

# Métodos de detección de anticuerpos anti HLA

Lic. Karin Padros  
Histocompatibilidad  
**PRICAI-Fundacion Favaloro**



# Todos los anticuerpos anti HLA son igualmente dañinos?

- Hay anticuerpos anti HLA presentes?
  - Metodos de fase solida: LUMINEX
- El anticuerpo es clínicamente relevante?
  - capacidad de fijar complemento

# MÉTODOS DE FASE SÓLIDA

ELISA

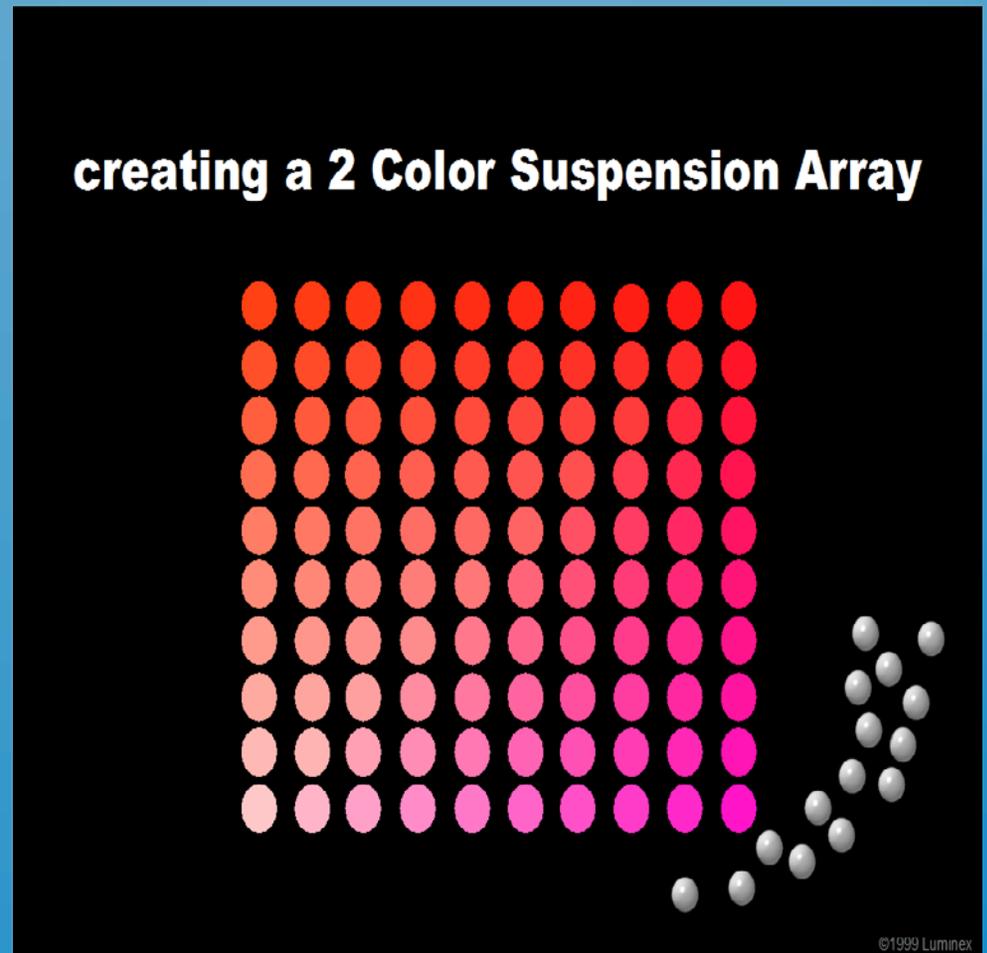
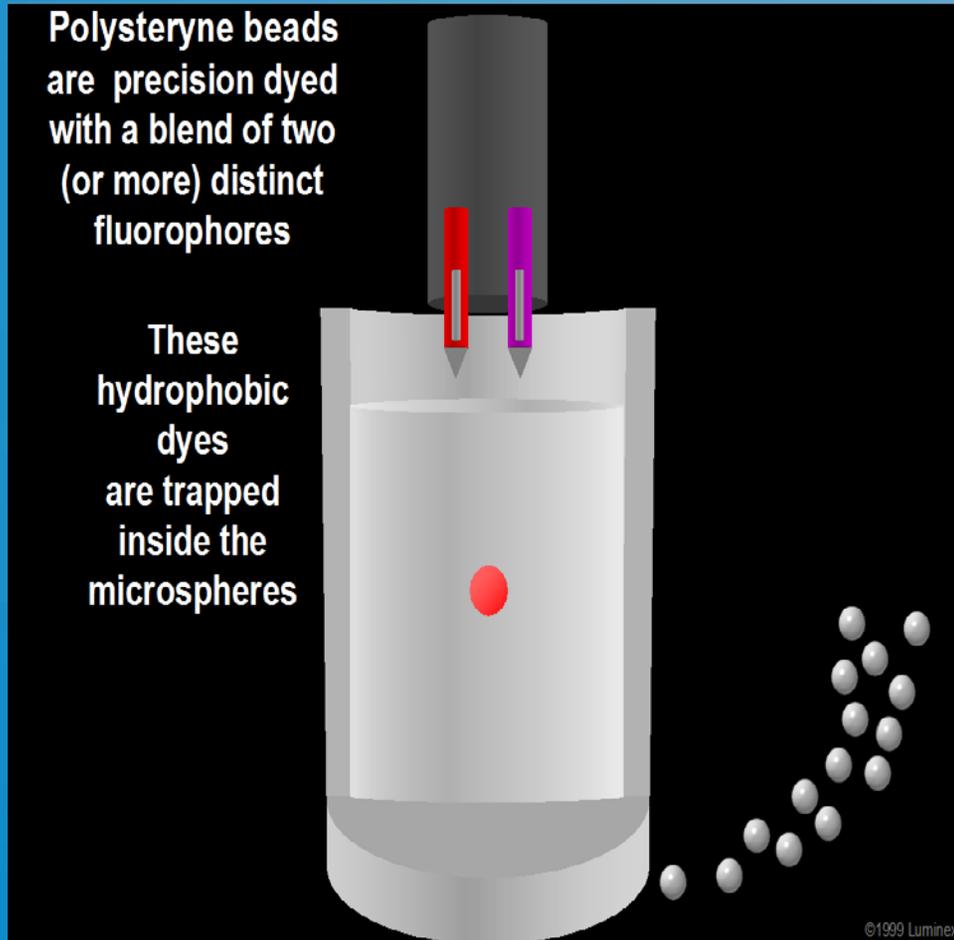
CITOMETRIA DE FLUJO  
(FLOW)

