

Anticuerpos anti-HLA por ELISA como predictores del resultado de la Prueba cruzada por citometría de flujo en pacientes cubanos receptores de Trasplante Renal. Instituto de Hematología e Inmunología. Marzo del 2013 a Junio del 2017

Marcell Rodríguez, Lelyem¹
Chang Monteagudo, Arturo²
Morera Barrios, Luz Mirella³
Ustariz García, Catalino Ronal⁴
Bencomo Hernández, Antonio⁵

¹Instituto de Hematología e Inmunología/Histocompatibilidad, La Habana, Cuba, amlerod@infomed.sld.cu

²Instituto de Hematología e Inmunología/Histocompatibilidad, La Habana, Cuba, achangm@gmail.com

³Instituto de Hematología e Inmunología/Histocompatibilidad, La Habana, Cuba, luzm.morera@infomed.sld.cu

⁴Instituto de Hematología e Inmunología/Histocompatibilidad, La Habana, Cuba, catalino@infomed.sld.cu

⁵Instituto de Hematología e Inmunología/Histocompatibilidad, La Habana, Cuba, bencomo@infomed.sld.cu

Resumen:

Introducción: Los anticuerpos anti-HLA son responsables del mal funcionamiento y pérdida del riñón trasplantado. Para su detección y caracterización se utilizan los anticuerpos contra panel (PRA) y las pruebas cruzadas (XM).

Objetivos: Comprobar si el PRA por Enzimoinmunoensayo (ELISA), puede predecir el resultado de las pruebas cruzadas por citometría de flujo en receptores de trasplante renal de donante vivo.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio de corte transversal. 237 estudios de compatibilidad donante-receptor pretrasplante renal (tipificación HLA con el estuche Olerup SSP® HLA-A-B-DR-DQ, PRA por ELISA y prueba cruzada por citometría de flujo), de pacientes cubanos aptos para trasplante renal con donante vivo, cuya muestra fue remitida al departamento de Histocompatibilidad, del Instituto de Hematología e Inmunología, de Marzo del 2013 a Junio del 2017. Se utilizaron el chi-cuadrado, el índice de kappa, los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) para el análisis.

Resultados: La detección de anticuerpos anti-HLA por ELISA mostró un VPP del 17,7% y VPN del 97,3% con respecto a la prueba cruzada por CF. El PRA por ELISA y la XM virtual por ELISA, ambos de clase I y II, presentaron VPN por encima del 95% con respecto a las XM por CF para linfocitos T y B, pero VPP bajos, a excepción de la XM virtual a clase I por ELISA con un VPP: 70% con respecto a la XM por CF con linfocitos B.

Conclusiones. Un paciente con PRA por ELISA negativo tiene altas probabilidades de tener una prueba cruzada por citometría de flujo negativa.

Palabras clave: PRA, anticuerpos anti-HLA, ELISA, prueba cruzada, prueba cruzada virtual.

I. INTRODUCCIÓN.

Los anticuerpos anti-HLA son los actores fundamentales en los rechazos hiper agudo, agudo mediado por anticuerpos e incluso, de la fibrosis intersticial y la atrofia glomerular del rechazo crónico del trasplante renal y por ello responsables del mal funcionamiento y pérdida del riñón trasplantado (1, 2), por lo que dos de los estudios de compatibilidad pretrasplante renal van enfocados hacia su detección y caracterización tales son: los anticuerpos anti-HLA contra panel (PRA) y las pruebas cruzadas.

En el PRA se enfrenta el suero del paciente frente a los antígenos HLA clase I y clase II más frecuentes en una población. Antaño se utilizaba un panel de linfocitos T y B, de donde adquirió el nombre el estudio, en la actualidad estos antígenos se encuentran inmovilizados en fases sólidas, de donde surge el PRA por Enzimoimmunoensayo (ELISA) y por la técnica de luminex. Este estudio permite conocer, si el paciente presenta o no anticuerpos anti-HLA, el porcentaje y contra cuales antígenos HLA van dirigidos estos anticuerpos (especificidad). (1) De vital importancia para poder encontrar un donante compatible.

