

Anticuerpos anti- HLA: métodos diagnósticos y subtipos



Marcos López Hoyos
Inmunología

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL
Santander

30 noviembre 2018



@inmunoHUMV

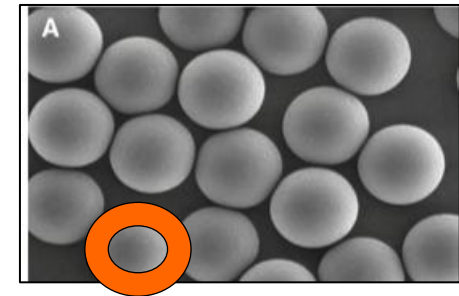


Estudio de anticuerpos anti-HLA

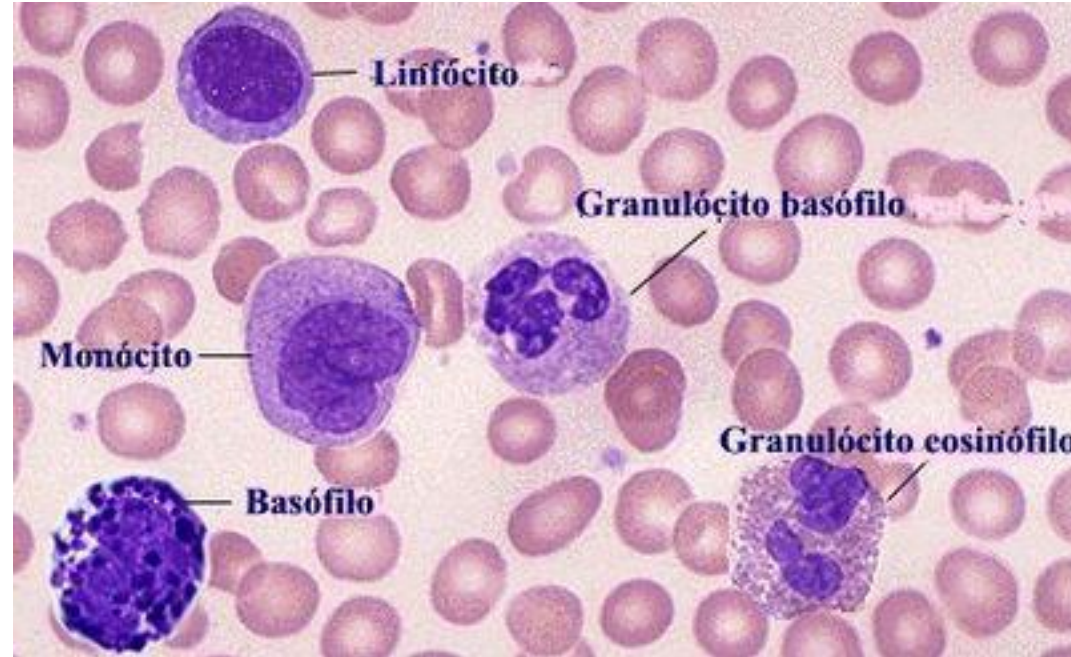
Test	Ac anti-HLA	Sensibilidad	
Microlinfocitotoxicidad	Fijadores de C´	IgG (G3 > G1), IgM	
ELISA	Fijadores y NO fijadores de C´	IgG (G1, G2, G3, G4)	
Luminex	Fijadores y NO fijadores de C´	IgG (G1, G2, G3, G4)	C1q

Luminex: microesferas

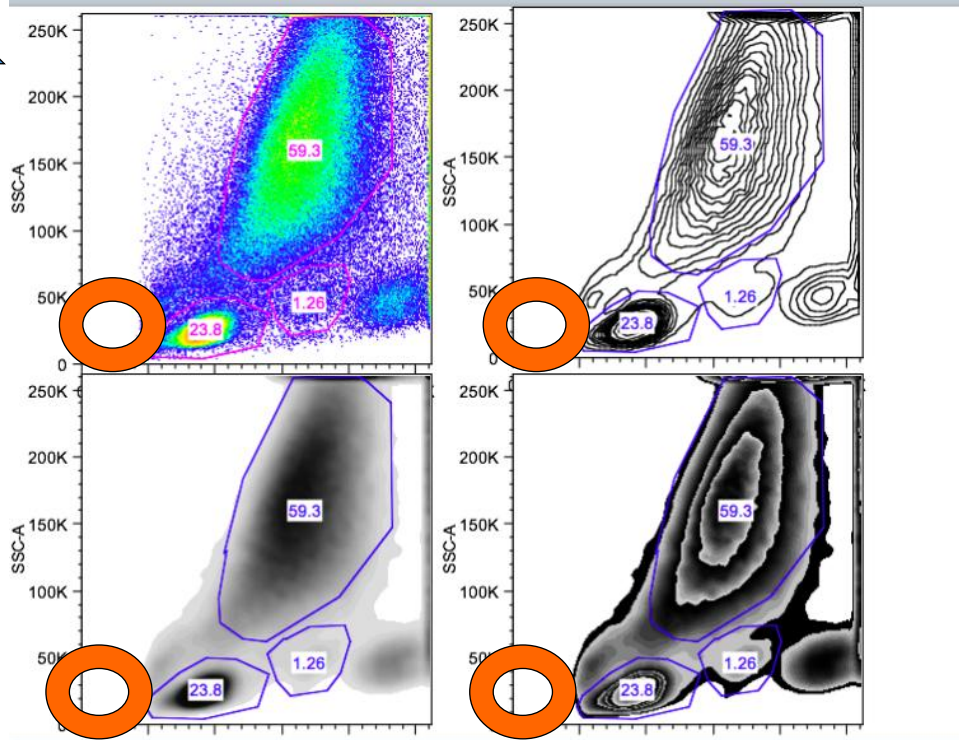
Microesferas → tamaño 5,6um



Eritrocitos (5-7,5um)
Linfocitos (7-15um)



Monocitos 15-30um
Granulocitos 15-20um



Complejidad

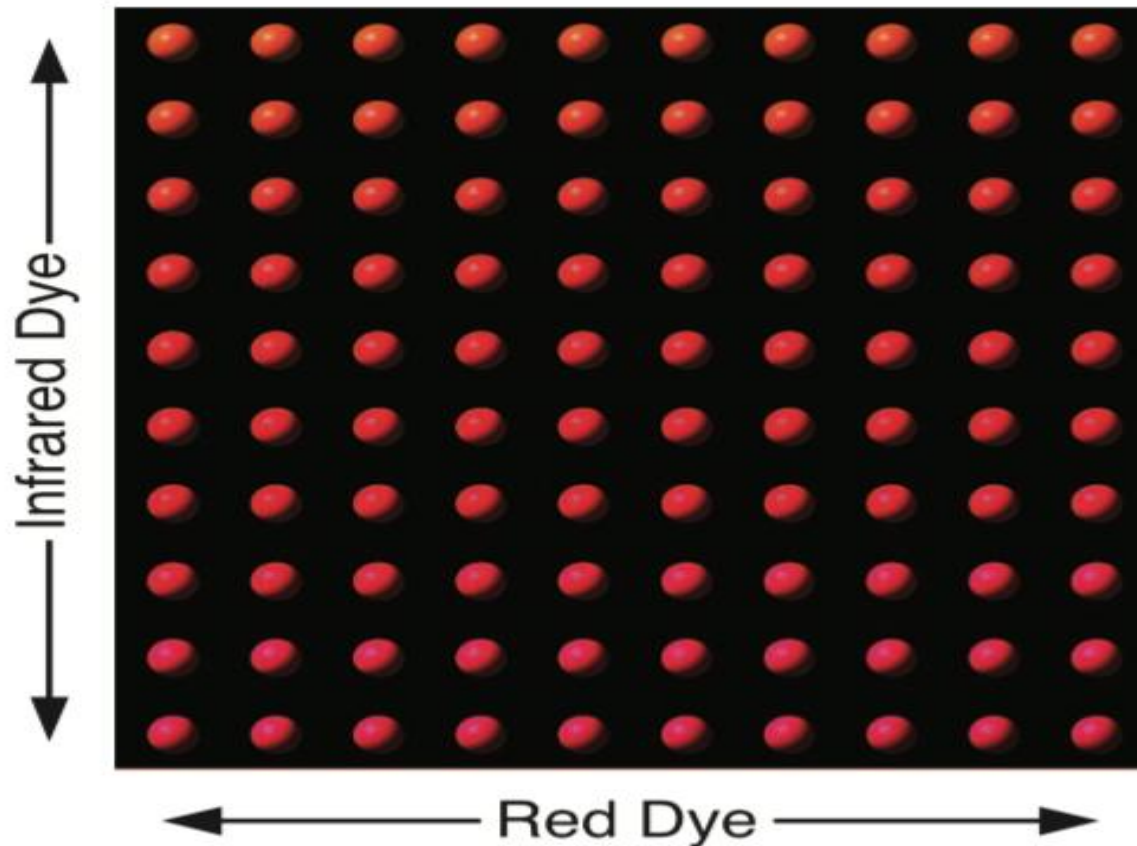
Tamaño

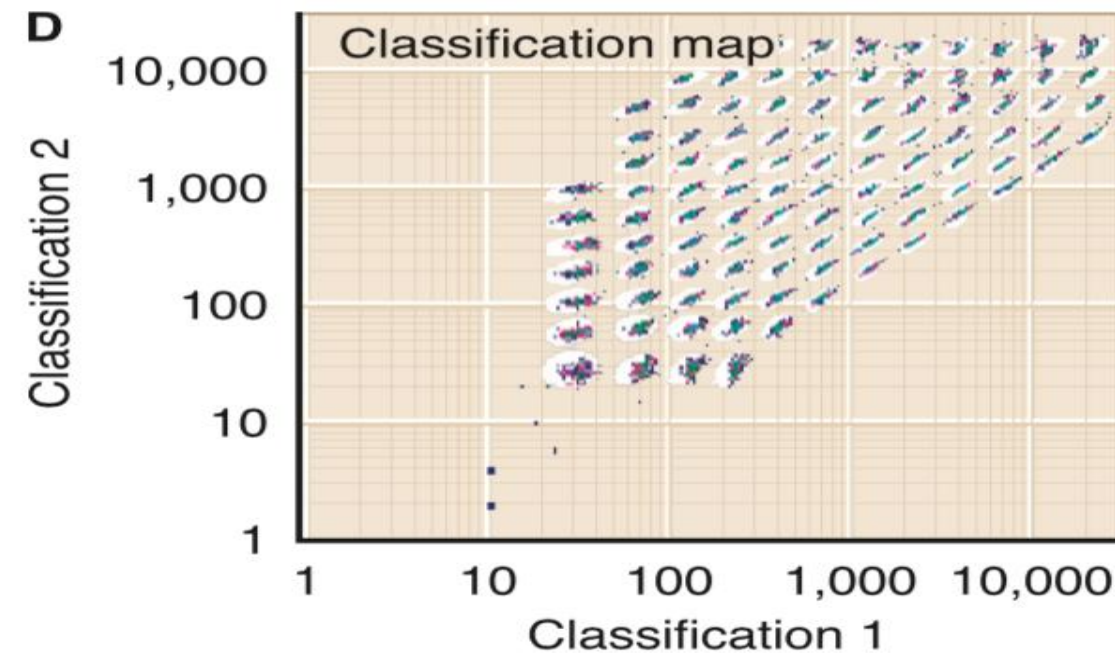
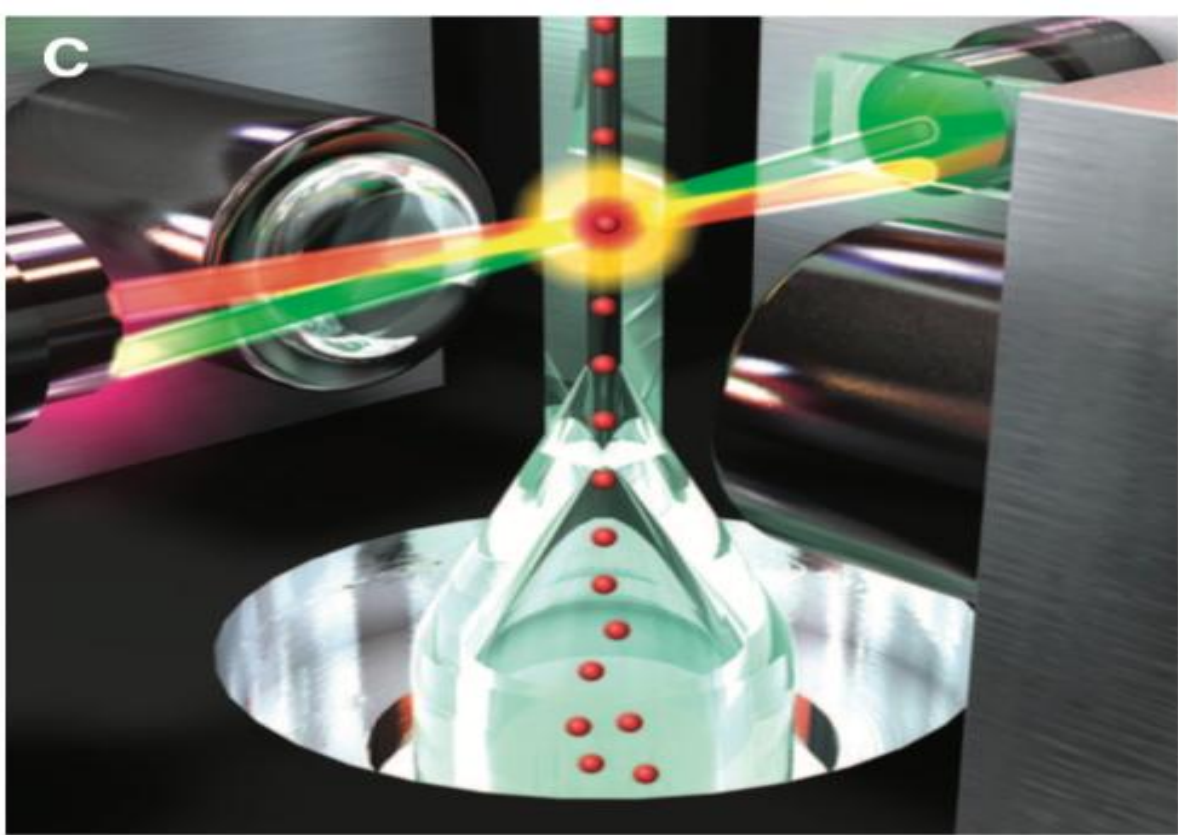
Con un tamaño exacto, se pueden seleccionar / discriminar fácilmente por CF

Luminex: microesferas

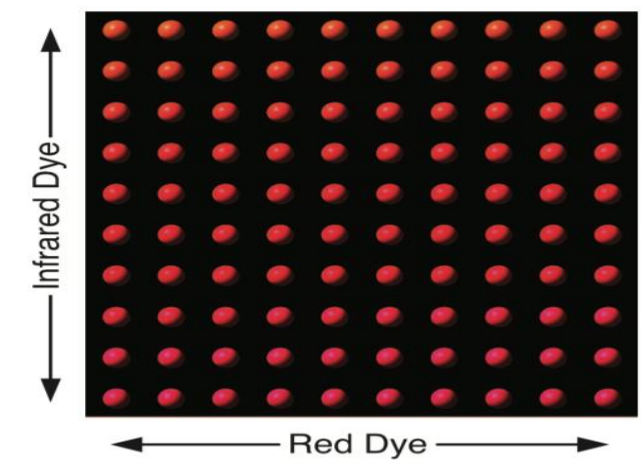
Microesferas

- De poliestireno
- Teñidas con una mezcla de colorante rojo e infrarrojo





Esta combinación de colores permite su identificación cuando la microesfera es interceptada por el láser rojo



Luminex: microesferas

Soporte de Poliestireno que permite “incrustar”:

Sondas de ADN

Anticuerpos frente a...

