

# Rilevazione di anticorpi anti HLA con nuova metodica citofluorimetrica in una casistica di pazienti nefropatici candidati al trapianto

M. Argiolas<sup>1</sup>, G.B. Piredda<sup>2</sup>, P. Piras<sup>3</sup>, A.M. Corpino<sup>3</sup>, M. Bajorek<sup>3</sup>, P. Todde<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Struttura Semplice Dipartimentale Immunologia dei Trapianti Az. Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari

<sup>2</sup> Struttura Semplice Dipartimentale Trapianto Renale Az. Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari

<sup>3</sup> Struttura Complessa di Immunoematologia e Centro Trasfusionale Az. Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari

<sup>4</sup> Dipartimento dei Servizi Speciali di Diagnosi e Cura Az. Ospedaliera G. Brotzu, Cagliari

## Riassunto

**Premesse.** La presenza di allo anticorpi anti HLA (Human Leucocyte Antigen) in pazienti nefropatici è dovuta a stimoli immunogeni: trasfusioni, gravidanze, trapianti. Si evidenziano con aspecifica metodica classica sierologica CDC (Complement Dependent Cytotoxicity), o con recenti e specifiche metodiche (citofluorimetrica, immunoenzimatica). Poiché gli anticorpi preformati anti HLA sono legati ad una maggiore incidenza di rigetti acuti e cronici appare opportuno studiarli con specifica metodica. È opportuno valutare anche l'impatto degli stimoli immunogeni nella formazione dei suddetti anticorpi, per un'eventuale prevenzione.

**Metodi.** Sono stati studiati 116 pazienti (37 sesso femminile e 79 sesso maschile). Gli anticorpi anti HLA sono stati ricercati con 2 metodiche: 1) Microlinfocitotossicità (CDC-PRA), previa separazione dei linfociti T e B con sfere magnetiche e utilizzando un pannello di 30 cellule, 2) Test in citofluorimetria (FLOW-PRA Screening-One Lambda Inc. 21001 Kittridge St, Canoga Park, CA.) che utilizza un pannello di microparticelle ricoperte da antigeni purificati di classe I e di classe II. L'analisi statistica è stata effettuata mediante analisi del test esatto di Fisher e del Chi-quadro e, per ciascuna metodica, è stata valutata la sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo e negativo.

**Risultati.** Su 33 pazienti positivi con metodica classica in CDC-PRA (17 per B linfociti e 16 per B+T linfociti), 25 pazienti hanno confermato la ricerca positiva in citometria per anticorpi anti HLA specifici (10 tra i positivi per B linfociti e 15 fra i positivi per B+T linfociti).

2 pazienti sono risultati positivi solo in citofluorimetria. Il FLOW-PRA ha una sensibilità minore e una maggiore specificità, mentre i risultati ottenuti con le due metodiche sono confrontabili ( $p < 0.0001$ ). Dei 27 pazienti positivi in citometria: 18 sono positivi per entrambe le classi, 4 solo per la classe I e 5 solo per la classe II. Per ciò che concerne lo stimolo immunogeno responsabile dell'immunizzazione: 10/25 trasfusi, 3/9 gravidanze, 4/8 trapiantati, 10/12 pazienti con stimoli immunogeni diversi, si sono immunizzati. I risultati non sono statisticamente significativi ( $p > 0.05$ ).

**Conclusioni.** I dati evidenziano come la positività in CDC-PRA per i B linfociti è spesso non legata alla formazione di anticorpi anti HLA, mentre la positività per i linfociti T + B è quasi sempre legata alla formazione di anticorpi specifici. La risposta immunitaria è più spesso rivolta contro entrambe le classi. La determinazione degli anticorpi anti HLA specifica con metodica citofluorimetrica consente di individuare i pazienti a rischio di rigetto, mentre appare indispensabile l'utilizzo di emazie filtrate per i candidati al trapianto per prevenire l'allo immunizzazione anti HLA da trasfusione.

*PAROLE CHIAVE:* Trapianto, HLA, Anticorpi, Rene, Citometria

## Anti-HLA antibodies in nephropathic patients

**Background.** The presence of anti-human leukocyte antigen (HLA) alloantibodies in nephropathic patients is due to immunogenic stimuli such as transfusions, pregnancies, and transplantations. These stimuli can be highlighted using a

---

classic aspecific serologic technique, such as complement-dependent cytotoxicity (CDC) or using more recent and specific techniques, such as cytofluorimetrics or enzyme linked immunoabsorbant assay (ELISA).

Because the presence of anti-HLA preformed antibodies is linked to the largest incidence of both acute and chronic rejection, it seems appropriate to re-evaluate that data obtained using aspecific classic serological analysis techniques by using the more specific cytofluorimetric technique. To aid in the possible prevention of anti-HLA antibody formation, it is also appropriate to analyze the influence of immunogenic stimuli on the development of these antibodies.

**Methods.** We studied 116 patients (37 women and 79 men). Anti-HLA antibodies were detected using microlymphotoxic technique after separation of B and T lymphocytes. This separation was obtained using magnetic balls. We used a 30-cell panel. We also used a recent cytofluorimetric test (Flow Pra screening; One Lambda Inc., 21001 Kittridge St., Canoga Park, California, U.S.A.) with a panel of micrograins covered with class I and class II purified antigens. Statistical analysis was performed using chi-square analysis or Fischer's exact test. For each test, sensibility, specificity, and positive and negative value were measured.

**Results.** Among 33 patients testing positive using the classic CDC-PRA technique (17 positive for B-lymphocytes and 16 positive for both B and T lymphocytes), using cytometry, 25 were positive for anti-HLA-specific antibodies (10 among the B lymphocyte-positive patients and 15 among the B + T lymphocyte-positive patients).

Two patients were shown positive only using the cytofluorimetric method. Of the 27 patients positive at cytometry, 18 were positive for class I and class II, 4 for class I, and 5 for class II. FLOW-PRA screening results were less sensitive and more specific. The results obtained by the two methods are comparable ( $p < 0.0001$ ).

The immunogenic stimuli found responsible for immunization were: transfusion in 10 of 25 patients, pregnancies in 3/9 patients, transplant in 4/8 patients, and different immunogenic stimuli in 10/12 patients. The results were not statistically significant ( $p > 0.05$ ).

**Conclusions.** Data show that positivity for B lymphocytes obtained using CDC-PRA is not always linked to the development of anti-HLA antibodies, whereas positivity for B+T lymphocytes, obtained using CDC-PRA, is often linked to specific antibody development. Immune response is more often directed against class I and II antibodies. The specific detection of HLA antibodies using the cytofluorimetric method allows us to identify patients at risk for rejection, and it suggests that red cells should be filtrated to prevent anti-HLA immunization secondary to transfusion in transplantation candidates. (*G Ital Nefrol* 2003; 20: 388-92)

**KEY WORDS:** Transplantation, Human leukocyte antigen (HLA), Antibodies, Kidney, Cytometry