

**DA LABORATORIO HLA A LABORATORIO DI IMMUNOGENETICA: UNO DEI SEGNI DEL DINAMISMO DEL LABORATORIO D'ISTOCOMPATIBILITÀ**

**LA BANCA DEL SANGUE CORDONALE: UNA RISPOSTA IMPORTANTE ALLA CRESCENTE DOMANDA TRAPIANTOLOGICA**

L. Salvaneschi  
Pavia

**Principi fondamentali che sono alla base della donazione di sangue placentare:**

- La donazione è volontaria:

Il sangue placentare non può essere donato senza il consenso informato della madre, poiché: il tessuto placentare va considerato di appartenenza materna e neonatale; la raccolta è effettuata quando la placenta è ancorata all'utero; il rischio infettivo e genetico della donazione di sangue placentare può essere controllato solo attraverso la partecipazione attiva della madre.

- La donazione è anonima:

Pur con rigorose chiavi di accesso, deve essere comunque mantenuta la possibilità di risalire al donatore, per mettere a disposizione dello stesso il sangue placentare precedentemente donato, in caso di insorgenza di una patologia onco-ematologica con indicazione al trapianto. Anche nel caso in cui si venga a conoscenza di malattie a possibile trasmissione genetica, insorte nel neonato dopo l'avvenuta validazione del sangue placentare, deve essere possibile accedere all'identificazione dell'unità per la necessaria eliminazione dal registro.

- Sicurezza infettiva e genetica della donazione:

La sicurezza che la donazione non sia fonte di malattie genetiche e virali deve essere confermata dopo un periodo di osservazione (quarantena della donazione) da due a sei mesi.

- Tutela delle gravide e del personale:

La raccolta deve essere eseguita in sala parto in un clima di sicurezza assoluta sia per le partorienti sia per il personale addetto. Il consenso della partorienti alla donazione non obbliga il personale addetto alla raccolta qualora le circostanze al momento del parto siano sfavorevoli.

- Estraneità di interessi economici o commerciali:

Nessun interesse economico deve interferire con l'attività di raccolta né per il donatore né per chi esegue la raccolta stessa. Il responsabile della Banca di cellule placentari deve vigilare sulle modalità di utilizzo delle donazioni.

La raccolta del sangue del cordone ombelicale si esegue quando:

- un paziente pediatrico affetto da patologie per le quali vi è l'indicazione per il trapianto di progenitori emopoietici (ad esempio: LLA in seconda remissione, linfomi, neuroblastomi, insufficienze midollare o immunodeficienze) ha la possibilità di disporre del sangue cordonale di un fratello (donazione dedicata);

- viene organizzata la sistematica raccolta e conservazione di unità di sangue del cordone ombelicale allogeniche (*unrelated*) da parte di una struttura, autorizzata dalla Regione di appartenenza, che assume le funzioni di Banca.

Fino dai primi trapianti effettuati fu evidente che:

- il sangue cordonale poteva essere criopreservato, caratterizzato e conservato in strutture apposite, le Banche di cordone,

- che la creazione di tali banche avrebbe permesso di rendere disponibile, a richiesta, unità di cellule staminali a tipizzazione HLA nota, indipendentemente dai limiti geografici in cui le Banche stesse si trovano ad operare.

Il primo passo per la realizzazione di Banche di sangue del cordone ombelicale è stata la formulazione di criteri scientifici oggettivi con cui esse devono operare. La prima Banca fu organizzata al New York Blood Center nel 1992; l'Italia si è distinta per l'organizzazione della prima Banca al Policlinico di Milano e per aver individuato l'esigenza di creare anche un centro di riferimento, GRACE (Gruppo per la Raccolta ed Amplificazione di Cellule Emopoietiche), per coordinare l'attività di altre Banche che volessero avviare questa attività nel Paese.

È sorta successivamente un'organizzazione scientifica internazionale, denominata NETCORD, che ha coordinato la formulazione e la diffusione di criteri operativi razionali tra tutte le Banche di cordone.

