UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Ch.mo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

Validazione di una metodica di tipizzazione HLA con tecnologia SSO Luminex®

per l'introduzione in diagnostica

Relatore: **Dr.Piero Marson**

Correlatori: **Dr.ssa Maria Paola Albergoni**

Dr.ssa Maria Sofia Nigro

Laureanda: **Beatrice Parisatto**

Matricola **2094988**

Anno Accademico 2024 – 2025

Ringrazio il Dr.Piero Marson, per avermi trasmesso la curiosità di approfondire argomenti e settori a me sconosciuti. Con grande disponibilità ha accolto la richiesta di lavorare a questa tesi nel Laboratorio Immunotrasfusionale. Grazie per aver dimostrato presenza ed interesse durante i mesi di attività di tirocinio e per aver comunicato con rispetto, e spesso con leggerezza, lezioni di vita.

Ringrazio tutto il personale dell'UOC Immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedale Università di Padova e in particolare quello del Laboratorio HLA. Grazie alla disponibilità di Maria Paola e Sofia, sempre presenti e accoglienti. Durante la mia permanenza ho potuto imparare molto dal punto di vista tecnico-professionale, facendone tesoro per il futuro, soprattutto grazie all'assistenza e pazienza di tutto lo staff del laboratorio HLA. Grazie per avermi accolta, apprezzata e per aver condiviso anche con me il lavoro quotidiano.

Cari *Fuoridallab*, non potete mancare nemmeno stavolta. Mi avete accompagnata anche in questo percorso, restando aggiornati dalle prime intenzioni fino al termine. Grazie per avermi dato ancora una volta la possibilità di raccontare, condividere, scherzare, alleggerire certi momenti, ma soprattutto di sentirmi capita.

Maurizio, non credo basti un grazie a riassumere tutto ciò per cui ti sono grata. Questo percorso è stato anche frutto di una scelta condivisa, con conseguenze non banali per la nostra vita quotidiana. Ti ringrazio, perché hai sempre saputo darmi valore, apprezzarmi, tollerarmi e aiutarmi a proseguire, anche quando la fatica si faceva sentire più del solito.

Ringrazio la mia famiglia, indispensabile anche durante questo percorso. Spero la mia soddisfazione basti (al momento) a ripagarvi per il vostro sostegno.

Infine, un grazie lo devo anche a me stessa, per aver scelto di intraprendere questo percorso, investendo tempo ed energie e cercando di non perdere mai la determinazione per portarlo a termine.

Sommario

Abstract 1
1. Introduzione 3
1.1. Il sistema HLA 3
1.2. Nomenclatura del sistema HLA 5
1.3. Tecniche di tipizzazione HLA 5
1.4. *Sequence-specific primers* (SSP) 6
1.5. *Sequence-specific oligonucleotide* (SSO) 6
1.6. *Real-time* PCR 8
1.7. *Sequence-based Typing* (SBT) 9
1.8. *Next-Generation Sequencing* (NGS) 9
2. Scopo dello studio 10
3. Materiali e metodi 11
3.1. Raccolta campioni 11
3.2. Estrazione DNA genomico 11
3.3. Tipizzazione SSO Luminex 11
3.3.1. Amplificazione DNA 11
3.3.2. Ibridazione 12
3.3.3. Analisi dei campioni 13
3.4. Controllo di contaminazione (*Wipe test*) 15
4. Risultati 17
4.1. Tipizzazione SSO Luminex 17
4.2. *Wipe test* 24
5. Discussione 25
Bibliografia 29

Abstract

I geni che codificano per le molecole del sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) sono i geni più polimorfici del genoma umano. L'elevata variabilità allelica, che porta alla presenza di migliaia di alleli differenti, pone notevoli complessità nella procedura di tipizzazione, che è di fondamentale importanza in campo diagnostico, in quanto alla base della compatibilità dei trapianti di organo solido, di cellule staminali ematopoietiche, dell'associazione con determinate malattie e della farmacogenetica. Le metodiche attualmente disponibili si differenziano per il grado di risoluzione che può essere raggiunto nel determinare le caratteristiche HLA di un paziente. Le varie tecnologie, quali la metodologia SSO, SSP o il sequenziamento NGS, sono spesso integrate o impiegate alternativamente, a seconda del quesito diagnostico. In questo studio, si è proceduto alla validazione della metodica SSO Luminex ai fini dell'introduzione nella routine diagnostica della tipizzazione HLA, rivolta in particolar modo allo studio dell'associazione tra geni HLA e malattie, nonché al trapianto di organo solido. La tecnologia SSO Luminex si basa sul principio dell'ibridazione tra il DNA e sonde oligonucleotidiche adese a biglie in soluzione, rilevando emissione di fluorescenza in caso di reazione positiva. Per lo studio, sono stati impiegati campioni di DNA estratto da prelievo venoso, già precedentemente tipizzati con metodica ad alta risoluzione a scopo diagnostico. Sono stati testati 26 campioni per il locus HLA-B a bassa risoluzione e 35 campioni per i loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1 con risoluzione al secondo campo. La tipizzazione è risultata concordante al 100% per il locus B. Per i campioni testati per i loci precedentemente citati, si è rilevata una concordanza del 100% utilizzando le informazioni aggiuntive ad alta risoluzione fornite dal produttore. I risultati ottenuti hanno consentito l'introduzione in routine della metodica SSO Luminex, con il relativo kit di tipizzazione HLA SSO Lifecodes, confermando l'applicazione per la valutazione dell'associazione fra HLA e malattia e per il trapianto di organo solido.

Abstract

The Human Leukocyte Antigen (HLA) class I and II genes are the most polymorphic genes in the human genome. This wide allelic variability generates thousands of different alleles, making HLA typing a challenging activity. Indeed, HLA typing is a fundamental diagnostic activity, as it is necessary for solid organ transplantation, to understand the association between HLA and certain diseases, and for pharmacogenetics. Currently available techniques differ in the resolution level used to determine HLA features. Methods such as SSO technology, SSP, or NGS sequencing are often integrated or used alternatively, depending on the diagnostic query.

In this study, we validated the SSO Luminex technology to introduce it into HLA typing diagnostic routine, with specific application for the study of HLA-disease associations and solid organ transplantation. The SSO Luminex technology is based on the hybridization between DNA and beads coated with complementary probes in solution, generating a fluorescence emission upon positive reaction. For this study, we used genomic DNA from blood samples already typed for diagnostic purposes, with high-resolution methods. We tested the HLA-B locus in 26 samples at low resolution and the loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 in 35 samples at second-field resolution. Typing results were fully concordant with previous ones in 100% of samples tested for locus B. For the previously cited loci, concordance was 100% using high-resolution information provided by the manufacturer. These results allowed the introduction of SSO Luminex and the HLA SSO Lifecodes typing kit into diagnostic routine, confirming its application for solid organ transplantation and the study of HLA-disease associations.

1. Introduzione

1.1. Il sistema HLA

Il sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*) rappresenta un elemento cruciale nella difesa dell'organismo umano, nella suscettibilità a certe malattie e nei processi diagnostici e clinici riguardanti i trapianti, sia di organo solido, sia di cellule staminali ematopoietiche[1]. Il complesso sistema di molecole HLA espresse sulla superficie delle cellule immunitarie è codificato dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), localizzati sul braccio corto del cromosoma 6 e sede della più alta frequenza di polimorfismi nel genoma umano. L'elevato grado di variabilità dei geni del sistema HLA è dovuto principalmente a sostituzioni non sinonime fra alleli e mostra un notevole impatto nella specificità della presentazione dell'antigene e nell'istocompatibilità dei trapianti[2]. Il complesso HLA comprende più di 200 geni, ma quelli maggiormente coinvolti nella risposta immunitaria, o geni classici HLA, si possono raggruppare in due classi, HLA di classe prima (classe I) e HLA di classe II (classe II), diversi sia funzionalmente sia strutturalmente **(Figura 1**). Tali geni codificano per le catene polipeptidiche che compongono le molecole HLA, espresse in modo differente a seconda del tipo cellulare. In particolare, le molecole HLA di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate dell'organismo, mentre le molecole HLA di classe II sono espresse limitatamente alle cellule immunitarie responsabili della presentazione dell'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APC) (**Figura 2**).

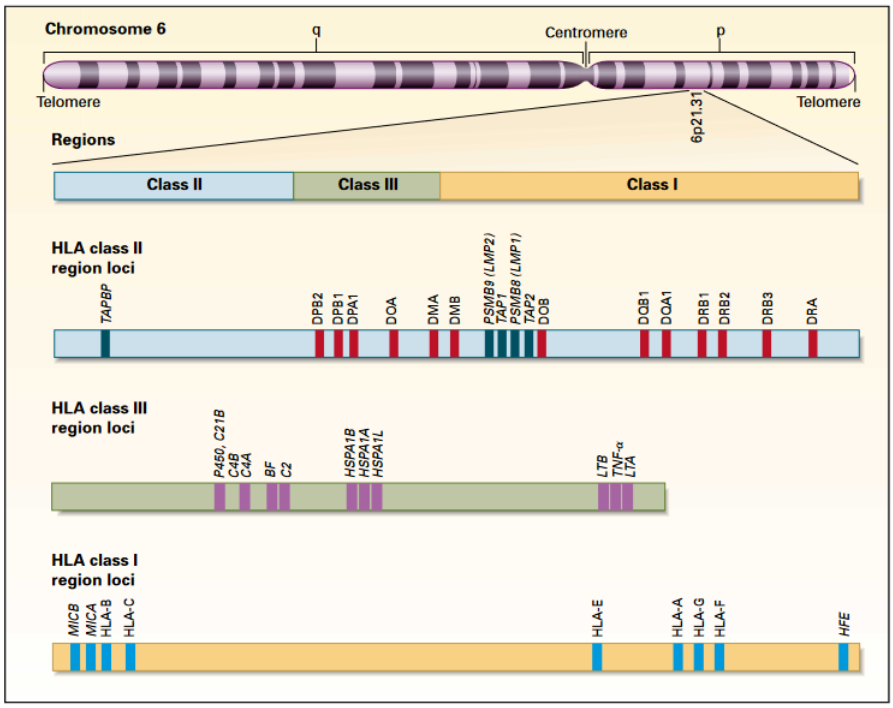

Figura 1. Organizzazione dei geni HLA.

