



Artículo original

Valor De La Prueba Cruzada Virtual En El Programa De Selección De Receptores De Trasplante Renal Modalidad Donante Fallecido En Panamá.

Virtual Test Value Crusade In Program Selection Of Kidney Transplant Recipients Of Deceased Donor Type In Panama.

*Vernaza-Kwiers A., APMC, *Moscoso J., *Ortiz L.,* Gutiérrez Y., **Cuero C., ***Manzanares J., ***Viggiano C.

*Laboratorio Nacional de Trasplante. C.H.M. Dr.A.A.M., **Organización Panameña de Trasplantes, ***Servicio de Nefrología C.H.M. Dr. A.A.M

Palabras claves:

prueba cruzada virtual, prueba cruzada real, donante fallecido, histocompatibilidad.

Keywords:

virtual crossmatch, renal crossmatch, deceased donor histocompatibility

Correspondencia a:

Lic. Alejandro Vernaza

Correo electrónico:

l_ve_rnaza@hotmail.com

Resumen

El establecer parámetros reales pre-trasplante para determinar el riesgo de rechazo inmunológico, ha sido uno de los logros más importantes para el éxito de los trasplantes, ya que el rechazo mediado por anticuerpos anti-HLA resulta en daño severo o en falla del injerto. La determinación del estado de sensibilización pre-trasplante de los potenciales receptores contra los antígenos HLA del donante, y la estimación del riesgo de rechazo mediado por anticuerpos anti-HLA presentes en el receptor, son importantes para seleccionar la estrategia apropiada para el éxito del trasplante en pacientes pre-sensibilizados. En la etapa pre-trasplante de riñón, modalidad donante vivo y donante fallecido, la presencia de estos anticuerpos anti-HLA preformados contra antígenos de los leucocitos humanos no deseables en el donante específico, constituye la base de la prueba cruzada virtual, y representa el más importante factor para evaluar el riesgo inmunológico pre-trasplante, como posible causa del rechazo humoral agudo o hiper-agudo mediado por anticuerpos. El uso de la prueba cruzada virtual para conocer el potencial riesgo de rechazo humoral antes del trasplante no es nuevo, pero su aplicación es obligatoria en Panamá, ya que permite pre-seleccionar los mejores donantes específicos con menor posibilidad de riesgo de rechazo humoral del órgano trasplantado. En Panamá se han aplicado varias técnicas para efectuar la prueba cruzada virtual como la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), el inmuno ensayo de fase sólida que utiliza moléculas HLA o glicoproteínas HLA solubilizadas unidas a una matriz sólida, que puede ser una cámara de microtitulación, (ensayo inmuno-absorbente ligado a enzima (ELISA), o pueden ser microesferas de poliestireno (arreglos de perlas con multi-analitos) y un fluoranalizador utilizando luminometría. Los resultados iniciales de prueba cruzada virtual positiva permiten excluir los pacientes con alto riesgo de rechazo y sólo a los negativos se les efectúa la prueba cruzada real, que constituye el principal factor de selección del receptor.

Abstract

The actual parameters set pre-transplant to determine the risk of immune rejection, has been one of the most important achievements for the success of transplantation. In contrast to cellular rejection episodes, who respond well to treatment with immunosuppressive drugs, rejection mediated by anti-HLA antibodies resulting in severe injury or graft failure. Determining the state of pre-transplant allo-antibodies in potential recipients against HLA antigens of the donor and the estimated risk of rejection is important to select the appropriate strategy for transplant success in pre-sensitized patients. In the pre-kidney transplant, using living and deceased donor, the presence of these anti-HLA preformed against antigens of undesirable human leukocytes in the specific donor, forms the basis of the virtual crossmatch, and represents the most important factor in evaluating the pre-transplant immunological risk as a possible cause of acute or hyper-acute antibody-mediated humoral rejection. The use of virtual crossmatch to know the potential risk of humoral rejection before transplantation is not new, but its application is mandatory in Panama, allowing pre-select the best specific donors with lower risk of humoral organ rejection transplanted. In Panama have been applied several techniques

R M P

2015: Volumen 35(3):21-29

to perform virtual crossmatch as complement dependent cytotoxicity (CDC), the immuno solid phase assay that uses HLA or HLA glycoproteins solubilized attached to a solid matrix, which can be a microtiter camera , (immuno-absorbent enzyme-linked assay (ELISA)), or can be polystyrene microspheres (beads arrangements with multi-analytes) and fluoroanalizador using luminometry. Initial positive results allow virtual crossmatch exclude high-risk patients for rejection and only negative they are made real crossmatch, which is the main factor receptor selection.

