

PROTOCOLO INMUNOLÓGICO EN EL TRASPLANTE RENAL

Rafael Rodríguez Martínez
Centro de transfusión de la Comunidad Valenciana

INTRODUCCIÓN

Son muchos los trabajos que avalan y demuestran la importancia que para la supervivencia del injerto, desempeña el grado de compatibilidad dentro del Sistema HLA, así como la realización de un cross match o prueba cruzada previa al trasplante, entre suero/s del receptor y los linfocitos del donante, cuyo resultado sea negativo.

Por tanto debemos intentar realizar los trasplantes, con el mayor número posible de identidades antigénicas HLA, disponiendo para ello la posibilidad de realizar el tipaje HLA, tanto a los pacientes como a los donantes de órganos, permitiéndonos así seleccionar aquellos receptores que mejor compatibilidad presente.

Por otro lado y mediante el escrutinio de anticuerpos citotóxicos, vamos a poder hacer un seguimiento de perfil inmunológico de cada paciente, detectando o no, la presencia de anticuerpos anti-HLA (que pueden ser los responsables, en un momento dado, del rechazo y la consiguiente pérdida del órgano trasplantado)

El protocolo inmunológico que seguimos en el Centro de Transfusión, se aplica a aquellos pacientes en diálisis, que tras la valoración clínica por parte del nefrólogo, se decide incluirlo en lista de espera para trasplante, para lo cual es enviado a nuestro Centro donde se le realiza mediante punción venosa la siguiente extracción:

- 30 ml de sangre con ACD ó heparina. TIPAJE HLA.
- 10 ml de sangre en tubo seco (suero) ESCRUTINIO ANTICUERPOS
- 7 ml de sangre de Eta. GRUPO SANGUÍNEO.

TIPAJE HLA. OBTENCIÓN DE LINFOCITOS

El tipaje HLA se realiza con linfocitos, separados previamente de la sangre extraída con ACD.

Dicha separación viene condicionada por la distinta expresión de los antígenos HLA en dichas células, según sean de clase I, presentes en linfocitos totales (T y B), de clase II, presentes solo en los linfocitos B.

Separación de linfocitos para tipaje HLA clase I.

Para el tipaje HLA de clase I (locus A, B y C) separamos linfocitos mediante un gradiente con ficoll-isopaque. Para ello diluimos la sangre a partes iguales con PBS y la dejamos caer muy suavemente por las paredes del tubo, donde previamente habremos puesto el ficoll, de tal modo, que la sangre no se mezcle con el ficoll y quede sobre él como <flotando>. Después de centrifugar durante 20 min. a 800 g., la distribución de todos los componentes en el tubo queda como sigue:

- Los hematíes en el fondo del tubo.
- Sobre éstos el ficoll.
- Sobre el ficoll la mezcla de plasma y PBS.
- En la interfase entre el ficoll y el plasma + PBS aparece un anillo blanquecino perfectamente perceptible constituido por los linfocitos.

Ayudados de una pipeta pasteur se aspiran y se pasan a un nuevo tubo, donde son lavados mediante centrifugación dos veces con líquido de Hanks. Por último los resuspendemos en RPMI enriquecido con suero bovino fetal al 10%, ajustándolos a 2500-3000 linfocitos X mm³, quedando así dispuestos para dispensarlos en las placas de tipaje.

Separación de linfocitos para tipaje HLA clase II

Para tipar a antígenos de clase II (DR) tenemos que realizar una separación de linfocitos, pero solo de la población B, ya que éstos antígenos solo están presentes en dichos linfocitos.

En nuestro medio, el método empleado para realizar dicha separación es por deplección inmunomagnética. Para ello existen comercializadas unos beads o microesferas magnéticas, que van recubiertas de un anticuerpo monoclonal específico para el epítipo monomórfico de la cadena HLA clase II. Puestas a incubar con la sangre citada del paciente a tipar, los linfocitos B se unen a dichas microesferas formando rosetas, las cuales son aisladas y lavadas, ayudados de un imán.

