

44°

CONVEGNO NAZIONALE di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini | Palacongressi, 3-5 maggio 2022



LA VALUTAZIONE DEL CHIMERISMO NEL TRAPIANTO DI CSE: ASPETTI METODOLOGICI E ORGANIZZATIVI

*Dott.ssa Cinzia Marina Tagliaferri
U.O.C. Medicina Trasfusionale
ULSS8 Berica - VICENZA*

44°

CONVEGNO NAZIONALE di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini | Palacongressi, 3-5 maggio 2022



La sottoscritta, Cinzia Marina Tagliaferri in qualità di Relatore dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le sue funzioni al fine di trarne vantaggio.

CHIMERISMO

Il termine chimera rappresenta una creatura con la testa di leone, corpo di capra e coda di serpente

In ambito clinico è genericamente impiegato per indicare un soggetto che racchiude due popolazioni cellulari geneticamente diverse



Fenomeno di co-esistenza di cellule di due o più organismi differenti in un unico individuo

CHIMERISMO NELL'UOMO

Nel caso dell'uomo queste cellule possono derivare da un trapianto di CSE, cioè indica la presenza di **cellule ematopoietiche** del donatore all'interno del soggetto ricevente il trapianto



Studiare quindi il chimerismo in un paziente trapiantato vuol dire fare uno studio **"personalizzato"** basandosi sulle caratteristiche del paziente pre-trapianto e del donatore

CHIMERISMO POST-TRAPIANTO

Il chimerismo post-trapianto è un fenomeno **dinamico**

che **cambia nel tempo**



Ciò che è clinicamente utile non è la singola determinazione, ma il **MONITORAGGIO** nel tempo attraverso diversi time points

STATI DI CHIMERISMO

Lo stato di chimerismo rappresenta un ottimo indicatore di attecchimento, rigetto, GvHD o ricaduta

CHIMERISMO COMPLETO DON	100% donor
CHIMERISMO COMPLETO RIC	0-20% donor
MICROCHIMERISMO	> 99% donor
CHIMERISMO MISTO	< 90% donor

Lo stato di chimerismo misto è espressione di una situazione di **equilibrio dinamico** tra emopoiesi di origine **donatore** e l'emopoiesi di origine **ricevente**

CHIMERISMO MISTO NEL TEMPO

Transitorio : nei primi 6 mesi dal TMO vi è una presenza di cellule del ricevente <5%, successivamente si osserva una conversione a full donor

Stabile: persistenza di cellule del ricevente 1-20%.
Interventi terapeutici (->CC)

Progressivo: persistenza di cellule del ricevente in % progressivamente crescente (>10%). Indicatore di recidiva di malattia

CAMPIONI BIOLOGICI per l'analisi di chimerismo

La fonte principale per la valutazione del chimerismo è rappresentata da:

- **Sangue Periferico**
- **Sangue Midollare**

L'analisi può essere condotta anche su:

- **Linee cellulari mieloidi o linfoidi**

(frazionamento da sangue periferico con tecniche di selezione positiva o negativa)

METODICHE PER LO STUDIO DEL CHIMERISMO

Il principio su cui si basano tutte le tecniche è l'utilizzo di marcatori genetici polimorfici, informativi, che differiscono fra donatore e ricevente e verranno utilizzati nel post- per quantificare la presenza di cellule

- STR (Short Tandem Repeats) chimerism
- Real Time PCR: Q chimerism
- NGS chimerism

Tozzo P et al Chimerism monitoring techniques : an overview of the last 15 years of innovations. *Diagnostics* 2021 April; 11(4):621

METODICHE A CONFRONTO

PCR-STR Chimerism

- ✓ Altamente informativo: garantisce un *elevato potere di differenziazione*
- ✓ Quantitativo
- ✓ Sensibilità 1-3%
- ✓ Applicabile anche in trapianti multi-donatore
- ✓ sensibilità non troppo elevata

Real Time PCR: Q-Chimerism

- ✓ Informativo: polimorfismi biallelici
- ✓ Quantitativo
- ✓ Sensibilità 0.1%
- ✓ Elevato consumo di DNA pre-trapianto

accuratezza

sensibilità

informatività

NGS Chimerism

- ✓ Altamente informativo
- ✓ Quantitativo
- ✓ Sensibilità 0.01%
- ✓ Mancanza di standardizzazione

linearità

riproducibilità

PCR-STR (Short Tandem Repeats)

