

# PROTOCOLLI DI DESENSIBILIZZAZIONE IN RICEVENTI IMMUNIZZATI NEL TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE VIVENTE

**A. Nocera**

Unità Operativa Semplice Immunologia dei Trapianti, Dipartimento Trapianti, Azienda Ospedaliera Universitaria "S. Martino", Genova

## Desensitization protocols in immunized living donor kidney transplant recipients

*It is well known that the presence of alloantibodies against human HLA class I (A, B, C) and class II (DR, DQ) antigens in transplant recipients waiting for a first or subsequent kidney transplant has a significant negative impact on graft outcome, with increased acute and chronic rejection rates. HLA antibodies, present in hyperimmunized patients (PRA >80%) as a result of pregnancies, blood transfusions and previous failed grafts, once thought to be a formidable barrier to renal transplantation, can now be overcome with excellent results by means of desensitization protocols in kidney transplant recipients from living or cadaver donors. Such pretransplant desensitization protocols consist of high-dose intravenous immunoglobulin infusions (IVIg-HD), plasmapheresis associated with low-dose IVIg (IVIg-LD) and immunoabsorption by protein-A sepharose or Ig-sepharose columns. All of the above treatments, associated in many cases with the anti-CD20 monoclonal antibody Rituximab, have been widely applied in living donor kidney transplant recipients showing donor-specific anti-HLA antibodies. Similar desensitization protocols have been used for non-A2 ABO-incompatible living donor kidney transplants. These techniques have allowed successful transplantation in this high-risk patient category by providing live donor kidneys that function promptly with minimal risk of early loss, and have consequently increased the organ donor pool. Long-term follow-up of these patients and the application on a wider scale of these techniques, which for many patients may represent the only realistic chance of a successful transplant, will provide the definitive answers about their real efficacy. (G Ital Nefrol 2009; 26: 499-515)*

Conflict of interest: None

### KEY WORDS:

Intravenous immunoglobulins, Antibody immunoabsorption, Plasmapheresis, Desensitization protocols, Immunized kidney transplant recipients, ABO incompatible kidney transplants, Living donor kidney transplants

### PAROLE CHIAVE:

Immunoglobuline endovena ad alte dosi, Immunoassorbimento, Plasmaferesi, Protocolli di desensibilizzazione, Riceventi iperimmunizzati con anticorpi anti-HLA, Trapianti renali ABO incompatibili, Trapianto renale da donatori viventi

### ✉ Indirizzo degli Autori:

Dr. Arcangelo Nocera  
Unità Operativa Semplice Immunologia dei Trapianti  
Dipartimento Trapianti  
Padiglione XIII II piano  
Azienda Ospedaliera Universitaria "S. Martino"  
Largo R. Benzi, 10  
16132 Genova  
e-mail: arcangelo.nocera@hsanmartino.it

## INTRODUZIONE

L'avvento del trapianto renale per il trattamento dei pazienti con IRC ha rappresentato uno dei progressi medici più importanti del XX secolo. Tale pratica chirurgica ha fornito la possibilità non solo di salvare decine di migliaia di pazienti ma anche di migliorare la qualità di vita permettendo a malati terminali di ritornare ad una piena vita sociale e lavorativa (1, 2). Il trapianto renale è limitato da una carenza di organi,

ma offre la migliore qualità di vita ai pazienti con insufficienza renale cronica, sottraendoli in tal modo al trattamento dialitico. Il successo di un trapianto clinico è legato principalmente alle risposte immunologiche del ricevente nei confronti degli antigeni di istocompatibilità (HLA) del donatore, e quindi alla possibilità di modificare tali risposte per prevenire quel complesso processo di danneggiamento del trapianto costituito dal rigetto.

I fattori che determinano il tipo e l'intensità di una risposta nei confronti di un organo trapiantato coinvolgono nel ricevente meccanismi effettori cellulari ed anticorpo-mediati i quali sono responsabili delle risposte di rigetto acute e croniche, a loro volta variamente influenzate da diversi tipi di immunosoppressione.

Negli ultimi anni è di gran lunga migliorata la capacità di prevenire o trattare i rigetti acuti cellulari (mediati dalle cellule T) con una riduzione della loro frequenza a meno del 15%, di cui la maggioranza dei casi responsivi alla terapia immunosoppressiva. Minori sono stati invece i progressi sin qui ottenuti con i rigetti sostenuti dalle risposte cellulari B, responsabili di rigetti acuti e cronici anticorpo-mediati i quali hanno assunto una sempre maggiore rilevanza clinica e risultano purtroppo scarsamente controllabili dai trattamenti immunosoppressivi (3). È ben noto che la presenza di alloanticorpi contro gli antigeni HLA di classe I e di classe II nel siero di pazienti in attesa di trapianto di organi solidi, abbia un impatto negativo sull'*outcome* del trapianto per una aumentata incidenza di rigetti acuti (cellulari ed anticorpo mediati) e di rigetti cronici. Nel 1969 Patel e Terasaki (4) riportavano che un *cross-match* (XM) positivo tra i linfociti di un donatore ed il siero dei riceventi si associava ad una perdita rapida ed immediata del trapianto. Questo primo studio permise di evidenziare che gli anticorpi clinicamente rilevanti in un XM positivo erano quelli diretti contro gli antigeni codificati dai geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che pertanto si confermavano come fattore centrale nel rigetto dei trapianti. Le suddette osservazioni, confermate successivamente in tutti i centri di trapianto nel mondo, stabilirono il concetto fondamentale che un XM positivo rappresentasse una controindicazione assoluta al trapianto e portarono all'identificazione di due categorie di pazienti in attesa di trapianto renale: pazienti non sensibilizzati e pazienti con anticorpi anti-HLA. Da allora i criteri di allocazione degli organi, con particolare riferimento al trapianto di rene, si sono fortemente basati sulla politica di trapiantare solo pazienti con XM negativo verso i potenziali donatori. Gli anticorpi (ab) preformati specifici per antigeni-HLA di classe I (A, B, C) e classe II (DR, DQ, DP) (ab-anti-HLA), la cui presenza permette di definire i livelli di immunizzazione pre-trapianto dei pazienti in lista di attesa, rappresentano da molti anni un problema di primaria importanza in quanto la percentuale di trapianto nei pazienti immunizzati risulta drammaticamente ridotta a causa dell'alta incidenza di XM positivi controindicanti il trapianto. Infatti, tali pazienti, se trapiantati in assenza di opportune strategie, sono esposti ad un alto rischio di insuccesso nel breve e nel medio termine a causa di un'elevata incidenza di rigetti acuti anticorpo-mediati e/o di rigetti cronici (5-7). A partire dalla metà degli anni '90 il

numero dei pazienti iperimmunizzati presenti sulle liste di attesa è progressivamente aumentato. Nel 2003 il 32% dei pazienti presenti nelle liste di attesa USA presentava anticorpi-anti-HLA e la percentuale di pazienti fortemente immunizzati con ampiezza di reattività anticorpale contro panel linfocitario (*panel reactive antibody* - PRA %)  $\geq 80\%$  risultava del 13.7% (8). Tali dati si sono confermati anche in Italia dove la percentuale media di pazienti con PRA  $\geq 80\%$  risulta del 38.6% nei pazienti con un'attesa in lista superiore ai 10 anni (dati ottenuti da una recente analisi della Commissione Nazionale del Centro Nazionale Trapianti sui "Grandi ritardatari"). Negli USA nel 2003 solo il 6.5% di tutti i trapianti renali effettuati ha riguardato pazienti con un PRA  $\geq 80\%$  nonostante che tali pazienti rappresentassero più del 13% dei pazienti in lista di attesa. Sempre negli USA, sebbene i pazienti immunizzati (con un PRA  $>10\%$ ) comprendano poco più di un terzo delle liste di attesa di trapianto da donatore cadavere, essi ricevono attualmente solo il 19.5% dei trapianti (8). Inoltre, una lunga permanenza in lista di attesa rappresenta di per sé un fattore di rischio aggiuntivo, in quanto responsabile essa stessa di una minore sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato. I costi economici ed emozionali della permanenza in dialisi sono considerevoli e contrastano in maniera evidente con i benefici ottenibili da un trapianto.

Il problema dell'iperimmunizzazione non riguarda solo pazienti in lista di attesa di trapianto da donatore cadavere, ma anche pazienti che pur disponendo di un potenziale donatore vivente presentano una situazione di incompatibilità a causa di anticorpi anti-HLA donatore specifici (*donor specific antibody* - DSA), o per incompatibilità per il sistema gruppoematico ABO.

Entrambe queste forme di incompatibilità, come verrà dettagliato in seguito, possono essere affrontate e risolte con particolari protocolli di desensibilizzazione. Risultano pertanto molto importanti i protocolli tesi alla riduzione in tali candidati dei livelli di immunizzazione (sia da anticorpi anti-HLA che da isoemoagglutinine anti ABO) ed alla conseguente effettuazione di un trapianto sicuro che se effettuato precocemente può determinare anche in tale categoria di pazienti una riduzione della morbilità e mortalità ed un miglioramento della qualità di vita (9).

#### **RILEVANZA CLINICA DEGLI ANTICORPI ANTI-HLA NEL RIGETTO DI ALLOTAPIANTI E METODICHE DI IDENTIFICAZIONE**

Gli anticorpi anti-HLA possono essere presenti nel siero di pazienti con pregressa esposizione ad eventi immunizzanti come gravidanze, trasfusioni e trapianti (5, 6, 10). In questi pazienti, durante l'attesa in lista per trapianto, la presenza di tali anticorpi può esse-

re variabile (7). Essi infatti possono: a) persistere in circolo a titoli elevati per molti anni anche in assenza di ulteriori stimoli antigenici, con conseguente estrema difficoltà di trapianto per la positività dei *tests* di XM nei confronti di potenziali donatori (7); b) non essere più riscontrabili nel siero. In questo caso, la persistenza di cellule B memoria specifiche potrà tuttavia determinare la ricomparsa di anticorpi anti-HLA a titoli elevati in seguito a nuovo *boost* antigenico (come nel caso ad esempio di successivo trapianto esprimente le stesse specificità HLA verso cui erano diretti gli anticorpi preesistenti).

Numerosi studi (11, 12) hanno mostrato che quasi tutti i pazienti che abbiano perso un trapianto di rene per rigetto acuto e/o cronico e che siano in attesa di un trapianto successivo, presentano nel loro siero anticorpi anti-HLA specifici per gli antigeni HLA di classe I e di classe II non condivisi con il rispettivo donatore e spesso anche verso antigeni *cross-reagenti* con i primi. In aggiunta, anticorpi anti-HLA "*de novo*" possono comparire dopo trapianto anche in pazienti non immunizzati, e questo rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di rigetto acuto o cronico (5, 6, 10).

