

“Cross Match Virtual por Luminex en insuficientes renales crónicos en espera de trasplante renal en Paraguay”

Martínez de Filártiga, María Teresa¹, Santacruz, Francisco² Rodríguez, Alicia³ Da Ponte, Fernando⁴.
lcurie@tigo.com.py¹, contacto@laboratoriocurie.com.py², fhdaponte@gmail.com⁴

Laboratorio Curie S.R.L. (Asunción-Paraguay)¹, Servicio de Trasplante Renal del Hospital de Clínicas FCM-UNA (San Lorenzo-Paraguay)²

PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14-INV-468

RESUMEN

La tecnología Luminex constituye una prueba de extremada sensibilidad y especificidad, de mayor aplicación en la actualidad en los países más desarrollados. Se fundamenta en un citómetro de flujo que emplea micro esferas como soporte de unión a los antígenos de HLA y permiten llevar a cabo pruebas de screening, para determinar presencia o no de anticuerpos anti HLA y además conocer sus especificidades mediante la técnica de los antígenos específicos unidos a las partículas, single antigen beads(SAB). La introducción de la tecnología Luminex en el país permitió conocer a través de la prueba de screening (Life Screen Deluxe) partiendo de 118 pacientes en espera de un trasplante, provenientes del hospital de clínicas, 41% estaban inmunizados contra antígenos HLA, en estos sueros se determinaron la especificidad de los anticuerpos presentes, empleando el kit (Lifecodes LSA Clase1,Clase2), para un punto de corte de 1500 Intensidad de Fluorescencia Media (MFI). Con los resultados obtenidos se creó una base de datos en una plataforma virtual a la que pueden acceder los médicos responsables del trasplante. Quedando implementada la posibilidad de llevar a cabo el Cross Match virtual en el Paraguay.

INTRODUCCIÓN

El trasplante renal ha realizado grandes progresos desde aquel primer trasplante de riñón entre gemelos idénticos en 1954 por Joseph Murray y Col.⁽¹⁾ Treinta años habían pasado para que el trasplante renal se iniciara en Paraguay (1985) en el Hospital de Clínicas (HC), desde entonces centenares de pacientes paraguayos han podido ser beneficiados con esta técnica que les ha permitido restaurar su salud y llevar una vida más digna. Sin embargo existen otros cientos de pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) en espera de un trasplante, conocer el estado de inmunidad de estos pacientes se hace de suma urgencia y gran importancia ya que la mayoría de ellos son pacientes poli trasfundidos y por lo tanto susceptibles de ser inmunizados contra los antígenos HLA de los posibles receptores.⁽²⁾ En 1969 la importancia clínica de los anticuerpos anti HLA preformados fue demostrada por Patel y Terasaky. Ellos introdujeron la prueba de Cross match, por el método de citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDC-Cross match) y observaron que el 80% de los receptores con un CDC-Cross match positivo perdían sus injertos debido a un rechazo humoral agudo, desde entonces dicha prueba de CDC, con algunas modificaciones, sigue siendo hasta hoy la prueba obligatoria para la detección de los anticuerpos anti HLA previa a los trasplantes de riñón.⁽³⁾ En 1998,Patel desarrollo un método de screening de anticuerpos anti HLA empleando micro esferas cubiertas con Antígenos HLA purificados y detectados por citometría de flujo, basados en esta tecnología se desarrollo la metodología Luminex de mayor aplicación en la actualidad. Constituye una prueba de extremada sensibilidad y especificidad, que permite además la identificación de los anticuerpos anti HLA específicos conocidos como DSA (Donor specific antibodies).⁽⁴⁾⁽⁵⁾ Esta técnica permite conocer las especificidades antigénicas contra las que reacciona el receptor o ADE (antígenos prohibidos) y contra las que no reacciona o no ADE

