I laboratori di tipizzazione tissutale per i trapianti d'organo

Domenico ADORNO, Daniela MACCARONE¹ e Franco PAPOLA

*Centro Interregionale di Riferimento per i Trapianti, Regioni Abruzzo e Molise,
Azienda USL, L'Aquila*

Riassunto. - Il laboratorio di tipizzazione tissutale ha la caratteristica di eseguire analisi genetiche che necessitano di sicurezza e riproducibilità dei risultati, visto che la tipizzazione HLA può essere determinante, sia nella definizione della compatibilità donatore-ricevente per i trapianti di organo e di midollo, sia nell'indirizzare la diagnosi in caso di malattie con coinvolgimento del sistema immunitario. Deve quindi rispondere alla necessità di individuare, nel minor tempo possibile, la compatibilità fra donatore e ricevente ed eseguire la ricerca di anticorpi donatore-specifici nel siero del ricevente per prevenire il rigetto iperacuto. Lo scopo di questo lavoro è quello di individuare linee guida che dovrebbero essere seguite da tutti i laboratori a seconda del tipo di organi da trapiantare anche nell'ottica di acquisire certificazioni nazionali o internazionali.

Parole chiave: tipizzazione HLA, controlli di qualità, accreditamento, citometria a flusso, trapianto renale.

Summary (*The tissue typing laboratories for organ transplantation*). - The tissue typing laboratory performs genetic analysis: the safety and the reproducibility of results are mandatory, because HLA typing can be crucial both in donor-recipient compatibility assessment for organ transplantation and for the diagnosis of immune related disease. The HLA laboratory should perform analysis, as quickly as possible, in order to define donor-recipient matching and to assess the presence of anti-donor specific antibodies in recipient's serum to prevent hyperacute rejection. The aim of this report is to define the guidelines that should be followed in all laboratories for each specific transplantation in order to acquire national and international accreditation, and to obtain the best clinical results.

Key words: HLA typing, quality control, accreditation, flow cytometry, renal transplantation.

I laboratori di tipizzazione tissutale per i trapianti d'organo

Un laboratorio di tipizzazione tissutale presenta varie peculiarità legate al tipo di analisi che vi viene svolto; essendo queste, infatti, analisi genetiche, devono essere eseguite con certezza e riproducibilità dei risultati, perché la tipizzazione HLA può essere determinante, non solo nella definizione della compatibilità donatore-ricevente per i trapianti di organo e di midollo, ma anche nell'indirizzare la diagnosi in caso di malattie con coinvolgimento del sistema immunitario.

Nel campo dei trapianti d'organo il laboratorio di tipizzazione tissutale deve rispondere alle esigenze per individuare, nel minor tempo possibile, le compatibilità fra donatore e ricevente ed eseguire la ricerca di anticorpi donatore-specifici nel siero del ricevente per prevenire il rigetto iperacuto. Le metodiche eseguite nel laboratorio devono quindi essere standardizzate in modo da assicurare la qualità e la riproducibilità dei risultati. Alcune analisi sono da ritenere obbligatorie; altre, che possono essere utilizzate per maggiore approfondimento della compatibilità, sono facoltative.

Soltanto il rispetto di una serie di norme che riguardano le condizioni ambientali, le apparecchiature in uso, le metodiche utilizzate, nonché la competenza del per-

sonale preposto, possono far sì che il laboratorio di tipizzazione tissutale referti dati sicuri e riproducibili, con utilizzo ottimale delle risorse disponibili e quindi con una politica attenta anche ai costi, che nel campo dell'istocompatibilità non sono certo da trascurare. La possibilità di arrivare ad un risultato sicuro e riproducibile, con la certezza che la metodica in uso sia stata utilizzata correttamente e nelle condizioni migliori, evita inutili ripetizioni dell'esame. E' necessario inoltre che il laboratorio acquisisca certificazione riconosciuta a livello internazionale, quali ad es. quella dell'American Society of Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) o dell'European Federation for Immunogenetics (EFI). Il vantaggio di partecipare ai programmi di accreditamento è anche quello di avere uno strumento di verifica di processo per tutte le metodiche eseguite nel laboratorio e in questa maniera mantenere alta la qualificazione del personale ed il suo continuo aggiornamento.