In base alla specificità per epitopi antigenici, gli anticorpi anti-HLA di classe I e II possono essere classificati nelle seguenti categorie (13, 14):

- 1) anticorpi diretti verso epitopi "privati", con reattività verso uno o più singole specificità antigeniche;
- 2) anticorpi diretti verso epitopi "pubblici" con reattività verso alcuni o tutti gli antigeni appartenenti allo stesso *cluster* di antigeni CREG o *cross reactive groups*;
- 3) anticorpi "multispecifici" con ampia reattività verso più gruppi CREG ed esprimenti un PRA verso antigeni HLA di classe I e/o II del 90-100%.

Con particolare riferimento ai trapianti di rene e/o pancreas, un'accurata analisi degli anticorpi anti-HLA durante l'attesa in lista e nel successivo *follow-up* post-trapianto, riveste un ruolo di grande importanza nella guida delle scelte terapeutiche mirate a migliorare, in caso di immunizzazione, le possibilità di trapianto, e a prevenire l'insorgenza di rigetto acuto e/o cronico in caso di comparsa di anticorpi dopo trapianto. Per questo tipo di analisi, i metodi di laboratorio devono quindi essere in grado di: a) identificare livelli anche molto bassi di anticorpi specifici (alta specificità e sensibilità); b) identificare anticorpi anti-HLA donatore specifici nell'ambito di PRA molto elevati. Negli ultimi anni, l'evoluzione delle tecniche di laboratorio ha permesso di rendere possibili la precisa determinazione e caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA, anche quando presenti a basso titolo o appartenenti a classi e sottoclassi anticorpali non fissanti il complemento (quali IgA, IgG2 ed IgG4) ma comunque capaci di fare danno su cellule parenchimali dell'organo trapiantato attraverso citotossicità cellulare anticorpo di-

pendente (ADCC), mediata in maniera aspecifica da monociti/macrofagi e cellule NK. Alla storica tecnica di citotossicità complemento dipendente (CDC), in uso da circa 40 anni (basata sull'uso come cellule bersaglio di cellule linfocitarie vitali in grado di identificare solo anticorpi fissanti il complemento come IgG1, IgG3 ed IgM) e caratterizzata da bassa sensibilità ed alta specificità, si sono affiancati negli ultimi anni i cosiddetti *solid phase immunoassays* (15-18), che hanno rappresentato un progresso fondamentale per l'identificazione dei DSA prima e dopo il trapianto. Essi si basano sull'uso di antigeni purificati legati a:

- pozzetti di piastre *microtiter* (analisi mediante test immunoenzimatico ELISA);
- microsfere di polisterene, analisi mediante citofluorimetria, a flusso standard, es. Flow-PRA®);
- microsfere di polistirene, impregnate con proporzioni diverse di due coloranti (analisi multiplex con tecnologia Luminex).

Nei pazienti immunizzati, l'utilizzo di queste nuove tecniche che permettono un monitoraggio rapido ed altamente sensibile dei DSA, deve sempre essere affiancato dall'utilizzo dei test di XM in CDC e in citofluorimetria (quest'ultima soprattutto in caso di trapianto da vivente). Tutti questi strumenti diagnostici (15-18), affiancati da strategie dirette da un lato all'individuazione di donatori compatibili (circuiti nazionali e talvolta internazionali di *organ sharing*) per riceventi la cui immunizzazione permetta di individuare finestre di antigeni HLA permissivi e dall'altro all'identificazione di pazienti iperimmunizzati con anticorpi multispecifici per i quali siano necessari trattamenti di desensibilizzazione (19) hanno permesso di garantire a tali pazienti una reale possibilità di trapianto. Nel caso di trapianto da potenziali donatori viventi incompatibili per la presenza nei riceventi di DSA le procedure di desensibilizzazione si rendono necessarie anche per bassi livelli di immunizzazione, riflettenti la presenza di anticorpi donatore specifici diretti verso una singola specificità HLA incompatibile. I trattamenti desensibilizzanti, basati su due principali meccanismi di meccanismi di azione quali quelli della immunomodulazione/*down-regolazione* e quelli della rimozione (Tab. I) sono rappresentati principalmente da:

- immunoglobuline ad alte dosi (Ig-AD) o assorbimento extracorporeo di IgG anti-HLA su colonne di Proteina A- od Ig-Sepharosio (immunoassorbimento-IA) utilizzabili sia per trapianti di rene da donatore cadavere sia da donatore vivente;
- plasmateresi (PP) pre-trapianto associate a infusione endovenosa di immunoglobuline a basse dosi (Ig-BD), utilizzabili, visto il rapido *rebound* post-plasmateresi dei DSA, quasi esclusivamente nel trapianto di rene da donatore vivente, in cui l'intervento di trapianto può essere programmato. A

**TABELLA I - TECNICHE DI DESENSIBILIZZAZIONE IN BASE ALLA LORO MODALITÀ DI AZIONE**

- **Mediante down-regolazione/modulazione della produzione anticorpale**
  - Immunoglobuline (Ig) endovena
  - Anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab)
- **Mediante procedure di rimozione**
  - Plasmaferesi standard (PP); Plasmaferesi a cascata o a doppia filtrazione (PPDF)
  - Immunassorbimento (IA) su colonne di Proteina A-Sefarosis od Ig-Sefarosis
  - Immunoassorbimento su colonne di Sefarosis coniugate ad antigeni specifici (quali: es. antigeni gruppo ematici A, B per la rimozione di isoemoagglutinine anti A, B)

tali tecniche desensibilizzanti, può essere associato l'utilizzo di agenti specifici diretti contro i linfociti B, quale per esempio il Rituximab, anticorpo monoclonale chimerico specifico per la molecola di superficie CD20, in grado di eliminare efficacemente i linfociti B maturi CD20 positivi con inibizione sinergica sulla produzione di anticorpi anti-HLA.

Nel corso degli ultimi anni, tali strategie di desensibilizzazione sono state ampiamente utilizzate in vari Centri (20-24), passando da un'iniziale fase sperimentale ad una successiva fase di utilizzazione clinica. Gli stessi protocolli di desensibilizzazione, variamente modificati, vengono anche utilizzati nel periodo post-trapianto per la profilassi ed il trattamento di rigetti anticorpo-mediati C4d+, presenti con elevata frequenza nei pazienti trapiantati dopo desensibilizzazione.

#### TEST DI VERIFICA

**1) Una delle seguenti definizioni è falsa in relazione alle specificità antigeniche riconosciute dagli anticorpi anti-HLA presenti nei sieri dei riceventi di trapianto:**

- a. Anticorpi diretti verso un solo epitopo "privato" di classe I
- b. Anticorpi diretti verso due o più epitopi "privati" di classe I
- c. Anticorpi anti B2 microglobulina
- d. Anticorpi diretti verso epitopi "pubblici" CREG di classe I
- e. Anticorpi diretti verso epitopi "privati" e "pubblici" GREG di classe I.

**2) Quale effetto hanno sul trapianto renale gli anticorpi anti-HLA presenti nei sieri dei riceventi trapiantati?**

- a. Nessuno effetto
- b. Effetto positivo con miglioramento della sopravvivenza del trapianto
- c. Effetto negativo con diminuzione della sopravvivenza del trapianto
- d. Sono responsabili dell'incidenza di carcinomi renali nel rene trapiantato
- e. Sono responsabili di infezioni nel rene trapiantato.

**3) Quali sono i principali eventi immunizzanti responsabili della formazione di anticorpi anti-HLA?**

- a. Trasfusioni, gravidanze e precedenti trapianti non riusciti
- b. Infezioni batteriche, fungine e protozoarie
- c. Vaccinazioni
- d. Interventi chirurgici
- e. Neoplasie.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

#### TECNICHE DI DESENSIBILIZZAZIONE PRE-TRAPIANTO

Negli ultimi anni sono stati sviluppati protocolli terapeutici in grado di permettere l'effettuazione con successo di trapianti di rene anche in pazienti immunizzati, nonostante la presenza di DSA responsabili di tests di XM positivi (25-29). Già nella fase pre-trapianto tali protocolli prevedono il trattamento con Ig-AD e.v., PP seguite da IG-BD e.v., IA su colonne di Proteina A-od Ig-Sefarosis. Tutte queste tecniche possono essere associate all'utilizzo di agenti specifici per i linfociti B, quale per esempio il Rituximab. Dal momento che nessuna di queste tecniche è stata utilizzata su larga scala e neppure in studi randomizzati, un protocollo ideale da utilizzare a tale scopo non è stato ancora identificato; tuttavia i differenti approcci hanno mostrato efficacia e non appaiono gravati da importanti effetti collaterali. Prima di illustrare in dettaglio le basi immunologiche sottese alle varie tecniche di desensibilizzazione, appare opportuno ribadire che alcune di esse, quali le PP + Ig-BD e.v., sono praticabili a causa del rapido *rebound* anticorpale, particolarmente se non esclusivamente, nell'ambito dei trapianti da donatori viventi. Altre metodiche, quali l'infusione e.v. di Ig-AD associata o meno al Rituximab, trovano invece

impiego sia nei trapianti da donatore vivente che in quelli da donatore cadavere.

### **Problematiche relative alla rimozione/modulazione della produzione degli anticorpi-anti HLA nei pazienti immunizzati**

Un breve accenno alle dinamiche di produzione, distribuzione e attività degli anticorpi anti-HLA DS è essenziale prima di considerare in dettaglio le varie tecniche di rimozione anticorpale e di modulazione della loro produzione. Queste possono essere diverse nel periodo di pre-trapianto e di post-Tx. La rimozione di DSA della classe IgG (mediante PP od IA) è condizionata dal loro volume di distribuzione, circa doppio rispetto a quello plasmatico. Qualsiasi tecnica che rimuova gli ab dal circolo in maniera efficiente e rapida avrà soltanto un effetto temporaneo poiché la redistribuzione si verifica all'incirca nelle successive 24 ore. Nella fase pre-trapianto, il *rebound* anticorpale, che si verifica tra le varie sessioni, pare essere riconducibile a fenomeni di redistribuzione dal compartimento extravascolare al plasma. Nel post-trapianto si aggiunge, a questo meccanismo, la stimolazione antigenica e quindi un possibile *rebound* nella produzione (DSA), cui può associarsi, per meccanismi di cross-reazione, anche la produzione di anticorpi non DSA. Nel periodo post-Tx la produzione di DSA può essere precoce, ad alto titolo e causare una disfunzione rapida del trapianto. In presenza di un rigetto ab-mediato è necessario che le tecniche di rimozione abbiano un'efficienza pari alla resintesi. La rimozione dei DSA può essere utile non solo ad evitare il danno da essi mediato ma anche a garantire, che con il passare del tempo rispetto al momento del trapianto ed in presenza della terapia immunosoppressiva, si verifichino nel post-trapianto i ben noti fenomeni di immunomodulazione e di accomodazione.