La prueba cruzada permite conocer si el receptor presenta anticuerpos anti-HLA específicos de donante (DSA), que son los anticuerpos que pueden provocar, si se utiliza a ese donante, reacciones que dañen el órgano trasplantado. Una prueba cruzada positiva contraindica a un potencial donante para ese receptor. Esta se puede realizar por citometría de flujo (CF) o por Luminex. (1)

El PRA, con el conocimiento de las especificidades de los anticuerpos anti-HLA, se utiliza para la prueba cruzada virtual, que permite no solo predecir el resultado de una prueba cruzada real al compararlos con los antígenos HLA de un donante potencial, sino conocer las posibilidades de un paciente de recibir un trasplante renal de acuerdo a la frecuencia poblacional de un determinado alelo de los genes HLA. De esta manera se puede estimar el tiempo en espera de trasplante renal, así como las posibilidades de supervivencia del injerto y del paciente una vez trasplantado. (3)

En nuestro país lleva menos de 5 años la introducción del método de ELISA para el PRA, que permite determinar el porcentaje de sensibilización y la especificidad de los anticuerpos anti-HLA, así como la instauración de la citometría de flujo (CF) para las pruebas cruzadas pre trasplante. Ambas pruebas presentan niveles de sensibilidad diferentes, por lo que el objetivo de la presente investigación es comprobar si el PRA por ELISA (menos sensible que la CF) es útil como herramienta predictiva de los resultados de las pruebas cruzadas por citometría de flujo en receptores de trasplante renal de donante vivo.

II. MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal, que comprendió las muestras de todos los pacientes del Programa Nacional de Trasplante Renal Cubano, aptos para trasplante renal con donante vivo, cuya muestra fue remitida al Centro de Ingeniería Celular y Trasplante de Órganos y Tejidos, del Instituto de Hematología e Inmunología, para los estudios de compatibilidad pretrasplante renal donante-receptor en el periodo de Marzo del 2013 a Junio del 2017, para un total de 217 posibles receptores estudiados, algunos hasta con tres donantes, y un total de 237 estudios.

A los pacientes y sus donantes se les realizó la tipificación por baja resolución de los genes HLA (A, B, DR, DQ) por primers específicos de secuencia (SSP) con el estuche Olerup SSP® HLA-A-B-DR-DQ

anteriormente reportado (4) y para la prueba cruzada fue utilizada la citometría de flujo (XMCF), para detectar si el suero del receptor de trasplante renal contenía anticuerpos contra los antígenos HLA expresados en los linfocitos T y B del donante, se empleó un citómetro de flujo de la compañía Apogee. Se emplearon anticuerpos monoclonales anti-CD19 conjugado con PerCP (del inglés, *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*), anti-CD3 conjugado con PE (del inglés, *phycoerythrin*) y anti-IgG, este último conjugado con FITC (Isotiocinato de fluoresceína). (5)

Para el PRA (porcentaje y especificidad de los anticuerpos IgG anti-HLA en el suero del receptor) fue utilizado el método de ELISA y los estuches comerciales LIFECODES QuikScreen y LIFECODES B-Screen, para la detección de anticuerpos anti-HLA clase I y II, respectivamente y a aquellos pacientes cuyas muestras resultaron positivas se procedió a la identificación de porcentaje de PRA y especificidades mediante los estuches comerciales LIFECODES Quik-ID Class I para anticuerpos anti-HLA clase I y LIFECODES Quik-ID Class II para anti-HLA clase II siguiendo las instrucciones del fabricante (6). Estas técnicas se realizaron de forma automatizada mediante un analizador tipo ChemWell® (AwarenessTechnology, Inc).

