

Valutazione della capacità degli anticorpi anti-HLA di attivare il complemento

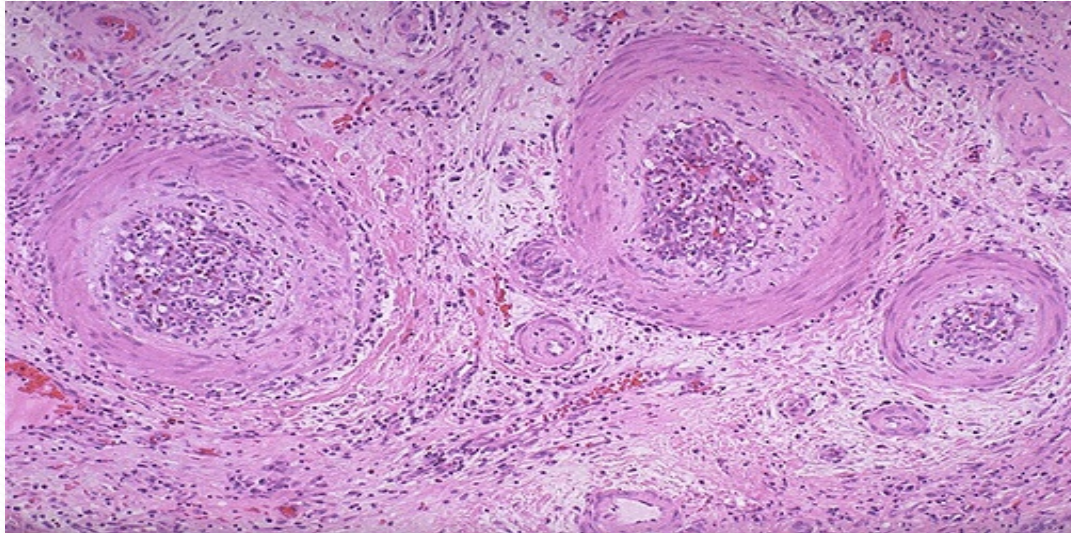
Elvira Poggi

Centro Regionale Trapianti Lazio
CNR-IFT Roma S. Camillo

XXVI Congresso Nazionale AIBT
Pavia, 3-5 Ottobre 2019

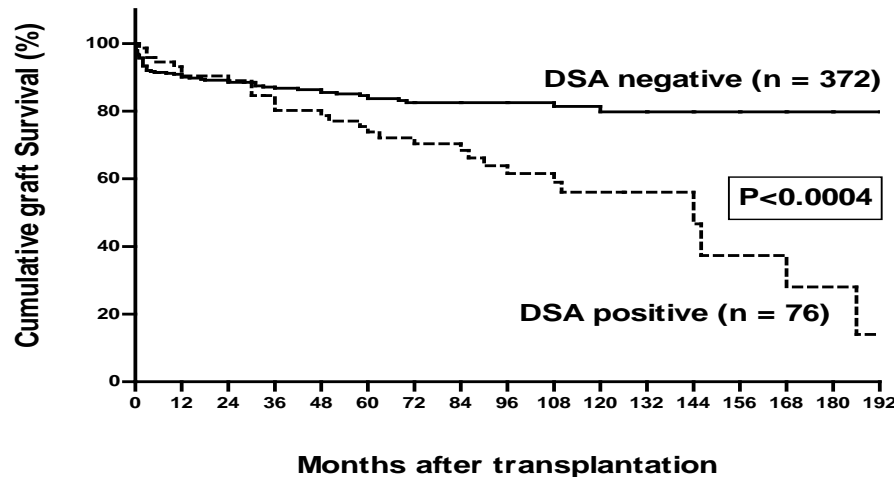
Rigetto del trapianto

Rigetto anticorpo mediato (AMR) rappresenta ancora la principale causa di perdita a medio e lungo termine del trapianto.