INTRODUCCIÓN

En el trasplante de riñón, los pacientes sensibilizados por la presencia de anticuerpos preformados anti-HLA donante específico, representan el más importante factor para conocer el riesgo inmunológico pre-trasplante y la tarea más importante de un laboratorio es la determinación de las llamadas incompatibilidades de antígenos HLA no aceptables antes del trasplante [1,2]. Esta información conocida como prueba cruzada virtual, predice el riesgo inmunológico, lo cual es posible, cuando se conoce la tipificación HLA completa del potencial donante disponible y el nivel de sensibilización anti-HLA del receptor [3].

Históricamente en el Laboratorio de Trasplante de Panamá, se incorporó el ensayo de prueba cruzada virtual, inicialmente mediante citotoxicidad dependiente de complemento, en la cual el suero del paciente fue estudiado por su habilidad de mediar lisis de un panel de linfocitos de múltiples donantes que comprendían todo el polimorfismo de antígenos HLA para loci genético HLA-A, -B, -DR [4].

Si la prueba cruzada virtual era positiva por anticuerpos anti-donante, se consideraba como una contraindicación para el trasplante renal. Esta técnica fue mejorada al incluir la adición de globulina anti-humana para favorecer la lisis mediada por complemento [5,6].

Posteriormente se modificó el método, determinando anticuerpos pre-trasplante mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), que utiliza moléculas HLA solubles fijado a una matriz sólida o cámara de microtitulación.

Este método es más específico y sensible que la citotoxicidad , y permitió determinar anticuerpos adicionales de relevancia clínica, que predicen con exactitud y alta sensibilidad los resultados de la prueba cruzada real aumentando el conocimiento de la probabilidad de rechazo humoral.

Posteriormente se incorporó el ensayo de fase sólida utilizando arreglos de perlas sensibilizadas con moléculas HLA múltiples (ID) o sencillas (LSA). Estas glicoproteínas HLA específicos Clase I (HLA-A, -B,-C) y

Clase II (DRB1, DQB1, DPB1), se determinan por su huella fluorescente en un fluoroanalizador o luminómetro (equipo Luminex) [7,8]. Este último método nos ha permitido caracterizar y detectar con exactitud los anticuerpos anti-HLA pre-existentes en los candidatos a trasplante, y hemos logrado desarrollar una prueba cruzada virtual más específica y sensible que la citotoxicidad y ELISA para predecir con exactitud los resultados de Prueba cruzada real donante específica.

La prueba cruzada virtual con alelos múltiples (ID) o sencillos (LSA) facilita la distribución de órganos en el caso de receptores de trasplante renal alosensibilizados, y al mismo tiempo contribuye al éxito del trasplante.

A los receptores con prueba cruzada virtual negativa preseleccionados, se les efectúa posteriormente y antes de la selección final la prueba cruzada real y sólo son seleccionados los que tienen resultado negativo.

El objetivo del presente estudio es:

1. Caracterizar factores variables de los pacientes preseleccionados como potenciales receptores de trasplante de riñón proveniente de donante fallecido y de los donantes durante los años 2013 - 2015.
2. Determinar el grado de compatibilidad HLA (A, B, DR) de todos los potenciales receptores preseleccionados por el Programa computarizado llamado Selector, de la lista de espera por trasplante de riñón con donantes fallecido.
3. Determinar la correlación de sensibilización mediante Tamizaje y Prueba Cruzada Virtual para anticuerpos HLA Clase I y II de los receptores de lista de espera.
4. Determinar relación de prueba cruzada real positiva en receptores con prueba cruzada virtual negativa.
5. Analizar la exactitud del protocolo de prueba cruzada virtual utilizando tamizaje, identificación de anticuerpos mediante multiplex y perlas simples. Para predecir los resultados de la prueba cruzada real en el trasplante de riñón con donante fallecido en los años 2013 - 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Es un estudio retrospectivo transversal que incluye a todos los receptores de la lista de espera por trasplante renal con modalidad donante fallecido y a todos los donantes fallecidos durante los años 2013-2015. Se excluyen del estudio a todos los donantes fallecidos en los cuales no se utilizó los riñones.

La lista de espera nacional

Todos los pacientes de los Programas de Hemodiálisis y Diálisis Peritoneal a nivel nacional, asegurados o no asegurados, que expresaron deseo de ser trasplantados una vez finalizado el protocolo clínico, son remitidos al Laboratorio de Trasplante para efectuar estudios de tipificación HLA, estudios de determinación de anticuerpos anti-HLA y su identificación.