Tratto da The HLA System — First of Two Parts. N Engl J Med. 2000 Sep 7;343(10):702-9. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.

In particolare, i geni della classe I codificano per la catena polipeptidica α delle molecole di classe I, mentre i geni della classe II codificano per le catene α e β delle molecole di classe II. Ogni molecola HLA è formata da quattro domini: il dominio di legame per il peptide, il dominio *immunoglobulin-like*, la regione transmembrana e la coda citoplasmatica[3]. Il dominio di legame per il peptide è fondamentale nella presentazione dell'antigene ai linfociti, in quanto il riconoscimento del determinante antigenico avviene nella tasca formata da tale dominio. Nelle molecole di classe I, la tasca per il peptide è formata da due domini della catena α, mentre nelle molecole di classe II, è formata da una catena α ed una catena β. Anche nelle molecole di classe I è presente una catena β, codificata dal gene per la β_2-microglobulina, localizzato sul cromosoma 15. I peptidi legati nella tasca del dominio extracellulare vengono presentati ai linfociti grazie all'interazione con il recettore delle cellule T (TCR), rispettivamente al TCR dei linfociti $CD8^+$ per le molecole HLA di classe I e al TCR dei linfociti $CD4^+$ per le molecole HLA di classe II. I geni particolarmente importanti sotto il profilo immunologico sono i geni HLA-A, HLA-B e HLA-C per la classe I ed i geni HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ per la classe II[1,3].

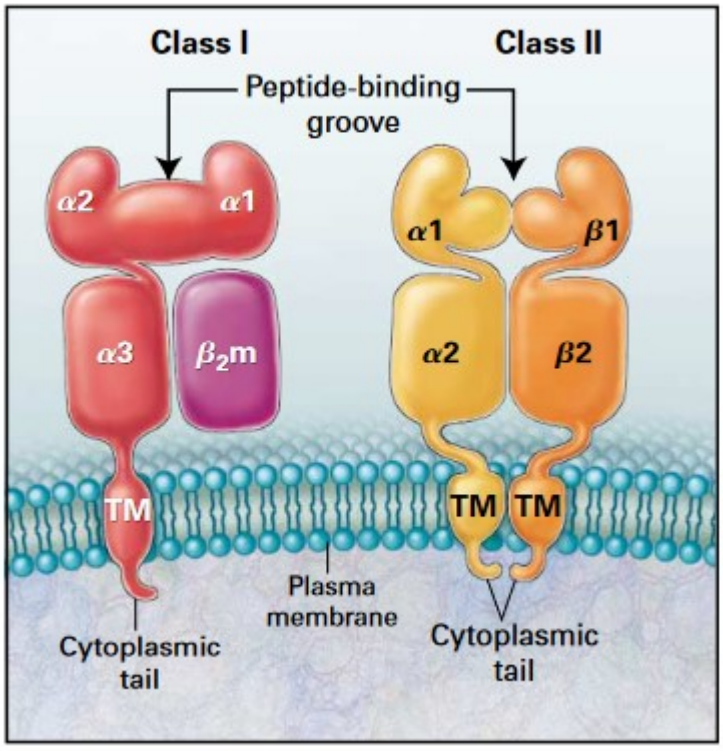

Figura 2. Struttura delle molecole HLA di classe I e II. La β_2-microglobulina (β_2-m) è la catena leggera delle molecole HLA di classe I. La catena α delle molecole di classe I possiede due domini leganti il peptide, un dominio *immunoglobulin-like*, una regione transmembrana (TM) ed una coda citoplasmatica. Ognuna delle catene α e β delle molecole di classe II possiede quattro domini: il dominio legante il peptide, un dominio *immunoglobulin-like*, una regione transmembrana (TM) ed una coda citoplasmatica.

Tratto da The HLA System — First of Two Parts. N Engl J Med. 2000 Sep 7;343(10):702-9. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.

1.2. Nomenclatura del sistema HLA

L'introduzione delle tecniche di biologia molecolare ha permesso di caratterizzare le specifiche combinazioni di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) presenti negli alleli dei geni HLA, permettendo così la transizione da una nomenclatura basata sulla componente sierologica delle molecole HLA ad una basata sul genotipo[1,4]. Questa nomenclatura segue un formato strutturato, definito da quattro campi numerici, ognuno di due o più cifre, separati da doppi punti. Il primo campo indica il gruppo allelico, il secondo campo discrimina alleli che, pur nello stesso gruppo, mostrano variazioni di una o più basi negli esoni. Il terzo campo distingue gli alleli con diversa sequenza nucleotidica, ma identica sequenza amminoacidica, mentre il quarto campo indica differenze negli introni o nelle regioni 5' o 3' UTR (*untraslated regions*) (**Figura 3**). La nomenclatura risulta ancora più completa con alcuni suffissi che indicano lo stato di espressione di uno specifico allele. La lettera "N", per esempio, identifica gli alleli "nulli", cioè non tradotti in proteina. La lettera "L" indica invece un'espressione ridotta sulla superficie cellulare[1]. Infine, gli alleli HLA con sequenza nucleotidica codificante per la stessa sequenza proteica del dominio di legame per il peptide sono denominati con i primi due campi della nomenclatura seguiti dalla lettera "P"[5].

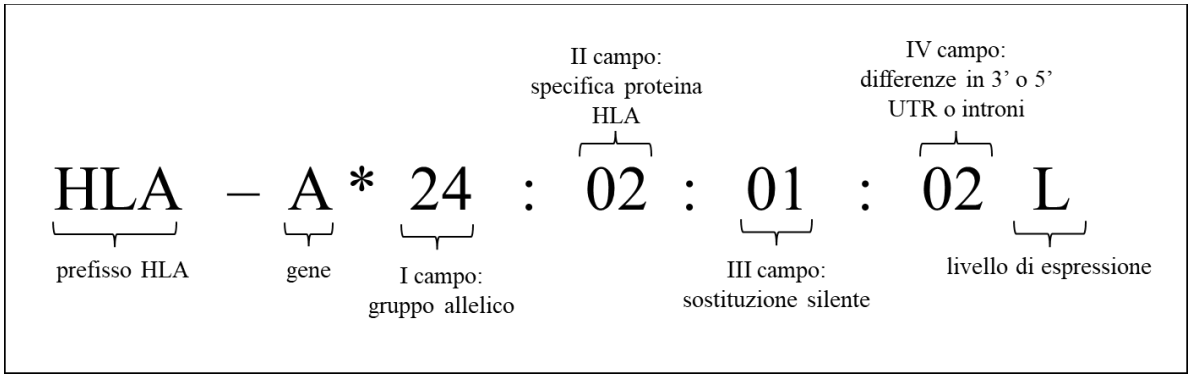

Figura 3. Nomenclatura HLA

1.3. Tecniche di tipizzazione HLA

La tipizzazione HLA è la pratica clinico-diagnostica fondamentale ai fini di un trapianto, in quanto assicura la compatibilità tra ricevente e donatore, evitando l'insorgenza di rigetto nel caso di organo solido e di *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) nel caso del trapianto di cellule staminali ematopoietiche[1]. Inoltre, numerose malattie autoimmuni e immunomediate sono state associate a specifici aplotipi e alleli HLA[6], così come alcune specifiche reazioni a farmaci, quali l'abacavir[7] e la carbamazepina[8]. Nel corso degli anni, diverse metodiche di tipizzazione sono state impiegate, a seconda della tecnologia disponibile o del livello di risoluzione desiderato. I primi metodi analitici erano basati sulla sierologia, ma lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare, in particolare la

reazione a catena della polimerasi (PCR), ha permesso una migliore caratterizzazione degli alleli HLA. In generale, le varie metodiche possono essere classificate in base al livello di risoluzione della tipizzazione, ovvero risoluzione bassa, alta con ambiguità o allelica. Una bassa risoluzione indica la capacità di determinare il gruppo allelico, l'alta risoluzione permette la determinazione dei primi due campi, mentre l'allelica di tutti i quattro campi di un allele.

1.4. *Sequence-specific primers* (SSP)

La tipizzazione mediante *primers* sequenza specifici (SSP) sfrutta specifici set di *primers* per l'amplificazione delle sequenze di interesse. I prodotti di PCR sono separati mediante gel di agarosio, dove la rilevazione di una banda mostra una reazione positiva, cioè la presenza di un determinato allele. Tale approccio permette di raggiungere una risoluzione alta con ambiguità, potendo fornire risultati riferiti, al più, al secondo campo di uno specifico allele. Tuttavia, la metodica SSP risulta poco spendibile su larga scala o per l'automazione, in quanto l'elevato numero di reazioni di PCR la rende complessa dal punto di vista operativo[1]. Inoltre, come tutte le metodiche basate sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche, l'SSP non consente di evitare le ambiguità, cioè le differenti combinazioni alleliche che coinvolgono alleli diversi, ma che presentano il medesimo *pattern* di sonde positive.