Sensibilizzazione ad alloantigeni e trapianto

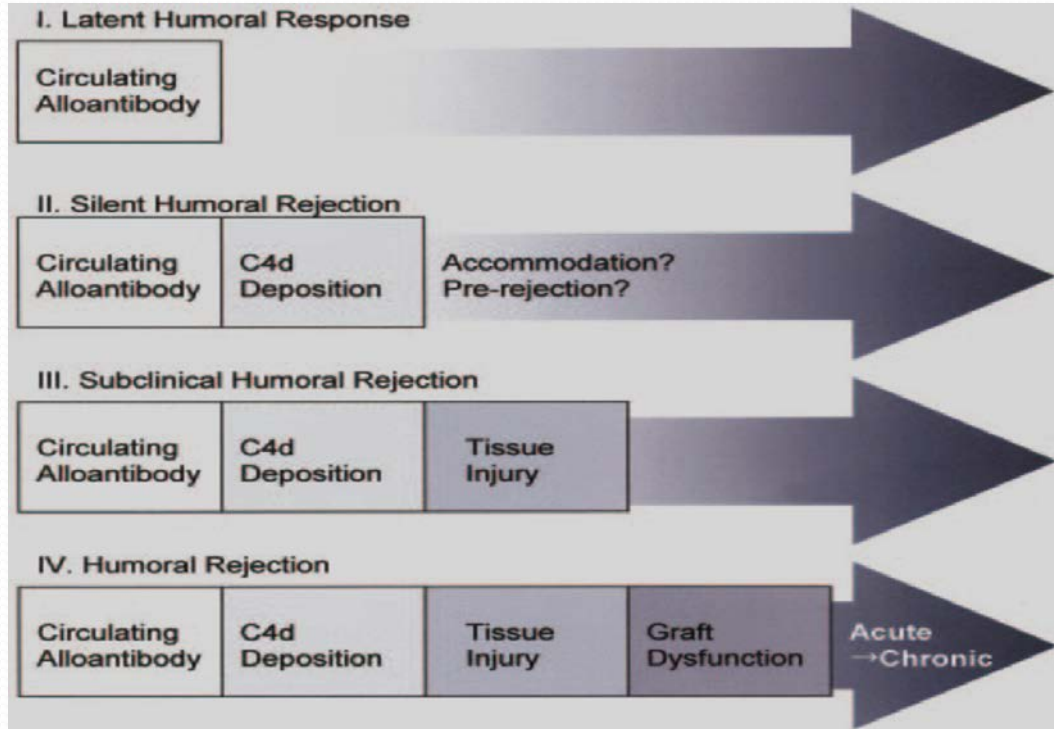
Anticorpi anti-HLA donatore-specifici (DSA) preformati o prodotti *de novo* post-trapianto rappresentano il principale fattore di rischio di AMR.



Stages of Humoral Alloreactivity

(National Conference to Assess Antibody Mediated Rejection in Solid Organ Transplantation.

Am J Transplant 4: 1033-1041, 2004)



Fattori che possono influenzare l'entità e la durata della risposta anticorpale umorale

(The complexity of the humoral immune response against HLA antigen.

Schaub S, Honger G, Amico P. - Transpl Int 2013; 27: 249.)

- ✓ Caratteristiche degli anticorpi
 - Quantità, numero e classe HLA
 - Forza di legame all'epitopo target
 - Capacità di attivare il complemento
 - Capacità di reclutare cellule tramite i recettori Fc
- ✓ Dall'entità di espressione delle molecole HLA sulle cellule endoteliali
- ✓ Fattori immunomodulanti (cytokines feedback)

The New England Journal of Medicine

Copyright, 1969, by the Massachusetts Medical Society

Volume 280

APRIL 3, 1969

Number 14

SIGNIFICANCE OF THE POSITIVE CROSSMATCH TEST IN KIDNEY TRANSPLANTATION*

RAMON PATEL, M.R.C.P., AND PAUL I. TERASAKI, PH.D.