Una vez se efectúa la tipificación HLA y se conoce su grado de sensibilización, son ubicados como activos en la lista de espera nacional para recibir un riñón proveniente de donante fallecido.

Tipificación HLA

Todos los pacientes antes de ser activados en la lista de espera se les efectúa tipificación HLA, que comprende extracción de ADN genómico de sangre periférica mediante el uso de QUIAMP DNA Mini Kits de QIAGEN, se ajusta la concentración de ADN a 25ng/ml. Los alelos de Clase I (HLA-A, -B) y de Clase II (-DR) se tipifican en baja e intermedia resolución utilizando reacción de la cadena polimerasa y secuencia específica de oligonucleótidos (SSO) de la Empresa Telpel Life Codes HLA-SSO Typing Kits [9,10].

Grado de sensibilización mediante tamizaje e identificación de anticuerpos anti-HLA.

Para este estudio utilizamos tres tipos de paneles de microesferas que varían en la composición de los antígenos blancos.

1. Tamizaje

Se utiliza un panel comercial con grupos de antígenos HLA que contienen dos o más poblaciones de perlas cubiertas con moléculas HLA purificadas y con afinidad HLA. Estas moléculas de proteínas se obtienen de múltiples líneas celulares individuales y se utilizan como tamizaje para determinar anticuerpos anti-HLA Clase I (HLA-A, HLA-B, -HLA-C) o HLA Clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP).

Este panel de grupo de antígenos dividido en siete micro perlas con Clase I y cinco micro perlas con Clase II, indican la presencia o ausencia de un anticuerpo de una clase HLA particular, pero no brinda información sobre la especificidad ni representa todos los posibles antígenos

HLA. Pero es útil para monitorear cambios en los niveles de la especificidad de los anticuerpos HLA específico fijados. Para el Tamizaje utilizamos LIFECODES Life Screen Deluxe (LMX) [11, 12, 13].

2. Identificación

Consiste en un panel de fenotipo en el cual cada población de microesferas contiene proteínas HLA Clase I o HLA Clase II de una línea celular derivada de un único individuo. En este procedimiento más de una especificidad HLA está presente en cada población de microesferas.

El panel de fenotipo usado es LIFECODES Class I, Class II. A Luminex Screening Assay for the Qualitative Detection of IgG Panel Reactive Antibodies to HLA Class I, II molecules [14].

Antígeno Único

Consiste en microesferas con antígeno único, en la cual cada población de microesferas es cubierta con una molécula que representa una clona alélica única. Es el arreglo más sensible y específico y brinda el mayor grado de resolución de los anticuerpos HLA y es muy útil en la identificación exacta de anticuerpos en pacientes altamente sensibilizados. Los pacientes estudiados son divididos en dos grupos, los que tienen anticuerpos anti-HLA y los que no poseen anticuerpos anti-HLA preformados. La causa de la presencia de estos anticuerpos anti-HLA preformados incluyen: transfusiones, embarazos, trasplante previo e infecciones.

Se utilizan reactivos de LIFECODES LSA Class I, Class II: Luminex Screening Assay for the Qualitative Detection of IgG antibodies to HLA Class I, II molecules [14].

Prueba cruzada virtual

Una vez conocida la tipificación HLA del receptor y la identificación del o los antígenos HLA sensibilizantes, los mismos se convierten en antígenos no deseables en el donante, y esta especificidad es utilizada para excluir al receptor si el donante posee en su tipificación HLA, alguno de los antígenos no deseables.

Esta capacidad de incluir o excluir a un receptor de la lista de espera para recibir riñones provenientes de donantes con antígenos no deseables, constituye la base de la prueba cruzada virtual [3, 15, 16].

El ADN del receptor utilizado en la tipificación HLA y su suero para estudiar presencia de anticuerpos anti-HLA son guardados a -86 °C, constituyendo parte integral del Banco de ADN y la Seroteca del Laboratorio de Trasplante.

Vernaza y col: Valor de la prueba cruzada virtual.

Selección de los receptores de riñones

Una vez se tiene un potencial donante fallecido, al mismo se le efectúa tipificación de los genes del Sistema HLA Clase I (HLA-*, -B*) y Clase II (DRB1*) y se seleccionan los diez posibles receptores de riñón utilizando el Programa Selector, el cual presenta una lista de los diez mejores receptores en base a la compatibilidad HLA con el donante fallecido. A este grupo de posibles receptores se les determina si tienen anticuerpos anti-HLA contra antígenos no deseables en el donante o prueba cruzada virtual positiva.

