

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

HELOISA RIEGER TARASCONI

**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  
2015

HELOISA RIEGER TARASCONI

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

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Doutor David Saitovitch

Porto Alegre  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T177c Tarasconi, Heloisa Rieger

**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. / Heloisa Rieger Tarasconi. – Porto Alegre, 2015.**  
**44f. Gráf.; tab.; il.**

Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. David Saitovitch

1. Transplante de Rim. 2. Antígenos HLA. 3. Anticorpos. 4. Citometria de Fluxo. I. Saitovitch, David. II. Título.

**CDD 617.4610592**

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

Ao meu pai e minha mãe, pelo carinho, dedicação e amor ( In Memoriam)

Ao meu amor, Alessandro, pela paciência, apoio irrestrito, carinho e compreensão em todos os momentos, e principalmente pelo amor e dedicação à minha avó durante minhas ausências.

A minha amiga Sandra, pela amizade e auxílio fundamental neste trabalho.

A minha amiga Andréa, pelo incentivo e carinho.

Ao meu colega Joao Batista, pela amizade e compreensão.

Ao Dr. Jorge Neumann, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio e incentivo e pela orientação na realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. David Saitovicht, pela confiança e orientação.

Aos meus colegas do laboratório de Imunologia de Transplantes

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, estiveram presentes na realização deste trabalho.

## **LISTA DE SIGLAS**

**AAMR** – Rejeição aguda mediada por anticorpo

**AGH** – Antiglobulina humana

**AMR**- Rejeição mediada por anticorpo

**CDC** – citotoxicidade dependente de complemento

**CPH** – complexo principal de histocompatibilidade

**DSA** – Anticorpo doador específico

**DTT** - ditionitrito

**HLA** – Antígeno Leucocitário Humano

**IgG** - imunoglobulina classe G

**IgM** – imunoglobulina classe M

**MFI** – Média de Intensidade de Fluorescência

**PRA** – Reatividade contra Paine

**RA** – Rejeição Aguda

**SAB** – Single Antigen Beads

**SPA** – Solid Phase Assay (teste de fase sólida)

**XMCF** – prova cruzada por citometria de fluxo

**XMV** – Prova Cruzada Virtual

## RESUMO

**Introdução:** A busca por testes seguros que possam prever a rejeição mediada por anticorpo em transplantes de órgãos tem sido contínua e a prova cruzada por citotoxicidade dependente de complemento, desenvolvida na década de 60, até pouco tempo era considerada padrão ouro e principal teste preditor de rejeição. Os novos métodos de aferição da imunidade humoral, notadamente a prova cruzada por citometria de fluxo e a tecnologia Luminex®, aumentaram significativamente a sensibilidade destas avaliações, mas também a complexidade na interpretação destes resultados, assim como na correlação das diferentes metodologias. Embora bastante sensível, nem todo anticorpo doador específico detectado pelo teste de fase sólida resulta em uma prova cruzada positiva ou com rejeição. As informações obtidas com as especificidades (assim como a intensidade de fluorescência) dos anticorpos anti-HLA podem definir o risco imunológico do paciente, auxiliando a escolha do doador ideal, bem como do esquema imunossupressor, tanto profilático quanto terapêutico.

**Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi estabelecer um ponto de corte no nível de fluorescência de anticorpos detectados pelo painel *Single Antigen Beads* de classe I e II que se correlacione com a prova cruzada positiva por citometria de fluxo (XMCF). Também objetivou-se avaliar se existem diferenças entre o emprego de apenas DSAs com maior MFI e a soma de todos os DSAs de um determinado paciente.

**Metodologia:** Foi realizado estudo transversal de dois bancos de dados de resultados de Painéis (Luminex®) e prova cruzada por citometria de fluxo de pacientes em lista de espera para transplante renal cadastrados no Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O banco número 1 era composto de 1316 provas cruzadas contra doadores falecidos e painéis de anticorpos anti-HLA dos *loci* A, B e DRB1, realizados no ano de 2010. O banco número dois era composto de 2288 provas cruzadas contra doadores falecidos e painéis de anticorpos anti-HLA dos *loci* C e DQB1 realizadas entre julho de 2013 e julho de 2014. Como critério de inclusão para ambos os bancos de dados foram utilizadas somente amostras que possuíam resultados de Painel na mesma data do soro testado nas provas cruzadas por citometria de fluxo, resultando em 834 amostras no banco de número 1. Além disso, para o banco de dados número 2 foram utilizados apenas

amostras que possuíam anticorpo específico contra o doador (DSA) dos *loci* C e ou DQB1, resultando em 348 provas cruzadas.

**Resultados e Conclusões:** demonstramos que 97,6% dos pacientes com DSAs anti-HLA- ABDRB1 com  $MFI \geq 5000$  resultaram em XMCF positiva. Os níveis de MFI nesta faixa corresponderam aos melhores pontos de corte de escolha quando avaliamos a sensibilidade e especificidade para a correlação com a prova cruzada positiva por citometria de fluxo. Para os DSAs HLA-DQB1, níveis de fluorescência acima de 15.000 MFI ofereceram elevada especificidade (97,8%). A sensibilização anti-HLA-C é menos frequente ( $n=40$ ). Apenas 5 pacientes apresentaram  $MFI \geq 5000$ . Destes, apenas em um (20%) a prova cruzada foi positiva. A prova cruzada virtual é um recurso que pode auxiliar na tomada de decisões pré-transplante renal.

**Palavras chaves:** Prova cruzada Virtual; Anticorpo doador-específico, Citometria de fluxo: Média de intensidade de fluorescência.

## ABSTRACT

**Introduction:** There has been a continuous search for safe tests that can predict antibody-mediated rejection in organ transplants, and the positive complement dependent cytotoxic crossmatch, developed in the 1960's, was until recently considered the gold standard and the main test for prediction of rejection. The new methods for assessing humoral immunity, notably flow cytometric crossmatching and the Luminex® technology significantly increased the sensitivity of these assessments, but also the complexity in the interpretation of these results, as well as in the correlation of different methodologies. Despite the sensitivity of these methods, not any donor-specific antibody detected by solid phase assay results in positive or negative crossmatch. Information obtained with the specificities (such as fluorescence intensity) of anti-HLA antibodies may define the immunological risk for the patient, assisting in the selection of the ideal donor, as well as in the immunosuppressive regimen, for prophylactic and therapeutic uses.

**Objectives:** The present study aimed to establish a cut-off point at the fluorescence intensity of antibodies detected by the panel *Single Antigen Beads* of class I and II that correlates to positive flow cytometric crossmatching (FCXM). It also aimed to assess whether there are differences between the use of DSAs with higher MFI alone and the sum of all the DSAs of a given patient.

**Methodology:** A cross-sectional study of two databases of results of panels (Luminex®) and flow cytometric crossmatching of patients on a waiting list for kidney transplantation registered at the *Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Misericórdia*, in Porto Alegre. Database 1 was composed of 1,316 crossmatches against deceased donors and panels of anti-HLA antibodies for *loci* A, B and DRB1 performed in 2010. Database 2 was composed of 2,288 crossmatches against deceased donors and panels of anti-HLA antibodies for *loci* C and DQB1 performed between July 2013 and July 2014. As an inclusion criterion for both databases, only samples with results available in the Panel on the same date of the serum tested in flow cytometry crossmatches were used resulting in 834 samples in database 1. Besides, for database 2 only samples with donor-specific antibody (DSA) for *loci* C and or DQB1, resulting in 348 crossmatches.

**Results and Conclusions:** we demonstrated that 97.6% of the patients with DSAs anti-HLA- ABDRB1 with MFI  $\geq$  5000 resulted in positive FCXM. These were the

optimal MFI cut-off values for donor selection when we assessed sensitivity and specificity for correlation with positive flow cytometric crossmatching. For DSAs HLA-DQB1, fluorescence intensities above 15,000 MFI offer high specificity (97.8%). Anti-HLA-C sensitization is less frequent (n=40). Only 5 patients showed MFI $\geq$ 5000. Of these, the crossmatch was positive in only one patient (20%). Virtual crossmatch is a resource that can assist in making pre-kidney transplantation decisions.

**Keywords:** Virtual crossmatch; Donor-specific antibody, Flow cytometry: Mean fluorescence intensity.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos e características do doador falecido	26
Tabela 2 - Frequência dos grupos de acordo com o nível de MFI dos resultados do Painel SAB	27
Tabela 3 - Correlação entre prova cruzada virtual e prova cruzada por citometria de fluxo em relação aos anticorpos HLA-ABDRB1	28
Tabela 4 - Correlação entre prova cruzada virtual e prova cruzada por citometria de fluxo HLA-DQB1	28
Tabela 5 - Correlação entre prova cruzada virtual e prova cruzada por citometria de fluxo em relação aos anticorpos HLA-C	29
Tabela 6 - Análise Curva ROC DSA HLA AB x XMCF T	30
Tabela 7 - Análise Curva ROC DSA HLA-AB x XMCF B	31
Tabela 8 - Análise Curva ROC DSA HLA- DRB1 x XMCF B	33
Tabela 9 - Análise Curva ROC DSA HLA-ABDRB1 x XMCF T	34
Tabela 10 - Análise Curva ROC DSA HLA-ABDRB1 x XMCF B	35
Tabela 11 - Análise Curva ROC DSA HLA-DQB1 x XMCF B	37
Tabela 12 - Análise de anticorpos conforme os níveis de MFI determinados	39

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura gênica do MHC ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )	14
Figura 2 - Estrutura da molécula HLA classe I	15
Figura 3 - Estrutura da molécula HLA classe II	15
Figura 4 - Curva ROC DSA HLA AB x XMCF T	30
Figura-5 - Curva ROC DSA HLA- AB x XMCF B	31
Figura 6 - Curva ROC DSA HLA-DRB1 x XMCF B	32
Figura 7 - Curva ROC DSA HLA-DQB1 x XMCF B	34
Figura 8 - Curva ROC DSA HLA-ABDRB1	35
Figura 9 - Curva ROC DSA HLA-DQB1	37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 O complexo principal de histocompatibilidade	13
1.2 Relevância do HLA nos transplantes	16
1.3 Justificativa do estudo	22
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
3.1 Delineamento	24
3.2 Critérios de inclusão	25
3.3 Análise estatística	25
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>26</b>
4.1 Relação entre DSA e os resultados das provas cruzadas	27
4.2 Anticorpos anti-HLA AB	29
4.3 Anticorpos anti-HLA DRB1	32
4.4 Soma Anticorpos DSA HLA-ABDRB1	33
4.5 Anticorpos anti-HLA C	36
4.6 Anticorpos anti-HLA-DQB1	36
4.7 Análise dos Anticorpos conforme os níveis de MFI determinados	38
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A- Comprovante submissão</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO</b>	<b>52</b>

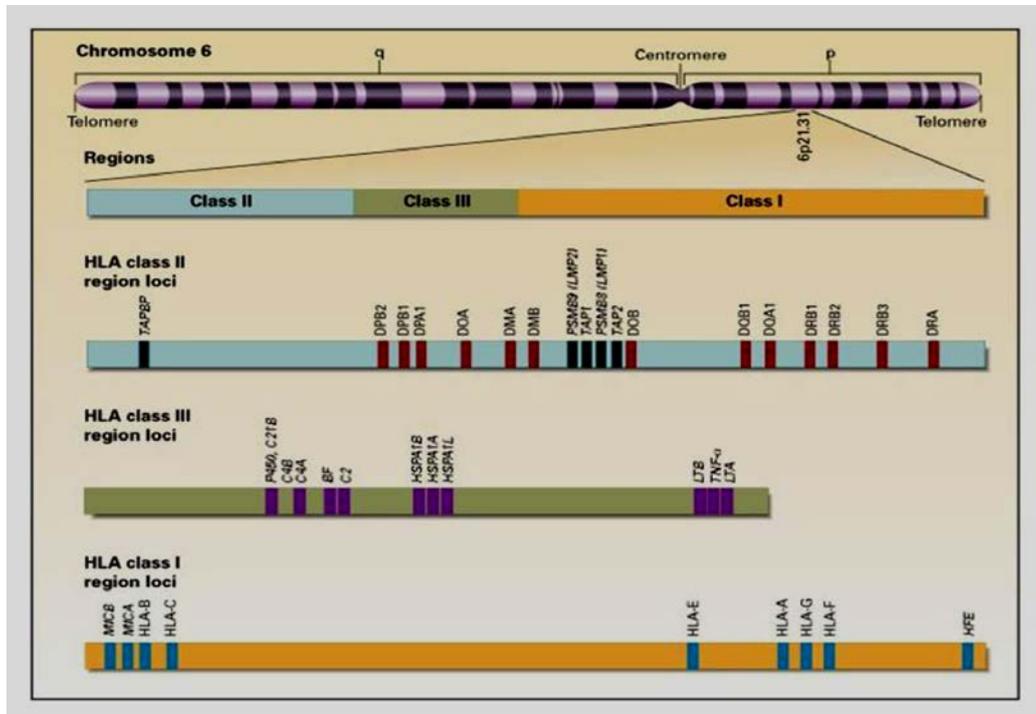
## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade

O complexo principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex) é uma região gênica, hipervariada localizada no braço curto do cromossomo seis. Nesta região encontram-se as moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigen*), que são glicoproteínas codificadas por genes altamente polimórficos envolvidos na resposta imunológica. O MHC foi descoberto através de estudos de rejeição de tecidos entre diferentes linhagens de camundongos. Na década de 40, George Snell e Peter Gorer descreveram antígenos responsáveis pela rejeição de tumores e tecidos normais em camundongos, nomeando histocompatibilidade-2(H-2). Mais tarde, a versão deste sistema em humanos tornou-se conhecida como MHC<sup>1</sup>. Através do desenvolvimento das técnicas de transfusão sanguínea, o primeiro antígeno deste sistema foi descoberto por Jean Dausset em 1958 e chamado de MAC, identificados através de testes de leucoaglutinação em pacientes politransfundidos <sup>2</sup>. A partir desta descoberta, foram descritos vários antígenos leucocitários e surgiu a necessidade de padronização da nomenclatura para este sistema e foi idealizado o primeiro *Workshop Internacional de Histocompatibilidade* (IWHS) em 1968, onde a nomenclatura passou a ser denominada de HLA (*Human Leukocyte Antigen*), na qual a primeira especificidade identificada passou a ser chamada como HLA-A2. Com isso foi estabelecido o comitê de Nomenclatura para fatores do sistema HLA da Organização Mundial da Saúde (WHO)<sup>3</sup>. A partir destes esforços, foram identificados vários *loci* gênicos localizados muito próximos, na região do braço curto do cromossomo 6 humano (segmento 6p21.3).

Existem dois tipos de genes polimórficos do MHC com maior relevância para os transplantes e que foram definidos como de classe I (HLA A, B, C) e classe II (HLA DR, DQ, DP). Entre os grupos de classe I e II está um terceiro grupo chamado classe III, o qual codifica as proteínas do sistema complemento. As regiões se distribuem no sentido do centrômero para o telômero na forma: classe II, III, I (figura1).

Figura 1 – Estrutura gênica do MHC (*Major Histocompatibility Complex*).



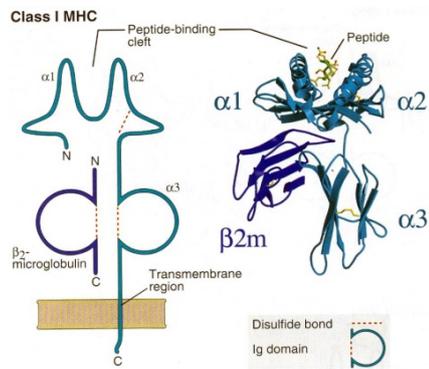
Fonte: [http://nejm.org/teaching\\_tools/jpegs\\_large/klei.fig1.jpg](http://nejm.org/teaching_tools/jpegs_large/klei.fig1.jpg)

O MHC de classe I possui genes que codificam proteínas da cadeia pesada de moléculas clássicas de histocompatibilidade (HLA A, B, C) e também para as vias não clássicas (HLA-E, F, G, MICA e MICB). Essas moléculas de classe I clássicas são expressas em quase todas as células nucleadas. Ela é composta por uma cadeia  $\alpha$  pesada, com associação não covalente a uma cadeia leve ( $\beta$ 2-microglobulina), sendo que esta última é codificada por um gene localizado no cromossomo 15. Essas moléculas se ligam ao receptor de células TCD8+.

