

Original Article

Analisi del chimerismo dopo trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche: standardizzazione e garanzia di qualità

Chimerism analysis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: standardization and quality assurance

Giuseppina Balza¹, Menada Gardalini², Roberta Neri¹, Lia Mele¹, Graziella Peretti¹,
 Roberta Di Matteo², Denise Gatti², Tatiana Bolgeo², Antonio Maconi³

¹SC Transfusion Medicine–Immunogenetics Laboratory, SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo Hospital, Alessandria, Italy; ²SC Infrastructure Research Training Innovation, Department of Integrated Activities Research Innovation, SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo Hospital, Alessandria, Italy; ³Department of Integrated Activities Research Innovation, SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo Hospital, Alessandria, Italy

Key words: accreditation EFI; genetic analyzer; chimerism; Short Tandem Repeats; analytical system validation.

ABSTRACT

Background: l'accreditamento di Eccellenza dalla Federazione Europea di Immunogenetica, rilasciato alla Struttura Complessa di Medicina Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo" di Alessandria nell'anno 2000, richiede a tutti i laboratori operanti nel campo del trapianto di cellule staminali ematopoietiche di rispettare determinati standard per garantire un buon livello di qualità del servizio.

Obiettivi: valutare le prestazioni del nuovo Analizzatore Genetico Applied Biosystems™ SeqStudio™ attraverso la validazione del kit PowerPlex® 16 HS System (Promega Italia Srl), presso il Laboratorio di Medicina Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo" di Alessandria.

Materiali e Metodi: sono stati condotti tre studi differenti quello di sensibilità, di misture, di riproducibilità utilizzando sia il DNA di pazienti ematologici sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, sia il DNA di donatori di sangue.

Risultati: gli studi di sensibilità che utilizzano l'analizzatore genetico AB SeqStudio si sono rivelati più sensibili di quelli utilizzati in precedenza (AB 3130), mentre i valori ottenuti negli studi sulle miscele si sovrapponevano ai valori attesi e i risultati ottenuti negli studi di riproducibilità erano replicabili e la stessa correlazione esiste nei test eseguita su entrambi gli strumenti.

Conclusioni: l'analizzatore genetico AB SeqStudio attraverso il kit PowerPlex® 16 HS System dimostra avere ottime prestazioni in termini di accuratezza e riproducibilità dei risultati ed essere uno strumento più performante in sensibilità rispetto all'analizzatore precedente.

Background: the European Federation of Immunogenetics excellence accreditation awarded to the Transfusion Medicine Complex Structure of the "SS. Antonio and Biagio e Cesare Arrigo" Hospital in the year 2000, requires all laboratories working in the field of hematopoietic stem cell transplantation to meet specific standards for guaranteeing a good level of service quality.

Objectives: to evaluate the performance of the new Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer by validating the PowerPlex® 16 HS System kit (Promega Italia Srl, Milan, Italy), at the Transfusion Medicine Laboratory of the "SS. Antonio e Biagio and Cesare Arrigo" Hospital of Alessandria.

Materials and Methods: three different studies were conducted: sensitivity, mixture, reproducibility, using DNA from hematology patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and DNA from blood donors.

Results: the sensitivity studies using the AB SeqStudio genetic analyzer proved to be more sensitive than those used previously (AB 3130), while the values obtained in the mixture studies overlapped with the expected values and the results obtained in the reproducibility studies were replicable and the same correlation exists in the tests performed on both instruments.

Conclusions: the AB SeqStudio genetic analyzer through the PowerPlex® 16 HS System kit demonstrates excellent performance in accuracy and reproducibility of results and is a better performing instrument in sensitivity than the previous analyzer.

INTRODUZIONE

Dall'anno 2000 il Laboratorio di Immunogenetica e Istocompatibilità della SC di Medicina Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria ha conseguito l'accreditamento di eccellenza da parte dell'European Federation for Immunogenetics (EFI). L'EFI è la massima società scientifica europea riguardo lo studio dell'Immunogenetica e dell'Istocompatibilità ai fini di trapianto d'organo e di Cellule Staminali Ematopoietiche (CSE) e gestisce un programma di accreditamento, basato su standard concordati da un gruppo di esperti del settore. È un accreditamento di eccellenza ed il suo obiettivo primario è certificare che, se un laboratorio soddisfa i requisiti di determinati standard, c'è la garanzia che fornisca un servizio appropriato e ad un livello di qualità accettabile. L'obiettivo secondario che l'EFI si prefigge è arrivare ad una standardizzazione delle tecniche, al controllo di qualità nonché al miglioramento del lavoro in materia di immunogenetica, istocompatibilità e trapianto, in Europa.¹

A differenza degli standard della International Organization for Standardization (ISO), che sono generici perché indirizzati a svariate discipline, gli standard EFI sono specifici e vengono regolarmente rivisti e aggiornati tenendo conto degli ultimi progressi clinici e tecnici nell'immunogenetica e nei trapianti.

Fra gli standard che ogni laboratorio deve rispettare per poter conseguire o mantenere l'accreditamento, ci sono anche quelli relativi alla validazione di strumentazioni di nuova adozione o di kit di reagenti, con lo scopo di poterli utilizzare di routine. Nel caso specifico, sull'analizzatore genetico Applied Biosystems SeqStudio introdotto presso il nostro laboratorio nell'ottobre 2022, è stato testato il kit PowerPlex® 16 HS System (Promega Italia Srl, Milano, Italia) già in uso, relativo alla metodica di analisi del chimerismo post-trapianto di CSE.