Se seleccionan los posibles receptores con prueba cruzada virtual negativa, teniendo siempre un total de los diez posibles receptores más compatibles, sustituyendo los de prueba cruzada virtual positiva por otros de la lista de espera con prueba cruzada virtual negativa.

Grado de compatibilidad: criterios para la asignación de órganos

Sólo se deben considerar para la selección del potencial receptor del injerto renal aquellos pacientes en la lista de espera que posean compatibilidad de grupo sanguíneo ABO con el donante.

Se determinarán las desigualdades de los antígenos HLA en los loci HLA-A, -B, -DR del donante con respecto a los potenciales receptores y las desigualdades se cuantifican así: para locus HLA-DR cero desigualdades con 8 puntos, una desigualdad con 4 puntos y dos desigualdades con cero punto. Para locus HLA-A y -B, cero desigualdades con dos puntos, una desigualdad con un punto y dos desigualdades con cero puntos.

La puntuación máxima es de 12 para los pacientes con cero desigualdades y la mínima es de cero para los pacientes con seis desigualdades [17].

Prueba cruzada real

A los pacientes con prueba cruzada virtual negativa se les efectúa la prueba cruzada real utilizando suero fresco del receptor y glicoproteínas HLA del donante fallecido.

Los resultados de tipificación HLA y de prueba cruzada virtual y prueba cruzada real son entregados al Grupo médico para la selección de los dos receptores que recibirán los riñones. Se excluyen los posibles receptores con prueba cruzada virtual y real positiva.

Las pruebas fueron efectuadas siguiendo las instrucciones del fabricante o proveedor [18, 19, 20].

Los resultados del ensayo Luminex son expresados por número de perlas con reacción fluorescente positiva, intensidad media fluorescente (MFI) y valor PRA o panel reactivo de anticuerpos. Los análisis específicos fueron efectuados por personal con amplia experiencia.

RESULTADOS

Durante los años 2103 - 2015 se obtuvo consentimiento para la donación de riñones de 64 deudos de donantes fallecidos. De estos 64 donantes, 52 (81.2%) fueron efectivos y 12 (18.7%) donantes no fueron utilizados por

Tabla 1 - Características de los Donantes fallecidos y Receptores de la lista de espera por trasplante renal que fueron preseleccionados durante los años 2013 - 2015.

Características	2013	2014	2015	Total
Donantes fallecidos:	22	26	16	64
Donantes fallecidos efectivos	18	19	15	52
Donantes fallecidos no efectivos	4	7	1	12
Donantes efectivos en los cuales se usó un (1) riñón	4	1	4	7
Donantes efectivos en los cuales se usó dos riñones	14	18	11	45
Total riñones trasplantados	32	38	25	95
Sexo de donantes fallecidos				
Masculino	14(26.9%)	9(17.3%)	10(19.2%)	33(63.4%)
Femenino	3(5.7%)	11(21.1%)	5(9.6%)	19(36.5%)
Edad de Donantes fallecidos				
13-30 años	= 18 (34.1%)			
31-50 años	= 17 (32.6%)			
51-67 años	= 17 (32.6%)			
Posibles receptores				
n. de posibles receptores pre-seleccionados	189 (32.1%)	246(41.7%)	154(26.1%)	589
Sexo de receptores				
Masculino	117(32.7%)	145 (40.6%)	95 (26.6%)	n=357 (60.6%)
Femenino	72(31.0%)	101 (43.5%)	59 (25.4%)	n= 232 (39.3%)

Tabla 2 - Grado de compatibilidad de los posibles receptores de riñón por año según puntaje HLA -A, -B, -DR y los receptores seleccionados para trasplante renal según compatibilidad

HLA-A, -B, DR	2013	2014	2015	Total (%)	2013	2014	2015	Total
0	11	24	8	43 (7.3%)	1	1	3	5 (5.2%)
1	11	2	5	17 (2.8%)	0	3	0	3 (3.1%)
2	2	17	5	24 (4.1%)	0	0	1	1 (1.0%)
3	0	8	3	11 (1.8%)	0	0	0	0
4	14	22	14	50 (8.5 %)	2	2	4	8 (8.4%)
5	52	40	40	132 (22.4%)	8	7	6	21 (22.1%)
6	34	35	36	105 (17.8%)	4	6	7	17 (17.9%)
7	12	18	11	41 (6.9%)	4	0	0	4 (4.2%)
8	14	16	13	44(7.4%)	4	5	2	11 (11.6%)
9	16	16	8	40 (6.8%)	4	3	1	8 (8.4%)
10	14	19	8	41(6.9%)	3	3	1	7 (7.3%)
11	7	18	0	25 (4.2. %)	2	6	0	8 (8.4%)
12	2	11	3	16 (2.7%)	0	2	0	2 (2.1%)
78	189	246	154	589	32	38	25	95

diversas causas. La totalidad de los riñones trasplantados en ese período fue de 95 .En el año 2013, fueron trasplantados los riñones de 18 donantes (34.6%); en el 2014 los de 19 donantes (36.5%) y en el 2015 15 donantes (28.8%).