O MHC de classe II codifica proteínas das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  com cinco tipos de moléculas expressas: HLA DR, DQ, DP, DM e DO. A região de classe II possui genes que codificam proteínas responsáveis pelo transporte de peptídeos<sup>4</sup>. As moléculas de classe II são expressas em linfócitos B, linfócitos T ativados, macrófagos e células dendríticas. As mesmas estão restritas aos receptores de células TCD4+. As moléculas do MHC desempenham papel fundamental nas respostas imunes a antígenos estranhos<sup>5</sup>. As figuras 2 e 3 mostram a estrutura das moléculas HLA de classe I e II respectivamente.

Figura 2-Estrutura da molécula

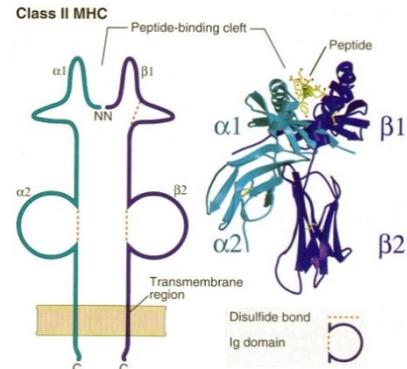
## HLA de classe I



Fonte: ABBAS,2003

Figura 3-Estrutura da molécula

## HLA de classe II



Os alelos da região MHC têm expressão codominante, portanto cada indivíduo apresenta dois antígenos HLA para cada *locus* (exceto em casos de homozigose), um de origem materna e um de origem paterna, e a combinação desses antígenos derivados do pai ou da mãe é chamado haplótipo.

O HLA é considerado o sistema mais polimórfico dentro do genoma humano, e os antígenos por ele codificados são responsáveis pela resposta dos anticorpos contra aloenxertos. Além disso, outros sistemas polimórficos, de menor relevância, podem propiciar uma resposta contra outros antígenos em alotransplantes<sup>6</sup>. Terasaki & Mclelland revolucionaram a detecção destes antígenos HLA com o desenvolvimento do teste de microlinfocitotoxicidade, que utiliza volume muito pequeno de soro e células<sup>7</sup>. Em 1966, Kissmeyer-Nielson descreveu dois casos de anticorpos leucoaglutinantes contra o doador, denominando de “rejeição hiperaguda”<sup>8</sup>. Terasaki e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a presença de anticorpo pré-transplante aumenta o risco de rejeição do enxerto renal, em um estudo que reuniu 30 casos de rejeição, onde 24(80%) apresentaram prova cruzada positiva<sup>9; 10</sup>. Estes resultados confirmados por outros estudos posteriormente acabou modificando a conduta dos transplantes renais, tornando o teste de reatividade contra painel(PRA) e a prova cruzada obrigatórios na rotina de avaliação pré-transplante<sup>6</sup>.

## 1.2 Relevância do HLA em transplantes

Anticorpos pré-formados contra antígenos HLA são a principal e mais conhecida causa de rejeição hiperaguda levando a perda do enxerto<sup>8</sup>, rejeição aguda, rejeição crônica e enxertos não funcionantes<sup>11; 12</sup>. Receptores renais a espera de um transplante podem desenvolver anticorpos anti-HLA como resultado de transfusões sanguíneas, gestações, transplantes prévios e infecções<sup>12</sup>. Os pacientes que desenvolvem algum nível de anticorpos anti-HLA são denominados sensibilizados e constituem um número considerável dentro da lista de espera em um centro de transplante.

De acordo com dados obtidos do Sistema Nacional de Transplantes (SNT) em janeiro de 2015, existiam 620 pacientes inscritos na lista de espera para transplante renal, com status ativo e vinculados ao Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre. Destes, 33% possuíam painel de anticorpos anti-HLA de classe I negativo e 24,8% dos pacientes com PRA >80% (hipersensibilizados). A presença destes anticorpos frequentemente impede o transplante por apresentarem prova cruzada pré-transplante positiva e como consequência permanecem por longo tempo em lista de espera, acima do tempo médio de espera de outros pacientes.

Através do teste de reatividade contra painel (PRA) é avaliado o nível de anticorpos anti-HLA, tanto no pré quanto no pós-transplante, constituindo uma ferramenta importante, juntamente com as provas cruzadas, nas condutas clínicas. Poucas áreas na Imunologia de transplantes evoluíram tanto nos últimos 15 anos como a avaliação de reatividade contra painel. Originalmente foi desenhada para representar o grau de positividade que uma determinada amostra apresentava em provas cruzadas reais e evoluiu para testes sem utilização de células vivas. O primeiro avanço surgiu com a aderência de moléculas HLA em placas de ELISA, evitando uso de células vivas viáveis e permitindo a criação de Kits comerciais para avaliação de Painel. Estas facilidades eram acompanhadas, por outro lado, de baixa sensibilidade, demonstrado pelo número de provas cruzadas positivas em indivíduos sem anticorpos anti-HLA circulantes. Em trabalho realizado pelo laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, constatamos 11% de

falsos negativos nos testes de ELISA<sup>13</sup>. Atualmente, a técnica mais utilizada para avaliação de reatividade contra Painel faz uso de princípios comuns a citometria de fluxo, empregando esferas plásticas com moléculas HLA purificadas aderidas. Os testes que utilizam a plataforma Luminex® podem ser de 3 tipos : (1) no primeiro, são microesferas plásticas com várias moléculas HLA de classe I e II aderidas, que produzem um resultado positivo ou negativo;(2) no segundo teste, cada microesfera contém duas moléculas com dois alelos de cada *locus* HLA classe I ou II, fornecendo um valor de PRA expresso em porcentagem e especificidade limitada; (3) o terceiro teste é composto de molécula HLA classe I ou II com apenas um alelo aderido (Single Antigen Beads-SAB) Esta tecnologia possibilitou grande aumento de sensibilidade na detecção de anticorpos anti-HLA de classe I e II , juntamente com os resultados de prova cruzada por citometria de fluxo(XMCF) levando a uma melhor avaliação e prognóstico dos transplantes .<sup>14</sup> A tecnologia Luminex® propiciou uma redefinição no conceito de sensibilização, gerando discussões sobre a relevância clínica destes anticorpos <sup>15</sup>.

Estes testes mais sensíveis geraram mudanças dos processos de escolha do par: doador x receptor quanto a questão da sensibilização HLA. Embora o CDC tenha sido o padrão ouro por muitos anos, este apresenta limitações, tais como reação cruzada por auto-anticorpos e imunocomplexos. Por outro lado, a prova cruzada por citometria de fluxo tem alta sensibilidade quando comparada ao CDC, mas têm como desvantagem ter como célula alvo o linfócito, que possui diferentes moléculas alvo na sua superfície (não-HLA), além de detectar anticorpos não fixadores de complemento, irrelevantes ao transplante. <sup>16</sup>. Ainda não existe consenso sobre a relevância clínica dos anticorpos anti-HLA doador específico detectados , pois entre os diferentes testes existentes os resultados variam, tanto entre os centros, quanto aos estudos, assim como os valores de ponto de corte. O uso dos resultados de PRA para alocação de órgãos para pacientes sensibilizados é chamado de prova cruzada virtual (XMV) e tem sido utilizado em vários centros. A previsão de uma prova cruzada negativa é a base do programa de *mismatches* aceitáveis do Eurotransplante que permite o transplante de pacientes hipersensibilizados. Na previsão de uma prova cruzada positiva, evita-se uma remessa inapropriada de órgãos para pacientes incompatíveis e tem sido utilizado no *United Network for Organ Sharing(UNOS)*. Neste contexto o painel SAB fornece

uma avaliação adequada para a prova cruzada virtual, predizendo o resultado da prova cruzada por citometria de fluxo nos pacientes sensibilizados<sup>16</sup>.

O prognóstico dos transplantes renais com resultado positivo de prova cruzada por citometria de fluxo ainda gera discussões. Através de estudo realizado em 2011 para avaliação dos resultados de 45 transplantes renais com provas cruzadas positivas por citometria de fluxo e a detecção de anticorpos anti-HLA classe I e II doador específico concluiu que o aumento do risco de rejeição aguda (RA) não está associado a presença de DSA e FCXM negativa, mas a combinação das duas técnicas com resultado positivo prevê piores resultados em curto prazo, especialmente nos casos de pacientes sensibilizados. Este estudo também demonstrou pobre correlação entre os valores de MFI de DSA e prova cruzada por citometria, que pode ser explicado pela variação de densidade de antígenos de classe I no painel SAB ou imunoglobulina da classe IgM bloqueando IgG HLA específico<sup>17</sup>. Outros estudos retrospectivos mostraram que a presença de DSA é associada com diminuição significativa da sobrevida do enxerto, mesmo na ausência de AMR<sup>18; 19 20</sup>.

Em um estudo para avaliar significância de anticorpos detectados pelas metodologias CDC e SPA (SPA-MIX e SPA-Singles) foram avaliados os valores preditivos em 354 transplantes renais de doador falecido com provas cruzadas por CDC e FCXM para linfócitos T e B demonstrando que a triagem feita por CDC (painel e prova cruzada) fornecem resultados confiáveis e aumenta as chances de um paciente receber um órgão, mas os testes de SPA-SAB e as provas cruzadas por citometria de fluxo podem ser de grande importância na identificação de pacientes que requerem monitoramento através de biopsia e sorologia para diagnóstico precoce de rejeição<sup>14</sup>.

As diferentes metodologias e os níveis de sensibilidade geram muitas dúvidas sobre a relevância clínica destes anticorpos detectados por estas técnicas extremamente sensíveis. Em estudo de coorte com 325 doadores falecidos para determinar a relevância das diferentes metodologias na detecção de anticorpos, previsão de AMR e sobrevida em transplante renal foi demonstrado que a maioria dos pacientes que possuíam DSA detectados por SAB (67%) e FCXM (66%) não apresentaram AMR, entre os pacientes com AMR (n=29), 76% apresentaram

manejo clínico sem perda do enxerto e a sobrevida do enxerto em 3 anos foi de 90% no grupo sem DSA e de apenas 76% no grupo com DSA<sup>21</sup>.

Atualmente o processo de prova cruzada virtual baseia-se no estabelecimento da correlação entre o teste de reatividade contra Painel (PRA) e os resultados da prova cruzada. Em trabalho publicado em 2009 foi realizada a comparação entre prova cruzada CDC e FCXM e Painel SPA-MIX e SAB para prever o resultado de uma prova cruzada. Neste trabalho a correlação foi melhor no painel screening. Esta diferença pode ser explicada pela menor sensibilidade do teste, variação da densidade de antígenos nas microesferas plásticas, levando os autores a questionarem se a prova cruzada pode realmente ser substituída pela prova cruzada virtual<sup>22</sup>.

Vaidya e colaboradores mostraram que o teste de fase sólida foi capaz de prever o desfecho das provas cruzadas por citometria de fluxo em 95% dos casos para linfócitos T e B, mostrando que essa análise na seleção do doador pode reduzir em mais de 50% o número de provas cruzadas, além de permitir uma expansão geográfica na busca de doadores ideais<sup>23</sup>.

Trabalho publicado em 2010 por Morris e colaboradores demonstrou o valor preditivo de detecção de anticorpos anti-HLA específicos por SAB em transplantes com doador vivo podendo prever uma prova cruzada negativa, porém apresenta sensibilidade limitada na predição de prova cruzada positiva, que pode ser atribuída à falta de tipagem para os alelos HLA-DQB1 e DP do doador ou presença de anticorpos não HLA. Neste estudo com acompanhamento de 18 meses, nenhum dos pacientes que apresentavam DSA considerado baixo (MFI<2000) e prova cruzada CDC negativa perderam o enxerto, demonstrando que até este nível de MFI não é uma contraindicação ao transplante<sup>24</sup>.

A importância clínica de anticorpos anti-HLA pré-existentes identificados por técnicas sensíveis gera muitas dúvidas. Através de um estudo observacional para análise da associação de anticorpos específicos preexistentes e incidência de AMR e sobrevida de pacientes e enxertos em 402 transplantes com doador falecido com prova cruzada CDC negativa, a sobrevida do enxerto em 8 anos foi

significativamente menor (61%) entre pacientes com DSA preexistentes ,comparados com pacientes sem DSA (93%) e não sensibilizados (84%)<sup>19</sup>.

Devido à polêmica com relação aos testes de fase sólida, um grupo realizou a comparação entre três métodos para detecção de anticorpos: CDC, FLOW PRA e SAB. Dois métodos apresentaram resultados semelhantes: CDC e FLOW PRA, já o teste de SAB apresentou reações adicionais que não puderam ser explicadas, nem por reconhecimento de epítomos nem pelo aumento de sensibilidade da técnica, e sugerem que as moléculas HLA solubilizadas aderidas as microesferas podem alterar sua conformação propiciando resultados falso-positivos. Desta forma os resultados devem ser tratados com muita cautela <sup>25</sup>.

Estudo realizado em 2012 por Ellis e colaboradores com o objetivo de determinar a habilidade do anticorpo HLA detectado por fase sólida em prever os resultados das provas cruzadas por citometria de fluxo e CDC através da análise de curva ROC demonstrou a utilidade da soma dos valores de MFI para prova cruzada virtual na avaliação dos níveis de sensibilização contra doador específico e prever o resultado da prova cruzada <sup>26</sup>.

O aumento da sensibilidade dos testes de fase sólida resultou em paradigma na interpretação dos resultados dos anticorpos doador específico. Na tentativa de padronizar a interpretação de resultados e os diversos protocolos de tratamento, foi publicado um trabalho em que a sociedade de transplantes convocou um grupo de especialistas para realizar relatórios com recomendações para o uso destas novas tecnologias. Foram criados três grupos que discutiram: aspectos técnicos que envolvem o uso da tecnologia, interpretação dos testes no pré-transplante e aplicação dos testes no pós-transplante. Esses grupos foram criados em 2011 e realizaram a “Conferência de Consenso em Anticorpo em Transplante” em Roma. As deliberações dos três grupos resultaram em uma lista de recomendações para cada grupo. O grupo técnico confirmou que os testes de fase sólida devem ser utilizados na detecção de anticorpos anti-HLA e que devem ser complementares aos testes baseados em células. Devem-se levar em conta as variações de densidade nas microesferas recobertas de antígenos e a presença de antígenos desnaturados, que impactam no resultado do teste de SAB. Com relação ao grupo pré-transplante devem ser estabelecidas categorias de risco baseados nos resultados de SAB e

provas cruzadas. Antígenos HLA inaceitáveis devem fazer parte das normas para alocação de órgãos. Para predizer uma prova cruzada com precisão é necessário uma tipagem HLA completa do doador, englobando os *loci* C, DQ e DP. Transplantes renais podem ser realizados sem a presença de prova cruzada prospectiva, desde que a tipagem do doador seja completa e o teste de SAB demonstre a ausência de anticorpos doadores específicos. Nos casos de presença de DSA e provas cruzadas negativas devem ser tratadas como risco imunológico, mas não contraindicação ao transplante <sup>27; 28</sup>.