- Il metodo si basa su sequenze ripetute di DNA non codificante e a seconda del n° di ripetizioni si distinguono diversi alleli allo stesso locus.
- Sono loci molto polimorfici nella popolazione (marker genetici) in grado di discriminare le coppie donatore-ricevente per il monitoraggio post-trapianto

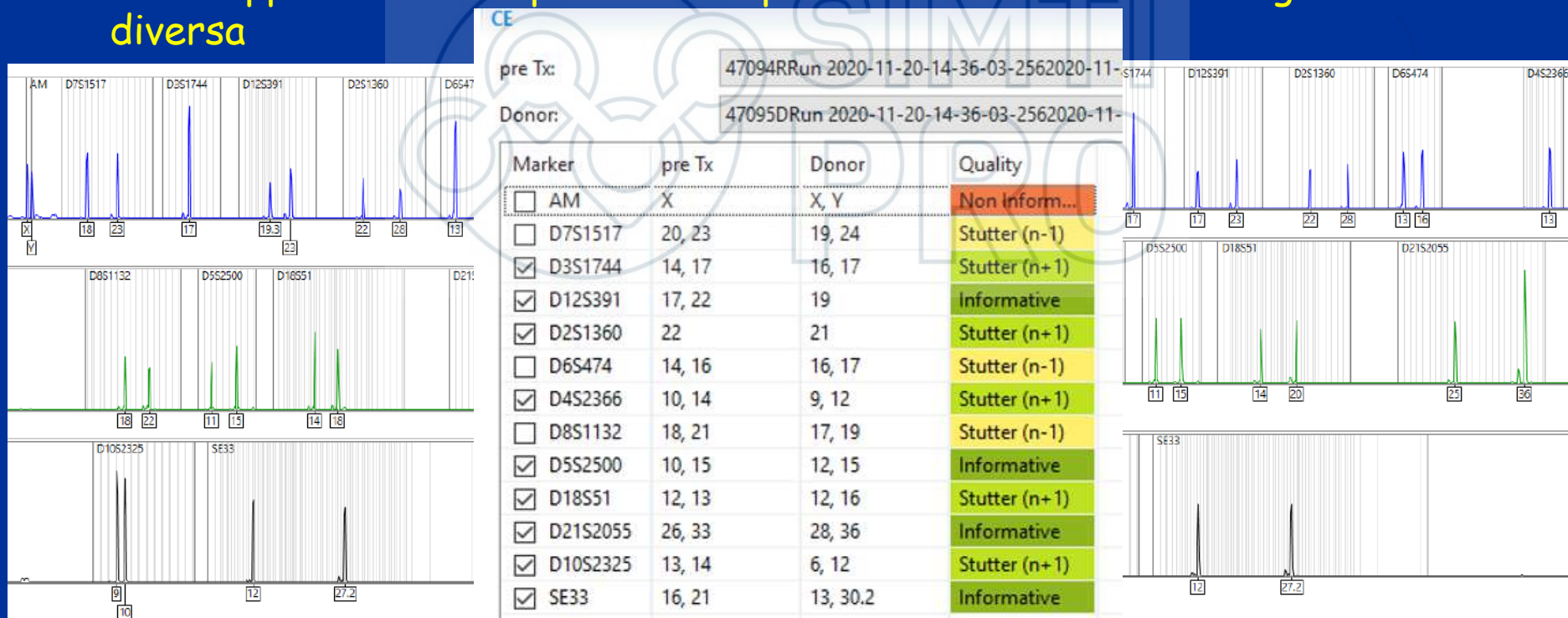
gold standard



PCR-STR: ANALISI QUALITATIVA

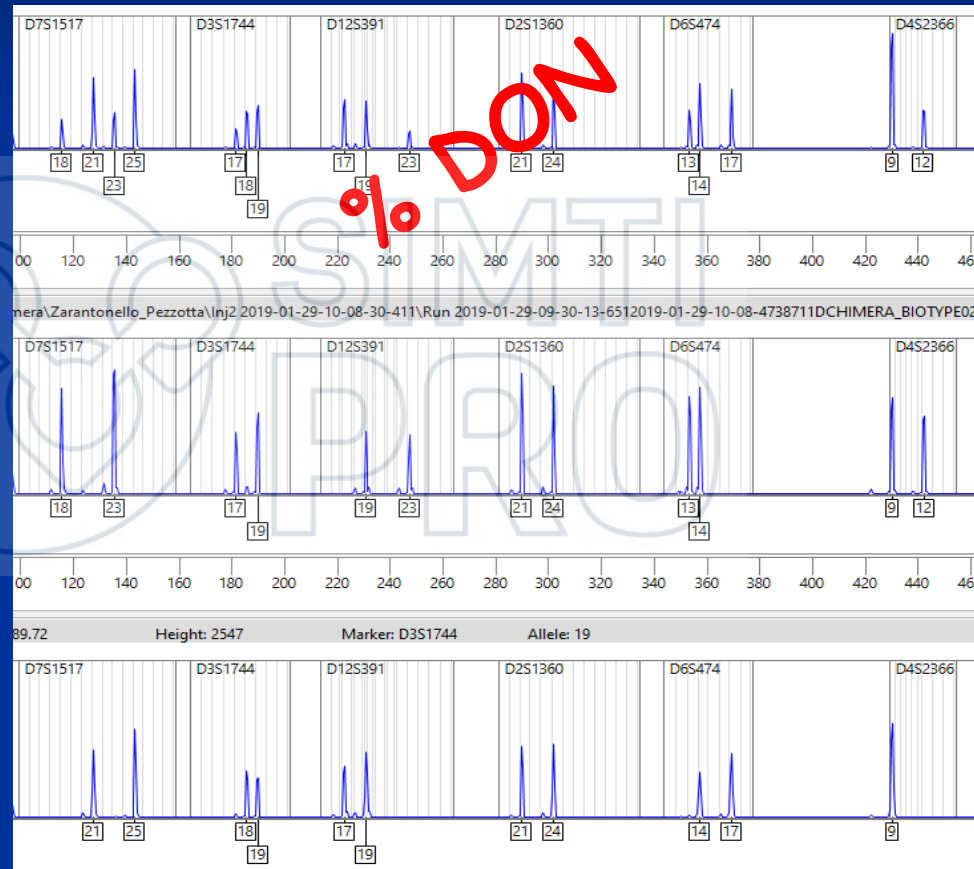
Kit CE-IVD :

- PCR multiplex per l'amplificazione di 12 markers STR (tetra o pentanucleotidici)
- SOFTWARE che converte il dato grezzo in un profilo genetico in cui gli alleli sono rappresentati da picchi corrispondenti a frammenti di lunghezza diversa



PCR-STR: ANALISI QUANTITATIVA

calcola la somma delle aree dei picchi rilevati nel campione post-trapianto (loci informativi) e lo traduce in un calcolo percentuale di cellule don/ric



MIX

DON

RIC

Introduzione del metodo : tra standard EFI e validazione