De los 52 donantes fallecidos efectivos, en 7 (13.4%) de ellos sólo se utilizó un riñón. y en los otros 45 (86.5%) se utilizaron los dos riñones. Ver Tabla No. 1.

De la totalidad de los 52 donantes efectivos, 33 (63.4%) fueron del sexo masculino. La edad de los donantes fallecidos estudiados estuvo entre 13 a 67 años, y la mayor población estuvo entre 13y30 años con un 34.1%. Los grupos etarios de 31-50 años y de 51-67 años tuvieron la misma proporción de donantes (32.6%).

Del período considerado , un total de 589 pacientes de la lista de espera fueron estudiados mediante tipificación HLA e identificación de anticuerpos anti-HLA en el período pre-trasplante como posibles receptores de riñones provenientes de donantes fallecidos: 189 (32.1%) en el año 2013, 246 (41.76%) en el año 2014 y 154 (26.1) en el año 2015. De los receptores preseleccionados estudiados 317 fue-ron del sexo masculino (53.8%).

Tabla 3 - Resultado de tamizaje anti-HLA de pacientes preseleccionados de lista de espera para recibir riñones de donante fallecido

Años	n pacientes	Tamizaje HLA Negativo	Tamizaje HLA Positivo
2013	189	88(37.9%)	101(28.3%)
2014	246	64(27.6%)	182(50.9%)
2015	154	80(34.5%)	74(20.7%)
Total	589	232(39.4%)	357(60.6%)

De los 589 posibles receptores estudiados según los grados de compatibilidad de los alelos de loci genéticos HLA-A, -B, -DR para trasplante, incluyen desde cero (0) hasta doce (12) compatibilidades , se encontró una distribución desigual, pero con mayor compatibilidad en el quinto grado (132 receptores = 24.4%) y en el sexto grado (105 receptores =17.8%) para un total de 237 receptores (51.6%). Ver Tabla No. 2.

Los grados de compatibilidad de los 95 receptores de riñón trasplantados por el grupo médico indican que 21 pacientes (22.1%) fueron trasplantados compartiendo un puntaje HLA de 5; 17 pacientes (17.9%) fueron trasplantados con puntaje HLA de 6; 11 (11.6%) pacientes fueron trasplantados con puntaje HLA de 8 y de 9; 8 pacientes (8.4%) fueron trasplantados con puntaje HLA de 4, 9 y 11; 7 (7.3%) pacientes fueron trasplantados con puntaje HLA de 10. Dos pacientes fueron trasplantados con compatibilidad completa de 12 (2.10%) y 9 pacientes fueron trasplantados con compatibilidad HLA menor o igual a 2. (9.4%)

Los 589 pacientes en lista de espera preseleccionados antes de ser activados para recibir un riñón fueron investigados mediante tamizaje por presencia de anticuerpos anti-HLA Clase I (HLA-A, -B,) y Clase II (HLA-DR).

De poseer en el suero circulante anticuerpos anti-HLA demostrado por tamizaje positivo, se procede a identificar la especificidad del anticuerpos anti-HLA Clase I y/o Clase II.

En los años estudiados, un total de 232 (39.4%) pacientes tuvieron tamizaje HLA negativo; 88 pacientes (37.9%) en el 2013; 64 pacientes (27.6%) en el 2014 y 80 pacientes (34.5%) en el 2015.

Tabla 4 - Estudio comparativo de pacientes pre seleccionados con tamizaje HLA positivo y su resultado de prueba cruzada virtual.

Años	Tamizaje Negativo Virtual Negativa	Tamizaje Positivo Virtual Negativa	Tamizaje Positivo	Tamizaje positivo	Virtual Positiva
2013	88	101	50 (49.5%)	51 (50.4%)	139
2014	64	182	50 (27.4%)	132 (72.5%)	196
2015	80	74	30 (40.5%)	44 (59.4%)	124
TOTAL	232	357	130 (36.4 %)	227(63.5%)	459

Tabla 5 - Estudio comparativo de pacientes con tamizaje negativo 0 prueba virtual negativa y resultado de prueba cruzada real.