### **Le Tecniche di desensibilizzazione**

#### **Immunoglobuline endovena ad alte dosi (Ig-AD)**

Le Ig e.v. AD (infusioni mensili per più cicli al dosaggio di 2 g/kg peso corporeo) sono state usate nella pratica clinica in riceventi immunizzati con XM positivi a causa della presenza di DSA sia per trapianti di rene da donatore vivente che da donatore cadavere. Il loro uso in protocolli di desensibilizzazione è stato introdotto dal Gruppo di S. Jordan al *Cedars- Sinai Medical Center* di Los Angeles nella prima metà degli anni '90 (29).

Tale impiego è derivato da numerose osservazioni cliniche dimostranti un effetto immunomodulatorio delle preparazioni di Ig in malattie infiammatorie ed autoimmuni (34).

Alla base di tale effetto di "*down-regulation*", dimostrato anche sulle risposte alloimmuni in corso di allo-trapianti, sono stati proposti i seguenti meccanismi di cui la gran parte dimostrati sperimentalmente:

- induzione di circuiti anti-idiotipici (29, 34) con diminuzione dei livelli di allo- ed autoanticorpi;
- inibizione dell'attivazione dei geni di citochine infiammatorie con *down-regolazione* della loro sintesi ed inibizione della loro attività (30);
- inibizione dell'attività complementare con effetto *scavenger* su prodotti intermedi dell'attivazione complementare quali C3b e C5b, accelerazione del loro catabolismo ed inibizione del complesso di attacco C5b-C9 (31);
- attività anti *T-cell receptor* (30);
- interazione con cellule presentanti l'antigene (APC) attraverso il loro *Fc receptor* e conseguente blocco dell'attivazione dei linfociti T (30, 32, 33);
- inibizione in colture miste linfocitarie dell'attivazione T e riduzione dell'espressione sulle APC di CD19, CD40, ICAM-1, CD86 ed MHC di classe II (32);
- apoptosi delle cellule B attraverso meccanismi *Fc receptor* dipendenti (32);
- induzione su linfociti B del recettore inibitorio *FcγRIIB*;
- inibizione della maturazione delle cellule dendritiche e della loro capacità di presentazione antigenica ed induzione della produzione di IL-10 (33).

#### **Trattamento plasmateretico (PP)**

Tecnica che permette di ottenere eliminazione di anticorpi attraverso la rimozione di plasma rimpiazzato insieme alla componente corpuscolata del sangue, con soluzioni di albumina, *fresh frozen plasma* (Ff plasma) o altri sostituti (27, 34, 35). Oltre al rischio di coagulazione, tale tecnica richiede la necessità di rimpiazzare le proteine plasmatiche perse con la rimozione del plasma, poiché la rimozione di 1 g di IgG determina perdita di 150 mg di albumina in aggiunta ad altre proteine e fattori della coagulazione. Le soluzioni di albumina rappresentano la migliore preparazione per il rimpiazzo dei liquidi, sebbene l'uso di Ff plasma venga raccomandato nelle prime 48 ore dopo un trapianto per evitare complicanze emorragiche. Il numero di trattamenti plasmateretici necessari per ottenere un'efficace eliminazione/rimozione anticorpale, è variabile da paziente a paziente; alcuni lavori riportano la necessità di più di 20 cicli di trattamento.

Con entrambe le tecniche sopracitate (Ig-AD e PP) alcuni anticorpi anti-HLA appaiono di più difficile rimozione/eliminazione rispetto ad altri in base ad una gerarchia che appare proporzionale all'espressione quantitativa degli antigeni HLA verso cui sono diretti:

HLA classe I >DR/DQ >DRW (DR51, DR52, DR53); CREG > epitopi privati (36).

### **Doppia filtrazione o PP a cascata (DFPP)**

Si differenzia dalla plasmaferesi in quanto il plasma rimosso con il trattamento non viene eliminato ma fatto passare in un secondo filtro in grado di assorbire solo le molecole ad alto peso molecolare (anticorpi, frazioni del complemento, fattori della coagulazione), con successiva reinfusione di molecole plasmatiche a basso peso molecolare. Rispetto alla PP standard, presenta il vantaggio di poter trattare quantità nettamente maggiori di plasma (fino a 250 mL/kg vs 60 mL/kg al giorno). Inizialmente utilizzata in Giappone per i trapianti ABO incompatibili (37), questa tecnica è stata successivamente utilizzata anche in Europa, quale strategia desensibilizzante in pazienti immunizzati.

### **Immunoassorbimento (IA)- su colonne di Proteina A- od Ig-Sefarosis**

Le Ig possono venire rimosse con passaggio del plasma su matrice di affinità: le colonne di Proteina A-Sefarosis (es. Excorim®, Lund-Sweden; Immunosorba®, Fresenius Hemocare, St. Wendel, Germany) sono quelle più usate nella pratica clinica. Nei pazienti esse sono state utilizzate per ottenere riduzione pre-trapianto degli alloanticorpi (38-43); ad eccezione delle IgG3, tutte le sottoclassi di IgG vengono infatti legate con efficacia dalla proteina A (44). Durante il trattamento, due colonne vengono usate in maniera alternata, deviando il flusso extracorporeo del plasma tra le colonne, con possibilità di rigenerazione della colonna non in uso mediante eluizione acida degli anticorpi legati. L'assenza di necessità di rimpiazzo delle proteine plasmatiche e la possibilità di processazione di maggiori volumi plasmatici (fino a 500 mL/kg di plasma per sessione), rappresentano vantaggi dell'IA rispetto al trattamento plasmaferetico. Si stima che una colonna di Proteina A sia capace di assorbire il 50% delle IgG dal volume plasmatico (45) e che passaggi multipli possano risultare in una deplezione del 90% dei livelli di IgG (46). Questo tipo di trattamento, sia nella fase pre- sia in quella post-trapianto, è ripetibile, in letteratura sono riportati fino a 24 trattamenti in associazione ad ATG (globulina anti-timocitaria) od ALS (siero anti-linfocitario), per la profilassi nel periodo post-trapianto del rigetto acuto anticorpo-mediato (43). In alternativa alle colonne di Proteina A, possono essere utilizzate le colonne di Ig-Sefarosis (Therasorb®, Munich, Germany) in cui, alla matrice di Sefarosis, sono legati anticorpi (da pecora) anti-IgG umane.

### **Immunoassorbimento con colonne antigene-specifiche**

L'IA utilizzando antigeni purificati rappresenta il metodo più specifico per rimuovere DSA. Tale obiettivo, difficile da ottenere nel caso dell'immunizzazione per HLA a causa dell'ampio range di specificità HLA, è più facilmente raggiungibile nel caso dei trapianti con incompatibilità ABO; in questo caso infatti sono solo due i tipi di antigeni (le sostanze A e B) richiesti per l'assorbimento di isoemoagglutinine. Gli antigeni gruppo ematici legati a Sefarosis sono disponibili in colonne a bassa saturabilità (dopo perfusione con 4 litri di plasma le colonne non sono ancora saturate) ed altamente biocompatibili (Glycosorb® ABO, Glycorex, Lund Sweden). A differenza della plasmaferesi a cascata o a doppia filtrazione, tutti i componenti plasmatici vengono reinfusi al paziente tranne che gli anticorpi anti A ed anti B e sono possibili sessioni routinarie di trattamento con processazione di 150 mL di plasma / kg di peso corporeo con scarsi effetti collaterali (37, 47, 48).

### **Farmaci accessori sinergizzanti**

Il Rituximab, anticorpo monoclonale chimerico specifico per la molecola di superficie CD20 presente sui linfociti B, venne inizialmente approvato in campo clinico per il trattamento dei linfomi follicolari. La molecola CD20 è espressa precocemente sulle cellule B durante l'ontogenesi, ma la sua espressione è assente sulle plasmacellule. Il Rituximab elimina le cellule B attraverso tre possibili meccanismi: ADCC, citotossicità complemento-dipendente (CDC) ed apoptosi. Fino a due anni dopo la sua somministrazione (anche in singola dose), si assiste a completa scomparsa delle cellule B memoria CD27+ (49, 50). L'utilizzo di tale farmaco appare, nei pazienti immunizzati, una logica scelta strategica: attraverso la riduzione o l'eliminazione delle cellule B CD20+. Infatti, è possibile inibire la produzione di plasmacellule produttrici degli ab anti-HLA. Non agendo direttamente sulle plasmacellule, gli anticorpi anti-CD20 non esplicano tuttavia un'azione immediata sui livelli di anticorpi circolanti, motivo per cui l'effetto di questo farmaco risulterebbe estremamente limitato laddove usato da solo. Molti studi hanno infatti dimostrato che l'utilizzo di Rituximab in associazione a PP, Ig-AD e.v. o IA risulta di efficacia clinica sia nella desensibilizzazione dei pazienti con anticorpi anti-HLA che nella inibizione/rimozione delle isoemoagglutinine nel caso di trapianti ABO incompatibili. Come dimostrato da un recente studio, la somministrazione combinata di Rituximab e Ig e.v. AD, permetterebbe inoltre di ottenere una desensibilizzazione molto più rapida, con conseguente riduzione del numero di infusioni (51).

## METODICHE DI DESENSIBILIZZAZIONE IN BASE AI LIVELLI DI IMMUNIZZAZIONE

Il condizionamento pre-trapianto, attraverso i metodi elencati nella Sezione precedente, ha l'obiettivo di abbassare i livelli di DSA circolanti al di sotto della concentrazione ancora in grado di fare danno sull'organo trapiantato. Entrambi i protocolli con Ig-AD o PP/Ig-BD mostrano efficacia clinica e sono ben tollerati: da un lato le PP, con un meccanismo di rimozione, permettono la riduzione dei DSA a livelli molto bassi non più in grado di fare danno sul rene trapiantato; dall'altro le Ig e.v. agiscono mediante una neutralizzazione della citotossicità mediata dai DSA ed una immunomodulazione inibitoria della loro produzione nel lungo termine. Non è ancora ben chiaro quale sia il livello di rimozione/riduzione degli anticorpi anti-HLA cui bisogna giungere per poter trapiantare in sicurezza un paziente immunizzato. Tipicamente tale situazione è rappresentata da un XM-CDC negativo, sebbene i DSA possano ancora essere messi in evidenza con tecniche più sensibili, quali la CF per i tests di XM e le tecniche in fase solida (ELISA, Flow-PRA, Luminex) per la loro determinazione e per il titolo. Alla luce di una tale possibile persistenza con i suddetti metodi, dopo i trattamenti di desensibilizzazione, l'obiettivo appare essere rappresentato, come vedremo nella maggioranza degli studi clinici, dal raggiungimento della negatività del XM effettuato con metodica di citotossicità complemento dipendente (XM/CDC) (eliminandosi in tal modo il rischio di rigetto iperacuto), ed anche in presenza di una residua debole positività del XM con metodica citofluorimetrica (XM/CFM), purché tale positività presenti uno *shift* dei canali di fluorescenza (FCS)  $\leq 200$ . Il titolo di DSA viene considerato come una misura precisa della quantità di anticorpi presenti ed appare correlato sia con la quantità di PP od infusioni di IG-AD e.v. necessarie per un'efficace desensibilizzazione, sia con la probabilità di rigetti acuti anticorpo-mediati nella fase post-trapianto. Sulla scorta dei lavori pubblicati in letteratura (19) è stata elaborata dalla *British Society of Transplantation*, nell'ambito delle Linee Guida sul trapianto renale in presenza di incompatibilità anticorpali pubblicate nel settembre 2006, una gerarchia di rischio basata su titolo e specificità dei DSA ed utilizzata nell'ambito di tale Organizzazione come criterio guida di riferimento per l'adozione di strategie di trapianto e di desensibilizzazione nei pazienti immunizzati (Tab. II). Anche se tali criteri non sono accettati nella loro interezza da altre Organizzazioni di Trapianto, essi hanno il pregio di indicare per titolo e specificità di anticorpi anti-HLA e per tipologia di positività dei XM pre-trapianto (CDC, CFM) l'approccio clinico da utilizzare. Da tale Tabella si evince comunque chiaramente come la presenza di DSA diretti verso specificità HLA di classe I (A, B) possa

rappresentare in presenza di titoli elevati di positività in XM-CDC una situazione ad alto rischio per l'insuccesso del trapianto anche utilizzando protocolli di desensibilizzazione, rischio che appare anche maggiore a parità di titolo rispetto ai DSA diretti verso specificità DR.