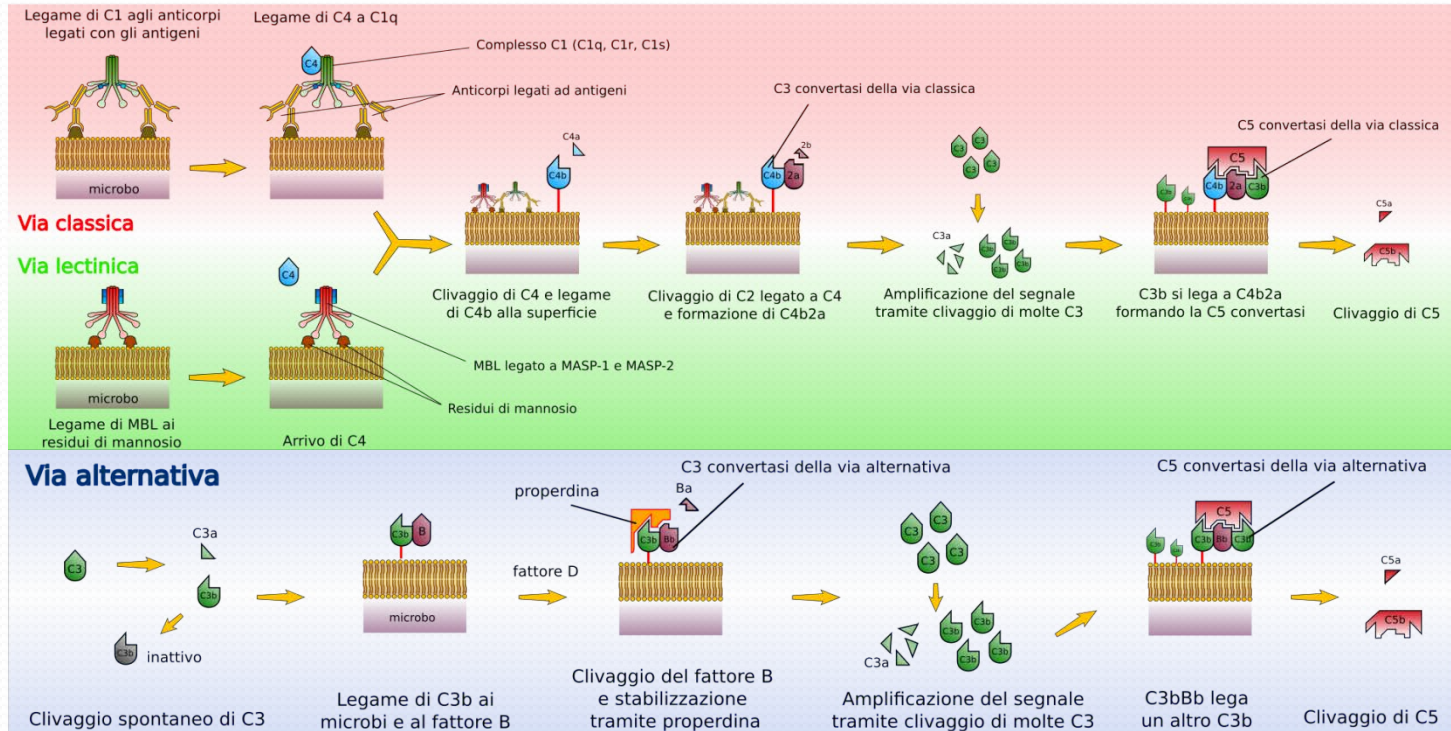
TABLE 2. *Classification of 248 Kidney Transplants Performed
in 63 Recipients with and 163 without Preformed Antibodies
According to the Duration of Graft Survival.*

GRAFT SURVIVAL	RECIPIENTS WITH ANTIBODIES			RECIPIENTS WITHOUT ANTIBODIES
	POSITIVE CROSSMATCH	NO CROSSMATCH	NEGATIVE CROSSMATCH	
Immediate failures	24 (80.0%)	6 (26.1%)	4 (14.8%)	4 (2.4%)
Failure within < 3 mo	0	6	4	32
Failure after > 3 mo	1	3	7	22
Survival for < 3 mo	2	2	1	6
Survival after > 3 mo	3	6	11	104
Totals	30	23	27	168

Il Sistema del Complemento *(I)*

- ✓ Uno dei principali meccanismi effettori dell'immunità umorale;
- ✓ E' costituito da proteine solubili e di membrana, che interagiscono tra loro e con altre componenti del sistema immunitario;
- ✓ Le proteine del complemento sono normalmente presenti nel torrente circolatorio sotto forma di precursori inattivi che vengono attivati solo in particolari condizioni originando prodotti bioattivi responsabili delle diverse funzioni effettrici.