(antígenos permitidos), definiendo muy claramente que donantes podrían ser compatibles con el receptor a priori, antes de llevar a cabo la prueba cruzada. Este último sería el concepto de la prueba cruzada virtual que en pacientes altamente sensibilizados permite definir cuáles son las "incompatibilidades aceptables o antígenos permitidos." La precisa evaluación de anticuerpos anti HLA presentes en el suero de los pacientes sensibilizados en lista de espera junto con la identificación de los antígenos de HLA en los donantes de órganos define el proceso del Cross Match Virtual.⁽⁶⁾ La implementación del Cross Match Virtual constituye una ventaja ya que muchas veces el receptor puede encontrarse geográficamente lejos del donante cadavérico y la información recabada en los sistemas informáticos de los anti DSA de los potenciales receptores, agiliza el proceso de adjudicación de órganos, cumpliendo con los principios éticos de equidad y justicia.⁽⁷⁾⁽⁸⁾ Desde los inicios de los trasplantes en el Paraguay hemos luchado para que el país ocupe un lugar preponderante, dentro de esta área de la medicina, a favor de los dolientes pacientes, habiendo introducido el Laboratorio Curie en 1992 el Cross Match (CDC) que ayudó al desarrollo de los trasplantes en el país. Hoy, siguiendo con esta visión estamos abocados al desarrollo del Cross Match virtual por la tecnología Luminex, que ayudara a reemplazar antiguas metodologías de Cross match, implementadas hace más de cuarenta años y que se seguían llevando a cabo hasta la fecha. La prevalencia actual de la IRC en el país es de 219/millón de habitantes, el 80% de estos pacientes son atendidos en hospitales públicos y de los cuales 50% serían trasplantables. Actualmente el Hospital de Clínicas constituye el principal centro de trasplante en el país y pacientes provenientes del Servicio de trasplante renal de dicho Hospital constituyeron nuestra población de estudio.⁽⁹⁾

OBJETIVOS

Determinar el Cross Match Virtual por la tecnología Luminex en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) en espera de un trasplante renal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-Introducir en el país una tecnología de avanzada como Luminex impuesta en países desarrollados.
2. Validad la tecnología recientemente introducida.
- 2- Determinar la presencia de anticuerpos anti HLA 1 y anti HLA 2 en pacientes inmunizados pre-trasplante.
- 3- Identificar los anticuerpos anti HLA 1 y anti HLA 2, Anticuerpos Donantes Específicos (DSA) en pacientes inmunizados pre-trasplante.
- 4- Predecir en el momento de la adjudicación de órganos de donantes cadavéricos los receptores capaces de ser compatibles por comparación de los HLA del donante con las especificidades anti HLA del receptor, Cross Match virtual, antes de llevar a cabo el Cross Match final, agilizando el proceso de donación de órganos.

“Cross Match Virtual por Luminex en insuficientes renales crónicos en espera de trasplante renal en Paraguay”

Martínez de Filártiga, María Teresa¹, Santacruz, Francisco² Rodríguez, Alicia³ Da Ponte, Fernando⁴.
lcurie@tigo.com.py¹, contacto@laboratoriocurie.com.py², fhdaponte@gmail.com⁴

Laboratorio Curie S.R.L. (Asunción-Paraguay)¹, Servicio de Trasplante Renal del Hospital de Clínicas FCM-UNA (San Lorenzo-Paraguay)²

PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14-INV-468

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio observacional prospectivo de corte transversal, que incluyó a 118 pacientes con IRC en espera de un trasplante renal provenientes del Servicio de Trasplante Renal del Hospital de Clínicas (FCM-UNA), que acudieron al Laboratorio Curie para la extracción de sangre a fin de determinar la presencia de anticuerpos anti HLA clase I, clase II y/o clase I/II y la asignación de especificidades anticuerpos anti DSA. En el periodo comprendido entre junio de 2015 y julio del 2017, fueron obtenidos los datos demográficos y el historial inmunológico de cada paciente en el momento de la toma de muestra mediante un formulario que recogía dichos datos. La toma de muestra se realizó previa firma del consentimiento informado. La detección de anticuerpos anti HLA y los DSA, se llevó a cabo mediante la técnica en fase sólida, Luminex, introducida por primera vez en el país.

En un primer momento se determinó la presencia de anticuerpos anti HLA clase I, II y clase I/II en el suero de todos los pacientes, mediante la técnica screening de anticuerpos anti HLA por Luminex (Lifecodes Life Screen Deluxe LMX, Tepnel, Stamford, CT), siguiendo las instrucciones del fabricante.