Standard for Histocompatibility e
 Immunogenetics Testing EFI (European
 Federation for Immunogenetics)
 version 8.0

«Indicazioni tecniche» per lo studio
 del chimerismo post-trapianto di
 CSE ver.1.1 -2016
 Linee guida AIBT

TABLE OF CONTENTS

SECTION A – GENERAL POLICIES	3
SECTION B – PERSONNEL QUALIFICATIONS	4
B3 The Director and/or Co-Director	4
B4 Technical Staff	4
B5 Competency Evaluation and Continuous Education	4
SECTION C – QUALITY ASSURANCE	6
C1 MANAGEMENT	6
C2 TECHNICAL	7
C3 PREANALYTICAL	8
SECTION D – EXTERNAL PROFICIENCY TESTING	10
D1 PROCEDURE OF EPT	10
D2 REPORTING OF EPT RESULTS	11
D3 LABORATORY PERFORMANCE	11
SECTION E – ANALYSIS PROCESSES	12
E1 REAGENTS	12
E2 EQUIPMENT	14
E3 COMPUTER ASSISTED ANALYSES	16
E4 METHODS	16
F3 RECORDS AND TEST REPORTS	34

“INDICAZIONI TECNICHE” PER LO STUDIO DEL
 CHIMERISMO POST-TRAPIANTO DI CSE
 ver.1.1 - 2016
 a cura del Gruppo di Lavoro per il Chimerismo AIBT