Proteína / Antígeno

(...)

Luminex: microesferas

Soporte de Poliestireno que permite “incrustar”:

Sondas de ADN

**Estudio de polimorfismos (Tipaje
HLA PCR-SSOP)**

Anticuerpos frente a...

**Interleucinas, quimiocinas, factores
solubles (multiplexing)**

Proteína / Antígeno

Anticuerpos

Luminex: microesferas

Soporte de Poliestireno que permite “incrustar”:

Moléculas
Fluorescentes

Sondas de ADN

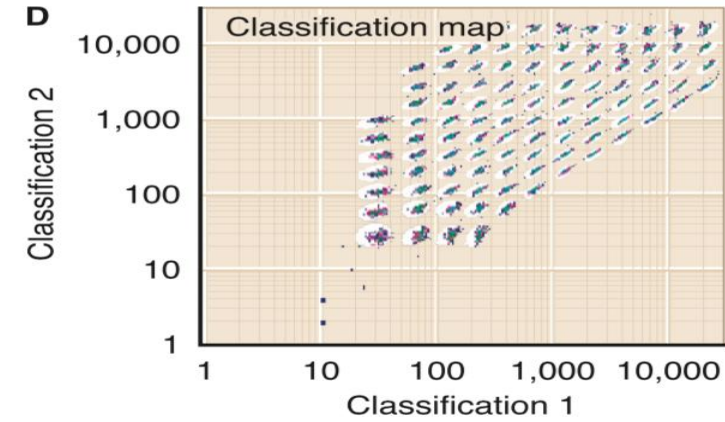
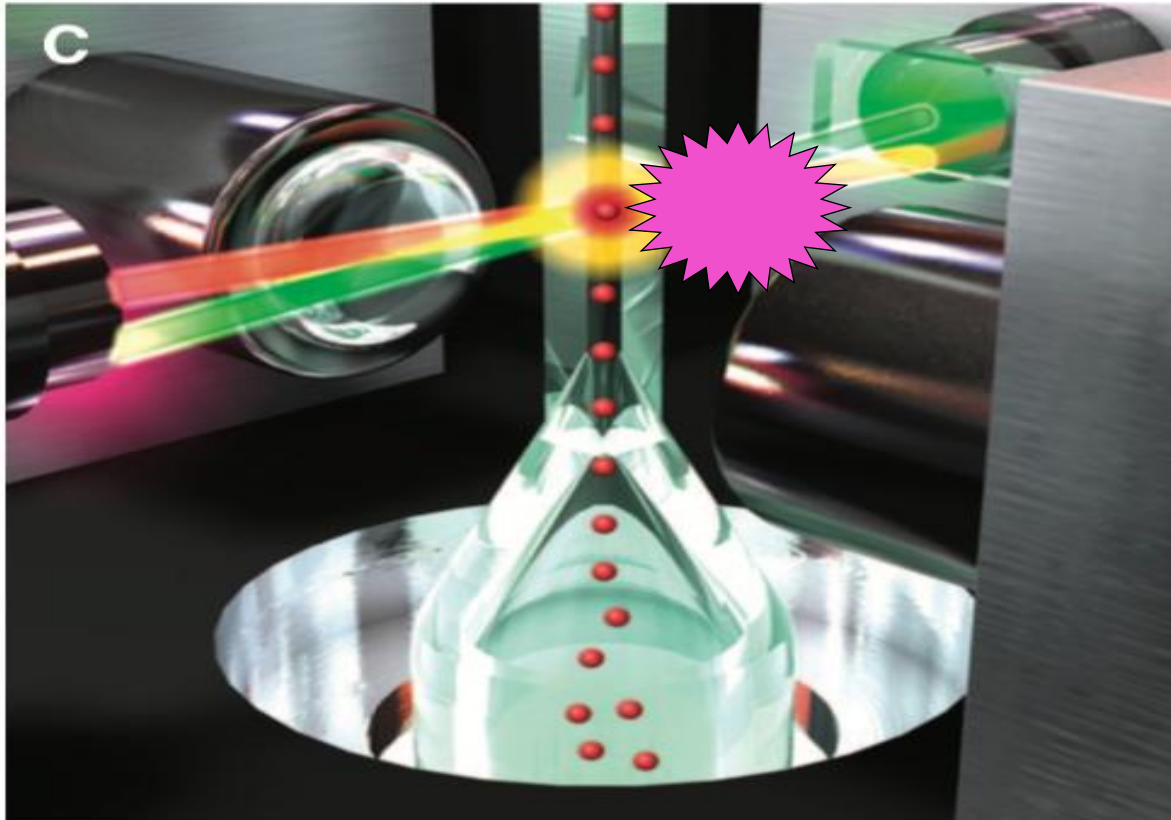
Estudio de polimorfismos (Tipaje
HLA)

Anticuerpos frente a...

Interleucinas, quimiocinas, factores
solubles,

Proteína / Antígeno

Anticuerpos



Fluorocromo se excita y emite una cantidad de fluorescencia

Valor semicuantitativo

MFI: Intensidad media de fluorescencia

Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de la determinación de anticuerpos anti-HLA en el trasplante

- **Pacientes en lista de espera** (*alorreactividad del receptor*)
- **Alarma de trasplante: *Crossmatch Virtual*** (*estratificación del riesgo*)
- **Monitorización del paciente trasplantado** (*respuesta humoral anti-donante*)

PRE LISTA

ENTRADA EN LISTA

MONITORIZACIÓN POST TRASPLANTE

Escrutinio
Ac HLA
en 2
sueros

NO
SENSIBILIZADO

SEMESTRAL

SENSIBILIZADO

TRIMESTRAL

15
d

1
m

3
m

6
m

9
m

12
m

Annual

PC virtual
PC (CDC ± FCM)

Propuesta HUMV

Adaptado de Tait BD 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

**PASADO
(CDC)**

Negativo

Positivo


Señal


**PRESENTE
(MFI)**

Trasplante

No trasplante

**POST-
TRASPLANTE**

Riesgo 

Relevancia clínica? 

Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de la determinación de anticuerpos anti-HLA en el trasplante

- **Pacientes en lista de espera** (*alorreactividad del receptor*)
- **Alarma de trasplante: *Crossmatch Virtual*** (*estratificación del riesgo*)
- **Monitorización del paciente trasplantado** (*respuesta humoral anti-donante*)

Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante

Pacientes en lista de espera

Posible encuentro previo con HLA

- Embarazos
- Retransplantados
- Enfermedad renal (varias transfusiones)

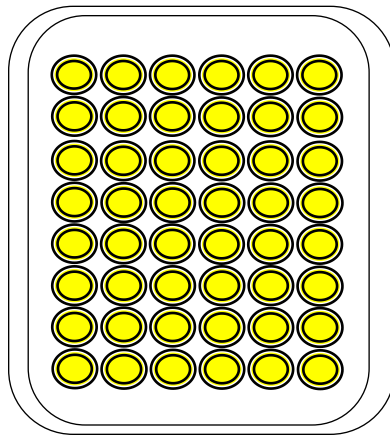
- Clasifica a los pacientes
 - Bajo riesgo (sin sensibilización previa = sin anticuerpos anti-HLA)
 - Alto riesgo (con sensibilización previa = con anti-HLA)

Hace unos años se realizaba calculando el PRA:
Panel Reactivo de Anticuerpos

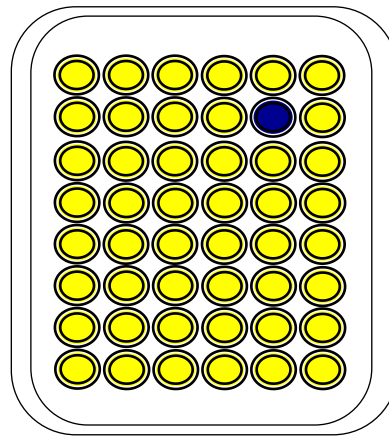
Anticuerpos anti-HLA (CDC)

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante -Panel Reactivo de Anticuerpos-

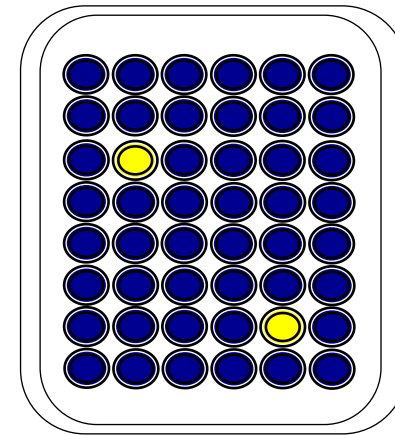
Panel reactivo de anticuerpos (PRA) → Estimación de lo fácil/difícil que lo va a tener un candidato a trasplante para encontrar un donante



PRA = **0%**



PRA = $1/48 =$ **2%**



PRA = $46/48 =$ **96%**

Anticuerpos anti-HLA (Luminex)

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante -Panel Reactivo de Anticuerpos Virtual-

Eurotransplant

<http://www.etr.org/Virtual%20PRA/Default.aspx>

6870 donantes europeos

Austria

Belgica

Alemania

Holanda

OPN

<https://optn.transplant.hrsa.gov/resources/all-location-calculators/cpra-calculator/>

14000 donantes USA

PATHI*

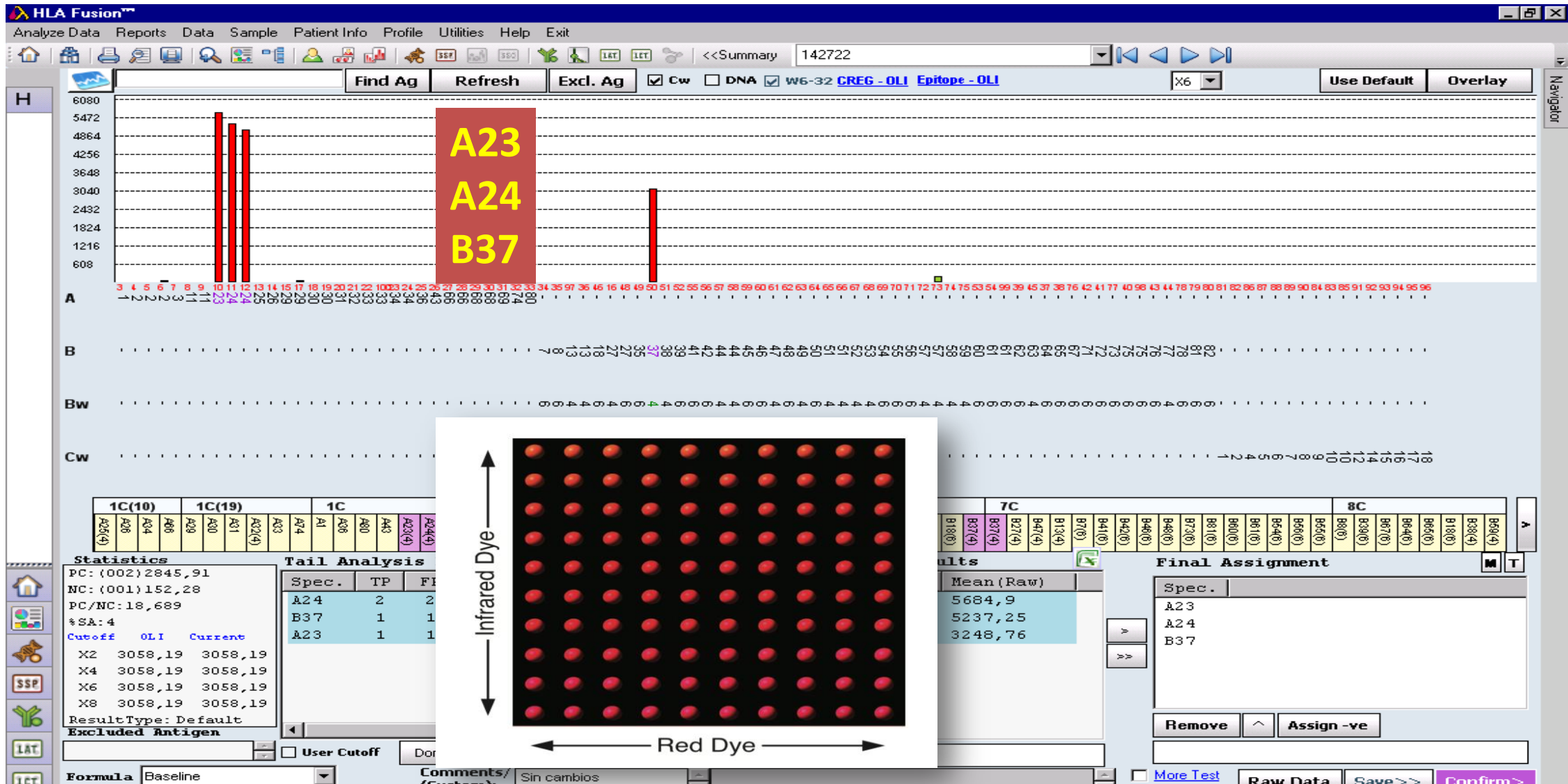
250 donantes

Canadian cPRA

<https://ctr2.transplantregistry.ca/otd-cpra-client/ctr2.jsp>

1700 donantes

Resultados de anti-HLA por Luminex



Population	<input type="radio"/> Austria <input type="radio"/> Belgium <input type="radio"/> Germany <input type="radio"/> The Netherlands <input checked="" type="radio"/> All ET
Antibodies/Specificities	Example: A1,A2, B7, A23, A24, B37
Calculate % PRA	
Examples	
Clear	