De los sueros que dieron positivos por el método de screening, se determinaron la especificidad de los anticuerpos anti HLA clase I, clase II y/o Clase I/II con la metodología Luminex utilizando el kit de IMMUCOR (Lifecodes LSA I Clase I, LSA y/o LSA clase II, LSA2; Telpel, Stamford, CT) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Hemos decidido emplear un punto de corte de 1500 MFI por debajo del cual las especificidades se consideran negativas. Con los resultados obtenidos, se creó una aplicación web a la que pueden acceder los médicos del Servicio de Trasplante Renal del HC, dicha aplicación se encuentra disponible en el link <http://www.proyectoscurie.com.py:8888/medicalrep>. Los datos recolectados (edad, sexo, transfusiones recibidas, embarazos, trasplantes previos) y los resultados obtenidos de las técnicas de Luminex fueron introducidos en una planilla electrónica (Excel) y analizados empleando herramientas de estadística descriptiva. El protocolo fue revisado y aprobado por el comité de ética del Hospital de Clínicas.

RESULTADOS

La prueba de Screening de anticuerpos anti HLA I y II llevada a cabo por la tecnología Luminex en el suero de 118 pacientes con IRC en espera de un trasplante renal provenientes del Servicio de Trasplante del HC arrojaron los siguientes resultados:

Del suero de estos pacientes: El 59% arrojó un resultado negativo para anticuerpos (Ac) anti HLA clase I y Clase II, el 41% arrojó un resultado positivo. De los pacientes con resultados positivos: todos recibieron una o más transfusiones, el 12% dio positivo para Ac de clase I, el 40% para Ac de clase II y el 80% positivo para Ac de clase I/II. De los pacientes con trasplantes previos: El 80% dio positivo para Ac de clase I y II. De los pacientes inmunizados, el 33% fue de sexo masculino y 67% de sexo femenino. De las mujeres: un 69% dio positivo para Ac clase II mientras que los hombres dieron un 62% de clase I y II. De mujeres

embarazadas previas: el 70% de los anticuerpos fueron de clase I y II. (Figura 1).

En lo que se refiere a la frecuencia de anticuerpos Anti DSA Clase I agrupados de acuerdo a la intensidad del MFI: Alta (> a 5000), Media (3000 -5000) y Baja (1500-300) se encontró que los Ac dirigidos contra el locus B fueron los más frecuentes para los tres niveles establecidos (Figura 2).

Para los Anti DSA de Clase II los Ac dirigidos contra el locus DRB1 fueron los más frecuentes para los tres niveles establecidos (Figura 3).

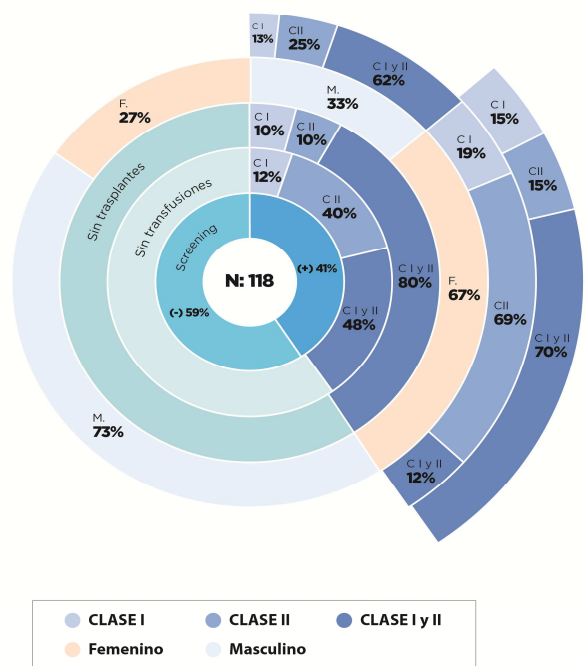
De los Ac anti DSA Clase I para el locus A los más frecuentes fueron: A* 24:03; A* 24:02; A* 24:01; A* 32:01 y A* 66:01 para el locus B los más frecuentes fueron: B* 27:05; B* 27:08; B*57:01; B* 15:16 y para el locus C los más frecuentes fueron: C* 12:02; C* 08:01 y el C* 03:04 (Figura 4).