**Unità imbankate e rilasciate al 31.12.2004**

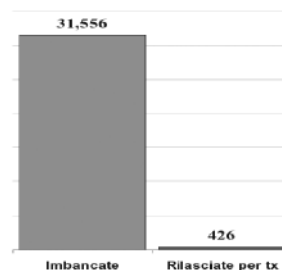


Figure 1.

**Totale unità rilasciate per trapianto al 31.12.2004 suddivise per banca**

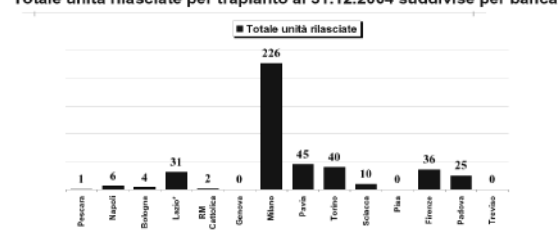


Figure 2.

**Unità rilasciate al 31.12.2004 suddivise per banca e tipologia**

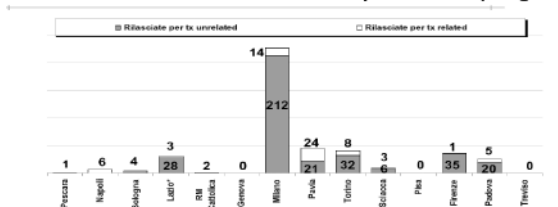


Figure 3.

**ANNO 2003 e 2004 Numero di unità rilasciate per trapianto UNRELATED**

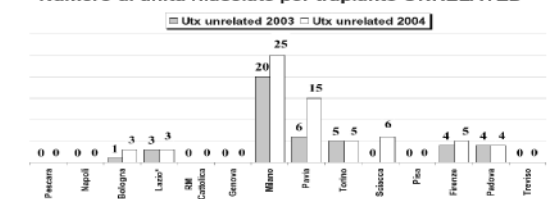


Figure 4.

**Raccolta dei dati relativi al trapianto di cellule staminali placentari**

I dati relativi all'esecuzione della procedura trapiantologica da cellule staminali cordonali sono raccolti secondo il form elaborato dallo Eurocord Transplant Group e centralizzati presso il Registro di Parigi.

Le Banche appartenenti al network italiano ITALGRACE, con periodicità mensile, comunicano l'elenco delle unità cedute per trapianto alla Milano CBB, la quale provvede ad inoltrarlo ad EUROCORD. EUROCORD provvede a fornire, con il tramite della Milano CBB, i dati relativi al follow-up dei pazienti trapiantati con le unità di CB cedute (tempo di attecchimento dei

neutrofili e delle piastrine, chimerismo e GVHD, percentuali di sopravvivenza e segnalazioni di eventuali reazioni avverse associate all'infusione delle unità di CB).

Le Banche provvedono a conservare, a tempo indefinito, l'intera documentazione relativa ad ogni singola unità stoccata (dal consenso-arruolamento fino al follow-up post-trapianto), registrando le modificazioni dello stato sacca e comunicandole alla Milano CBB.

L'attività di bancaggio e di rilascio delle unità di sangue placentare ha assunto in Italia una rilevanza notevole, come attestato dai dati evidenziati nelle Figure 1-4, che verranno commentati con riferimento alle ricadute cliniche.

#### ALLOREATTIVITÀ NK NEL TRAPIANTO EMATOPOIETICO APOLOIDENTICO

A. Velardi

Sezione di Ematologia ed Immunologia Clinica, Università di Perugia

Il trapianto incompatibile per un aplotipo HLA (aploidentico) è necessario poiché molti pazienti affetti da leucemia non trovano un donatore compatibile (familiare o unrelated). Nei trapianti incompatibili l'alloreattività mediata dai linfociti T è causa di GVHD letale. Solamente trapianti di alti numeri di cellule staminali estensivamente depletate di linfociti T attecchiscono attraverso la barriera HLA senza causare GVHD (Aversa *et al.*, NEJM 1998 e JCO 2005). Tuttavia alla deplezione dei linfociti T si possono ascrivere le principali cause di fallimento del trapianto: recidiva leucemica e infezioni. Il lento recupero dell'immunità verso patogeni è responsabile di un 35% di mortalità infettiva.