Se consideró como prueba cruzada virtual positiva cuando el estudio por ELISA arrojó anticuerpos anti-HLA específicos de los genes HLA del donante (DSA, del inglés, *donor specific antibody*). Los pacientes fueron agrupados según su porcentaje de sensibilización con anticuerpos anti-HLA en 4 grupos de PRA (0%, menos del 20%, del 20 al 75% y mayor del 75%)

Los resultados fueron introducidos en una Base de Datos en Microsoft Access utilizada en el departamento de Histocompatibilidad y para el análisis estadístico se utilizó el programa Epidat versión 3.1. Se utilizaron la estadística descriptiva, el estadígrafo Ji-cuadrado para la asociación entre pruebas y el índice de kappa para la concordancia entre pruebas, trabajándose en ambos con un nivel de confianza del 95%, (p menor estricto de 0,05 existió significación estadística). Se empleó la siguiente escala para evaluar el grado de concordancia según el valor de Kappa: Deficiente $<0,20$, Regular $0,21 - 0,40$, Moderada $0,41 - 0,60$, Buena $0,61 - 0,80$, Muy buena $0,81 - 1,00$. Además se analizaron el valor predictivo negativo (VPN) y positivo (VPP) del PRA por ELISA con respecto al XMCF.

Se mantuvieron los principios éticos relacionados con las investigaciones médicas y con la Declaración de Helsinki entre ellos: La aprobación por el Comité de Ética de la Investigación institucional para el inicio del estudio y el consentimiento informado antes de iniciar la investigación.

III. RESULTADOS

De los pacientes estudiados solo 20 (8,4%) tuvieron una prueba cruzada a linfocitos B o T positiva y de ellos 16 tuvieron anticuerpos anti-HLA de alguna clase. En el estudio predominaron los pacientes negativos a anticuerpos anti-HLA y existió asociación entre el PRA por ELISA y la prueba cruzada por CF ($p: 0,0001$) Tabla 1.

El PRA por ELISA mostró con respecto a la prueba cruzada por citometría de flujo una sensibilidad del 80%, especificidad del 65,9%, VPP del 17,7% y VPN del 97,3%. La concordancia entre ambas pruebas fue significativa aunque deficiente, Tabla 1.

Tabla 1. PRA por ELISA y resultados de la prueba cruzada por citometría de flujo.

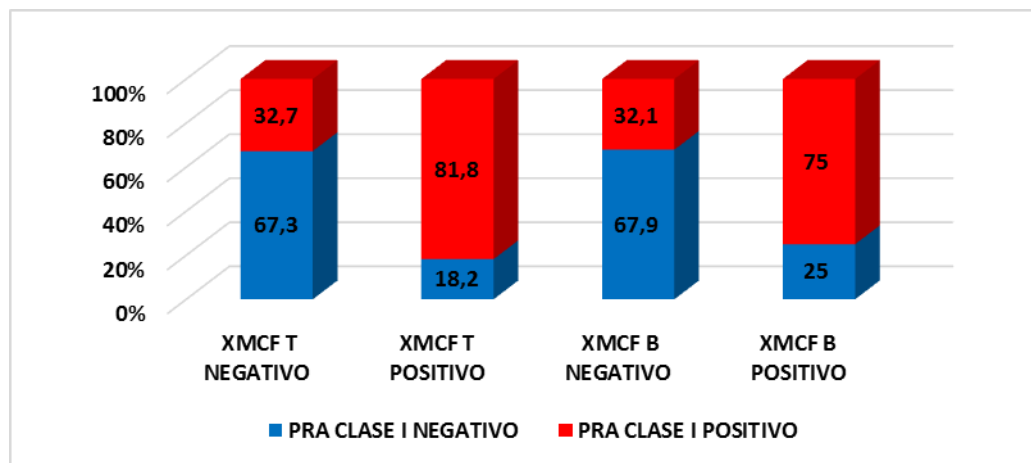
PRA	XMCF				TOTAL	%	X ²	kappa	Kappa/ p
	N	%	P	%					
NEGATIVO	143	60,4	4	1,6	147	62	0,0001	0,1773	0,0492
POSITIVO	74	31,2	16	6,8	90	38			
TOTAL	217	91,6	20	8,4	237	100			

Notas aclaratorias: N: Negativo; P: Positivo, PRA: anticuerpos anti-HLA contra panel; XMCF: prueba cruzada por citometría de flujo; X2: chi-cuadrado, kappa: Índice de kappa.