Il Sistema del Complemento (II)



Tests di citotossicità complemento-mediata (PRA e crossmatch)

Utilizzati per la valutazione della compatibilità donatore/ricevente
trapianto

- PRO:**
- Identifica anticorpi linfocitotossici di notevole rilevanza clinica (**controindicazione assoluta al trapianto di rene**).
- CONTRO:**
- Scarsa sensibilità (Isotipo delle immunoglobuline e sottoclassi, concentrazione degli anticorpi)
 - Scarsa specificità (risultato positivo può essere dovuto ad anticorpi non-hla)
 - Molto difficile definire tutte le specificità anticorpali presenti.

Crossmatch

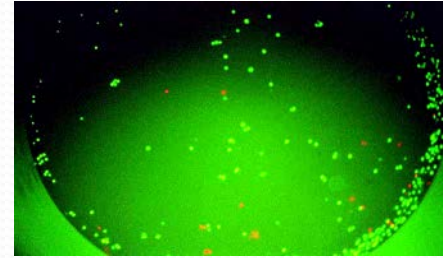
CDC-XM

identifica anticorpi fissanti il complemento
(NIH → long incubation/Amos → AHG)

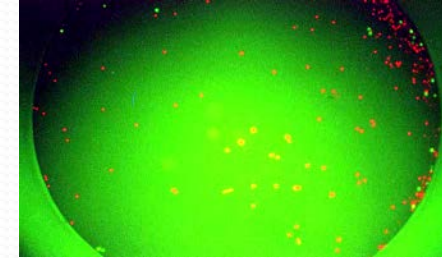


FC-XM

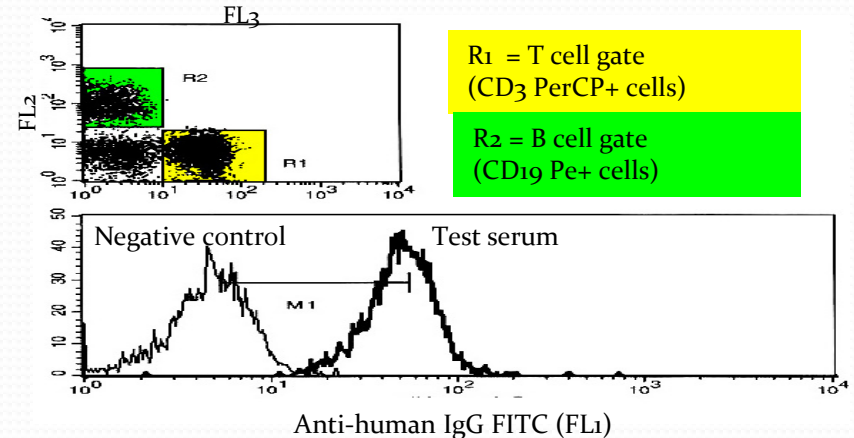
identifica anticorpi fissanti e non il
complemento
elevata sensibilità