Los Ac Anti DSA de Clase II, lo más frecuentes fueron, para el locus DRB1: DRB1* 14:01; 11:04; 11:01 y 14:04; para el locus DRB3: DRB3* 01:01; 03:01 para el DRB4: DRB4* 01:01; 01:02 para el DRB5: DRB5* 01:01 y 02:02 Para DQA1: DQA1* 01:02; 04:01y 01:01 para el DQB1: DQB1* 06:04 para el DPA1: DPA1* 01:03; 03:01 y 04:01 y para el locus DPB1: DPB1* 04:02; 02:01 y 28:01 (Figura 5).

Figura 1

Relación entre pacientes en espera de un trasplante renal con las variables y clases de anticuerpos anti HLA.

Edad: Una media de 35



“Cross Match Virtual por Luminex en insuficientes renales crónicos en espera de trasplante renal en Paraguay”

Martínez de Filártiga, María Teresa¹, Santacruz, Francisco² Rodríguez, Alicia³ Da Ponte, Fernando⁴.
 lcurie@tigo.com.py¹, contacto@laboratoriocurie.com.py², fhdaponte@gmail.com⁴

Laboratorio Curie S.R.L. (Asunción-Paraguay)¹, Servicio de Trasplante Renal del Hospital de Clínicas FCM-UNA (San Lorenzo-Paraguay)²

PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14-INV-468

Figura 2

Frecuencias de anticuerpos anti HLA clase I por Luminex de acuerdo al MFI.

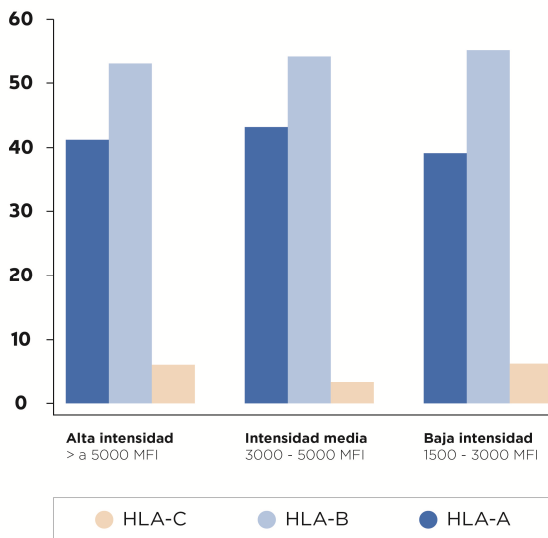


Figura 4

Frecuencias de especificidades de anticuerpos antígenos específicos - DSA Clase I.

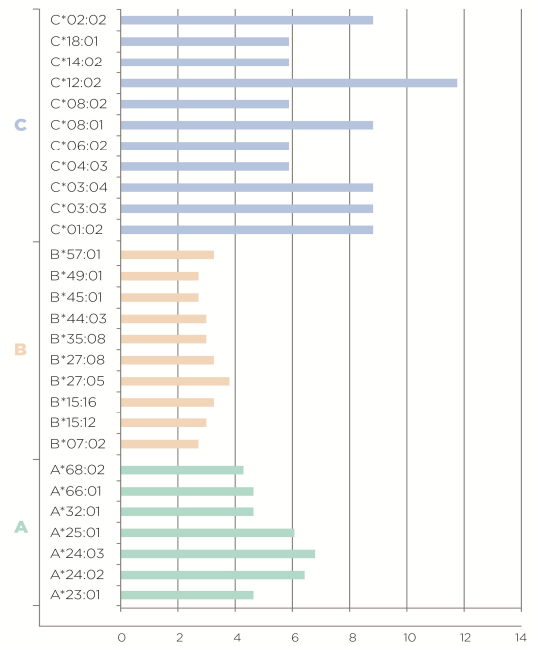


Figura 3

Frecuencias de anticuerpos anti HLA de clase II por Luminex de acuerdo al MFI.