Nella valutazione dell'efficacia dei trattamenti desensibilizzanti è importante tenere presente che sia le Ig-AD che il Rituximab possono interferire sui test di laboratorio di XM eseguiti sia con metodica CDC che CFM (in modo particolare in caso di utilizzazione di linfociti B come cellule bersaglio) rendendo in tal modo difficile il monitoraggio dei livelli di DSA. Anche se alcuni Autori suggeriscono di valutare nello studio dei pazienti immunizzati e nel corso del monitoraggio di eventuali trattamenti desensibilizzanti altri anticorpi, quali quelli con specificità anti-MICA (molecole atipiche class-I *like* codificate da geni localizzati nella regione HLA di classe III) (52) o anti-endotelio, gli anticorpi anti-HLA sono sicuramente all'apice nella gerarchia delle risposte anticorpali verso allotrapianti e rivestono un ruolo clinico predominante.

### TEST DI VERIFICA

**4) Qual è mediamente la percentuale di pazienti iperimmunizzati (PRA>80%) riscontrata nelle varie liste di attesa per trapianto renale?**

- Intorno al 10%
- <2%
- >30%
- >50%
- Tra il 20 ed il 30%.

**5) Uno dei seguenti protocolli di desensibilizzazione pre-trapianto è falso:**

- Immunoglobuline e.v. ad alte dosi + Rituximab
- Ciclosporina + corticosteroidi ad alte dosi
- Immunoglobuline e.v. ad alte dosi
- Plasmaferesi + Immunoglobuline e.v. a basse dosi
- Immunoassorbimento su colonne di proteina A Seharosio.

**6) Uno dei seguenti meccanismi di azione attivi nell'effetto desensibilizzante delle IG e.v. è falso:**

- Induzione di circuiti anti-idiotipici
- Inibizione dell'attivazione dei geni per citochine infiammatorie
- Inibizione dell'attività complementare
- Apoptosi dei linfociti B attraverso meccanismi Fc Receptor dipendenti
- Inibizione delle cellule NK.

**TABELLA II - GERARCHIA DEL RISCHIO (PER PERDITA A BREVE TERMINE DEL TRAPIANTO PER CAUSE IMMUNOLOGICHE) NEI TRAPIANTI RENALI CON INCOMPATIBILITÀ PER ANTICORPI ANTI-HLA IN BASE ALLA SPECIFICITÀ (ANTI CLASSE I, ANTI CLASSE II) E AL TITOLO DEGLI ANTICORPI ANTI-HLA DONATORE SPECIFICI (DSA), SECONDO LE LINEE GUIDA DELLA BRITISH TRANSPLANTATION SOCIETY**

	Antigeni HLA verso cui possono essere diretti gli anticorpi		
	HLA Classe II Specificità supertipiche DR (51/52/53)	HLA Classe II Specificità da DR1 a DR10	HLA Class I (A, B)
Assenza di anticorpi anti-HLA			
Presenza di anticorpi anti-HLA in sieri storici			
Assenza di anticorpi anti-HLA nel siero recente			
Presenza di anticorpi anti-HLA mediante metodica Flow-PRA o Luminex			
Negatività XM/CFM			
Negatività XM-CDC			
Positività XM/CFM			
Negatività XM/CDC			
XM/CDC positivo, titolo fino a 1:32			
XM/CDC positivo, titolo fino 1:64-1:128			
XM/CDC positivo, titolo fino a 1:256 o maggiore			

XM: Cross match; XM/CDC: effettuato mediante tecnica di citotossicità complemento dipendente; XM/CFM: effettuato con tecnica citofluorimetrica

Celle con sfondo bianco: rischio molto basso, il trapianto può essere effettuato con un appropriato monitoraggio immunologico

Celle con sfondo grigio: il trapianto per essere effettuato può richiedere nella fase pre-trapianto la rimozione degli anticorpi e/o la modulazione della loro produzione

Celle con sfondo nero: rischio molto alto anche con trattamenti desensibilizzanti (adattata dalle Linee Guide della British Transplantation Society, Settembre 2006)

### PROBLEMATICHE PARTICOLARI NELL'AMBITO DEL TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE VIVENTE

Il trapianto da donatore vivente rappresenta non solo un'alternativa alla carenza di organi ma offre anche, rispetto a quello da donatore cadavere, una migliore sopravvivenza del trapianto nel lungo termine. Di non trascurabile importanza anche la possibilità di pianificazione del momento del trapianto, ivi compresa l'effettuazione di un trapianto *preemptive* che consente di evitare ai pazienti l'ingresso in dialisi. Quale integrazione a validi programmi di trapianto da

cadavere, quelli da vivente permettono inoltre un ampliamento del *pool* dei donatori disponibili con notevole beneficio sulle liste di attesa. In Italia, a differenza di altri paesi Europei ed extraeuropei, la percentuale di trapianti di rene da donatore vivente è inferiore al 10% del totale dei trapianti. La necessaria espansione di tale programma, da auspicarsi per le suddette motivazioni ed attualmente tra gli obiettivi di molti Centri di trapianto in Italia, viene però in qualche modo resa più difficile dal fatto che in circa il 25% delle potenziali coppie donatore/ricevente il trapianto è ostacolato dalla presenza nei riceventi di anticorpi anti-HLA do-

natore specifici o da incompatibilità ABO. Nel caso di trapianto da donatore vivente vengono ad aggiungersi, tra i fattori di rischio per incompatibilità HLA dovute ad immunizzazione, anche situazioni di particolari coppie donatore/ricevente quali quelli marito/moglie e figlio/madre a causa dell'esposizione della ricevente, nel corso della gravidanza, agli antigeni HLA non condivisi, espressi dal feto, di derivazione paterna.

È interessante sottolineare a tal riguardo che nei programmi di trapianto renale da donatori viventi il numero di trapianti non effettuabili per le suddette motivazioni eguaglia il numero di trapianti effettuati in ogni Centro (63), con un rilevante *drop-out* dei potenziali donatori cui contribuiscono in maniera non trascurabile anche le situazioni di non idoneità clinica rilevate nel corso delle procedure di studio dei potenziali donatori. Affiancando le strategie di superamento di barriere immunologiche, basate su protocolli di rimozione/riduzione degli anticorpi-anti-HLA e delle isemoagglutinine anti-AB, a programmi quali quello del trapianto da donatore vivente con modalità *crossover* è stato possibile negli ultimi anni fornire una chance realistica di trapianto per molte coppie incompatibili.

#### USO CLINICO DELLE TECNICHE DI DESENSIBILIZZAZIONE NEL TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE VIVENTE

##### Trapianto di rene in riceventi immunizzati con presenza di anticorpi anti-HLA donatore specifici (DSA)

Nel trapianto da donatore vivente in cui è possibile pianificare il momento dell'intervento per la costante disponibilità del potenziale donatore, a differenza del trapianto da donatore cadavere dove non è generalmente indicato l'uso delle plasmaferesi, è possibile utilizzare tutte le varie modalità di desensibilizzazione rappresentate principalmente da:

- Ig e.v. AD (infusioni mensili di 2 g/kg peso corporeo);
- PP associate all'infusione di Ig e.v. BD (100 mg/kg peso corporeo), queste ultime rappresentate principalmente da preparazioni di Ig CMV-specifiche;
- IA extracorporeo su colonne di proteine A- od Ig-Sefarosio. Quest'ultima modalità, almeno da quanto risulta dai dati della letteratura, è stata prevalentemente utilizzata nei trapianti renali da donatore cadavere con scarso utilizzo nei trapianti da donatore vivente. Sembra utile ricordare, per una più corretta comprensione del problema che, nel caso dei trapianti da vivente, le situazioni di incompatibilità HLA con XM positivo possono essere anche osservate in riceventi con livelli bassi di immunizzazione e quindi di PRA, essendo sostenute in tali casi da anticorpi diretti verso singole specificità

HLA di classe I e/o di classe II (es: anti B18 con un PRA del 10%; anti DR11 con un PRA del 17%). Laddove non si voglia per forte motivazione della coppia al trapianto da vivente o non si possa superare tali incompatibilità mediante ricorso al *pool* di donatori cadaveri, l'effettuazione del trapianto potrà avvenire solo utilizzando protocolli di desensibilizzazione.

##### Ig e.v. ad alte dosi (Ig-AD)

Le Ig-AD possono essere usate nei protocolli desensibilizzazione sia nei trapianti da donatore vivente che nei trapianti da donatore cadavere. Pazienti con alti livelli di anticorpi anti-HLA con positività di XM/CDC pre-trapianto possono essere desensibilizzati con somministrazione di IVIG ad alte dosi (infusioni mensili di 2 g/kg peso). Sebbene i già ricordati meccanismi di azione delle Ig e.v. non siano ancora completamente elucidati, il loro effetto di negativizzazione di un XM/CDC precedentemente positivo dovuto a DSA è rapidamente evidenziabile dopo loro somministrazione, probabilmente per l'azione di anticorpi anti-idiotipo. Le Ig-AD svolgono inoltre anche effetto nel lungo termine sulle risposte alloreattive, dovuto alla complessa attività inibitoria ed immunomodulatoria precedentemente descritta. I protocolli con Ig-AD sono stati principalmente utilizzati da due Gruppi, di cui il primo attivo negli Stati Uniti al *Cedars Sinai Medical Center* di Los Angeles ed il secondo in Francia all'*Hopital Georges Pompidou* di Parigi).