Años	Tamizaje Negativo	Prueba Virtual Negativa	Total	Prueba Cruzada Real Negativa	Prueba Cruzada Real Positiva
2013	88	51	139	104 (74.8%)	35 (25.2%)
2014	64	132	196	168 (85.7%)	28 (14.3%)
2015	80	44	124	98 (79.0%)	26 (20.9%)
Total	232	227	459	370 (78.9%)	99 (21.0%)

Del total de 589 posibles receptores estudiados, 357 (60.6%) tuvieron tamizaje HLA positivo, para el año 2013 un total de 101 pacientes (28.3%); para el año 2014, un total de 182 (250.9%) y para el año 2015, un total de 74 pacientes (20.7%). Ver Tabla No. 3.

En los 357 pacientes con tamizaje positivo y que han sido sensibilizados por presencia de anticuerpos anti-HLA y presentan riesgo de rechazo humoral del órgano trasplantado, fue posible identificar el antígeno HLA sensibilizante.

En un 30% no fue posible identificarlo mediante el método de identificación (ID) utilizando panel de glicoproteínas y en un 70% usando el método de antígeno sencillo (LSA).

De los 101 pacientes con tamizaje positivo preseleccionados en 2013, un total de 50 (49.5.0%) presentaron prueba cruzada virtual positiva; es decir, con anticuerpos específicos anti-HLA contra los antígenos no deseables presente en el donante. y 51 (50.4%) prueba cruzada virtual negativa.

De los 182 pacientes con tamizaje positivo preseleccionados en 2014, un total de 50 (27.4%) presentaron prueba cruzada virtual positiva, es decir, con anticuerpos específicos anti-HLA contra los antígenos no deseables presente en el donante y 132 (59.4%) prueba cruzada virtual negativa.

De los 64 pacientes con tamizaje positivo preseleccionados en 2015, un total de 30 (40.5%) presentaron prueba cruzada virtual positiva, es decir, con anticuerpos específicos anti-HLA contra los antígenos no deseables presente en el donante fallecido y 44 (59.4.5%) prueba

cruzada virtual negativa (Tabla No. 4). Durante los años estudiados, un total de 459 (77.7%) posibles receptores de 589 presentaron tamizaje Negativo y Prueba Cruzada Virtual Negativa, y 130 receptores preseleccionados inicialmente presentaron Tamizaje Positivo y prueba cruzada virtual positiva, por lo cual no fueron incluidos en la lista de los pacientes a ser seleccionados para recibir los riñones por el riesgo de rechazo humoral.

Al efectuar la prueba cruzada real a los 459 posibles receptores preseleccionados con Tamizaje positivo o negativo pero con prueba Cruzada Virtual Negativa, un total de 99 dieron Prueba Cruzada Real Positiva, los cuales no fueron seleccionados para ser trasplantados.

En el año 2013, de un total de 139 pacientes con Tamizaje Negativo y Prueba Cruzada Virtual negativa, 35 pacientes (25.2%) dieron prueba cruzada real positiva, indicando que poseían anticuerpos anti-HLA Clase I y/o II contra los antígenos HLA del donante fallecido, por lo cual se excluyeron de recibir estos riñones para evitar rechazo humoral y 104 (74.8%) pacientes dieron prueba cruzada real negativa, entre los cuales se seleccionaron los 32 receptores que recibieron riñones.

En el año 2014, de un total de 196 pacientes con Tamizaje Negativo y Prueba Cruzada Virtual negativa, 28 pacientes (14.3%) dieron prueba cruzada real positiva, indicando que poseían anticuerpos anti-HLA Clase I y/o II contra los antígenos HLA del donante fallecido, por lo cual se excluyeron de recibir estos riñones para evitar rechazo humoral y 168 (78.5%) pacientes dieron prueba cruzada real negativa, entre los cuales se seleccionaron los 38 receptores que recibieron los riñones.

En el año 2015, de un total de 124 pacientes con Tamizaje Negativo y Prueba Cruzada Virtual negativa, 26 pacientes (20.9%) dieron prueba cruzada real positiva, indicando que poseían anticuerpos anti-HLA Clase I y/o II contra los antígenos HLA del donante fallecido, por lo cual se excluyeron de recibir estos riñones para evitar rechazo humoral y 98 (79.0%) pacientes dieron prueba cruzada real negativa, entre los cuales se seleccionaron los 25 receptores que recibieron los riñones.

El grupo Médico responsable de la selección de los receptores de riñones, seleccionaron en el año 2013, 104 (74.8%) pacientes para ser trasplantados de un total de 139 con Tamizaje y prueba cruzada real negativa para un promedio de 4.7 pacientes a ser trasplantados por donante.

