



INFORMATIVA PRE-TEST

Descrizione e finalità del test AffinityMap

Affinitymap consiste nella genotipizzazione dei geni KIR e HLA-C al fine di valutare la compatibilità tra i recettori KIR, presenti sui linfociti NK materni nella cavità uterina, e il sistema di immuno-istocompatibilità HLAC di origine fetale.

Ogni individuo è caratterizzato da un corredo genetico ereditato per metà per via paterna e per metà per via materna, pertanto ogni embrione possiede una quota di materiale genetico di origine paterna che viene riconosciuto come non proprio (*non-self*) dall'ambiente uterino materno in cui si sta sviluppando.

Nel corso della gravidanza il sistema immunitario materno sviluppa una "tolleranza" all'embrione prima ed al feto poi, nonostante questo sia riconosciuto come parzialmente *non-self*. Il successo della gravidanza è quindi salvaguardato dalla capacità del sistema immunitario materno, attraverso i recettori KIR, di tollerare l'embrione e non attaccarlo come elemento estraneo.

In presenza di una compatibilità ottimale, il processo di tolleranza materno-fetale si svilupperà correttamente agevolando una gravidanza senza complicazioni; viceversa una incompatibilità tra geni KIR materni e HLA-C fetale comporterà una attivazione della popolazione NK materna, con conseguente risposta immunitaria che potrebbe compromettere la riuscita della gravidanza o comportare l'insorgenza di parto pretermine.

Complesso di immuno-istocompatibilità HLA –C

Gli Antigeni Leucocitari Umani (HLA - *Human Leukocyte Antigen*), sono proteine codificate da oltre 200 geni localizzati sul cromosoma 6 che fanno parte del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Il complesso maggiore di istocompatibilità ha la funzione di presentare sulla sua superficie gli antigeni di agenti infettivi o ritenuti estranei, presentandoli alle cellule del sistema immunitario (Linfociti T). A seconda della loro distribuzione tissutale e della loro funzione, si possono distinguere due gruppi principali di molecole HLA: le molecole di classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e le molecole di classe II (HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP).

La maggior parte degli alleli HLA-C presenti nella popolazione può essere a sua volta suddivisa in due gruppi principali (HLA-C 1 e 2), in base all'amminoacido (aspartico o lisinico) presente in posizione 80 della molecola HLA-C. È proprio attraverso questa regione che avviene il legame con i recettori KIR materni e di conseguenza la risposta immunitaria NK è fortemente influenzata dal genotipo C1 e C2 fetale.

La presentazione dell'antigene a cura del complesso di istocompatibilità fetale HLA-C al sistema immunitario materno (Linfociti T-NK), permette l'identificazione dello stesso come "*self*" o "*non self*".

Tabella 1: Serie alleliche specifiche dell'HLA C di gruppo 1 e 2

Gruppo HLA-C	HLA-C Serie Alleliche
C1	HLA-C*01, HLA-C*03, HLA-C*07, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14 y HLA-C*16
C2	HLA-C*02, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*15, HLA-C*17 y HLA-C*18

Geni KIR e Linfociti NK

I linfociti *Natural Killer* (NK) sono una sottopopolazione linfocitaria coinvolta nella risposta immunitaria mediante la formazione di immunocomplessi. Le NK hanno recettori di membrana chiamati KIR (*Killer-cell Immunoglobulinlike Receptors*) che riconoscono alcune proteine codificate dall'allele HLA-C prodotto dal trofoblasto dell'embrione. Il recettori KIR sono codificati da una famiglia di 16 geni, tutti localizzati sul cromosoma 19 (19q13.4), caratterizzati da elevata omologia ma anche da ampia variabilità. I recettori KIR appartengono alla superfamiglia di immunoglobuline IgSF e sono composti da 2 o 3 domini Ig, una regione transmembrana e una coda citoplasmatica che può essere corta (con effetto attivante) o lunga (con effetto inibitorio). Lo stato di attivazione delle cellule NK è determinato dalla combinazione di questi 16 geni KIR, poiché esse esprimono sia recettori di superficie con effetto attivante sia recettori con effetto inibitorio.

I geni KIR sono organizzati in due principali aplotipi, denominati A e B.

- L'aplotipo A è correlato ad incompatibilità madre-feto in quanto determina una attivazione della popolazione NK
- L'aplotipo B è correlato a tolleranza madre-feto in quanto determina un effetto inibitorio dei NK.