*a) Esperienza del Cedars Sinai Medical Center LA.* L'uso delle preparazioni di Ig-AD è stato introdotto nella pratica clinica del trapianto renale da donatore vivente all'inizio degli anni '90 in riceventi pediatrici (33) dal gruppo di Jordan, in associazione ad un *test* di analisi *in vitro* ritenuto utile per l'individuazione di pazienti *responders* ad una successiva desensibilizzazione *in vivo*. In tale *test* di inibizione (29) i sieri dei riceventi in studio, contenenti DSA, vengono incubati con Ig esogene (un campione delle stesse preparazioni di Ig e.v. da utilizzarsi *in vivo*) e poi sottoposti ad un XM/CDC contro i linfociti del potenziale donatore (od a *screening* contro *panel* linfocitari) verso cui avevano mostrato una precedente positività. Negli individui *responders* è possibile osservare una modifica della reattività (diminuzione del titolo) fino alla negativizzazione del *test* di XM contro linfociti *targets* rilevanti. Jordan et al. (53) hanno riportato, nell'ambito di uno studio coinvolgente 45 pazienti di cui 17 trapianti da donatore cadavere (15 di rene e due di cuore) che 26 pazienti di 28 immunizzati (93%) e con XM positivo sono stati tutti trapiantati dai rispettivi potenziali donatori viventi, sulla scorta della risposta al *test* di inibizione *in vitro*. La terapia immunosoppressiva (i.s.)

post-trapianto era costituita da induzione con anticorpo monoclonale anti-CD25, micofenolato mofetile (MMF), tacrolimus e corticosteroidi. Il trattamento con Ig si rivelò in grado di negativizzare la precedente positività del XM donatore specifico anche se in alcuni pazienti venne inibito solo il XM/CDC e non quella del XM/CFM. In tale studio, come anche in casistiche successive più estese, si osservava nel 31% dei casi un rigetto acuto anticorpo mediato (RAAM), con perdita del trapianto nel 7% dei pazienti; a 24 mesi la sopravvivenza di pazienti e del trapianto è stata rispettivamente del 97.6% e dell'89.1%. L'ottimizzazione dell'iniziale protocollo, basato sui dati generati dallo stesso gruppo in uno studio multicentrico controllato in doppio cieco (studio NIH-IG02) che comparava Ig-AD vs placebo in pazienti altamente sensibilizzati in attesa di trapianto renale sia da cadavere che da vivente (54), è rappresentato da infusione di dosi mensili di Ig-AD (ciascuna di 2 g/kg peso, fino ad un massimo di 140 g) per 4 mesi finché non si ottengano o XM totalmente negativi sia in CDC che in CFM od almeno la totale negatività del XM/CDC ed una positività residua del XM/CFM con uno shift dei canali di fluorescenza (FCS) < a 225. Tale protocollo è stato adattato dallo stesso gruppo anche per riceventi iperimmunizzati in lista UNOS di trapianto da cadavere da più di 5 anni con un PRA > del 30% e con frequenti offerte di rene da donatori verso cui si era sempre osservato un XM positivo. L'esperienza complessiva del gruppo, riferita in un recente *report* (55) e relativa al periodo Gennaio 1994 - Maggio del 2008, ha riguardato 169 pazienti immunizzati trapiantati dopo desensibilizzazione con Ig-AD ± rituximab e/o PP. L'esperienza precedente (1994-2005) aveva compreso solo i trattamenti con Ig-AD in dosi mensili di 2 g/kg per 4 mesi. In tale studio i pazienti venivano trapiantati spesso con XM/CFM + e presentavano un PRA medio del 52%; il 42% era costituito da trapianti da donatore cadavere ed il 58% da donatore vivente con un 39% di ritrapianti. Le sopravvivenze del trapianti ad 1,3 e 5 anni sono state le seguenti: ad 1 anno del 91.5% (150 pazienti valutabili), con il fallimento di 14 trapianti, 2 persi al *follow-up* e 3 morti a rene funzionante; a 3 anni dell'83.1% (84 pazienti) ed a 5 anni del 76.7% con 10 trapianti persi (di cui 4 per rigetto, 1 per trombosi, 4 per non compliance e scarso *follow-up* e 1 per rigetto cronico). Le creatininemie medie sono state rispettivamente ad 1,3 e 5 anni: 1.36, 1.43 ed 1.60 mg/dL; le sopravvivenze dei pazienti agli stessi intervalli: 97.6%, 96.4% e 89.6% (56). Tali dati risultano a 5 anni migliori di quelli relativi alle sopravvivenze del trapianto (61%) osservate allo stesso intervallo nei pazienti che sviluppano DSA de novo nel post-trapianto.

#### *Ig-AD + Rituximab*

Più recentemente lo stesso gruppo di Jordan (57)

usando un regime accelerato di Ig-AD al giorno 0 e 30 e Rituximab (1 g indipendentemente dal peso) o nei bambini (375 mg/m<sup>2</sup> di superficie corporea) al 1°, 7° e 22° giorno, ha potuto trapiantare 16/20 pazienti (80%). Il grado di immunizzazione veniva misurato mediante PRA in CDC e si osservava dopo desensibilizzazione un decremento medio di PRA dal 77 al 40%. La sopravvivenza dei pazienti e dei trapianti ad un anno è stata del 100 e del 94% (con la perdita di un solo trapianto su 16) e la creatininemia media ad un anno è stata di 1.3 mg/dL. Il tempo medio di attesa prima di tale protocollo di desensibilizzazione era di 12 anni mentre per i pazienti desensibilizzati entrati nello studio è stato di soli 5 mesi. Si è avuta un'alta incidenza di rigetto (50% e quello di rigetto ab mediata è stata del 31%). Nonostante le limitazioni, rappresentate dal piccolo numero di pazienti, dal periodo breve di osservazione e da un'alta incidenza di rigetti precoci, le implicazioni di quest'ultimo studio appaiono importanti per il potenziale contributo allo sviluppo ulteriore dei protocolli rapidi di desensibilizzazione associati ad un'alta percentuale di pazienti trapiantati. In più del 50% dei casi il trapianto è stato effettuato con XM non completamente negativi: infatti nel 69% dei pazienti vi era positività per XM/CFM e nel 19% anche per XM/CDC.

#### *b) Esperienza del Gruppo di D. Glotz all'Hopital Georges Pompidou - Parigi*

Il gruppo di Glotz ha trattato una serie di 19 pazienti iperimmunizzati prima del trapianto con un protocollo di desensibilizzazione rappresentato da tre infusioni (una ogni mese) di Ig-AD (2 g/kg) somministrate ognuna in un periodo di 48 ore. La desensibilizzazione è stata considerata coronata da successo se i livelli di anticorpi venivano ridotti di almeno il 50%. I pazienti così desensibilizzati sono stati trapiantati con il primo donatore ABO compatibile con un XM negativo in CDC contro le cellule T utilizzando i sieri post-trattamento desensibilizzante. Il trattamento immunosoppressivo al momento del trapianto è stato di IG e.v. (2 g/kg ai giorni 0-1, 20-21, 40-41), MMF (2 g/die), steroidi e ATG per 10 giorni al dosaggio di 1, 1.5 mg/kg/die seguiti da tacrolimus (58). Di questo gruppo sono però noti solo i risultati relativi a 15 pazienti pubblicati nel 2002 (59). Tredici dei 15 pazienti (di cui 2 candidati a trapianto da donatore vivente e 11 da donatore cadavere) così trattati sono stati desensibilizzati in maniera efficace e sottoposti a Tx. Molti pazienti avevano un PRA pre-trattamento del 50-70% (*range* 10-86%). Ad un *follow-up* di 2 anni 8/13 trapianti sono ancora funzionanti con 2 morti e 3 perdite del trapianto.

### PP/Ig-BD

Riceventi con alti livelli di DSA possono anche essere trapiantati in seguito a desensibilizzazione con PP/Ig-BD e.v. (100 mg/kg). I primi lavori sui risultati clinici ottenuti con tale tecnica sono stati pubblicati da tre gruppi attivi, rispettivamente alla *University of Maryland* di Baltimora (E.J. Schweitzer), alla *Johns Hopkins University School of Medicine* di Baltimora (R. Montgomery) ed alla *Mayo Clinic* di Rochester (J. Gloor). Il protocollo con PP/Ig-BD è stato utilizzato nella pratica clinica quasi esclusivamente nel trapianto da donatore vivente in quanto i DSA, dopo la rimozione, ritornano in circolo come *rebound* entro pochi giorni dall'interruzione del trattamento plasmateretico. Ciò pone la necessità di pianificare il trapianto nella fase di assenza dei DSA ed immediatamente a ridosso dalla fine delle PP, come possibile, solo nel caso di trapianto da donatore vivente. Le due componenti di tale protocollo agiscono di concerto: infatti le PP multiple permettono di rimuovere i DSA, mentre le Ig-BD permettono di rimpiazzare la perdita di Ig con una possibile parallela azione di immunomodulazione. La rimozione di DSA, mediante PP/Ig-BD (plasmaferesi a giorni alterni con 1, 1.5 scambio di volume per sessione, seguite alla fine dall'infusione di 100 mg/kg di Ig), in pazienti immunizzati candidati a trapianto renale da donatore vivente è stata riportata nel 2000 alla *Johns Hopkins University* in USA dal gruppo di Montgomery che per primo ne ha dimostrato l'efficacia clinica (60). Montgomery et al. (61) hanno utilizzato PP/Ig-BD per trapiantare 4 pazienti tutti con XM positivo contro i rispettivi potenziali donatori. Tre di questi 4 pazienti avevano bassi livelli di DSA (negatività di XM/CDC, positività di XM/CFM) mentre il restante paziente presentava anche un XM/CDC positivo. Tutti i riceventi sono andati incontro a rigetti acuti umorali trattati con successo. La sopravvivenza del *graft* è risultata del 100% dopo un *follow-up* di 40 settimane. Il tipo di i.s. usata in tali pazienti era rappresentata da induzione con Mab anti-CD25, (daclizumab) in associazione con MMF, tacrolimus e corticosteroidi. L'uso del daclizumab ha permesso di monitorare i livelli di DSA nel periodo post-Tx (a differenza dei pazienti trattati con Ig-AD e Rituximab in cui l'interferenza di tali trattamenti rende difficile e non completamente attendibile il monitoraggio dei livelli di DSA nel post-trapianto). Nel corso di rigetti acuti anticorpo-mediati (RAAM) veniva osservata una ricomparsa dei DSA ed una loro successiva scomparsa dopo un nuovo trattamento con PP/Ig-BD. Lo studio iniziale è stato successivamente esteso a 18 soggetti, 8 dei quali avevano un XM/CDC positivo mentre i restanti 10 un XM/CFM ancora positivo. L'i.s. era rappresentata da Daclizumab, Tacrolimus, MMF e prednisolone. Nel

post-trapianto le PP venivano somministrate al giorno 2, 4, 6 ed aumentate in base ai risultati dello *screening* anticorpale effettuato nel post-Tx. Cinque pazienti che avevano sviluppato un RAAM sono stati trattati con steroidi ed ulteriori PP. In recenti ulteriori *reports* dello stesso gruppo (61), viene riportata una casistica di 62 pazienti trapiantati con una sopravvivenza a 3 anni dell'86.7% del Tx e del 94.4% del paziente. Il protocollo è stato individualizzato in accordo ad un livello di rischio calcolato in base al titolo di DSA e prevedeva l'uso del Rituximab (375 mg/m<sup>2</sup> di superficie corporea) in pazienti selezionati. Alla *Johns Hopkins University* sono stati effettuati con successo trapianti di rene sia in pazienti con incompatibilità per DSA anti-HLA che incompatibilità ABO (62).