Il trapianto di CSE, eseguito per la prima volta nel 1957, si è nel corso dei decenni affermato come una consolidata applicazione terapeutica per la cura di svariate emopatie maligne, alcune neoplasie solide e numerose patologie non maligne.²⁻⁵

Per trapianto di CSE si intende la sostituzione di un midollo osseo malato con cellule staminali sane. Può essere autologo (le cellule vengono raccolte dal paziente stesso e crioconservate per poi essere successivamente reinfuse) o allogenico (le cellule provengono da un donatore sano).⁴

Nonostante numerosi progressi, il trapianto allogenico rimane una procedura ad alto rischio: nella fase post-trapianto il clinico deve affrontare decisioni critiche che mirano ad attuare una serie di interventi terapeutici (dosaggio di farmaci immunosoppressori, infusioni di linfociti del donatore o di altre terapie cellulari, somministrazione di citochine immunomodulatori, ritrapianti), potenzialmente pericolosi per la vita, allo scopo di bilanciare i rischi di malattia recidivante, di mancato attecchimento, di fallimento in seguito a Graft versus Host Disease (GvHD), la "Malattia del Trapianto verso l'ospite".^{5,6}

Uno dei parametri che permettono di supportare fortemente il clinico riguardo le decisioni terapeutiche da adottare, in quanto valuta il grado di attecchimento e la buona riuscita di un trapianto allogenico, è l'analisi del chimerismo.⁶⁻⁸

Il chimerismo post-trapianto allogenico indica la coesistenza nel medesimo individuo di due patrimoni genetici differenti: quello del ricevente e quello del donatore.

Per effettuare l'analisi del chimerismo, devono essere eseguiti test genetici pre-trapianto sul paziente e sul suo donatore; successi-

vamente al trapianto, è di estrema importanza, ad intervalli regolari e prestabiliti, monitorare l'andamento del chimerismo sul paziente, cioè quantificare la percentuale di cellule ematopoietiche del donatore rispetto a quelle del ricevente, e può essere valutata sia su aspirato midollare che su sangue periferico; da quest'ultimo è possibile separare con varie metodiche la linea cellulare mieloide e la linfoide ed effettuare anche su queste l'analisi stessa. Alcuni valutano anche il chimerismo sulle cellule CD34+ e sulle cellule CD3+.⁹

Un paziente può avere un Chimerismo Completo (CC o Full Donor) quando la percentuale di cellule di origine del donatore supera il limite superiore di rilevanza dell'analisi utilizzata (solitamente corrispondente a un chimerismo del donatore >95-99,9%), o un Chimerismo Misto (MC) in cui coesistono cellule ematopoietiche del donatore e del ricevente.^{8,9}

La persistenza nel paziente trapiantato di cellule di origine propria può essere indice di possibile ricaduta di malattia, e la diminuzione di cellule di origine del donatore può essere il primo segno di fallimento del trapianto.⁹

Vari metodi sono stati utilizzati per monitorare lo stato di chimerismo, e tutti seguono lo stesso principio di base: distinguere le differenze tra donatore e ricevente nei marcatori genetici polimorfici informativi.

Visto l'entità del rischio clinico associato agli interventi terapeutici preventivi, le prestazioni del laboratorio che effettua l'analisi del chimerismo devono essere testate attraverso uno schema di Valutazione Esterna della Qualità (VEQ) e devono essere soddisfatti gli standard di accreditamento generali e specifici.⁶

la metodica maggiormente utilizzata per l'analisi del chimerismo è quella dei microsatelliti o Short Tandem Repeats (STR), a causa dell'alto livello di standardizzazione, la grande applicabilità e riproducibilità, i brevi tempi di esecuzione, l'economicità e la validazione clinica in più studi di follow-up.⁹

Gli STR o microsatelliti sono marcatori molecolari altamente polimorfici in lunghezza e molto variabili nella popolazione. Sono costituiti da una sequenza di 2-6 nucleotidi che si ripetono un numero variabile di volte, lungo tutto il genoma. Variano in lunghezza a seconda del numero di ripetizioni della sequenza ripetuta, e il riconoscimento e la distinzione di un DNA dall'altro, cioè di un individuo dall'altro, avviene proprio in base alla lunghezza delle regioni considerate.^{6,9}

Attraverso gli STR, vengono individuati il profilo genetico del paziente e del suo donatore prima del trapianto, e vengono selezionati gli alleli informativi adatti per il monitoraggio del chimerismo post-trapianto.^{8,9}

L'analisi del chimerismo basata sugli STR ha una sensibilità riportata dell'1-5 %, con un'applicabilità (il numero di coppie ricevente/donatore) di quasi il 100%.

Gli standard EFI nei punti C1.3.2 e C1.3.2.1 della sezione C (Garanzia di qualità) richiedono che un laboratorio accreditato disponga di meccanismi in grado di monitorare tutti i sistemi e le apparecchiature utilizzate. Questo include, prima dell'introduzione in routine, la validazione e la verifica di ogni nuovo sistema, sia esso un'apparecchiatura o un test, attraverso una comparazione dei risultati con quello precedente.¹⁰

L'obiettivo di questo lavoro è stato quindi effettuare, nel rispetto degli standard EFI, uno studio di verifica dell'Analizzatore Genetico SeqStudio (Applied Biosystems – Thermo Fisher, Waltham, USA), di nuova introduzione presso il nostro laboratorio, al fine di testarne le prestazioni in specificità e sensibilità, attraverso la validazione del kit PowerPlex® 16 HS System (Promega Italia Srl), già in uso pres-

so il nostro laboratorio ma mai validato dall’Azienda produttrice sul suddetto strumento.