Tabella 2: Serie alleliche dei geni KIR con i relativi aplotipi

Aplotipo KIR	Geni KIR* e aplotipi
A	KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DS4
B	KIR2DL2, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR2DP1 KIR3DP1

**Nomenclatura dei geni KIR stabilita dal Comitato Internazionale di Nomenclatura (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) (1)*

Indicazione ad eseguire Affinitymap

Affinitymap è indicato in tutti i casi in cui sia opportuno indagare la compatibilità immunologica materno-fetale relativamente al genotipo KIR/HLA-C per una presa in carico adeguata della coppia nel percorso di PMA o nella fase preconcipimento.

È particolarmente indicato per:

- ✓ Coppie con storia clinica di poliabortività e/o ripetuti fallimenti di impianto
- ✓ Coppie con storia pregressa o a rischio di pre-eclampsia
- ✓ Scelta di donatori di seme in fecondazione assistita eterologa maschile
- ✓ Selezione di donatrici di ovociti in fecondazione assistita eterologa femminile
- ✓ Scelta dei donatori in caso di embriodonazione/doppia donazione di gameti

Tipologie di Affinitymap

- ☐ Affinitymap KIR: studio del genotipo KIR
- ☐ Affinitymap HLA-C: studio del genotipo HLA-C
- ☐ Affinitymap HLA-C/KIR: studio del genotipo KIR e del genotipo HLA-C

Come proporre Affinitymap

Affinitymap può essere eseguito in caso di concepimenti omologhi o eterologhi.

Tabella 3: Come proporre Affinitymap nei diversi tipi di concepimenti

	Partner Femminile (gestante)	Partner Maschile	Donatrice di ovociti	Donatore di seme
Concepimento Naturale	KIR + HLA-C	HLA-C	n.a.	n.a.
PMA omologa	KIR + HLA-C	HLA-C	n.a.	n.a.
PMA eterologa femminile	KIR	HLA-C	HLA-C	n.a.
PMA eterologa maschile	KIR + HLA-C	n.a.	n.a.	HLA-C
PMA eterologa con doppia donazione o embriodonazione	KIR	n.a.	HLA-C	HLA-C

*n.a.: non applicabile

Risultati:

Studi recenti hanno dimostrato che specifiche combinazioni tra il genotipo KIR materno e il genotipo HLA-C paterno, che si manifestano nell'embrione, sono più frequenti nelle donne con aborti spontanei ricorrenti (2). In particolare, il genotipo KIR AA nella gestante è stato associato a un maggior rischio di interruzioni ricorrenti di gravidanza, preeclampsia o ritardo di crescita intrauterino rispetto alle gestanti eterozigoti con genotipo AB o omozigoti con genotipo BB (3).

Questo aumento del rischio è correlato all'espressione da parte dell'embrione del Genotipo HLAC di tipo 2 sia in eterozigosi sia in omozigosi.

Diversamente, se il genotipo materno è KIR AB o KIR BB non ci sarà un aumento di rischio per le complicanze sopra esposte indipendentemente dal genotipo HLA-C del feto.

Tabella 4: Livello di rischio per l'impianto durante la gravidanza in base al genotipo KIR materno e al gruppo HLA-C fetale dedotto dai genotipi materni e paterni

Genotipo KIR materno	HLA-C fetale		
	C1/C1	C1/C2	C2/C2
AA	neutro	a rischio*	a rischio
AB	neutro	neutro	neutro
BB	neutro	neutro	neutro

**Il rischio aumenta quando l'allele HLA-C appartenente al gruppo HLA-C2 è di origine paterna.*

Per dedurre il genotipo HLA-C del feto è necessario distinguere tra concepimenti omologhi o eterologhi.

Concepimenti omologhi

Nei concepimenti omologhi, spontanei o da procreazione medicalmente assistita, si dovranno considerare i genotipi dei due partner della coppia.

La presenza di un genotipo **KIR AB o BB della partner femminile**, indipendentemente dal genotipo HLA-C dei due partner, non riduce la probabilità di impianto né aumenta il rischio di complicanze della gravidanza.