LUMINEX

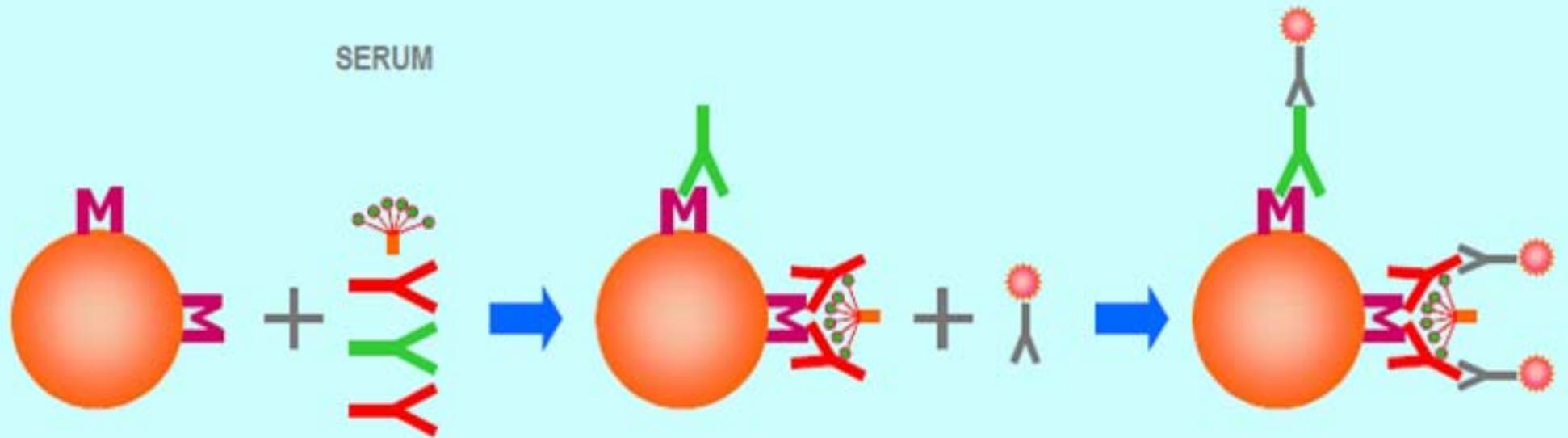
# LUMINEX



Las microesferas están embebidas en fluorocromos que producen una señal de identificación única individual



# Luminex-IgG



HLA-Ag Coated  
Luminex Beads



Autologous C1q



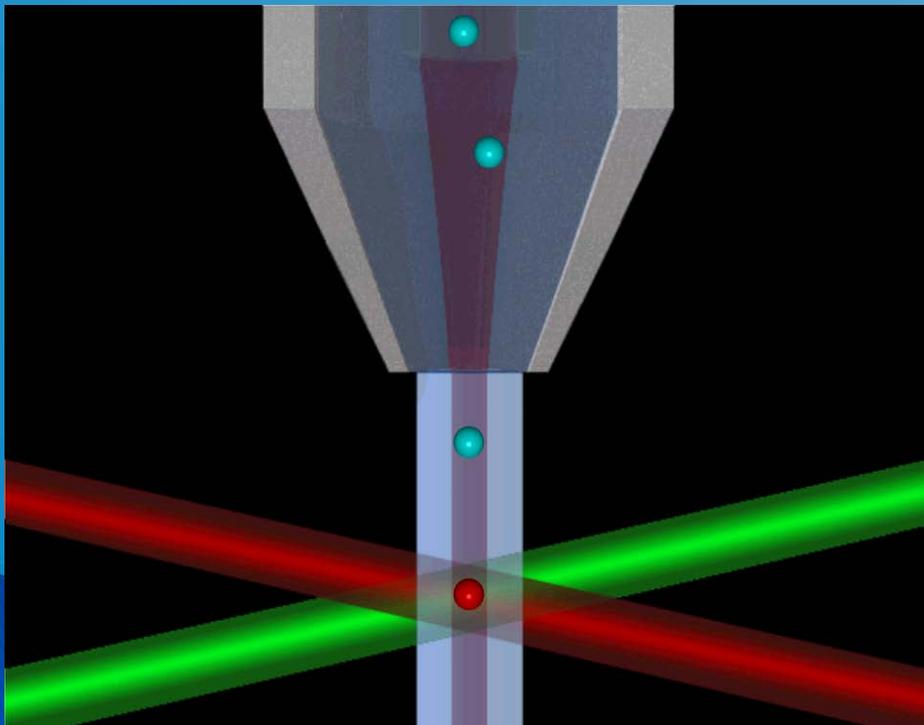
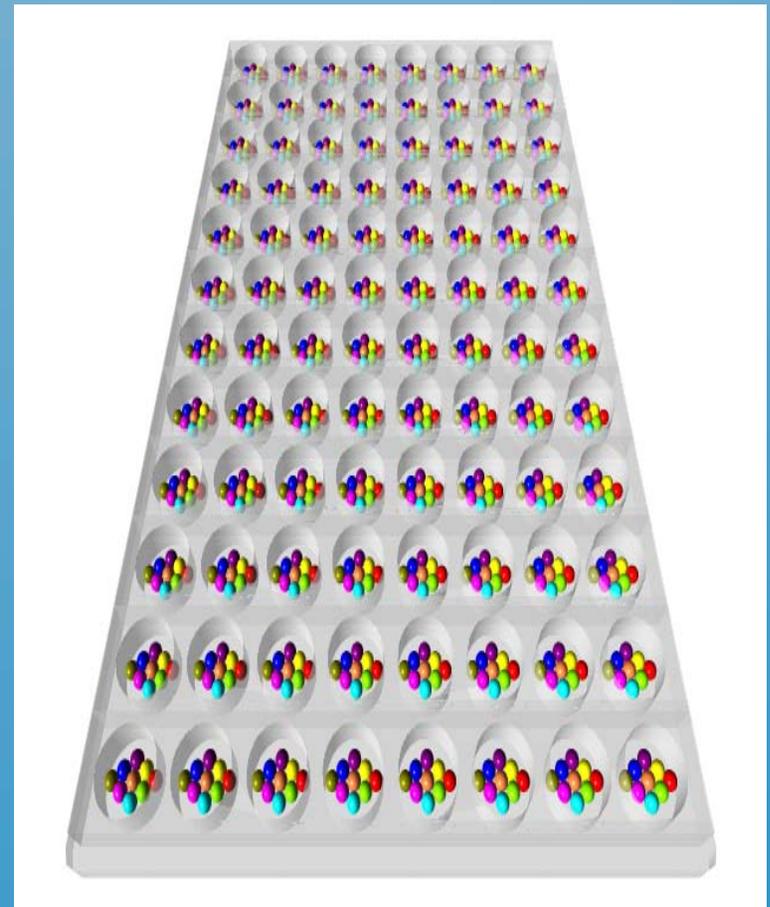
CFAB



