





Resultados da Prova Cruzada por Citometria de Fluxo pelo Protocolo Halifax de Acordo com o MFI do Anticorpo e o Alvo HLA

Tiago Schiavo¹ , Juliana Montagner¹ , Elizete Keitel^{2,3} , Anna L. Greenshields⁴ ,
Robert S. Liwski⁴ , Jorge Neumann^{1,*} 

1. Santa Casa de Porto Alegre , Laboratório de Imunologia de Transplantes, Porto Alegre/RS, Brasil 2. Santa Casa de Porto Alegre , Serviço de Transplante Renal, Porto Alegre/RS, Brasil 3. Universidade Federal de Ciências da Saúde , Disciplina de Nefrologia, Porto Alegre/RS, Brasil. 4. Dalhousie University , Department of Pathology – Halifax/NS – Canadá.

*Autor correspondente: neumann.litx@gmail.com

Editora de seção: Ilka de Fátima Santana F Boin 

Recebido: Jan. 24, 2023 | Aceito: Fev. 27, 2023

Como citar: Schiavo T, Montagner J, Keitel K, Greenshields AL, Liwski RS, Neumann J. Resultados da Prova Cruzada por Citometria de Fluxo pelo Protocolo Halifax de Acordo com o MFI do Anticorpo e o Alvo HLA. BJT. 2023.26 (01):e1223. https://doi.org/10.53855/bjt.v26i1.500_PORT

RESUMO

Introdução: A principal estratégia para reduzir a imunogenicidade dos enxertos transplantados é buscar a máxima compatibilidade entre os aloantígenos no par doador-receptor. Entende-se que a prova cruzada virtual (VXM) pode ser uma boa ferramenta na avaliação da dupla doador/receptor e que uma aplicação mais ampla desses protocolos melhorará a avaliação do risco imunológico pré-transplante. O objetivo deste estudo foi correlacionar os resultados das provas cruzadas por citometria de fluxo (FCXM), observando os diferentes valores médios de intensidade de fluorescência (MFI) e o alvo dos anticorpos doador específicos (DSA), com a probabilidade de uma prova cruzada positiva. Usamos para isso o protocolo Halifax de prova cruzada por citometria de fluxo. **Métodos:** Foram realizados um total de 15.217 FCXM entre 2015 e 2019. Todos foram testados pelo protocolo Halifax Flow Cytometer Crossmatch (FCXM), com células de doadores falecidos e soro de receptores renais. Para esta análise, selecionamos apenas as amostras que apresentavam um ou dois DSAs por *locus* (N = 1.081) quando o MFI estava acima de 1.000. Esses foram divididos de acordo com o grupo alélico reconhecido pelo anticorpo (anti-HLA-A, B, C, DR ou DQ) observando a probabilidade de uma prova cruzada positiva com diferentes valores de MFI dos DSAs. As combinações entre eles também foram analisadas da mesma forma (N=175). **Resultados:** Na presença de um DSA exclusivo contra os grupos alélicos A, B e DR, com índice MFI acima de 5.000, todos os FCXM foram positivos. Com anticorpos exclusivamente contra os grupos C ou DQ, todos os casos com DSAs acima de 15.000 MFIs foram positivos. Com dois ou mais DSAs anti A e/ou B, e/ou DR, quando suas somas de MFIs excederam 5.000, todos os resultados de FCXM contra células B foram positivos. A presença de DSA anti-Classe I (A, B e A+B), independentemente do valor de MFI, foi responsável por 71% (N=424 de 601) da positividade de células T e 77% (N=460 de 661) nas células B. A presença apenas de DSAs anti Classe II (DR e DQ) foi responsável por 55% (N=168 de 303) da positividade FCXM em células B. A média geral do MFI dos DSAs foi maior no grupo FCXM positivo quando comparado ao crossmatch negativo. O grupo com somatória de DSAs A (N=217) mostrou que quando a soma era de 4.000 MFIs ou mais havia uma probabilidade 24 vezes maior de uma prova cruzada positiva de células B quando comparado com MFIs menores. **Conclusões:** Nossos resultados mostram uma forte associação entre o DSA MFI e o resultado do FCXM. Os dados aqui apresentados confirmam os resultados dos nossos estudos anteriores, justificando o padrão VXM utilizado pelo nosso centro, revelando-se uma boa ferramenta para agilizar a seleção de receptores de transplantes e facilitar a distribuição de órgãos de doadores nacionais.

Palavras-chave: Prova Cruzada; Citometria de Fluxo, Single Antigen Beads; Protocolo Halifax.

The Halifax flow Crossmatch Protocol Results According to the Class and MFI of the DSA

ABSTRACT

Introduction: The main strategy to reduce the immunogenicity of transplanted grafts is to seek maximum compatibility between alloantigens in the donor-recipient pair. It is understood that the virtual crossmatch (VXM) can be a good tool in the evaluation of the donor / recipient pair and that a broader application of these protocols will improve the pre-transplant immunological risk assessment. The aim of this study

was to correlate the physical flow crossmatches results, looking at different mean fluorescence intensity (MFI) values of the donor specific antibodies (DSA), and the probability of a positive crossmatch. We also aimed to validate this tool using a well standardized flow crossmatch protocol. **Methods:** We performed a total of 15,217 FCXM between 2015 and 2019. All were tested by the Halifax Flow Cytometer Crossmatch (FCXM) protocol, with cells from deceased donors and serum from renal recipients. For this analysis we selected only samples that had one or two DSA per *locus* (N = 1,081), when the MFI was above 1,000, and they were divided according to the allelic group recognized by the antibody (anti-HLA-A, B, C, DR or DQ) looking at the probability of a positive crossmatch with different MFI values of the DSAs. Combinations among them were also analyzed in the same way (N=175). **Results:** In the presence of an exclusive DSA against the allelic groups A, B and DR, with an index MFI above 5,000, all the FCXM were positives. With exclusively antibodies against groups C or DQ, all cases with DSAs above 15,000 MFIs were positives. With two or more DSAs anti A and/or B, and/or DR, when their MFIs sums exceeded 5,000, all FCXM results against B cells were positive. The presence of anti-Class I DSAs (A, B and A+B), regardless of the MFI value, was responsible for 71% (N=424 of 601) of the T cell positivity and 77% (N=460 of 661) in the B cell crossmatches. The presence of only anti-Class II DSAs (DR and DQ) accounted for 55% (N=168 of 303) of FCXM positivity in B cells. The overall mean of the MFI of the DSAs was higher in the FCXM positive group when compared to negative crossmatch. The group with sum of DSAs A (N=217) showed that when the sum was 4,000 MFI or higher, there was a 24 times higher probability for a positive B cell crossmatch when compared with lowers MFIs. **Conclusions:** Our results show a strong association between the DSA MFI and the FCXM result. The data here presented confirm the results of our previous studies, justifying the VXM standard used by our center, proving to be a good tool to streamline the selection of transplant recipients and facilitate the sharing of organs from national donors.