Population	<input type="radio"/> Austria <input type="radio"/> Belgium <input type="radio"/> Germany <input type="radio"/> The Netherlands <input checked="" type="radio"/> All ET
Antibodies/Specificities	Example: A1,A2, B7, A23, A24, B37
Calculate % PRA	24,33% (973 out of 4000)
Examples	A2 A9 A24 B15 B62 B18 BW6 CW3 CW9 CW5 DR5 DR11 DR6 DR13 DR52 DQ1 DQ6 DQ3 DQ7 A3 A9 A24 B22 B56 B27 BW4 BW6 CW1 CW2 DR6 DR13 DR8 DR52 DQ3 DQ7 DQ4 A2 A9 A23 B7 B12 B44 BW4 BW6 CW4 CW7 DR2 DR15 DR7 DR53 DQ1 DQ6 DQ2 A2 A9 A24 B18 B40 B60 BW6 CW3 CW10 CW7 DR2 DR15 DQ1 DQ6 A2 A11 B13 B37 BW4 CW6 DR6 DR13 DR7 DR52 DR53 DQ1 DQ2 A1 A9 A24 B35 BW6 CW4 DR5 DR11 DR6 DR13 DR52 DQ1 DQ6 DQ3 DQ7 A9 A24 A11 B5 B51 B7 BW4 BW6 CW7 DR1 DR2 DR15 DQ1 DQ5 DQ6 A9 A24 A11 B7 BW6 CW7 DR2 DR15 DR4 DR53 DQ1 DQ6 DQ3 DQ8 A2 A9 A23 B7 B21 B49 BW4 BW6 CW7 DR2 DR15 DR5 DR11 DR52 DQ1 DQ6 DQ3 DQ7 A9 A24 A19 A33 B7 B14 BW6 CW7 CW8 DR1 DR2 DR15 DQ1 DQ5 DQ6 A1 A9 A24 B7 B15 B63 BW4 BW6 CW7 DR2 DR16 DR5 DR12 DR52 DQ1 DQ5 DQ3 DQ7 A9 A24 A10 A26 B8 B12 B44 BW4 BW6 CW7 DR6 DR13 DR52 DQ1 DQ6 A1 A9 A24 B8 B13 BW4 BW6 CW6 CW7 DR3 DR7 DR52 DR53 DQ2 A3 A9 A23 B7 B41 BW6 CW7 DR3 DR5 DR11 DR52 DQ2 DQ3 DQ7 A1 A9 A24 B8 B35 BW6 DR3 DR6 DR14 DR52 DQ1 DQ5 DQ2
Clear	

El suero de este paciente reaccionará con el **24,3 %** de donantes

No reaccionará con el 75,6%

La calculadora de PRAv con el pool de donantes del PATHI tiene la misma capacidad que las calculadoras establecidas hasta la fecha

PRAv de 42 pacientes hipersensibilizados

TABLE 2 | Comparison of class I, class II, and total calculated panel reactive of antibody (cPRA) with different calculators.

cPRA, median (IQR)	PATHI	United Network for Organ Sharing	Eurotransplant	CTR	p Value
Class I	91 (38.2–99)	89 (37.2–99)	89.8 (38.3–98.6)	89.5 (38–99)	0.99
Class II	86.5 (55.7–98)	92.5 (60.5–98.2)	92.4 (61.4–98.5)	89 (60.5–98)	0.90
Total	99 (94–100)	99 (95–100)	99 (94.6–99.9)	99 (94.7–100)	0.96

IQR, interquartile range.

Kruskal–Wallis test was applied.

Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante

Pacientes en lista de espera

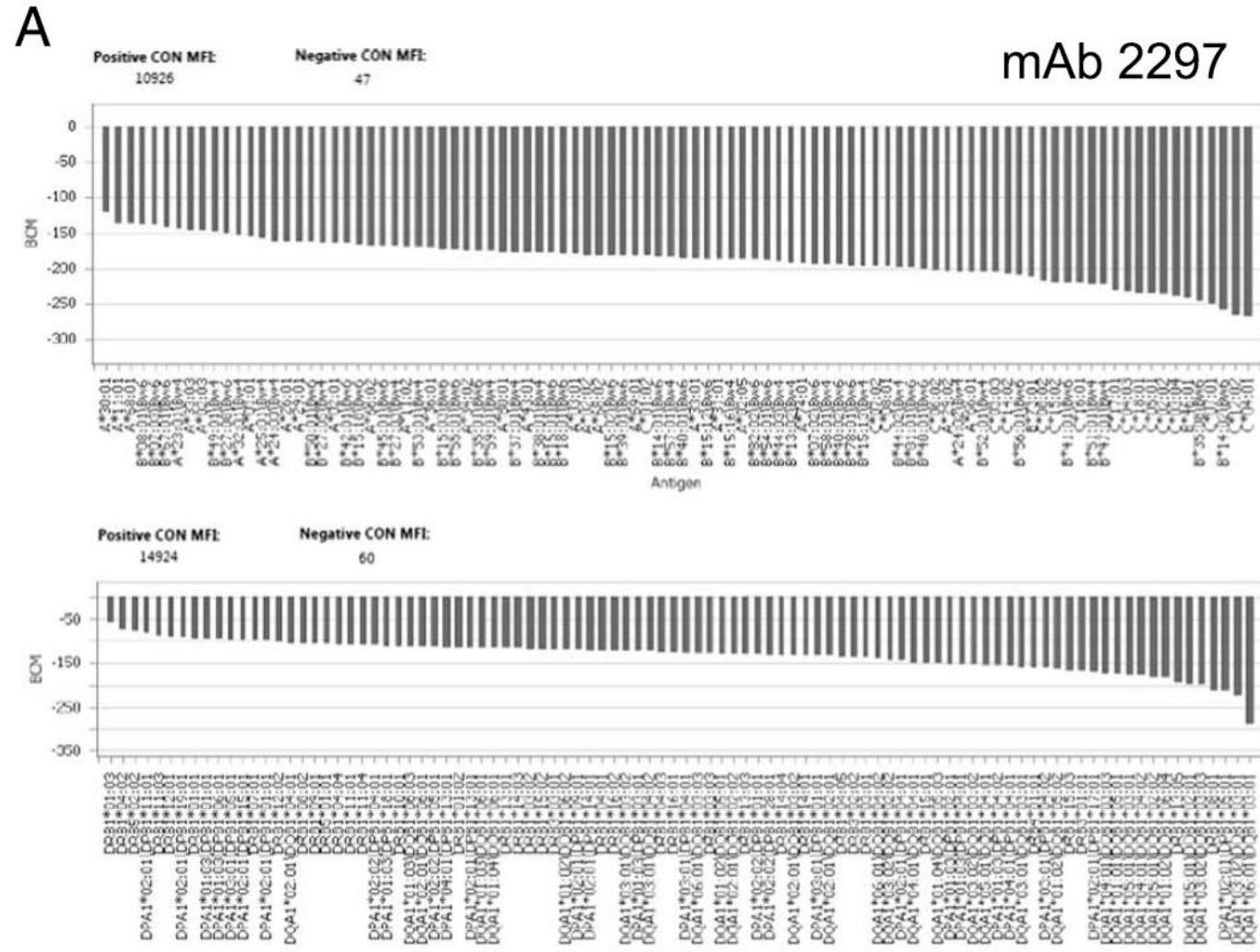
Posible encuentro previo con HLA

- Embarazos
- Retransplantados
- Enfermedad renal (varias transfusiones)
- **INMUNIDAD HETERÓLOGA (Acs de reacción cruzada HLA-microorganismos)**
- Clasifica a los pacientes
 - Bajo riesgo (sin sensibilización previa = sin anticuerpos anti-HLA)
 - Alto riesgo (con sensibilización previa = con anti-HLA)

Ausencia de reacción cruzada entre anticuerpos virales y anti-HLA

La producción de Acs anti-HLA post-infecciosa es por activación de células B memoria

51 AcMo virales
41 AcMo anti-HLA



Anticuerpos anti-HLA

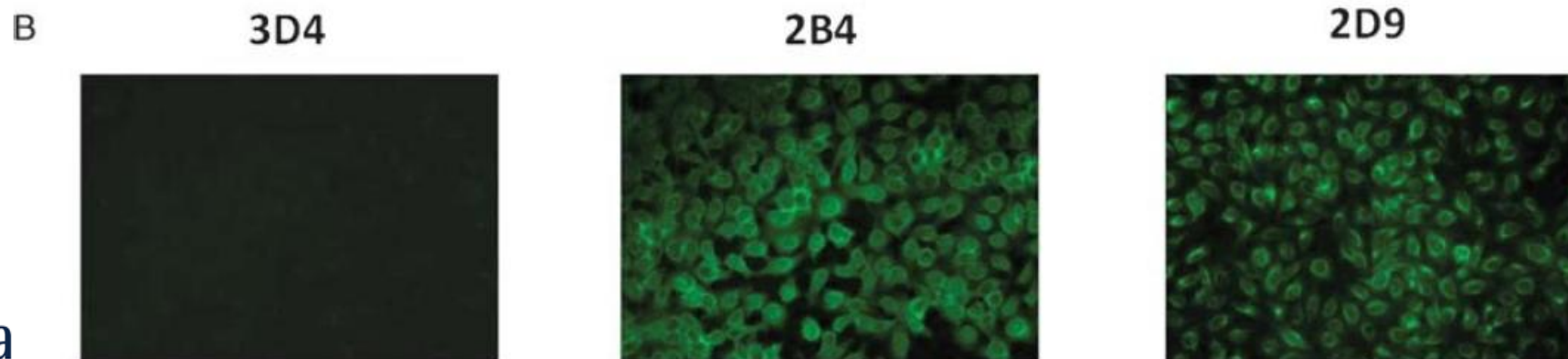
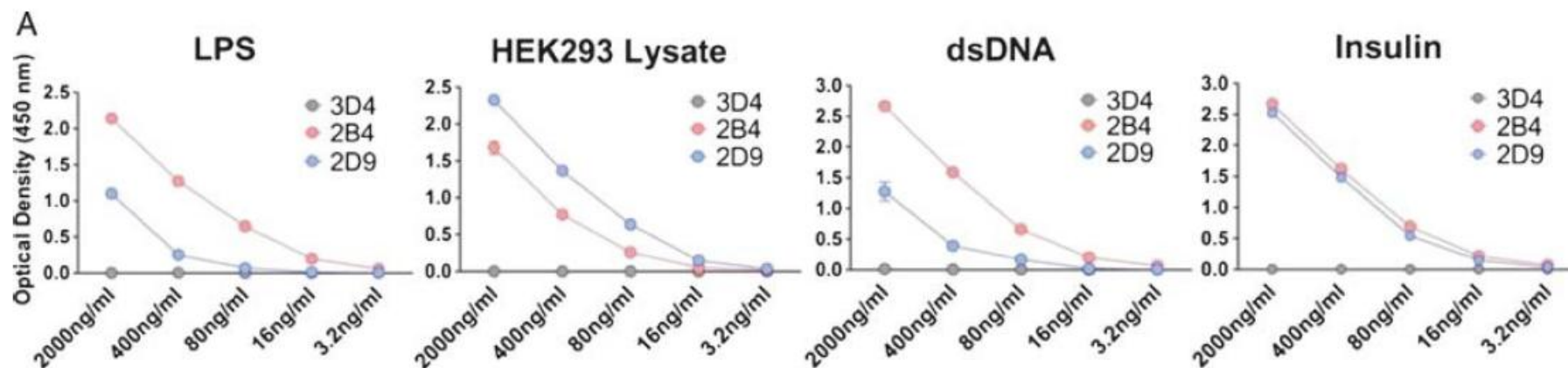
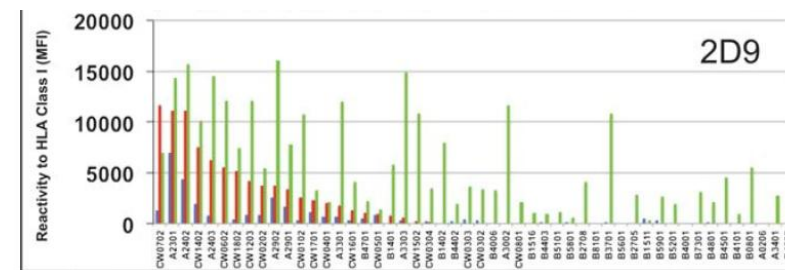
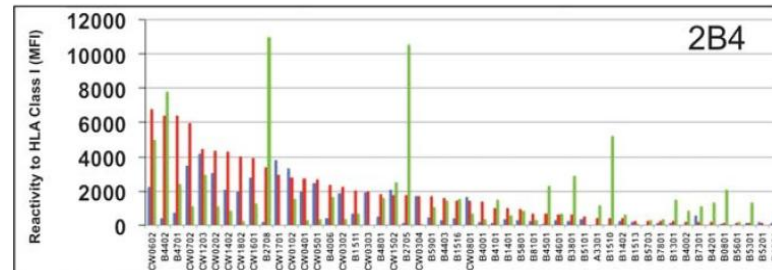
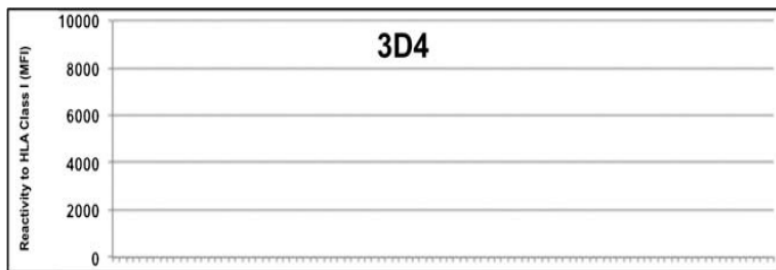
Utilidad de los Acs anti-HLA en el campo de trasplante