Non-CFAB

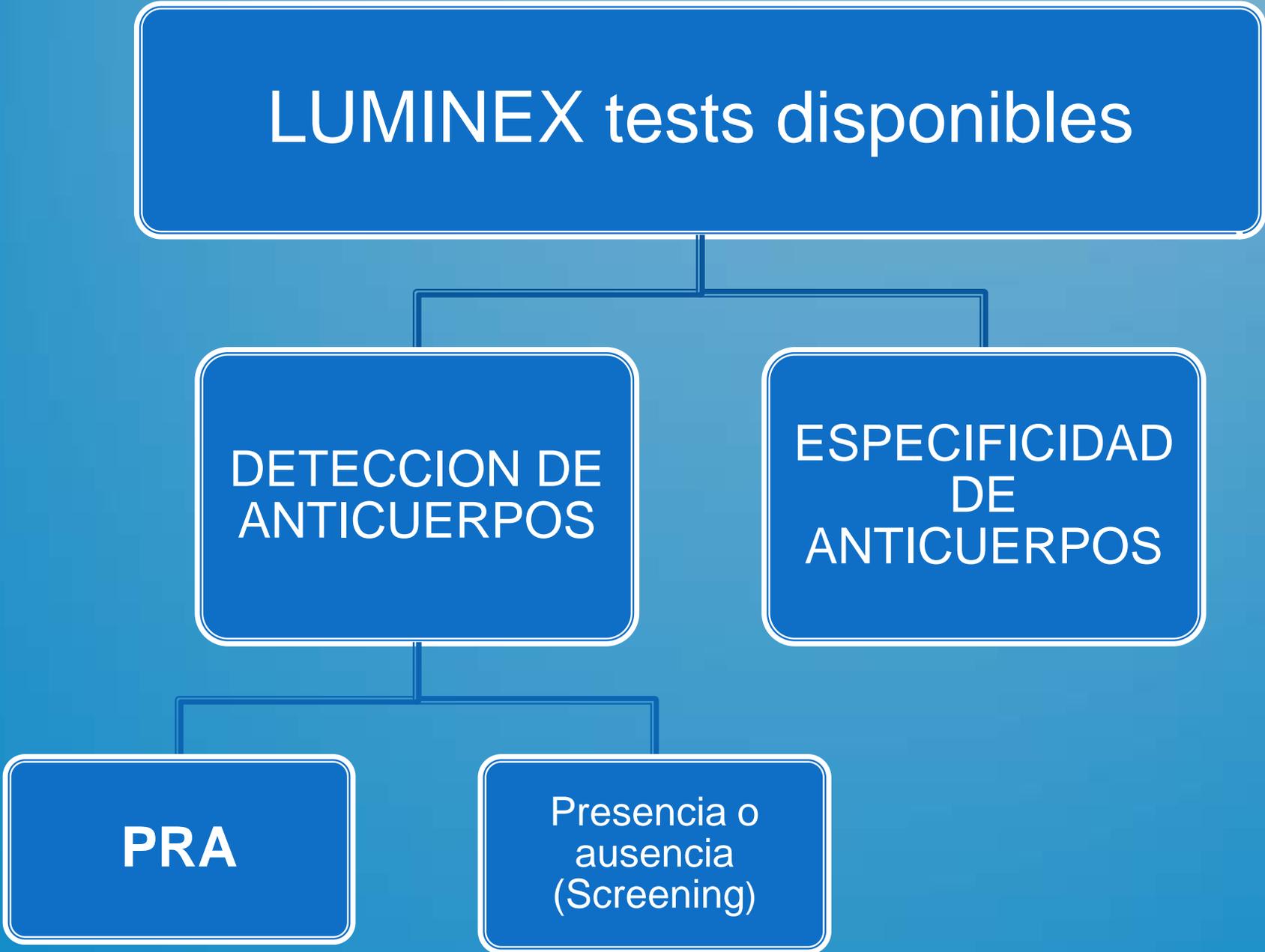


Anti-IgG



Se pueden estudiar hasta 100 esferas en un mismo ensayo, y a su vez 95 pacientes a la vez.

# LUMINEX tests disponibles



```
graph TD; A[LUMINEX tests disponibles] --> B[DETECCION DE ANTICUERPOS]; A --> C[ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS]; B --> D[PRA]; B --> E[Presencia o ausencia (Screening)];
```

The diagram is a hierarchical flowchart. At the top is a large blue rounded rectangle containing the text 'LUMINEX tests disponibles'. A vertical line descends from this box and splits into two horizontal lines. The left horizontal line leads to a blue rounded rectangle containing 'DETECCION DE ANTICUERPOS'. The right horizontal line leads to a blue rounded rectangle containing 'ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS'. From the bottom of the 'DETECCION DE ANTICUERPOS' box, a vertical line descends and splits into two horizontal lines. The left horizontal line leads to a blue rounded rectangle containing 'PRA'. The right horizontal line leads to a blue rounded rectangle containing 'Presencia o ausencia (Screening)'.

DETECCION DE  
ANTICUERPOS

ESPECIFICIDAD  
DE  
ANTICUERPOS

**PRA**

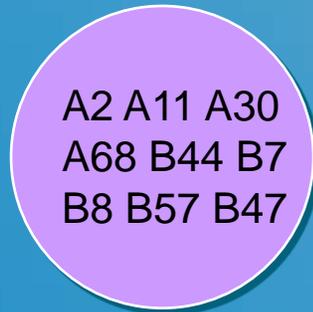
Presencia o  
ausencia  
(Screening)

## PRA



- Antígenos de una línea celular en cada esfera. “60 individuos”
- Esferas con HLA-Clase I
- Esferas con HLA-Clase II

## SCREENING



- Antígenos de muchas líneas celulares en cada esfera.
- Esferas con HLA-Clase I
- Esferas con HLA-Clase II