1.5. *Sequence-specific oligonucleotide* (SSO)

Un approccio alternativo ed integrativo alla tipizzazione SSP consiste nell'utilizzo di sonde oligonucleotidiche complementari alla sequenza genomica di interesse, in grado di ibridarsi con la sequenza in esame soltanto in caso di corretto appaiamento. Questo principio è alla base delle tecniche basate su oligonucleotidi sequenza-specifici (SSO). In passato, la metodica SSO prevedeva l'impiego dell'approccio *dot-blot*, ovvero l'amplificazione tramite PCR delle sequenze di interesse, l'immobilizzazione del prodotto di amplificazione su membrana e l'ibridazione con una sonda marcata con biotina. La rivelazione del segnale avveniva grazie alla presenza di streptavidina e ad un colorante cromogeno. Questo metodo, seppur informativo e robusto, richiedeva l'impiego di un numero elevato di sonde e di reazioni di ibridazione separate, quindi, è stato successivamente sostituito dall'approccio *reverse dot-blot*, ovvero l'amplificazione tramite PCR con *primers* biotinilati e l'ibridazione dell'amplificato con sonde immobilizzate su una membrana. Nel tempo, sempre più sonde sono state aggiunte alle membrane, consentendo la rilevazione di un numero maggiore di polimorfismi. Inoltre, grazie all'evoluzione tecnologica della metodica, l'ibridazione su membrana di nylon è stata sostituita da quella su biglie[9], a sua volta declinata in differenti protocolli, attualmente disponibili sul mercato:

- tecnologia Luminex®: vengono utilizzate delle microsfere di polistirene, anche dette biglie, marcate con fluorofori rossi ed infrarossi, incorporati in proporzioni diverse nelle diverse biglie. Ogni biglia è ricoperta da più copie di una diversa sonda oligonucleotidica, alla quale il DNA amplificato può ibridarsi in soluzione. Il processo può avvenire in una piastra da 96 pozzetti, dove ogni singolo locus viene testato in un pozzetto, ciascuno dei quali contenente un campione e una miscela di circa 100 biglie. Potenzialmente, è quindi possibile testare 96 pazienti simultaneamente con una sola piastra (**Figura 4**). Il DNA amplificato legato alle microsfere viene successivamente miscelato ad una soluzione di streptavidina- ficoeritrina, in modo da rilevare il segnale fluorescente. L'analisi del segnale, svolta da un analizzatore automatico basato sul principio della citometria a flusso, avviene grazie a due laser presenti nello strumento. Il risultato può essere usato per determinare i possibili alleli HLA presenti nel DNA amplificato. Nel tempo, la tecnologia Luminex® è stata implementata introducendo strumentazioni con capacità risolutive sempre maggiori, grazie a nuove combinazioni di microsfere. Attualmente, la tecnologia Luminex 2D® e Luminex 3D® sono le due metodiche di acquisizione ed analisi più diffuse ed utilizzate. La prima consente di analizzare fino a 100 biglie, ognuna delle quali è codificata da due colori, in modo da emettere nella lunghezza d'onda del rosso e dell'infrarosso. A seconda dei *kit* in commercio, il numero di biglie disponibili può essere superiore a 100 grazie all'aggiunta di una miscela di microsfere addizionali denominata solitamente eRES. Questa strategia consente di incrementare il numero di sonde specifiche e risolvere più ambiguità. La tecnologia Luminex 3D® invece, consente di analizzare fino a 500 biglie diverse, servendosi di un terzo colore per la marcatura delle biglie. Ad ogni biglia corrisponde un'unica fluorescenza di rosso, infrarosso ed infrarosso esteso rendendone possibile l'identificazione univoca[10]. In generale, la tecnologia Luminex® risulta idonea per lo studio di un elevato numero di campioni in tempi relativamente brevi, implementando la processività per la tipizzazione HLA per trapianto di organo solido e per l'associazione fra HLA e malattie.

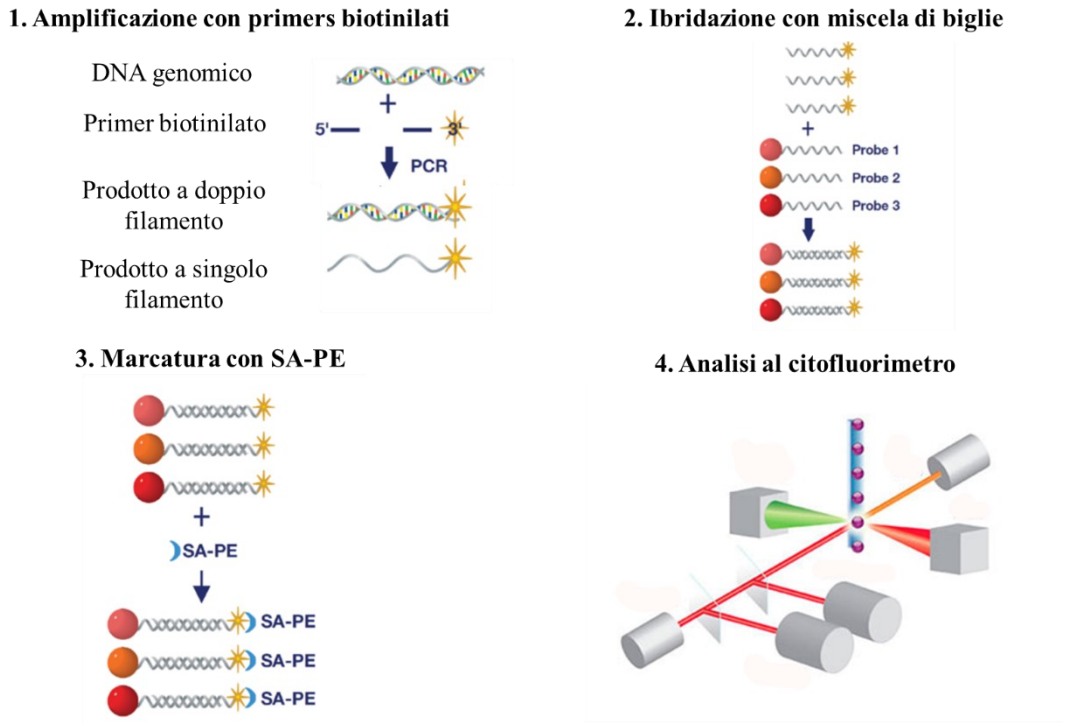

Figura 4. Fasi del protocollo SSO Luminex®

Tratto dal sito https://transfusionandtransplant.werfen.com/it/ (archiviato al 17/08/2025 https://web.archive.org/web/20250817140857/https://transfusionandtransplant.werfen.com/it/)

- Sistema HISTO SPOT® SSO: in questo approccio, successivamente all'estrazione ed amplificazione del DNA di interesse, l'ibridazione avviene su un supporto solido, grazie alla presenza di sonde oligonucleotidiche adese al fondo di un pozzetto. Le sonde possono essere singole o in combinazione, immobilizzate nello stesso pozzetto, in modo da incrementare la risoluzione. La reazione tra amplicone marcato con biotina e sonde complementari può essere evidenziata da una reazione colorimetrica. Il *pattern* di punti colorati ottenuti sul fondo di ciascun pozzetto viene fotografato dallo strumento ed analizzato dal relativo *software* per ricondurlo agli alleli presenti nel campione. Questa metodica viene principalmente impiegata per ottenere una tipizzazione di risoluzione bassa o alta con ambiguità nel settore della trapiantologia[11].

1.6. *Real-time* PCR

La tipizzazione mediante *real-time* PCR prevede l'amplificazione delle sequenze HLA di interesse mediante *primers* marcati con fluorofori, che consentono la rilevazione di segnali di fluorescenza utilizzati per stabilire l'assetto allelico. La metodica di *real-time* PCR offre la possibilità di svolgere l'amplificazione, l'ibridazione e la rilevazione del segnale all'interno dello stesso strumento e risulta più rapida di altri approcci dal punto di vista operativo.

Tuttavia, è considerata una tecnica a risoluzione bassa, in quanto fornisce risultati limitati al primo campo, con una definizione al secondo campo degli alleli più frequenti[12].

1.7. *Sequence-based Typing* (SBT)

La tipizzazione basata sulla sequenza consiste nell'amplificazione degli esoni di interesse e del sequenziamento di tipo *Sanger*, cioè mediante di-deossinucleotidi terminatori ed elettroforesi capillare. Analizzando l'intera sequenza esonica, l'approccio SBT è in grado di identificare variazioni a livello nucleotidico non ancora note, limitatamente agli esoni analizzati. Solitamente, infatti, l'analisi si focalizza sulle sequenze del sito di riconoscimento dell'antigene (ARS), ma la presenza di polimorfismi all'esterno di tali sequenze può portare a risultati ambigui. La metodica non è indicata per la tipizzazione su larga scala, a causa dell'elevato lavoro manuale associato[1].

1.8. *Next-Generation Sequencing* (NGS)

La tipizzazione HLA tramite NGS rappresenta l'avanzamento maggiore nella capacità risolutiva, in quanto consente una caratterizzazione estesa del genoma e una risoluzione elevata. Inoltre, l'approccio NGS permette il sequenziamento di interi geni e la comprensione della fase dei polimorfismi, distinguendo fra mutazioni -*cis* e -*trans*. La tecnologia NGS può essere sfruttata per l'analisi di alti numeri di campioni, consentendo l'abbattimento del costo economico e tempo-lavoro di una seduta. Tuttavia, presenta una notevole complessità tecnica, soprattutto nel caso della mancanza di automazione di supporto, strumentazione dedicata e personale con esperienza. La procedura può richiedere dai due ai tre giorni di lavoro per ottenere il risultato, quindi non risulta idonea in situazioni di urgenza, quale per esempio la tipizzazione di donatori deceduti[13].

2. Scopo dello studio

Le procedure rivolte alla tipizzazione dei geni HLA sono indispensabili ai fini della decisione clinica inerente ad un trapianto, sia esso di organo solido o di cellule staminali ematopoietiche. Infatti, la caratterizzazione dal punto di vista genetico del ricevente e dei potenziali donatori consente di trovare l'abbinamento più idoneo e di evitare gravi conseguenze del trapianto. Inoltre, la tipizzazione di specifici geni del sistema HLA è di aiuto nella comprensione dell'associazione tra determinate malattie di origine autoimmune oppure immunomediate con specifiche forme alleliche.