Pacientes en lista de espera

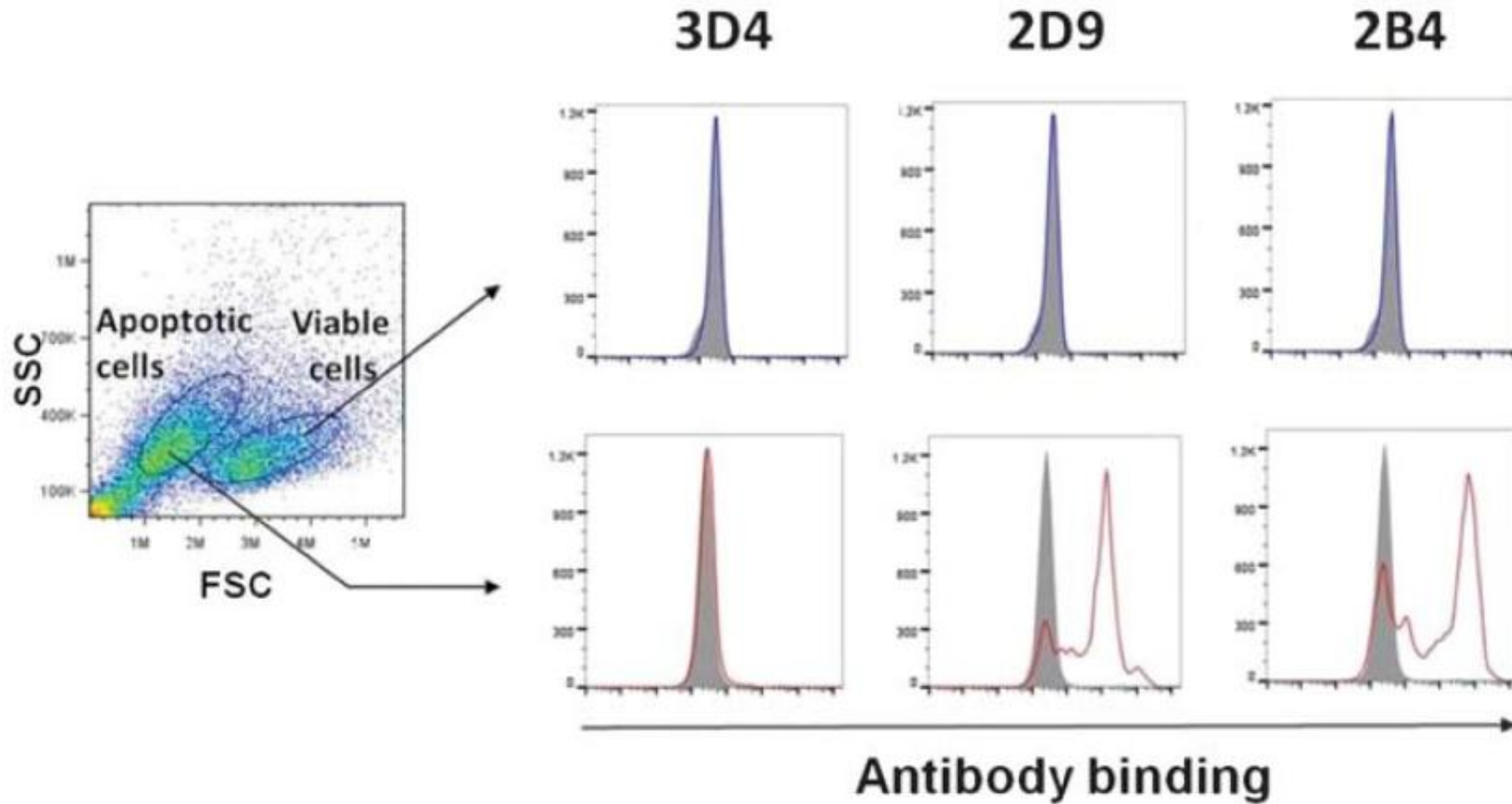
Posible encuentro previo con HLA

- Embarazos
- Retransplantados
- Enfermedad renal (varias transfusiones)
- INMUNIDAD HETERÓLOGA (Acs de reacción cruzada HLA-microorganismos)
- **Ac anti-HLA en pacientes en lista de espera sin eventos sensibilizantes???**
- Clasifica a los pacientes
 - Bajo riesgo (sin sensibilización previa = sin anticuerpos anti-HLA)
 - Alto riesgo (con sensibilización previa = con anti-HLA)

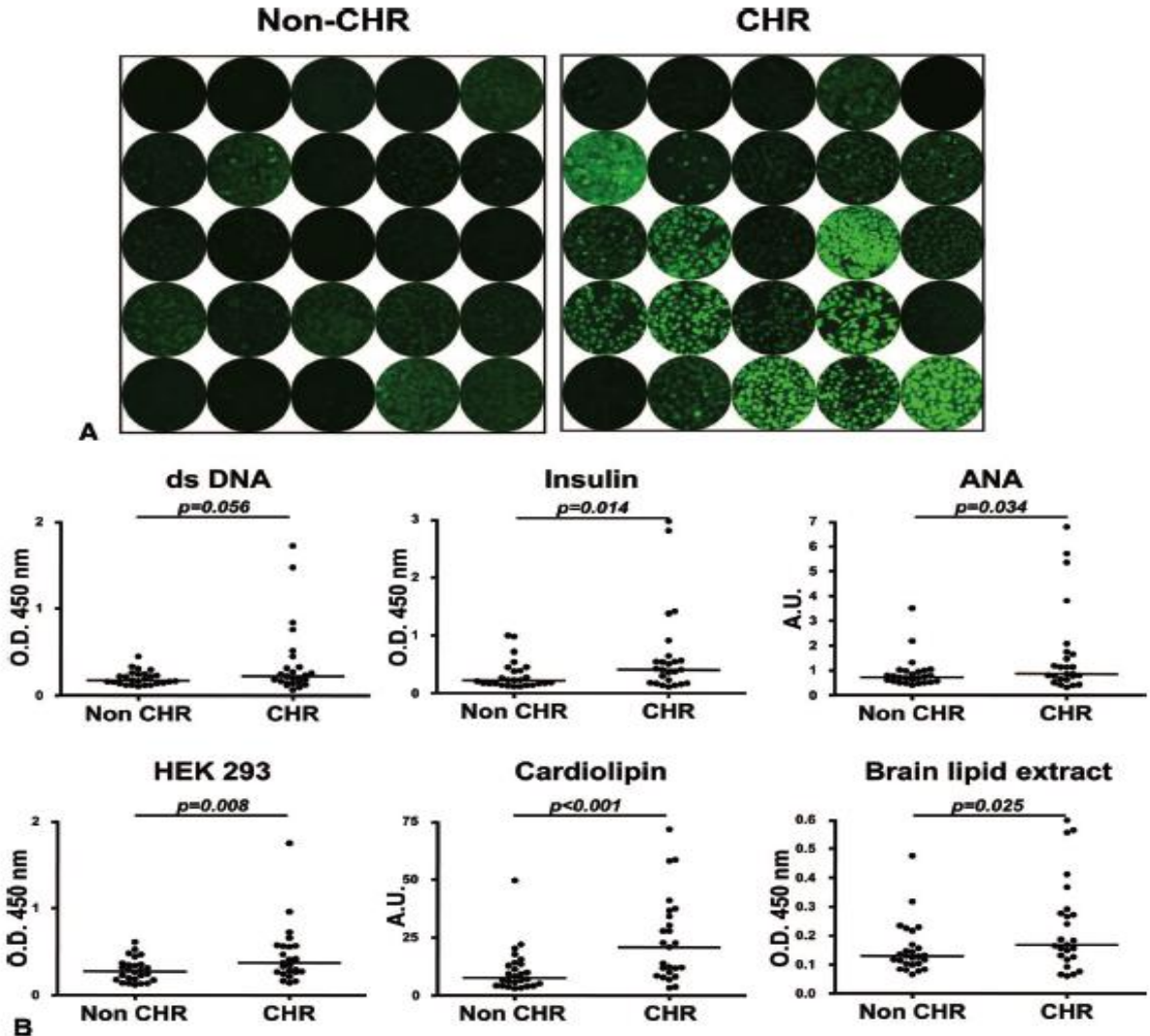
Los anticuerpos POLIRREACTIVOS contribuyen a la reactividad anti-HLA detectada con Luminex en pacientes en lista de espera



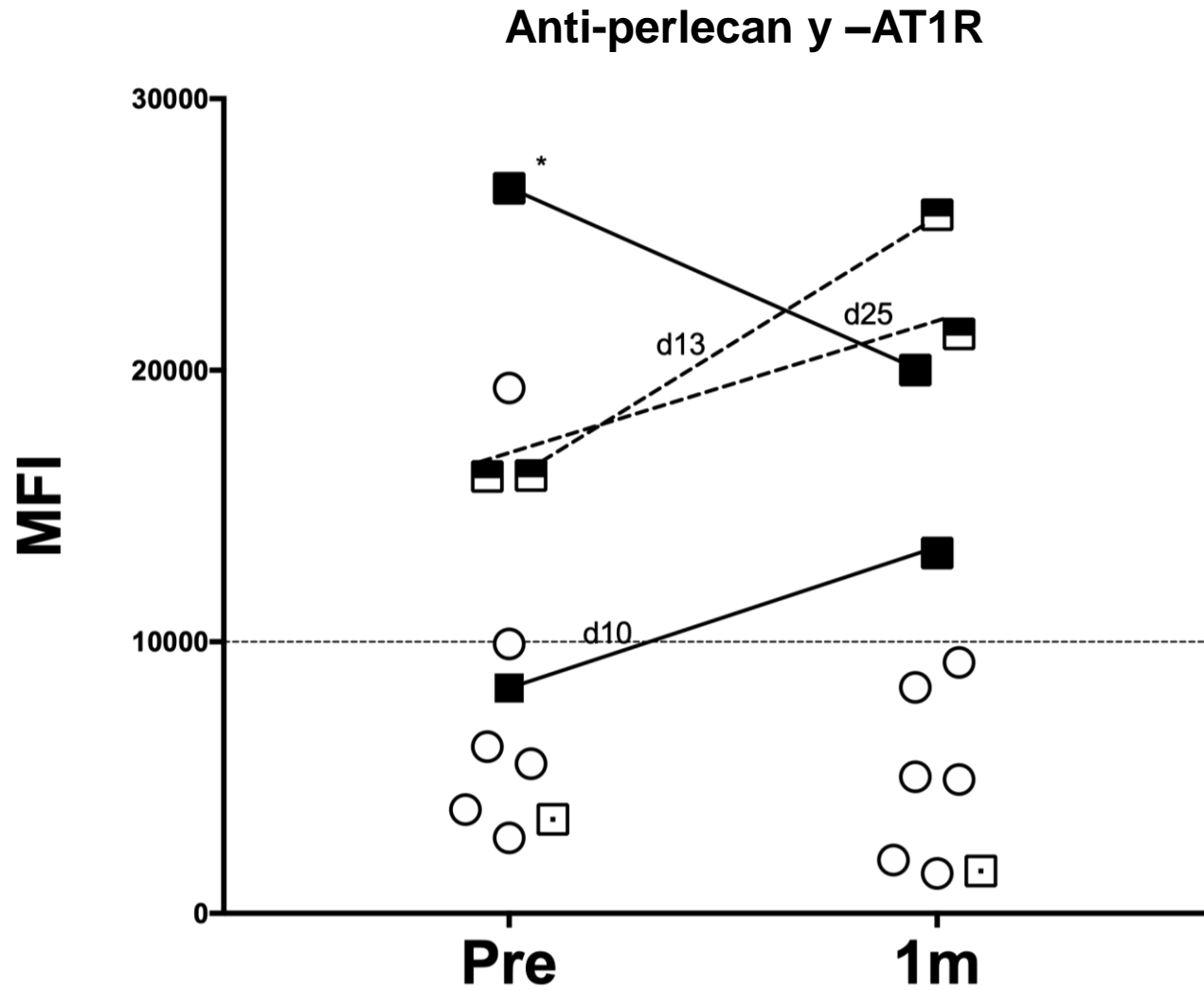
La polirreactividad de los Ac anti-HLA se explica por polirreactividad de la IgG frente a células apoptóticas



Un medio inflamatorio (ej., rechazo crónico) en el contexto de un ALOtrasplante puede inducir la producción de AUTOanticuerpos



La producción de autoanticuerpos en pacientes hipersensibilizados favorece el rechazo humoral independiente de aloanticuerpos anti-HLA



Implicaciones de los Acs polirreactivos en la interpretación de los resultados anti-HLA con Luminex

- Detección de Ac anti-HLA a pesar de no haber historia de episodios sensibilizantes.
- Desarrollo de NDSA después del trasplante.
- Diferencias de resultados entre métodos para detectar Ac anti-HLA (i.e., Luminex positivo vs CDC negativo).
- Presencia de Ac polirreactivos con altas MFI en Luminex: especificidades prohibidas en lista de espera.
- Resultados del trasplante renal a largo plazo: Ac anti-HLA (DSA) y anti-células apoptóticas (polirreactivos) efecto deletéreo

Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante

-Prueba Cruzada virtual-

Prueba Cruzada Virtual

-Perfil de anticuerpos anti-HLA de los candidatos

-Tipaje del donante

Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante
-Prueba Cruzada virtual-

**Alerta
de Trasplante**



Tipaje del Donante

A1,2

B7,13

DR1,4

Ojo ahora también tipamos locus
DQ...