Score 1/2 = Negativo

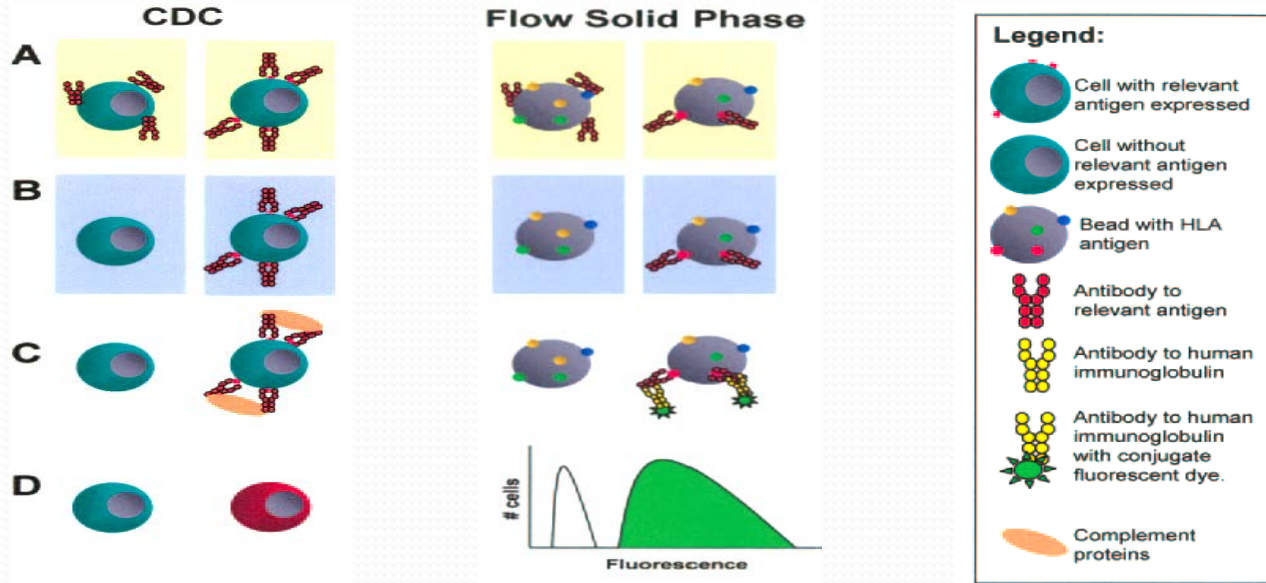


Score 4/6/8 = Positivo



Analisi della Sensibilizzazione HLA

Screening (%PRA) e Specificità di anticorpi anti-HLA



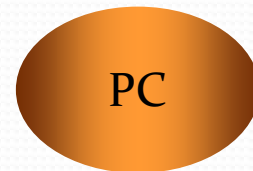
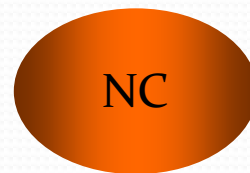
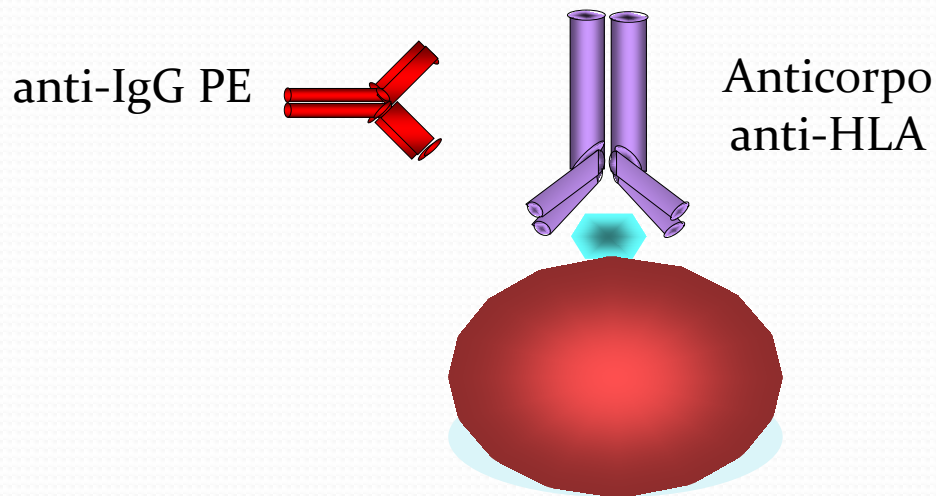
Differiscono per:

- ✓ Specificità: - non antigene-specifiche (CDC)
- antigene-specifiche (Elisa, Flow)
- ✓ Sensibilità (CDC < ELISA < Citometria)

Identificazione, caratterizzazione e valutazione semiquantitativa della “forza” dei DSA

Principi della Tecnica

✓ Luminex-Single Antigen Beads (SAB)



Biglie di controllo:

- NC (controllo negativo= biglia nuda)
- PC (controllo positivo = IgG umane)

Nuove tecniche in fase solida

Luminex-Single Antigen Beads (L-SAB) (I)

Tecniche caratterizzate da elevata sensibilità e specificità:

- ✓ Identificano anticorpi diretti contro molecole di tutti i loci HLA (A, B, C, DRB, DQA₁, DQB₁, DPA₁ e DPB₁), spesso anche a livello allelico;
- ✓ Eliminano le reazioni falso-positive dovute ad anticorpi non-HLA o ad autoanticorpi;
- ✓ Consentono la valutazione semiquantitativa della “forza” degli anticorpi evidenziati mediante analisi dell’intensità di fluorescenza media (MFI).

Nuove tecniche in fase solida

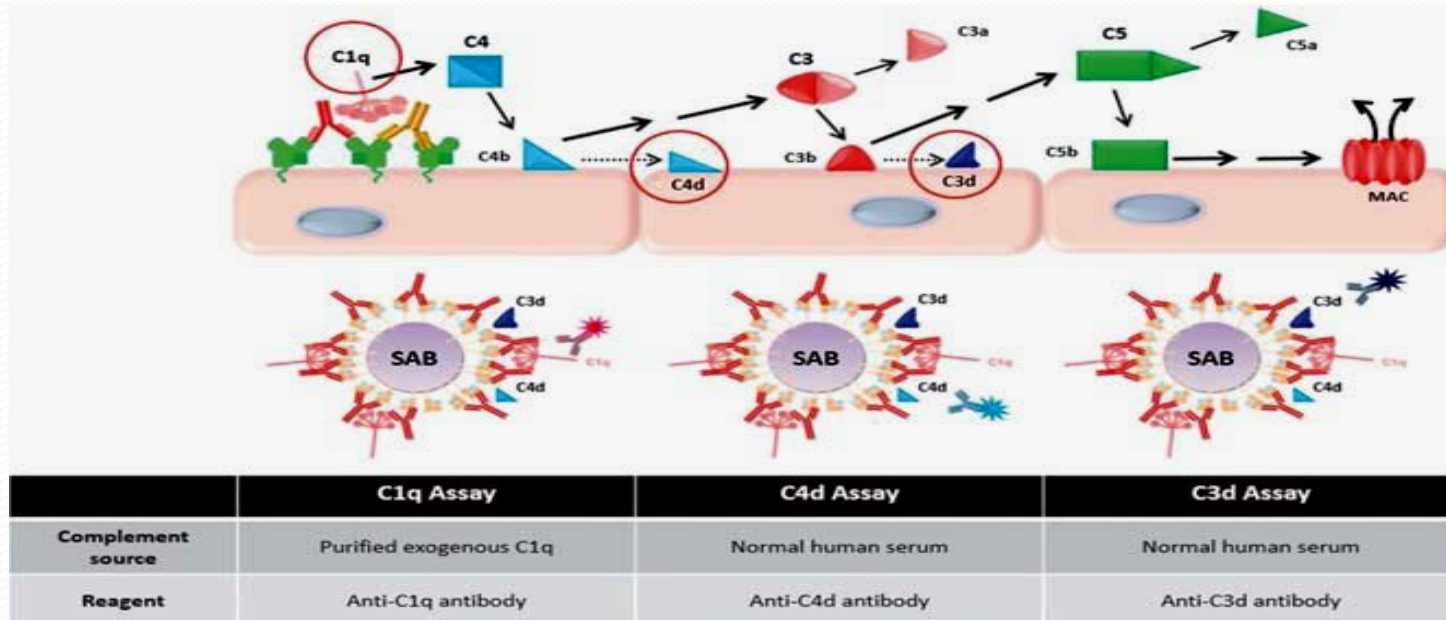
Luminex-Single Antigen Beads (L-SAB) (II)

Considerazioni:

- ✓ Non tutti i DSA evidenziati dalle L-SAB sono associati con AMR o con un peggiore andamento clinico del trapianto.