Per ottenere tali certificazioni è di fondamentale importanza la posa in opera di tutta una serie di misure atte ad assicurare la qualità delle analisi eseguite. In particolare devono essere redatti dei protocolli che assicurino il monitoraggio ed il controllo delle varie fasi delle metodiche eseguite per la prevenzione dei possibili errori; ciò è applicabile sia alle metodiche di sierologia sia alle

metodiche di analisi molecolare, dove è necessario un intervento di monitoraggio ancor più accurato e dettagliato.

È inoltre indispensabile l'esecuzione nel laboratorio di controlli di qualità che devono essere messi in atto innanzitutto per i materiali utilizzati, come pure per il personale.

Nel laboratorio vanno perciò identificati dei protocolli precisi per assicurare la perfetta funzionalità delle apparecchiature, nonché le procedure per l'esecuzione dei controlli di qualità per il personale, intralaboratorio ed extralaboratorio, nazionali ed internazionali. Tutto il personale va reso edotto sull'applicazione di questi protocolli e possono essere identificati dei responsabili per ciascun settore.

Esamineremo quindi in maniera approfondita le regole da seguire per ottenere gli accreditamenti sopra citati [1].

Tipologia del laboratorio

Nel laboratorio di tipizzazione tissutale sono importanti in primo luogo gli spazi a disposizione, in quanto deve esserci una divisione degli ambienti tale da garantire che tutte le procedure vengano eseguite senza ostacoli e sia assicurata la prevenzione di errori o di inquinamento. L'utilizzo di metodiche di biologia molecolare, che in un laboratorio che svolga un servizio di trapianti d'organo devono essere necessariamente eseguite, prevede ulteriori accorgimenti per evitare ogni possibilità di contaminazione del DNA che viene analizzato.

La soluzione ottimale sarebbe rappresentata dall'avere a disposizione quattro locali separati, dotati di opportuno sistema di filtrazione dell'aria per:

- a) preparazione reagenti;
- b) purificazione del DNA del paziente e assemblaggio della PCR;
- c) amplificazione;
- d) analisi del post-amplificato.

Se non è possibile avere una tale disposizione si può utilizzare un unico ambiente per amplificazione e per l'analisi dei prodotti dopo l'amplificazione; se invece ci sono a disposizione solo due locali, è necessario che la preparazione dei reagenti avvenga sotto cappa a flusso laminare e che la preparazione del DNA del paziente all'assemblaggio della PCR avvenga sotto una cappa distinta; la stanza però deve essere dotata di sistema di filtrazione dell'aria a pressione positiva (*clean room*), mentre la seconda stanza, completamente indipendente dalla prima, utilizzata per l'amplificazione e per l'analisi dei prodotti amplificati, deve essere dotata di sistema di filtraggio di aria a pressione negativa (*dirty room*).

Qualsiasi soluzione logistica venga scelta, è fondamentale che i dispositivi di protezione personale (camicie e guanti), nonché i sistemi di distribuzione automatica dei reagenti (pipettatrici, ecc.) siano completamente

diversi tra la fase di pre-amplificazione e post-amplificazione. Questo perché l'amplificazione del DNA produce milioni di copie della stessa sequenza e quindi anche una minima quantità di prodotto amplificato può produrre una contaminazione massiva, sia della strumentazione sia dei campioni. Per questo motivo oltre alle misure preventive su esposte, cui vanno aggiunti anche corretti comportamenti nella preparazione di tutti i reagenti, vanno messe in atto azioni di rilevazione e di monitoraggio per essere effettivamente sicuri che tale contaminazione non sia avvenuta. Ciò si realizza attraverso l'uso, in ogni amplificazione eseguita, di un controllo negativo di amplificazione, contenente tutti i reagenti utilizzati (*open tube*) e mediante l'esecuzione di procedure note sotto il nome di *wipe test*.

Controllo di qualità per le apparecchiature

I protocolli per le apparecchiature devono essere in grado di permettere la verifica sull'ottimale funzionalità di quanto installato presso il laboratorio e prevedono quindi una registrazione del monitoraggio costante delle condizioni di utilizzo.

È importante la registrazione della temperatura ambientale, perché alcune delle metodiche utilizzate per la determinazione degli antigeni HLA, sia sierologiche sia molecolari, devono essere eseguite a temperatura ambiente e risentono di temperature troppo distanti dai 25 °C; pertanto, un eccessivo riscaldamento, o al contrario una temperatura troppo bassa, possono risultare in una scorretta esecuzione dell'analisi, che dovrà perciò essere ripetuta.