Uma das principais atribuições dos laboratórios de histocompatibilidade atualmente é a determinação de antígenos inaceitáveis ao transplante, ou mismatches inaceitáveis, através da prova cruzada virtual, avaliando o risco imunológico de cada paciente. Estudo recente de revisão sobre esse tema relatou a experiência de seis centros transplantadores e as regras de determinação dos mismatches inaceitáveis e avaliações pós-transplante. O consenso permanece que CDC positiva é contraindicação ao transplante, mas sobre os testes de fase sólida, a determinação de mismatches inaceitáveis varia entre os centros, assim como a decisão sobre realização de transplantes em pacientes não sensibilizados sem prova cruzada. Outra questão importante é a definição de paciente sensibilizado, o que pode variar em cada centro transplantador. A presença de DSA no SAB é associada com alta incidência de rejeição na maioria dos estudos, mas não ocorre o mesmo para a perda de enxerto, permanecendo os questionamentos quanto a relevância destes anticorpos <sup>27</sup>.

A prova cruzada virtual oferece vantagens ao transplante: diminuição do tempo de isquemia fria, aumento da área de busca e alocação de órgãos. Porém, é importante salientar a necessidade de um teste de fase sólida atualizado, conhecimento do histórico do paciente, tipagem HLA a nível molecular tanto do doador quanto do receptor, e de preferencia abrangendo os *loci* A, B, C, DRB1 e DQB1. A discussão sobre a necessidade de uma tipagem HLA completa do doador ainda gera polêmica, pois a presença de anticorpos específicos contra *loci* C e DQB1 é menos frequente <sup>29</sup>.

Um estudo sobre a relevância clínica da prova cruzada virtual positiva demonstrou que a detecção de anticorpos por SAB foi a variável que conferiu o maior risco relativo para a perda do enxerto<sup>30</sup>.

Neste momento toda a comunidade transplantadora está discutindo os resultados destas novas tecnologias e suas aplicações. Um aspecto importante a ser debatido é a alta sensibilidade dos testes de fase sólida, quando comparada com os demais testes, podendo dificultar o transplante em pacientes hipersensibilizados, por isso a importância de definições de pontos de corte, resultado da prova cruzada e a correlação entre todos os resultados e assim possibilitar a melhor escolha do tratamento com menor intercorrências.

Em 2012 foi publicado estudo de revisão sistemática e metanálise sobre o efeito dos DSA na sobrevida do enxerto. Foi analisado grupos de pacientes com DSA, mas com prova cruzada CDC e citometria negativas. Nos 7 estudos de coorte retrospectivos analisados e reunidos os resultados sugerem que DSA pré-formados são clinicamente relevantes, mesmo na ausência de prova cruzada positiva indicando maior risco imunológico para o paciente<sup>31</sup>.

### 1.3 Justificativa do Estudo

As informações obtidas com as especificidades dos anticorpos Anti-HLA de classe I e II detectados por fase sólida correlacionados com os resultados das provas cruzadas podem definir de maneira adequada o risco imunológico do paciente, orientando para a escolha do doador ideal, bem como o esquema imunossupressor, tanto profilático quanto terapêutico. A possibilidade de prever um resultado de prova cruzada e conhecer os riscos imunológicos pode repercutir em menor tempo de isquemia fria, evitar deslocamentos dos enxertos e evitar episódios de rejeição, impactando nos custos do transplante. Portanto, é fundamental estabelecer uma correlação entre as metodologias existentes.

A partir de julho de 2013, o laboratório de Imunologia de transplantes da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre iniciou a realização da tipagem de doador falecido contemplando os *loci* C e DQB1, tornando possível uma melhor avaliação dos resultados dos testes de fase sólida e a correlação com os resultados das provas cruzadas.

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um ponto de corte do nível de fluorescência dos anticorpos detectados pelo Painel SAB de classe I e II dos loci HLA-A,B,C,DRB1 e DQB1 que correlacione com a prova cruzada positiva por citometria de fluxo.

Também objetivou avaliar se existem diferenças entre a utilização do maior valor de MFI dos DSAs e a soma de todos os DSAs de um determinado paciente.

### 3 - METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento

Estudo transversal retrospectivo de dois bancos de dados de pacientes em lista de espera para transplante renal cadastrados no Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre.

O banco de dados número 1 foi composto de 1316 provas cruzadas contra doador falecido realizadas no ano de 2010.

O banco de dados número 2 foi composto de 2288 provas cruzadas contra doador falecido realizadas de julho de 2013 a julho de 2014.

Os bancos de dados utilizados nas análises possuem resultados de exames de pacientes em lista de espera para transplante renal cadastrados no laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa. O paciente cadastrado deve possuir tipagem HLA (*loci* AB e DRB1) para análise da compatibilidade com o provável doador, assim como a reatividade contra Painel atualizada para avaliação de anticorpos doador específicos. Quando o paciente é selecionado para concorrer a um órgão, é realizada a prova cruzada por citometria de fluxo contra linfócitos T e B do possível doador falecido. Para detecção de anticorpos anti-HLA foram utilizados os testes LABScreen® Mixed e LABScreen® Single Antigen (SAB) e o critério de positividade destes testes definido a partir de MFI  $\geq 1000$ .

Para análise do banco de dados número 1 foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Maior valor de MFI dos DSAs HLA-AB – Maior DSA AB
- Soma dos valores de MFI dos DSAs HLA-AB – Soma DSAs AB
- Maior valor de MFI dos DSAs HLA-DRB1 – Maior DSA DRB1
- Soma dos valores de MFI dos DSAs HLA-DRB1 – Soma DSAs DRB1
- Soma de todos os valores de MFI dos DSAs HLA-ABDRB1 – Soma DSAs

ABDRB1

Para análise do banco de dados número dois foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Maior valor de MFI dos DSAs HLA- C – Maior DSA C
- Soma dos valores de MFI dos DSAs HLA-C – Soma DSAs C
- Maior valor de MFI dos DSAs HLA-DQB1 – Maior DSA DQB1
- Soma dos valores de MFI dos DSAs HLA-DQB1 – Soma DSAs DQB1

Todas as variáveis foram comparadas com os resultados das provas cruzadas por citometria de fluxo contra linfócitos T e B.

### 3.2 Critérios de Inclusão

Para o banco de dados que avaliou os anticorpos HLA-AB e DRB1, foram utilizadas apenas amostras que possuíam resultado de Painel na mesma data do soro testado nas provas cruzadas por citometria de fluxo contra doador falecido, resultando em 834 amostras. Os soros testados somente por CDC foram excluídos da análise.

Para análise do banco de dados que avaliou os anticorpos HLA-C e DQB1, os critérios de inclusão foram: possuir apenas anticorpos anti-HLA C e DQB1 específico contra doador (DSA) e resultado de painel na mesma data de soro testado nas provas cruzadas. Os soros testados somente por CDC foram excluídos da análise.

### 3.3 Análise Estatística

Foram calculadas as frequências das provas cruzadas virtuais e XMCF assim como das diferentes variáveis estudadas. Para análise de correlação, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Para análise de sensibilidade e especificidade foi utilizada curva ROC e também para definição de pontos de corte para predição de prova cruzada. As variáveis analisadas foram divididas em faixas de MFI e calculadas a sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança.

#### 4 - RESULTADOS

Os dados demográficos para análise dos anticorpos HLA-A B e DRB1 obtidos foram: 834 provas cruzadas contra 145 doadores falecidos, sendo 61% do sexo masculino com idade entre zero e 75 anos (média 43 anos), e principal causa morte foi AVC. Na análise dos anticorpos HLA-C e DQB1 foram 348 provas cruzadas contra 134 doadores falecidos, onde 50% eram do sexo masculino com idade variando entre 0 e 79 anos(média 44 anos) e a principal causa morte também foi AVC (Tabela 1).

Para a análise dos anticorpos anti-HLA A, B e DRB1, a amostra foi dividida em três grupos utilizando o critério de prova cruzada virtual (XMV): grupo 1 – XMV negativo, sem DSA de classe I e II, grupo 2 – XMV positivo, presença de DSA com MFI > 5000, e grupo 3 - XMV indeterminado, presença de DSA com MFI entre 1000 e 5000. (Tabela 2). Para análise dos anticorpos anti-HLAC e DQB1 as amostras foram divididas em XMV Negativo (sem DAS de classe I e II) e XMV Positivo (DSA com MFI>5000) e somente o teste SAB foi utilizado, com o mesmo critério de positividade da análise anterior. A tabela 2 mostra a frequência dos grupos de acordo com o critério de prova cruzada virtual definida pelo estudo.

**Tabela 1 - Dados demográficos e características do doador falecido**

	<i>loci</i> ABDRB1	<i>loci</i> C e DQB1
	Doador Falecido N=145	Doador Falecido N=134
Idade,média±DP (range)	42,88±19,48( 0 a 75 anos)	43,84±17,06 ( 0 a 79 anos)
Sexo masculino, n (%)	89(61,4%)	67(50%)
Grupo Sanguíneo		
Grupo O, n (%)	70(48,20%)	74(55,2%)
Grupo A, n(%)	54(37,20%)	42(31,3%)
Grupo B, n(%)	15(10,30%)	16(11,9%)
Grupo AB, n(%)	6(4,13%)	2(1,5%)

Fonte: o autor (2015)

**Tabela 2- Frequência (%) dos grupos de acordo com o critério de XMV**

<b>XM Virtual</b>	<b>Anti-HLA-ABDRB1</b>	<b>Anti-HLA-C</b>	<b>Anti-HLA-DQB1</b>
Grupo 1 - XMV Negativo	429 (51,4)	35(87,5)	82(65,1)
Grupo 2 - XMV Positivo	247 (29,6)	5(12,5)	44(34,9)
Grupo 3 - XMV Indeterminado	158 (19)	-	-
<b>Total</b>	<b>834</b>	<b>40</b>	<b>126</b>

Fonte: o autor (2015)

#### 4.1 Relação entre DSA e resultados de XMCF

Os resultados obtidos da correlação entre prova cruzada por citometria de fluxo e prova cruzada virtual para os anticorpos anti- HLA-ABDRB1 e HLA-C e DQB1 encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5. Na tabela 3, analisando os anticorpos anti-HLA ABDRB1, no grupo 1, 42(9,8%) das amostras apresentaram XMCF positiva. No grupo 2, em 6 amostras a XMCFI foi negativa. No grupo 3, 97 amostras apresentaram prova cruzada real positiva e 61 negativas. Na tabela 4, para análise dos anticorpos anti-HLA DQB1, o grupo 1 (XMV NEG) resultou em 5 provas cruzadas positivas e no grupo 2 (XMV POS) obtivemos 11 provas cruzadas negativas. Na tabela 5, para avaliação dos anticorpos anti-HLA C, do total de 40 provas cruzadas, apenas 1 foi positiva.

**Tabela 3 - Correlação entre prova cruzada virtual e prova cruzada por citometria de fluxo em relação aos anticorpos anti-HLA-ABDRB1**

		XMVIRTUAL HLA-ABDRB1			TOTAL
		GRUPO 1- NEG (S/DSA)	GRUPO 2- POS (MFI>5000)	GRUPO 3- IND (MFI 1000 a 5000)	
XMCF T e B	NEGATIVO	387(90,2%)	6(2,4%)	61(38,6%)	454
	POSITIVO	42(9,8%)	241(97,6%)	97(61,4%)	380
<b>TOTAL</b>		429(100%)	247(100%)	158(100%)	834

P<0.001  $r_{(s)}=0.62$

Fonte: o autor (2015)

**Tabela 4 - Correlação entre prova cruzada virtual e prova cruzada por citometria de fluxo dos anticorpos anti- HLA-DQB1**

		XMVIRTUAL HLA-DQB1		TOTAL
		Grupo 1-NEG (MFI 1000 a 5000)	Grupo 2-POS (MFI>5000)	
XMCF B	NEGATIVO	78(87.6%)	11(12.4%)	89
	POSITIVO	5(14,3%)	30(85,7%)	35
<b>TOTAL</b>		83	41	124

P<0.001  $r_{(s)}=0.72$

Fonte: o autor (2015)

**Tabela 5 - Correlação entre prova cruzada virtual e prova cruzada por citometria de fluxo em relação aos anticorpos anti- HLA-C**

		XMVIRTUAL HLA- C		
		Grupo 1-NEG	Grupo 2-POS	TOTAL
		(MFI 1000 a 5000)	(MFI>5000)	
	<b>NEGATIVO</b>	35(89,7%)	4(10,3%)	39
<b>XMCF T</b>	<b>POSITIVO</b>	0	<b>1(100%)</b>	1
	<b>TOTAL</b>	35(87,5%)	5(12,5%)	40

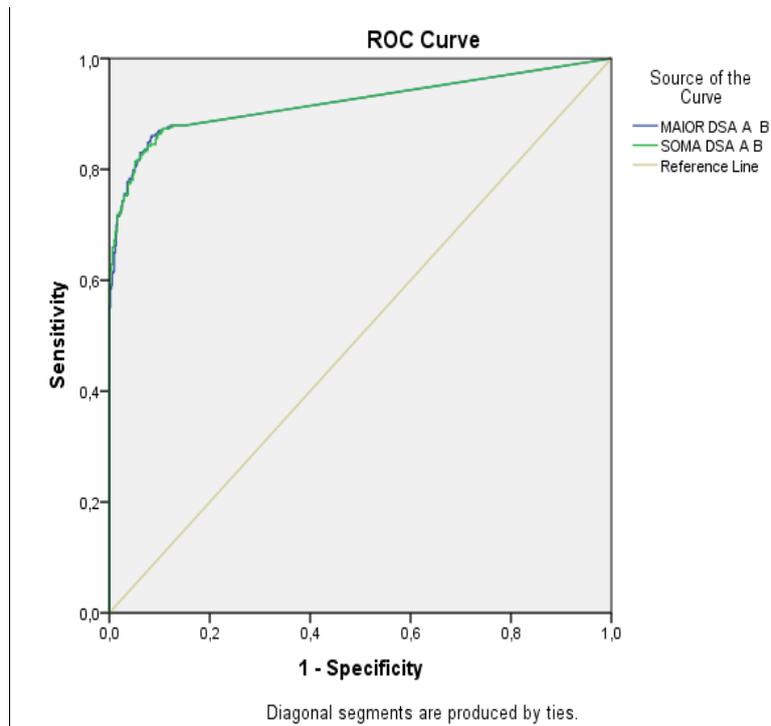
P=0,006  $r_{(s)}=0,42$   
 Fonte: o autor (2015)

Para a definição do melhor ponto de corte que correlacione com prova cruzada positiva, foi utilizada a curva ROC separada para XMFLOW T e B com as seguintes categorias analisadas para os anticorpos anti-HLA A, B e DRB1: Maior DSA HLA A e B; Soma DSA HLA A e B, Soma maior DSA HLA A, B e DRB1, Soma todos DSA HLA A, B e DRB1; maior DSA DRB1; soma DSA DRB1; maior DSA DQB1 e soma DSA DQB1.

#### 4.2 Anticorpos anti-HLA- A e B

Na definição do melhor ponto de corte para correlação com prova cruzada positiva, foi utilizada a curva ROC separada para XMFLOW T e B com as seguintes categorias para os anticorpos anti-HLA A, B: Maior DSA HLA A e B, Soma DSA HLA A e B (tabela 6 e 7).As figuras 4 e 5 mostram os pontos de corte escolhidos e separados nas respectivas categorias analisadas para XMCF T e B .