## ESPECIFICIDAD



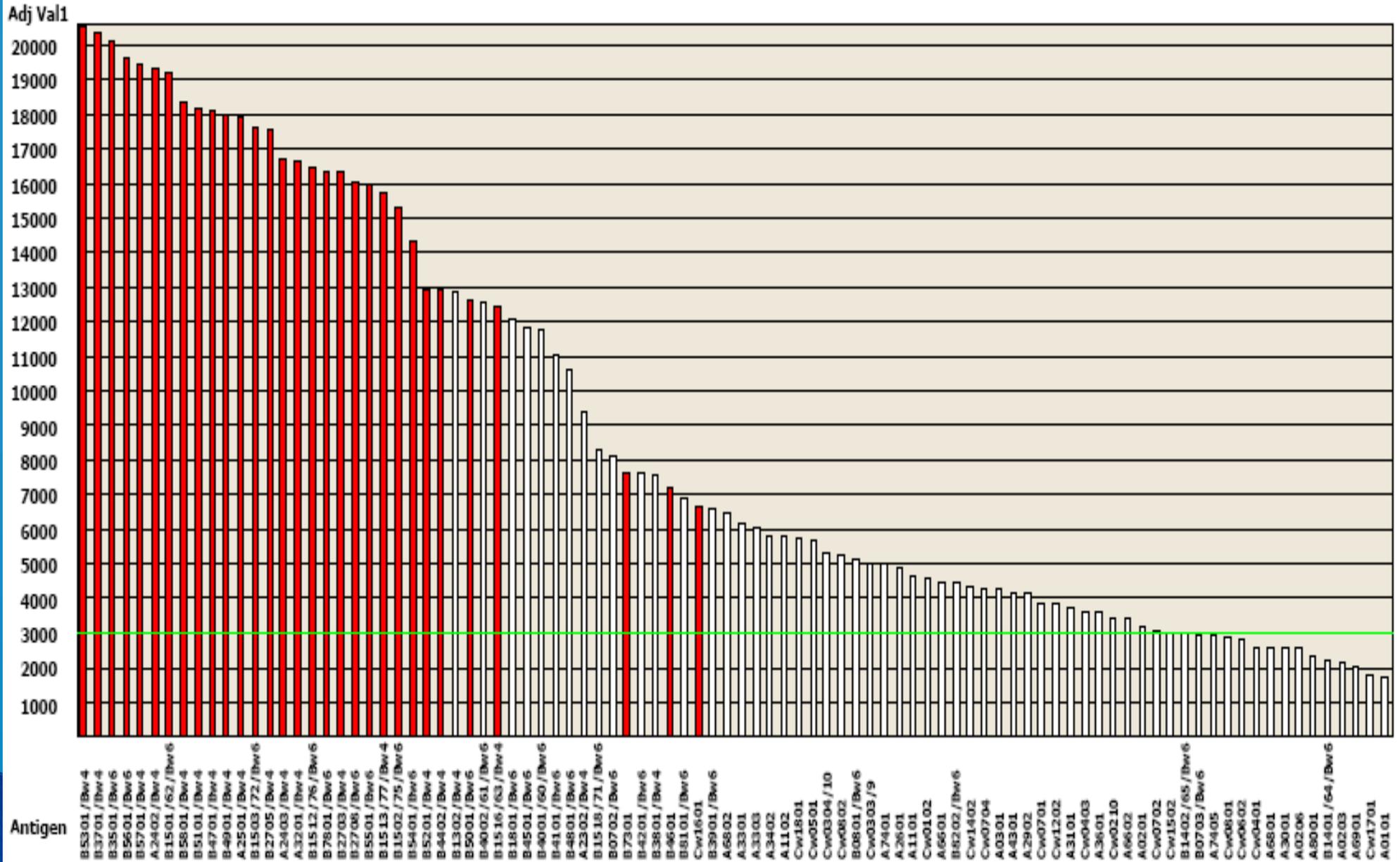
- Un solo tipo de antígeno en cada esfera obtenido de líneas celulares que han sido transfectadas con un gen HLA via tecnología de DNA recombinante.
- Esferas con HLA-Clase I
- Esferas con HLA-Clase II
- Son antígenos HLA recombinantes.

# ESPECIFICIDAD: SINGLE ANTIGEN

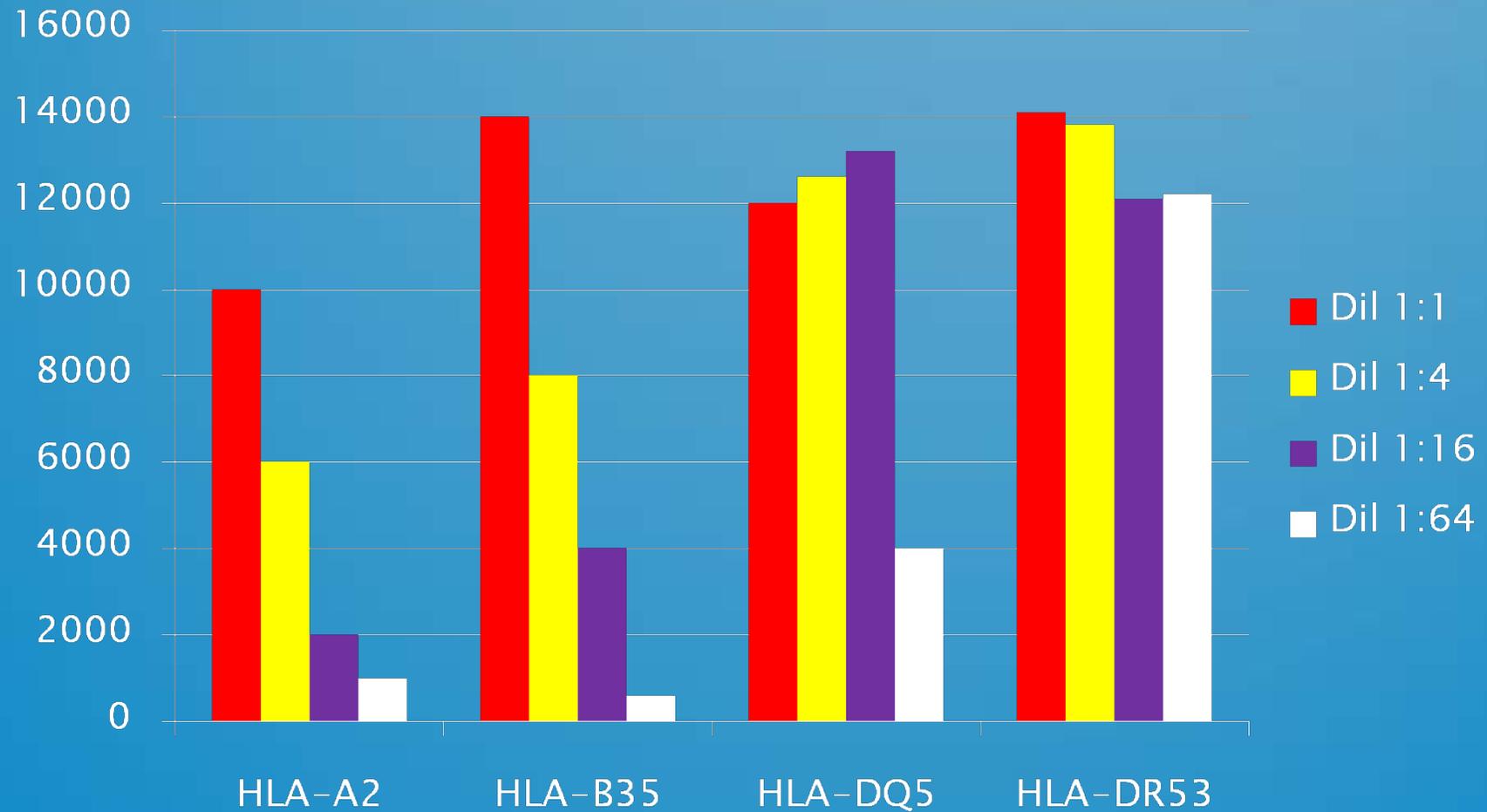
- ▶ Cada esfera tiene unido sólo un antígeno HLA.
- ▶ Se logra determinar la especificidad de los anticuerpos aún en los pacientes hipersensibilizados.
- ▶ Selección del donante de acuerdo a los antígenos no aceptables o mis match aceptables.