Gloor et al. (63) hanno riportato una serie di 14 pazienti tutti con XM/CDC pre-trapianto positivo contro i rispettivi donatori, con un titolo compreso tra 1:1 ed 1:16, i quali sono stati trapiantati con successo con il seguente protocollo: PP ad un volume nei giorni -4, -3, -1 e 0 con somministrazione dopo ogni PP di 100 mg/kg da Ig e.v.; PP nei giorni +1 e +3, con splenectomia al trapianto. L'i.s. era rappresentata da ATG, MMF, Tacrolimus e corticosteroidi. Ad un *follow-up* di 448 giorni la sopravvivenza dei pazienti e del trapianto risultava rispettivamente del 93% e del 79%. Un RAAM veniva diagnosticato nel 44% dei pazienti. Due trapianti sono falliti nel corso del primo anno per la persistente produzione di DSA con successiva morte dei pazienti di cui uno in dialisi ed uno a trapianto funzionante. I DSA sono scomparsi nei pazienti con una buona funzione del trapianto, sebbene con le tecniche più sensibili sia stato possibile dimostrare che in molti pazienti sia continuata la loro produzione anche se a basso titolo (64, 65).

Il protocollo utilizzato dal gruppo di Schweitzer era rappresentato da cicli di plasmaferesi costituiti da 3 PP alla settimana fino ad un massimo di 6 cicli. Le PP erano associate a Ig-BD e nel periodo pre-trapianto i pazienti ricevevano anche una terapia i.s. costituita da tacrolimus, MMF e prednisone. Undici/15 candidati al trapianto da donatore vivente, tutti con XM positivo donatore-specifico, sono stati desensibilizzati dopo 1-5 cicli di PP (66). L'i.s. post-Tx era costituita da induzione con OKT3 per 10 giorni, MMF, tacrolimus e corticosteroidi. Quattro pazienti su 11 hanno avuto RAAM (36%) ma sono stati trattati con successo con una sopravvivenza del trapianto e del paziente del 100% dopo 3-26 mesi di *follow-up*.

### Trapianto di rene da donatore vivente in coppie ABO incompatibili

Il sistema gruppoemico ABO rappresenta una barriera maggiore per i trapianti di organi solidi in quan-

**TABELLA III - COMPATIBILITÀ TRA DONATORI E RICEVENTI IN BASE AL FENOTIPO ABO**

Gruppo ABO del ricevente	Gruppi dei donatori compatibili
O	O
A	A, O
B	B, O
AB	AB, A, B, O

  

Gruppo ABO del donatore	Gruppi dei riceventi compatibili
O	O, A, B, AB
A	A, AB
B	B, AB
AB	AB

to nell'uomo gli antigeni ABO sono espressi su tutte le cellule dei tessuti e gli anticorpi (isoemoagglutinine) anti A ed anti B, sia tipo IgG che IgM, sono presenti in maniera costitutiva come risposte anticorpali T indipendenti. La non identità o compatibilità per il sistema ABO (Tab. III) in una potenziale coppia donatore vivente-ricevente per trapianto di rene rappresenta un'importante causa di non utilizzo di tali donatori che si ripercuote negativamente sull'intero pool dei donatori (cadavere e viventi).

Tali situazioni di incompatibilità possono essere superate, in maniera analoga a quanto già si fa per i riceventi immunizzati con DSA anti-HLA, utilizzando o programmi di trapianto da vivente con modalità di crossover (che utilizzano donatori ABO compatibili) o strategie di desensibilizzazione con cui è possibile azzerare od abbassare, ad un titolo accettabile e non dannoso per il trapianto, il livello di anticorpi anti-AB. Un titolo ritenuto sicuro per l'effettuazione di un trapianto renale ABO incompatibile è  $\leq 1:8$  per quanto riguarda le incompatibilità di tipo A1 e B. A differenza di queste, un'incompatibilità per l'antigene A2 non sembra costituire un ostacolo maggiore e molti lavori hanno dimostrato l'assenza di rigetto iperacuto in trapianti di rene effettuati con incompatibilità A2. Comunque anche in tali casi si suggerisce di effettuare il trapianto in presenza di un basso titolo ( $\leq 1:8$ ) abbassando se necessario i livelli iniziali.

Il rischio di RAAM nel periodo post-operatorio è infatti direttamente legato al titolo anticorpale pre-trapianto (anti A1 ed anti B), con sopravvivenze molto basse del trapianto in presenza di un titolo  $\geq 1:128$ , come dimostrato dal Gruppo del *Tokyo Women's Ho-*

*spital* in Giappone che ha finora effettuato il maggior numero di trapianti renali ABO incompatibili, tutti da donatore vivente (67, 68). Il primo trapianto renale ABO incompatibile venne effettuato da Hume nel 1955 (69). Un ricevente di gruppo O ricevette un trapianto renale da donatore cadavere di gruppo A con un rigetto precoce dell'organo trapiantato in 7<sup>a</sup> giornata. I tentativi successivi ebbero tutti scarsi risultati in quanto i trapianti ABO incompatibili venivano rigettati a seguito di rigetti vascolari causati dal legame di anticorpi anti A/B alle cellule vascolari endoteliali del trapianto esprimenti tali specificità e dalla conseguente attivazione della cascata complementare e coagulativa con danno trombotico massivo. Il titolo di isoemoagglutinine anti A ed anti B venne presto identificato come la causa principale della scarsa sopravvivenza dei trapianti ABO incompatibili, in quanto con un titolo  $\leq 1:4$  i risultati risultavano eccellenti con una sopravvivenza del trapianto a due anni del 94%.

Il primo report di un programma su larga scala di trapianti ABO incompatibili, è stato presentato dal Gruppo di G.P. Alexandre al *Saint-Luc Hospital, University of Louvain* in Belgio, con la revisione di una casistica di 39 trapianti di rene in 38 pazienti effettuati tra il 1982 ed il 1989. In tale lavoro si dimostrava che i riceventi che non avevano ricevuto una splenectomia, rigettavano molto rapidamente il rene trapiantato rispetto ai pazienti splenectomizzati (70). La splenectomia veniva utilizzata in tali pazienti sulla scorta di osservazioni sperimentali dimostranti che la maggioranza delle plasmacellule, responsabili della produzione T indipendente di anticorpi con specificità anti A/B, risiede nella milza (71).

Le terapie pre-trapianto includevano trasfusioni donatore specifiche, plasmaferesi, ciclosporina A con o senza Azatioprina, uso di anticorpi policlonali e splenectomia al tempo del trapianto. Tali studi iniziali hanno avuto un ruolo fondamentale, permettendo una rapida evoluzione dei trattamenti di desensibilizzazione: le PP standard sono state attualmente rimpiazzate dalle plasmaferesi a doppia filtrazione od a cascata e dall'immunoassorbimento con colonne di Sefarosis coniugate a sostanze A, B purificate (Glycosorb ABO<sup>®</sup>, Glycorex). La splenectomia è stata recentemente sostituita con successo dal Rituximab e dalle Ig e.v. e risulta essere non più utilizzata.

Le principali casistiche di trapianti renali ABO incompatibili sono state pubblicate dai seguenti Gruppi:

**Giappone:** *Tokyo Women's Medical University* con la casistica più ampia costituita da 141 trapianti effettuati tra il 1989 e 2001. In un recente studio (72) sono stati riportati i risultati dei trapianti eseguiti dal 1989 al 2001 in Giappone in 55 Centri su 441 pazienti, inclusi i 141 pazienti sopra riportati. La maggioranza di tali pazienti presentava incompatibilità per

A1, per B ed in un caso anche per entrambi. In tali pazienti, sottoposti in maggioranza a splenectomia (98%) dato il periodo a cui la casistica si riferisce, i titoli di ab anti A, B venivano ridotti ad 1:32 prima del trapianto, usando DFPP (3-4 sessioni) nella maggioranza dei pazienti od IA su colonne con antigeni A e B purificati. L'i.s. era rappresentata da Ciclosporina o Tacrolimus, antimetaboliti e prednisolone; le sopravvivenze dei pazienti e del trapianto sono state rispettivamente ad un anno: 93% ed 84%; a 5 anni 87-71%; a 9 anni: 84% e 65%. Le sopravvivenze risultavano migliori nei riceventi giovani ed in quelli sottoposti terapia anticoagulante nel post-trapianto e non vi erano differenze tra trapianti effettuati con incompatibilità per A o B. L'introduzione della terapia i.s. una settimana prima del trapianto nel periodo 2001-2004 (Tacrolimus, MMMF e steroidi), in associazione alla splenectomia, ha reso eccellenti anche le sopravvivenze a breve termine. Molto recentemente lo stesso gruppo della *Tokyo Women's Medical University* ha comparato (68) i risultati di un gruppo di trapianti ABO incompatibili da donatore vivente effettuati con splenectomia nel periodo 2001-2004 (46 pazienti) con quelli di un gruppo di 24 trapianti trattati con rituximab al posto della splenectomia. Tutti i pazienti sono stati trattati nel post-trapianto con una combinazione di farmaci immunosoppressori comprendenti Tacrolimus, MMF e steroidi. Il primo gruppo veniva trattato con DFPP e splenectomia al momento del trapianto, mentre il gruppo senza splenectomia riceveva Rituximab a basse dosi nel pre-trapianto (500 mg/paziente). I risultati sono stati successivamente paragonati con un gruppo di controllo di trapianti ABO compatibili. A 3 anni la sopravvivenza dei pazienti è stata del 100% in tutti i 3 gruppi. La sopravvivenza del trapianto a 3 e 5 anni dopo lo stesso intervallo è stata 98.2 e 93% nei controlli, 93.5 e 91.3% nei pazienti con splenectomia e 95.8% (a 3 anni solo in quest'ultimo caso) nei pazienti trattati con Rituximab. A fronte di pari sopravvivenze l'incidenza di rigetti acuti e cronici anticorpo/mediati è risultata inferiore nel gruppo trattato con Rituximab, dimostrando in conclusione che la splenectomia, una volta ritenuta essenziale, può essere efficacemente sostituita da quest'ultimo.