Questo studio ha lo scopo di descrivere la validazione della metodica SSO Luminex, valutando le potenziali applicazioni nella diagnostica di laboratorio, la concordanza dei risultati ottenuti con dati precedentemente ricavati con altre metodiche e l'idoneità del flusso di lavoro tecnico-manuale richiesta dal metodo. Queste valutazioni sono finalizzate poi all'inserimento nella routine diagnostica del laboratorio HLA per la tipizzazione relativa al trapianto di organo solido e per lo studio di associazione fra HLA e malattie.

3. Materiali e metodi

3.1. Raccolta campioni

Ai fini della validazione è stato utilizzato DNA genomico estratto da 53 campioni di sangue intero, presenti presso il Laboratorio HLA dell'U.O.C Immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedale Università di Padova per scopi diagnostici. Sono stati inoltre impiegati 8 controlli di qualità esterni, derivanti da *buffy coat*, (Istituto Superiore di Sanità) precedentemente testati in laboratorio. I pazienti avevano preliminarmente dato il consenso all'utilizzo del proprio campione biologico per tipizzazione genomica e per scopi di ricerca. I campioni di sangue intero sono stati raccolti in provette con anticoagulante EDTA e conservati a +4°C per un massimo di sette giorni.

3.2. Estrazione DNA genomico

Per la tipizzazione dei campioni in esame è stato utilizzato il kit commerciale di tipizzazione HLA-SSO Lifecodes (Werfen, Barcellona, Spagna), Come da indicazioni del fornitore, il DNA genomico è stato estratto dai campioni di sangue intero utilizzando il kit QIAsymphony DSP DNA Midi Kit (Qiagen; Hilden, Germania) e l'estrattore automatico QIAsymphony SP (Qiagen; Hilden, Germania). La concentrazione e la qualità del DNA estratto sono stati misurati con lo spettrofotometro Nanophotometer N120 (Implen GmbH, Monaco, Germania). Sono state ottenute concentrazioni di DNA comprese nell'intervallo tra 10 ng e 200 ng/µl ed i valori di assorbanza dei campioni di DNA rilevati a 260 e a 280 nm, per questa metodica, sono ritenuti validi se il rapporto 260/280 è compreso nell'intervallo tra 1,65 e 2,00. Le concentrazioni di DNA e i relativi codici di riferimento dei pazienti sono stati riportati nel foglio di calcolo a celle protette opportunamente predisposto dall'azienda fornitrice dello stesso *kit*, in modo tale da calcolare le eventuali diluizioni di DNA necessarie per ottenere una normalizzazione della concentrazione a 20 ng/µl.

3.3. Tipizzazione SSO Luminex

3.3.1. Amplificazione DNA

L'amplificazione del DNA è stata predisposta preparando la miscela master di amplificazione in volume di n+2 reazioni, secondo i seguenti volumi:

Reagenti	**µl/pozzetto**
Taq polimerasi	0,2
Immucor Lifecodes Primer Mix	6
dH_2O nuclease-free	10

È stata allestita una miscela di amplificazione per ogni locus in esame, ovvero: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQA/B E HLA-DPA/B. La miscela di amplificazione è stata seminata nella piastra da PCR e poi sono stati aggiunti 4 µl di DNA in ogni pozzetto

La miscela di amplificazione è stata dispensata in una piastra da 96 pozzetti, utilizzando due diversi approcci, al fine di valutare quale fosse più idonea all'introduzione nella routine diagnostica dal punto di vista operativo. Nel primo caso, è stata allestita una piastra analizzando un solo locus per tutti i campioni, nel secondo caso, invece, la piastra è stata allestita comprendendo tutti i loci per ogni campione.

La piastra di amplificazione è stata collocata in termociclatore VeritiPro (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) per l'amplificazione. Le condizioni di amplificazione sono di seguito riportate:

95°C per 3 min	**1 ciclo**
95°C per 15 sec 60°C per 30 sec 72°C per 30 sec	**12 cicli**
95°C per 10 sec 63°C per 30 sec 72°C per 30 sec	**28 cicli**
72°C per 2 min	**1 ciclo**
4°C ∞	

3.3.2. Ibridazione

Per effettuare l'ibridazione, sono state utilizzate le miscele di biglie specifiche per ciascun locus. Le provette contenenti le microsfere sono state portate a temperatura ambiente e successivamente riscaldate a 56°C per 8 minuti. Sono state inoltre sottoposte a sonicazione per circa 30 secondi e miscelate su vortex per 30 secondi, in modo tale da portarle completamente in sospensione. Le biglie sono state dispensate in una piastra Costar da 96 pozzetti in volume di 15 µl per pozzetto. Il kit di tipizzazione HLA-SSO Lifecodes comprende un'ulteriore miscela di biglie eRES per i loci HLA-A, HLA-B e HLA-DR. Pertanto, è necessario, in fase di allestimento della piastra, predisporre due pozzetti per ogni campione da esaminare per i loci citati, uno con la miscela di biglie standard ed uno con la miscela di biglie eRES. Dopo aver dispensato la miscela di reazione, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 5 µl di DNA amplificato.

La piastra opportunamente allestita è stata sottoposta a ciclo di ibridazione in termociclatore secondo il seguente programma:

97°C per 2 minuti

47°C per 10 minuti

56°C per 8 minuti

56°C ∞

Durante la fase di ibridazione è stata preparata la miscela di ficoeritrina (PE)-streptavidina (SA-PE) e soluzione di diluizione, entrambe fornite dal kit commerciale. Per ogni campione è stato preparato un volume di 170 µl di soluzione di diluizione e 0.85 µl di SA-PE 1 mg/ml. Al termine della procedura di ibridazione, mantenendo la piastra alla temperatura di 56 °C, è stata aggiunta in ogni pozzetto la soluzione contenente la miscela SA-PE.

3.3.3. Analisi dei campioni

Successivamente all'ibridazione, i campioni sono stati letti utilizzando lo strumento Luminex 200 ed analizzati mediante il relativo *software Xponent*. Lo strumento necessita di accensione e manutenzione preliminare all'analisi, pertanto si è proceduto, come da protocollo, al riscaldamento del laser almeno 30 minuti prima dell'utilizzo, all'avviamento della fluidica e alla calibrazione mediante kit dedicato (Luminex). Ad ogni utilizzo, è necessario effettuare la procedura denominata '*Performance verification*' al fine di garantire il corretto funzionamento dello strumento. La procedura di calibrazione, invece, è stata programmata con cadenza quindicinale o in aggiunta al fallimento della '*Performance verification*', da svolgersi con reagenti dedicati. Prima di analizzare i campioni, vengono impostati i fogli di lavoro mediante il *software* MatchIT!DNA (v. 1.3, Werfen, Barcellona, Spagna), creando una lista di lavoro indipendente per ogni locus da analizzare. Una volta impostate le liste di lavoro, la piastra di ibridazione viene inserita nello strumento per la lettura. Al termine di questa, lo strumento è stato sottoposto a disinfezione mediante candeggina ed etanolo al 70%.

I risultati della lettura sono stati analizzati mediante il *software* MatchIT!DNA, che consente di stabilire innanzitutto l'esito della seduta, mediante un codice colori.

Il codice identificativo di ogni campione analizzato, al termine della lettura, può essere evidenziato secondo i seguenti criteri **(Figura 5)**:

- verde (*exact match*): l'amplificazione, l'ibridazione e la lettura del campione sono avvenute con esito positivo; il *software* ha potuto assegnare al segnale rilevato una certa combinazione di alleli;
- blu (*failed amplification*): il segnale non è sufficiente per attribuire una tipizzazione, solitamente dovuto a problematiche in fase di amplificazione;
- arancione (*review probes*): il *pattern* di reazione ottenuto presenta delle ambiguità, per la quale non è possibile assegnare uno specifico allele;
- giallo (*one allele*): il *pattern* di reazione non corrisponde a nessuna coppia di alleli presente nel *database;*
- rosso (*no match*): il *pattern* di reazione ottenuto non può essere associato a nessun allele nel *database*.