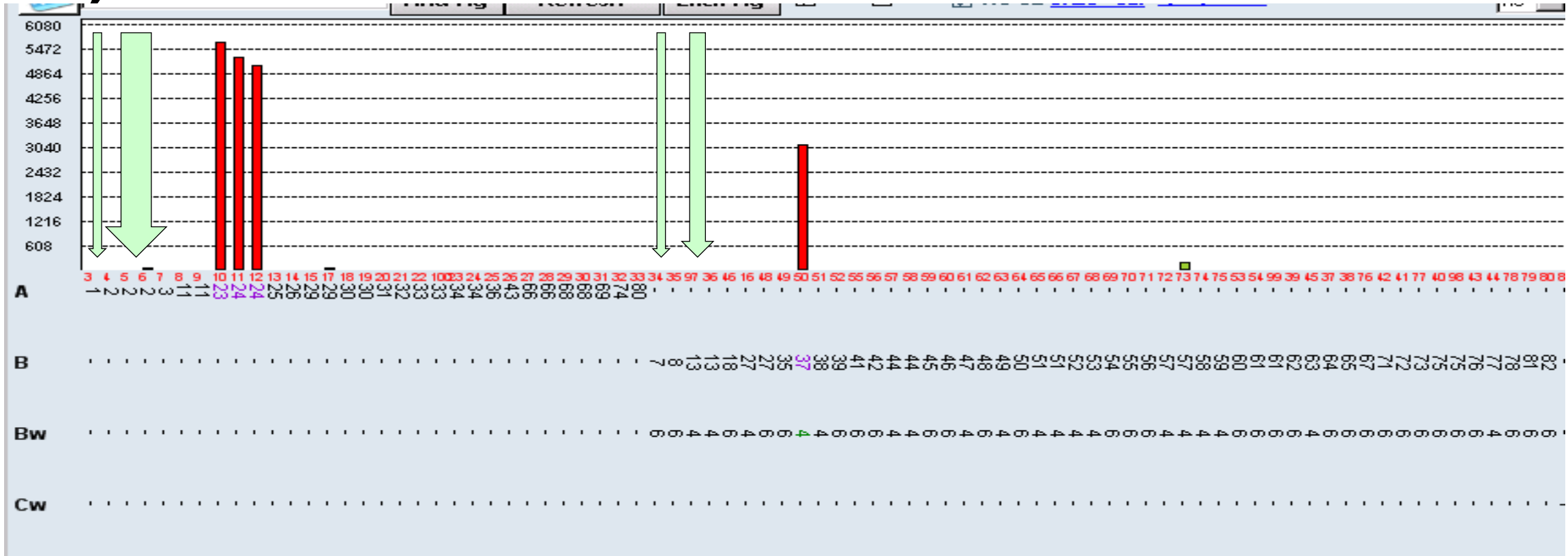
Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de los anticuerpos anti-HLA en el campo de trasplante

-Prueba Cruzada virtual-

A1,2

B7,13



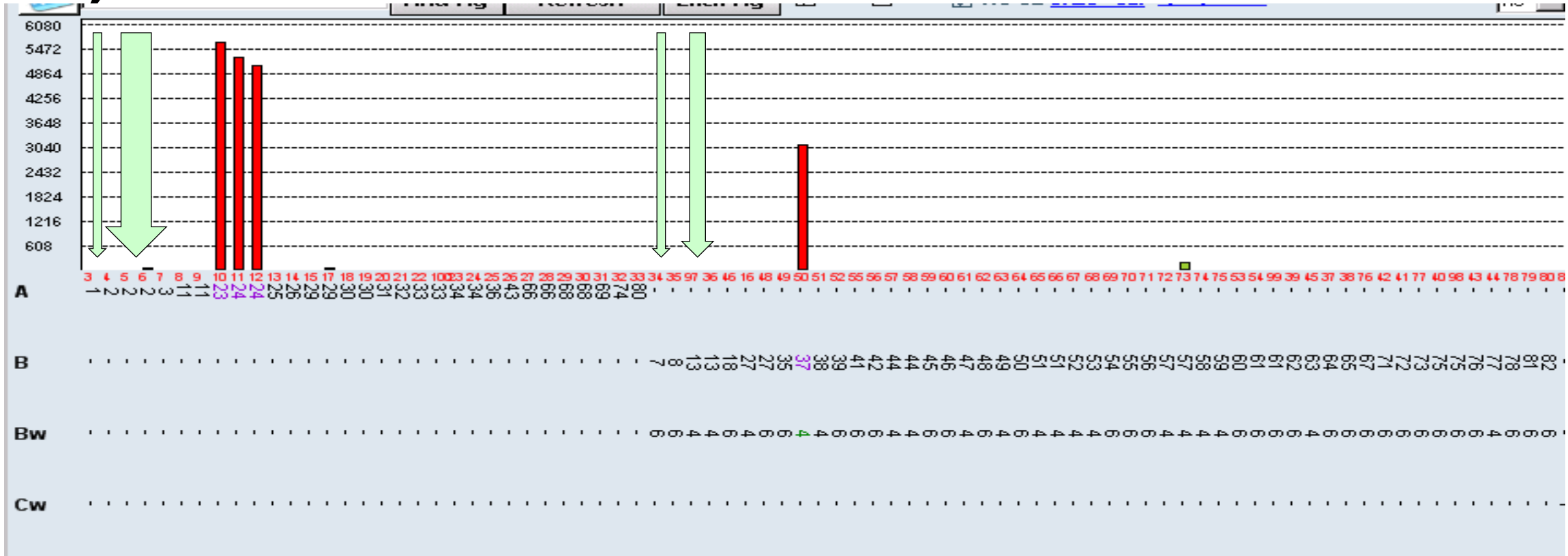
Anticuerpos anti-HLA

Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante

-Prueba Cruzada virtual-

A1,2

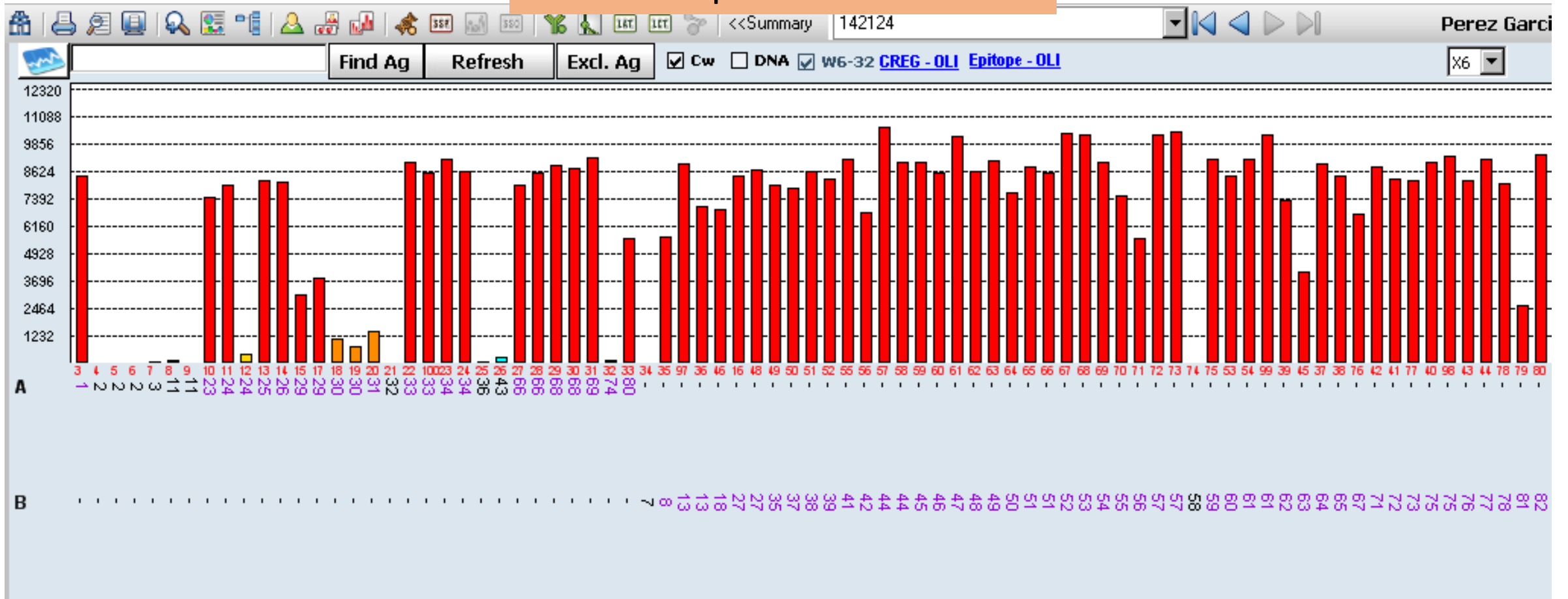
B7,13



Anticuerpos anti-HLA

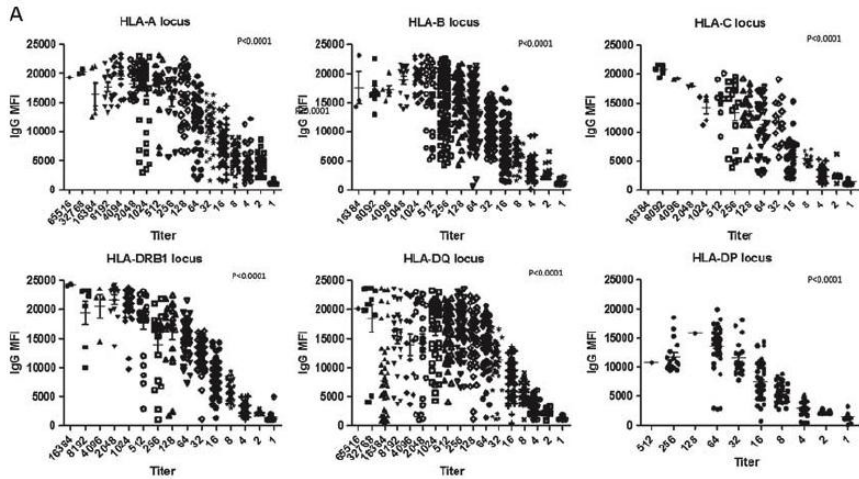
Utilidad de los anticuerpo anti-HLA en el campo de trasplante -Prueba Cruzada virtual-

Paciente Hipersensibilizado

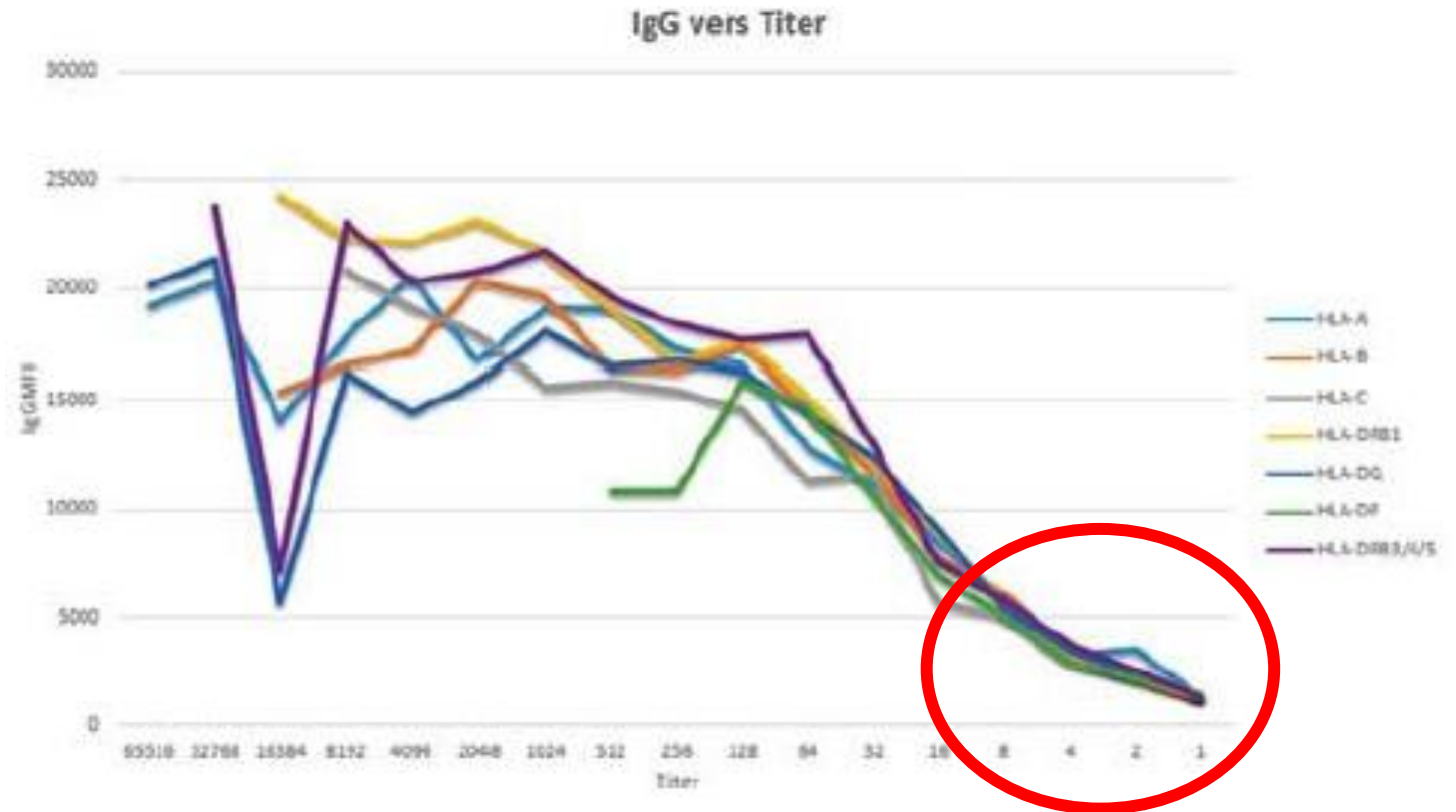


Limitaciones de detección Ac anti-HLA mediante Lx

CUANTIFICACIÓN

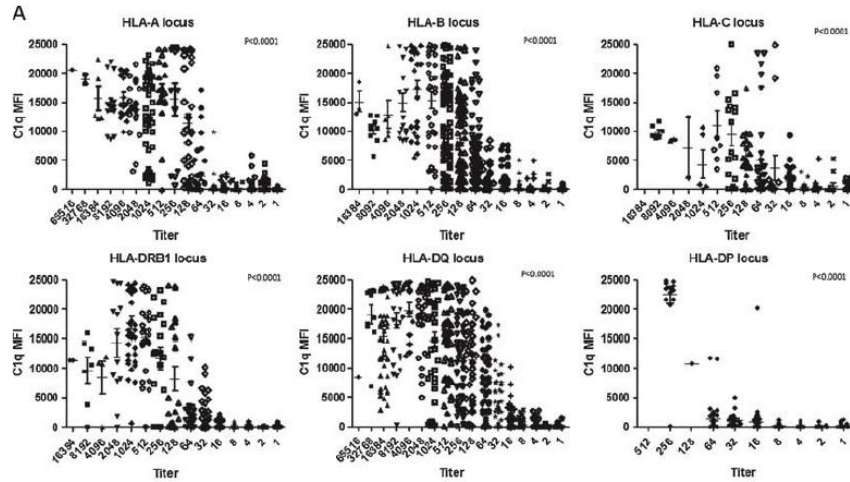


Las MFI < 10.000 (semicuantitativo) se relacionan bien con los títulos o diluciones (cuantitativo)