Altri risultati importanti nel campo dei trapianti ABO incompatibili sono stati riportati al *Karolinska Institutet*, di Stoccolma (73, 74), alla *Johns Hopkins University* di Baltimora (75, 76) ed al *Cedars Sinai Medical Center* di Los Angeles (56).

Al *Karolinska Institutet* nel 2001 (73, 74) il gruppo di G. Tyden ha introdotto un nuovo protocollo, usando IA su colonne di Glycosorb ABO® e Rituximab secondo il seguente protocollo: Rituximab alla dose standard dato 2-4 settimane prima dell'inizio dell'IA, Tacroli-

mus, MMF e prednisolone in associazione ad IA con 4 sessioni di trattamento. Non si è osservato nessun rigetto nel post-Tx e a 3-34 mesi di *follow-up* post-Tx la sopravvivenza dei pazienti e del *graft* è stata del 100%. Recentemente tale gruppo ha riportato che questo protocollo è stato applicato con successo in Europa in più di 200 casi (87) con incompatibilità di tipo A2, A1, e B con titoli di emoagglutinine compresi tra 1:2 ad 1:128.

Sonnenday (75) alla *Johns Hopkins* in un'iniziale serie di 6 pazienti ha dimostrato la capacità del Rituximab di fornire una protezione sufficiente durante la fase dell'*engraftment* con PP +Ig-BD ed una singola dose di Rituximab (il giorno prima del trapianto), senza alcuna necessità della splenectomia grazie a fenomeni di "accomodation" post-trapianto. In una serie singola recente di 53 trapianti ABO incompatibili effettuati alla *Johns Hopkins University* (76), 24 pazienti sono stati trapiantati contro la barriera ABO senza l'uso né di Rituximab né della splenectomia con risultati eccellenti ad un *follow-up* medio di due anni. Tutti i 24 pazienti sono stati desensibilizzati con il protocollo standard della JH includente PP con Ig-BD e terapia quadruplice con MMF, tacrolimus, daclizumab e steroidi. Il goal delle PP/Ig-BD è stato quello di ridurre il titolo di isoagglutinine ad un livello sicuro (<1:16) ed evitare la perdita immediata del trapianto dovuta al rigetto iperacuto (76).

Al *Cedar-Sinai Medical Center* il gruppo di Jordan (56) ha adottato il seguente protocollo, in una serie di 14 pazienti: Rituximab (1 g) seguito dopo una settimana da 5 sedute di PP a giorni alterni ed Ig-AD (un'unica somministrazione di 2 g/kg). Nei pazienti trattati, portati al trapianto con una riduzione del titolo di anticorpi anti A/B ad un livello <1:8 sono state osservate ad un anno sopravvivenze del 100% sia dei pazienti che del rene trapiantato.

## CONCLUSIONI

*Follow-up* compresi tra 3 e 5 anni nel caso di trapianti HLA incompatibili (5, 22) e fino a 12 anni in quelli ABO incompatibili (68-72) hanno dimostrato in entrambe le situazioni una buona sopravvivenza del paziente e dell'organo trapiantato, un'ottima funzione renale e una qualità di vita equivalente a quella ottenuta nei trapianti standard. Per tale motivo le strategie di trapianto da donatori viventi incompatibili, basate sui protocolli di desensibilizzazione, rappresentano attualmente per sicurezza ed affidabilità una valida alternativa a prolungati periodi di attesa in dialisi per un trapianto compatibile da donatore cadavere. Alla luce dei numerosi dati presenti in letteratura è possibile affermare pertanto che la

presenza di XM positivi a causa di anticorpi anti-HLA donatore specifici o di incompatibilità ABO donatore/ricevente non rappresentino più una controindicazione al trapianto potendosi ottenere, con il superamento di tali barriere immunologiche, validi risultati clinici. Le eccellenti sopravvivenze trapianto/paziente osservate nel lungo termine compensano, ampiamente il numero maggiore di complicanze osservate nel breve termine, rappresentate principalmente da un'alta incidenza di RAAM, e permettono di giustificare gli alti costi dei trattamenti desensibilizzanti, rappresentati mediamente da una spesa di circa 30.000 euro per ogni paziente trattato. In coppie incompatibili molti trapianti renali da donatore vivente hanno potuto essere effettuati affiancando programmi di desensibilizzazione a programmi di trapianto con modalità *crossover*, rappresentando spesso tali strategie da ritenersi assolutamente complementari le uniche chances realistiche di trapianto. È importante sottolineare a tal proposito che modalità *crossover* e tecniche di desensibilizzazione non sono competitive tra di loro essendo le esigenze cliniche dei pazienti meglio soddisfatte grazie alla disponibilità di entrambi i metodi, ognuno dei quali può rappresentare una valida alternativa nel caso della non percorribilità di uno dei due. Infatti i risultati ottenuti da studi di simulazione negli USA (77) indicano che meno del 50% di coppie incompatibili potrà trovare un donatore vivente compatibile con modalità *crossover* anche utilizzando un ampio pool di coppie donatore/ricevente iscritte in tale programma. Inoltre per quanto riguarda i trapianti di rene ABO incompatibili, sulla base delle combinazioni ABO e del profilo immunologico del ricevente, una strategia può essere favorita rispetto ad un'altra. Ad esempio, mentre le combinazioni B/A ed A/B possono essere favorite in programmi *crossover*, i riceventi di gruppo O hanno meno probabilità di trovare un donatore nel pool in *crossover* specialmente quelli con un donatore AB, e tali pazienti si avvantaggerebbero pertanto delle tecniche di desensibilizzazione. Anche se sono ancora necessari *follow-up* a più lungo termine e l'utilizzazione in protocolli randomizzati e su di un numero più ampio di pazienti, dai dati disponibili in letteratura è possibile concludere che le tecniche di desensibilizzazione, al pari di altre strategie, rappresentino una valida modalità di incremento del pool globale dei donatori, consentendo l'utilizzo con successo e con rischio minimo di perdita precoce di reni da donatori viventi per riceventi non altrimenti trapiantabili.

#### TEST DI VERIFICA

**7) Una delle seguenti affermazioni è falsa in relazione al meccanismo di azione dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 (Rituximab):**

- Eliminazione delle cellule B mediante citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC)
- Eliminazione delle cellule B mediante citotossicità complemento-dipendente (CDC)
- Eliminazione delle cellule B mediante apoptosi
- Eliminazione delle plasmacellule mediante CDC
- Eliminazione delle cellule B memoria CD27+.

**8) Un titolo ritenuto sicuro per poter effettuare un trapianto renale ABO incompatibile (non A2) è quello:**

- <1:512
- <1:8
- <1:64
- >1:16
- <1:256.

**9) In quale situazione di accoppiamento di gruppi ABO tra ricevente e donatore il trapianto è da ritenersi ABO incompatibile?**

- Ricevente O/donatore O
- Ricevente A/donatore O
- Ricevente O/donatore A
- Ricevente AB/donatore B
- Ricevente AB/donatore O.

#### RIASSUNTO

È ben noto come la presenza di alloanticorpi contro gli antigeni HLA di classe I (A, B, C) e di classe II (DR, DQ) nel siero di pazienti in attesa di trapianto di organi solidi abbia un impatto negativo sull'outcome del trapianto, con un'augmentata incidenza di frequenza di rigetti acuti (cellulari ed anticorpo mediati) e di rigetti cronici. I pazienti immunizzati, per precedenti emotrasfusioni, gravidanze o trapianti falliti, esprimono un'ampia reattività anticorpale (PRA >80%) contro antigeni HLA di classe I e/o di classe II rappresentano una categoria ad alto rischio per la scarsa possibilità di ricevere un trapianto immunologicamente sicuro, data l'alta incidenza di *cross-matches* positivi pre-trapianto. Tali pazienti si accumulano per anni nelle liste di attesa (di cui rappresentano circa il 10%) senza alcuna possibilità di trapianto. Diverse sono le strategie che possono essere utilizzate per la soluzione di tale problema quali: a) il ricorso a circuiti nazionali od internazionali di scambio d'organo per l'individuazione di donatori con *cross-matches* negativi e finestre permissive per particolari combinazioni di antigeni HLA; b) l'impiego di trattamenti

desensibilizzanti pre-trapianto. In coppie per trapianto da donatore vivente ma incompatibili per la presenza di anticorpi anti-HLA o per incompatibilità ABO, è stato possibile effettuare trapianti coronati da successo, grazie a protocolli di desensibilizzazione che hanno permesso di ottenere rispettivamente una riduzione o rimozione degli anticorpi-anti-HLA e delle isoemoagglutinine anti-AB. Il superamento di tali barriere immunologiche, una volta

considerate insormontabili, ha permesso di amplificare il pool dei donatori aumentando in parallelo il numero di trapianti in una categoria di pazienti ad alto rischio.

#### DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

L'Autore dichiara di non avere conflitto di interessi.