Nel tentativo di sviluppare nuove strategie per proteggere i pazienti dalle recidive e dalle infezioni senza causare GVHD, sono state studiate le potenzialità delle cellule Natural Killer (NK). Le cellule NK sono attivabili da vari recettori attivatori, ma non uccidono le cellule autologhe perché co-esprimono recettori inibitori che riconoscono molecole MHC di classe I self. Nell'uomo, recettori Ig-like (KIR) sono specifici per epitopi condivisi da gruppi di alleli HLA di classe I. Dal momento che i KIR sono distribuiti in maniera clonale, alcune cellule NK nel repertorio di un donatore sono alloreattive verso cellule target del ricevente che non possiede l'allele HLA di classe I che le inibisce.

In modelli murini, cellule NK alloreattive del donatore verso il ricevente: 1) eliminano le cellule leucemiche, 2) eliminano le cellule T dell'ospite, causa di rigetto del trapianto, 3) non causano GVHD, ma 4) proteggono dalla GVHD mediata da cellule T, eliminando le cellule presentanti l'antigene (APC) dell'ospite, che attivano la GVHD.

Il trial clinico comprendente 178 trapianti da donatore aploidentico per pazienti con leucemia acuta ha dimostrato che le risposte allojeniche del donatore verso il ricevente mediate da cellule NK riducono drasticamente il rischio di recidive in pazienti affetti da AML, facilitano l'attecchimento e proteggono dalla GVHD (Ruggeri *et al.*, Science 2002; analisi aggiornata al 2006).

Dati recenti (Ruggeri *et al.*, manoscritto in preparazione) mostrano come reazioni allojeniche NK, nel topo, promuovano una brusca accelerazione della ricostituzione immunologica di cellule T, B e DC e, nel trapianto umano, in analisi multivariata, siano l'unico fattore indipendente, statisticamente significativo, associato a protezione da mortalità infettiva. Stiamo investigando attivamente, e presenteremo i dati disponibili, circa i meccanismi di questo inatteso effetto NK sulla ricostituzione immunologica.

#### TERAPIA GENICA PER IL CONTROLLO DELLE REAZIONI AVVERSE NEL TRAPIANTO DELLE CELLULE STAMINALI EMPOIETICHE

C. Bonini,<sup>1</sup> F. Ciceri,<sup>1</sup> M. T. Lupo Stanghellini,<sup>1</sup> A. Bondanza,<sup>1</sup> Z. Magnani,<sup>1</sup> S. Perna,<sup>1</sup> M. Bernardi,<sup>1</sup> J. Peccatori,<sup>1</sup> A. Pescarollo,<sup>1</sup> P. Servida,<sup>1</sup> F. Crippa,<sup>2</sup> L. Callegaro,<sup>1</sup> L. Vago,<sup>3</sup> K. Fleischhauer,<sup>3</sup> M. Salomoni,<sup>3</sup> L. Turchetto,<sup>3</sup> S. Toma,<sup>3</sup> C. Traversari,<sup>3</sup> P. Bruzzi,<sup>4</sup> L. Castagna,<sup>5</sup> A. Santoro,<sup>5</sup> J. Apperley,<sup>6</sup> S. Slavin,<sup>7</sup> S. Colombi,<sup>3</sup> C. Gallo Stampino,<sup>3</sup> M. Bregni,<sup>1</sup> C. Bordignon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology, H.S.Raffaele, Milano, Italy; <sup>2</sup>Infectious Disease, H.S.Raffaele, Milano, Italy; <sup>3</sup>MolMed SpA, Milano, Italy; <sup>4</sup>Epidemiologia Clinica, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italy; <sup>5</sup>Hematology, IC Humanitas, Rozzano, Italy; <sup>6</sup>Hematology, Hammersmith H, London, United Kingdom and <sup>7</sup>BMT Unit, Hadassah H, Jerusalem, Israel