I frigocongelatori (-20 e -80 °C), i frigoriferi (+4 °C) ed i congelatori ad azoto liquido, oltre ad essere monitorizzati con un registratore costante della temperatura, devono essere dotati di sistema d'allarme tale da garantire un pronto intervento in caso di innalzamento della temperatura, per evitare che ci sia una cattiva conservazione dei campioni e dei reagenti; tutti i reagenti, infatti, hanno una precisa temperatura di conservazione; il mancato rispetto di queste può provocare errori di esecuzione. Anche i campioni vanno conservati a precise temperature, ad esempio i sieri dei pazienti in lista d'attesa per trapianto, che devono essere utilizzati al momento del *cross-match* donatore-ricevente, vanno conservati a -70 °C per evitare che ci sia una denaturazione degli eventuali anticorpi presenti.

L'apparecchiatura cardine per l'esecuzione delle metodiche di biologia molecolare è rappresentata dall'amplificatore, del quale deve essere verificata mensilmente la capacità di mantenere una temperatura precisa e riproducibile, testando in special modo le temperature di denaturazione (94 °C), appaiamento (55 °C) ed estensione (72 °C) mediante un sistema termometrico di alta precisione.

Ciascuna apparecchiatura utilizzata va iscritta in un registro in cui vanno riportate le tarature, i controlli (incubatori, bilance, pipettatrici, ecc.), nonché gli interventi di manutenzione eseguiti.

Qualificazione del personale

Il personale che esegue analisi di istocompatibilità deve avere dei requisiti particolari che lo rendano idoneo all'esecuzione ed all'interpretazione delle analisi. In particolare l'organico a disposizione deve essere sufficientemente adeguato, in base ai carichi di lavoro, in maniera da evitare che l'accumulo di analisi da eseguire possa essere causa di errori.

L'organico del laboratorio deve essere rappresentato dalle seguenti figure professionali:

- *tecnici di laboratorio di tipizzazione tissutale*: perché possa essere responsabilizzato dell'esecuzione di analisi il personale, oltre avere esperienza di laboratorio acquisita con il titolo di studio, deve aver lavorato da almeno un anno in un laboratorio di tipizzazione, seguito da personale esperto che ne abbia curato l'addestramento;

- *laureati*: dato che sono preposti all'interpretazione dei risultati ed alla validazione dell'analisi devono avere, oltre alla laurea richiesta ed eventuale diploma di specializzazione, un'esperienza di tre anni di lavoro nel campo dell'istocompatibilità;

- *responsabile*: deve avere esperienza documentata almeno quinquennale nel campo dell'istocompatibilità e dell'immunologia dei trapianti.

Dato che il campo dell'istocompatibilità è in continua evoluzione sia per quanto riguarda la conoscenza dei meccanismi di riconoscimento degli alloantigeni da parte del sistema immunitario dell'individuo, sia nel campo più appropriatamente applicativo, con lo sviluppo di sempre nuove metodiche da applicare allo studio dell'HLA, tutto il personale del laboratorio deve partecipare a specifici programmi di aggiornamento specifico in relazione ai compiti svolti ed alle proprie responsabilità.

Trattamento del campione

Quando viene eseguito un prelievo per le analisi di istocompatibilità bisogna assicurarsi che il campione di sangue sia etichettato correttamente; devono essere riportati i dati anagrafici della persona, la data del prelievo e la firma del prelevatore. Se viene usata più di una provetta ciascuna di esse deve riportare la stessa etichetta. Nel prelievo vanno rispettate le comuni regole di asepsi e ciascun prelievo va trattato come potenzialmente capace di trasmettere malattie infettive [2].

Controllo di qualità per i reagenti

Poiché i reagenti possono subire nelle varie fasi precedenti al loro utilizzo (ad es. trasporto) delle esposizioni a condizioni ambientali che possono alterarne la funzionalità, ciascun reagente prima di essere utilizzato dovrà essere sottoposto a controllo di qualità e quindi conservato ed etichettato seguendo le istruzioni della ditta produttrice, con ben evidente la data di scadenza.