#### BIBLIOGRAFIA

- Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA* 1993; 270: 1339-43.
- Simmons RG, Anderson C, Kamstra L. Comparison of quality of life of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, hemodialysis, and after transplantation. *Am J Kidney Dis* 1984; 4: 253-5.
- Andreoni KA, Brayman KL, Guidinger MK, Sommers CM, Sung RS. Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005. *Am J Transplant* 2007; 7: 1359-75.
- Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-9.
- Süsal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 2002; 73: 1269-73.
- Lee KW, Kim SJ, Lee DS, et al. Effect of panel-reactive antibody positivity on graft rejection before or after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 2009-10.
- Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665-73.
- UNOS Annual Report 2006 <http://www.ustransplant.org/annualreport>.
- Meier-Kriesche HU, Port FK, Ojo AO, et al. Effect of waiting time on renal transplant outcome. *Kidney Int* 2000; 58: 1311-7.
- Cecka JM. The role of HLA in renal transplantation. *Hum Immunol* 1997; 56: 6-16.
- El-Awar N, Terasaki PI, Lazda V, Nikaein A, Manning C, Arnold AN. Almost all patients who are waiting for a re-graft of a kidney transplant have anti-HLA antibodies. *Transplant Proc* 2002; 34: 2531-2.
- Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74: 1192-4.
- Rodey GE, Fuller TC. Public epitopes and the antigenic structure of the HLA molecules. *Crit Rev Immunol* 1987; 7: 229-67.
- Rodey GE, Neylan JF, Whelchel J, Revels KW, Bray RA. Epitope specificity of HLA class I alloantibodies. I. Frequency analysis of antibodies to private versus public specificities in potential transplant recipients. *Hum Immunol* 1994; 39: 272-80.
- Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection: technology emulating biology. *Immunol Res* 2004; 29: 41-54.
- Monien S, Salama A, Schönemann C. ELISA methods detect HLA antibodies with variable sensitivity. *Int J Immunogenet* 2006; 33: 163-6.
- Cesbron-Gautier A, Simon P, Achard L, Cury S, Follea G, Bignon JD. Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities. *Ann Biol Clin (Paris)* 2004; 62: 93-8.
- Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003; 75: 43-9.
- Fuggle SV, Martin S. Toward performing transplantation in highly sensitized patients. *Transplantation* 2004; 78: 186-9.
- Montgomery RA, Hardy MA, Jordan SC, et al.; Antibody Working Group on the diagnosis, reporting, and risk assessment for antibody-mediated rejection and desensitization protocols. Consensus opinion from the antibody working group on the diagnosis, reporting and risk assessment for antibody-mediated rejection and desensitisation protocols. *Transplantation* 2004; 78: 181-5.
- Higgins RM, Bevan DJ. Antibody removal therapy in transplantation. *Transplantation Reviews* 1995; 9: 177-99.
- Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1033-41.
- Gloor J. Kidney transplantation in the hyperimmunized patient. *Contrib Nephrol* 2005; 146: 11-21.
- Montgomery RA, Zachary AA. Transplanting patients with a positive donor-specific crossmatch: a single centre's perspective. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 535-42.
- Gloor JM, DeGoey SR, Pineda AA, et al. Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 1017-23.
- Glantz D, Antoine C, Julia P, et al. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant* 2002; 2: 758-60.
- Schweitzer EJ, Wilson JS, Fernandez-Vina M, et al. A high panel-reactive antibody rescue protocol for cross-match-positive live donor kidney transplants. *Transplantation* 2000; 70: 1531-6.
- Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation* 2000; 70: 887-95.
- Tyan DB, Li VA, Czer L, Trento A, Jordan SC. Intravenous immunoglobulin suppression of HLA alloantibody in highly sensitized transplant candidates and transplantation with a histoincompatible organ. *Transplantation* 1994; 57: 553-62.
- Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoim-

- mune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001; 345: 747-55.
31. Lutz HU, Stammer P, Bianchi V, et al. Intravenously applied IgG stimulates complement attenuation in a complement-dependent autoimmune disease at the amplifying C3 convertase level. *Blood* 2004; 103: 465-72.
  32. Toyoda M, Pao A, Petrosian A, Jordan SC. Pooled human gammaglobulin modulates surface molecule expression and induces apoptosis in human B cells. *Am J Transplant* 2003; 3: 156-66.
  33. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood* 2003; 101: 758-65.
  34. Taube DH, Williams DG, Cameron JS, et al. Renal transplantation after removal and prevention of resynthesis of HLA antibodies. *Lancet* 1984; 1: 824-8.
  35. Reisaeter AV, Leivestad T, Albrechtsen D, et al. Pretransplant plasma exchange or immunoadsorption facilitates renal transplantation in immunized patients. *Transplantation* 1995; 60: 242-8.
  36. Zachary AA, Montgomery RA, Leffell MS. Factors associated with and predictive of persistence of donor-specific antibody after treatment with plasmapheresis and intravenous immunoglobulin. *Hum Immunol* 2005; 66: 364-70.
  37. Tanabe K, Tokumoto T, Ishida H, et al. ABO-incompatible renal transplantation at Tokyo Women's Medical University. *Clin Transpl* 2003; 175-81.
  38. Palmer A, Taube D, Welsh K, Bewick M, Gjorstrup P, Thick M. Removal of anti-HLA antibodies by extracorporeal immunoadsorption to enable renal transplantation. *Lancet* 1989; 1: 10-2.
  39. Higgins RM, Bevan DJ, Carey BS, et al. Prevention of hyperacute rejection by removal of antibodies to HLA immediately before renal transplantation. *Lancet* 1996; 348 (9036): 1208-11.
  40. Kupin WL, Venkat KK, Hayashi H, Mozes MF, Oh HK, Watt R. Removal of lymphocytotoxic antibodies by pretransplant immunoadsorption therapy in highly sensitized renal transplant recipients. *Transplantation* 1991; 51: 324-9.
  41. Ross CN, Gaskin G, Gregor-Macgregor S, et al. Renal transplantation following immunoadsorption in highly sensitized recipients. *Transplantation* 1993; 55: 785-9.
  42. Hickstein H, Kortjen G, Bast R, Barz D, Nizze H, Schmidt R. Immunoadsorption of sensitized kidney transplant candidates immediately prior to surgery. *Clin Transplant* 2002; 16: 97-101.
  43. Lorenz M, Regele H, Schillinger M, et al. Peritransplant immunoadsorption: a strategy enabling transplantation in highly sensitized crossmatch-positive cadaveric kidney allograft recipients. *Transplantation* 2005; 79: 696-701.
  44. Barocci S, Nocera A. In vitro removal of anti-HLA IgG antibodies from highly sensitized transplant recipients by immunoadsorption with protein A and protein G sepharose columns: a comparison. *Transpl Int* 1993; 6: 29-33.
  45. Gjorstrup P, Watt R. Therapeutic Protein A immunoadsorption. A review. *Transfusion Science* 1990; 11: 281.
  46. Higgins RM, Bevan DJ, Carey BS, et al. Prevention of hyperacute rejection by removal of antibodies to HLA immediately before renal transplantation. *Lancet* 1996; 348: 1208-11.
  47. Tydén G, Kumlien G, Genberg H, Sandberg J, Lundgren T, Fehrman I. ABO incompatible kidney transplantations without splenectomy, using antigen-specific immunoadsorption and rituximab. *Am J Transplant* 2005; 5: 145-8.
  48. Rydberg L, Bengtsson A, Samuelsson O, Nilsson K, Breimer ME. In vitro assessment of a new ABO immunosorbent with synthetic carbohydrates attached to sepharose. *Transpl Int* 2005; 17: 666-72.
  49. Pescovitz MD. The use of rituximab, anti-CD20 monoclonal antibody, in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 9-21.
  50. Sidner RA, Book BK, Agarwal A, Bearden CM, Vieira CA, Pescovitz MD. In vivo human B-cell subset recovery after in vivo depletion with rituximab, anti-human CD20 monoclonal antibody. *Hum Antibodies* 2004; 13: 55-62.
  51. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359: 242-51.
  52. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007; 357: 1293-300.
  53. Jordan SC, Vo A, Bunnapradist S, et al. Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients. *Transplantation* 2003; 76: 631-6.
  54. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (12): 3256-62.
  55. Peng A, Vo A, Villicana R. Long term graft and patient outcomes in highly HLA-sensitized deceased donor kidney transplant recipients desensitized with high dose IVIG. *Am J Transplant* 2008; 8: 303.
  56. Jordan SC, Peng A, Vo AA. Therapeutic Strategies in management of the highly sensitized and ABO-Incompatible Transplant Recipients. In: Remuzzi G, Chiaramonte S, Perico N, Ronco C, ed. Humoral Immunity in kidney Transplantation. What clinicians need to know. *Contrib Nephrol*. Ed. Basel, Karger 2009; 162: 13-26.
  57. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 2008; 359: 242-51.
  58. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor specific antibodies in kidney transplantation. In: Remuzzi G, Chiaramonte S, Perico N, Ronco C, ed. Humoral Immunity in kidney Transplantation. What clinicians need to know. *Contrib Nephrol*. Ed. Basel, Karger 2009; 162: 1-12.
  59. Glotz D, Antoine C, Julia P, et al. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant* 2002; 2: 758-60.
  60. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation* 2000; 70 (6): 887-95.
  61. Montgomery RA, Zachary AA. Transplanting patients with a positive donor-specific crossmatch: a single centre's perspective. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 535-42.
  62. Warren DS, Zachary AA, Sonnenday CJ, et al. Successful renal transplantation across simultaneous ABO incompatible and positive crossmatch barriers. *Am J Transplant* 2004; 4 (4): 561-8.
  63. Gloor JM, DeGoey SR, Pineda AA, et al. Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3 (8): 1017-23.
  64. Gloor JM, DeGoey S, Ploeger N, et al. Persistence of low levels of alloantibody after desensitization in crossmatch-positive living-donor kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78 (2): 221-7.
  65. Gloor J. Kidney transplantation in the hyperimmunized patient. *Contrib Nephrol* 2005; 146: 11-21.
  66. Schweitzer EJ, Wilson JS, Fernandez-Vina M, et al. A high panel-reactive antibody rescue protocol for cross-match-positive live donor kidney transplants. *Transplantation* 2000; 70 (10): 1531-6.
  67. Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, Tokumoto T, Takahashi K, Toma H. Role of anti-A/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*

- 2000; 70: 1331-5.
68. Tanabe K, Ishida H, Shimizu T, Omoto K, Shiriawa H, Tokumoto T. Evaluation of two different preconditioning regimens for ABO-incompatible living kidney donor transplantation. A comparison of splenectomy vs. Rituximab treated non-splenectomy preconditioning regimens. In: Remuzzi G, Chiaramonte S, Perico N, Ronco C, ed. *Humoral Immunity in kidney transplantation. What clinicians need to know.* Contrib Nephrol. Basel, Karger 2009; 162: 61-74.
  69. Hume DM, Merrill JP, Miller BF, Thorn GW. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 1955; 34: 327-82.
  70. Squifflet JP, De Meyer M, Malaise J, Latinne D, Pirson Y, Alexandre GP. Lessons learned from ABO-incompatible living donor kidney transplantation: 20 years later. *Exp Clin Transplant* 2004; 2: 208-13.
  71. Slapak M, Digard N, Ahmed M, Shell T, Thompson F. Renal transplantation across the ABO barrier--a 9-year experience. *Transplant Proc* 1990; 22: 1425-8.
  72. Takahashi K, Saito K, Takahara S, et al.; Japanese ABO-Incompatible Kidney Transplantation Committee. Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am J Transplant* 2004; 4: 1089-96.
  73. Tydén G, Kumlien G, Fehrman I. Successful ABO-incompatible kidney transplantation without splenectomy using antigen-specific immunoadsorption and rituximab. *Transplantation* 2003; 76: 730-1.
  74. Tydén G. The European experience. *Transplantation* 2007; 84 (12 Suppl.): S2-3.
  75. Sonnenday CJ, Warren DS, Cooper M, et al. Plasmapheresis, CMV hyperimmune globulin, and anti-CD20 allow ABO-incompatible renal transplantation without splenectomy. *Am J Transplant* 2004; 4: 1315-22.
  76. Montgomery RA, Locke JE. ABO-incompatible transplantation: less may be more. *Transplantation* 2007; 84 (12 Suppl.): S8-9.
  77. Segev DL, Gentry SE, Warren DS, Reeb B, Montgomery RA. Kidney paired donation and optimizing the use of live donor organs. *JAMA* 2005; 293: 1883-90.