En el año 2014 seleccionaron 168 pacientes para ser trasplantados de un total de 196 receptores con prueba cruzada real negativa para un promedio de 6.46% de receptores por donante; en el año 2015 seleccionaron 98 pacientes de un total de 124 receptores con prueba cruzada real negativa para un promedio de 6.12 receptores por donante. Ver Tabla No. 5.

DISCUSIÓN

El presente estudio fue diseñado para establecer el valor del protocolo de prueba cruzada virtual utilizado en el Laboratorio de Trasplante de Panamá, y que está basado en los ensayos de tamizaje, identificación y determinación de la especificidad de anticuerpos anti HLA Clase I (HLA-A, -B) y Clase II (DR) en la etapa pre-trasplante de los receptores de la lista de espera renal provenientes de donantes fallecidos.

Hemos descrito el proceso que valida el éxito de la prueba cruzada virtual y su uso más común es en el trasplante de órganos provenientes donante fallecido; pero es también útil en el donante vivo, cuando la prueba cruzada real no es posible debido a que el paciente ha recibido agentes terapéuticos citotóxicos.

Aproximadamente el 60% de los pacientes en lista de espera por riñón proveniente de donante fallecido están sensibilizados y tienen Tamizaje anti-HLA positivo y de estos aproximadamente un 36.4% y poseen Prueba cruzada virtual positiva contra antígenos específicos.

El estudio confirma la importancia de la prueba cruzada virtual para evaluar el riesgo de rechazo humoral debido a anticuerpos anti HLA específicos anti-donante previo al trasplante, y excluir de recibir un riñón a los receptores que poseen anticuerpos no deseables contra el potencial donante. También brinda oportunidad para que otros pacientes de la lista de espera puedan ser estudiados.

Identificar la especificidad de los antígenos no deseables basados en la correlación entre el ensayo de fase sólida por luminometría y los niveles de anticuerpos considerados no permisibles para el trasplante, reduce el número anticipado de prueba cruzada real positiva y esto nos permite ampliar el número de pacientes seleccionados en el cual el donante puede ser utilizado.

El Programa Selector que se aplica en Panamá, establece como orden de prelación en primer lugar la compatibilidad del Sistema de Grupo Sanguíneo y luego el puntaje del mayor grado de compatibilidad donante-receptor al de menor, garantizando que la selección se basa en principios de relación inmuno-genética, lo que permite una selección justa y equitativa y minimiza los riesgos de rechazo.

La mayoría de los riñones trasplantados están en los grados de compatibilidad de 4 a 12 antígenos HLA-A, -B, -DR, lo cual es indicativo del alto grado de selección por compatibilidad que se aplica.

La prueba cruzada virtual es también útil para monitorear la respuesta a los tratamientos de desensibilización anti-HLA y conocer la posibilidad de rechazo mediado por anticuerpos y la detección temprana de este.

Siguiendo el trasplante con la prueba cruzada virtual nos permite la identificación del incremento del título o los cambios de la clase de anticuerpo en la prueba cruzada real o el desarrollo de nuevos anticuerpos, y provee la oportunidad de tratar preventivamente el desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos y puede evitar la necesidad de la biopsia.

Los diferentes resultados entre una prueba y otra pueden ser afectados por varios factores, incluyendo el tiempo de obtención de los datos y la exactitud de la caracterización del anticuerpo. Si los análisis no son frecuentes la posibilidad de eventos sensibilizantes que aumentan el título y amplitud del anticuerpo se incrementan.

El uso del Tamizaje pre-trasplante nos brinda información sobre los eventos sensibilizantes como transfusiones, embarazo, trasplantes previos o eventos pro inflamatorios como infecciones y traumas que pueden no específicamente provocar anticuerpos HLA específicos.

Ciertamente la prueba cruzada virtual puede ser la única prueba pre-trasplante posible para órganos con tiempo de isquemia permisible corto como el corazón, pero en muchos casos la prueba cruzada real puede ser efectuada sin añadir tiempo de isquemia, reduciendo el tiempo requerido para otras pruebas o procedimientos pre-trasplante. Considerando todo esto, creemos que la cuestión no es si la prueba cruzada real es necesaria, sino el beneficio que se gana omitiéndola.

El debate de si la Prueba Cruzada Virtual puede reemplazar a la Real, consideramos que el riesgo es mayor en pacientes sensibilizados que en no sensibilizados y las consecuencias de error son potencialmente mayores por resultados falsos negativos que por falsos positivos. La predicción basada en la prueba cruzada virtual está limitada por la cantidad de antígeno HLA presente en las microesferas, que puede no ser representativa de la cantidad encontrada en células y que es necesario incorporar todos los alelos del Sistema HLA para efectuar con exactitud un estudio de Prueba Cruzada Virtual.