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (allo-SCT) è stato il primo ed è tuttora il più efficace esempio di immunoterapia dei tumori. Nel contesto di allo-SCT l'infusione di linfociti del donatore (DLI) offre diversi vantaggi: è responsabile di un effetto diretto nei confronti della malattia (graft-versus-leukemia-GvL) e permette una rapida ricostituzione immunologica, in grado di ridurre l'incidenza e la mortalità delle complicanze infettive (graft-versus-infection-GvI). Sfortunatamente, la DLI è spesso causa di una complicanza letale nota come graft-versus-host disease (GvHD). L'equilibrio tra GvL, GvI e GvHD è difficile da raggiungere e mantenere, specialmente nei trapianti da donatore non convenzionale, come il trapianto da donatore familiare aploidentico, ove il rischio di GvHD associato all'infusione di linfociti di donatore rende la procedura impraticabile. Al fine di massimizzare l'indice terapeutico dei linfociti di donatore nel contesto del trapianto da donatore aploidentico, il nostro gruppo ha disegnato una strategia di terapia genica basata sull'ingegnerizzazione dei linfociti del donatore con un vettore che codifica per la timidina chinasi dell'Herpes Simplex Virus (TK). I linfociti TK diventano selettivamente sensibili a morte a seguito della somministrazione di ganciclovir (GCV) e possono essere quindi eliminati in caso di GvHD. Riportiamo i risultati di un protocollo clinico multicentrico di fase I-II (MMTK007) sponsorizzato da Molmed basato sull'infusione precoce dei linfociti TK, finalizzata ad ottenere una rapida immunoricostituzione ed un controllo selettivo della GvHD in pazienti sottoposti ad aplo-trapianto per la cura di leucemie ad alto rischio. Il protocollo ha arruolato 29 pazienti (mediana d'età: 52 anni) e 17 pazienti hanno ricevuto linfociti TK alla dose di 107/kg 42 giorni dopo aplo-trapianto. Quattordici pazienti hanno ottenuto una rapida immunoricostituzione, con una mediana di 144 linfociti CD3+/mcl al giorno 100 post-trapianto. Le cellule geneticamente modificate sono state identificate *ex vivo* in tutti i pazienti immunoricostituiti e hanno rappresentato il 48% (10-90) delle cellule CD3+ circolanti. Cinque pazienti hanno sviluppato una GvHD acuta (grado I-IV) che è stata sempre controllata con ganciclovir. La qualità dell'immunoricostituzione è stata analizzata alla comparsa di  $\geq 100$  CD3/mcl (tempo dell'immunoricostituzione-IR) e 6 mesi dopo il trattamento. L'analisi del repertorio immunologico T, effettuata tramite spectratyping delle catene, del TCR ha mostrato un repertorio ampio già all'IR ed una normalizzazione, nel 79% dei casi, 6 mesi post-trattamento. L'analisi fenotipica ha mostrato un quadro di linfociti a fenotipo attivato, *effector memory*, prevalentemente Th1/Tc1 all'IR. L'analisi a 6 mesi ha mostrato che solo il 50% dei linfociti circolanti aveva ancora un fenotipo attivato *effector memory*, mentre la restante parte dei linfociti era composta di cellule naïve e *central memory*. L'analisi funzionale effettuata con ELISpot per  $\gamma$ IFN dopo stimolo policlonale ha mostrato una mediana di 147 e 261 spots/105 cellule mononucleate (PBMC) rispettivamente all'IR e a 6 mesi. È stato inoltre possibile rilevare un numero elevato di linfociti specifici per patogeni opportunisti già all'IR (mediana di 84 e 58  $\gamma$ IFN spots/105 PBMC specifici per antigeni di citomegalovirus-CMV e del virus di Epstein-Barr-EBV). Il rilievo di  $\geq 50$  spots specifici per CMV o

EBV su 105 PBMC è risultato protettivo nei confronti delle riattivazioni virali ( $p=0.002$ ). In accordo con i risultati immunologici, rispetto ai controlli storici, abbiamo osservato una riduzione significativa delle complicanze infettive e della mortalità tardiva da trapianto (ultimo evento al giorno +166 dopo HSCT) ed un miglioramento delle sopravvivenza globale.