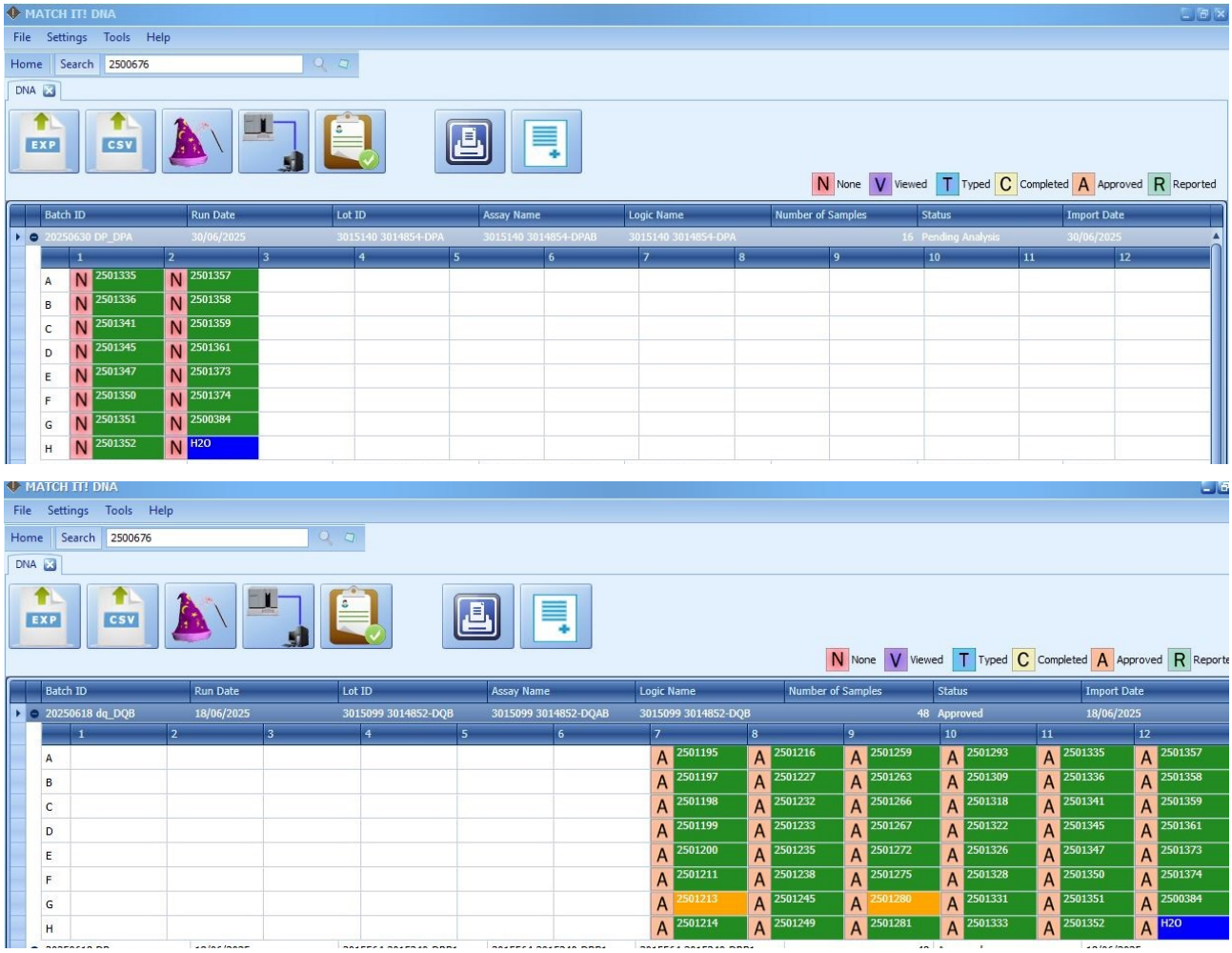

Figura 5. Schermate di esempio dell'interfaccia del *software* MatchIT!DNA.

Per ogni campione, il *software* suggerisce tutte le possibili combinazioni alleliche per la tipizzazione ed i grafici relativi al segnale fluorescente registrato per ogni biglia (*mean fluorescence intensity* [MFI] *vs probe*) **(Figura 6)**. I risultati proposti sono stati visualizzati individualmente, per assegnare la tipizzazione. Eventuali ambiguità sono state risolte visualizzando i risultati relativi alle biglie aggiuntive eRES per i loci HLA-A, HLA-B e HLA-DR.

La tipizzazione assegnata è stata approvata nel formato denominato 'generico', ovvero includendo soltanto il primo campo, in quanto la metodica SSO consente una tipizzazione a bassa risoluzione. Tuttavia, la risoluzione al secondo campo può essere ottenuta per gli alleli più frequenti.

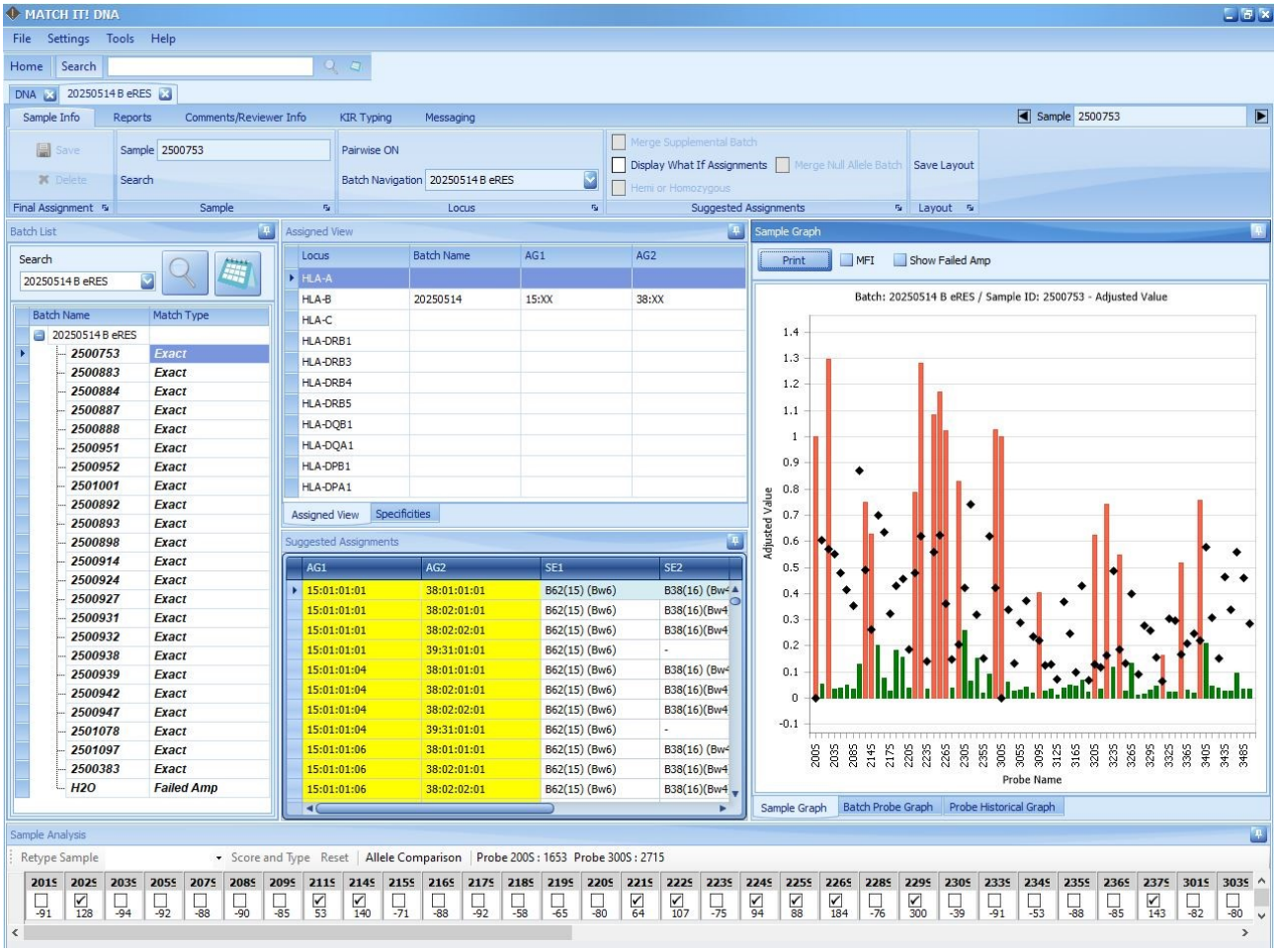

Figura 6. Schermata di esempio dell'interfaccia del *software* MatchIT!DNA.

3.4. Controllo di contaminazione (*Wipe test*)

Al fine di assicurare la qualità in laboratorio e, anche secondo quanto riportato negli standard dell'*European Federation for Immunogenetic* (EFI) per i Laboratori di Immunogenetica, ed impedire le contaminazioni, i materiali, le aree di lavoro ed i singoli reagenti devono essere monitorati regolarmente per la presenza di acidi nucleici ed amplificati. Quest'operazione viene garantita da quel che è denominato *Wipe test*, il quale consente la rilevazione di eventuali contaminazioni di prodotti

di amplificazione dei geni HLA. Il metodo si basa sul principio delle sequenze *primer*-specifiche (SSP), cioè sul fatto che l'amplificazione avviene solo in presenza di esatto appaiamento dei *primers*. L'amplificazione viene poi evidenziata tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Pertanto è necessario verificare che i prodotti di amplificazione della nuova metodica SSO (Werfen, Barcellona, Spagna) introdotta in laboratorio possano essere rilevati con il kit commerciale già in uso in laboratorio Olerup SSP® HLA *Wipe Test* (CareDx, Brisbane, CA, USA). Sono state allestite e testate diluizioni scalari da 1:10 a 1:10000 del prodotto di amplificazione per ciascun locus ottenuto tramite la metodica SSO.

4. Risultati

4.1. Tipizzazione SSO Luminex

I campioni di DNA genomico selezionati ai fini della validazione della metodica SSO Luminex® e del relativo kit commerciale HLA SSO Lifecodes, sono risultati tutti idonei alla procedura di tipizzazione, in quanto entro i limiti dei *range* di concentrazione e di qualità del DNA estratto.

In dettaglio, sono stati testati 26 campioni di DNA genomico per il locus B a bassa risoluzione, cioè valutando solo il primo campo (gruppo allelico). Tali campioni erano stati precedentemente tipizzati a bassa risoluzione mediante il Sistema HISTO SPOT® SSO. Al fine di valutare la riproducibilità della metodica, è stato incluso, come controllo interno, per ogni seduta eseguita uno stesso campione di riferimento già tipizzato. Solo una volta terminata l'analisi mediante SSO Luminex® si è proceduto al confronto con il risultato precedente. I risultati della tipizzazione sono riportati nella **Tabella 1**. Come è possibile osservare, si è ottenuta una concordanza del 100% tra i gruppi allelici per il locus B.