Como se puede apreciar en la Fig 1, menos de la tercera parte de los pacientes que tuvieron pruebas cruzadas negativas a linfocitos T y B presentaron anticuerpos anti-HLA clase I detectados por ELISA. Un PRA por ELISA positivo con una prueba cruzada por CF negativa, a pesar de esta última ser más sensible que la primera, se debe a que el PRA por ELISA detecta todo tipo de anticuerpos anti-HLA, mientras que la prueba cruzada solo detecta aquellos anticuerpos específicos del donante (DSA), por lo que el receptor puede presentar anticuerpos anti-HLA no específicos del donante. El 81,8% y el 75% de los pacientes con XMCF positivos en linfocitos T y B respectivamente, presentaron anticuerpos anti-HLA clase I detectados por ELISA.

Los linfocitos T no presentan genes HLA clase II, por lo que la prueba cruzada con linfocitos B fue la única utilizada para establecer su relación con los anticuerpos anti-HLA clase II, Fig 2. En esta se muestra que los anticuerpos anti-HLA clase II detectados por ELISA estuvieron presentes en más de la mitad de los pacientes con prueba cruzada positiva a linfocitos B.

Fig 1. PRA clase I y clase II según resultado de la prueba cruzada con linfocitos T y B

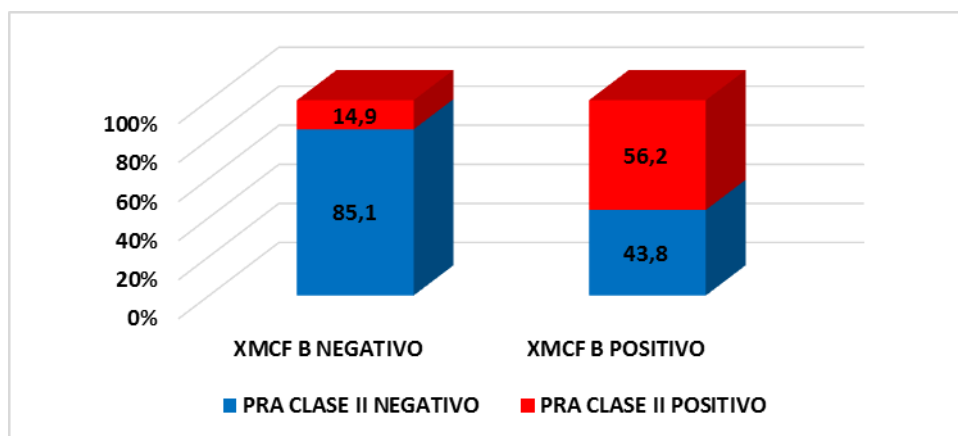


Fuente: Base de Datos del departamento de Histocompatibilidad.

El PRA por ELISA para anticuerpos anti-HLA clase I mostró con respecto a la prueba cruzada por citometría de flujo para linfocitos T un VPP del 10,84% y VPN del 98,7%, mientras que para la prueba cruzada para linfocitos B tuvo un VPP del 13,48% y un VPN del 97,4% y la concordancia fue similar en ambos casos, siendo esta significativa aunque deficiente (índice de kappa: 0,1193, p=0,0434).

Los anticuerpos anti-HLA clase II detectados por ELISA tuvieron un VPP del 20% y VPN del 96,3% respecto al XMCF con los linfocitos B. En este caso no existió concordancia significativa (índice de kappa: 0,2356, p=0,0800).