Con questo studio, è stato possibile comparare le prestazioni del nuovo Applied Biosystems SeqStudio rispetto al vecchio analizzatore genetico Applied Biosystems 3130.

Gli Standard EFI, nella sezione D, richiedono inoltre che la metodica riguardante il chimerismo, così come tutte le metodiche eseguite in un laboratorio di Immunogenetica, sia sottoposta ad un programma di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ).

Dall’analisi di Harmer *et al.* del 2018 è emerso che una delle due sezioni degli standard EFI che producono costantemente il maggior numero di “non conformità” da parte dei laboratori controllati è proprio quella relativi alla garanzia della qualità.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati utilizzati sia i DNA di pazienti ematologici sottoposti a trapianto allogenico di CSE sia quelli di donatori di sangue.

Estrazione degli acidi nucleici

L’estrazione del DNA genomico è stata eseguita utilizzando l’estrattore automatico Maxwell 16 (Promega Italia Srl), secondo le istruzioni del produttore.

La concentrazione e la purezza dei DNA sono stati valutati utilizzando lo spettrofotometro Biophotometer D30 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Tutti i DNA sono stati portati alla concentrazione ottimale stabilita dal laboratorio di 0,05 ng/μL.

Reazione di PCR

La reazione di PCR è stata eseguita su termociclatori (Applied Biosystems) utilizzando il kit PowerPlex® 16 HS System (Promega Italia Srl), definito come test multiplex di Short Tandem Repeats (STR). Questo kit permette di co-amplificare 15 STR loci e l’Amelogenina (marcatore del sesso) in una sola reazione di PCR, sfruttando quattro fluorocromi per la tipizzazione del DNA genomico.

Test di validazione

La verifica delle prestazioni del nuovo analizzatore genetico SeqStudio (Applied Biosystems - Thermo Fisher) attraverso il kit PowerPlex® 16 HS System è stata impostata su tre studi differenti:

1. **Studio di sensibilità:** dal DNA genomico di un donatore di sangue di sesso maschile a profilo STR noto è stata generata una serie di diluizioni seriali (vedi Tabella 1), partendo dalla quantità di 500 pg fino ad arrivare ad una quantità di 3,9 pg/reazione di PCR. I campioni così diluiti sono stati amplificati con il kit

PowerPlex 16HS e testati in doppio sia sull’analizzatore genetico Applied Biosystems 3130 (che utilizza il polimero POP7) che sull’Applied Biosystems SeqStudio (che utilizza il polimero POP1), di nuova introduzione, al fine di confrontare la sensibilità dei due strumenti. Questo studio ci ha permesso quindi di valutare le prestazioni del nuovo strumento rispetto al vecchio, oltre che testare il kit in uso sul nuovo strumento.

2. **Studio di misture:** per definire la correlazione tra i risultati e i valori attesi, è stato simulato uno stato chimerico tra i campioni ematici di due donatori di sangue, uno di sesso femminile, considerato come Ricevente (R), ed uno di sesso maschile, considerato come Donatore (D), con concentrazione di leucociti simile. I DNA dei due soggetti sono stati portati alla concentrazione ottimale stabilita dal laboratorio (0,05 ng/μL) e, da questi, sono state allestite 15 misture a percentuale nota. Nella mistura M1, ad esempio, sono stati miscelati 1 μL di DNA di D con 99 μL di DNA di R al fine di ottenere una diluizione 1%; nella mistura M2 sono stati miscelati 2 μL DNA di D con 98 μL di DNA di R al fine di ottenere una diluizione 2%, ecc. (vedi Tabella 2).

Ogni campione è stato amplificato in tre sedute distinte con il kit PowerPlex HS16, eseguite da due differenti operatori; gli amplificati di ogni seduta sono stati fatti correre sull’analizzatore genetico AB SeqStudio con polimero POP1.

Al fine di valutare di quanto i risultati differiscono rispetto al valore atteso, è stata applicata la formula che permette di determinare lo scostamento di misura (b):

$$b = x_m - x_{ref}$$

Dove:

x_m = media dei risultati ottenuti per ogni singola mistura

x_{ref} = valore attesi

Tabella 1. Schema diluizioni seriali.

Diluizioni	[ng/ L]	DNA(pg)/reaz PCR	DNA%
Diluizione1	0.05000	500	100%
Diluizione2	0.02500	250	50%
Diluizione3	0.01250	125	25%
Diluizione4	0.006250	62.5	12.50%
Diluizione5	0.003125	31.25	6.25%
Diluizione6	0.0015625	15.625	3.125%
Diluizione7	0.00078	7.8	1.56%
Diluizione8	0.00039	3.9	0.78%

Tabella 2. Schema diluizioni misture.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
Diluizione	1:100	1:50	1:40	1:20	1:10	1:6	1:3	1:2	3:1	6:1	10:1	20:1	40:1	50:1	100:1
Valore atteso donatore	1%	2%	2.5%	5%	10%	16.6%	33.3%	50%	66.6%	83.3%	90%	95%	97.5%	98%	99%

3. Studio di riproducibilità:

- **Intra assay:** su 5 pazienti precedentemente sottoposti a trapianto allogenico di CSE è stata eseguita l'analisi del Chimerismo su: Sangue Periferico (PB), Linea Linfocitaria (L), Linea Mielocitaria (M) e Midollo Osseo (MO) per un totale di 20 campioni. Ogni campione è stato amplificato in tre sedute distinte ed eseguite da due differenti operatori; gli amplificati di ogni seduta sono stati fatti correre sull'analizzatore genetico AB SeqStudio con polimero POP1. La riproducibilità intra-assay è stata, quindi, valutata confrontando gli stessi campioni nelle 3 sedute analitiche e applicando lo scostamento medio dalla media aritmetica (S_{μ}).