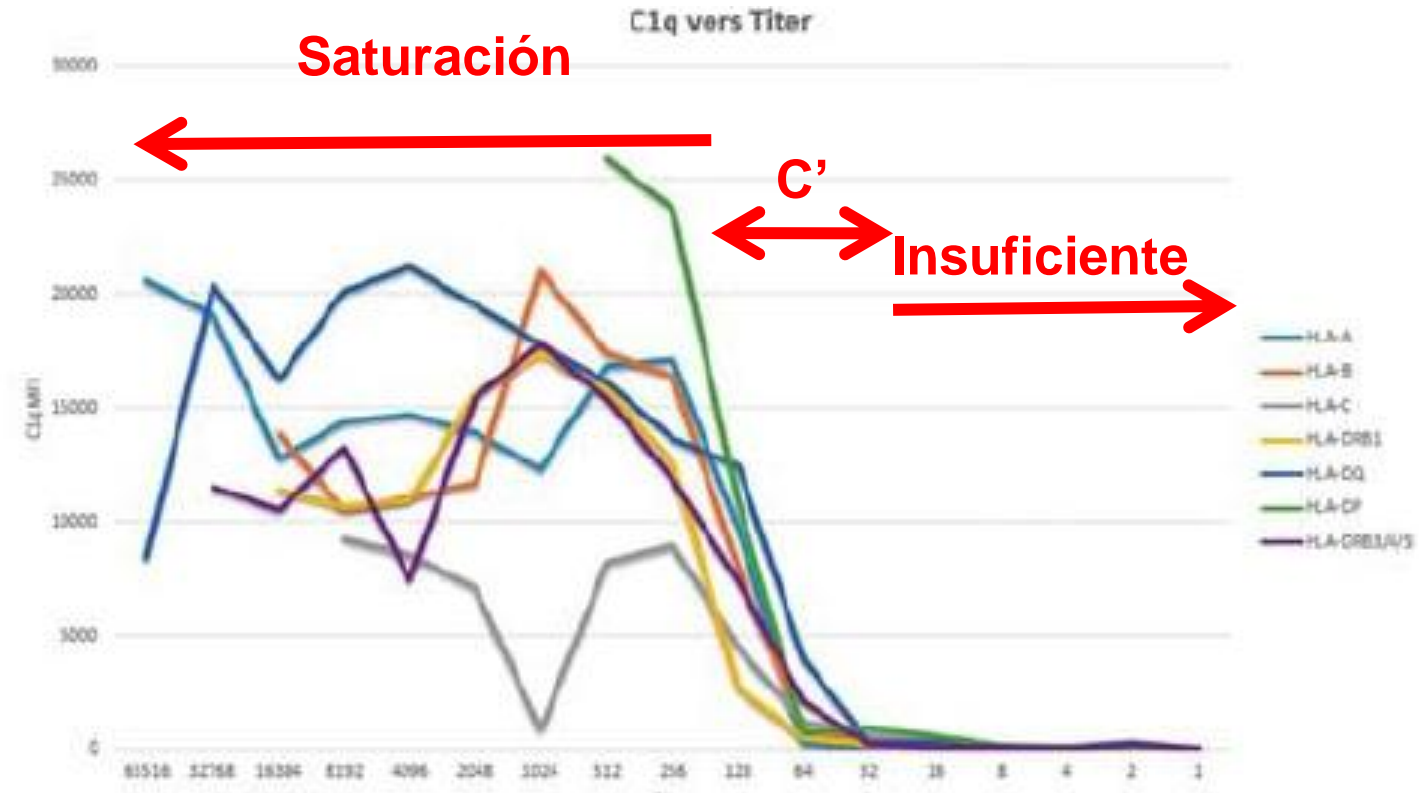
Limitaciones de detección Ac anti-HLA mediante Lx

COMPLEMENTO

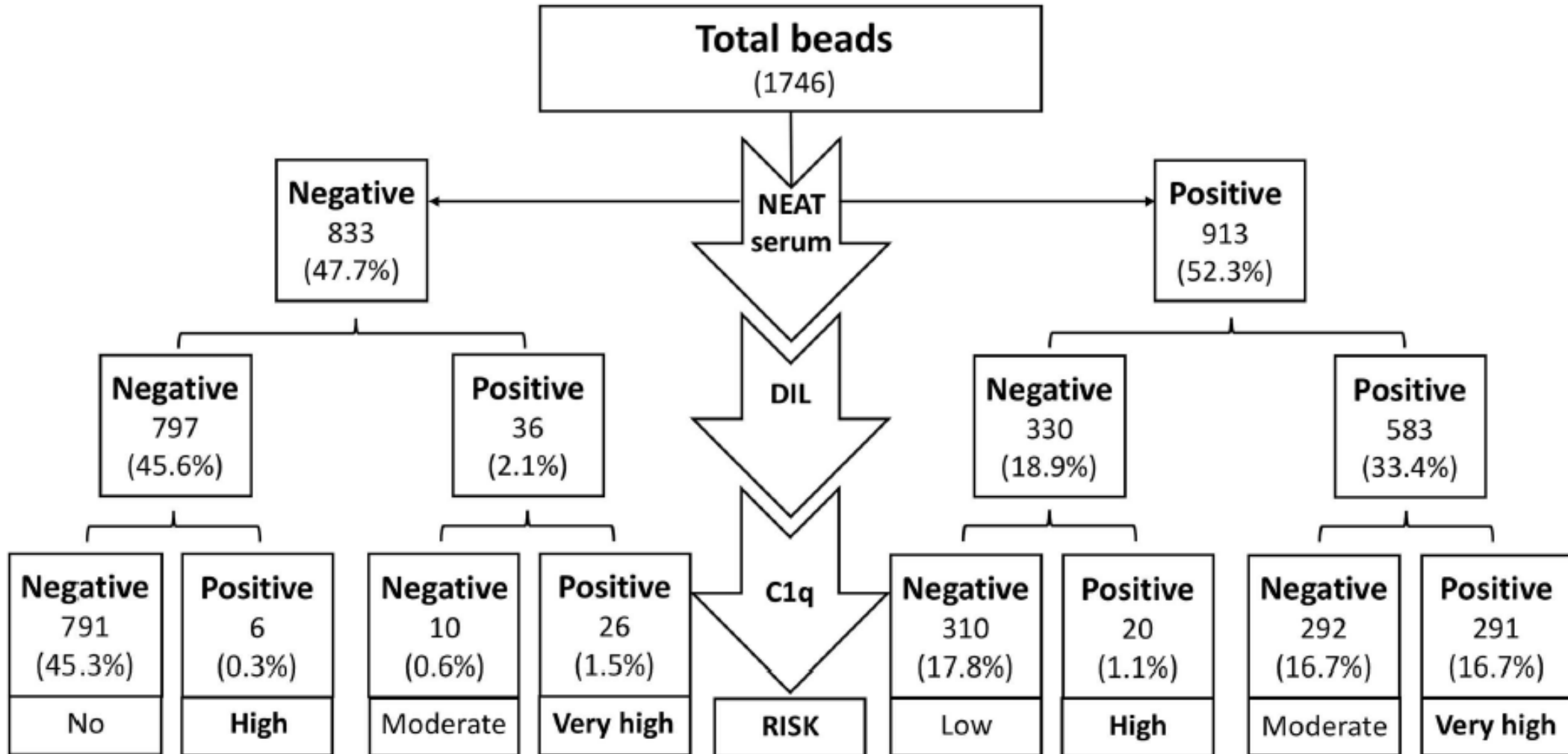


A dilución 1/32-1/64 hay buena correlación con C1q SAP en Lx y se activa complemento

B



3 perfiles de riesgo en pacientes hipersensibilizados



Limitaciones de detección Ac anti-HLA mediante Lx

DOS MÉTODOS COMERCIALES: VARIABILIDAD INTRAINDIVIDUAL



HLA denaturalizado y conformacional
Secundario policlonal

Table 2. General Features of Luminex Platform Kits

	LABScreen Mixed (LSM12)	LIFECODES LifeScreen Deluxe (LMX)
Sample preparation	Undiluted	Diluted 1:3
Amount of serum required	20 μ L	12.5 μ L
Amount of reagent required	5 μ L	5 μ L
Panel composition	12 class I and 7 class II beads from multiple individuals	7 class I + 5 class II beads with purified glycoproteins
Overall incubation time	60 min	60 min
Wash steps	3 \times 2 times	3
Hands on time	Up to 120 min	Up to 90 min
Negative control serum	Yes	Yes
Positive control serum	Not applicable	Yes
No. of negative control beads	1	3
No. of positive control beads	1	1



HLA conformacional
Secundario monoclonal

LabScreen detecta más especificidades HLA-I y HLA-II y con mayores MFI que Lifecodes

HLA Class-I

Nature of Secondary antibody	FcMonolG						IgHPolyFab					
	LABScreen (LS)		LIFECODES (LC)		LABScreen (LS)		LIFECODES (LC)		LABScreen (LS)		LIFECODES (LC)	
Types of Beadsets												
HLA-I Loci	A		B		Cw		A		B		Cw	
Number of antigens	28		43		13		28		43		13	
MGH-001	0	0	1	0	1	0	0	0	7	0	0	0
MGH-002	0	0	1	2	0	1	0	0	2	2	0	0
MGH-006	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	5	0
MGH-007	24	23	2	2	8	8	25	24	3	3	8	8
MGH-008	6	6	1	1	0	0	6	6	1	1	0	0
MGH-010	0	0	3	3	0	0	0	0	4	3	0	0
MGH-011	3	0	0	0	0	0	4	3	2	0	0	0
MGH-014	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
MGH-015	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
MGH-016	0	0	4	4	0	0	0	0	4	4	0	0
MGH-018	0	0	0	0	5	4	0	0	0	0	5	3
MGH-019	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
MGH-020	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
MGH-024	0	0	0	0	2	0	2	0	5	0	11	0
MGH-027	4	0	14	3	0	0	5	1	17	5	0	0
Total alleles recognized	38	30	26	15	16	14	43	35	53	18	29	11
<i>p</i> value	NS		NS		NS		0.0313		0.0078		NS	
	LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC	
	LS-Mono		LS-Mono		LS-Mono		LS-Poly		LS-Poly		LS-Mono	
							p 0.0005					
							p 0.0625 (NS)					

HLA Class-II

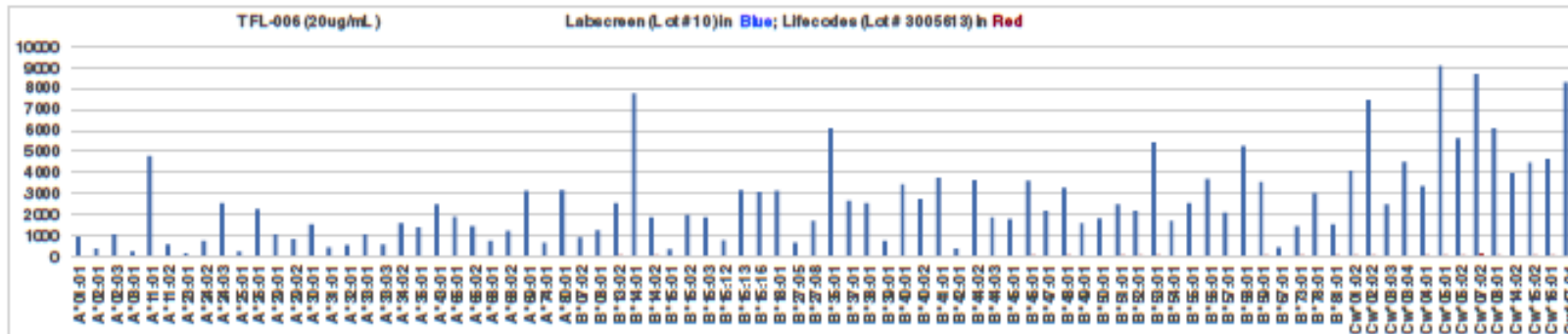
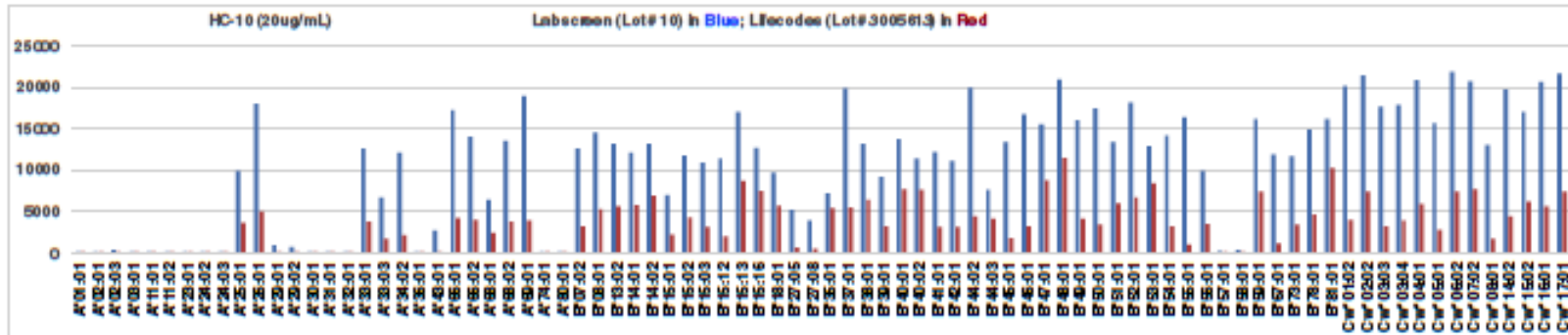
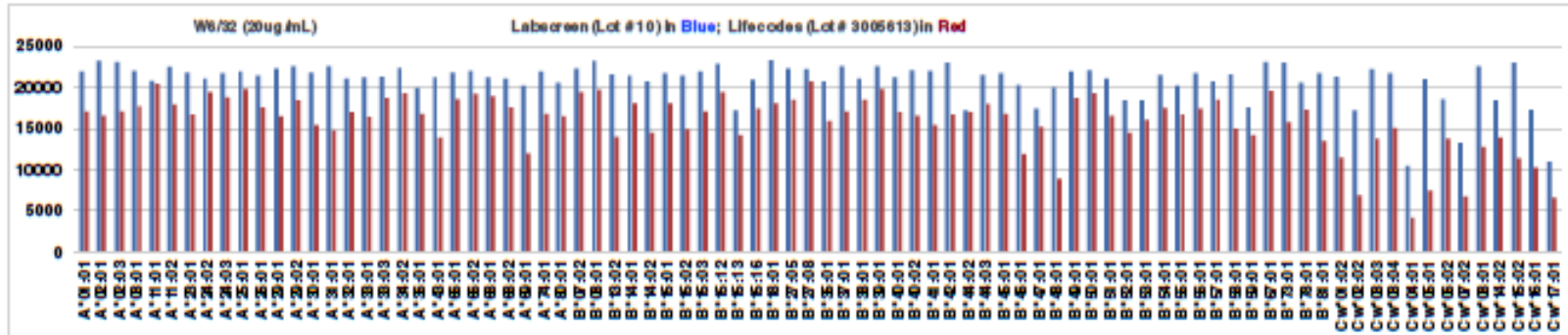
Nature of Secondary Antibody	FcMonolG						IgHPolyFab					
	LABScreen (LS)		LIFECODES (LC)		LABScreen (LS)		LIFECODES (LC)		LABScreen (LS)		LIFECODES (LC)	
Types of Beadsets												
HLA-II Loci	DRB		DQA/DQB		DPA/DPB		DRB		DQA/DQB		DPA/DPB	
Number of antigens	32		17		14		32		17		14	
MGH-001	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MGH-002	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
MGH-005	1	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
MGH-006	4	0	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0
MGH-007	10	6	8	8	0	0	10	10	8	8	0	0
MGH-008	5	5	12	12	0	0	5	7	12	12	0	0
MGH-010	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
MGH-011	11	12	6	6	0	0	11	12	6	6	1	0
MGH-015	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1
MGH-018	4	4	6	5	0	0	4	4	4	5	0	0
MGH-019	2	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
MGH-023	2	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0
MGH-024	2	0	1	0	0	0	3	0	2	0	2	0
MGH-025	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
MGH-027	8	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Total alleles recognized	61	36	39	34	3	0	42	41	32	31	4	0
<i>p</i> value	0.0254		NS		0.0313		NS		NS		0.0313	
	LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC		LS vs LC	
	LS-Mono		LS-Mono		LS-Mono		LS-Poly		LS-Poly		LS-Mono	
							p 0.0098					
							p 0.0313					