Figura 4-Curva ROC DSA HLA-AB x XMCF T



Fonte: o autor (2015)

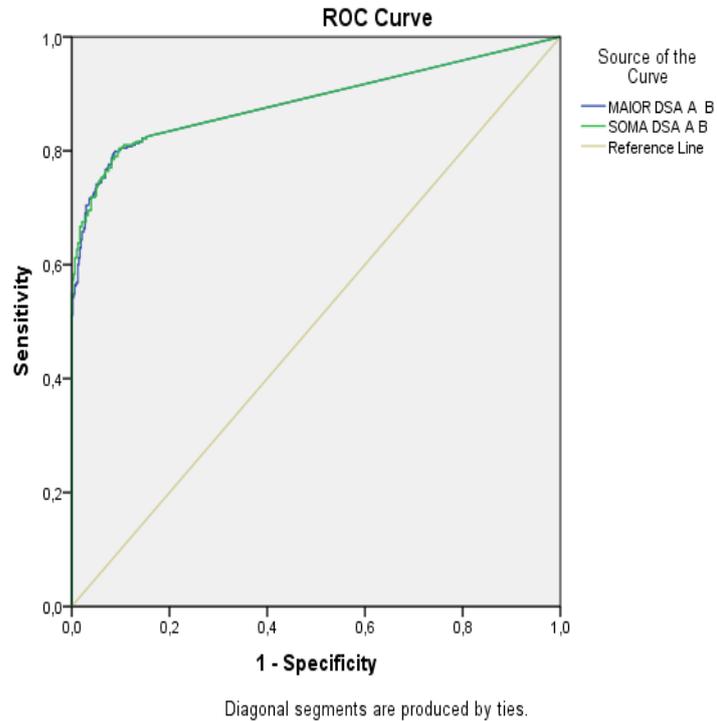
Tabela 6 - Análise Curva ROC DSA HLA-AB x XMCF T

Grupos	N(pos/neg)	Área sob a curva			Características cutoff		
		Área	P	95%CI	cutoff	S*(%)	E**(%)
<b>Maior DSA AB</b>	323/509	,920	<0,001	0,897-0,943	2502	79,9	95,1
					4042	70,9	98,4
					<b>5024</b>	<b>62,5</b>	<b>99</b>
					6564	55,1	100
<b>Soma DSAs AB</b>	323/509	,920	<0,001	0,897-0,943	2502	82,7	93,5
					4027	74,6	97,1
					<b>5004</b>	<b>70,3</b>	<b>98,4</b>
					6657	61,9	99,8

Legenda: S\* - Sensibilidade; E\* - Especificidade

Fonte: o autor (2015)

Figura 5- Curva ROC DSA HLA-AB x XMCF



Fonte: o autor(2015)

Tabela 7- Análise Curva ROC DSA HLA-AB x XMCF B

Grupos	N(pos/neg)	Área sob a curva			Características cutoff		
		Área	P	95%CI	cutoff	S*(%)	E**(%)
<b>Maior DSA AB</b>	348/378	,887	<0,001	0,861-0,913	2502	74,1	94,8
					4042	65,2	97,9
					<b>5024</b>	<b>57,8</b>	<b>98,7</b>
					7129	48,9	100
<b>Soma DSAs AB</b>	323/509	,888	<0,001	0,861-0,914	2502	76,4	92,4
					4027	69	96,7
					<b>5004</b>	<b>66,2</b>	<b>98,3</b>
					7093	56,9	99,8

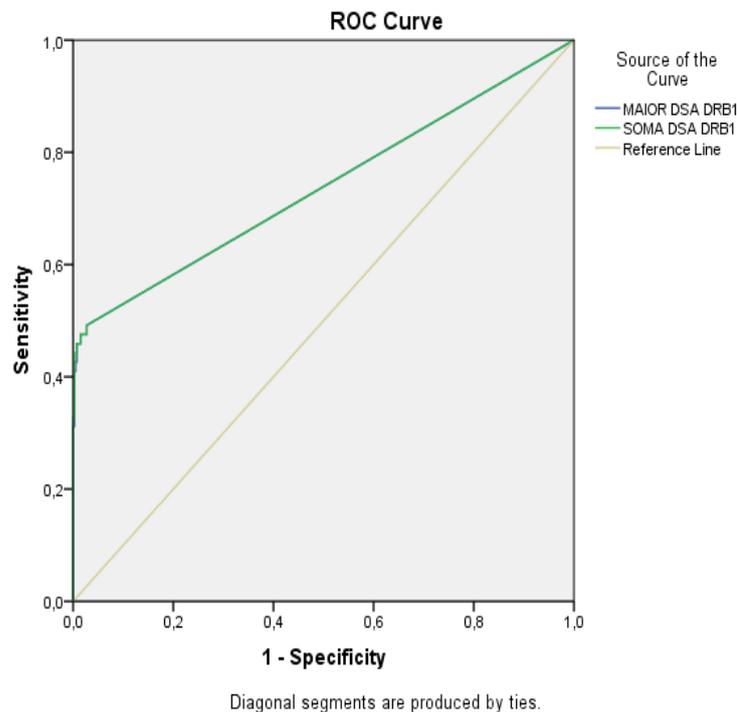
Legenda: S\*- Sensibilidade; E\*- Especificidade

Fonte: o autor(2015)

### 4.3 Anticorpos Anti-HLA DRB1

A curva ROC para esta análise está visualizada na figura 6 e os pontos de corte escolhidos na tabela 8. Para a variável maior DSA DRB1, a média de MFI dos anticorpos foi de 7680 e valores mínimos e máximos de 1015 e 22.626 respectivamente, e na variável soma DSA DRB1, a média de MFI foi 8517 e os valores mínimos e máximos foram 1015 e 40034. Analisando a variável maior DSA DRB1 com  $MFI > 13.000$ , todas as XMCF B foram positivas. Se analisarmos a variável Soma ABDR1, obtivemos média de MFI de 14.278 e valores mínimos de 1096 e máximos de 93.810. Quando analisamos a curva ROC para predição da XMCF B através do SAB observamos exclusivamente para os anticorpos anti HLA-DRB1, foi encontrado área sob a curva de 0,73 e sensibilidade de 26,2% e especificidade de 100% no ponto de corte de MFI 5359.

Figura 6- Curva ROC DSA HLA-DRB1 x XMCF B



Fonte: o autor (2015)

**Tabela 8- Análise Curva ROC DSA HLA-DRB1 x XMCF B**

Grupos	N(pos/neg)	Área sob a curva			Características cutoff		
		Área	P	95%CI	cutoff	S*(%)	E**(%)
<b>Maior DSA DRB1</b>	61/405	,738	<0,001	0,655-0,821	2544	37,7	99,8
					<b>5359</b>	<b>26,2</b>	<b>100</b>
					10724	16,4	100
<b>Soma DSAs DRB1</b>	61/405	,738	<0,001	0,655-0,821	2544	39,3	99,6
					<b>5354</b>	<b>26,2</b>	<b>100</b>
					11600	16,4	100

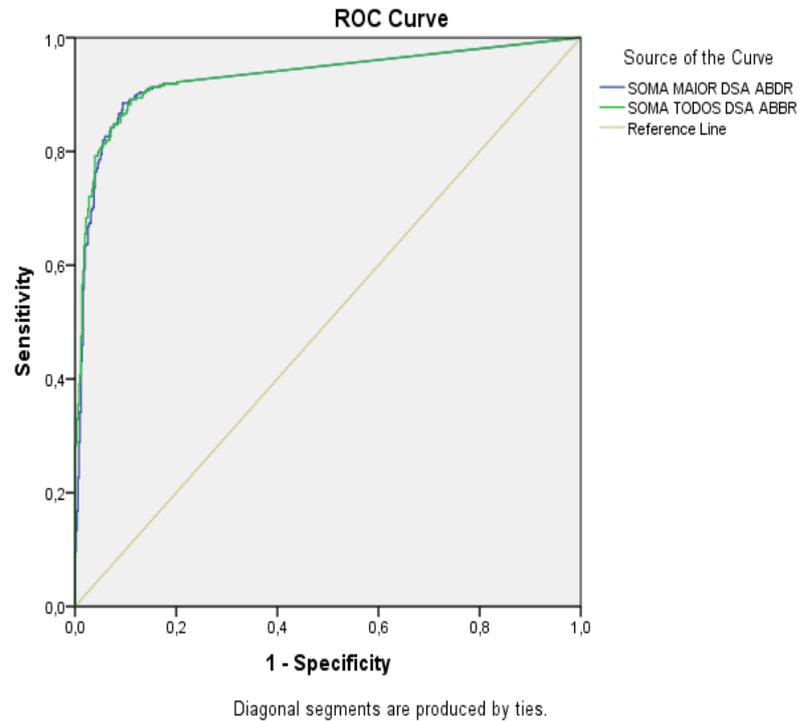
Legenda: S\*- Sensibilidade; E\*- Especificidade

Fonte: o autor (2015)

#### 4.4 Soma de todos os DSA HLA-ABDRB1

Foram realizadas as análises das variáveis Soma Maior DSA ABDRB1 e soma todos DSA ABDRB1 com relação aos resultados das XMCF T e B e utilizando o ponto de corte de 5000 MFI obtivemos para a primeira variável, sensibilidade de 71,7% e especificidade de 96,3%, e para a segunda variável, a sensibilidade foi 77,6% e especificidade de 96,1%. A curva ROC para as análises de XMCF T e B encontra-se nas figuras 7 e 8 e nas tabelas 9 e 10 os pontos de corte escolhidos.

Figura 7- Curva ROC DSA HLA ABDRB1 x XMCF



Fonte: o autor (2015)

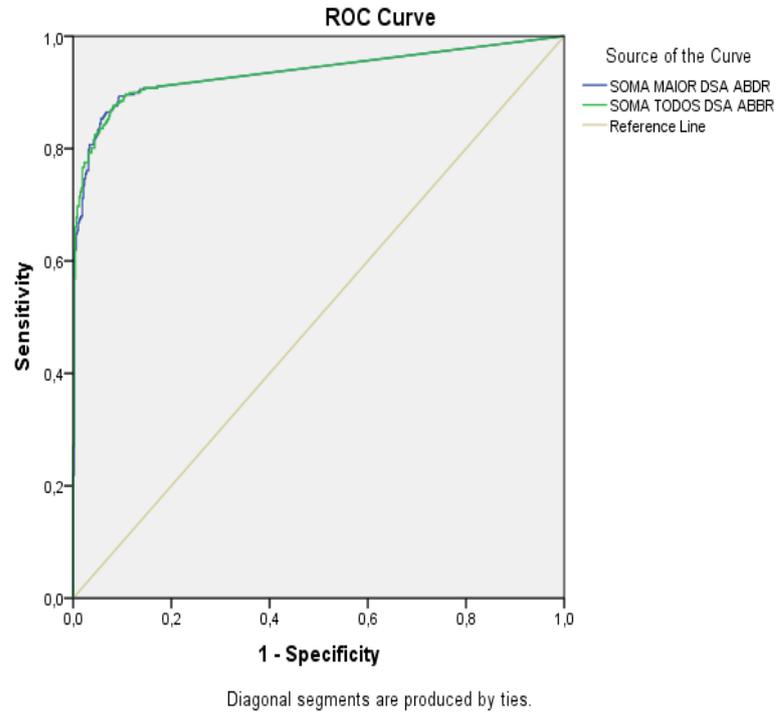
Tabela 9- Análise Curva ROC DSA HLA-ABDRB1 XMCF T

Grupos	N(pos/neg)	Área sob a curva			Características Cutoff		
		Área	P	95%CI	Cutoff	S(%)	E(%)
<b>Soma maior DSA ABDRB1</b>	322/509	,930	<0,001	0,909-0,950	2502	86,6	91,2
					3671	80,7	95,3
					<b>5024</b>	<b>71,7</b>	<b>96,3</b>
8147	59,6	98					
<b>Soma Todos DSAs ABDRB1</b>	322/509	,932	<0,001	0,912-0,952	2502	88,2	89,4
					4054	81,4	93,
					<b>5004</b>	<b>77,6</b>	<b>96,1</b>
8053	65,8	97,8					

Legenda: S\*- Sensibilidade; E\*- Especificidade

Fonte: o autor(2015)

Figura 8- Curva ROC DSA HLA-ABDRB1 x XMCF B



Fonte: o autor (2015)

Tabela 10 Análise Curva ROC DSA HLA-ABDRB1 x XMCF B

Grupos	N(pos/neg)	Área sob a curva			Características Cutoff		
		Área	P	95%CI	Cutoff	S(%)	E(%)
<b>Soma maior DSA</b>	347/478	,935	<0,001	0,915-0,955	2502	85,3	94,1
<b>ABDRB1</b>					<b>5024</b>	<b>69,5</b>	<b>98,1</b>
					8147	57,9	99,8
<b>Soma Todos DSAs</b>	347/478	,935	<0,001	0,916-0,955	2502	86,7	92,3
<b>ABDRB1</b>					<b>5004</b>	<b>75,2</b>	<b>98,1</b>
					9028	61,4	99,6

Legenda: S\*=Sensibilidade; E\*= Especificidade

Fonte:o autor(2015)

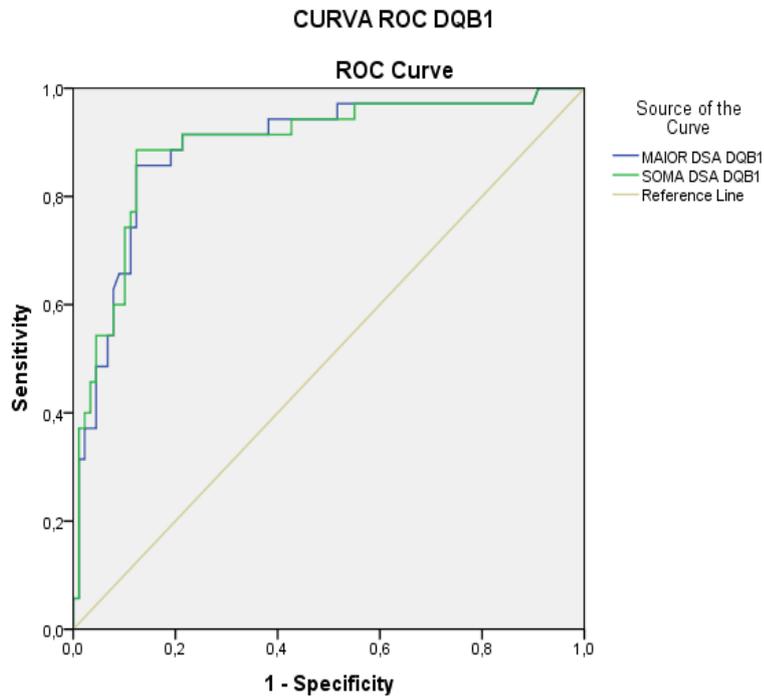
#### 4.5 Anticorpos anti-HLA C

Na tabela 5 encontram-se os resultados das XMV correlacionadas com os resultados das XMCF, onde 40 pacientes possuíam somente anticorpo anti-HLA C contra doador específico e destes, apenas 5 com anticorpos com MFI>5.000(média de MFI 9360), ocorrendo prova cruzada positiva em apenas um caso, que apresentou o anticorpo específico HLA-C12 com MFI de 12.394,sendo o maior valor de MFI para o *locus* C neste estudo. Desta forma não foi possível realização da curva ROC para determinação do ponto de corte para realização de prova cruzada virtual.

#### 4.6 Anticorpos anti-HLA-DQB1

Das 348 provas cruzadas selecionadas, 124 (35,6%) possuíam anticorpo exclusivo anti-HLA DQB1 doador específico, que foram analisados em duas categorias: XMV Negativo (DSA com MFI <5000) e XMV Positivo (DSA MFI>5000) (Tabela 2B). Analisando a categoria XMV, observamos 44(34,9%) casos com MFI>5000(XMV POS) e 82(65,1%) com XMV Negativo (MFI<5000). Analisando as XMCF B, foram 35(27,8%) casos positivos e 89(70,6%) de casos negativos. A média de MFI do grupo Maior DSA foi de 5529 e para o grupo Soma DSA foi 6.561 e nos valores máximos de MFI, a diferença entre os grupos foi de 24.551 e 48.423 respectivamente. Já o XMV positivo apresentou 31 casos com prova cruzada positiva e 11 negativa. Além destas categorias foram analisadas duas variáveis: maior DSA DQB1 e soma DSA DQB1 e na figura 9 a curva ROC e na tabela 11 os pontos de corte escolhidos.