Después del último lavado, los linfocitos B se resuspenden con RPMI más suero bovino fetal al 10%, quedando dispuestos para realizar el tipaje DR, sin que la presencia de la microesfera o beads en la superficie celular, altere su viabilidad, no así la sensibilidad de la prueba, que queda aumentada, pudiendo acortar los tiempos de incubación.

TÉCNICA

La técnica empleada para realizar el tipaje es la microlinfocitotoxicidad mediada por complemento.

En placas de Terasaky, donde previamente se han distribuido en cada pocillo, 1 microlitro de los distintos antisueros que reconocen cada uno de los antígenos HLA, se dispensa otro microlitro de los linfocitos que queremos tipar. Después de incubar durante 30 min. a temperatura ambiente, se añaden 5 microlitros de complemento de conejo, el cual provoca (en aquellos pocillos donde se haya producido la reacción antígeno-anticuerpos), la rotura de la membrana del linfocito.

Después de un tiempo de incubación, que varía según se esté tipando a antígenos de clase I o de clase II, se añade un colorante vital como la eosina, o una combinación de fluorocromos como puede ser Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio que permitirá visualizar en el microscopio invertido adecuado, la positividad o negatividad de la reacción en cada pocillo.

Así dependiendo de la especificidad del antisuero con el que ha reaccionado iremos determinando los antígenos que conforman el tipaje HLA.

ESCRUTINIO DE ANTICUERPOSO CITOTÓXICOS

Si importante es el tipaje HLA, para poder trasplantar a un máximo de identidades, lo es igualmente el escrutinio de anticuerpos citotóxicos, como medio de saber el estado inmunológico, en cuanto a presencia de anticuerpos anti-HLA es el paciente, que puedan ser causa del rechazo del órgano trasplantado.

La inmunización de un paciente puede ser ocasionada por transfusión, embarazos, trasplantes previos o enfermedades autoinmunes.

Dicho estudio lo realizamos enfrentando en una placa de Terasaky, el suero del paciente en un papel de 30 células de tipaje conocido y suspendidas con DTT. A continuación, desarrollamos la técnica de la microlinfocitotoxicidad mediada por complemento, cuyos fundamentos han sido ya descritos al tratar el tipaje.

La positividad ocurrirá en aquellos pocillos donde el anticuerpo (si lo hubiere) reaccione con algún antígeno presente en las células del panel, pudiendo en muchas ocasiones determinar la especificidad del mismo, al comprobar de todas las células con las que reacciona son portadoras de un mismo antígeno. En otras ocasiones no se podrá determinar su especificidad, por no darse esta circunstancia de correlación, en cuyo caso decimos que es inespecífico o multiespecífico

El usar el DTT como medio en el cual se resuspenden los linfocitos del panel se hace para inactivar los anticuerpos de naturaleza IgM, sobre todo los auto-anticuerpos, que NO resultan nocivos de cara al trasplante y en cambio enmascaran un cross match al dar positivo.

Una vez determinada el tipaje HLA, el escrutinio, y el grupo sanguíneo, el paciente se incluye en lista de espera.

El archivo de pacientes en lista de espera es actualizado diariamente con todos aquellos datos que son susceptibles de variación, como por ejemplo la administración de una nueva transfusión, el cambio en el resultado de un escrutinio, la positividad o negatividad de algún marcador serológico, etc.

De cada pacientes, es remitido al centro cada dos meses un suero con una doble finalidad, por un lado, la realización de un escrutinio de anticuerpos citotóxicos y por otro el de disponer en caso de ser seleccionado para trasplante, de un suero reciente para realizar el cross match.

Igualmente, de todo paciente que recibe una transfusión, es remitido al centro un suero a los 15 días para su estudio. Durante esos 15 días el paciente pasará a la situación (CT) de contraindicación transitoria para recibir un trasplante, ya que puede estar formando un anticuerpo, que todavía no se detecte en el escrutinio o el cross match. La situación CT es utilizada también cuando el paciente atraviesa una situación clínica que le contraindica temporalmente el trasplante.

De aquellos pacientes NO inmunizados se conservarán todos los sueros post-transfusionales, así como los últimos seis sueros recibido, con el fin de realizar cuando llegue al caso, el cross match con todos ellos.

De los SI inmunizados se guardan todos los sueros cuyo escrutinio ha dado positivo y los últimos 6 sueros recibidos.