Descriptors: Virtual Crossmatch; Flow Cytometer Crossmatch, Single Antigen Beads; Halifax Protocol.

INTRODUÇÃO

Além de proporcionar melhor compatibilidade HLA entre o par doador e o receptor para a profilaxia de rejeições agudas e crônicas, é essencial avaliar a presença de anticorpos anti-HLA específicos (DSA) contra os antígenos do doador.¹

A introdução do ensaio - citotoxicidade dependente de complemento (CDC) como teste-padrão para a detecção de anticorpos pré-transplante anti-HLA foi o ponto de partida que culminou na melhoria subsequente dos testes imunogênicos. A citometria de fluxo cruzado usando o protocolo Halifax (FCXM), bem como a reatividade do painel por contas de antígenos únicos (SAB) e a melhoria da tipagem HLA são, atualmente, as principais ferramentas resultantes desta jornada evolutiva. O trabalho de Patel e Terasaki em 1969 foi, sem dúvida, o incitamento que lançou o campo dos testes clínicos de histocompatibilidade humana, abrindo o caminho para o desenvolvimento da prova cruzada (VXM- em inglês).¹⁻³

O ensaio FCXM usando o protocolo Halifax/Halifaster é significativamente mais sensível que os ensaios citotóxicos, permitindo uma melhor detecção de anticorpos HLA de baixo nível, melhorando, assim, a avaliação do risco imunológico pré-transplante.⁴⁻⁶

O VXM representa a mais recente evolução na análise dos anticorpos anti-HLA específicos de doadores (DSA). Ele combina o perfil de anticorpos (Ab) do receptor em comparação com os antígenos HLA (Ag) do doador para determinar a presença do DSA e prever o risco imunológico para um par doador-receptor. Usando esta ferramenta, é possível prever não apenas a possibilidade de um FCXM negativo, mas também quantificar a probabilidade de um teste positivo real. Sua importância é reduzir o tempo do teste e, conseqüentemente, reduzir o tempo de isquemia fria. Em muitos casos, o VXM pode ser a única prova cruzada pré-transplante, reduzindo testes desnecessários e despesas de laboratório.^{2,7}

Os parâmetros para um VXM positivo variam, dependendo das condições determinadas por cada laboratório, passando pelo limiar para distinguir entre negativo e positivo e a tolerância ao risco do centro de transplante. Em nosso hospital, temos um ponto de corte bem estabelecido para um VXM positivo. DSA com MFI igual ou maior a 5.000 contra antígenos HLA A, B e/ou DR e igual ou maior que 15.000 para HLA DQ são considerados VXM positivos com base em nossa experiência de prova cruzada física, portanto, desde 2011, não realizamos transplante renal em receptores com um ou mais DSA acima desses valores.⁸ Nosso hospital oferece um rim doador falecido para todos os pacientes, desde que o FCXM seja negativo, independentemente, da presença de DSA abaixo dos valores estipulados para o VXM. Esta definição é de fundamental importância, pois aumenta o acesso de nossos pacientes ao transplante, dependendo de um FCMX negativo e não de uma ausência total de DSA. Os transplantes de rins realizados sob estes parâmetros têm a mesma segurança que os transplantes realizados em sua ausência.⁸⁻¹⁰

O objetivo deste estudo foi correlacionar os resultados da prova cruzada por citometria de fluxo realizado na presença de DSA, com diferentes valores de MFI, e a probabilidade de uma prova cruzada positiva ou negativa devido a esses DSAs. Para isso, utilizamos o Protocolo Halifax, um protocolo de prova cruzada por citometria de fluxo bem validado e padronizado, como uma ferramenta para atingir este objetivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizamos um total de 26.316 provas cruzadas entre 2015 e 2019, incluindo VXM e FCXM. Destes, 15.217 foram testados pelo Protocolo Halifax de prova cruzada por citometria de fluxo, com células de doadores falecidos e soro de receptores renais. Para esta análise, selecionamos apenas amostras que tinham um ou dois DSA por *locus* (N = 1.081) e foram divididas conforme o grupo alélico em DSA anti-HLA-A, B, C, DR ou DQ. Também, foram analisadas diferentes combinações entre eles (N=175). Esses grupos são demonstrados na Fig. 1. Incluímos todos os anticorpos com uma fluorescência média de 1.000 ou mais.

Foram excluídos os soros com anticorpos alelo específicos, utilizando-se a MFI média na análise.

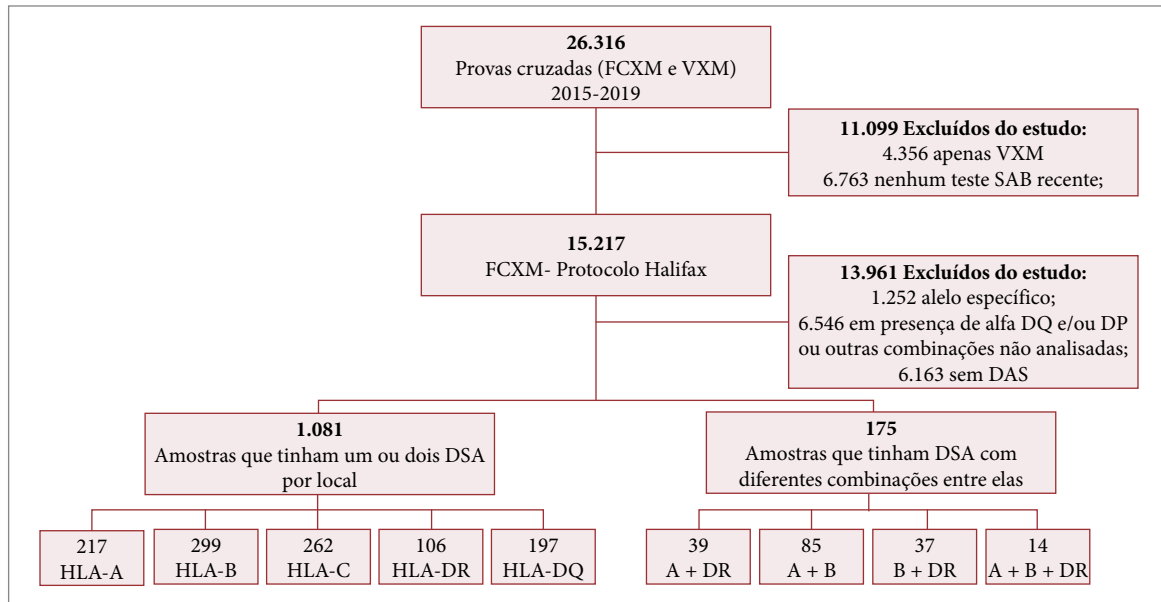


Figura 1. Fluxograma mostrando a coorte para este estudo.