Lo scostamento medio dalla media aritmetica è un indice di variabilità dato dalla media aritmetica dei valori assoluti degli scarti dalla media aritmetica:

$$S_{\mu} = \frac{\sum_{i=1}^n |x_i - \mu|}{n}$$

Dove:

X_i = % di chimerismo ottenuta

μ = media delle % di chimerismo ottenute

n = numero delle % di Chimerismo prese in esame

Tabella 3. Risultati studio di sensibilità (AB SeqStudio).

	DIL 1	DIL 2	DIL 3	DIL 4	DIL 5	DIL 6	DIL7	DIL8	CN	
[ng/ L]	0.05000	0.02500	0.01250	0.006250	0.003125	0.0015625	0.00078	0.00039		
DNA(pg)/reaz PCR	500 pg	250 pg	125 pg	62.5 pg	31.25 pg	15.625 pg	7.8 pg	3.9 pg	0 pg	
DNA%	100%	50%	25%	12.50%	6.25%	3.125%	1.56%	0.78%		
Locus	Allele	Peak height								
D3S1358	16	3638	2933	1567	528	365	377	60	75	0
	18	4226	3153	1888	1062	416	179	251	233	0
TH01	9	2914	2612	1284	585	240	128	118	0	0
	9.3	2759	2320	1174	842	280	187	57	0	0
D21S11	27	3035	2209	1806	966	341	254	99	134	0
	31.2	3548	2167	1474	748	256	139	142	75	0
D18S51	17	2540	963	951	442	300	264	116	145	0
	20	1762	1206	761	559	69	112	139	180	0
PENTA E	7	2698	1413	1179	960	258	0	97	105	0
	15	2188	1533	775	740	226	86	226	0	0
D5S818	11	3006	2999	1715	921	336	337	231	234	0
	12	3355	2860	1418	1401	287	326	54	517	0
D13S317	11	3367	2423	1478	750	223	144	198	68	0
	14	2453	2038	1165	678	445	54	65	106	0
D7S820	8	3619	2886	2036	1353	345	239	249	0	0
	9	3358	2820	1600	299	208	172	0	111	0
D16S539	11	6099	5238	2925	1551	468	395	353	106	0
CSF1PO	12	3001	2545	1794	990	167	0	105	99	0
PENTA D	12	4479	3321	1680	1119	365	285	0	249	0
vWA	17	8236	4261	2099	1599	1314	243	258	429	0
D8S1179	15	9851	6427	3241	1696	793	303	189	244	0
TPOX	8	3965	1789	1730	996	1488	379	543	87	0
	12	3857	2933	1489	1286	765	290	567	99	0
FGA	21	5484	2623	1488	1205	459	300	95	188	0
	24	4373	3731	1706	1160	733	150	384	0	0
AMEL	X	6010	3780	1813	1811	534	557	516	248	0
	Y	5171	4177	2532	1656	1521	923	308	0	0

Esempio di calcolo dello scostamento medio dalla media aritmetica.
Data la seguente successione: 99,4 99,23 99,22

Media ottenuta tra i tre valori: 99,28

$$S_{\mu} = (|99,4 - 99,28| + |99,23 - 99,28| + |99,22 - 99,28|) / 3 = 0,07$$

- **Inter assay:** sono stati presi in esame 22 pazienti ematologici precedentemente sottoposti a trapianto allogenico di CSE, a cui è stata eseguita l'analisi del chimerismo su: PB (23 campioni), L (18 campioni), M (18 campioni) e MO (20 campioni) per un totale di 79 campioni. Al fine di valutare la riproducibilità tra i due strumenti AB 3130 con polimero POP7 e AB SeqStudio con polimero POP1 è stata

calcolata la Variazione percentuale ($\Delta\%$), applicando la seguente formula:

$$\text{Variazione percentuale } (\Delta\%) = [(x_f - x_i) / x_i \times 100]\%$$

Dove:

x_f : valore di Chimerismo su POP1

x_i : valore di Chimerismo su POP7

Analisi dei dati

L'analisi dei dati, col calcolo della percentuale di Chimerismo, è stata eseguita da due operatori utilizzando il

Tabella 4. Risultati studio di sensibilità (AB SeqStudio).