BEAD	Probe	HLA-A	
7	207	A*0101	
8	208	A*0201	
9	209	A*0203	
10	210	A*0206	
11	211	A*0301	
12	212	A*1101	
13	213	A*1102	
14	214	A*2302	
15	215	A*2402	
16	216	A*2403	
17	217	A*2501	
18	218	A*2601	
19	219	A*2902	
20	220	A*3001	
21	221	A*3101	
22	222	A*3201	
23	223	A*3301	
24	224	A*3303	
25	225	A*3402	
26	226	A*3601	
27	227	A*4301	
28	228	A*6601	
29	229	A*6602	
30	230	A*6801	
31	231	A*6802	
32	232	A*6901	
33	233	A*7401	
34	234	A*7405	
35	235	A*8001	

Results for: Class I - Single Antigen  
 Session: [REDACTED] / Sample: [REDACTED]  
 Report Date: 5/29/2008



# Intensidad MFI $\neq$ Titulo



# Como podemos utilizar los resultados de la especificidad de anticuerpos anti HLA?

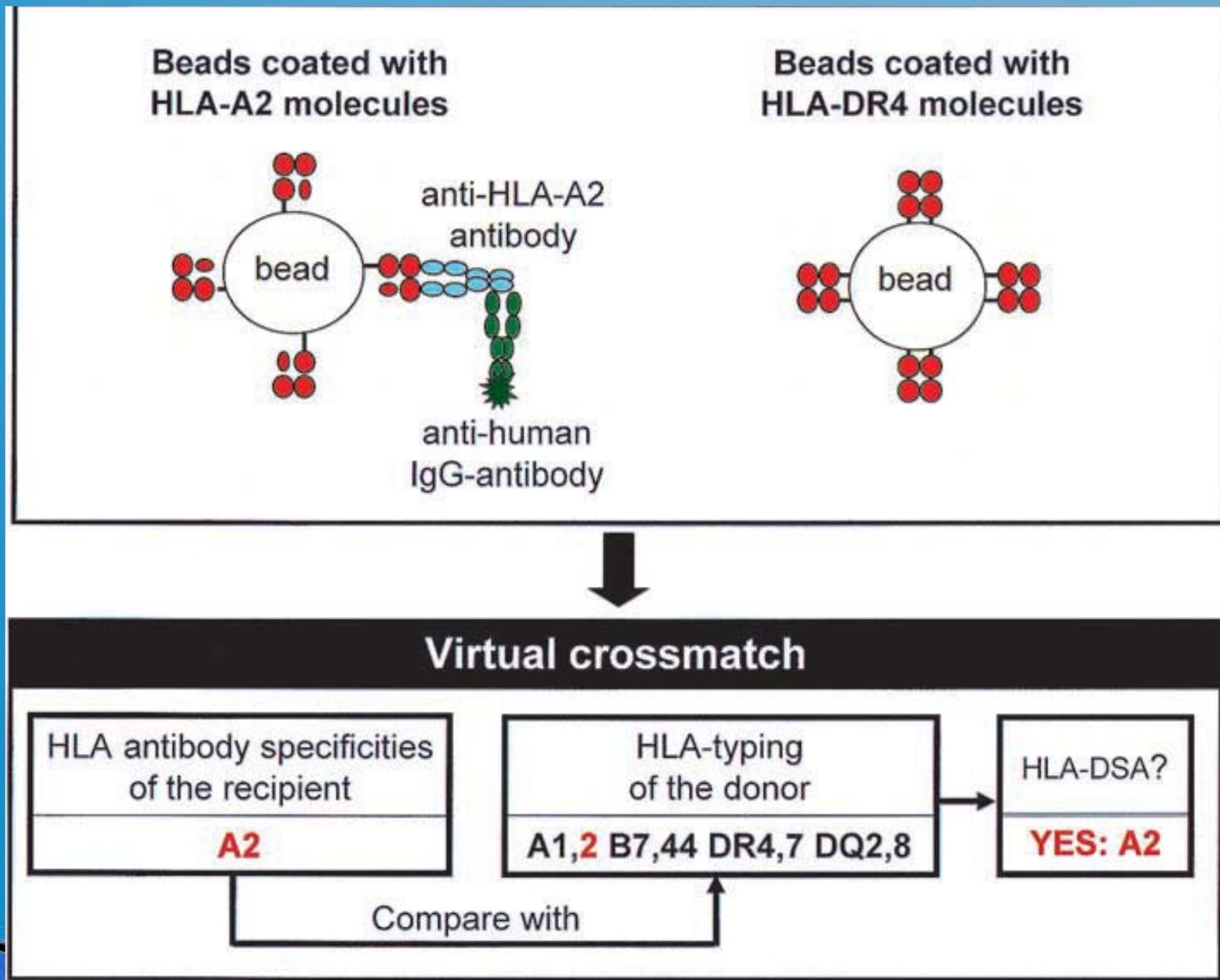
- ▶ Correlacionando el Índice de fluorescencia y los resultados del XM:  
XM virtual (vXM)

	MFI Luminex	Resultados XM	
		FLOW	CDC
NEG	< 1000	NEG	NEG
DEBIL	1000 a 2000	NEG	NEG
MODERADO	2000 a 8000	wkPOS	NEG/wkPOS
ELEVADO	> 8000	POS	POS/NEG

Analizaron los resultados de controles de calidad de 2006 a 2008.