Figura 9- Curva ROC DSA HLA-DQB1 x XMCF B



Fonte: o autor (2015)

**Tabela 11 - Análise Curva ROC DSA HLA-DQB1 x XMCF B**

Grupos	N(pos/neg)	Área sob a curva			Características Cutoff		
		Área	P	95%CI	Cutoff	S*(%)	E**(%)
	35/89	,891	<0,001	0,823- 0,958	2504	91,4	68,5
<b>Maior DSA</b>					<b>5163</b>	<b>82,9</b>	<b>87,6</b>
<b>DQB1</b>					10119	54,3	93,3
					15804	31,4	98,9
	35/89	,894	<0,001	0,826 -0,962	2504	91,4	64
<b>Soma DSAs</b>					<b>5163</b>	<b>85,7</b>	<b>87,6</b>
<b>DQB1</b>					10457	60	91
					15094	40	96,6

Legenda: \*S= Sensibilidade \*\*E= Especificidade

Fonte: o autor (2015)

#### 4.7 Análise de anticorpos conforme os níveis de MFI determinados

Nos dados da tabela 12 demonstramos resultados de sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança para cada variável estudada e subdivididas em níveis de MFI: nível1- MFI-1.000-4.999; nível 2-MFI 5.000-10.000; nível 3-MFI 10.001-15.000; nível 4- MFI>15.000, para XMFCF T e B. Para análise de XMCF T, a variável Maior DSA apresenta na faixa de MFI de 5 a 10.000, sensibilidade de 62,8%, especificidade de 99% e razão de verossimilhança positiva de 63,98. Na variável soma DSA, a sensibilidade foi de 70,3%, especificidade de 98,4% e razão de verossimilhança positiva 44,71. A variável Soma de todos os DSA ABDRB1 obteve 77,6% de sensibilidade, 96,1% de especificidade e 19,76 de razão de verossimilhança positiva. Para XMCF B, a faixa 5 a 10.000MFI, na variável Maior DSA DRB1 para a variável Maior DSA DRB1, obtivemos sensibilidade de 31,1%, especificidade de 99,8% e razão de verossimilhança positiva de 126,15. O mesmo nível, para a variável soma DSA DRB1 obteve 27,9 de sensibilidade e 100% de especificidade e para a variável Soma todos os DSA ABDRB1, a sensibilidade foi de 75,2%, especificidade de 98,1% e a razão de verossimilhança positiva de 39,95. Os resultados para a variável maior DSA DQB1 e Soma DSA DQB1 para o nível de MFI de 15.000 a 20.000, a variável Maior DSA DQB1 apresentou sensibilidade de 31,4%, especificidade de 97,8% e razão de verossimilhança positiva de 13,99, na Soma DSA DQB1, 40% de sensibilidade, 96,6% de especificidade e 11,87 para razão de verossimilhança positiva.

**Tabela 12 Análise de anticorpos conforme os níveis de MFI determinados -**

Variável	Faixa MFI	S*(%)	E*(%)	LR+	LR-
	1.000-4.999	87,9	84,9	5,81	0,14
Maior DSA AB x XMCF T	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>62,8</b>	<b>99</b>	<b>63,98</b>	<b>0,38</b>
AUC:0,92(0,90-0,94) $r_{(s)}=0,72$	10.000 a 15.000	40,6	100	-	0,59
	1.000-4.999	82,5	84,7	5,40	0,21
Maior DSA AB x XMCF B	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>58,0</b>	<b>98,7</b>	<b>46,24</b>	<b>0,42</b>
AUC:0,89(0,86-0,91) $r_{(s)}=0,72$	10.000 a 15.000	37,6	100	-	0,62
	1.000-4.999	87,9	84,9	5,81	0,14
Soma DSAs AB x FLOW T	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>70,3</b>	<b>98,4</b>	<b>44,71</b>	<b>0,30</b>
AUC:0,92(0,90-0,94) $r_{(s)}=0,78$	10.000-15.000	52,6	100	-	0,47
	1.000-4.999	82,5	84,7	5,40	0,21
Soma DSAs AB x Flow B	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>65,2</b>	<b>98,3</b>	<b>38,97</b>	<b>0,35</b>
AUC:0,92(0,90-0,94) $r_{(s)}=0,73$	10.000 a 15.000	48,9	100	-	0,51
	1.000-4.999	49,2	97,3	18,11	0,52
Maior DSA DRB1 x XMCF B	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>31,1</b>	<b>99,8</b>	<b>126,15</b>	<b>0,69</b>
AUC:0,74(0,65-0,82) $r_{(s)}=0,56$	10.000 a 15.000	27,9	100	-	0,72
	1.000-4.999	49,2	97,3	18,11	0,52
Soma DSA DRB1 x XMCF B	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>27,9</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>0,72</b>
AUC:0,74(0,65-0,82) $r_{(s)}=0,56$	10.000 a 15.000	16,4	100	-	0,84
	1.000-4.999	92,2	79,4	4,47	0,10
Soma DSAs ABDRB1 x XMCF T	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>77,6</b>	<b>96,1</b>	<b>19,76</b>	<b>0,23</b>
AUC:0,93(0,91-0,95) $r_{(s)}=0,78$	10.000-15.000	60,6	98,2	34,25	0,40
	1.000-4.999	91,1	82,4	5,18	0,11
Soma DSAs ABDRB1 x XMCF B	<b>5.000 a 10.000</b>	<b>75,2</b>	<b>98,1</b>	<b>39,95</b>	<b>0,25</b>
AUC:0,93(0,91-0,95) $r_{(s)}=0,79$	10.000-15.000	58,2	99,6	139,13	0,42
	5.000 a 10.000	88,6	87,6	7,17	0,13
Maior DSA DQB1 x XMCF B	10.000 a 15.000	54,3	93,3	8,05	0,49
AUC:0,89(0,82-0,96) $r_{(s)}=0,72$	<b>15.000 a 20.000</b>	<b>31,4</b>	<b>97,8</b>	<b>13,99</b>	<b>0,70</b>
	5.000 a 10.000	88,6	87,6	7,17	0,13
Soma DSA DQB1 x XMCF B	10.000 a 15.000	60,0	91,0	6,68	0,44
AUC:0,89(0,83-0,96) $r_{(s)}=0,72$	<b>15.000 a 20.000</b>	<b>40,0</b>	<b>96,6</b>	<b>11,87</b>	<b>0,62</b>

Legenda: S\*= Sensibilidade; E\*= Especificidade; LR+=Razão de Verossimilhança positiva; LR-=Razão de Verossimilhança negativa; AUC= Área sob a curva;  $r_{(s)}$ = coeficiente correlação Spearman

Fonte: o autor (2015)

## 5 - DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos que 97,6% dos pacientes com DSA HLA-ABDRB1 com  $MFI \geq 5000$  resultaram em XMCF positiva e que os níveis de MFI nesta faixa também corresponderam aos melhores pontos de corte de escolha quando avaliamos a sensibilidade e especificidade para a correlação com a prova cruzada por citometria de fluxo. Estes dados são consistentes tanto para análise individual dos anticorpos como para soma e ou maior DSA ABDRB1. Na análise das diferenças entre a utilização somente do maior DSA e a soma dos DSAs, observou-se aumento na sensibilidade, diferente da especificidade, que manteve os mesmos níveis. Analisando a tabela 2, no grupo 1 (XMV NEG), ocorreram 42(11,1%) provas cruzadas positivas, e destas, observamos que 15 apresentavam anticorpo contra HLA-DQB1 com  $MFI \geq 5000$  com possível associação, 3 com anticorpo anti-HLA-DQA e 3 contra HLA-DP com  $MFI \geq 5000$ , 1 com anticorpo HLA-C com  $MFI \geq 15000$  com possível associação. No grupo 2 (XMV positivo), ocorreram 6(2,4%) casos com prova cruzada real negativa, em 4 casos foi realizada tipagem de alta resolução e destes, 1 devido a alelo nulo, 2 com DSA confirmado ( $MFI$  5780 e 5425 respectivamente), um foi analisado como virtual positivo pela média de  $MFI$  do grupo alélico (A68  $MFI$  5934) e não do alelo específico que após tipagem de alta resolução foi confirmado anticorpo específico A\*68:01, porém para este alelo, o  $MFI$  era abaixo de 5.000 ( $MFI$  4108). Nos outros dois casos, devido a provável não DSA (alelos não confirmados por alta resolução por falta de material do doador). No grupo 3 (XMV IND) conforme esperado, encontramos um percentual de casos positivos e negativos, conforme o nível de anticorpos detectados. Dos 158 casos deste grupo, 61(38,6%) tiveram resultado negativo na prova cruzada real e para a variável Maior DSA ABDRB1 a média de  $MFI$  foi de 2.038 e 97(61,4%) com resultado de prova cruzada real positiva apresentou média de  $MFI$  do maior DSA de 3586 e se consideramos a média de  $MFI$  da variável soma dos DSA ABDRB1 o  $MFI$  foi de 4.431. Em trabalho publicado por Tambur *et al.* foi relatado 63 casos com prova cruzada positiva e XMV negativo, indicando que essas discrepâncias podem ocorrer pela avaliação incompleta, tanto da tipagem do doador quanto do perfil de anticorpos do receptor. Em 40% destes casos, o único anticorpo com força suficiente para produzir uma prova cruzada positiva foi HLA C. Na análise dos DSA

considerados fracos, a presença de um único DSA fraco é um pobre preditor para prova cruzada por citometria positiva<sup>32</sup>.

Em nosso estudo a frequência de anticorpo anti-HLA-C foi pequena (11,4%), e em apenas um caso a prova cruzada foi positiva, dificultando a escolha de um ponto de corte para realização de prova cruzada virtual. Anticorpos contra antígenos HLA-C apresentam maior dificuldade para detecção, devido à baixa expressão na superfície das células, o que também pode contribuir para a baixa imunogenicidade, mas existem relatos de casos em que ocorreu rejeição aguda e crônica mediada por estes anticorpos e a introdução dos testes de fase sólida incrementaram a detecção destes anticorpos. Um estudo sobre a prevalência, força dos anticorpos anti-HLA C e DP em pacientes sensibilizados no pré-transplante e o desfecho clínico em transplantes renais mostrou que, dos 1069 pacientes em lista de espera, 251(24%) eram sensibilizados (CPRA>0%), e destes 56% com DSA HLA-C com média de MFI 4955, mostrando prevalência e força menor quando comparadas a anti-HLA A, B, DRB1 e DQB1<sup>33</sup>. Estudos de casos recentes mostraram relação de AMR e glomerulopatia do enxerto com DSA HLA-C<sup>34; 35</sup>, porém, ambos os estudos apresentavam outros anticorpos DSA envolvidos.

Na análise do grupo Maior DSA DRB1, foram 141 soros com MFI≥1000(média MFI1295), e destes, 17 tiveram XMCF negativa (MFI variando de 1217 a 14674) No painel SAB é possível uma definição alélica, porém, a maioria das tipagens HLA dos doadores falecidos foi realizada por PCR-SSP média resolução, portanto sem esta definição alélica. Esta diferença pode comprometer a definição de DSA. Exemplo ocorrido no caso do anticorpo com MFI 14674(DRB1\*07:01), onde a tipagem do doador foi definida como HLA DRB1\*07 e desta forma, podendo não corresponder a DSA. Em nosso estudo, a análise dos anticorpos anti-HLA DRB1 mostrou que no ponto de corte utilizado pelo Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa a sensibilidade foi apenas 26,2%. Porém, foi detectada uma especificidade elevada (99%). Uma limitação deste estudo foi a utilização de dois bancos de dados separados para análise dos anticorpos DRB1 e DQB1. Existe um forte desequilíbrio de ligação entre os antígenos HLA DRB1 e DQB, dificultando a resposta isolada do anticorpo contra DQB nos casos em que o alvo de ligação do anticorpo são células que expressam tanto DR quanto DQ, principalmente em pacientes hipersensibilizados. O desequilíbrio de ligação entre DR, DQA e B nem sempre seguem o padrão tradicional, especialmente em populações com grande diversidade

genética. Apesar disso, normalmente utiliza-se esta informação na falta de uma tipagem completa com seus equivalentes correspondentes sorológicos<sup>36</sup>. O teste de SAB possui uma distribuição de antígenos fixados nas microesferas que pode não representar o fenótipo de nossa população, podendo explicar alguns resultados de SAB negativo e prova cruzada positiva.

Na análise dos anticorpos DQB1, mostramos que a faixa de MFI 5.000 a 10.000 obtivemos a melhor sensibilidade (88,6%), porém uma especificidade menor (87,6%) quando comparada com os demais loci. Nesta análise correram 5 casos em que a XMCF B foi positiva mas o XMV foi negativo, observou-se que em 2 casos haviam anticorpos anti-DP com MFI > 10.000, 1 caso com tipagem do doador com apenas um alelo DRB1 determinado, 1 caso indeterminado e 1 caso em que utilizando a soma dos DSA DQB1 a XMV se tornaria positiva (DSA MFI 6592). Buscando melhorar a especificidade para estes anticorpos DQB1, visualizamos que na faixa de MFI > 15.000 encontramos 97,8% de especificidade portanto, o ponto de corte de escolha para este *locus* poderia ser maior do que para os demais *loci* analisados.

Existe uma limitação do teste de SAB para análise de DQB1, que são beads com DQ $\alpha$  e  $\beta$  pareados, dificultando a análise conforme descrito por Morris *et al.*, 2010. Provavelmente devido a isto neste estudo encontramos uma especificidade menor quando comparada aos demais *loci* estudados. Questão importante quanto ao uso do painel SAB na realização do XMV é a falta de consenso quanto ao critério de positividade desta ferramenta. Neste estudo, o ponto de corte para positividade foi definido como MFI  $\geq$  1000, o mesmo utilizado em nosso laboratório desde o ano de 2010. Outra dificuldade está relacionada à qualidade das tipagens HLA e a necessidade de identificação de todos os *loci* para predição dos resultados de prova cruzada. Apesar destas dificuldades ainda existentes, esta ferramenta possibilita o uso de estratégias trazendo benefícios nas avaliações pré-transplante de órgãos sólidos como a diminuição do tempo de isquemia fria devido ao deslocamento desnecessário de órgãos de doadores para realização de prova cruzada sem possibilidade de transplante e de certa forma diminuição do custo geral nas avaliações pré-transplante.

## 6 - CONCLUSÕES

Ficou demonstrado que níveis de  $MFI \geq 5.000$  tem melhor correlação com os resultados de prova cruzada por citometria de fluxo nos loci ABDRB1.

Devido ao número pequeno de avaliações para o anticorpo HLA-C, não foi possível determinar um valor de ponto de corte para utilização na prova cruzada virtual.

Para os anticorpos anti- HLA-DQB1 encontramos especificidade de 97,8% na faixa de  $MFI \geq 15.000$ , mostrando que o ponto de corte para este *locus* pode ser maior do que para os *loci* A, B e DRB1.

Em conclusão, o exercício da prova cruzada virtual positiva é possível, resultando em economia de tempo, dinheiro e, sobretudo, de soro dos pacientes sensibilizados. Permite ainda que se direcione o rim disponível a quem mais provavelmente apresentará a prova cruzada negativa.

## REFERÊNCIAS

- 1     RODEY, Glenn,E. **HLA beyond tears:introduction to human histocompatibility**. 2ed., 2000.
  
- 2     DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. **Acta Haematology**, v. 73, p. 687, 1958.
  
- 3     TERASAKI, P. I. A Personal Perspective: 100-Year History of the Humoral Theory of Transplantation. **Transplantation**, v. 93, n. 8, p. 751-756, 2012. ISSN 0041-1337.
  
- 4     RODEY, G. E.; REVELS, K.; FULLER, T. C. Epitope specificity of HLA class I alloantibodies: II. Stability of cross-reactive group antibody patterns over extended time periods. **Transplantation**, v. 63, n. 6, p. 885-893, 1997. ISSN 00411337.
  