	HISTO SPOT® SSO		SSO Werfen	
Campioni	B	B	B	B
2403094	15	50	**15**	**50**
2500067	40	56	**40**	**56**
2500103	35	51	**35**	**51**
2500185	45		**45**	
2500198	49	51	**49**	**51**
2500220	44	51	**44**	**51**
2500316	35	51	**35**	**51**
2500380	27	38	**27**	**38**
2500470	35	51	**35**	**51**
2500471	35	51	**35**	**51**
2500549	07	08	**07**	**08**
2500556	18	56	**18**	**56**
2500559	35	38	**35**	**38**
2500602	15	35	**15**	**35**
2500679	08	18	**08**	**18**
2500680	08	18	**08**	**18**
2500685	35	53	**35**	**53**
2500695	49	52	**49**	**52**

Tabella 1. Risultati della tipizzazione per il locus B. La tabella riporta i risultati della tipizzazione al primo campo per il locus B, confrontando il risultato ottenuto mediante HISTO SPOT® SSO e SSO Luminex® Werfen. Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

	HISTO SPOT® SSO		SSO Werfen	
Campioni	B	B	B	B
2500709	07	51	**07**	**51**
2500718	13	18	**13**	**18**
2500632	15	51	**15**	**51**
2500635	39	49	**39**	**49**
2500645	35	51	**35**	**51**
2500672	18	50	**18**	**50**
2500676	35		**35**	
2500678	08	18	**08**	**18**

Tabella 1. ***(segue)*** **Risultati della tipizzazione per il locus B.** La tabella riporta i risultati della tipizzazione al primo campo per il locus B, confrontando il risultato ottenuto mediante HISTO SPOT® SSO e SSO Luminex® Werfen. Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

Sono stati inoltre esaminati 35 campioni di DNA genomico, di cui 8 controlli di qualità esterni, precedentemente tipizzati ad alta risoluzione mediante NGS. Per tali campioni, sono stati tipizzati i loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DQA/B E HLA-DPA/B. Anche in questo caso, in ogni sessione analitica è stato incluso lo stesso campione di controllo per valutare la riproducibilità del test. Come previsto dal protocollo, per i loci HLA-A, HLA-B e HLA-DR sono state utilizzate anche le miscele di biglie definite eRES, volte ad ottenere una risoluzione maggiore.

I risultati dell'analisi sono presentati in **Tabella 2**, includendo, in questo caso, anche il secondo campo della tipizzazione allelica. Dai dati, è possibile osservare che i risultati sono concordanti al 100%. In un solo caso si è ottenuta una discrepanza al secondo campo, risolta utilizzando le informazioni fornite dall'analisi con la miscela di biglie eRES.

Campioni ▶	2500037		2403096		2500025		2500093		2403023		2402269		2402270		2402271	
Loci ▼	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO
A	02:01	02:01	01:01	01:01	02:06	02:06	01:01	01:01	02:01	02:01	02:01	02:01	01:01	01:01	01:01	01:01
			30:01	30:01	24:07	24:07	30:01	30:01	03:01	03:01	24:02	24:02	03:02	03:02	30:02	30:02
B	15:17	15:17	07:02	07:02	35:03	35:03	07:02	07:02	57:01	57:01	18:01	18:01	35:01	35:01	15:17	15:17
	44:05	44:05	13:02	13:02	52:01	52:01	13:02	13:02	58:01	58:01	51:01	51:01	57:01	57:01	53:01	53:01
C	02:02	02:02	06:02	06:02	04:01	04:01	06:02	06:02	03:02	03:02	07:01	07:01	04:01	04:01	04:01	04:01
	07:01	07:01	07:02	07:02	12:02	12:02	07:02	07:02	06:02	06:02	14:02	14:02	06:02	06:02	07:01	07:01
DRB1	13:02	13:02	07:01	07:01	04:03	04:03	07:01	07:01	07:01	07:01	11:04	11:04	07:01	07:01	04:05	04:05
	16:01	16:01	11:04	11:04	14:04	14:04	11:04	11:04	11:01	11:01			11:01	11:01	13:02	13:02
DQA1	01:02	01:02	02:01	02:01	01:01	01:01	02:01	02:01	02:01	02:01	05:05	05:05	02:01	02:01	01:02	01:02
			05:05	05:05	03:01	03:01	05:05	05:05	05:05	05:05			05:05	05:05	03:03	03:02
DQB1	05:02	05:02	02:02	02:02	03:02	03:02	02:02	02:02	03:01	03:01	03:01	03:01	03:01	03:01	03:02	03:02
	06:04	06:04	03:01	03:01	05:03	05:03	03:01	03:01	03:03	03:03			03:03	03:03	06:09	06:09
DPA1	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03
	02:01	02:01					02:01	02:01			02:01	02:01				
DPB1	03:01	03:01	02:01	02:01	04:01	04:01	04:02	04:02	03:01	03:01	02:01	02:01	04:01	04:01	04:01	04:01
	10:01	10:01	04:02	04:02			17:01	17:01	04:01	04:01	10:01	10:01			04:02	04:02

Tabella 2. Risultati della tipizzazione per i loci A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1. La tabella riporta i risultati della tipizzazione al secondo campo, confrontando il risultato ottenuto mediante AlloSeqTx (CareDx, Brisbane, CA, USA) e SSO Werfen (Barcellona, Spagna). Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

Campioni ▶	2302284		2401283		2401303		2401369		2401404		2401428		2401802		2401973	
Loci ▼	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO
A	03:01	03:01	24:02	24:02	02:01	02:01	01:01	01:01	02:01	02:01	01:01	01:01	01:01	01:01	01:01	01:01
	31:01	31:01			24:02	24:02	02:05	02:05	24:02	24:02	02:01	02:01	02:01	02:01	03:01	03:01
B	35:01	35:01	15:24	15:24	13:02	13:02	39:01	39:01	13:02	13:02	15:17	15:17	07:02	07:02	35:01	35:01
	35:03	35:03	18:01	18:01	40:01	40:01	50:01	50:01	40:01	40:01	44:05	44:05	40:02	40:02	57:01	57:01
C	04:01	04:01	03:03	03:03	03:04	03:04	06:02	06:02	03:04	03:04	02:02	02:02	02:02	02:02	04:01	04:01
			07:01	07:01	06:02	06:02	07:02	07:02	06:02	06:02	07:01	07:01	07:02	07:02	06:02	06:02
DRB1	07:01	07:01	04:01	04:01	07:01	07:01	07:01	07:01	07:01	07:01	13:02	13:02	07:01	07:01	01:01	01:01
	08:01	08:01	11:04	11:04	09:01	09:01	14:01	14:01	09:01	09:01	16:01	16:01			07:01	07:01
DQA1	02:01	02:01	03:01	03:01	02:01	02:01	01:04	01:04	02:01	02:01	01:02	01:02	02:01	02:01	01:01	01:01
	04:01	04:01	05:01	05:01	03:02	03:02	02:01	02:01	03:02	03:02					02:01	02:01
DQB1	02:02	02:02	03:01	03:01	02:01	02:02	02:02	02:02	02:02	02:02	05:02	05:02	02:02	02:02	03:03	03:03
	04:02	04:02	03:02	03:02	03:03	03:03	05:03	05:03	03:03	03:03	06:04	06:04			05:01	05:01
DPA1	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03
	02:01	02:01													02:01	02:01
DPB1	02:01	02:01	04:02	04:02	04:01	04:01	03:01	03:01	03:01	03:01	04:01	04:01	02:01	02:01	04:02	04:02
	17:01	17:01					04:01	04:01					11:01	11:01	13:01	13:01

Tabella 2. ***(segue)*** **Risultati della tipizzazione per i loci A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1.** La tabella riporta i risultati della tipizzazione al secondo campo, confrontando il risultato ottenuto mediante AlloSeqTx (CareDx, Brisbane, CA, USA) e SSO Werfen (Barcellona, Spagna). Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

Campioni ▶	2402213		2402483		2302969		2303001		2500383		2500384		2500385		2500386	
Loci ▼	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO
A	02:01	02:01	01:01	01:01	02:01	02:01	02:01	02:01	26:01	26:01	24:02	24:02	03:01	03:01	03:01	03:01
	29:02	29:02	03:01	03:01	30:01	30:01	30:01	30:01	32:01	32:01	31:01	31:01	30:01	30:01		
B	40:02	40:02	08:01	08:01	13:02	13:02	13:02	13:02	35:01	35:01	35:08	35:08	08:01	08:01	35:01	35:01
	58:01	58:01	35:03	35:03	15:01	15:01	15:01	15:01	51:08	51:08	38:01	38:01	55:01	55:01	35:02	35:02
C	02:02	02:02	04:01	04:01	03:03	03:03	03:03	03:03	04:01	04:01	04:01	04:01	03:03	03:03	04:01	04:01
	08:02	08:02	07:01	07:01	06:02	06:02	06:02	06:02	16:02	16:02	12:03	12:03	07:01	07:01		
DRB1	11:01	11:01	03:01	03:01	07:01	07:01	07:01	07:01	11:04	11:04	07:01	07:01	14:01	14:01	11:04	11:04
	15:01	15:01	11:01	11:01	11:01	11:01	11:01	11:01			11:04	11:04				
DQA1	01:02	01:02	05:01	05:01	02:01	02:01	02:01	02:01	05:05	05:05	02:01	02:01	01:04	01:04	05:05	05:05
	05:05	05:05			05:01	05:01	05:05	05:05			05:05	05:05				
DQB1	03:01	03:01	02:01	02:01	02:02	02:02	02:02	02:02	03:01	03:01	02:02	02:02	05:03	05:03	03:01	03:01
	06:02	06:02	03:01	03:01	03:01	03:01	03:01	03:01			03:01	03:01				
DPA1	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03
	02:01	02:01			02:01	02:01	02:01	02:01			02:01	02:01				
DPB1	01:01	01:01	04:01	04:01	02:01	02:01	02:01	02:01	04:01	04:01	04:02	04:02	04:01	04:01	04:01	04:01
	02:01	02:01	04:02	04:02	17:01	17:01	17:01	17:01			17:01	17:01			04:02	04:02