**OJO: Ac secundario
(LabScreen policlonal y Lifecodes monoclonal)**



LabScreen (azul) tiene antígenos HLA-I nativos y desnaturalizados mientras que Lifecodes (rojo) no

3 AcMo



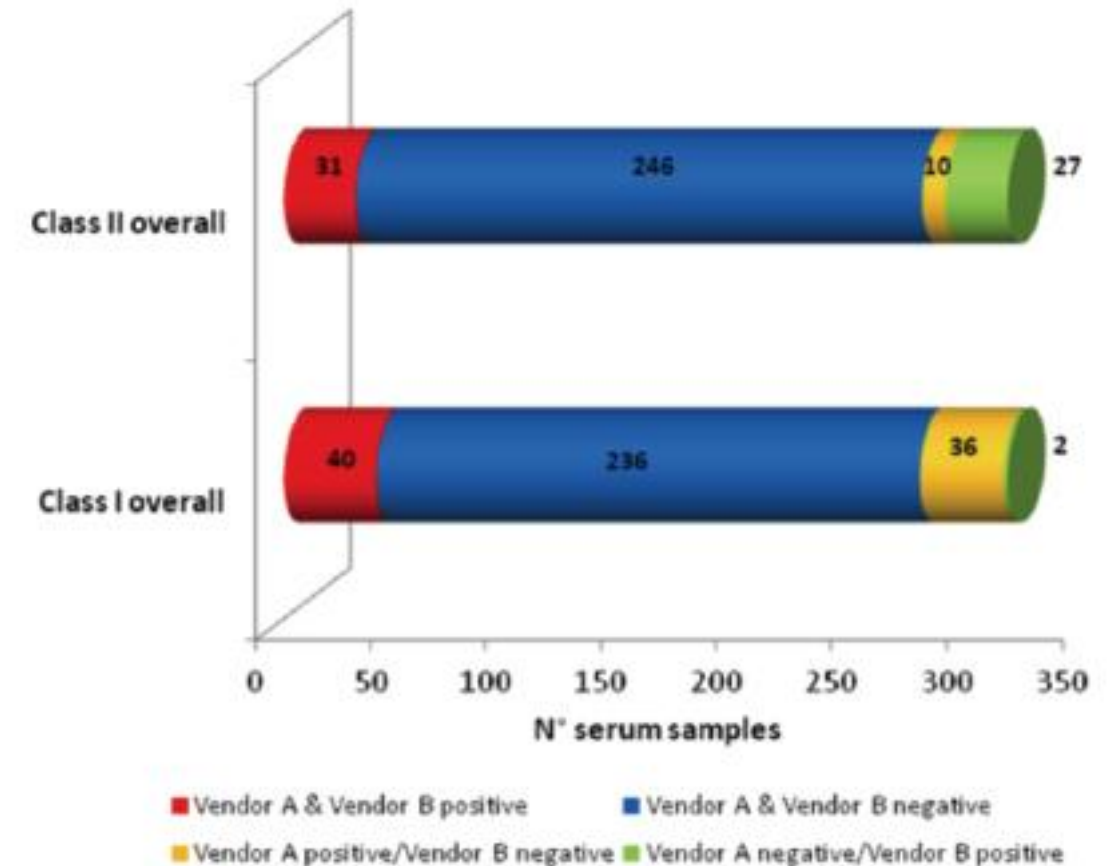
TFL-006
HLA libre sin $\beta 2m$



LabScreen detecta más especificidades HLA-I mientras que Lifecodes detecta más especificidades HLA-II

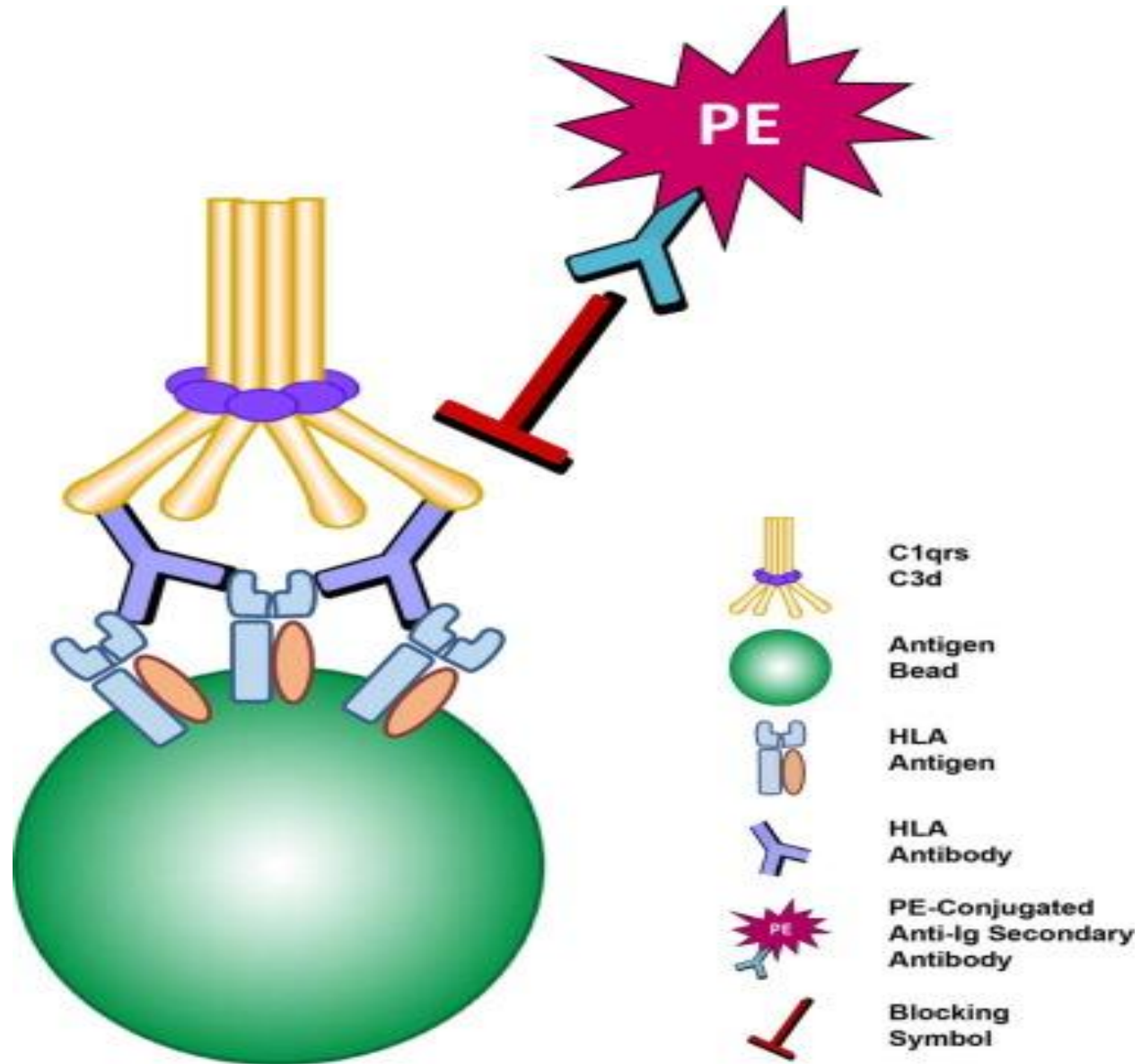
Table 3. Class I and Class II Anti-HLA Antibody Test Comparisons of the 2 Vendors

Vendor A/Vendor B	+/+	+/-	-/+	-/-	No. of Serum Samples Evaluated	Overall Agreement, %	Kc (95% CI)
Class I	40	36	2	236	314	88	0.61 (0.50-0.73)
Class II	31	10	27	246	314	88	0.56 (0.43-0.69)



OTROS ASPECTOS TÉCNICOS DE LX DE INTERÉS CLÍNICO

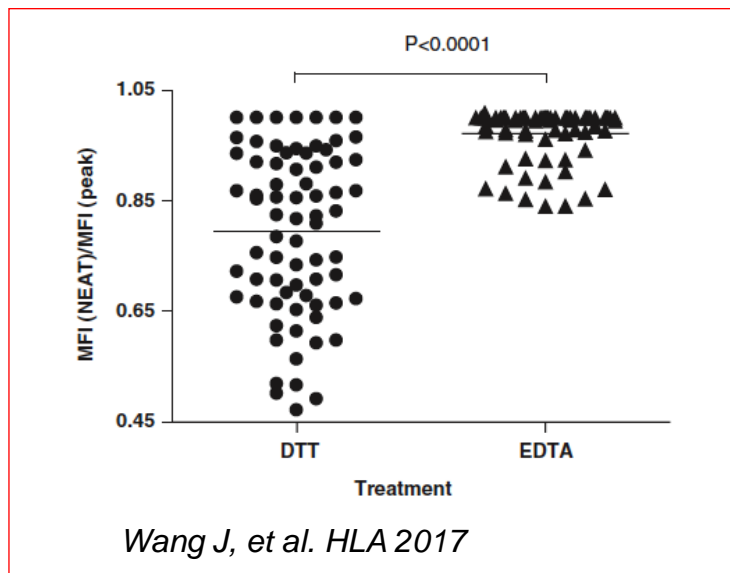
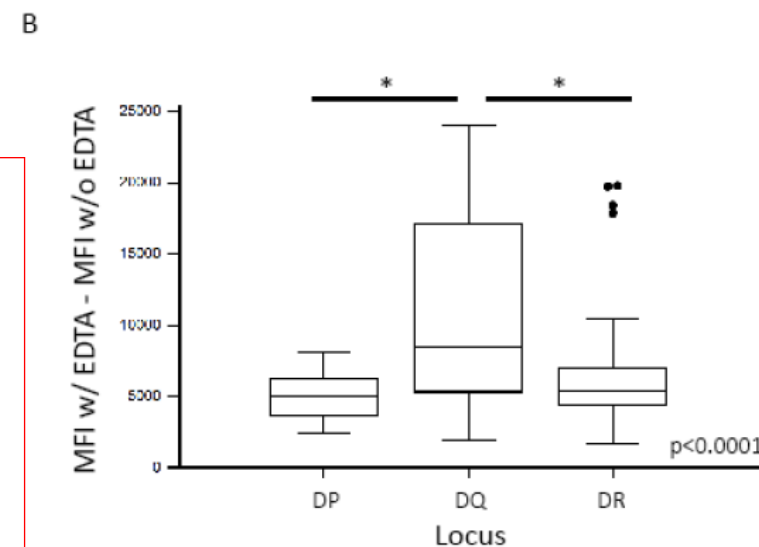
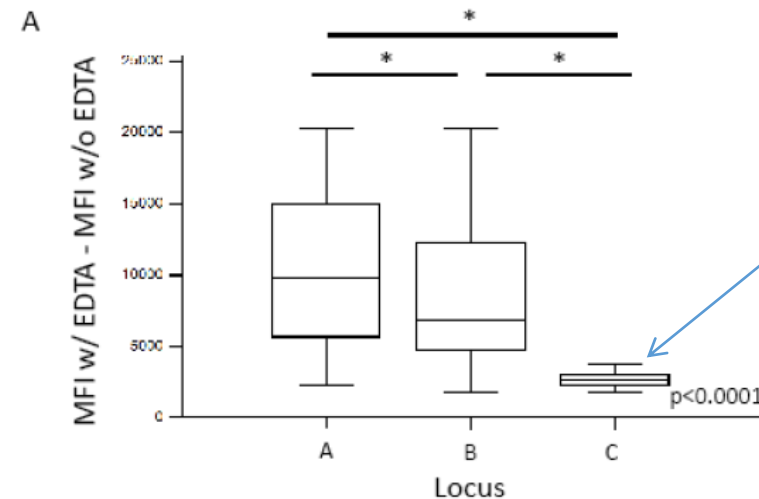
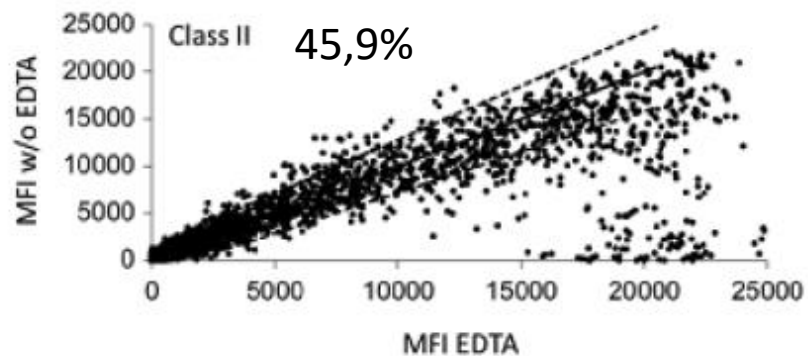
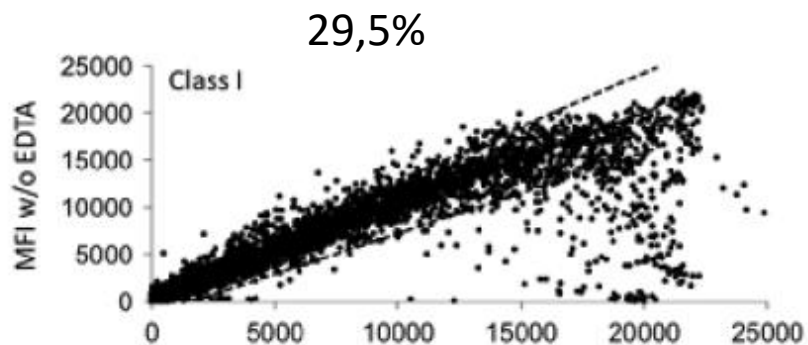
Complemento y su interferencia en la detección de anticuerpos anti-HLA con Lx