	DIL 1	DIL 2	DIL 3	DIL 4	DIL 5	DIL 6	DIL7	DIL8	CN	
[ng/L]	0.05000	0.02500	0.01250	0.006250	0.003125	0.0015625	0.00078	0.00039		
DNA(pg)/reaz PCR	500 pg	250 pg	125 pg	62,5 pg	31,25 pg	15,625 pg	7,8 pg	3,9 pg	0 pg	
DNA%	100%	50%	25%	12,50%	6,25%	3,125%	1,56%	0,78%		
Locus	Allele	Peak height								
3S1358	16	3638	2933	1567	528	365	377	60	75	0
	18	4226	3153	1888	1062	416	179	251	233	0
TH01	9	2914	2612	1284	585	240	128	118	0	0
	9.3	2759	2320	1174	842	280	187	57	0	0
D21S11	27	3035	2209	1806	966	341	254	99	134	0
	31.2	3548	2167	1474	748	256	139	142	75	0
D18S51	17	2540	963	951	442	300	264	116	145	0
	20	1762	1206	761	559	69	112	139	180	0
PENTA E	7	2698	1413	1179	960	258	0	97	105	0
	15	2188	1533	775	740	226	86	226	0	0
D5S818	11	3006	2999	1715	921	336	337	231	234	0
	12	3355	2860	1418	1401	287	326	54	517	0
D13S317	11	3367	2423	1478	750	223	144	198	68	0
	14	2453	2038	1165	678	445	54	65	106	0
D7S820	8	3619	2886	2036	1353	345	239	249	0	0
	9	3358	2820	1600	299	208	172	0	111	0
D16S539	11	6099	5238	2925	1551	468	395	353	106	0
CSF1PO	12	3001	2545	1794	990	167	0	105	99	0
PENTA D	12	4479	3321	1680	1119	365	285	0	249	0
vWA	17	8236	4261	2099	1599	1314	243	258	429	0
D8S1179	15	9851	6427	3241	1696	793	303	189	244	0
TPOX	8	3965	1789	1730	996	1488	379	543	87	0
	12	3857	2933	1489	1286	765	290	567	99	0
FGA	21	5484	2623	1488	1205	459	300	95	188	0
	24	4373	3731	1706	1160	733	150	384	0	0
AMEL	X	6010	3780	1813	1811	534	557	516	248	0
	Y	5171	4177	2532	1656	1521	923	308	0	0

software ChimerMarker (Promega). Il software permette la rimozione di possibili artefatti non specifici, come i pull-up peaks, gli stutter peaks e i segnali intensi “fuori scala”.

RISULTATI

1. **Studio di sensibilità:** le tabelle 3a e 3b riportano i risultati dello studio di sensibilità, ottenuti dalle varie diluizioni rispettivamente sull'AB 3130 e sull'AB SeqStudio. Come si può osservare, nel caso della Tabella 3 si hanno dei drop-out con una parziale perdita del profilo genetico (celle evidenziate in giallo) già a partire dalla diluizione 5 (31,25

pg/ DNA pari a 6,5%). Nelle diluizioni 6-7-8 in cui le quantità di template sono molto basse (Low Copy Number, LCN), l'analisi mostra come atteso un'aumentata variabilità e si riscontrano numerosi drop-out. Inoltre, nella diluizione 8 si osserva una totale perdita del profilo.

Nella Tabella 4, invece, la parziale perdita del profilo genetico inizia a partire dalla diluizione 6. Si può osservare che i drop-out (celle evidenziate in giallo) siano in numero significativamente inferiore, per quanto i risultati relativi alla diluizione 8 potrebbero non essere indicativi, in quanto l'altezza dei picchi si confonde con il rumore di fondo.

2. **Studio di misture:** nella Tabella 5 sono stati riportati i risultati

Tabella 5. Risultati ottenuti nello studio di misture.

	M1	b (M1)	M2	b (M2)	M3	b (M3)	M4	b (M4)	M5	b (M5)	M6	b (M6)	M7	b (M7)	M8	b (M8)
Valore atteso donatore	1%		2%		2.5%		5%		10%		16.6%		33.3%		50%	
Risultati I seduta	*1.86	*0.48	*2.62	*0.73	*2.88	*0.5	*4.52	*0.80	*10.62	*2.04	*16.51	*0.58	*31.76	*0.44	*47.96	*1.2
	1.86	0.48	2.62	1.00	2.88	0.5	4.98	0.20	11.06	2.79	17.34	1.33	32.39	1.03	48.43	0.71
	X		XY		XY		XY		XY		XY		XY		XY	
Risultati II seduta	*1.35		*2.66		*3.20		*4.17		*12.81		*17.53		*34.74		*49.15	
	1.35		3.08		3.20		4.57		13.71		18.25		35.31		49.65	
	X		XY		XY		XY		XY		XY		XY		XY	
Risultati III seduta	*1.22		*2.90		*3.24		*3.90		*12.70		*17.50		*34.72		*49.29	
	1.22		3.32		3.24		4.84		13.61		18.22		35.29		49.78	
	X		XY		XY		XY		XY		XY		XY		XY	
Valore atteso donatore	M9	b (M9)	M10	b (M10)	M11	b (M11)	M12	b (M12)	M13	b (M13)	M14	b (M14)	M15	b (M15)		
	66.6%		83.3%		90%		95%		97.5%		98%		99%			
Risultati I seduta	*64.95	*1.21	*79.87	*2.84	*87.2	*2.03	*93.98	*0.45	*97.06	*0.56	*98.07	*0.72	*99.20	*0.04		
	65.31	0.89	80.01	2.69	87.39	1.87	94.07	0.53	97.13	0.51	98.12	0.67	99.22	0.07		
	XY		XY		XY		XY		XY		XY		XY			
Risultati II seduta	*65.58		*80.78		*88.28		*96.12		*96.71		*96.89		*98.88			
	65.88		80.94		88.43		96.18		96.77		96.93		98.92			
	XY		XY		XY		XY		XY		XY		XY			
Risultati III seduta	*65.63		*80.72		*88.42		*96.27		*97.03		*96.89		*99.05			
	65.92		80.88		88.57		96.33		97.08		96.93		99.09			
	XY		XY		XY		XY		XY		XY		XY			