#### LA COOPERAZIONE INTERNAZIONALE DELLA FONDAZIONE IME: RICADUTE IN CAMPO SANITARIO E NEGLI STUDI DI GENETICA DI POPOLAZIONE

M. Testi, M. Andreani, G. Federici, G. Lucarelli

Laboratorio di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti, Fondazione IME c/o Policlinico Tor Vergata, Roma

Con lo scopo di valorizzare il know-how italiano maturato in campo ematologico e parallelamente per creare le condizioni organizzative tecniche ed economiche che rispondano al bisogno di trattamenti di alta specializzazione come il trapianto di midollo osseo (TMO) ai pazienti affetti da talassemia, il 28 marzo 2003 nasce l'Istituto Mediterraneo di Ematologia (IME). Dal punto di vista istituzionale l'IME è una fondazione che ha come soci fondatori il Ministero della Salute, degli Affari Esteri, dell'Economia e delle Finanze e la Regione Lazio, con i seguenti scopi:

a) attivare un centro di eccellenza e di alta specializzazione con sede a Roma per la cura e la ricerca sulle malattie ematiche e per il trattamento e lo studio della talassemia e delle emoglobinopatie;

b) realizzare un progetto a rete che promuova le relazioni e l'integrazione di strutture italiane e estere, in particolare del bacino del Mediterraneo, specializzate nella ricerca, trattamento e formazione in campo sanitario con particolare riferimento all'ematologia, inclusa la talassemia.

La talassemia è una malattia ereditaria caratterizzata da un difetto nella sintesi dell'emoglobina; i pazienti affetti da beta talassemia major per sopravvivere devono sottoporsi a specifici trattamenti sanitari. Il trattamento tradizionale consiste in trasfusioni di sangue, con cadenza di norma quindicinale. Da circa 25 anni, oltre al trattamento tradizionale, i pazienti talassemici possono essere sottoposti al trapianto di midollo osseo. Dall'analisi dei dati risulta che nel 68% dei pazienti talassemici complessivamente trattati il trapianto ha avuto esito positivo. Ciò significa che anche a distanza di 10 o 20 anni dal trapianto, il 68% dei pazienti è stato curato e può condurre una vita normale. Le stime sulla diffusione delle emoglobinopatie rivelano che nel mondo esistono più di 300 milioni di persone portatrici di tali disordini e che ogni anno 300.000-400.000 nati si presentano affetti dalle forme più gravi di tali disordini. I paesi più interessati da questo problema sono quelli del Medio Oriente, del Nord Africa, subcontinente Indiano ed il Sud-Est asiatico. Alcuni paesi come Egitto, Palestina, Libano, Siria, Iraq, Maldive hanno siglato con la fondazione IME un *Memorandum of Understanding* per realizzare un progetto di cura, ricerca e formazione sul trapianto di midollo osseo nella talassemia. Pertanto al laboratorio di tipizzazione tissutale della fondazione IME, situato presso il Policlinico Universitario di Tor Vergata di Roma, pervengono, mediante spedizioni opportunamente organizzate, campioni di sangue di nuclei familiari per l'esecuzione della tipizzazione tissutale HLA. In questo scenario è possibile valutare la distribuzione dei diversi alleli e aplotipi HLA nelle diverse popolazioni. Dal giugno 2005 ad oggi sono stati inviati al laboratorio dell'IME circa 2000 campioni per la ricerca di un donatore compatibile per pazienti talassemici all'interno dei nuclei familiari. Di ogni nucleo familiare è stata eseguita la tipizzazione HLA e lo studio della segregazione aplotipica. I dati ottenuti sono stati elaborati al fine di valutare le frequenze alleliche e aplotipiche nelle diverse popolazioni.