Fig 2. PRA clase II según resultado de la prueba cruzada con linfocitos B



Fuente: Base de Datos del departamento de Histocompatibilidad.

En las Tabla 2 y Tabla 3 se puede apreciar que en la medida que aumentó el porcentaje de sensibilización con anticuerpos anti-HLA clase I y clase II detectados por PRA por ELISA, aumentó la incidencia de pruebas cruzadas positivas tanto a linfocitos T, como a B y como existió asociación estadísticamente significativa entre tener un PRA del 0% y la mayor probabilidad de una prueba cruzada negativa y PRA mayor del 75% y una prueba cruzada positiva, tanto a linfocitos T como B.

Otros investigadores han detectado aumento de la incidencia de resultados positivos de la XM con el aumento del porcentaje del PRA por ELISA. (7)

Tabla 2. Porcentaje de anticuerpos anti-HLA clase I por ELISA y resultado de la prueba cruzada por citometría de flujo con linfocitos T y B.

		0%		MENOS DEL 20%		PRA CLASE I 20-75%		MAYOR DEL 75%		NR	TOTAL
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%		
XMCF T	NEG	152	98,7	18	100	42	93,3	8	72,2	6	226
	POS	2	1,3	0	0	3	6,6	3	27,3	3	11
	p	0,0009		0,3992		0,3992		0,0000			
XMCF B	NEG	150	97,4	17	94,4	40	88,9	7	63,6	7	221
	POS	4	2,6	1	5,6	5	11,1	4	36,4	2	16
	(X ²) p	0,0005		0,9142		0,1211		0,0000			

Notas aclaratorias: PRA: NEG: Negativo; POS: Positivo; PRA: anticuerpos anti-HLA frente a panel; XMCF: prueba cruzada por citometría de flujo; No: Número; NR: No realizada; X²: chi-cuadrado.

Tabla 3. Porcentaje de anticuerpos anti-HLA clase II por ELISA y resultado de la prueba cruzada por citometría de flujo con linfocitos B.

		0%		MENOS DEL 20%		PRA CLASE II 20-75%		MAYOR DEL 75%		NR	TOTAL
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	
XMCF B	NEG	188	96,4	8	80	17	85	1	25	7	221
	POS	7	3,6	2	20	3	15	3	75	1	16
(X ²) p		0,0000		0,0764		0,1099		0,0000			

Notas aclaratorias: PRA: NEG: Negativo; POS: Positivo; PRA: anticuerpos anti-HLA frente a panel; XMCF: prueba cruzada por citometría de flujo; No: Número; NR: No realizada; X²: chi-cuadrado.

Tanto en la Tabla 4, como en la Tabla 5, se muestra que existió asociación estadísticamente significativa entre la prueba cruzada virtual, que tuvo de base las especificidades de los anticuerpos detectadas con el PRA por ELISA, y la citometría de flujo. Existió asociación entre la prueba cruzada virtual de clase I y XM a linfocitos T y B (p: 0,0000) y entre la prueba cruzada virtual de clase II y el XM a los linfocitos B (p: 0,0002)

Tabla 4. Prueba cruzada virtual clase I por ELISA y resultado de la prueba cruzada por citometría de flujo con linfocitos T y B

		XM VIRTUAL CLASE I				NR	X ²	kappa	kappa/p
		NEG		POS					
		No.	%	No.	%				
XMCF T	NEG	212	98,1	6	60	8	0,0000	0,4217	0,1498
	POS	4	1,9	4	40	3			
XMCF B	NEG	209	96,8	3	30	9	0,0000	0,5607	0,1240
	POS	7	3,2	7	70	2			

Notas aclaratorias: NEG: Negativo; POS: Positivo; XMCF: prueba cruzada por citometría de flujo; XM: prueba cruzada; No: Número; NR: No realizada; kappa: Índice de kappa.