Tabella 6. Correlazione valori attesi-ottenuti.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
Valori attesi (%)	1	2	2.5	5	10	16.6	33.3	50	66.6	83.3	90	95	97.5	98	99
*Media dei valori ottenuti (%)	1.48	2.73	3.11	4.2	12.04	17.18	33.74	48.8	65.39	80.46	87.97	95.46	96.93	97.28	99.04
Media dei valori ottenuti (%)	1.48	3.01	3.11	4.8	12.8	17.94	34.33	49.29	65.7	80.61	88.13	95.53	97	97.33	99.08

Tabella 7. Calcolo dello scostamento medio della media aritmetica (S_{μ}).

Paziente	Seduta	PB%	S_{μ} (PB)	L%	S_{μ} (L)	M%	S_{μ} (M)	MO%	S_{μ} (MO)
FP.	I	100	0.15	99.65	0.17	100	0.20	99.55	0.08
	II	99.76		99.59		99.67		99.42	
	III	99.56		100		99.43		99.31	
	MEDIA	99.77		99.75		99.7		99.43	
R.D.	I	99.4	0.07	97.22	0.10	99.46	0.08	95.83	0.77
	II	99.23		96.98		99.24		93.69	
	III	99.22		97.18		99.3		94.51	
	MEDIA	99.28		97.13		99.33		94.68	
T. P.E.	I	*97.94	*0.1 0.1	*97.76	*0.08 0.07	*97.39	*0.05 0.05	*97.01	*0.33 0.18
		99.14		98.98		98.69		98.28	
	II	*97.76		*97.9		*97.49		*97.15	
		98.97		99.12		98.79		98.39	
	III	*97.66		*97.7		*97.53		*96.66	
		98.88		98.94		98.83		97.94	
*MEDIA	*97.79		*97.79		*97.47		*97.27		
MEDIA	99.00		99.01		98.77		98.20		
Z.M.	I	99.52	0.09	99	0.09	99.17	0.08	98.59	0.17
	II	99.38		98.79		99.35		98.64	
	III	99.25		99		99.34		98.24	
	MEDIA	99.38		98.93		99.29		98.49	
C.P.	I	98.53	0.32	97.56	0.21	97.06	0.40	98.38	0.22
	II	98.39		97.41		97.82		98.25	
	III	97.74		97.96		96.77		97.82	
	MEDIA	98.22		97.64		97.22		98.15	

*Il calcolo è stato effettuato con l'aggiustamento degli stutter peaks.

ottenuti nelle tre sedute analitiche, dove le colonne b (M_n) si riferiscono al valore di scostamento di misura per ogni singola mistura.

Nella Tabella 6 per ogni mistura è stato inserito il valore atteso e la media dei valori ottenuti con (*) e senza l'aggiustamento degli stutter peaks. Come si può notare dalla Figura 1, i valori ottenuti sono per lo più sovrapponibili ai valori attesi.

Il coefficiente di correlazione (r) tra la media dei valori ottenuti (con e senza l'aggiustamento degli stutter peaks) e i valori attesi risulta essere: $r=0.99$ dove $-1 < r < 1$.

3. Studio di riproducibilità:

- Intra assay:** i risultati dell'analisi dei campioni relativi alle run delle tre sedute analitiche sono stati riportati in Tabella 7.

L'analisi dei dati mostra come lo scostamento medio (S_{μ}) dalla media aritmetica di ogni linea cellulare per ogni campione analizzato risulti essere $<1\%$, valore compatibile con la variabilità intrinseca alla ripetizione del test.

- Inter assay:** i risultati dell'analisi dei campioni relativi alle run su entrambi gli strumenti e corrispondenti polimeri sono riportati in Tabella 8.

Variatione % media ottenuta

- Sangue Periferico: 0,59%
- Linea Linfoide: 0,80%
- Linea Mieloide: 0,64%
- Midollo Osseo: 0,79%
- I profili STR pre-trapianto delle coppie analizzate, utilizzando

il polimero POP1 e lo strumento AB SeqStudio, si sono confermati.

- Il risultato della variazione % media di chimerismo del donatore, calcolata su uno stesso campione fatto correre su AB 3130 con POP7 e su AB SeqStudio con POP1, su PB, linea linfoide, linea mieloide e BM, risulta essere $<1\%$.

Il valore $<1\%$ è compatibile con la variabilità intrinseca alla ripetizione del test indipendentemente dallo strumento e dal polimero utilizzato e comunque di molto inferiore alla soglia di sensibilità del kit (3%).

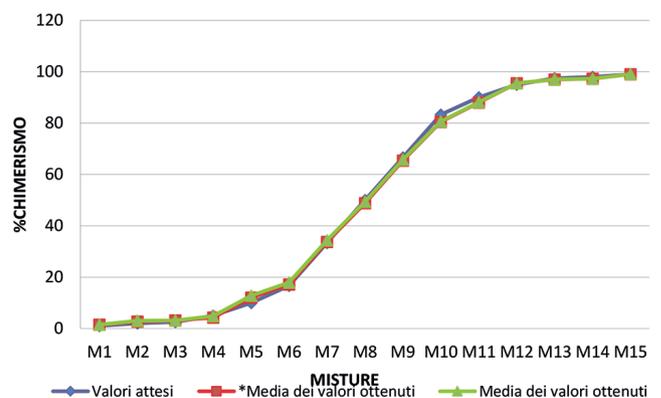


Figura 1. Correlazione ottenuti-attesi.