Tabella 2. ***(segue)*** **Risultati della tipizzazione per i loci A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1.** La tabella riporta i risultati della tipizzazione al secondo campo, confrontando il risultato ottenuto mediante AlloSeqTx (CareDx, Brisbane, CA, USA) e SSO Werfen (Barcellona, Spagna). Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

Campioni ▶	2500960		2500894		2302914		2302864		2302725		2301639		2302101		2500896	
Loci ▼	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO
A	11:01	11:01	02:01	02:01	02:01	02:01	01:01	01:01	01:01	01:01	02:01	02:01	30:01	30:01	01:01	01:01
	32:01	32:01	24:02	24:02	31:01	31:01			11:01	11:01			33:03	33:03	02:01	02:01
B	35:03	35:03	18:01	18:01	15:01	15:01	08:01	08:01	15:01	15:01	27:02	27:02	13:02	13:02	52:01	
	44:02	44:02	35:03	35:03	51:01	51:01			57:01	57:01	39:01	39:01	58:01	58:01	58:01	
C	04:01	04:01	07:01	07:01	03:03	03:03	07:01	07:01	04:01	04:01	02:02	02:02	03:02	03:02	03:02	03:02
	05:01	05:01	12:03	12:03	15:02	15:02			06:02	06:02	12:03	12:03	06:02	06:02	12:02	12:02
DRB1	08:01	08:01	01:01	01:01	03:01	03:01	03:01	03:01	04:06	04:06	16:01	16:01	03:01	03:01	11:01	11:01
	12:01	12:01	11:04	11:04	11:01	11:01	13:02	13:02	07:01	07:01			07:01	07:01	15:02	15:02
DQA1	04:01	04:01	01:01	01:01	05:01	05:01	01:02	01:02	02:01	02:01	01:02	01:02	02:01	02:01	01:03	01:03
	05:05	05:05	05:05	05:05			05:01	05:01	03:01	03:01			05:01	05:01	05:05	05:05
DQB1	03:01	03:01	03:01	03:01	02:01	02:01	02:01	02:01	03:02	03:01	05:02	05:02	02:01	02:01	03:01	03:01
	04:02	04:02	05:01	05:01	03:01	03:01	06:04	06:04	03:03	03:03			02:02	02:02	06:01	06:01
DPA1	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03	01:03
					01:03		02:01	02:01	02:02	02:02			02:01	02:01		
DPB1	03:01	03:01	04:02	04:02	04:01	04:01	01:01	01:01	05:01	05:01	04:01	04:01	02:01	02:01	02:01	02:01
	04:02	04:02	06:01	06:01			04:01	04:01	104:01	104:01	04:02	04:02	17:01	17:01	04:01	04:01

Tabella 2. ***(segue)*** **Risultati della tipizzazione per i loci A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1.** La tabella riporta i risultati della tipizzazione al secondo campo, confrontando il risultato ottenuto mediante AlloSeqTx (CareDx, Brisbane, CA, USA) e SSO Werfen (Barcellona, Spagna). Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

Campioni ▶	2500897		2500849		2500715	
Loci ▼	NGS	SSO	NGS	SSO	NGS	SSO
A	03:01	03:01	01:01 24:02	01:01 24:02	26:01 32:01	26:01 32:01
B	07:02 08:01	07:02 08:01	08:01 35:03	08:01 35:03	39:01 44:02	39:01 44:02
C	07:01 07:02	07:01 07:02	07:01 12:03	07:01 12:03	05:01 12:03	05:01 12:03
DRB1	03:01 15:01	03:01 15:01	01:01 03:01	01:01 03:01	04:02 13:01	04:02 13:01
DQA1	01:02 05:01	01:02 05:01	01:01 05:01	01:01 05:01	01:03 03:01	01:03 03:01
DQB1	02:01 06:02	02:01 06:02	02:01 05:01	02:01 05:01	03:02 06:03	03:02 06:03
DPA1	01:03	01:03	01:03 02:01	01:03 02:01	01:03	01:03
DPB1	04:01	04:01	03:01 10:01	03:01 10:01	02:01	02:01

Tabella 2. ***(segue)*** **Risultati della tipizzazione per i loci A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1.** La tabella riporta i risultati della tipizzazione al secondo campo, confrontando il risultato ottenuto mediante AlloSeqTx (CareDx, Brisbane, CA, USA) e SSO Werfen (Barcellona, Spagna). Dove non sia indicato il secondo allele, è da intendersi come omozigosi.

4.2. *Wipe test*

Il test di contaminazione eseguito con il kit commerciale Olerup SSP® HLA Wipe Test (CareDx, Brisbane, CA, USA) è risultato positivo per tutte le diluizioni scalari (da 1:10 a 1:10000) allestite. Come è possibile osservare dalla foto relativa alla corsa elettroforetica, è presente una banda in corrispondenza di ogni diluizione di ogni locus testato, presenza indicativa dell'avvenuta amplificazione dei prodotti della metodica SSO Luminex® (Werfen; Barcellona, Spagna). **(Figura 7)**

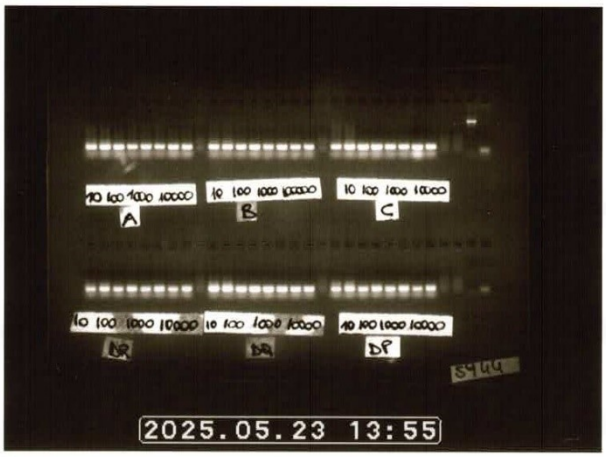

Figura 7. Risultato della corsa elettroforetica del test di contaminazione, gel di agarosio (2%). Per ogni set di bande è riportato il locus in esame e le diluizioni scalari effettuate.

5. Discussione

La ricerca dell'abbinamento (*matching* genetico) idoneo fra donatore e ricevente è fondamentale nella pratica trapiantologica, sia esso di organo solido o di cellule staminali ematopoietiche [14]. Nel primo caso si rende necessaria soprattutto la valutazione della presenza nel ricevente di anticorpi donatore-specifici (*Donor-Specific Antibodies*, DSA), in quanto responsabili di un eventuale rigetto. Nel caso di trapianto di precursori emopoietici, invece, è necessario procedere con la tipizzazione dei principali geni HLA. La scelta delle metodiche da utilizzare ai fini della tipizzazione è cruciale ed è possibile utilizzare metodiche differenti a seconda del quesito diagnostico, dell'urgenza del risultato, della disponibilità di risorse e della praticità dal punto di vista tecnico. Negli ultimi anni, grazie all'evoluzione delle tecnologie diagnostiche, le metodiche cosiddette 'ad alta risoluzione' hanno trovato sempre più maggior impiego, in quanto un'alta risoluzione consente di ottimizzare la selezione del donatore e del ricevente evitando l'insorgenza di effetti avversi post-trapianto[15]. Tuttavia, le metodologie ad alta risoluzione come il sequenziamento NGS non sempre rappresentano l'unica strategia diagnostica all'interno di un Laboratorio HLA, ma possono essere utilizzate in modo integrativo o alternativo ad altre metodiche. Talvolta infatti, può essere privilegiata una tecnica a risoluzione bassa o alta con ambiguità per motivi relativi alla tempistica di refertazione, ai costi o all'esperienza del personale. Presso il Laboratorio HLA dell'U.O.C Immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedale-Università di Padova l'attività diagnostica si realizza attualmente attraverso delle metodiche SSP, *real time* PCR e NGS. La metodica SSP risulta molto laboriosa dal punto di vista operativo, e diventerà presto obsoleta. In laboratorio era inoltre utilizzato il sistema HISTO SPOT® SSO, ma è stato recentemente dismesso per nuova fornitura da gara regionale di Azienda Zero del Veneto (SSO Luminex). Pertanto, al fine di mantenere l'affidabilità diagnostica e migliorare l'efficienza operativa del laboratorio, è stato introdotto il metodo SSO associato alla tecnologia Luminex®, della quale il laboratorio dispone da tempo per la genotipizzazione dei gruppi sanguigni e per la valutazione della risposta anticorpale anti HLA (DSA). Nel presente studio si è proceduto con la validazione della metodica SSO Luminex, con l'obiettivo della sua introduzione nell' attività di laboratorio per la tipizzazione HLA.

Come già precedentemente anticipato, i risultati di validazione mostrano una concordanza del 100% su tutti i 35 campioni testati per i loci A, B, C, DR, DQ e DP, nonché sui 26 campioni testati per il solo locus B, soddisfacendo pienamente i criteri di accettabilità per le metodiche diagnostiche. La concordanza risulta particolarmente appropriata, considerando che per la maggior parte dei campioni i risultati precedenti provenivano da analisi NGS, metodica con risoluzione allelica, considerata *gold*

standard per la tipizzazione HLA. Quindi, nonostante il diverso livello di risoluzione tra le due metodiche, la scelta di utilizzare SSO Luminex® appare comunque idonea al contesto diagnostico.

In fase di tipizzazione, possono essere spesso richieste ripetizioni dell'analisi per ambiguità dei risultati. Durante la validazione di SSO Luminex® è emersa una sola tipizzazione ambigua al secondo campo, risolta attraverso l'utilizzo della miscela di biglie ad alta risoluzione fornite dal kit Lifecodes, riducendo, quindi, la necessità di ricorrere a tecniche alternative o a ripetizioni della procedura e risultando così vantaggiosa in termini di tempi e costi.