- 5     ABBAS, A.; LICHTMANN, A. **Cellular And Molecular Immunology**. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
  
- 6     OPELZ, G. Non- HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1570-1576, 2005. ISSN 01406736.
  
- 7     TERASAKI, P.; MCCLELLAND, J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**. 204: 998-1000 p. 1964.
  
- 8     KISSMEYER-NIELSEN, F. et al. Hyperacute Rejection Of Kidney Allografts, Associated With Pre-existing Humoral Antibodies Against Donor Cells. **The Lancet**, v. 288, n. 7465, p. 662-665, 1966. ISSN 0140-6736.
  
- 9     PATEL, R.; TERASAKI, P. I. Significance Of The Positive Crossmatch Test In Kidney Transplantation. England: **New England Journal Of Medicine**. 280: 735-739 p. 1969.
  
- 10    TERASAKI, P. I.; KREISLER, M.; MICKEY, R. M. Presensitization and kidney transplant failures. **Postgraduate Medical Journal**, v. 47, n. 544, p. 89-100, 1971. ISSN 00325473.
  
- 11    TILNEY, N. L. et al. Transplantation immunology: an introduction. **Transplant Immunology**, v. 2, n. 2, p. 99-102, 1994. ISSN 0966-3274.

- 12 MARTIN, S.; DYER, P. A. Identification and importance of MHC: The definition of HLA specificities by cytotoxicity. **Transplant Immunology**, v. 2, n. 2, p. 108-111, 1994. ISSN 0966-3274.
- 13 FERNANDES, S. R.; NEUMANN, J.; SAITOVITCH, D. O papel da citometria de fluxo da detecção de aloanticorpos anti-HLA no pré-transplante renal. **Atualidades em Nefrologia**: Savie. 9: 375-380 p. 2006.
- 14 HO, E. K. et al. Sensitivity, specificity and clinical relevance of different cross-matching assays in deceased-donor renal transplantation. **Transplant Immunology**, v. 20, n. 1, p. 61-67, 2008. ISSN 0966-3274.
- 15 TAIT, B. D. et al. Solid phase HLA antibody detection technology - challenges in interpretation. **Tissue Antigens**. 76: 87-95 p. 2010.
- 16 ROELEN, D. L.; DOXIADIS, I. I. N.; CLAAS, F. H. J. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. **Transplant International** Oxford, UK. 25: 604-610 p. 2012.
- 17 COUZI, L. et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single- antigen bead assay. **Transplantation**, v. 91, n. 5, p. 527, 2011.
- 18 AMICO, P. et al. Clinical relevance of pretransplant donor- specific HLA antibodies detected by single- antigen flow- beads. **Transplantation**, v. 87, n. 11, p. 1681, 2009 2009.
- 19 LEFAUCHEUR, C. et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 21, n. 8, p. 1398, 2010. ISSN 1046-6673.
- 20 WAHRMANN, M. et al. Modified solid- phase alloantibody detection for improved crossmatch prediction. **Hum. Immunol.**, v. 74, n. 1, p. 32-40, 2013. ISSN 0198-8859.
- 21 VLAD, G. et al. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. **Human Immunology**, v. 70, n. 8, p. 589-594, 2009. ISSN 0198-8859.
- 22 ZACHARY, A. A. et al. Using real data for a virtual crossmatch. **Hum. Immunol.**, v. 70, n. 8, p. 574-579, 2009. ISSN 0198-8859.

- 23 VAIDYA, S. et al. Prediction of crossmatch outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. **Transplantation**, v. 82, n. 11, p. 1524-1528, 2006. ISSN 0041-1337.
- 24 MORRIS, G. P. et al. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: A 30-month analysis in living donor kidney transplantation. **Human Immunology**, v. 71, n. 3, p. 268-273, 2010. ISSN 0198-8859.
- 25 ZOET, Y. M. et al. Challenging the golden standard in defining donor-specific antibodies: does the solid phase assay meet the expectations?(Report). **Tissue Antigens**, v. 77, n. 3, p. 225, 2011. ISSN 0001-2815.
- 26 ELLIS, T. M. et al. Diagnostic accuracy of solid phase HLA antibody assays for prediction of crossmatch strength. **Human Immunology**, v. 73, n. 7, p. 706-710, 2012. ISSN 0198-8859.
- 27 TAIT, B. D. et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non- HLA antibodies in transplantation. **Transplantation**, v. 95, n. 1, p. 19, 2013.
- 28 \_\_\_\_\_. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. **Transplantation**, v. 95, n. 1, p. 19-47, Jan 2013. ISSN 1534-6080. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23238534>>.
- 29 AMICO, P. et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. **Transpl. Int.**, v. 24, n. 6, p. 560-569, 2011 2011  
ISSN 0934-0874.
- 30 CARO-OLEAS, J. L. et al. Influence of donor specific HLA antibodies detected by Luminex in kidney graft survival: A multivariate analysis. **Human Immunology**, v. 74, n. 5, p. 545-549, 2013. ISSN 01988859.
- 31 MOHAN, S. et al. Donor- specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 12, p. 2061-2071, 2012. ISSN 10466673.
- 32 TAMBUR, A. R. et al. Perception versus reality ?: Virtual crossmatch - How to overcome some of the technical and logistic limitations. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 8, p. 1886-1893, 2009. ISSN 16006135.

- 33 LING, M. et al. Pretransplant anti- HLA-Cw and anti- HLA-DP antibodies in sensitized patients. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 879-883, 2012. ISSN 0198-8859.
- 34 BOSCH, A. et al. HLA-C antibodies are associated with irreversible rejection in kidney transplantation: Shared molecular epitopes characterization. **Human Immunology**, 2014, v 75, p. 338-341.
- 35 ROGERS, N. M.; BENNETT, G. D.; COATES, P. T. Transplant glomerulopathy and rapid allograft loss in the presence of HLA- Cw7 antibodies. **Transplant International**, v. 25, n. 3, p. e38, 2012. ISSN 0934-0874.
- 36 TAMBUR, A. R. et al. HLA- DQ barrier: Effects on cPRA calculations. **Transplantation**, 2013. ISSN 00411337.
- 37 GARAVOY, M. R. et al. Flow Cytometry Analysis .A High technology crossmatch technique facilitating transplantation. **Transplantation Proceedings**: **Transplantation Proceedings**. 15: 1939 p. 1983.
- 38 GEBEL, H. M.; BRAY, R. A.; NICKERSON, P. Pre- Transplant Assessment of Donor- Reactive, HLA- Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. **American Journal of Transplantation**, 9600 Garsington Road , Oxford , OX4 2DQ , UK . v. 3, n. 12, p. 1488-1500, 2003. ISSN 1600-6135.
- 39 BRAY, R. A. et al. Evolution of HLA antibody detection - Technology emulating biology. **Immunol. Res.**, v. 29, n. 1-3, p. 41-53, 2004. ISSN 0257-277X.
- 40 GEBEL, H. M.; BRAY, R. A. Laboratory assessment of HLA antibodies circa 2006: making sense of sensitivity. **Transplantation Reviews**, v. 20, n. 4, p. 189-194, 2006. ISSN 0955-470X.
- 41 GEBEL, H. M.; BRAY, R. A.; LIWSKI, R. S. Technical aspects of HLA antibody testing. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 18, n. 4, p. 455-462, 2013. ISSN 10872418.
- 42 FERRARI-LACRAZ, S.; TIERCY, J. M.; VILLARD, J. Detection of anti- HLA antibodies by solid- phase assay in kidney transplantation: Friend or foe? **Tissue Antigens**, 79(5): 315-325 p. 2012.
- 43 DUNN, T. B. et al. Revisiting Traditional Risk Factors for Rejection and Graft Loss After Kidney Transplantation.(Report). **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 10, p. 2132, 2011. ISSN 1600-6135.

- 44 CARO - OLEAS, J. L. et al. Clinical relevance of HLA donor- specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 3, p. 1231-1238, 2012. ISSN 0931-0509.
- 45 OTTEN, H. G. et al. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. **Am J Transplant**, v. 12, n. 6, p. 1618-23, Jun 2012. ISSN 1600-6143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22404993> >.
- 46 SUSAL, C. et al. No Association of Kidney Graft Loss With Human Leukocyte Antigen Antibodies Detected Exclusively by Sensitive Luminex Single- Antigen Testing: A Collaborative Transplant Study Report. **Transplantation**, v. 91, n. 8, p. 883-887, 2011. ISSN 0041-1337.
- 47 GLOOR, J. M. et al. Baseline donor- specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 3, p. 582-589, 2010. ISSN 16006135.
- 48 GLOOR, J.; STEGALL, M. D. Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions.(Report). **Nature Reviews Nephrology**, v. 6, n. 5, p. 297, ISSN 1759-5061.
- 49 \_\_\_\_\_. Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions.(Report). **Nature Reviews Nephrology**, v. 6, n. 5, p. 297, 2010. ISSN 1759-5061.
- 50 LEFFELL, M. S.; ZACHARY, A. A. The role of the histocompatibility laboratory in desensitization for transplantation. **Current opinion in organ transplantation**, v. 14, n. 4, p. 398, 2009.
- 51 REED, E. F. et al. Comprehensive Assessment and Standardization of Solid Phase Multiplex- Bead Arrays for the Detection of Antibodies to HLA. **Am. J. Transplant.**, v. 13, n. 7, p. 1859-1870, 2013. ISSN 1600-6135.

## **ANEXO A- Comprovante submissão**

**ScholarOne Manuscripts**

**file:///C:/Users/HELOISA/Desktop/ScholarOne%20Manuscripts.htmlcomprovante.html 1/2**

**American Journal of Transplantation**

**Thank you for submitting your manuscript to American Journal of Transplantation.**

**Manuscript ID: AJTO1500144**

**Title: Virtual Crossmatch: is it feasible? Correlation between antidonor**

**HLA Class I**

**and II antibodies levels and pretransplant**

**flow crossmatches.**

**Authors:**

**Tarasconi, Heloisa**

**Fernandes, Sandra**

**Bortolotto, Andrea**

**Wurdig, Joao**

**Neumann, Jorge**

**Saitovitch, David**

**Date Submitted: 30Jan2015**

**© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.**

**ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.**

**ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.**

**[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)**

**01/02/2015 ScholarOne Manuscripts**

**file:///C:/Users/HELOISA/Desktop/ScholarOne%20Manuscripts.htmlcomprovante.html 2/2**

## APÊNDICE A – ARTIGO

# **Virtual Crossmatch: is it feasible? Correlation between levels of anti-donor HLA antibodies and pre-transplant flow crossmatches.**

Heloisa R. Tarasconi<sup>1,2</sup>, Sandra R. Fernandes<sup>1</sup>, Andrea S. Bortolotto, João Wurdig<sup>1</sup>, Jorge Neumann<sup>1</sup> and David Saitovitch<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Transplantation Immunology Laboratory, Santa Casa Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Post-graduate Program in Medical Sciences and Health-Medical School, Pontifícia Universidade Católica of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Keywords:

Virtual crossmatch(VXM);Solid phase assay(SPA);Single Antigen Beads (SAB);Donor-specific antibodies(DSA);Flow Cytometry crossmatch(FCXM)

## **Abstract**

The introduction of the solid phase assays enhanced the identification of anti-HLA antibodies. By assessing the levels of mean fluorescence intensity (MFI) of these donor-specific antibodies it is possible to try to predict the outcome of the crossmatch, making the exercise of virtual crossmatch (VXM) a reality. The goal of this study is to establish a cut-off point in the fluorescence detected in the SAB class I and II antibodies and to correlate it with flow cytometry crossmatch result. We looked at one antibody as well as the sum of more than one specific antibodies. For the analysis of anti-HLA AB and DRB1 were used 834 tests of 2010 year and for anti-HLA C and DQB1 were used 348 tests between July of 2013 and July of 2014. Anti-HLA A, B and DRB1 DSAs with an  $MFI \geq 5,000$  were associated with a positive FCXM in 97.6% of the tests. The presence of anti-HLA C was infrequent. The analysis of anti HLA-DQB1 showed that only DSAs with  $MFI \geq 15,000$  resulted in a similar specificity of 97.8%, with a likelihood ratio of 13.99. In conclusion,  $MFI \geq 5,000$  for anti-A, B and DRB1, and  $MFI \geq 15,000$  for DQB1 antibodies corresponded to 97% of flow crossmatch positivity, making the exercise of the virtual crossmatch very reliable.

## Introduction

The search for a test that can predict antibody-mediated rejection (AMR) in organ transplantation in the solid organ transplant set is a permanent need. The complement-dependent cytotoxicity cross-matching (CDC) developed in the 60s by Terasaki & McClelland (1) was considered the gold standard until recently and still is in many transplantation centers. The introduction of the flow cytometry crossmatch (FCXM) in 1983 (2) added a much needed sensitivity to this risk evaluation (3-5), and the development of the solid phase assay testings (SPA) using purified HLA antigens, especially the panel of Single Antigen Beads (SAB), greatly improved the detection of anti-HLA antibodies. These developments, coupled with an evolution of molecular HLA typing techniques allowed a more consistent definition of antibodies in sensitized patients and enabled a better allocation of solid organs. The solid phase tests, with its semi-quantification of donor specific antibodies (DSA) through the mean fluorescence intensity levels (MFI), made the exercise of the virtual crossmatch a reality. The major issue still needing clarification is how much of the detected DSAs are really important (6).

The virtual crossmatch (VXM) has emerged as a useful tool for risk assessment in the pre-transplantation and organ allocation. As reviewed by Amico and his colleagues, a negative virtual crossmatch defines a very low risk for AMR and early graft loss (7). On the other side, the definition of a positive virtual crossmatch is much more controversial. The main question that needs clarification is how much DSA is necessary for one to be sure that the real crossmatch will be positive (8). While some studies reports that any antibody detected by solid phase is associated with increased risk of AMR and early graft loss (7, 9-12), others have shown that these antibodies might be clinically irrelevant (13, 14). Some authors suggests that MFI levels on the SAB can be correlated with the results of the crossmatch, as well as the clinical outcome post-transplantation (15, 16), 17, ). Probably the most important missing variable in these correlations is the MFI cut-off point that strongly correlates with the FCXM result (19-21).

In our institutions we use, since 2011, virtual crossmatch for transplant candidates on the waiting list with DSAs against HLA-A, B or DRB1 MFI  $\geq 5,000$ . The patients are considered as having a positive crossmatch against the donor candidates. Such a strategy helps reducing cold ischemia time as well as saving serum in hypersensitized which are used only in situations where there is a higher possibility of a negative crossmatch. Recipient candidates with DSA lower than 5,000 MFI are always crossmatch

tested. Thereby, the aim of this study was to correlate the levels of donor-specific antibodies detected by the SAB panel (HLA- A, B and DRB1 *loci*) with pre-renal transplantation crossmatch results. It also aims to determine a cut-off point in antibodies levels of fluorescence detected in the SAB which correlates with a positive FCXM. Differences among in the sum of one or more donor-specific antibodies in the cut-off point correlated with the positive result in the FCXM were also assessed. In addition, we sought to confirm and improve the strategies of using the virtual crossmatch with the inclusion of C and DQB1 *loci*.