Anticorpi anti-HLA fissanti il complemento (I)

Tecniche in fase solida “modificate”, in grado di analizzare la capacità degli anticorpi anti-HLA di legare frazioni del complemento (C4d, C1q, C3d).

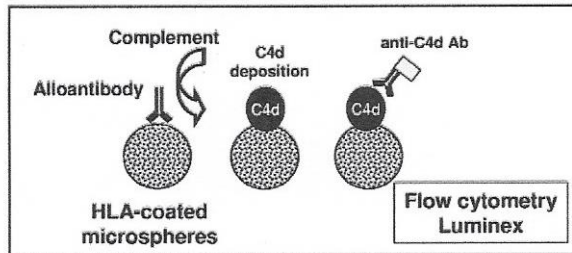


Anticorpi anti-HLA fissanti il complemento: Saggio C4d

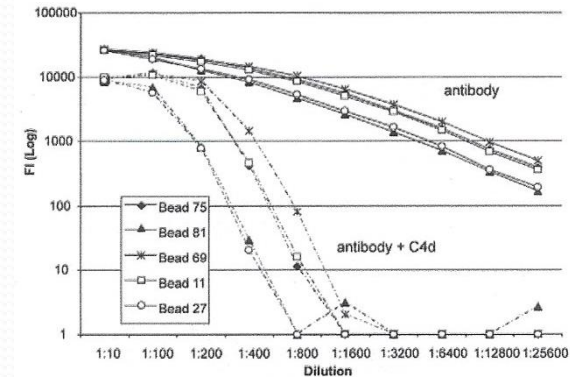
Flow cytometry based detection of HLA alloantibody mediated classical complement activation

Markus Wahrmann^a, Markus Exner^b, Heinz Regele^c,
Kurt Derfler^a, Günther F. Körmöcz^d, Karl Lhotta^e,
Gerhard J. Zlabinger^f, Georg A. Böhmig^{a,*}

Solid-phase C4d staining in vitro

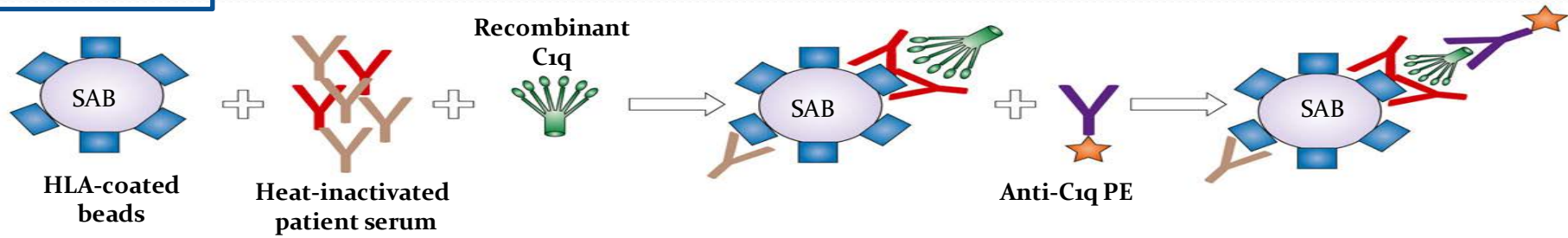


K. Mizutani and M. Gotoh
Transplantation Proceedings, 42, 4021-4025 (2010)

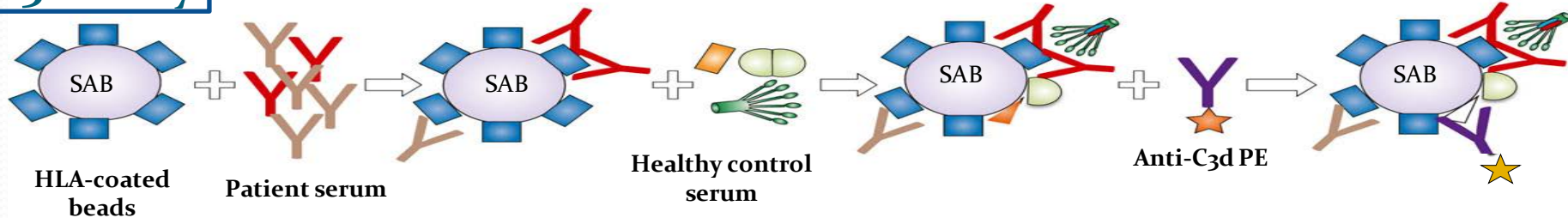


.....In later antibody dilution studies, we noted that C4d fixation occurred only at high antibody titers, and fluorescence was lost as sera were diluted further