Per l'esecuzione delle metodiche di sierologia vengono utilizzate piastre tipizzanti contenenti antisieri specifici contro antigeni HLA, che possono essere mono o polispecifici; la piastra tipizzante deve contenere almeno due sieri monospecifici o tre polispecifici per ciascun allele HLA. Se vengono utilizzati antisieri monoclonali va stabilita la opportuna diluizione da utilizzare. Le piastre di tipizzazione devono contenere tutte le specificità HLA note, o almeno quelle che sono presenti nelle popolazioni caucasiche, non solo come antigeni *broad*, ma anche come *splits*. Prima di utilizzare nuovi lotti delle piastre questi vanno validati utilizzando almeno cinque campioni di cellule a tipizzazione nota e diversa l'una dall'altra, in maniera da essere certi di utilizzare delle piastre valide. Dopo le prime 50 tipizzazioni eseguite, il software del sistema di lettura semiautomatico, che è auspicabile sia utilizzato in tutti i laboratori, permette l'elaborazione dei risultati ed un'ulteriore verifica della funzionalità delle piastre tipizzanti calcolando il coefficiente di correlazione per ciascun siero [3].

Le metodiche sierologiche prevedono l'uso di complemento di coniglio che è quindi un componente importantissimo della reazione e per tale motivo va scelta la diluizione più opportuna d'utilizzo, a meno che non venga utilizzato complemento fornito insieme alla piastra tipizzante, in quanto tali test sono eseguiti dalla ditta stessa.

Manuale del laboratorio

Nel laboratorio deve essere disponibile un manuale contenente la descrizione dettagliata di tutte le metodiche in uso; tale manuale va aggiornato annualmente e deve portare la firma del responsabile per la validazione delle modifiche apportate. Oltre al manuale generale, di cui esisterà un'unica copia a disposizione di tutto il personale, in ogni stanza deve essere disponibile un manuale contenente solamente le metodiche che vengono utilizzate in quella stanza.

Controlli di qualità

Il laboratorio deve avere attuati controlli di qualità per tutte le metodiche che in esso vengono utilizzate: il primo controllo è quello a livello intralaboratorio, per cui il personale tutto deve eseguire delle tipizzazioni già

note ed i risultati vanno riportati su appositi registri. Per quanto riguarda i controlli extralaboratorio il laboratorio deve partecipare ai controlli organizzati a livello nazionale, o anche a livello internazionale, se richiesti per gli accreditamenti, ad esempio quelli dell'University of California, Los Angeles (UCLA) per l'ASHI. Attualmente in Italia, mentre è ben organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità il controllo di qualità per la tipizzazione tissutale sierologica e genomica, non sono ancora attivi controlli di qualità per il *cross-match* e per le metodiche eseguite in citometria a flusso, ma il laboratorio dovrebbe prevedere di partecipare a controlli internazionali per queste metodiche [4, 5].

I risultati di questi controlli vanno registrati in apposito registro e per ogni eventuale errore riscontrato va tenuta registrazione delle azioni correttive eseguite, una volta che sia stato individuato il problema che ha causato l'errore.

Trapianto renale

E' indispensabile eseguire la tipizzazione HLA nel ricevente per i loci A, B e DR, ma sarebbe auspicabile tipizzare anche i loci HLA C e DQ.

Se un ricevente ha un tempo di permanenza in lista d'attesa superiore ai quattro anni e presenta dei "blank" nella sua tipizzazione, questa deve essere ripetuta. Possono essere utilizzate metodiche sierologiche oppure metodiche molecolari a bassa risoluzione. Le metodiche di analisi molecolare, impiegate nel laboratorio di tipizzazione impegnato nel trapianto di organi solidi sono essenzialmente quelle per la bassa risoluzione degli alleli DRB1 e DQB1 [6]. Il laboratorio deve documentare i metodi utilizzati per la preparazione del DNA e per la sua conservazione. Gli acidi nucleici devono essere conservati in maniera tale da non avere artefatti o inibizioni delle reazioni di amplificazione. La metodica più utilizzata attualmente per la bassa definizione degli alleli DRB1 è senza dubbio l'amplificazione mediante *primers* allele-specifici e devono essere chiaramente dimostrate le condizioni che influenzano la quantità e la qualità dei prodotti amplificati. Devono essere quindi stabilite le condizioni di reazione delle coppie dei *primers* ed un protocollo specifico che include i cicli e le temperature di amplificazione, le concentrazioni del tampone e la quantità di enzima utilizzata. Devono essere conosciute le esatte zone di appaiamento delle coppie dei *primers* per valutare eventuali reazioni aspecifiche che possono dare dei problemi di valutazione degli alleli. L'utilizzo di controlli interni di amplificazione è indispensabile per determinare se le condizioni di amplificazione e la qualità del DNA siano esatte. Tutti i test commerciali utilizzati devono essere validati mediante analisi di DNA a genotipo noto prima di essere utilizzati per una risposta in campo clinico.