Caracterização da DSA

Todos os anticorpos foram definidos, utilizando-se a técnica SAB e a plataforma Luminex (LABScreen SAB luminex assay OneLambda, EUA), e analisados com a utilização do software HLA FUSION (One Lambda, EUA). Anticorpos positivos foram considerados quando a MFI estava acima de 1.000. Todas as amostras de soro de pacientes foram tratadas por aquecimento a 56 °C durante 1 minuto antes do teste SAB. Procurou-se por DSAs específicos contra HLA-A, B, C, DR e DQ. O cálculo da reatividade contra o painel (cPRA) foi baseado no perfil HLA de uma coorte de referência de 2.000 doadores renais reais de nossa região, e os resultados foram expressos em porcentagens.

Os DSA foram categorizados pela série MFI: 1000 a 1.999, 2000 a 4.999 e igual ou superior a 5000 para os grupos HLA A, B e DR. Para os grupos HLA C e HLA DQ, foi, também, acrescentado o intervalo acima de 15.000. Foi calculada a média de IFM DSA do total e de cada grupo.

Tipagem HLA

A tipagem HLA foi realizada, utilizando PCR Micro SSP DNA Typing Trays (Sequence Specific Primers-One Lambda, EUA) ou LABType™ SSO Typing Test (oligonucleotídeo específico da sequência - One Lambda, EUA). Os testes foram realizados utilizando a plataforma Luminex (LABScreen SAB luminex assay OneLambda, EUA) e analisados utilizando o software HLA LABTYPE (One Lambda, EUA).

A Prova Cruzada por Citometria de Fluxo

O FCXM foi realizado utilizando o protocolo Halifax. Todos os soros analisados no pré-transplante, foram também testados pelo SAB.^{5,11}

As células dos doadores falecidos foram isoladas de amostras de gânglios linfáticos ou baço. Os linfócitos foram separados por gradiente de densidade e tratados com Pronase (0,5 mg/mL, sigma, St Louis, EUA). As células do doador e o soro do receptor foram incubados. Após lavagem foram depois marcados com um anti-CD3 (PerCP), anti-CD19 (PE), ambos da BD Biociências, e anti-IgG (FITC) dos Laboratórios Jackson. A análise foi realizada no FACSCanto II (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). A reação positiva foi determinada pelo cálculo da mudança média de canal em comparação com o controle negativo. O corte é de 75 e 115 canais de deslocamento para células T e B respectivamente, calculados com base na média de canais fluorescentes obtidos a partir de 2.400 provas cruzadas realizados entre pacientes reais em lista de espera sem DSA contra células de doadores reais, mais 2,5 desvios-padrão.

A média de mudança de canal (CS) também foi calculada quando o resultado do FCXM foi positivo.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 23). A significância estatística foi avaliada usando regressão linear, qui-quadrado ou Fisher's Exact, Student's T ou Wilcoxon-Mann-Whitney. Os valores para $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

A presença de DSAs, contra apenas um *locus* foi encontrada em 1.081 soros. Destes, 217 (20,1%) tinham DSA contra HLA A, 299 (27,6%) contra HLA B, 262 (24,2%) contra HLA C, 106 (9,8%) contra HLA DR e 197 (18,2%) contra HLA DQ (Fig. 2). Soros com dois ou mais DSAs contra diferentes *loci* totalizaram 175 amostras, com 85 (49%) anti-A e B, 39 (22%) anti-A e DR, 37 (21%) anti-B e DR e 14 (8%) anti- A e B e DR.

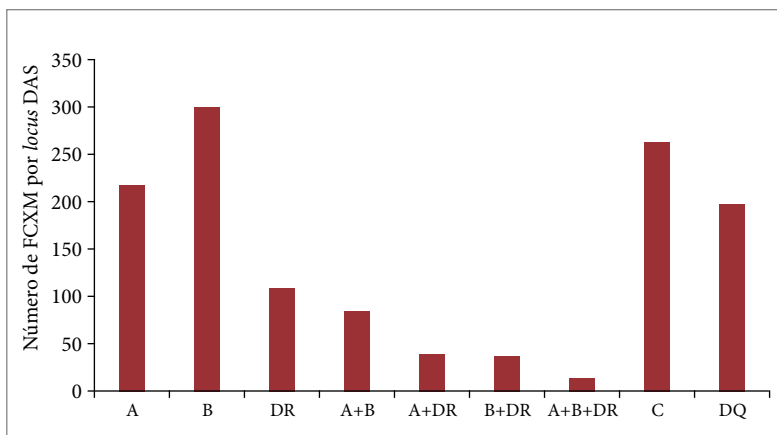


Figura 2. Prevalência de DSA por *locus* e prevalência de um ou mais DSA em diferentes *loci*.

Para todos os grupos estudados, observou-se um aumento de CS no FCXM tanto nas células T quanto nas células B, conforme o aumento da MFI. A exceção foram os anticorpos, anti-HLA-C que não mostraram uma progressão linear do CS com aumento da MFI.

Em grupos de anti-A, B ou DR, na presença de um DSA exclusivo acima de 5.000 MFI, todos os FCXM foram positivos. Nos grupos anti-C e DQ, todos os casos com DSAs com MFI acima de 15.000 tinham um FCXM positivo. Em grupos com dois ou mais DSAs anti-Classe I, quando suas somas excederam a MFI de 5.000, todos os resultados do FCXM foram positivos (Fig. 3).

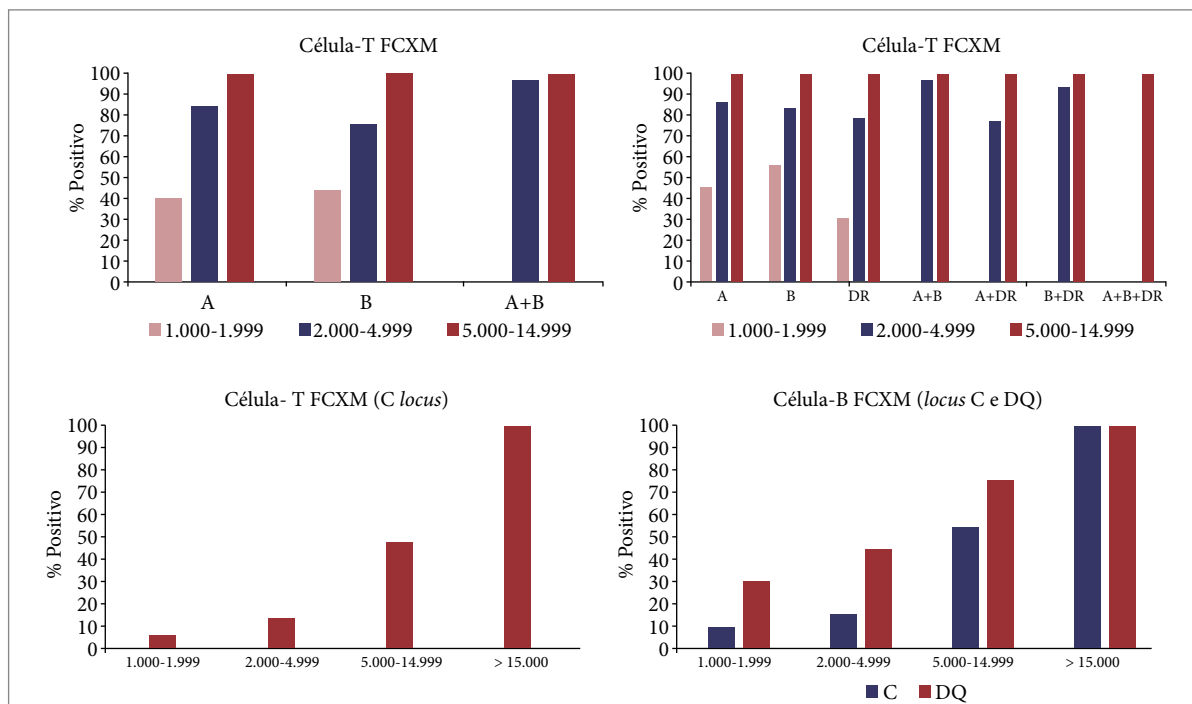


Figura 3. A relação entre CS e FCXM conforme o aumento da MFI do DSA.