ALARMA DE TRANSPLANTE

Viene ocasionada cuando existe un donante de órganos, que ha recibido la conformidad por parte e todos los grupos de trabajo que intervienen en la fase pre-trasplante (diagnostico de muerte cerebral, permiso familiar, analítica correcta, marcadores serológicos negativos, etc.)

El laboratorio de HLA dispone de un médico y un A.T.S. localizados, para realizar esta eventualidad, si surge en horas fuera del turno habitual de trabajo.

Se comienza con la realización del tipaje HLA completo del donante, así como la comprobación del grupo sanguíneo. Si el donante no ha sido transfundido y lleva pocos días ingresados, puede comenzarse con el tipaje, separando los linfocitos de sangre periférica. En caso contrario esperamos a la realización del explante y obtenemos los linfocitos del bazo o ganglio.

La separación de linfocitos en esta ocasión se realiza por deplección inmunogenética, tanto para tipaje a antígenos de clase I, como para los de clase II, con el fin de obtener el tipaje en el menor tiempo posible.

SELECCIÓN DE RECEPTORES

Hay tres etapas de selección de las cuales las dos primeras tienen prioridad absoluta sobre la tercera.

1. Pacientes del Hospital Infantil.

Se seleccionan con unos criterios, que varían según la valoración del estado clínico del paciente por parte del nefrólogo. Así, hay receptores cuya selección exige un mínimo de compatibilidades, (1 antígeno B y 1 DR), y otros cuyo grado de urgencia determina que el único criterio de selección sea la compatibilidad ABO y cross match negativo.

2. Pacientes hiperinmunizados.

Son aquellos cuyo PARA (Porcentaje de reactividad del anticuerpo) es igual o superior al 90% y por tanto se hace difícil el encontrar un riñón compatible. En este caso, el Centro de Transfusión de la C. Valenciana está adherido a un programa nacional organizado por la ONT, en el que participan 11 laboratorios, para el intercambio de riñones destinados a éstos pacientes. Para ello se ha confeccionado una placa común para los 11 laboratorios, con los sueros de 56 pacientes con un PARA > 90%, y con el fin de que cada vez que haya una generación de riñones en uno de estos 11 puntos de la geografía española, se haga un cross match con dicha placa. Si

da compatible alguno de estos pacientes, y reúne las condiciones mínimas de compatibilidad, que el laboratorio responsable de ese paciente exige, (pueden ser distintas para cada paciente) entonces el riñón es enviado al lugar correspondiente para que sea trasplantado, comprometiéndose el coordinador responsable, a devolver el riñón al hospital dado, en la primer generación de órganos que se produzca del mismo grupo sanguíneo.

3. Lista general de receptores.

Los criterios de compatibilidad por los que se realiza la elección, atendiendo a su importancia inmunológica son:

Identidad del grupo sanguíneo.

Identidad del locus DR.

Identidad del locus B.

Identidad del locus A.

Entre los seleccionados, se eligen siempre más de dos pacientes para realizar el cross match, y en el caso de un eventual cross match incompatible con alguno de los dos pacientes, que están en primer lugar por preferencia inmunológica, disponer de otro de reserva para ser trasplantado.

En los pacientes que presente anticuerpos cuya especificidad o especificidades sean conocidas, se excluyen como receptores, cuando el tipaje del donante aparecen antígenos contra los que va dirigido el anticuerpo, así como antígenos de reacción cruzado con ellos.

CROSS MATCH

El cross match se realiza enfrentando los sueros almacenados de los distintos receptores seleccionados, a los linfocitos T y B del donante, en placa Terasaky y aplicando la técnica de microlinfocitotoxicidad mediada por complemento.

La negatividad de todos los sueros es la condición imprescindible para la realización del trasplante.

Revisados los trasplantes realizados en 22 meses han dado un total de 129 trasplantes realizados, de los que 5 se perdieron los riñones por causas no inmunológicas.

De los restantes, 28 tuvieron episodios de rechazo agudo en los dos meses que siguieron al trasplante y de ellos solamente 9 perdieron el injerto, lo que representa un 7,25% de rechazos inmunológicos.