AIBT ASSOCIAZIONE ITALIANA
 DI IMMUNOGENETICA
 E BIOLOGIA DEI TRAPIANTI

Partecipanti alla stesura:

Loredana Elia

Benedetta Mazzi

Marcella Margiotta

Marco Andreani

Carla Cervelli

Coordinatore:

Franco Papola

Introduzione del metodo : tra Standard EFI (v 8.0) e validazione

E4.11.6 Optimal ranges of DNA quantity and purity must be:

E4.11.6.1 Defined

E4.11.6.2 Documented

E4.11.6.3 If a sample falls outside these optimal ranges, a statement must be included in the report

La concentrazione ottimale e la purezza del DNA sono state definite nel percorso di validazione dei test e corrispondono a:

Concentrazione : >10 ngr/ul

Purezza: rapporto $260/280 = 1,7-1,9$

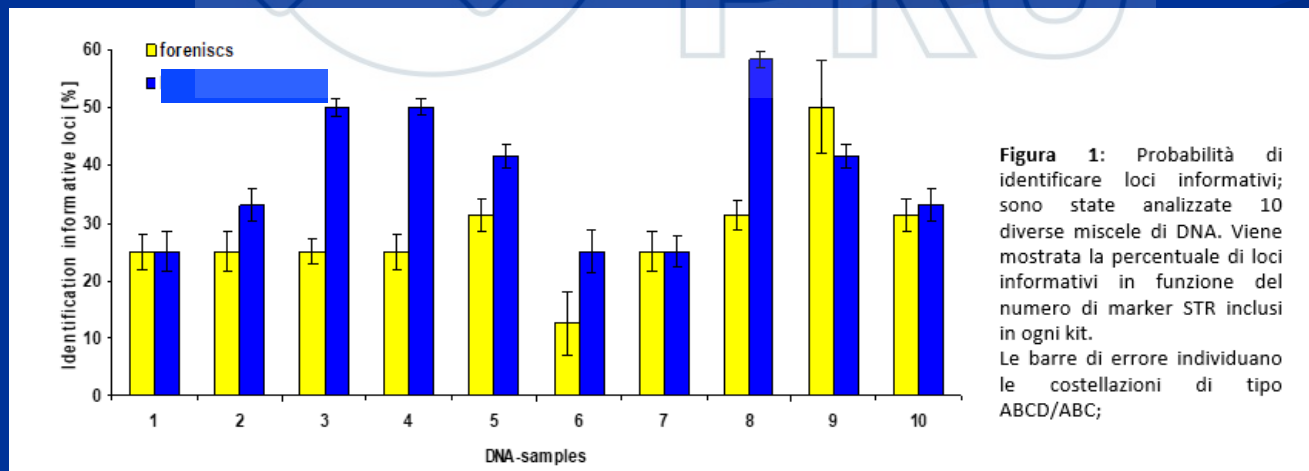
Se il campione non rientrasse nel range previsto dalla procedura, ma il test fosse comunque interpretabile, la variazione dovrà essere segnalata nel report

Introduzione del metodo : tra Standard EFI (v 8.0) e validazione

E4.11.2 The polymorphic gene system(s) used for HCE monitoring must be identified and documented with regards to allelic variability

12 marker STR (tetra o pentanucleotidici)

- Distribuiti su 10 cromosomi
- Elevato polimorfismo
- Alto tasso di eterozigosità (>80%)
- Validati su coppie abbinata HLA donatore-ricevente



Introduzione del metodo : tra Standard EFI (v 8.0) e validazione

E4.11.3 The **sensitivity** of the HCE assay must be validated using DNA mixtures from two individuals at defined ratios/concentrations, before implementation into clinical use

Le miscele di DNA sono state eseguite secondo le modalità indicate:

99% DON	99ul DNA del DON+ 1ul DNA del PZ (PRE)
97,5% DON	97,5ul DNA del DON+ 2,5ul DNA del PZ (PRE)
90% DON	90ul DNA del DON+ 10ul DNA del PZ (PRE)
50% DON	50ul DNA del DON+ 50ul DNA del PZ (PRE)
10% DON	10ul DNA del DON+ 90ul DNA del PZ (PRE)
2,5% DON	2,5ul DNA del DON+ 97,5ul DNA del PZ (PRE)
1% DON	1ul DNA del DON+ 99ul DNA del PZ (PRE)