Tabla 5. Prueba cruzada virtual clase II por ELISA y resultado de la prueba cruzada por citometría de flujo con linfocitos B

		XM VIRTUAL CLASE II				NR	X ²	kappa	kappa/p
		NEG		POS					
		No.	%	No.	%				
XMCF B	NEG	211	94,6	2	50	8	0,0002	0,2003	0,1295
	POS	12	5,4	2	50	2			

Notas aclaratorias: NEG: Negativo; POS: Positivo; XMCF: prueba cruzada por citometría de flujo; XM: prueba cruzada; No: Número; NR: No realizada; kappa: Índice de kappa.

La prueba cruzada virtual clase I por ELISA presentó un VPP: 40%, VPN: 99,05%, con respecto a la prueba cruzada a linfocitos T y un VPP: 70%, VPN: 96,75% con la prueba cruzada a linfocitos B. No existió concordancia en ambos casos, Tabla 4.

La prueba cruzada virtual clase II por ELISA presentó un VPP: 50%, VPN: 94,06%, con respecto a la prueba cruzada a linfocitos B. No existió concordancia entre ambas, Tabla 5.

Otros autores han reportado VPP no tan importantes y VPN mayores del 90% en la predicción del resultado de la prueba cruzada pretrasplante utilizando en el PRA y en la prueba cruzada virtual ensayos de fase sólida como el ELISA (8), pero en este estudio se utilizó el método de microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (CDC) en la prueba cruzada, con menor sensibilidad que el ELISA, y no la citometría de flujo como en este estudio.

IV. CONCLUSIONES

Un PRA por ELISA positivo no predice un resultado positivo de la prueba cruzada por citometría de flujo en pacientes receptores de trasplante renal cubanos, pero su negatividad se traduce en altas probabilidades de una prueba cruzada por citometría de flujo negativa.

V. REFERENCIAS

- 1-Ercilla MG, Martorell J. Estudio inmunológico de la pareja donante-receptor. *Nefrología*. 2010; 30(Suppl. 2):60-70.
- 2-Valenzuela NM, Reed EF. Antibodies in Transplantation: The Effects of HLA and Non-HLA Antibody Binding and Mechanisms of Injury. In: Zachary AA, Leffell MS. *Transplantation Immunology Methods and Protocols*. 2nd ed. New York: Humana Press; 2013. p. 41-70.
- 3-de Leo Cervantes C. Histocompatibility tests in a transplantation program. *Rev Invest Clin* 2005; 57(2):142-6
- 4-Morera Barrios LM, Chang Monteagudo A, García García MA, de la Guardia O, Ustariz García C, Marcell Rodríguez L, González Mujica R, Fernández Leliebre M, Rodríguez Díaz E, Hernández Limonta Y. Frecuencia de genes HLA en pacientes con insuficiencia renal crónica procedentes del occidente y centro de Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2015; 31(1):32-40.
- 5-Shumway S. Flow Crossmatch. ASHI online university. Chapter 3. Flow Cytometry/Luminex. [Citado 7-2017]. Disponible en: www.ashi-u.com.
- 6-Immucor GTI Diagnostics, I. LIFECODES QuikScreen for in vitro diagnostic use 8(package insert); LIFECODES B-Screen for in vitro diagnostic use (package insert), Waukesha, WI; LIFECODES Quik-ID Class I for in vitro diagnostic use (package insert); LIFECODES Quik-ID Class II for in vitro diagnostic use (package insert) [citado 2017 8-15]. Disponible en: <http://www.immucor.com/global/Products/Pages/LIFECODES-Screen-Identification.aspx>.
- 7- Lieber SR, Perez FV, Tabossi MR, Persoli LB, Marques SB, Mazzali M, Alves-Filho G, de Souza CA. Effect of panel-reactive antibody in predicting crossmatch selection of cadaveric kidney recipients. *Transplant Proc*. 2007 Mar; 39(2):429-31.

8- Lee PC, Ozawa M. Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. Clin Transpl. 2007:219-26.