CONCLUSIÓN

1. Existe una mayor proporción de receptores y donantes fallecidos del sexo masculino. Los donantes fueron más en el grupo de edad de 13 a 30 años.

2. El grado de compatibilidad HLA de los potenciales receptores tuvo una distribución desigual, pero con mayor compatibilidad en el quinto grado (132 receptores = 24.4%) y en el sexto grado (105 receptores = 17.8%) para un total de 237 receptores (51.6%).

3. Del total de 589 posibles receptores estudiados, 357 (60.6%) tuvieron tamizaje HLA positivo. En todos fue posible identificar el antígeno HLA sensibilizante.

4. Al efectuar la prueba cruzada real a los 459 posibles receptores preseleccionados con Tamizaje positivo o negativo pero con prueba Cruzada Virtual Negativa, un total de 99 dieron Prueba Cruzada Real Positiva, los cuales no fueron seleccionados para ser trasplantados.

5. Existe en la lista de espera una mayor población de pacientes con Tamizaje positivo y Prueba cruzada virtual negativa que pacientes con Tamizaje positivo y prueba cruzada virtual positiva, debido a que sólo se conoce la tipificación HLA-A, -B, -DR del donante y receptor, ya que no está normatizada la tipificación de locus HLA-C, DQB, y DPB.

6. La aplicación de la Prueba Cruzada Virtual como selección previa permite una mayor proporción de pacientes con prueba cruzada real negativa en la fase final de selección.

7. El Programa Selector del Laboratorio garantiza que los posibles receptores de la lista de espera y los receptores finalmente seleccionados posean la mayor compatibilidad HLA-A, -B, -DR.

REFERENCIAS

- [1] Lefaucheur C., Suberbielle-Boissel C., Hill GS. et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8:324
- [2] Gebel HM, Moussa O, Eckels DD., et al. Donor-reactive HLA antibodies in renal allograft recipients: considerations, complications and conundrums. *Hum Immunol* 2009;70:636.
- [3] Zachary A., Sholander J., Houpp J., Leffell M. Using real data for virtual crossmatch. *Hum Immunol* 70 (2009) 574-579
- [4] Terasaki PI., McClelland ID. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998.
- [5] Zachary AA, Klingman L., Torne N. et al. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplant Proc.* 1983; 15:1939.
- [6] Nelken D, Cohen I, Furcaig I. A method to increase the sensitivity of the lymphocyte micro cytotoxicity test. *Transplantation* 1970; 10:346.
- [7] Zachary AA, Ratner LE, Graziani JA, et al. Characterization of HLA Class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigens target: II. Clinical relevance. *Hum. Immunol* 1999; 60: 1293
- [8] Dunn TEB, Noreen H, Gillingham K, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 2132.
- [9] Bodmer WF. The HLA System: introduction. *Br. Med. Bull.* 1978; 34(3): 213-216.
- [10] Klein J., Sato A. The HLA System. *N. Eng. J. Med* 2000; 343:702
- [11] Gibney EM, Cagle LR, Freed B, et al. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephron Dial Transplant* 2006; 21:2625.
- [12] Eng HS, Bennett JG, Tsiopelas E, et al. Anti-HLA donor-specific antibodies detected in positive B-cell crossmatches by Luminex predict late graft loss. *Am J Transplant* 2008; 8: 2335
- [13] Aubert V, Venetz JP, Pantaleo G, et al. Low levels of human leukocyte antigen donor-specific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Human Immunol* 2009; 70: 580.
- [14] McKenna RM., Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. 2000; 69: 319.
- [15] Piazza A., Ozella G., Poggi E., Caputo D., Manfreda a., Adorno AD. Virtual Crossmatch in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2014; 46(7) 2195-2198.
- [16] Lee PC., Ozawa M.. Reappraisal of HLA antibody analysis and crossmatching in kidney transplantation. *Clin. Transpl.* 2007: 219-26.

-
- [17] Sociedad Panameña de Nefrología. Criterios para selección de receptores de riñones. Playa Bonita 2008. Panamá.
- [18] Gebel HM, Lebeck LK. Crossmatch procedures used in organ transplantation. Clin Lab Med. 1991; 11 (3) 603-20.
- [19] Opelz G., Zeevi A., et al. Consensus guidelines on the Testing and Clinical Management issues associated with HLA and non HLA antibodies in Transplantation. Transplantation 2013; 95(1), 19-47