*Batal, Lunz, Zeevi et al 2010*

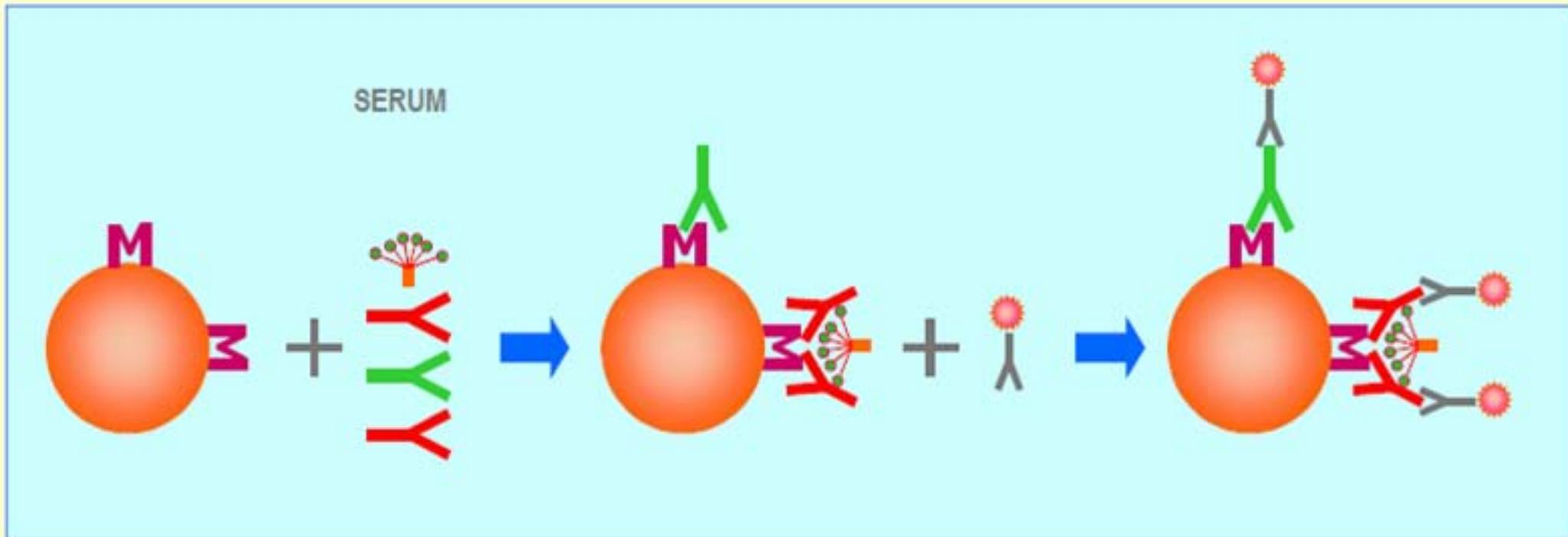
# SINGLE ANTIGEN



# C1q

Un nuevo ensayo para  
detectar anticuerpos  
clínicamente relevantes

# Luminex-IgG



HLA-Ag Coated  
Luminex Beads



Autologous C1q



CFAb

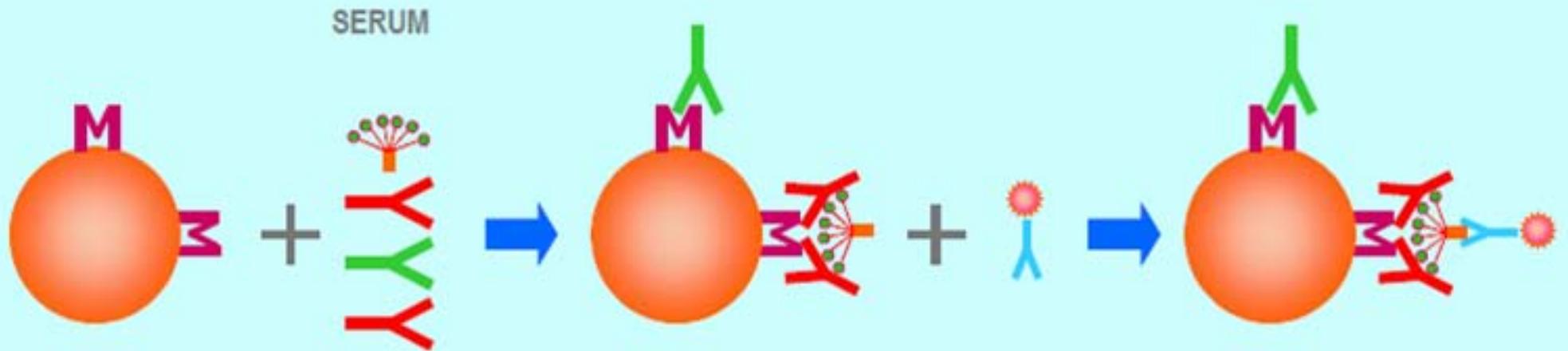


Non-CFAB



Anti-IgG

# Luminex-C1q



HLA-Ag Coated  
Luminex Beads



Autologous C1q



CFAb



Non-CFAB



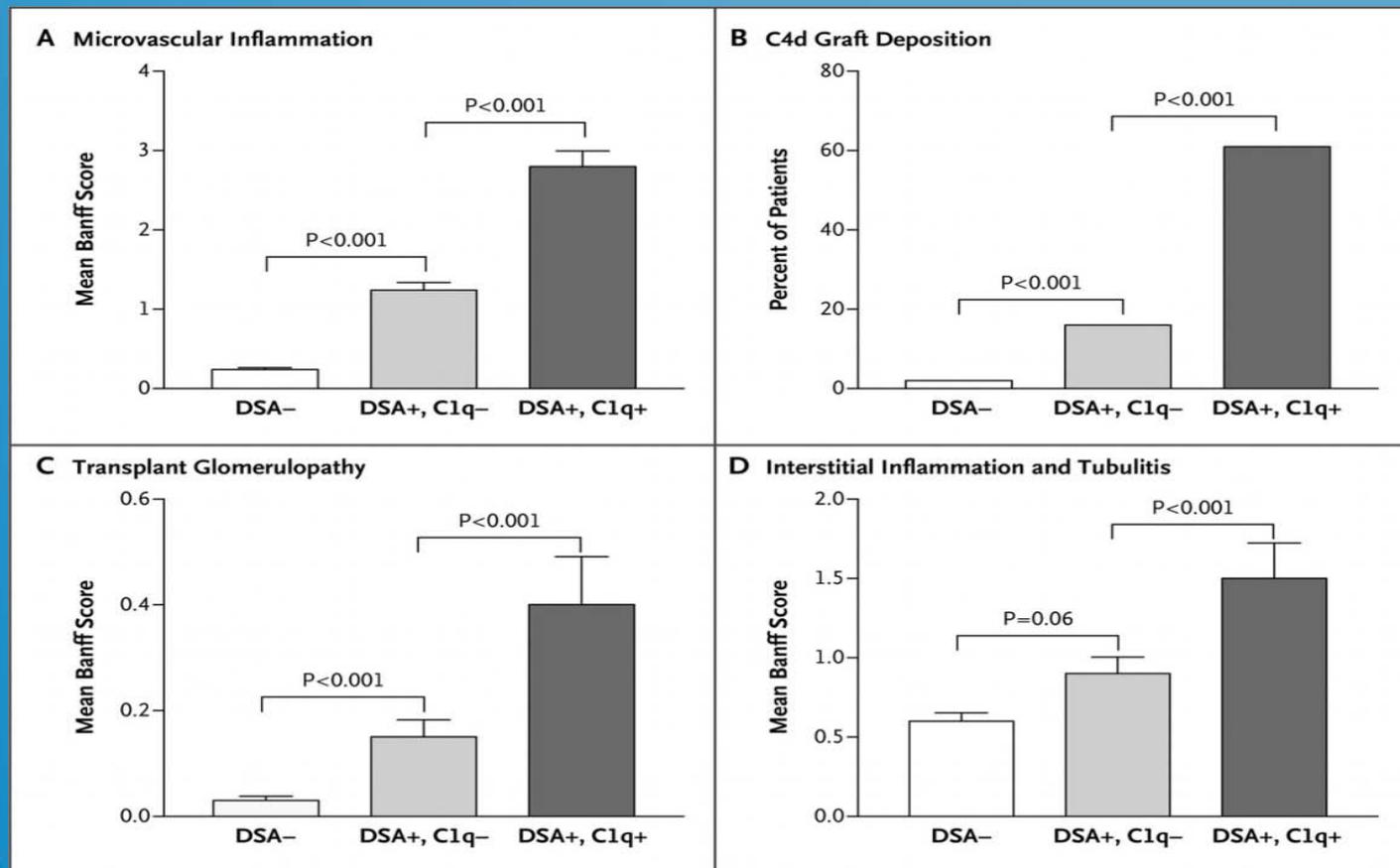
Anti-hC1q



# Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival

1016 pacientes Tx renales. Presencia de DSA y capacidad de fijar C1q (dia 0 y 12 meses pos Tx.)