Complemento y su interferencia en la detección de anticuerpos anti-HLA con Lx

EDTA (0,1M, 1/10, 10 min):
C' e IgM

Alternativa: inactivación por calor (56°C, 20 minutos)



Guidicelli G, et al. HLA 2018

Antígenos HLA en las “bolitas” de poliestireno

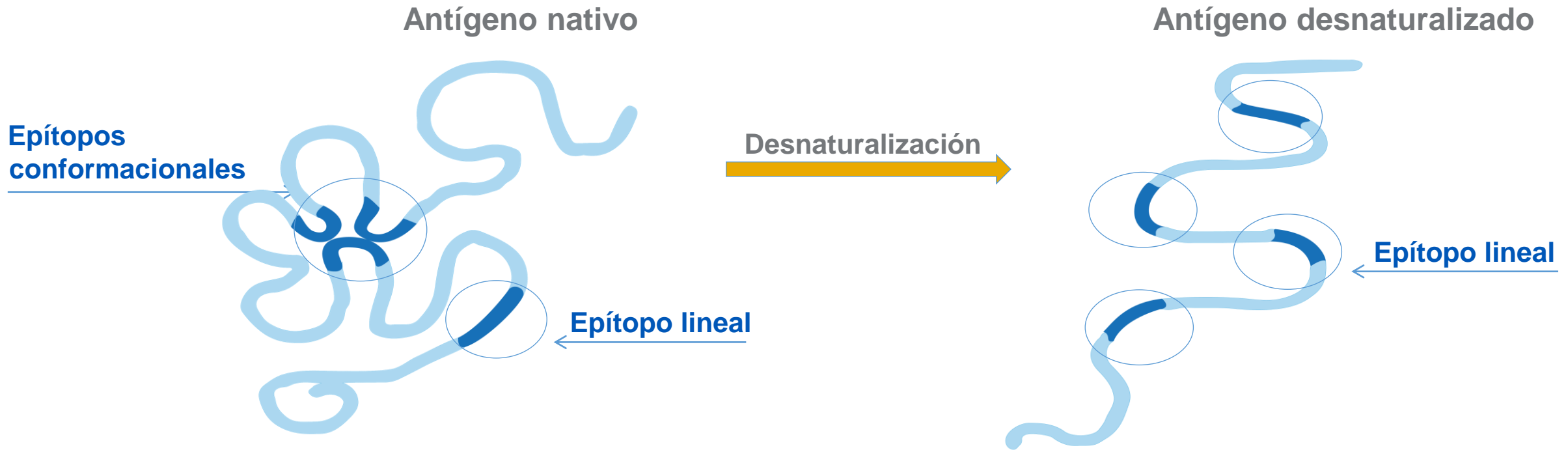


HLA nativo

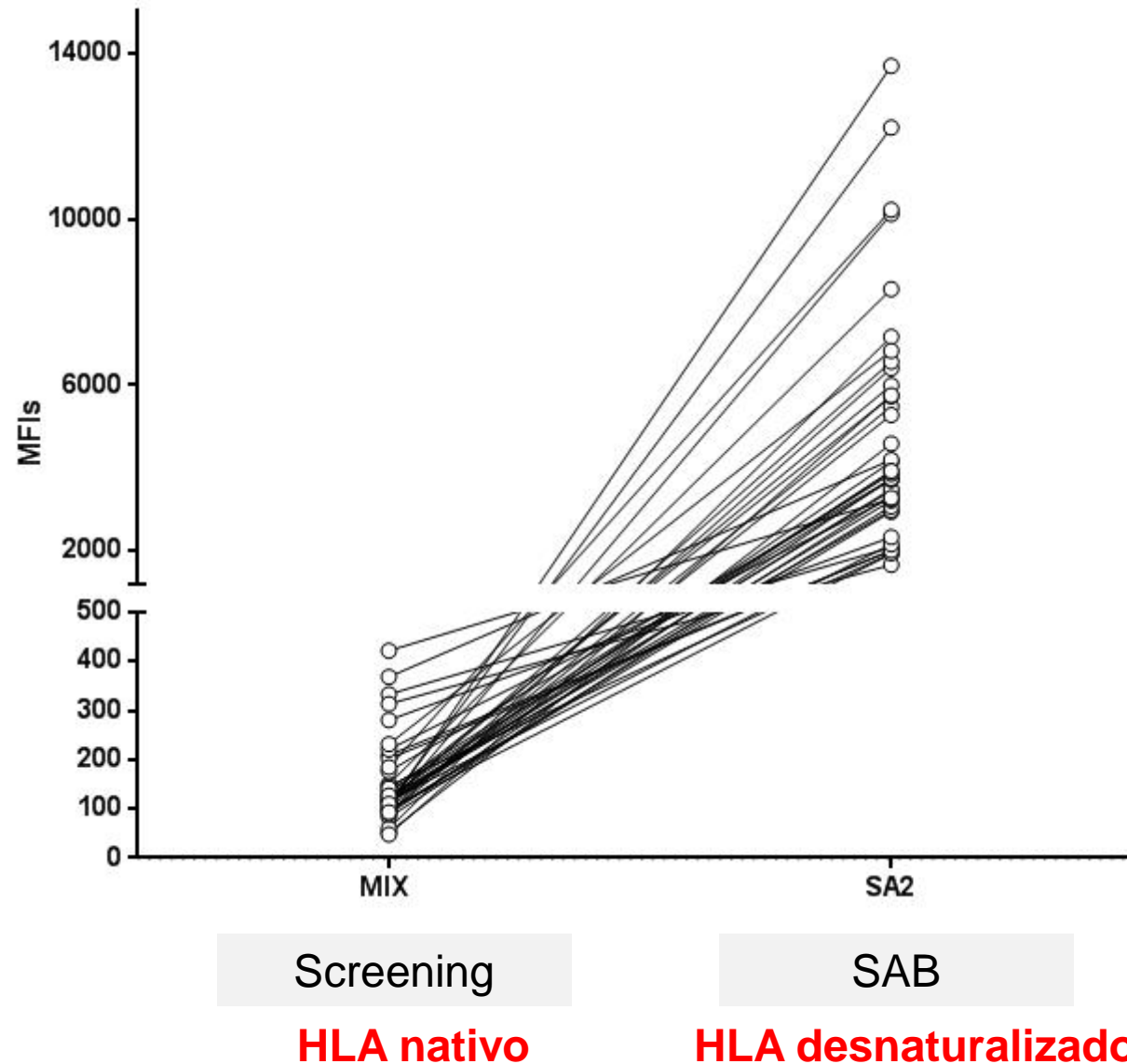


HLA desnaturalizado

Antígenos HLA en las “bolitas” de poliestireno



Los pacientes en lista de espera tienen especificidades frente a dnHLA que no se detectan con el screening



Caso #2 (HLA Matchmaker)

	Locus A	Locus B	Locus C	Locus DR	Locus DQ
Receptor	*01,*02	*07,*49		*04,*13	
Donante	*01,*24	*07,* 15:17	*07,-	*08,*13	*04, *06

-Trasplante pulmonar

-Biopsia: Rechazo Agudo Celular A3 de la WF de la ISHLT

¿Presencia de anti-HLA?

Tipaje Donante 15:17 (B63)

- Este alelo no está representado en el panel Lx

038	589,56	28,75	237,37	14,37	337,81	1,24	1	267			B65	Bw6							- , - , B*14:02, - , - , -
040	108,61	28,75	68,38	14,37	25,85	0,79	1	228			B62	Bw6							- , - , B*15:01, - , - , -
041	208,92	28,75	88,86	14,37	105,68	1,18	1	258			B75	Bw6							- , - , B*15:02, - , - , -
042	182,74	28,75	79,75	14,37	88,61	1,15	1	249			B72	Bw6							- , - , B*15:03, - , - , -
043	185,21	28,75	76,35	14,37	94,48	1,21	1	257			B71	Bw6							- , - , B*15:10, - , - , -
044	4002,68	28,75	60,25	14,37	3928,05	33,21	8	252			B76	Bw6							- , - , B*15:12, - , - , -
045	155,12	28,75	75,81	14,37	64,93	1,02	1	249			B77	Bw4							- , - , B*15:13, - , - , -
046	357,57	28,75	183,2	14,37	159,99	0,98	1	207			B63	Bw4							- , - , B*15:16, - , - , -
047	166,69	28,75	77,71	14,37	74,6	1,07	1	272			B18	Bw6							- , - , B*18:01, - , - , -
048	138,36	28,75	53,37	14,37	70,61	1,3	1	266			B27	Bw6							- , - , B*27:08, - , - , -
049	112,67	28,75	53,74	14,37	44,55	1,05	1	276			B35	Bw6							- , - , B*35:01, - , - , -

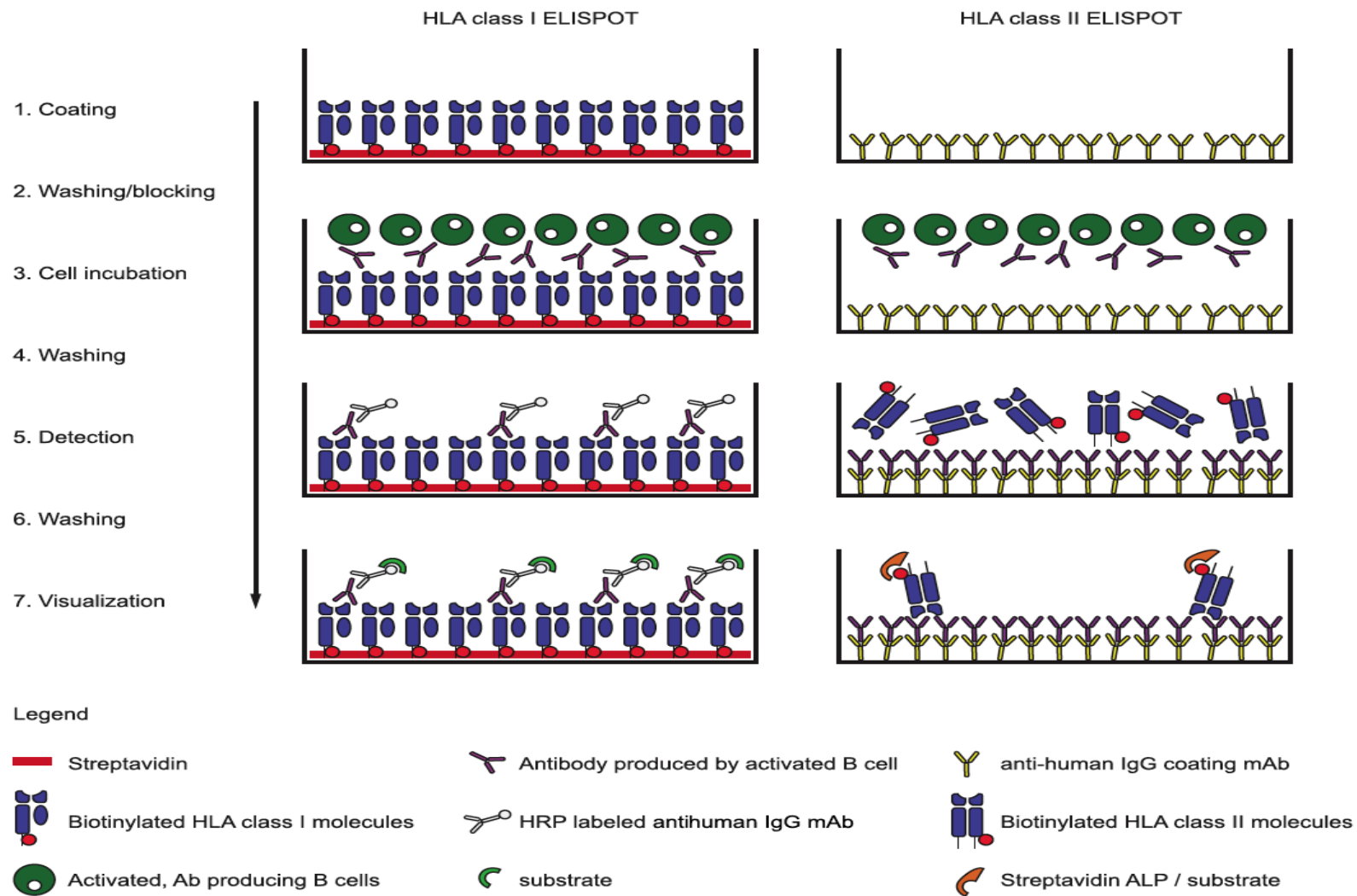
CONCLUSIONES I

- Luminex es el método establecido para el estudio de Ac anti-HLA.
- Los resultados se determinan en MFI. Titulación de utilidad con MFI elevadas y en tratamientos desensibilizantes.
- La interpretación de los resultados puede afectarse en función de polirreactividad o inhibición por complemento y/o IgM.
- Dos métodos comerciales de Luminex con relativa buena concordancia, pero no estandarización.

CONCLUSIONES II

- HLA matchmaker: utilidad para individualizar (¿generalización?)
- Otras situaciones: mayor densidad de Ag HLA en las beads que en células endoteliales (HLA-C, HLA-DQ, HLA-DP); tratamientos desensibilizantes (IVIG, timoglobulina).
- **FUTURO...**

El empleo de ELISPOT para detectar células B memoria en pacientes hipersensibilizados como complemento a los Ac anti-HLA



GRACIAS



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Instituto de Salud Carlos III



Valdecilla
Instituto de
Investigación
Sanitaria IDIVAL



@inmunoHUMV