In realtà l'utilizzo di metodiche molecolari non sostituisce quelle sierologiche, in quanto la definizione esatta del gene non ci dà indicazioni sulla sua traduzione e quindi sull'espressione della molecola a livello della superficie cellulare e perciò sulla sua capacità di indurre risposta immune [7].

Oltre alla tipizzazione HLA è necessaria l'esecuzione del *cross-match* per valutare la presenza nel ricevente di anticorpi citotossici donatore-specifici che possano essere responsabili di rigetto iperacuto (cioè entro le 24 h). Per il trapianto da donatore cadavere le analisi da eseguire sono indifferibili, pertanto è necessario attivare un sistema di reperibilità del personale coinvolto 24 ore su 24 tutti i giorni. La tipizzazione del ricevente viene eseguita al momento della sua iscrizione in lista d'attesa, ma durante la permanenza nella lista, ad intervalli regolari di circa tre mesi, il siero deve essere testato contro un pannello linfocitario costituito da circa trenta cellule di donatori sani, per valutare se qualche evento immunizzante (es. trasfusione) abbia provocato una sensibilizzazione contro antigeni HLA [8].

Per la rilevazione di questi anticorpi la tecnica più usata è quella della micro-linfo-citotossicità mediata dal complemento, ma per l'esecuzione del *cross-match* donatore-specifico al momento dell'assegnazione dell'organo bisogna utilizzare particolare accorgimento per aumentare la sensibilità del test, quali la lunga incubazione (1 ora dopo la semina e due ore dopo il complemento), l'utilizzo di lavaggi per rimuovere fattori anti-complemento presenti nel siero del paziente, o l'aggiunta di AHG (*anti human globulin*) che favorisce il legame del C1q alla cellula rivestita dall'anticorpo [9, 10]. In questi ultimi anni sta raccogliendo sempre più consensi l'utilizzo della tecnica in citometria a flusso, che offre una serie di vantaggi rispetto alla metodica tradizionale di citotossicità complemento-mediata. Con la citometria, infatti, viene testato un numero maggiore di cellule, possono essere misurati contemporaneamente più parametri in maniera da definire, con l'utilizzo di più fluorescenze, oltre che le classi di immunoglobuline presenti anche il tipo di cellula cui si lega tale anticorpo; la caratteristica più importante di tale tecnica è, però, quella di essere dotata di una maggiore sensibilità non influenzata da fattori inibenti presenti nel siero e quindi in grado di dare al laboratorista una sicurezza maggiore sulla presenza di anticorpi donatore-specifici nel siero di un paziente che si avvia al trapianto [11-13].

E' auspicabile che il laboratorio di tipizzazione tissutale estenda il suo campo d'azione nel periodo post-trapianto eseguendo anche analisi che valutino la risposta immunitaria all'organo trapiantato, mettendo cioè a punto metodiche capaci di valutare precocemente la comparsa di rigetto, quali ad esempio lo studio della comparsa di anticorpi donatore-specifico in citometria a flusso e la determinazione del fenotipo linfocitario.

Trapianto di altri organi

L'assegnazione dell'organo nel caso di trapianti di cuore, fegato, polmoni, ecc., non viene effettuata normalmente sulla base della compatibilità HLA fra donatore e ricevente ma secondo parametri di compatibilità fisica, urgenza clinica e tempo di permanenza in lista di attesa. Il rispetto della compatibilità genetica è però necessario quando i pazienti in lista d'attesa sono ad alto rischio per rigetto del trapianto (ad es. secondo trapianto, pazienti precedentemente immunizzati contro gli antigeni HLA). In questo caso i pazienti devono essere tipizzati per gli antigeni HLA A, B e DR per l'assegnazione di un organo più compatibile e deve essere eseguito il *cross-match* pre-trapianto; se il paziente presenta anticorpi anti-classe I il siero utilizzato deve essere stato raccolto 48 h prima del trapianto.