La scelta di implementare SSO Luminex® si inserisce in una strategia diagnostica differenziata del Laboratorio HLA dell'Azienda Ospedale-Università di Padova, poiché, disponendo di più tecnologie, si è pianificata una strategia di utilizzo diversa per ognuna di esse, a seconda delle esigenze e nell'ottica di ottimizzazione delle risorse. La tecnologia NGS è quindi per lo più dedicata alle tipizzazioni ad alta risoluzione richieste nei trapianti di cellule staminali ematopoietiche, dove la compatibilità allelica deve essere pressoché perfetta, mentre SSO Luminex® verrà riservato ai trapianti di organi solidi e per le associazioni HLA-malattia, dove un livello di risoluzione inferiore può essere sufficiente sotto il profilo clinico. La recente introduzione in laboratorio della metodica di real-time PCR permette inoltre di effettuare una scelta metodologica basata sull'urgenza del risultato, in quanto in grado di fornire un risultato in tempi celeri per i principali loci HLA a bassa risoluzione, ma per un numero minore di campioni rispetto a SSO Luminex®.

Ai fini dell'introduzione in routine della metodica, è stata valutato anche l'aspetto puramente operativo previsto dal protocollo. Pertanto, l'allestimento della piastra di amplificazione del DNA è avvenuto secondo due diverse modalità:

- piastra allestita per analizzare un solo locus per tutti i campioni;
- piastra allestita per analizzare tutti i loci per ogni campione.

Nel primo caso, è possibile testare più campioni per seduta, ma sono necessarie 2 o 3 sedute per completare l'analisi di tutti i loci, qualora richiesto. Nel secondo caso, invece, l'analisi di ogni campione può essere completata in un'unica seduta, diminuendo, tuttavia, il numero di pazienti testati per seduta. Il primo approccio è risultato tra i due il più pratico dal punto di vista operativo, in quanto richiede di dispensare il singolo campione una sola volta, evitando errori e contaminazioni. Inoltre, consente di testare più campioni per seduta. Nonostante siano necessarie più sedute per l'analisi di tutti i loci, è in realtà possibile procedere con due sedute nello stesso giorno o almeno anticipare la fase di amplificazione del DNA. Considerando poi che la metodica SSO Luminex® Werfen (Barcellona, Spagna) verrà principalmente usata per lo studio della farmacogenetica o per

l'associazione con specifiche malattie, l'analisi si focalizzerà su uno o due loci per seduta e non sull'intero pannello.

Per quanto concerne la valutazione di eventuali contaminazioni da amplificati, si è testata la capacità del test già presente in laboratorio HLA di individuare la presenza di prodotti di PCR. Il test è risultato positivo per ogni diluizione effettuata, indicando che i prodotti di amplificazione ottenuti con SSO Luminex® Werfen (Barcellona, Spagna) possono essere rilevati dal kit commerciale Olerup SSP® HLA *Wipe Test* (CareDx, Brisbane, CA, USA), in uso in laboratorio.

Pur riconoscendo la validità dei risultati ottenuti, è opportuno considerare alcune limitazioni intrinseche del presente studio di validazione. Il numero di campioni utilizzati, sebbene adeguato ai fini della validazione di una metodica, potrebbe essere considerato relativamente limitato per una caratterizzazione esaustiva delle prestazioni del sistema in tutte le possibili condizioni operative. Un'estensione della validazione su un numero maggiore di campioni, includendo casistiche più eterogenee dal punto di vista delle caratteristiche pre-analitiche, potrebbe fornire ulteriori elementi di valutazione. Dal punto di vista delle prospettive future, la metodica potrebbe essere ulteriormente sviluppata grazie all'implementazione in laboratorio di un sistema di automazione per la parte operativa, soprattutto per la fase di dispensazione dei DNA (allestimento delle PCR) da analizzare e per la fase di ibridazione, così come il trasferimento informatizzato dei dati dei campioni da analizzare allo strumento, in modo da favorire il flusso di lavoro ed evitare errori da parte dell'operatore.

In conclusione, la validazione della metodica SSO Luminex® per la tipizzazione HLA ha prodotto risultati soddisfacenti che supportano l'implementazione di questa tecnologia nella routine diagnostica del Laboratorio HLA dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. La combinazione di accuratezza analitica ed efficienza operativa rende questa metodica una soluzione adeguata alle esigenze diagnostiche dei trapianti di organo solido e delle associazioni HLA-malattia.

In generale, il successo di questa validazione dimostra come l'aggiornamento tecnologico possa e debba essere introdotto nella pratica diagnostica, contribuendo al miglioramento della qualità dei servizi laboratoristici in ambito trapiantologico. L'implementazione di nuove tecnologie dà evidenza della qualità del Laboratorio stesso, che offre un ventaglio di opportunità molto ampio, importante criterio per gli accreditamenti internazionali di eccellenza. Il Laboratorio è infatti accreditato EFI (*European Federation for Immunogenetics*) e rappresenta il Centro di riferimento per numerose attività del settore trapiantologico, quali i Programmi Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche nell'adulto e pediatrico, i Centri Trapianto di Organo Solido (rene, cuore, fegato, polmone) di Padova, nonché lo studio di HLA e malattie e di farmacogenetica associata all'HLA per le Province di Padova e Rovigo.

Inoltre, il Laboratorio è Laboratorio di Riferimento Regionale di Immunologia per i Trapianti, svolgendo il monitoraggio anticorpale nel post-trapianto e nel pre-trapianto da donatore vivente ed il *cross-match* per il trapianto da donatore vivente. Oltre alle attività di tipizzazione HLA in laboratorio si esegue la tipizzazione di biologia molecolare di antigeni minori eritrocitari per la Regione. In virtù di questi ruoli, il carico di campioni analizzati e soprattutto le prestazioni associate ad essi sono andate aumentando nel triennio 2023-25, come è possibile osservare in **Tabella 3**. Pertanto, si conferma fondamentale l'implementazione di nuove tecnologie diagnostiche per l'ottimizzazione delle attività del Laboratorio HLA.

	2023		2024		2025 (PROIEZIONE)	
	CAMPIONI	TEST	CAMPIONI	TEST	CAMPIONI	TEST
HLA-TCSE[1]	880	3877	750	6000	980	7840
HLA-TOS[2]	1060	7052	1150	9200	1150	9200
HLA-MAL + farmacogenetica	614	1198	609	1218	800	1600
TOT	2554	12127	2509	16418	2930	18640
anticorpi anti HLA	1797	3616	2036	4276	2200	4620
cross match	166	332	175	350	180	360
tipizzazione antigeni minori eritrocitari	463	4167	730	6570	830	7470

[1]TCSE: Trapianto di cellule staminali ematopoietiche; [2]TOS: Trapianto di organo solido

Tabella 3. Attività svolte presso il Laboratorio HLA dell'Azienda Ospedale-Università di Padova. La tabella riporta le attività svolte dal Laboratorio, comprensive del numero di campioni analizzati e di prestazioni associate ad essi, riferiti al triennio 2023-2025. La proiezione 2025 è stata calcolata sui dati reali alla data 26/08//2025.

Bibliografia

1. Geo JA, Ameen R, Al Shemmari S, Thomas J. Advancements in HLA Typing Techniques and Their Impact on Transplantation Medicine. Med Princ Pract. 2024;33(3):215–31.

2. Christiansen FT, Tait BD, curatori. Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [citato 22 maggio 2025]. (Methods in Molecular Biology). Disponibile su: https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-842-9

3. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. N Engl J Med. 2000 Sep 7;343(10):702-9. doi: 10.1056/NEJM200009073431006. PMID: 10974135. N Engl J Med.

4. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Tissue Antigens. 2010;75(4):291–455.

5. P Groups [Internet]. [citato 4 giugno 2025]. Disponibile su: https://hla.alleles.org/pages/wmda/p_groups/

6. Trowsdale J. The MHC, disease and selection. Immunol Lett. 30 giugno 2011;137(1–2):1–8.

7. Mallal S, Nolan D, Witt C, Masel G, Martin AM, Moore C, et al. Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. Lancet Lond Engl. 2 marzo 2002;359(9308):727–32.

8. Hung SI, Chung WH, Jee SH, Chen WC, Chang YT, Lee WR, et al. Genetic susceptibility to carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions. Pharmacogenet Genomics. aprile 2006;16(4):297–306.

9. Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. Tissue Antigens. luglio 2012;80(1):1–11.

10. Luminex Platform Technology - IT [Internet]. [citato 21 giugno 2025]. Disponibile su: https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/antibodies/immunoassays/procartaplex-assays-luminex/features.html

11. BAG Diagnostics - our HLA SSO typing products - Home [Internet]. [citato 21 giugno 2025]. Disponibile su: https://www.bag-diagnostics.com/en/hla-sso-typing.html

12. Gersuk VH, Nepom GT. A real-time PCR approach for rapid high resolution subtyping of HLA-DRB1*04. J Immunol Methods. 20 dicembre 2006;317(1–2):64–70.

13. Vogiatzi P. Some considerations on the current debate about typing resolution in solid organ transplantation. Transplant Res. 2016;5:3.

14. Hurley CK, Wade JA, Oudshoorn M, Middleton D, Kukuruga D, Navarrete C, et al. A special report: histocompatibility testing guidelines for hematopoietic stem cell transplantation using volunteer donors. Tissue Antigens. aprile 1999;53(4 Pt 1):394–406.

15. Crocchiolo R, Ciceri F, Fleischhauer K, Oneto R, Bruno B, Pollichieni S, et al. HLA matching affects clinical outcome of adult patients undergoing haematopoietic SCT from unrelated donors: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo and Italian Bone Marrow Donor Registry. Bone Marrow Transplant. novembre 2009;44(9):571–7.