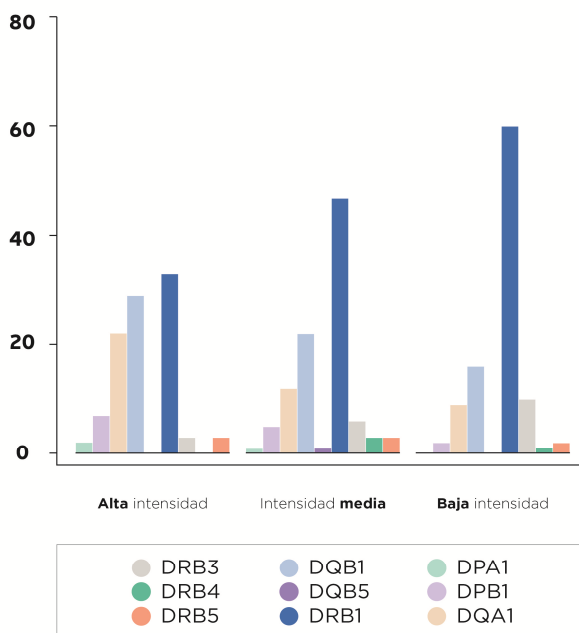
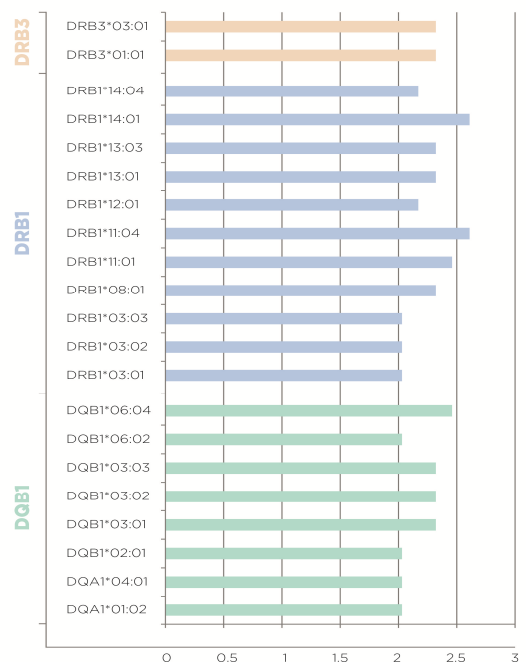


Figura 5

Frecuencias de especificidades de anticuerpos antígenos específicos - DSA Clase II.



“Cross Match Virtual por Luminex en insuficientes renales crónicos en espera de trasplante renal en Paraguay”

Martínez de Filártiga, María Teresa¹, Santacruz, Francisco² Rodríguez, Alicia³ Da Ponte, Fernando⁴.
lcurie@tigo.com.py¹, contacto@laboratoriocurie.com.py², fhdaponte@gmail.com⁴

Laboratorio Curie S.R.L. (Asunción-Paraguay)¹, Servicio de Trasplante Renal del Hospital de Clínicas FCM-UNA (San Lorenzo-Paraguay)²

PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14-INV-468

CONCLUSIONES

El desarrollo de este proyecto permitió introducir en el país la tecnología de alto impacto Luminex, impuesta en los países desarrollados. A través de este fluoroanalizador fue posible conocer el estado inmunológico y definir poblaciones de riesgo, en pacientes en espera de un trasplante renal, determinando la presencia de anticuerpos anti HLA clase I y anti HLA clase II e identificar los Ac anti DSA en pacientes inmunizados. Empleando la prueba de screening de IMMUCOR (LifeScreen Deluxe) se obtuvo un 41 % de pacientes inmunizados contra antígenos de HLA, estos datos se corresponden exactamente con los obtenidos por el Laboratorio de Inmunogenética del Instituto de Donación y Trasplante (INDT) del Uruguay, empleando técnicas de ELISA, MLCT y citometría de flujo, diferentes a Luminex.⁽¹⁰⁾ Todos nuestros pacientes inmunizados recibieron trasfusiones a diferencia de los no inmunizados