#### IL TRAPIANTO DI RENE IN CONDIZIONI PROBLEMATICHE

##### TRAPIANTO RENALE 2006: STRATEGIE IMMUNOGENETICHE

M. Savi, A. Zanetti, S. Giuliodori, P. Zanelli

Sezione e UO di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera, Università di Parma

L'esito di un trapianto renale è oggi una funzione di molteplici fattori tra i quali spiccano ancora quelli di natura immunogenetica nonostante le moderne terapie immunosoppressive abbiano mutato radicalmente le prospettive di sopravvivenza sia del paziente che dell'organo trapiantato. Ciò, se da una parte ha indotto alcune organizzazioni a non tenere più conto, almeno nei primi trapianti, della compatibilità HLA dall'altra ha contribuito a far emergere la sua fondamentale valenza in caso di ritrapianti o di riceventi immuni/iperimmuni. Non solo, in questi pazienti accanto alla compatibilità HLA, un ruolo importante riveste lo studio approfondito dei sieri con più metodiche, a sensibilità e specificità diversificate: linfocitotossicità complemento dipendente (CDC), ELISA, Citofluorimetria. In tutte le liste di attesa, inclusa quella della regione Emilia-Romagna, ambito AIRT, a cui la nostra esperienza si riferisce, si è assistito con il passare degli anni e forse proprio come conseguenza delle migliorate possibilità terapeutiche oggi disponibili, ad un aumento dei pazienti con ritrapianto e/o iperimmunizzati (PRA  $\geq 80\%$ ) o comunque con alti livelli di anticorpi anti HLA (PRA 50-70%). Si è quindi posto il problema della loro gestione e delle strategie da adottare per assicurarne comunque la trapiantabilità. La via maestra, anche sulla scorta dei dati della letteratura, è sembrata quella della ottimale caratterizzazione del profilo immunogenetico di ogni ricevente. A questo proposito è stata introdotta nella pratica routinaria, la determinazione molecolare degli antigeni HLA dei pazienti in lista di attesa, e di tutti i possibili donatori, al fine di disporre di typing allelici su cui valutare la compatibilità nelle coppie D-R. Inoltre è stato attuato uno studio approfondito dei sieri dei candidati al trapianto basato sull'utilizzo accanto alla metodica base (CDC), della citometria a flusso con tecnologia Luminex. Questo approccio ha consentito una analisi dettagliata degli anticorpi preformati e la costruzione di un profilo individuale nei pazienti immuni/iperimmuni, permettendo sia la valutazione prospettica della classe immunoglobulinica (IgG o IgM) degli anticorpi sia una più precisa reattività contro pannello (PRA) sia una determinazione delle specificità anticorpali verso antigeni HLA di Classe I e di Classe II. La classe immunoglobulinica risulta infatti determinante per valutare il significato funzionale degli anticorpi anti HLA: solo le IgG sono dannose e mediano il rigetto mentre le IgM sono prevalentemente autoanticorpi privi di effetto sul trapianto. Il valore del PRA esprime l'ampiezza della risposta anticorpale verso gli antigeni di trapianto e la determinazione del tipo e della specificità degli anticorpi rivolti contro antigeni HLA di Classe I e II riveste un ruolo cruciale nei pazienti immunizzati e nei ritrapianti. La conoscenza delle specifiche caratteristiche della sensibilizzazione nei soggetti immunizzati ha consentito l'adozione di strategie di selezione mirate su ogni singolo paziente che ne hanno aumentato la probabilità di trapianto. Le informazioni così raccolte hanno poi permesso di costruire una lista interregionale di iperimmuni con lo scopo di offrire a questi pazienti un più vasto pool di donatori e quindi di favorirne la trapiantabilità.

##### IL TRAPIANTO DI RENE IN CONDIZIONI PROBLEMATICHE RICEVENTI IPERIMMUNIZZATI

A. Buscaroli, D. Conte, M.L. Cappuccilli, S. Stefoni

U.O. Nefrologia Dialisi e Trapianto, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna

Uno dei problemi più scottanti nel campo del trapianto renale è rappresentato dai pazienti immunizzati la cui presenza nelle liste d'attesa può arrivare a rappresentare fino al 30-40% dei can-