Phenotypic Features of Kidney-Allograft Injury, According to Anti-HLA Antibody Status after Transplantation.



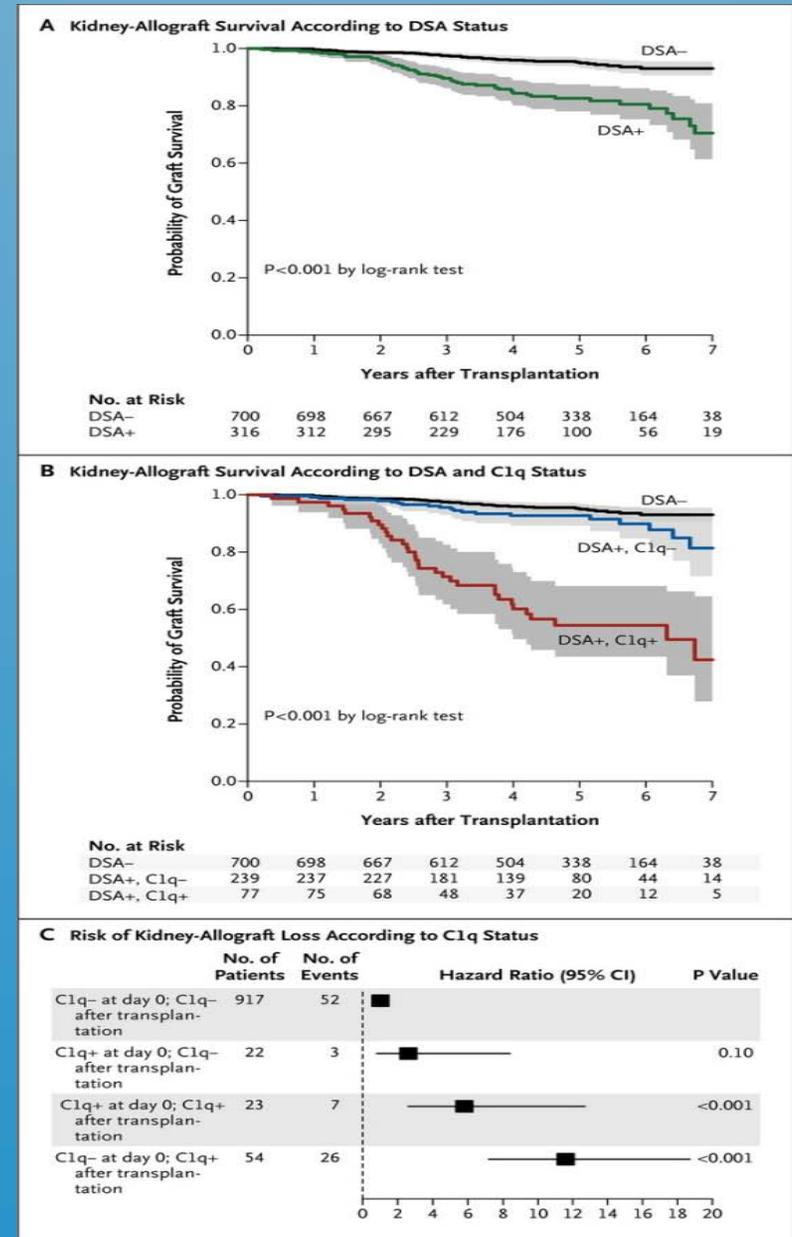
# Kaplan–Meier Curves for Kidney-Graft Survival, According to Donor-Specific Anti-HLA Antibody Status after Transplantation.

2A- Supervivencia de acuerdo al status de DSA luego del Tx.

2B- Pacientes con DSA pos Tx se categorizaron de acuerdo a su capacidad de fijar complemento.

2C- Riesgo de pérdida del injerto de acuerdo al status de DSA fijadores de complemento; pacientes con DSA C1q pos Tx tenían mayor riesgo de pérdida del injerto.

Conclusión: Presencia de DSA C1q+ detectados durante el primer año pos Tx es un predictor independiente de pérdida del injerto a 5 años. C1q puede ayudar a identificar ptes de riesgo a pesar de negatividad del C4d.



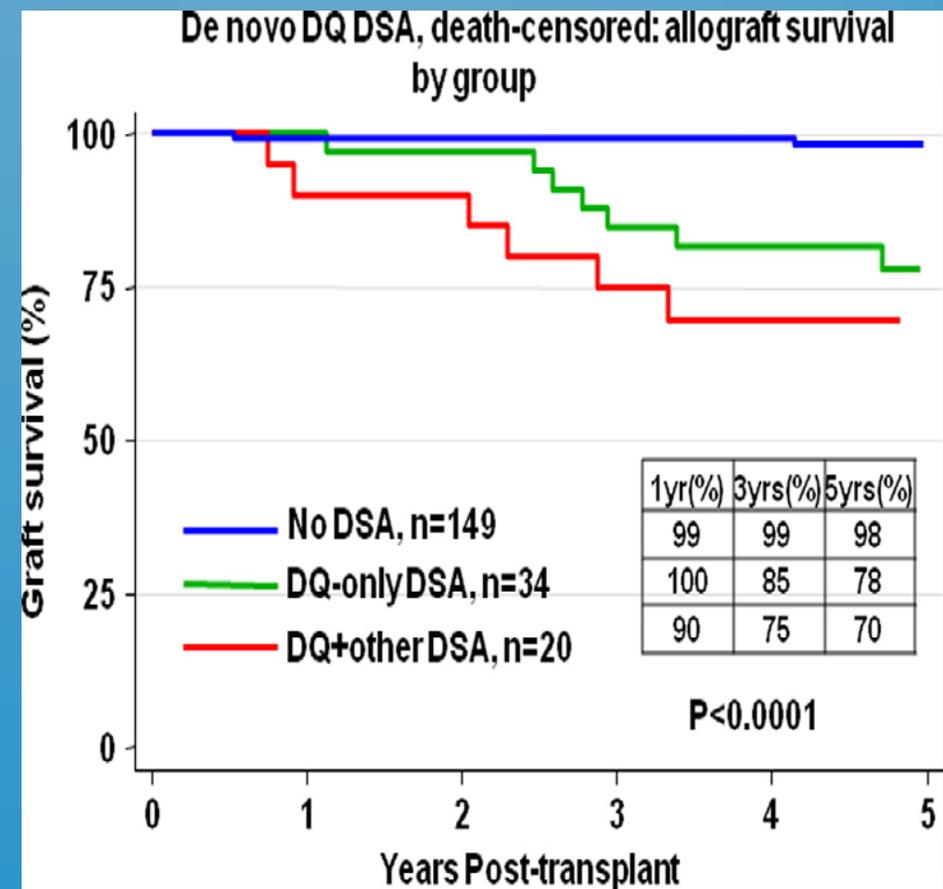
# The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody Kidney Transplantation outcomes.