## **Materials and methods**

Retrospective cross-sectional study of patients on the waiting list for kidney transplantation registered at the Santa Casa Hospital Transplantation Immunology Laboratory, Porto Alegre. For the analysis of anti-HLA A, B and DRB1 antibodies, of the 1,316 crossmatches against 161 deceased donors performed in 2010, only samples used simultaneously for SAB panels and for FCXM were analyzed, resulting in 834 crossmatches. For anti-HLA-C and DQB1 antibodies, of 2,288 crossmatches performed between July 2013 and July 2014, only 348 were simultaneously tested for SAB and FCXM. These were included in the present analysis

For the detection of anti-HLA antibodies LABScreen®Mixed and LABScreen® Single Antigen (SAB) tests were used. Positivity was set MFI  $\geq 1,000$ . Sera tested only by CDC crossmatch were excluded from the analysis. For the analysis of anti-HLA-A, B, and DRB1 antibodies, serum samples were divided into three groups using the following virtual crossmatch (VXM) criteria: Group 1 - Negative VXM (without Class I and II DSAs); Group 2 - Positive VXM( presence of DSAs with MFIs  $\geq 5,000$ ); Group 3 - Undetermined VXM( presence of DSAs with MFI between 1,000 and 5,000).table1.For the analysis of anti-HLA-C and anti-DQB1 antibodies, the samples were divided into “VXM negative” (without DSA) or “VXM Positive” (DSAs with MFI $>5,000$ ). Only the SAB were used, and the criteria for positive or negative results were as above. Crossmatches were performed by flow cytometry against T and B lymphocytes, being only included in the analysis when the deceased donors were HLA typed (including DQB1 and C loci for database 2).

## Statistical analysis

Sensitivity and specificity were evaluated by using the ROC (Receiver Operator Characteristics) curve to determine the best cutoff points for the crossmatch prediction. The adopted confidence interval was of 95% and  $p \leq 0.05$  considered significant. In addition, positive and negative likelihood ratios for different MFI ranges were calculated. The statistical analyses were performed with SPSS software, version 20.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL).

## Results

### Correlation between DSA (VXM) and FCXM results

Tables 2, 3 and 4 shows the results obtained with the correlation between VXM and FCXM for HLA- ABDRB1 and HLA-DQB1 and HLA-C, respectively. In the comparison between VXM (using HLA-A, B and DRB1 *loci*) and FCXM, in group 1, 42 sera (9.8%) were FCXM positive. In group 2, 6 sera (2.4%) were negative FCXM. In group 3, 97 sera (61,4%) were FCXM positive and 61 sera (38.6%) were FCXM negative (table 2). In the comparison between VXM (using HLA DQB1 *locus*) and FCXM, group 1 presented 5 positive crossmatches, in group 2 were 11 FCXM negative (table 3). Finally, in the comparison between VXM (using HLA-C *locus*) and FCXM, in group 1, 100% were FCXM negative. However, in group 2, only 1 (2.5%) were FCXM positive (table 4).

To define the best cutoff point that correlates with positive crossmatch, we used ROC curve for XMFLOW T and B with the following categories analyzed for anti-HLA A, B and DRB1: highest DSA HLA A or B; Sum of HLA A and B DSAs; Sum of the highest HLA A, B, and DRB1 DSAs; Sum of all DSAs. Figures 1 and 2 show the ROC curves for HLA ABDRB1 and the results of T and B FCXM. Table 5 contains the cutoff points chosen and separated in their respective categories.

### Anti-HLA and B antibodies

Analyzing the MFI levels for the highest anti-HLA A and B DSA, the mean was 8035 and the minimum and maximum values of MFI were 1,095 and 25,626, respectively. For the sum DSAs, the MFI levels were 12,596. Minimum and maximum values were 1,095 and 81,657, respectively. In the ROC curve analysis for T FCXM, an

area under the curve of 0.92 (CI 0.897 to 0.943) and a cutoff point of MFI 5,024 were observed. The sensitivity was 62.5% and the specificity 99 %. The sum of DSAs obtained for the cutoff of MFI 5,004, 70.3% sensitivity and 98.4% specificity (table 5, 6, figure 1 and 2)

### **Anti-HLA DRB1 Antibodies**

The highest anti-DRB1 DSA had mean MFI of 7,680, and minimum and maximum values were 1,015 and 22,626 respectively. For the DSA Sum, we obtained a mean of 8,517, and minimum values of 1,015 and 40,034 for the maximum value. Looking at the sum of DSA ABDRB1, the mean MFI was 14,278, and the minimum and maximum levels of 1,096 and 93,810 respectively. The ROC curve for this analysis is shown in Figure 3 and the cutoff points chosen in table 7. In the analysis of HLA-DRB1 isolated, we found an area under the curve of 0.73 and sensitivity of 26.2% in the cutoff MFI 5,359, and specificity of 100% for both variables higher DSA DRB1 and Sum DSA DRB1. When we analyzed the sum of all the HLA-ABDRB1, we observed an area under the curve of 0.93 and 75.2% sensitivity and 98,1% specificity for the MFI 5,004 cutoff.(table 6)

### **Anti- HLA-C Antibodies**

In table 4 a correlation between VXM and TFCXM is demonstrated. Forty candidates only (11.4%) had isolated anti-HLA C antibodies against the specific donor. Among these, five sera had DSA with MFI $\geq$  5.000(MFI mean 9,360).However, out of the latter 5, only one case the crossmatch came out positive (anti-HLA-C12 antibody with MFI of 12,394). For this reason, it was not possible to perform a ROC curve for this analysis.

Analyzing anti-HLA-C DSA, a mean MFI of 2,797 was obtained and minimum and maximum values were 1,002 and 12,394, respectively.

### **Anti-HLA-DQB1 Antibodies**

Three hundred and forty-eight crossmatches were performed. In 126 of these (36.2%) there was a unique anti HLA DQB1 antibody, classified into two categories: Negative VXM (DSA with MFI  $\geq$ 5000) and Positive VXM (DSA MFI $\geq$  5000) (Table 3).Forty four (34.9%) cases with MFI $\geq$ 5000 (Pos VXM) and 82 (65.1%) with negative VXM (MFI<5000). In addition to these categories two others variables were analyzed: highest

DQB1 and sum of all DQB1 antibodies. For B FCXM, they were 35 (27.8%) positive results and 89 (70.6%) of negative results. The mean MFI of the group with highest DQB1 was 5529 and the DQB1sum was 656. The positive VXM group presented 31 cases with positive FCXM and 11 negative. In figure 4 and table 8 are the ROC curve analysis.

### **3.6 Analysis of antibodies according to MFI levels**

The data in table 9 show sensitivity, specificity, likelihood ratios for each variable and subdivided into MFI levels: level 1: MFI: 1,000-4,999; level 2: MFI 5,000-10,000; level 3: MFI: 10,001-15,000; level 4: MFI $\geq$  15,000 for T and/or B FCXM. In the level 2 (MFI 5,000-10,000), sensitivity of 62.8%, specificity of 99% and positive likelihood ratio of 63.98 for the variable highest HLA-AB DSA. For the variable sum HLA-AB DSA, the sensitivity was 70.3%, specificity 98.4% and positive likelihood ratio 44.71. The variable Sum of all DSAs achieved sensitivity of 77.6%, specificity of 96.1% and positive likelihood ratio 19.76. In B FCXM, the level 2, for the variable highest HLA-DRB1, a sensitivity of 22.3%, specificity of 99.8% and positive likelihood ratio of 106.38 were obtained.

When analyzing the highest DQB1 DSA and the DQB1 DSA sum, for the MFI level of 15,001-20,000, a sensitivity of 31.4%, specificity of 97.8% and a positive likelihood ratio of 13.99 were obtained. Regarding and sum HLA-DQB1 DSA, sensitivity of 40%, specificity of 96.6% of and positive likelihood ratio of 11.87 were observed.

## **Discussion**

In this study, we demonstrated that anti-HLA ABDRB1 DSA with MFI $\geq$ 5000 resulted in positive FCXM in 97,6% of the patients. Moreover, the levels of MFI in this range also corresponded to the best cutoff points of choice when sensitivity and specificity were measured for a correlation with the flow cytometry crossmatch. These data were consistent for both individual analysis of antibodies as well as DSA Sum or highest ABDRB1 DSA.

Analyzing table 2, in group 1 (XMV NEG), there were 42 (11.1%) positive crossmatches and, of these, we found that 15 had antibody against HLA-DQB1 with MFI $\geq$  5,000 with possible association, 3 with anti- HLA-DQA DSA and 3 against HLA-DP with MFI $\geq$  5000, 1 with anti- HLA C with MFI $\geq$  15,000, with a possible association.

In the group 2 (positive VXM), there were 6 (2.4%) cases with negative FCXM, 4 patients performed high-resolution typing and of these, one due to null allele, two with DSA confirmed (MFI 5,780 and 5,425 respectively), one was analyzed as a positive VXM by mean MFI of the allelic group (A68 MFI 5,934) and after a high resolution typing, it was confirmed specific antibody (A \* 68:01 MFI 4,108). In the other two cases, due to likely no DSA (alleles not confirmed by high resolution for lack of donor material).

In group 3 (Undetermined VXM), as expected, we found a percentage of positive and negative cases. In 61 cases (38.6%) FCXM was negative and for the variable highest DSA ABDRB1, the MFI mean was 2,038; in 97 (61.4%) with positive FCXM present with highest mean of MFI 3,586.

In our study, the frequency of anti-HLA-C antibody was irrelevant (11.4%), and in only one case the crossmatch was positive, making it difficult for a cutoff point to be chosen in order that a virtual crossmatch can be executed. Antibodies against HLA-C antigens are more difficult to be detected because of their low expression on cell surfaces, which can also contribute to their lower immunogenicity. However, there are reports of both acute and chronic rejection allograft being mediated by these antibodies. The introduction of solid phase testing increased the detection of these antibodies. In a study by Tambur and colleagues (20), the prevalence of anti-HLA-C antibodies was 48%. Recent studies have shown a correlation between AMR and graft glomerulopathy and anti- HLA-C antibodies (22, 23). However, stronger evidence is needed as the above mentioned cases are also involved.

In the analysis of the group with higher HLA-DRB1 DSA were 141 sera with  $MFI \geq 1000$  (mean MFI 1,295), and of these, 17 were associated with a negative FCXM (MFI range 1,217-14,674) In the SAB panel it is possible an allelic definition, but most deceased donor HLA typing were performed by low resolution PCR-SSP which locus those allele settings. Such difference may affect DSA definition. An example, in the case of DSA antibody with MFI of 14,674 (DRB1 \* 07: 01), donor typing was later defined as HLA-DRB1 \* 07 and, thus, may not correspond to DSA. In our study, the analysis of the anti-HLA DRB1 antibodies showed that using the cutoff point set by our laboratory, the sensitivity was only 26,2%. However, a high specificity was detected (99%). A limitation of this study was the use of two separate databases for the analysis of DRB1 and DQB1 antibodies. There is a strong linkage disequilibrium between DRB1 and DQB HLA antigens, making the isolated antibody response against DQB where antibodies binding to target cells that express both are as DR DQ, especially in patients hypersensitive. The

Linkage disequilibrium between HLA-DRB1, DQA and B do not always follow the traditional pattern, especially in populations with high genetic diversity. Nevertheless, usually this information is used in the absence of a complete typing, with their corresponding serological equivalent (24, 25) Furthermore SAB tests have distribution of antigens in fixed microbeads that may not represent the phenotype of our population, which may explain some results of SAB negative and positive crossmatch.

The analysis of DQB1 antibodies, showed that with the MFI range of 15,000 to 20,000 we obtained a sensitivity of 31,4%, a specificity of 97,8%, and a likelihood ratio of 13,99. There were 5 cases where the B FCXM was positive but the VXM was negative, it was observed that in 2 patients had antibodies with anti-DP MFI $\geq$  10,000, 1 case with only donor typing a particular DRB1 allele ;1case indeterminate ;1case in which the sum of using the DSA DQB1 XMV become positive (MFI DSA 6,592)

There is a limitation of the SAB test for the analysis of DQB1 antibodies, as beads with DQ $\alpha$  and matched  $\beta$ , making it difficult to analyze it as described by Morris et al., 2010. This is probably the reason why in this study we found a lower specificity compared to the other two *loci* studied before. An important regarding for the use of the SAB panel in performing the XMV is the lack of consensus on positivity criterion of this tool. In this study, the cutoff point for positivity was defined as MFI $\geq$ 1000, the same used in our laboratory since 2010. Another difficulty is related to quality of HLA typing and the need of identification of all the loci for predicting the results of cross-matching. Despite of these remaining problems, this tool enables the use of strategies bringing benefits in pre transplantation evaluation of solid organs such as the reduction of cold ischemia time due to unnecessary displacement of organ donors for performing crossmatching without the need of transplant and a way to decrease the overall cost in transplant.

In conclusion, the exercise of virtual crossmatch is possible, resulting in savings of time, money and, above all, sera of sensitized patients. It also allows directing the available kidney to those most likely to present a negative crossmatch.

## **Disclosure**

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose .

## References

1. Terasaki P, McClelland J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964. p. 998-1000.
2. Garavoy MR, Reinsschmidt MA, Bigos M, et al. Flow Cytometry Analysis .A High technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplantation Proceedings: Transplantation Proceedings*; 1983. p. 1939.
3. Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre- Transplant Assessment of Donor- Reactive, HLA- Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *American Journal of Transplantation*. 2003;3(12):1488-500.
4. Bray RA, Nickerson PW, Kerman RH, Gebel HM. Evolution of HLA antibody detection - Technology emulating biology. *Immunol Res*. 2004;29(1-3):41-53.
5. Gebel HM, Bray RA. Laboratory assessment of HLA antibodies circa 2006: making sense of sensitivity. *Transplantation Reviews*. 2006;20(4):189-94.
6. Gebel HM, Bray RA, Liwski RS. Technical aspects of HLA antibody testing. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2013;18(4):455-62.
7. Amico P, Hirt-Minkowski P, Honger G, Gurke L, Mihatsch MJ, Steiger J, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int*. 2011 24(6):560-9.
8. Ferrari-Lacraz S, Tiercy JM, Villard J. Detection of anti- HLA antibodies by solid- phase assay in kidney transplantation: Friend or foe? 2012. p. 315-25.
9. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(8):1398.
10. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting Traditional Risk Factors for Rejection and Graft Loss After Kidney Transplantation.(Report). *American Journal of Transplantation*. 2011;11(10):2132.
11. Caro - Oleas JL, González - Escribano MF, González - Roncero FM, Acevedo - Calado MJ, Cabello - Chaves V, Gentil - Govantes MÁ, et al. Clinical relevance of HLA donor- specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012;27(3):1231-8.
12. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hené RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant*. 2012;12(6):1618-23.
13. Susal C, Ovens J, Mahmoud K, Dohler B, Scherer S, Ruhstroth A, et al. No Association of Kidney Graft Loss With Human Leukocyte Antigen Antibodies Detected Exclusively by Sensitive Luminex Single- Antigen Testing: A Collaborative Transplant Study Report. *Transplantation*. 2011;91(8):883-7.

14. Zoet YM, Brand - Schaaf SH, Roelen DL, Mulder A, Claas FHJ, Doxiadis IIN, et al. Challenging the golden standard in defining donor-specific antibodies: does the solid phase assay meet the expectations?(Report). *Tissue Antigens*. 2011;77(3):225.
15. Gloor JM, Stegall MD, Winters JL, Cornell LD, Fix LA, DeGoey SR, et al. Baseline donor- specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2010;10(3):582-9.
16. Gloor J, Stegall MD. Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions.(Report). *Nature Reviews Nephrology*.6(5):297.
17. Ellis TM, Schiller JJ, Roza AM, Cronin DC, Shames BD, Johnson CP. Diagnostic accuracy of solid phase HLA antibody assays for prediction of crossmatch strength. *Human Immunology*. 2012;73(7):706-10.
18. Gloor J, Stegall MD. Sensitized renal transplant recipients: current protocols and future directions.(Report). *Nature Reviews Nephrology*. 2010;6(5):297.
19. Vaidya S, Partlow D, Susskind B, Noor M, Barnes T, Gugliuzza K. Prediction of crossmatch outcome of highly sensitized patients by single and/or multiple antigen bead luminex assay. *Transplantation*. 2006;82(11):1524-8.
20. Tambur AR, Ramon DS, Tambur DB, Kaufman J, Skaro X, Caicedo B, et al. Perception versus reality ? : Virtual crossmatch - How to overcome some of the technical and logistic limitations. *American Journal of Transplantation*. 2009;9(8):1886-93.
21. Leffell MS, Zachary AA. The role of the histocompatibility laboratory in desensitization for transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2009;14(4):398.
22. Rogers NM, Bennett GD, Coates PT. Transplant glomerulopathy and rapid allograft loss in the presence of HLA- Cw7 antibodies. *Transplant International*. 2012;25(3):e38.
23. Bosch A, Llorente S, Eguia J, Mrowiec A, Boix F, Lopez-Hernandez R, et al. HLA-C antibodies are associated with irreversible rejection in kidney transplantation: Shared molecular eplets characterization. 2014.
24. Tambur AR, Leventhal JR, Walsh RC, Zitzner JR, Friedewald JJ. HLA- DQ barrier: Effects on cPRA calculations. *Transplantation*. 2013.
25. Reed EF, Rao P, Zhang Z, Gebel H, Bray RA, Guleria I, et al. Comprehensive Assessment and Standardization of Solid Phase Multiplex- Bead Arrays for the Detection of Antibodies to HLA. *Am J Transplant*. 2013;13(7):1859-70.