A presença de DSAs anti-Classe I (A, B e A+B), independentemente do valor MFI, foi responsável por 71% (N=424 de 601) da positividade da célula T e 77% (N=460 de 661) nas provas cruzadas em células B. A presença de apenas DSAs anti-Classe II (DR e DQ) foi responsável por 55% (N=168 de 303) da positividade da FCXM nas células B.

A média geral das MFI DSAs foi mais alta no grupo FCXM positivo quando comparada com os testes negativos, como esperado.

O gráfico de análise de regressão logística do grupo com a soma de apenas DSAs é mostrado na Fig. 4. No grupo com anti-A, quando a soma dos DSAs atinge uma MFI de 4.987, há 99% de chance de um FCXM positivo.

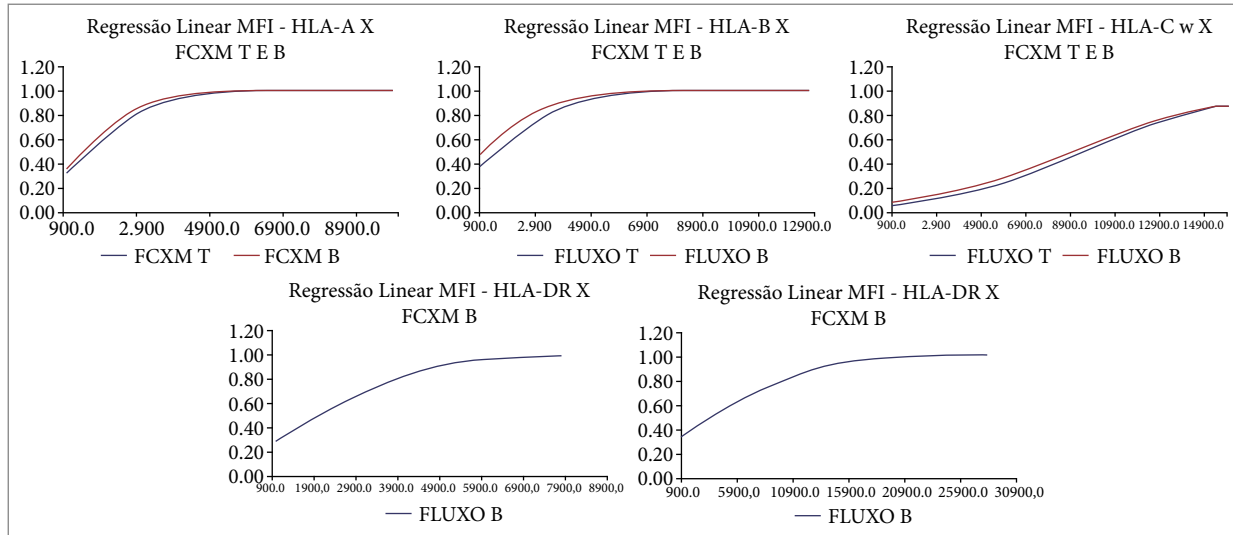


Figura 4. Análise de regressão logística.

A regressão logística binária foi calculada para avaliar a associação entre a MFI dos DSAs e o resultado do FCXM. Cada grupo foi analisado numa determinada faixa de MFI. Nos grupos com DSA HLA A, B e DR, as faixas foram divididas em: maiores que 2.000, 3.000 e 4.000. Nos grupos com HLA C e DQ, foram incluídas as faixas de MFI acima de 5.000 e 10.000. A Tabela 1 mostra o valor da razão de chances de cada grupo. O grupo com soma de DSAs A (217) mostrou que em pacientes, cuja soma é maior que 4.000, estes têm 24 vezes mais probabilidade de ter FCXM positivo em células- B quando comparado àqueles com MFIs mais baixas. O mesmo ocorre em todos os grupos estudados, com os valores encontrados sendo estatisticamente significativos (Tabela 1).

Tabela 1. O risco de um FCXM positivo nos grupos com diferentes gamas de DSA HLA A, B e DR.

| HLA | MFI | N | T FCXM | | | B FCXM | | |
|-----|--------|-----|--------|------------|-------|--------|-------------|-------|
| | | | RC | IC 95% | P | RC | IC 95% | P |
| A | >4000 | 44 | 13.9 | 3.2 - 59.4 | 0.000 | 24.0 | 3.2 - 178.6 | 0.002 |
| | >3000 | 74 | 9.4 | 3.8 - 23.1 | 0.000 | 9.4 | 3.6 - 24.7 | 0.000 |
| | >2000 | 126 | 9.3 | 4.8 - 18.1 | 0.000 | 9.3 | 4.6 - 18.6 | 0.000 |
| B | >4000 | 63 | 6.5 | 2.7 - 15.7 | 0.000 | 9.1 | 2.7 - 30.0 | 0.000 |
| | >3000 | 113 | 7.0 | 3.7 - 13.4 | 0.000 | 7.7 | 3.5 - 16.8 | 0.000 |
| | >2000 | 179 | 4.8 | 2.9 - 8.1 | 0.000 | 5.1 | 2.9 - 8.9 | 0.000 |
| | >10000 | 25 | 24.6 | 9.0 - 67.0 | 0.000 | 18.2 | 6.8 - 49.0 | 0.000 |
| C | >5000 | 53 | 10.4 | 5.1 - 21.2 | 0.000 | 10.0 | 5.0 - 20.0 | 0.000 |
| | >4000 | 68 | 11.4 | 5.5 - 23.5 | 0.000 | 9.8 | 5.0 - 19.1 | 0.000 |
| | >3000 | 92 | 8.8 | 4.2 - 18.6 | 0.000 | 7.6 | 3.8 - 14.9 | 0.000 |
| | >2000 | 133 | 6.0 | 2.7 - 13.6 | 0.000 | 4.5 | 2.2 - 9.0 | 0.000 |
| DR | >4000 | 11 | * | * | * | 5.4 | 1.1 - 26.5 | 0.036 |
| | >3000 | 22 | * | * | * | 4.7 | 1.6 - 14.1 | 0.005 |
| | >2000 | 38 | * | * | * | 9.9 | 3.7 - 26.1 | 0.000 |
| | >10000 | 50 | * | * | * | 9.6 | 3.6 - 25.6 | 0.000 |
| DQ | >5000 | 97 | * | * | * | 6.0 | 3.2 - 11.4 | 0.000 |
| | >4000 | 108 | * | * | * | 4.2 | 2.3 - 7.7 | 0.000 |
| | >3000 | 127 | * | * | * | 3.7 | 2.0 - 6.9 | 0.000 |
| | >2000 | 155 | * | * | * | 4.4 | 2.1 - 9.2 | 0.000 |

RC: razão de chances IC: intervalo de confiança MFI: valores médios de intensidade de fluorescência FCXM: prova cruzada por citometria de fluxo T: células T, B: Células B.