Freitas MC, Terasaki PI Transplantation 2013

Anticuerpos anti DQ son altamente frecuentes en receptores de Tx renal y son mas resistentes a los tratamientos de IS, haciendo importante la detección temprana de los mismos.

1-3 grupos de estudio de receptores de primer Tx renal: solo dnDQ DSA, dnDQ + otros DSA, no DSA.

2- Pacientes con dnDSA solo DQ y con dnDQ + otros DSA tienen mas episodios de rechazo agudo (AR), > riesgo de pérdida del injerto y < sobrevivida del injerto a 5 años comparado con pacientes s/DSA.

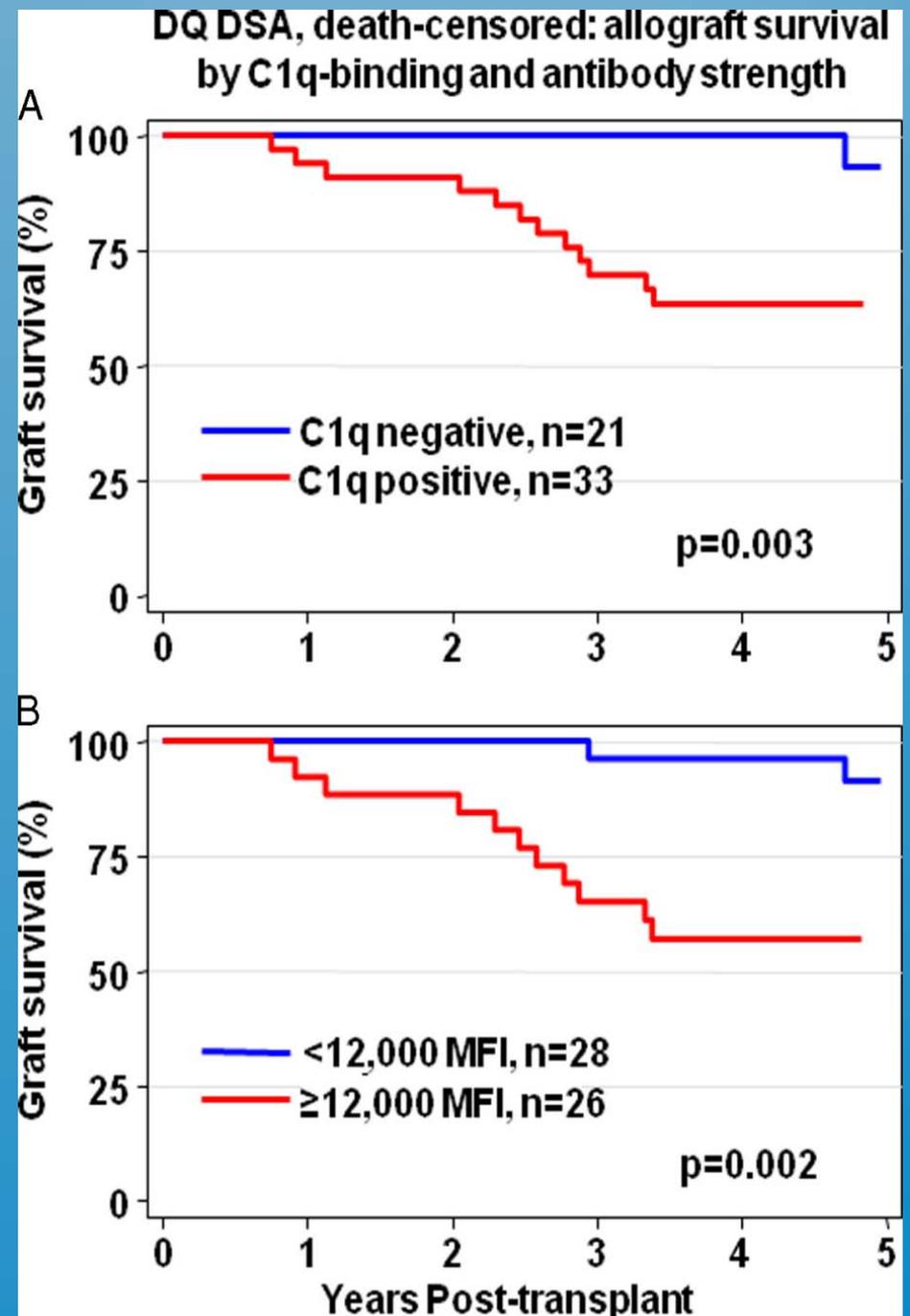


3- Pacientes con dnDQ DSA con AR tenían mayor combinación de IgG1/IgG3 y anticuerpos fijadores de C1q que los pacientes sin AR.

4- La presencia de dnDQ DSA fijadores de C1q fue asociado con un 30% menos de supervivencia a 5 años.

5- Receptores con DQ DSA con MFI > 12000 tenían peor supervivencia del injerto que receptores con MFI < 12000.

## TIIFICACION DQ DE RECEPTORES Y DONANTES????



## CONCLUSIONES GENERALES C1q

-DSA C1q + ES PREDICTIVO DEL RIESGO DE CM CDC +.

-EXISTE UNA CORRELACION ENTRE DSA C1q + POS TX Y RECHAZO TEMPRANO MEDIADO POR ANTICUERPOS:

DSA pre Tx	DSA pos TX	AMR temprano
C1q positivo	C1q positivo	SI
C1q positivo	C1q negativo	NO
C1q negativo	C1q positivo	SI
C1q negativo	C1q negativo	NO

-EXISTE CORRELACION ENTRE DSA C1q + PERSISTENTE Y DISFUNCION DEL INJERTO A LARGO PLAZO.

-EXISTE CORRELACION ENTRE NEGATIVIZACION DE DSA C1q Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE RECHAZO.



**-FASE SOLIDA**

**-ESPECIFICIDAD- DSA**

**-FIJACION DE COMPLEMENTO**

**-ANTICUERPOS NO HLA**

# PREGUNTAS????