In presenza di un **genotipo KIR AA della partner femminile** dovrà essere valutato il genotipo HLA-C dei due partner:

- Se entrambi i partner presentano genotipo HLA-C C1/C1 non c'è riduzione di probabilità di impianto né aumenta il rischio di complicanze della gravidanza
- Se uno o entrambi i partner presentano un genotipo HLA-C C1/C2 o C2/C2 esiste la possibilità che il feto abbia un genotipo C1/C2 o C2/C2 e questo riduce la probabilità di impianto e aumenta il rischio di complicanze della gravidanza.

Concepimenti Eterologhi

Nei concepimenti eterologhi si dovranno considerare il genotipo della gestante ed altri genotipi in relazione alla specifica tipologia di fecondazione eterologa che verrà eseguita.

La presenza di un **genotipo KIR AB o BB della gestante**, indipendentemente dal genotipo HLA-C della gestante e/o del partner e/o dei donatori, non riduce la probabilità di impianto né aumenta il rischio di complicanze della gravidanza.

In presenza di un **genotipo KIR AA della gestante** dovrà essere valutato il genotipo HLA-C nella gestante e/o nel partner e/o nei donatori:

- PMA eterologa femminile:
 - se il partner maschile e o la donatrice presentano genotipo HLA-C C1/C1 non c'è riduzione di probabilità di impianto né aumenta il rischio di complicanze della gravidanza
 - se il partner maschile e o la donatrice presentano un genotipo HLA-C C1/C2 o C2/C2 esiste la possibilità che il feto abbia un genotipo C1/C2 o C2/C2 e questo riduce la probabilità di impianto e aumenta il rischio di complicanze della gravidanza
- PMA eterologa maschile:
 - se il donatore di seme presenta genotipo HLA-C C1/C1 non c'è riduzione di probabilità di impianto né aumenta il rischio di complicanze della gravidanza
 - se il donatore di seme presenta un genotipo HLA-C C1/C2 o C2/C2 esiste la possibilità che il feto abbia un genotipo C1/C2 o C2/C2 e questo riduce la probabilità di impianto e aumenta il rischio di complicanze della gravidanza
- PMA eterologa con doppia donazione o embriodonazione:
 - se i donatori presentano genotipo HLA-C C1/C1 non c'è riduzione di probabilità di impianto né aumenta il rischio di complicanze della gravidanza
 - se i donatori presentano un genotipo HLA-C C1/C2 o C2/C2 esiste la possibilità che il feto abbia un genotipo C1/C2 o C2/C2 e questo riduce la probabilità di impianto e aumenta il rischio di complicanze della gravidanza

Nota tecnica

Metodo di analisi

- Genotipizzazione HLA-C

Affinitymap consente di rilevare e genotipizzare le seguenti serie alleliche: HLA-C: HLA-C*01, HLA-C*02, HLA-C*03, HLA-C*04, HLA-C*05, HLA-C*06, HLA-C*07, HLA-C*08, HLA-C*12, HLA-C*14, HLA-C*15, HLA-C*16, HLA-C*17 e HLA-C*18. Il test consiste in una estrazione del DNA da sangue periferico, una successiva amplificazione attraverso PCR dei marcatori genetici HLA-C e successiva tipizzazione mediante sonde specifiche SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) legate a microsfere Luminex (Lifecodes, Inmucor).

- Genotipizzazione KIR

Il test consiste in una estrazione del DNA da sangue periferico e una successiva amplificazione attraverso PCR di marcatori genetici associati ai geni KIR e successiva tipizzazione mediante sonde SSO (Sequence Specific Oligonucleotide) legate a microsfere Luminex (Lifecodes, Inmucor). Questa tecnica consente di rilevare e genotipizzare 16 geni

KIR: KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR2DP1 e KIR3DP1.

Sensibilità analitica

La sensibilità è del 98%.

Limiti

Il test Affinitymap non garantisce l'impianto dell'embrione in utero né garantisce l'evoluzione della gravidanza successiva all'impianto. I risultati del test e la pianificazione della terapia e del follow-up specifici dovrebbero essere definiti ed illustrati dal medico di riferimento che ha richiesto e/o eseguito l'indagine.

Il test Affinitymap può essere eseguito sul DNA estratto da un prelievo di sangue periferico raccolto in provetta contenente EDTA come anticoagulante. L'utilizzo di provette contenenti altri anticoagulanti non è idoneo all'esecuzione di Affinitymap. Nel caso di trasfusioni di sangue o trapianto non è possibile eseguire il test in quanto non si può assicurare che il DNA estratto da prelievo ematico corrisponda al DNA germinale dell'individuo.