# Figures

Figure 1- ROC curve DSA HLA-ABDRB1 x FCXM T

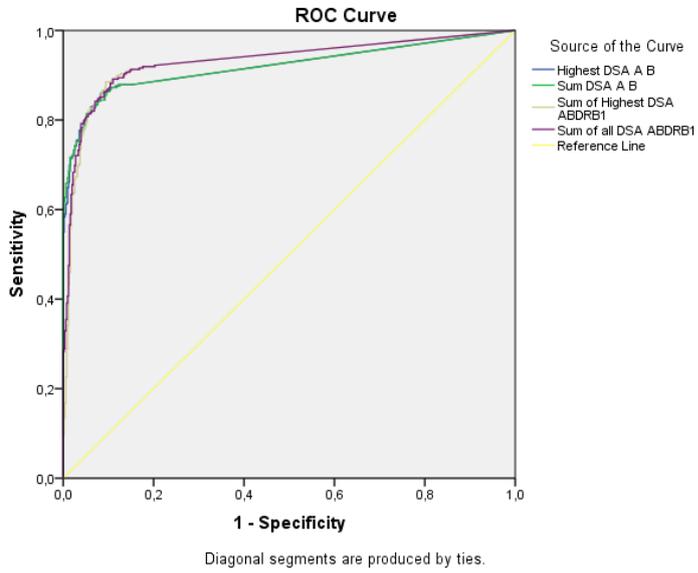


Figure 2- ROC curve DSA HLA-ABDRB1 x FCXM

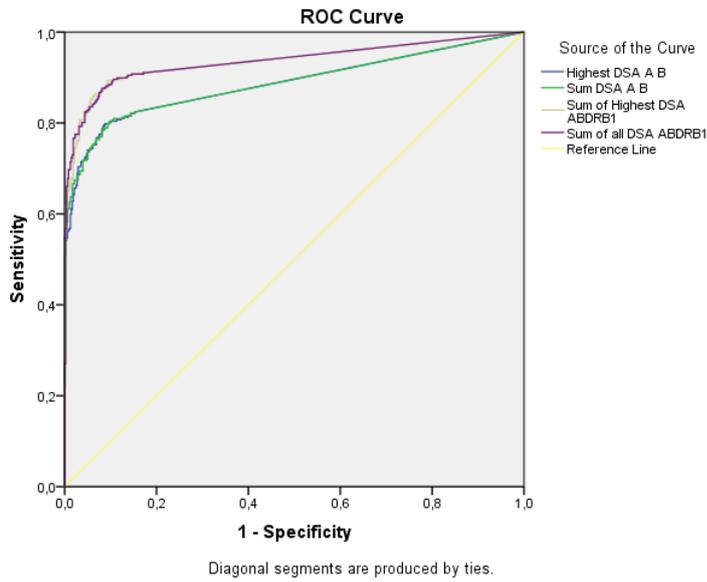
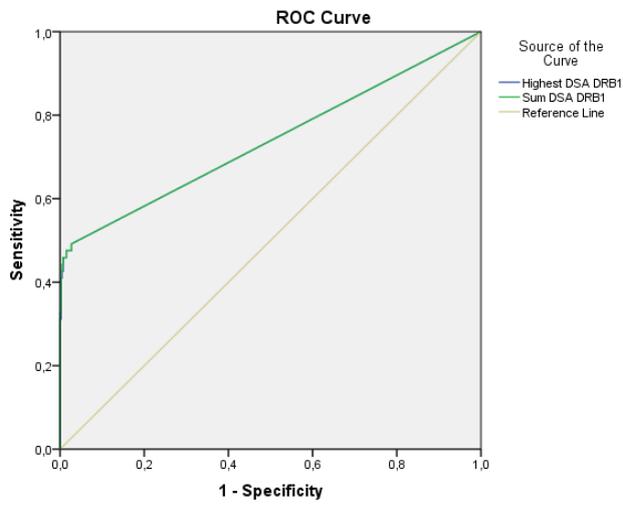
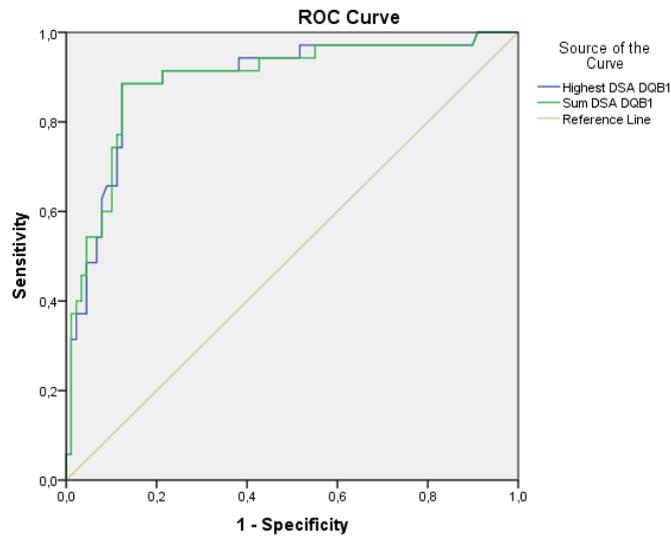


Figure 3- ROC curve DSAHLA- DRB1 x FCXM B



Diagonal segments are produced by ties.

Figure 4- ROC curve DSA HLA-DQB1 x FCXM B



Diagonal segments are produced by ties.

**TABLES**

**Table 1 - Frequency of groups according to VXM**

<b>VXM – Frequency (%)</b>	<b>HLA- ABDRB1</b>	<b>HLA-DQB1</b>	<b>HLA-C</b>
Group 1 – Negative VXM	429 (51.4)	82 (65.1)	35 (87.5)
Group 2 – Positive VXM	247 (29.6)	44 (34.9)	5 (12.5)
Group 3 – Undetermined VXM	158 (19)		
<b>Total</b>	<b>834</b>	<b>126</b>	<b>40</b>

**Table 2- VXM x T FCXM for HLA-ABDRB1**

		<b>VXM HLA-ABDRB1</b>			
		<b>Group 1- NEG (S/DSA)</b>	<b>Group 2- POS (MFI&gt;5000)</b>	<b>Group 3- IND (MFI 1000 a 5000)</b>	<b>TOTAL</b>
<b>FCXM T and B</b>	<b>NEG</b>	387(90,2%)	<b>6(2,4%)</b>	<b>61(38,6%)</b>	454
	<b>POS</b>	<b>42(9,8%)</b>	241(97,6%)	<b>97(61,4%)</b>	380
<b>TOTAL</b>		429(100%)	247(100%)	158(100%)	834

P<0.001 r<sub>(s)</sub>=0.62

**Table 3 – VXM x B FCXM HLA-DQB1**

		<b>VXM HLA- DQB1</b>		
		<b>Group 1-NEG (MFI 1000 a 5000)</b>	<b>Group 2-POS (MFI&gt;5000)</b>	<b>TOTAL</b>
<b>FCXM B</b>	<b>NEG</b>	78(87.6%)	<b>11(12.4%)</b>	89
	<b>POS</b>	<b>5(14,3%)</b>	30(85,7%)	35
	<b>TOTAL</b>	83	41	124

P<0.001 r<sub>(s)</sub>=0.72

**Table 4 – VXM x T FCXM HLA-C**

		VXM HLA- C		
		Group 1-NEG (MFI 1000 a 5000)	Group 2-POS (MFI>5000)	TOTAL
FCXM T	NEG	35(89,7%)	4(10,3%)	39
	POS	0	1(100%)	1
	TOTAL	35(87,5%)	5(12,5%)	40

P=0,006  $r_{(s)}=0,42$

**Table 5 - ROC curve analysis DSA highest HLA-AB x FCXM T**

Groups	N(pos/neg)	Área under the curve			Cutoff		
		Área	P	95%CI	Cutoff	Sensibility(%)	Especificity(%)
<b>Highest DSA AB</b>	323/509	,920	<0,001	0,897- ,0943	2502	79,9	95,1
					4042	70,9	98,4
					<b>5024</b>	<b>62,5</b>	<b>99</b>
					6564	55,1	100
<b>Sum DSA AB</b>	323/509	,920	<0,001	0,897-0,943	2502	82,7	93,5
					4027	74,6	97,1
					<b>5004</b>	<b>70,3</b>	<b>98,4</b>
					6657	61,9	99,8
<b>Highest DSA ABDRB1</b>	322/509	,930	<0,001	0,909-0,950	2502	86,6	91,2
					3671	80,7	95,3
					<b>5024</b>	<b>71,7</b>	<b>96,3</b>
					7797	60,2	98
<b>Sum DSA ABDRB1</b>	322/509	,932	<0,001	0,912-0,952	2502	88,2	89,4
					4054	81,4	93
					<b>5004</b>	<b>77,6</b>	<b>96,1</b>
					6346	70,2	97,2

**Table 6 - ROC curve analysis DSA HLA-AB x FCMX B**

Groups	N(pos/neg)	Area under curve			Cutoff		
		Área	P	95%CI	Cutoff	Sensibility(%)	Specificity(%)
<b>Highest DSA AB</b>	347/478	,887	<0,001	0,860- ,0913	2502	74,1	94,8
					4042	65,1	97,9
					<b>5024</b>	<b>57,6</b>	<b>98,7</b>
					6564	51	100
<b>Sum DSA AB</b>	347/478	,887	<0,001	0,861-0,913	2502	76,4	92,9
					4027	74,6	96,7
					<b>5004</b>	<b>65,1</b>	<b>98,3</b>
					8277	54,8	100
<b>Sum DSA</b>	347/478	,935	<0,001	0,916-0,955	2502	86,	92,3
<b>ABDRB1</b>					4528	77,5	97,5
					<b>5004</b>	<b>75,2</b>	<b>98,1</b>
					10777	56,8	99,8

**Table 7 - ROC curve analysis DSA HLA-DRB1x XMCF B**

Groups	N(pos/neg)	Area under curve			Cutoff		
		Area	P	95%CI	Cutoff	Sensibility(%)	Specificity(%)
<b>Higest DSA DRB1</b>	61/405	,738	<0,001	0,655- 0,821	2544	37,7	99,8
					<b>5359</b>	<b>26,2</b>	<b>100</b>
					10724	16,4	100
<b>Sum DSA</b>	61/405	,738	<0,001	0,655 -0,821	2544	39,3	99,6
<b>DRB1</b>					<b>5354</b>	<b>26,2</b>	<b>100</b>
					11606	16,4	100

**Table 8 - ROC curve analysis DSA HLA-DQB1 x XMCF B**

Groups	N(pos/neg)	Area under curve			Cutoff		
		Área	<i>P</i>	95%CI	Cutoff	Sensibility(%)	Specificity (%)
<b>Highest DSA DQB1</b>	35/89	,893	<0,001	0,825- 0,960	2504	91,4	68,5
					<b>5150</b>	<b>85,7</b>	<b>87,6</b>
					10119	54,3	93,3
					15804	31,4	98,9
<b>Sum DSA DQB1</b>	35/89	,894	<0,001	0,826 -0,962	2504	91,4	64
					<b>5163</b>	<b>85,7</b>	<b>87,6</b>
					10457	60	91
					15094	40	90,6

**Table 9 - Antibodies analysis according to MFI levels.**

Variable	levels MFI	Sensibility(%)	Specificity(%)	LR+	LR-
Highest DSA AB x XMCF T AUC:0,92(0,90-0,94) $r_{(s)}=0,72$	1000-4999	87,9	84,9	5,81	0,14
	<b>5k a 10k</b>	<b>62,8</b>	<b>99</b>	<b>63,98</b>	<b>0,38</b>
	10k a 15k	40,6	100	-	0,59
Highest DSA AB x XMCF B AUC:0,89(0,86-0,91) $r_{(s)}=0,72$	1000-4.999	82,5	84,7	5,40	0,21
	<b>5k a 10k</b>	<b>58,0</b>	<b>98,7</b>	<b>46,24</b>	<b>0,42</b>
	10k a 15k	37,6	100	-	0,62
Sum DSA AB x FLOW T AUC:0,92(0,90-0,94) $r_{(s)}=0,78$	1000-4999	87,9	84,9	5,81	0,14
	<b>5k a 10k</b>	<b>70,3</b>	<b>98,4</b>	<b>44,71</b>	<b>0,30</b>
	10k-15k	52,6	100	-	0,47
Sum DSA AB x Flow B AUC:0,92(0,90-0,94) $r_{(s)}=0,73$	1000-4999	82,5	84,7	5,40	0,21
	<b>5k a 10k</b>	<b>65,2</b>	<b>98,3</b>	<b>38,97</b>	<b>0,35</b>
	10k a 15k	48,9	100	-	0,51
Highest DSA DRB1 x XMCF B AUC:0,74(0,65-0,82) $r_{(s)}=0,56$	1000-4999	49,2	97,3	18,11	0,52
	<b>5k a 10k</b>	<b>31,1</b>	<b>99,8</b>	<b>126,15</b>	<b>0,69</b>
	10k a 15k	27,9	100	-	0,72
Sum DSA DRB1 x XMCF B AUC:0,74(0,65-0,82) $r_{(s)}=0,56$	1000-4999	49,2	97,3	18,11	0,52
	<b>5k a 10k</b>	<b>27,9</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>0,72</b>
	10k a 15k	16,4	100	-	0,84
Sum DSA ABDRB1 x XMCF T AUC:0,93(0,91-0,95) $r_{(s)}=0,78$	1000-4999	92,2	79,4	4,47	0,10
	<b>5k a 10k</b>	<b>77,6</b>	<b>96,1</b>	<b>19,76</b>	<b>0,23</b>
	10k-15k	60,6	98,2	34,25	0,40
Sum DSA ABDRB1 x XMCF B AUC:0,93(0,91-0,95) $r_{(s)}=0,79$	1000-4999	91,1	82,4	5,18	0,11
	<b>5k a 10k</b>	<b>75,2</b>	<b>98,1</b>	<b>39,95</b>	<b>0,25</b>
	10k-15k	58,2	99,6	139,13	0,42
highest DSA DQB1 x XMCF B AUC:0,89(0,82-0,96) $r_{(s)}=0,72$	5k a 10k	88,6	87,6	7,17	0,13
	10k a 15k	54,3	93,3	8,05	0,49
	<b>15k a 20k</b>	<b>31,4</b>	<b>97,8</b>	<b>13,99</b>	<b>0,70</b>
	5k a 10k	88,6	87,6	7,17	0,13
Sum DSA DQB1 x XMCF B AUC:0,89(0,83-0,96) $r_{(s)}=0,72$	10k a 15K	60,0	91,0	6,68	0,44
	<b>15k a 20k</b>	<b>40,0</b>	<b>96,6</b>	<b>11,87</b>	<b>0,62</b>
	5k a 10k	88,6	87,6	7,17	0,13