Standard for Histocompatibility e Immunogenetics Testing version 8.0



E4.11.9 When HCE testing is performed on cellular subsets isolated by cell sorting, the purity of the sorted population:

E4.11.9.1 Must be documented and

E4.11.9.2 taken into account in the analysis of the results

E4.11.9.3 If this is not possible it must be clearly stated in the report

Su 5 campioni si è proceduto alla separazione della sottopopolazione linfocitaria e il materiale ottenuto è stato analizzato in **Citofluorimetria**.

La **purezza** della popolazione linfocitaria varia dal 80% al 98%



Standard for Histocompatibility e Immunogenetics Testing version 8.0

E4.11.12 In addition to the requirements from standard F3.5.7, the report must contain

E4.11.12.1 A description of the specimen used for testing (bone marrow, peripheral blood, cellular subsets isolated by cell sorting etc.)

E4.11.12.2 The date of transplant

E4.11.12.3 Other information if deemed relevant for HCE interpretation (i.e. limited informative markers or clinical condition of the patient)

	Servizio Sanitario Nazionale - Regione Veneto - ULSS 8 BERICA U.O.C. Medicina Trasfusionale - Direttore: Dott. Francesco Fiorin tel 0444/757087 - fax 0444/757088 Unità operativa semplice di IMMUNOGENETICA HLA Accreditato EFI (European Federation for Immunogenetics) 07-IT-028.972 Responsabile: dott.ssa Cinzia Marina Tagliaferri	
id campione:	53513	
Cognome:	I	
Nome:	I	
Dt. Nascita:	17/04/1968	
Sesso:	F	
Codice a barre:	21768555	
Reparto:	Centro trapianti midollo Esterni VICENZA	
Data prelievo:	05/04/2022	
Data refertazione:	08/04/2022	
MONITORAGGIO CHIMERISMO POST-TRAPIANTO		
Campione utilizzato:	MIDOLLO	←
Qualità del campione:	Idoneo	
Data trapianto:	05/01/2022 (90 giorni)	←
Risultato:	% Donor Chimerism 99	
St.Dev.	0.52%	
Num loci informativi:	7	
Sensibilità:	3	←
Metodica:	STR	

Introduzione del metodo : tra Standard EFI (v 8.0) e validazione

Per la validazione del metodo è stato necessario verificare:

- **RIPRODUCIBILITA'** sono stati processati in doppio o in triplo alcuni campioni e i risultati ottenuti sono sovrapponibili tra loro
- **SENSIBILITA'** sono state analizzate diverse miscele di DNA don/ric con % scalari e i risultati sono concordanti con quelli attesi
- l'esito positivo dei **CONTROLLI DI QUALITA'** esterni (ISS)
- che il **RISULTATO** relativo a 25 campioni sia **SOVRAPPONIBILE** a quello ottenuto da altro laboratorio
- la **PUREZZA** di 5 campioni in citofluorimetria dopo separazione delle sottopopolazioni linfocitarie



LABORATORIO IMMUNOGENETICA VICENZA

Laboratorio di riferimento di 2 Centri Trapianto Ematologia dell'adulto e di 1 Centro Trapianto Pediatrico

Incremento dell'attività:

- 68 nuovi trapianti nel 2021
- 602 campioni post-trapianto

CASI PARTICOLARI

- **PAZ APLASIA MIDOLLARE TRAPIANTATA 06/02/2012**
- DAL 2012 AL 2022
- MIDOLLO DAL 31% AL 12% DONATORE
- **POPOLAZIONE LINFOCITARIA DAL 91% AL 74% DONATORE**

- **PAZ PEDIATRICO**
- 1°TMO 03/2021 ND
- 2°TMO 05/2021 ND
- **3°TMO 08/2021 100% DON**

CONCLUSIONI

Lo studio del chimerismo permette:

- una precoce interpretazione dell'andamento del trapianto prima della comparsa di un'evidenza clinica
- al clinico di intervenire tempestivamente con scelte terapeutiche in grado di migliorare l'efficacia del trapianto

GRAZIE