DISCUSSÃO

O VXM é definido como “uma avaliação de compatibilidade imunológica baseada no perfil dos aloanticorpos do paciente em comparação com os antígenos de histocompatibilidade do doador”.² Mais recentemente, devido a melhorias nas técnicas de tipagem HLA e identificação dos DSAs, o VXM tem vantagens consideráveis sobre a prova cruzada física. Em muitos casos, o VXM pode ser o único teste necessário ou mesmo possível na configuração pré-transplante.²

A disponibilidade do VXM, algumas vezes, suprimindo a necessidade de uma prova cruzada física, demonstrou diminuir o tempo de isquemia fria e, por conseguinte, a mortalidade na lista de espera para receptores de transplante de pulmão e coração. Além disso, esta ferramenta desempenha um papel importante para aumentar a probabilidade de encontrar um doador adequado para receptores hipersensibilizados, resultando em transplantes bem-sucedidos.¹²⁻¹⁴

Os parâmetros para um VXM positivo variam, dependendo das condições determinadas por cada laboratório, entre essas o limiar para distinguir entre negativo e positivo e a tolerância ao risco do centro de transplante. Em nosso hospital, temos um ponto de corte bem estabelecido para um VXM positivo. DSAs com MFI igual ou maior que 5.000 contra antígenos HLA A, B e/ou DR e igual ou maior que 15.000 para HLA DQ são considerados VXM positivos com base em nossa experiência em provas cruzadas físicas por citometria de fluxo e, por isso, desde 2011, não realizamos transplante renal em receptores com um ou mais DSA acima desses valores.⁸ Nosso hospital oferece um rim doador falecido para todos os pacientes, desde que o FCXM seja negativo, independentemente da presença de DSA abaixo dos valores estipulados para o VXM. Esta definição é de fundamental importância, pois aumenta o acesso de nossos pacientes ao transplante, dependendo de um FCXM negativo e não de uma ausência total de DSAs. Os transplantes de rins realizados sob estes parâmetros têm a mesma segurança que os transplantes realizados em sua ausência.⁸⁻¹⁰

Nos casos de anti-HLA-C, os resultados previram de forma confiável o FCXM positivo somente com valores de MFI a partir de 10.000, sendo 100% (Fig. 5).^{8,15} Os resultados aqui apresentados mostram uma excelente associação entre o valor de MFI DSA e o resultado FCXM, conforme a prática já adotada em nosso centro.

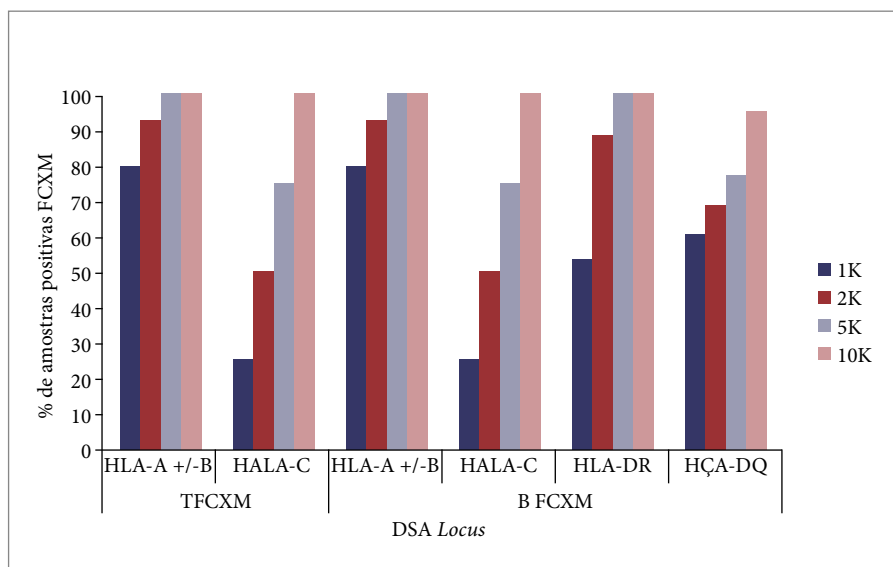


Figura 5. Correlação entre a prova cruzada virtual e a prova física por citometria de fluxo em nosso estudo anterior.

VXM: prova cruzada virtual; FCXM: prova cruzada de citometria de fluxo

Embora a diferença no nível de expressão dos antígenos HLA-C, em comparação com o HLA A e HLA B, esteja bem documentado, poderíamos especular que os antígenos HLA-C poderiam ser menos imunogênicos que o HLA-A e B, mas eles devem ser sempre considerados, especialmente quando detectados antes do transplante.¹⁶ A ocorrência de algumas reações FCXM que não responderam de forma dependente de MFI pode ser um reflexo da carga epitópica do alelo imunizante anterior causando uma reação imunológica inesperada em relação à célula alvo.^{17,18} Um estudo mais detalhado sobre a expressão de cada alelo, assim como sua carga epitópica em relação ao hospedeiro, deve ser realizado a fim de observar seu impacto na relação com o FCXM. A expressão HLA é regulada geneticamente e pode levar a determinadas variações nos níveis de expressão que podem ter relevância clínica.¹⁶⁻¹⁹

Os resultados apresentados também mostram que na presença de DSA A, B, C, DR e DQ de um valor igual ou maior que 4.144, 4.502, 14.901, 4.563 e 14.587 MFI, respectivamente, têm 100% de especificidade no FCXM B (resultados da curva ROC, dados apresentados na

Tabela Complementar). Poucos estudos estão disponíveis fornecendo dados sobre o possível impacto de diferentes níveis de expressão HLA no FCXM.¹⁶⁻¹⁹ Nossos dados mostram que é seguro prever um FCXM positivo considerando os valores de MFI acima.