En el suero de los inmunizados se determinó la especificidad de los anticuerpos presentes, empleando el kit de IMMUCOR (Lifecodes LSA Clase I, Clase II), con un punto de corte de 1500 MFI. Considerando que no existen puntos de corte estandarizados para determinar la positividad de estas pruebas, la valoración del riesgo inmunológico varía entre los distintos centros. Este sería el punto débil de esta técnica. Nosotros hemos empleado 1500 como intermedio entre 3000 y 500 que constituye el abanico de puntos de corte empleados por los distintos laboratorios de histocompatibilidad. Teniendo en cuenta que cuanto más bajo sea el MFI que define el cut off, la actitud del centro trasplantador será más conservadora, por el contrario cuanto más alto sea el MFI se correrán más riesgos inmunológicos pero se darán más oportunidades a los pacientes sensibilizados en lista de espera. A pesar de este problema el Luminex se ha convertido hoy en día en una prueba "gold standard" en los laboratorios de histocompatibilidad.

Consideramos importante separar las especificidades de acuerdo al MFI en alta, intermedia y baja sin que esto signifique una cuantificación, sino como una forma de brindar al médico una visión más amplia acerca de las especificidades de los pacientes, así como también hemos expresado los anticuerpos con cuatro dígitos de manera a la que se expresan los alelos obtenidos por resolución media, por técnicas de biología molecular. Con los resultados se creó una base de datos disponible en una aplicación web del estado de inmunización de los pacientes en lista de espera a la que pueden acceder los médicos responsables del trasplante renal del Hospital de Clínicas. De esta manera quedó implementada la posibilidad de llevar a cabo el Cross Match virtual en el Paraguay.

El Luminex permite además de la tipificación de los Antígenos de HLA por métodos de biología molecular, PCR/SSO (Secuencia específica de Oligonucleótidos) de manera automatizada y rápida. La incorporación de la tecnología Luminex constituyó una gran revolución en el mundo de los trasplantes, llevando a la realidad el concepto del Cross Match virtual. A manera de Gebel and Bray, en su artículo "*Solid-phase assays for the detection of alloantibody against human leukocyte antigens: panacea or pandora?*" decían "*el futuro ha llegado y las expectativas son altas*".⁽¹¹⁾

Nosotros también hoy podemos decir: contamos con la tecnología y la capacidad técnica de brindar a los pacientes con IRC en espera de un

trasplante renal esta tecnología de punta, agilizando a través de la prueba de Cross Match virtual el proceso de adjudicación de órganos, cumpliendo con los principios éticos de equidad y justicia. Esta técnica permitirá así mismo el seguimiento de los pacientes trasplantados en cuanto a la presencia de los DSA post trasplantes para predecir y evaluar la disfunción del injerto motivo de un próximo trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Narinder M, Jamshaid S, Ajay B, Sanjeev G. Clinical Relevance of antibody development in renal transplantation. Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923. .
2. Picascia A, Infante T, Napoli C. Luminex and antibody detection in kidney transplantation. Clin Exp Nephrol. 2012; 16: p. 373-381.
3. Patel R, Terasaki P. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med. 1969 April; 14(280): p. 735-739.
4. Kelley MKH, Tambur AR. Detection of donor-specific antibodies in kidney transplantation. British Medical Bulletin. 2014 April 15;: p. 1-12.
5. Terasaki PI. A Personal Perspective: 100-Year History of the Humoral Theory of Transplantation. Transplantation. 2012 April 27; 93(8): p. 751-756.
6. Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. Nephrology. 2009;(14): p. 247-254.
7. Puttarajappa C. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. J Transplant. 2012 April 20.
8. South AM, Grimm PC. Transplant immuno-diagnostics: crossmatch and antigen detection. Pediatr Nephrol. 2016;(31): p. 897-905.
9. Toledo N, Tiscornia A, Bengochea M, Carretto E. Monitoreo de anticuerpos HLA-en insuficientes renales crónicos en lista de espera uruguaya para trasplante renal 2005. Rev Med Uruguay. 2008; 24: p. 15-23.
10. Instituto Nacional de Ablación y Trasplante INAT (MSP y BS). Datos proveídos por INAT.
11. Roberts T, Tumer G, Gebel HM, Bray RA. Solid-phase assays for the detection of alloantibody against human leukocyte antigens: Panacea or Pandora? International Journal of Immunogenetics. 2014;: p. 362-369.

[Escribir texto]