Infine va sottolineato che il laboratorio di tipizzazione tissutale difficilmente estende il suo campo d'azione solo nei trapianti d'organo, ma è sicuramente impegnato anche nel trapianto di midollo e nel campo della ricerca, per cui avrà a disposizione anche metodologie avanzate per la definizione della compatibilità donatore-ricevente, quali ad esempio il sequenziatore automatico di DNA. Tale apparecchiatura permette di definire la sequenza nucleotidica dei geni HLA e, oltre ad essere utilizzata nel campo del trapianto di midollo da non correlato, dove è importante una perfetta identità degli antigeni HLA, sta anche aprendo la strada ad una diversa concezione della compatibilità intesa non più come identità per singoli antigeni. Negli ultimi anni è stato, infatti evidenziato come la condivisione di "epitopi pubblici" e la somiglianza di sequenze aminoacidiche permetta di raggruppare gli antigeni HLA di classe I in un ridotto numero di "antigeni crossreattivi" (CREG) per cui si potrebbe arrivare ad un nuovo sistema di selezione del potenziale ricevente, aumentando notevolmente il numero di trapianti eseguiti con elevata o completa compatibilità HLA [14].

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 25 gennaio 2000.

BIBLIOGRAFIA

1. AMERICAN SOCIETY FOR HISTOCOMPATIBILITY AND IMMUNOGENETICS. 1993. Standard or histocompatibility testing. *ASHI Quarterly* **14** (4).

2. ROSE, S.L. 1984. *Clinical laboratory safety*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA.
3. BLANCK, C.E. 1993. *Laboratory guidelines for quality controls of HLA typing trays*. 3. ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. (ASHI laboratory manual).
4. COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGIST. 1994. *Surreys intralaboratory comparison programs, 1993*. CAP, Northfield, Illinois.
5. COX, F.R., SMITA, V. & TERESI, A. 1993. *Gary quality assurance for serology and cellular methods*. 3. ed. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. (ASHI laboratory manual).
6. OLERUP, O. & ZETTERQUIST, H. 1992. HLA-DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* **39**: 225.
7. ADORNO, D., CANOSSO, A., PIAZZA, A., POGGI, E., PAPOLA, F., DI ROCCO, M., LIBERATORE, G., DEL BEATO, T., OZZELLA, G., ANACLERIO, M. & CASCANI, C.U. 1999. The role of β -pleated sheet DRB1 differences in acute rejection after cadaveric renal transplant. *Transplant. Proc.* **31**: 730-733.
8. FULLER, T.C. 1991. Monitoring HLA alloimmunization: analysis of HLA alloantibodies in the serum prospective transplant recipients. *Clin. Lab. Med.* **11**: 551.
9. GEBEL, H.M. & LEBECK, L.K. 1991. Cross-match procedures used in organ transplantation. *Clin. Lab. Med.* **11**: 603.
10. KERMAN, R.H., VAN BUREN, C.T., LEWIS, R.M., DEVERA, V., BAGHDAHSARIAN, V. & KAHAN, B.D. 1990. Improved graft survival for flow cytometry and antihuman globulin cross-match negative retransplant recipients *Transplantation* **49**: 52-56.
11. BRAY, R.A. 1994. Flow cytometry crossmatching for solid organ transplantation. *Methods Cell Biol.* **41**: 103-119.
12. MAHONEY, R.J., AULT, K.A., GIVEN, S.R. *et al.* 1990. The flow cytometry crossmatch and early renal transplant loss. *Transplantation* **49**: 527.
13. PIAZZA, A. & ADORNO, D. 1999. Flow cytometry crossmatch and kidney graft outcome. *Transplant. Proc.* **31** (1-2): 314-316.
14. CANOSSO, A., PIAZZA, A., MONACO, P.I., BUONOMO, O., DI ROCCO, M., DEL BEATO, T., VALERI, M., TORLONE, N., PAPOLA, F., CASCANI, C.U. & ADORNO, D. 1999. Role of amino acid residue matching on kidney graft outcome. In: 13. European Histocompatibility Conference. Aghia Pelaghia, Crete, April 13-17, 1999. *Human Immunol.* **60** (suppl. 1): S10 n. 19.