Tabella 8. Comparazione AB 3130 (POP7) vs AB SeqStudio (POP1).

Strumento/Polimero		PB %	Δ%	Y	L %	Δ%	Y	M %	Δ%	Y	BM%	Δ%	Y
A.T.	3130/POP7	100.00	-0.82	A	100.00	-0.8	A	99.75	-0.89	P	100.00	-0.81	A
	SeqStudio/POP1	99.19		A	99.20		A	98.86		P	99.19		A
B. R.	3130/POP7	100.00	-0.11	A	100.00	-0.23	A	100.00	0	A	98.38	-0.04	A
	SeqStudio/POP1	99.89		A	99.77		A	100.00		2P	98.34		A
B. M.	3130/POP7	99.79	-0.42	-	99.77	-0.41	-	100.00	-0.44	-	99.51	-0.31	-
	SeqStudio/POP1	99.37		-	99.36		-	99.56		-	99.20		-
B. F.	3130/POP7	99.89	-0.40	-	100.00	-0.22	-	100.00	-1,31	-	99.42	-0.26	-
	SeqStudio/POP1	99.49		-	99.78		-	98.69		-	99.16		-
C. M.	3130/POP7	98.72	-0.93	-	99.82	0.13	-	98.50	0.12	-	-	-	-
	SeqStudio/POP1	97.80		-	99.95		-	98.62		-	-		-
G. C.	3130/POP7	99.85	-1.20	A	100.00	-0.39	A	99.83	-0.30	A	99.82	-0.58	A
	SeqStudio/POP1	98.65		2P	99.61		A	99.53		A	99.24		A
G. N.	3130/POP7	99.41	-0.23	-	99.40	0	-	99.40	-0.26	-	99.39	0	-
	SeqStudio/POP1	99.18		-	99.40		-	99.14		-	99.39		-
M. E.	3130/POP7	*95.9498.34*	-0.1-0.13	P	*98.07100.00*	-1.89-1.86	P	*96.1198.30*	-0.07-0.08	P	*96.1098.31*	-0.17-0.14	P
	SeqStudio/POP1	*95.8498.21		P	*96.2198.14		P	*96.0498.22		P	*95.9498.17		P
M. M.L.	3130/POP7	100.00	-0.29	-	97.86	-0.22	-	99.84	-0.25	-	95.91	-0.14	-
	SeqStudio/POP1	99.71		-	97.64		-	99.59		-	95.77		-
G. S.	3130/POP7	100.00	-0.28	-	-	-	-	-	-	-	98.57	-0.15	-
	SeqStudio/POP1	99.72		-	-		-	-		-	98.42		-
P. M.P.	3130/POP7	99.64	-0.74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SeqStudio/POP1	98.90		-	-		-	-		-	-		-
S. M.	3130/POP7	0.25	1-0.96	-	0.13	1-0.59	-	0.42	1-0.57	-	1.16	1-0.50	-
	SeqStudio/POP1	1.21		-	0.72		-	0.99		-	1.66		-
T. P.E.	3130/POP7	*98.74100.00*	-0.91-0.86	-	*98.69100.00*	-0.94-0.87	-	*98.73100.00*	-0.82-0.8	-	*98.70100.00*	-2.04-1.92	-
	SeqStudio/POP1	*97.8499.14		-	*97.7699.13		-	*97.9299.20		-	*96.6898.08		-
B. D.	3130/POP7	95.69	-0.56	-	81.10	-0.36	-	98.51	0.51	-	97.56	-1.60	-
	SeqStudio/POP1	95.15		-	80.81		-	99.01		-	96.48		-
M.M.L.	3130/POP7	99.89	-0.26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SeqStudio/POP1	99.63		-	-		-	-		-	-		-
P. S.	3130/POP7	100.00	0	-	-	-	-	-	-	-	100.00	-0.56	-
	SeqStudio/POP1	100.00		-	-		-	-		-	99.44		-
P. L.	3130/POP7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	97.23	-0.17	-
	SeqStudio/POP1	-		-	-		-	-		-	97.06		-
P.G.B.	3130/POP7	99.01	-0.71	-	96.73	0.09	-	97.73	-0.50	-	99.17	-1.64	-
	SeqStudio/POP1	98.3		-	96.82		-	97.24		-	97.54		-
R. D.	3130/POP7	99.79	-0.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SeqStudio/POP1	99.17		-	-		-	-		-	-		-
R. D.	3130/POP7	99.87	-0.27	P	99.03	-1.82	P	100.00	-0.54	P	95.51	0.34	P
	SeqStudio/POP1	99.40		P	97.22		P	99.46		P	95.83		P
C. P.	3130/POP7	99.59	-1.20	-	99.50	-1.69	-	99.37	-1.13	-	99.37	-1.13	-
	SeqStudio/POP1	98.39		-	97.82		-	98.25		-	98.25		-
F. P.	3130/POP7	100.00	0	-	100.00	-0.35	-	100.00	0	-	100.00	-0.45	-
	SeqStudio/POP1	100.00		-	99.65		-	100.00		-	99.55		-
Z. M.	3130/POP7	100.00	-0.48	-	100.00	-1	-	100.00	-0.83	-	99.44	-0.85	-
	SeqStudio/POP1	99.52		-	99.00		-	99.17		-	98.59		-
T. P.E.	3130/POP7	*98.83	*-0.9	-	*98.83	*-1.08	-	*98.78	*-1.40	-	*98.78	*-1.79	-
		100	-0.86	-	100	-1.02	-	100	-1.31	-	100	-1.72	-
	SeqStudio/POP1	*97.94		-	*97.76		-	*97.39		-	*97.01		-
		99.14		-	98.98		-	98.69		-	98.28		-
Media Δ%			0.59			0.80			0.64			0.79	