C1q assay



C3d assay



Non-complement
fixing antibody



Complement
fixing antibody



Recombinant
C1q



C1q Complex
(C1qrs)



C4



C4d



C3



C3d

RESEARCH ARTICLE

Complement-activating donor-specific anti-HLA antibodies and solid organ transplant survival: A systematic review and meta-analysis

Antoine Bouquegneau^{1,2}, Charlotte Loheac¹, Olivier Aubert^{1,3}, Yassine Bouatou^{1,4}, Denis Viglietti^{1,5}, Jean-Philippe Empana¹, Camilo Ulloa⁶, Mohammad Hassan Murad⁷, Christophe Legendre^{1,3}, Denis Glotz^{1,5}, Annette M. Jackson⁸, Adriana Zeevi⁹, Stephan Schaub¹⁰, Jean-Luc Taupin¹¹, Elaine F. Reed¹², John J. Friedewald¹³, Dolly B. Tyan¹⁴, Caner Süsal¹⁵, Ron Shapiro¹⁶, E. Steve Woodle¹⁷, Luis G. Hidalgo¹⁸, Jacqueline O'Leary¹⁹, Robert A. Montgomery²⁰, Jon Kobashigawa²¹, Xavier Jouven^{1,22}, Patricia Jabre^{1,23,24,25}, Carmen Lefaucheur^{1,5}, Alexandre Loupy^{1,3}



.....In the present meta-analysis including 7,936 solid organ transplant patients, we established that complement-activating anti-HLA DSAs represent an important determinant of allograft loss across multiple types of organ transplants...

.....Patients with complement-activating anti-HLA DSAs have a 3-fold increased risk of allograft loss compared with patients without anti-HLA DSAs and/or patients with non complement-activating anti-HLA DSAs.

.....the effects of complement-activating anti-HLA DSAs on allograft loss remained significant in heart, lung, and liver transplant patients.....

.....the same effect was observed regardless of whether the antibody was preexisting or de novo.

...we found similar associations regardless of the type of test used for assessing complement-activating anti-HLA DSAs.

....In most of the studies included in this meta-analysis, a correlation existed between complement-activating antibody status and anti-HLA DSA level (assessed by MFI). Despite this correlation, 8 studies included in the present meta-analysis with sufficient statistical power to perform multivariable models demonstrated that the association between C1q-, C3d-binding tests or IgG3 test and allograft outcomes was independent of the level of anti-HLA DSA MFI.....

.....the SAB assays can be falsely low, while the C1q assay is more accurate.

In contrast to MFI..... anti-HLA DSA level determined by titer of antibody correlated with complement-fixing ability.

.....the composition of IgG subtypes may also influence the complement-binding capacity.....

Conclusioni_(I)

- ✓ Un' accurata identificazione e caratterizzazione degli anticorpi anti-HLA donatore-specifici, ottenibile attraverso un'attenta la valutazione di tutte le loro caratteristiche biologiche, rappresenta pertanto un obiettivo strategico da perseguire per una corretta valutazione del reale rischio immunologico di un trapianto.
- ✓ L'identificazione di MMs non accettabili mediante l'utilizzo di saggi per la valutazione di anticorpi fissanti il complemento, potrebbe essere un utile strumento per aumentare l'accesso al trapianto, soprattutto di pazienti iperimmuni.

Conclusioni^(II)

- ✓ La stratificazione del rischio immunologico di un trapianto è necessaria per identificare il trattamento terapeutico più idoneo per un determinato paziente, da adottare nel pre e post trapianto al fine di massimizzarne i benefici e minimizzare i danni causati dall'AMR ed i costi delle cure mediche che ne deriverebbero.