Em nosso Estado do Sul do Brasil (RS), 43% dos transplantes com doadores falecidos são oferecidos por doadores nacionais, muitas vezes associados a um longo tempo de isquemia fria e, conseqüentemente, vemos um número significativo de funções de enxerto retardado (DGF). Ambos, DSA e DGF são fatores de risco conhecidos para pior sobrevivência do enxerto.²⁰ Neste contexto, o VXM pode ser uma boa ferramenta para agilizar a seleção do receptor pré-transplante e facilitar o compartilhamento de órgãos em distâncias maiores. É digno de nota que o VXM pode ser uma barreira ao transplante dependendo do ponto de corte adotado por cada centro, especialmente quando são usados pontos de corte de MFI baixos para atribuir antígenos inaceitáveis. Em nosso centro, realizamos 162 transplantes de rim com um doador falecido entre 2020 e 2021. Destes, 43 (26,54%) vieram de ofertas nacionais usando a ajuda de nosso VXM, ou seja, não aceitamos doadores contra DSAs que darão uma prova cruzada física com 100% de probabilidade de ser positiva, e procedemos com o transplante quando temos um receptor sem DSA detectável, realizando a prova cruzada física retrospectivamente. Este procedimento resultou em uma economia de tempo muito significativa, resultando em menores tempos de isquemia fria nos casos de prova cruzada virtual negativa e um melhor destino para os rins que não poderiam ser utilizados por nós devido a um VXM positivo.²¹

Devido à natureza complexa de sua interpretação, os limites de MFI são, na maioria das vezes, específicos de cada centro transplantador. Como tal, a variabilidade desses limites pode ser atribuída aos protocolos do teste, à experiência do analista de laboratório e à prática clínica local. É de suma importância compreender que a ligação de anticorpos às *beads* ou a ligação de anticorpos secundários ao anticorpo anti-HLA pode ser afetada por diferentes fatores. Por exemplo, é conhecido o papel do complemento contribuindo para um efeito inibitório, coloquialmente chamado “efeito prozona”. Ao tratar as amostras de soro com ácido etilendiaminotetracético (EDTA), dithiothreitol (DTT) ou aquecimento antes de realizar o ensaio (artigo submetido), a maioria do efeito inibitório pode ser eliminada ou substancialmente reduzida.^{22,23} Então, uma correlação cuidadosa e criteriosa entre a detecção da DSA torna-se extremamente importante, tanto do ponto de vista técnico do teste SAB como do ponto de vista clínico, na escolha do corte para determinar um nível de DSA aceitável.

Na outra ponta do espectro, ou seja, qual é a probabilidade de uma prova cruzada física ser negativa na presença de DSAs, descobrimos que mesmo em pacientes com um cPRA de 99 a 99,9% há uma probabilidade de uma prova cruzada física ser negativa na presença de um DSA anti-HLA-A, B, C ou DR, e esta é a razão pela qual realizamos uma prova física quando a MFI do DSA está entre 1.000 e 4.999. Resultados anteriores de um estudo em andamento em nosso centro não mostraram diferença na sobrevida de pacientes e enxertos até quatro anos de seguimento, bem como na função renal, em pacientes transplantados com ou sem DSA, desde que fossem negativos para FCXM.⁹ Isto ressalta a alta sensibilidade de nosso centro em prever uma compatibilidade imunológica entre doador e receptor, aumentando o acesso ao transplante para pacientes hipersensibilizados. Além disso, os dados aqui apresentados mostram que os DSAs anti-HLA A ou B com uma MFI de até 2.900 têm uma chance de 20% de uma prova cruzada física ser negativa. Os DSAs anti-HLA DR com este mesmo valor de MFI são em média 35% negativos, anti-HLA DQ 55% e anti-HLA C 85% negativos a este valor de MFI.

Além disso, também destaca a importância da padronização correta para análise do VXM e sua correlação com o FCXM, não apenas para detectar um DSA de alto risco, mas também para detectar um DSA fraco e provavelmente de baixo risco. Acreditamos que nem todos os DSAs são iguais e nem todos têm a mesma imunopatogenicidade. Consideramos que a presença de DSA contra epítomos crípticos pode explicar alguns de nossos resultados, enfatizando a importância da análise epitópica, que deve ser incluída na configuração do VXM.^{2,9}

Em geral, um VXM negativo está associado a um FCXM negativo e, inversamente, um DSA de alto nível está associado a um FCXM positivo. Entretanto, é importante estar atento a casos incomuns, onde pode haver divergências não apenas na linearidade da razão MFI x FCXM positivo, mas também com resultados falso positivos ou negativos. Em uma situação onde temos a presença de DSA combinado com um FCXM negativo, deve-se identificar padrões de *beads* com alvos HLA desnaturados, ou antígenos crípticos, e implementar análise de epítomos para confirmar a presença ou ausência de um verdadeiro anticorpo anti-HLA com potencial patogênico. Por outro lado, as razões para FCXM falso positivo (na ausência de DSA) não são tão facilmente identificáveis. A expressão tecidual dos antígenos HLA pode ser variável e impossível de prever. Questões como infecção pelo HIV, doenças autoimunes e regimento imunossupressor também podem levar a reações falso-positivas e, alternativamente, existe a rara possibilidade de um paciente ter um anticorpo anti-HLA contra um alelo não representado nos testes de painel atuais.² Em nosso centro, temos uma taxa de FCXM falso positivo muito baixa (2,6%).

Idealmente, todo DSA deveria ser evitado, mas isto é muitas vezes impraticável no contexto de um determinado transplante. Em vez disso, o clínico deve estimar o risco de rejeição do enxerto em cada situação, contra o risco de não ser transplantado.^{24,25}

Embora alguns estudos difiram em seus resultados, atualmente a força da DSA expressa em MFI no momento do transplante é considerada um fator de risco para a ocorrência de AMR precoce e falha do aloenxerto.^{26,27}

Nossos critérios para VXM são ilustrados na Fig. 6. Só exercitamos o VXM em nossos transplantes quando temos uma tipagem de doador que inclui HLA-A, B, C, DR e DQ. Isto se tornou muito mais frequente nos últimos cinco anos. Como o HLA-DP não é tipado como rotina em nenhum doador de órgãos sólidos no Brasil, quando nosso receptor tem anti HLA-DP, não podemos fazer um virtual. Com pacientes com um cPRA de 0%, assume-se que o VXM é negativo. Isso quando a mais recente análise de cPRA (<120 dias), sem evento imunizante neste período, mostra ausência de qualquer DSA conhecido.