Nelle colonne contrassegnate con "Y" è indicato se è stata riscontrata la presenza (P) o l'assenza (A) dell'Amelogenina.

CONCLUSIONI

Il nuovo analizzatore genetico AB SeqStudio (Applied Biosystems – Thermo Fisher) utilizzato per l'analisi del chimerismo con il kit PowerPlex® HS16 (Promega Italia Srl), ha dimostrato ottime prestazioni in termini di accuratezza e riproducibilità dei risultati e, rispetto all'AB 3130, essere più performante nello studio di sensibilità. Attraverso questo lavoro abbiamo verificato che lo strumento testato soddisfa i requisiti dello standard EFI di garanzia di qualità e abbiamo quindi ritenuto di inserirlo nella routine del nostro laboratorio.

È dimostrato come il monitoraggio del chimerismo possa essere utilizzato dal clinico trapiantologo nel periodo post trapianto allogenico, al fine di predire la ricaduta o l'imminente perdita di attecchimento, indirizzandolo verso una corretta terapia di intervento.

Lo studio evidenzia l'affidabilità del kit e dello strumento testato nel riuscire a discriminare una situazione di chimerismo completo o misto e per indirizzare verso una diagnosi precoce di recidiva di malattia sia su aspirato midollare, che su sangue periferico e sulle linee cellulari linfoidi e mieloide.

Le prestazioni del kit e dello strumento possono inoltre garantirci di ottenere ottime performance durante le verifiche del programma di Valutazione Esterna di Qualità, condizione indispensabile, nell'ambito del rispetto degli standard, per mantenere l'accreditamento EFI.

BIBLIOGRAFIA

1. Harmer A, Mascaretti L, Petershofen E. Accreditation of histocompatibility and immunogenetics laboratories: Achievements and future prospects from the European Federation for Immunogenetics Accreditation Programme. HLA. 2018.
2. Kanate AS, Majhail NS, Savani BN, et al. Indications for Hematopoietic Cell Transplantation and Immune Effector Cell Therapy: Guidelines from the American Society for Transplantation and Cellular Therapy. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. 2020;26:1247–56.
3. Goldman JM. A special report: bone marrow transplants using volunteer donors--recommendations and requirements for a standardized practice throughout the world--1994 update. The WMDA Executive Committee. Blood. 1994;84:2833–9.
4. Bazinet A, Popradi G. A general practitioner's guide to hematopoietic stem-cell transplantation. Curr Oncol Tor Ont. 2019; 26:187–91.
5. Blouin AG, Ye F, Williams J, Askar M. A practical guide to chimerism analysis: Review of the literature and testing practices worldwide. Hum Immunol. 2021;82:838–49.
6. Clark JR, Scott SD, Jack AL, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. Br J Haematol. 2015;168:26–37.
7. Bader P, Niethammer D, Willasch A, et al. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? Bone Marrow Transplant. 2005;35:107–19.
8. Clemente I, Goncalo A, Faria C, et al. Relevance of Chimerism Analysis After Allogeneic Stem Cell Transplantation. Transplant Proc. 2017;49:890–2.
9. Delie A, Verlinden A, Beel K, et al. Use of chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: Belgian guidelines and review of the current literature. Acta Clin Belg. 2021;76:500–8.
10. European Federation for Immunogenetics. STANDARDS FOR HISTOCOMPATIBILITY & IMMUNOGENETICS TESTING. 2020; Version 8.0. available from: https://efi-web.org/fileadmin/Efi_web/Standardv8_280819.pdf

Correspondence: Menada Gardalini, via Venezia 16, 15121, Alessandria, Italy.
 Tel. 0131-206309.
 E-mail: mgardalini@ospedale.al.it

Authors' contributions: GB, MG, RN: substantial contributions to the conception, design of the work, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting the work and revising it critically for important intellectual content; LM, GP: interpretation of data, drafting the work and revising it critically for important intellectual content; RDM, DG: acquisition, analysis and interpretation of data, drafting the work and revising it critically for important intellectual content; AM, TB: substantial contributions to the conception, design of the work, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting the work and revising it critically for important intellectual content. All the authors have read and approved the final version of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work.

Conflict of interest: the authors declare no potential conflict of interest.

Funding: none.

Availability of data and materials: all data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Key words: accreditation EFI; genetic analyzer; chimerism; Short Tandem Repeats; analytical system validation.

Received: 2 December 2022.

Accepted: 7 February 2023.

Publisher's note: all claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article or claim that may be made by its manufacturer is not guaranteed or endorsed by the publisher.

©Copyright: the Author(s), 2023

Licensee PAGEPress, Italy

Working Paper of Public Health 2023;11:9640

doi:10.4081/wpph.2023.9640

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).