Per l'esecuzione dell'analisi Affinitymap è necessario che siano correttamente compilati e firmati il foglio di richiesta analisi e il consenso informato. In caso alcune informazioni richieste siano mancanti il laboratorio contatterà il medico per ottenere tali informazioni. Tale comunicazione potrebbe modificare i tempi di lavorazione del campione e di emissione del referto.

Riferimenti bibliografici:

(1) Marsh SGE et al. *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) Nomenclature Report, 2002*; Human Immunology, 2003 64:648-654.

(2) Hong Y et al. *Killer immunoglobulin-like receptor repertoire on uterine natural killer cell subsets in women with recurrent spontaneous abortions*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008 Oct;140(2):218-23.

(3) Hiby SE et al. *Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success*, J Exp Med 2004; 200: 957-65.

(4) Hiby SE et al. *Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage*, Hum Repro, 2008; 23: 972-6.

CONSENSO INFORMATO AL TEST AFFINITYMAP

Io sottoscritto/a _____

Data di nascita _____ Luogo di nascita _____

Residente a _____ Prov. _____

in Via _____ Cap _____

Recapiti: Telefono: _____ e-mail: _____

DICHIARO

di aver ricevuto, nel corso del colloquio con il/la Dottore/Dottoressa _____ avvenuto in data _____, dettagliate informazioni sull'analisi molecolare che mi accingo ad eseguire, di aver compreso e valutato tutti gli aspetti dell'esame, di aver compreso l'utilità e le finalità dell'analisi genetica ed i suoi eventuali limiti. Ho avuto inoltre modo di porre tutte le domande che ho ritenuto opportune ed ho ricevuto risposte che considero esaurienti. In particolare:

- mi è stato spiegato lo scopo del test;
- mi sono stati spiegati i limiti del test;
- ho discusso sui possibili rischi, benefici e limiti connessi al test;
- ho compreso che l'esito del test può comportare conseguenze mediche e psicologiche, per me e la mia famiglia;
- ho compreso il significato di possibili risultati del test (anche inattesi);
- sono stato/a informato/a delle persone che avranno accesso al campione biologico;
- sono stato/a informato/a delle persone che avranno accesso all'esito del test;
- di poter revocare il consenso in qualsiasi momento, mediante la firma del relativo atto di revoca.

Pertanto:

ACCONSENTO

all'esecuzione della/e seguente/i analisi: _____
sul materiale biologico a me prelevato.

INDICAZIONE ALL'ANALISI: _____

DICHIARO inoltre di:

☐ Volere

☐ NON volere

essere informata/o circa i risultati dell'analisi;

☐ Volere

☐ NON volere

Rendere partecipe dei risultati il Dott. _____

☐ Volere	☐ NON volere	che il materiale biologico possa essere utilizzato in futuro, nel rispetto della normativa vigente in materia di protezione dei dati personali, per ulteriori indagini a fini diagnostici presso il centro che esegue le analisi;
☐ Volere	☐ NON volere	che il materiale biologico possa essere utilizzato in futuro, nel rispetto della normativa vigente in materia di protezione dei dati personali, per ulteriori indagini a fini diagnostici presso altri centri, anche fuori dall'Unione Europea;
☐ Volere	☐ NON volere	essere informata/o circa i risultati delle ulteriori indagini a fini diagnostici effettuate;
☐ Volere	☐ NON volere	essere informata/o dei risultati delle analisi anche in relazione a notizie inattese, che possono avere un beneficio in termini di terapia, prevenzione o consapevolezza delle scelte riproduttive;
☐ Volere	☐ NON volere	che il materiale biologico e i loro referti anonimizzati possano essere utilizzati, nel rispetto della normativa vigente in materia di protezione dei dati personali, per scopi di ricerca e/o per studi finalizzati alla tutela della collettività in campo medico, biomedico ed epidemiologico e per programmi di verifica della qualità delle prestazioni del laboratorio;
☐ Volere	☐ NON volere	essere informata/o circa i risultati della ricerca.

Il/La sottoscritto/a dichiara che quanto sopra corrisponde a verità e si impegna a comunicare tempestivamente ogni eventuale cambiamento di opinione in merito.

Data ____/____/____

Firma del paziente:

Lo Specialista che ha raccolto il consenso (nome e cognome): _____

Tel. _____ E-Mail _____

Firma e timbro dello Specialista: _____