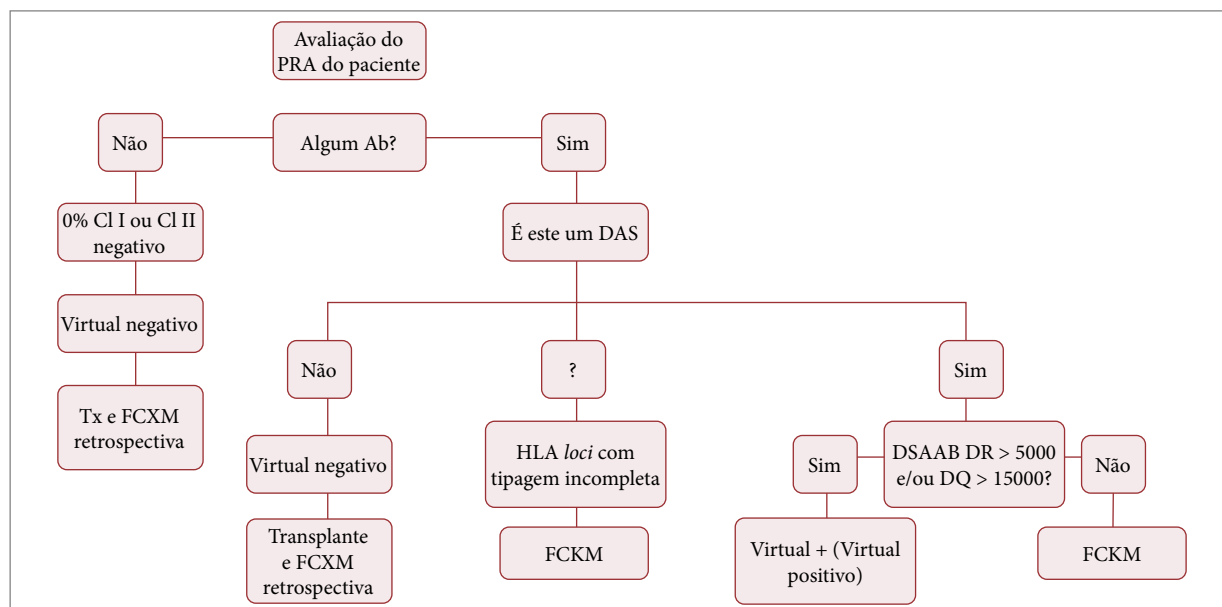


Figura 6. A estratégia VXM da Santa Casa para estratificação de risco.

Entretanto, a prova cruzada física é realizada mesmo na presença de altos níveis de DSAs em pacientes, com algum tipo de urgência médica para transplante renal. Estes são casos em que a equipe médica avalia o risco imunológico em relação ao clínico, assumindo o risco de transplante mesmo com um FCXM fracamente positivo. São situações em que o risco para o paciente não transplantar é maior do que o risco de rejeição.

Consciente da necessidade de reduzir o tempo de teste pré-transplante, desenvolvemos um sistema computadorizado para processar os dados imunológicos relevantes relativos à lista de espera e a um determinado doador falecido. Os dados de HLA do doador são comparados com o perfil de anticorpos anti-HLA do paciente, com intuito de avaliar se eles têm algum DSA pré-formado e caracterizá-los de acordo com nosso algoritmo de VXM (Fig. 5). Usando esta ferramenta, obtivemos uma redução do tempo de uma média de 40 minutos (quando feito manualmente) para <5 minutos com o software (-82%), além de eliminar possíveis erros manuais.²⁸

Nosso centro oferece a oportunidade de todos os pacientes da lista receberem um transplante independentemente da presença de DSAs, desde que o FCXM seja negativo ou mesmo positivo sob avaliação da relação risco/benefício. A definição do VXM é de fundamental importância, pois agiliza toda a avaliação imunológica e oferece uma ferramenta para uma melhor avaliação do risco.^{9,20}

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram uma forte associação entre a DSA MFI e o resultado do FCXM. Os dados aqui apresentados confirmam os resultados de nossos estudos anteriores, justificando o padrão VXM utilizado por nosso centro, provando ser uma boa ferramenta para agilizar a seleção dos receptores de transplante e facilitar o compartilhamento de órgãos de doadores nacionais.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Contribuições científicas e intelectuais substantivas para o estudo: Schiavo, T.; Montagner, J.; Keitel, E.; Greenshields, A.L.; Liwski, R.S.; Neumann, J.; **Concepção e design:** Schiavo, T.; Montagner, J.; Keitel, E.; Greenshields, A.L.; Liwski, R.S.; Neumann, J.; **Análise e interpretação de dados:** Schiavo, T.; Liwski, R.S.; Neumann, J.; **Artigo escrito:** Schiavo, T.; Greenshields, A.L.; Neumann, J.; **Revisão crítica:** Liwski, R.S.; Neumann, J.; **Aprovação final:** Neumann, J.

DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Todos os dados foram gerados neste estudo e estão disponíveis sob solicitação.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse que possam interferir nos resultados

FINANCIAMENTO

Não aplicável

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi possível devido à dedicação competente do pessoal do Laboratório de Imunologia de Transplante do Hospital Santa Casa que gerou todos os dados brutos aqui estudados.

REFERÊNCIAS

1. Liwski RS, Greenshields AL, Bray RA, Gebel HM. Becoming a chef in the human leukocyte antigen kitchen: Interpretation and modification of human leukocyte antigen-antibody assays. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22(4):407-14. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000423>
2. Morris AB, Sullivan HC, Krummey SM, Gebel HM, Bray RA. Out with the old, in with the new: Virtual versus physical crossmatching in the modern era. *HLA*. 2019;94(6):471-81. <https://doi.org/10.1111/tan.13693>
3. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280(14):735-9. <https://doi.org/10.1056/NEJM196904032801401>
4. Gebel HM, Bray RA. The evolution and clinical impact of human leukocyte antigen technology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19(6):598-602. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32833dfc3f>
5. Liwski RS, Greenshields AL, Conrad DM, Murphey C, Bray RA, Neumann J, Gebel HM. Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols, *Hum Immunol*. 2018;79(1):28-38. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.10.020>
6. Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, Pochinco D, Birk P, Nickerson P. Flow Cytometric Crossmatching in Primary Renal Transplant Recipients with a Negative Anti-Human Globulin Enhanced Cytotoxicity Crossmatch. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12) 2807-14.
7. Bray RA, Nolen JDL, Larsen C, Pearson T, Newell KA, Kokko K, Guasch A, Tso P, Mendel JB, Gebel HM, Transplanting the Highly Sensitized Patient: The Emory Algorithm. *Am J Transplant*. 2006;6(10):2307-15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01521.x>
8. Montagner J, Tarasconi H, Wurdig J, Keitel E, Liwski R, Neumann J. OR6 The positive virtual crossmatch. Correlation between HLA DSA and flow cytometry crossmatch results. *Hum Immunol*. 2016;77(Suppl):6. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.07.018>
9. Neumann J, Montagner J, Schiavo T, Keitel E, Garcia V. OR45 Is it safe to transplant a kidney from deceased donors in the presence of DSAs But with a negative flow cross match? *Hum Immunol*. 2018;79(Suppl):50. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.07.050>
10. Carvalho L, Machado O, Seelig D, Michelon T, Santos A, Goldani J, Garcia V, Neumann J, Bruno R, Keitel E. Impact of Anti-HLA Donor Specific Antibodies (DSA) in the Survival and Function of Renal Graft [abstract]. *Am J Transplant*. 2013;13(Suppl 5). [cited 2022 Jan 19]. Available from: <https://atcmeetingabstracts.com/abstract/impact-of-anti-hla-donor-specific-antibodies-dsa-in-the-survival-and-function-of-renal-graft/>
11. Liwski R, Montagner J, Neumann J. P137 Go pro(nase)! the importance of donor lymphocyte treatment with pronase in flow cytometric crossmatch testing. *Hum Immunol*. 2018;79(Suppl):162. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.07.194>
12. Appel JZ, Hartwig MG, Cantu E, Palmer SM, Reinsmoen NL, Davis RD. Role of Flow Cytometry to Define Unacceptable HLA Antigens in Lung Transplant Recipients with HLA-Specific Antibodies. *Transplantation*. 2006;81(7):1049-57. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000204046.89396.c5>
13. Zangwill SD, Ellis TM, Zlotocha J, Jaquiss RD, Tweddell JS, Mussatto KA, Berger S. The virtual crossmatch - A screening tool for sensitized pediatric heart transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2006;10(1):38-41. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2005.00394.x>
14. Hiho SJ, Levvey B, Carroll R, Nicolson I, Mihaljcic M, Diviney MB, Snell GI, Sullivan LC, Westall GP, The clinical utility and thresholds of virtual and Halifaster flow crossmatches in lung transplantation. *HLA*. 2022;99(6):580-9. <https://doi.org/10.1111/tan.14613>
15. Alegre P. Correlação dos níveis de anticorpos ANTI-HLA de classe I e II doador específicos detectados por ensaio de fase sólida com os resultados das provas cruzadas no pré-transplante renal. Porto Alegre. Dissertation [Master in Medicine and Health Sciences] – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2015. [cited 2021 June 17]. Available from: <https://repositorio.pucrs.br/dspace/handle/10923/7312>
16. Visentin J, Couzi L, Taupin JL. Clinical relevance of donor-specific antibodies directed at HLA-C: A long road to acceptance. *HLA*. 2021;97(1):3-14. <https://doi.org/10.1111/tan.14106>
17. Hönger G, Krähenbühl N, Dimeloe S, Stern M, Schaub S, Hess C. Inter-individual differences in HLA expression can impact the CDC crossmatch. *Tissue Antigens*. 2015;85(4):260-6. <https://doi.org/10.1111/tan.12537>

18. Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM. The flow cytometric crossmatch. Dual-color analysis of T cell and B cell reactivities, Transplantation. 1989;48(5):834-9. <https://doi.org/10.1097/00007890-198911000-00022>
19. Apps R, Qi Y, Carlson JM, Chen H, GAO XJ, THOMAS R, et al. Influence of HLA-C Expression Level on HIV Control. Science. 2013;340(6128):87-91. <https://doi.org/10.1126/science.1232685>
20. Silva CK, Meinerz G, Bruno RM, Abud J, Montagner J, Dorsdt DMB, Coutinho AK, Neumann J, Garcia VD, Keitel E. Late impact of preformed anti-HLA antibodies on kidney graft outcome. Transpl Immunol. 2019;55:101212. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2019.06.004>
21. Abud J, Pupo BBD, Silva C, Keitel E, Garcia VD, Manfro RC, Neumann J. Phasing out the pre-transplant cytotoxicity crossmatch: Are we missing something? J Bras Nefrol. 2021;43(3):365-74. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2019-0222>
22. Tambur AR, Wiebe C. HLA Diagnostics: Evaluating DSA Strength by Titration. Transplantation. 2018;102(1S):S23-30. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001817>
23. Schwaiger E, Wahrmann M, Bond G, Eskandary F, Böhmig GA. Complement Component C3 Activation: The Leading Cause of the Prozone Phenomenon Affecting HLA Antibody Detection on Single-Antigen Beads. Transplantation. 2014;97(12);1279-85. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000441091.47464.c6>
24. Niederhaus SV, Leveson GE, Lorentzen DF, Robillard DJ, Sollinger HW, Pirsch JD, Torrealba JR, Odorico JS. Acute Cellular and Antibody-Mediated Rejection of the Pancreas Allograft: Incidence, Risk Factors and Outcomes. Am J Transplant. 2013;13(11):2945-55. <https://doi.org/10.1111/ajt.12443>
25. Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting Anti-HLA Antibody Testing Data A Practical Guide for Physicians. Transplantation. 2016;100(8):1619-28. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001203>
26. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. Transplantation. 2009;87(11):1681-8. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a5e034>
27. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Nochy D, Andrade J, Antoine C, Gautreau C, Charron D, Glotz D. Clinical Relevance of Preformed HLA Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplantation. Am J Transplant. 2008;8(2):324-31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.02072.x>
28. Schiavo T, Montagner J, Leal R, Gil N, Neumann J. Protocolo Informatizado para Análise de Anticorpos - PIAA: um plano para diminuir o tempo de isquemia fria em transplante renal no nosso centro. Presented at XVI Congresso Brasileiro de Transplantes. 2019. [cited 2021 May 13]. Available from: <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgihttps://sistemaparaevento.com.br/evento/abto2019/trabalhosaprovados/naintegra/13095>

TABELA SUPLEMENTAR

A tabela mostra que o aumento na MFI do DSA segue o aumento da especificidade em todos os grupos. As faixas de especificidade foram estabelecidas em 75 e 100% e em grupos com mais de um DSA, 95 e 100%.

| | MFI | FCXM T | | Area | I.C. 95% |
|-------------|-------|---------------|----------------|-------|---------------|
| | | Sensibilidade | Especificidade | | |
| A (N=217) | 1878 | 0.233 | 0.750 | 0.800 | 0.740 - 0.860 |
| | 4827 | 0.890 | 1.000 | | |
| B (N= 299) | 2321 | 0.335 | 0.750 | 0.741 | 0.685 - 0.798 |
| | 4742 | 0.838 | 1.000 | | |
| C (N= 262) | 3162 | 0.0239 | 0.750 | 0.810 | 0.728 - 0.892 |
| | 14901 | 0.913 | 1.000 | | |
| DR (N= 106) | * | * | * | * | * |
| | * | * | * | | |
| DQ (N= 197) | * | * | * | * | * |
| | * | * | * | | |
| | MFI | FCXM B | | Area | I.C. 95% |
| | | Sensibilidade | Especificidade | | |
| A (N=217) | 1803 | 0.240 | 0.750 | 0.804 | 0.744 - 0.863 |
| | 4144 | 0.740 | 1.000 | | |
| B (N= 299) | 2302 | 0.369 | 0.750 | 0.744 | 0.685 - 0.804 |
| | 4502 | 0.815 | 1.000 | | |
| C (N= 262) | 3036 | 0.278 | 0.750 | 0.782 | 0.703 - 0.862 |
| | 14901 | 0.926 | 1.000 | | |
| DR (N= 106) | 1746 | 0.288 | 0.750 | 0.743 | 0.648 - 0.839 |
| | 4563 | 0.865 | 1.000 | | |
| DQ (N= 197) | 4397 | 0.328 | 0.750 | 0.759 | 0.693 - 0.825 |
| | 14587 | 0.828 | 1.000 | | |