



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

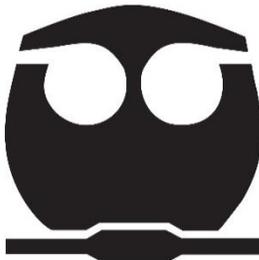
**DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD  
DE LA PRUEBA CRUZADA LINFOCITARIA POR CITOMETRÍA  
DE FLUJO ESTANDARIZADA COMO PARTE DE LAS  
PRUEBAS DE LABORATORIO REALIZADAS DENTRO DEL  
PROTOCOLO DE TRASPLANTE RENAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JESÚS ENRIQUE GUZMÁN RIVERA**



**Ciudad Universitaria, CDMX, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

**VOCAL:** Profesor: MÓNICA BERENICE HÉRAS CHAVARRÍA

**SECRETARIO:** Profesor: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

**2° SUPLENTE:** Profesor: HÉCTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE HLA, DEL BANCO CENTRAL DE SANGRE DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**M. en C. JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

## **SUSTENTANTE (S):**

**JESÚS ENRIQUE GUZMÁN RIVERA**



# ÍNDICE GENERAL

❖ Abreviaturas.....	1
❖ Índice de Figuras.....	4
❖ Índice de Cuadros.....	5
❖ Índice de Gráficos.....	7
❖ Resumen.....	9
❖ Justificación.....	11
❖ Marco Teórico.....	12
➤ Trasplante de Órgano Sólido (Riñón).....	12
▪ Enfermedad Renal Crónica (Insuficiencia Renal Crónica).....	12
▪ Trasplante Renal.....	14
▪ Inmunidad en el Rechazo del Trasplante de Órgano Sólido.....	15
▪ Reacciones Mediadas por Anticuerpos.....	17
▪ Generalidades en el Protocolo de Trasplante Renal.....	17
➤ Pruebas de Histocompatibilidad.....	18
▪ Determinación de Grupo Sanguíneo (ABO/Rh-Hr).....	19
➤ Antígenos Leucocitarios Humanos, Sistema HLA.....	20
▪ HLA de Clase I.....	22
▪ HLA de Clase II.....	23
▪ Tipificación HLA.....	24
▪ Anticuerpos del Sistema HLA.....	25

▪ Otros Anticuerpos que Contraindican el Trasplante Renal .....	26
▪ Detección de Anticuerpos Anti-HLA .....	27
▪ Porcentaje del Panel Reactivo de Anticuerpos (% PRA) .....	28
▪ Antígeno Único/ <i>Single Antigen</i> (SA). Anticuerpo Donador Específico (ADE) 29	
➤ Prueba Cruzada Linfocitaria.....	30
▪ Prueba Cruzada Linfocitaria por CDC .....	31
▪ Prueba Cruzada Linfocitaria por Citometría de Flujo .....	32
▪ <i>FlowDSA-XM</i> .....	34
▪ Prueba Cruzada Virtual (PVC) .....	36
➤ Sensibilidad y Especificidad.....	37
❖ Planteamiento del Problema .....	39
❖ Objetivo General .....	40
❖ Objetivos Particulares .....	40
❖ Metodología .....	41
❖ Resultados .....	43
❖ Discusión .....	64
❖ Conclusión .....	71
❖ Referencias.....	72
❖ Anexos .....	81

## **Abreviaturas**

**ADE:** Anticuerpo Donador Específico.

**AHG:** Globulina Antihumana.

**Anti-AT1R:** Anticuerpos del Receptor de Angiotensina II Tipo 1.

**CDC:** Citotoxicidad Dependiente del Complemento.

**CMN SXXI:** Centro Médico Nacional Siglo XXI.

**DPA:** Diálisis peritoneal automatizada.

**DPCA:** Diálisis Peritoneal Continúa Ambulatoria.

**EIVH:** Enfermedad injerto versus hospedero pos transfusión.

**ELISA:** Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas, *Enzime Linked Immunosorbent Assay*.

**ERC:** Enfermedad Renal Crónica.

**FAVI:** Fístula Arterio-Venosa Interna

***FlowDSA-XM:*** *Flow Donor Specific Accelerated Crossmatch.*

***FlowPRA/SA:*** *Flow Panel Reactive Antibody Single Antigen*

***Flow-XM:*** *Flow Crossmatch.*

**HE:** Hospital de Especialidades.

**HLA:** Antígeno Leucocitario Humano.

**Ig:** Inmunoglobulina.

**IMSS:** Instituto Mexicano del Seguro Social.

**K DOQI:** Kidney Disease Outcomes Quality Initiative.

**LTC:** Linfocitos T Citotóxicos.

**MAC:** Complejo de Ataque a la Membrana.

**MFI:** Intensidad Media de Fluorescencia, Mean Fluorescence Intensity.

**MHC:** Complejo Principal de Histocompatibilidad.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa.

**PCR-SSOP:** Reacción en Cadena de la Polimerasa de Secuencias Específicas de Oligonucleótidos.

**PCR-SSP:** Reacción en Cadena de la Polimerasa de Secuencias Específicas de Iniciadores

**PE:** Ficoeritrina.

**PRA:** Panel Reactivo de Anticuerpos.

**%PRA:** Porcentaje del Panel Reactivo de Anticuerpos.

**PVC:** Prueba Cruzada Virtual.

**SA:** Antígeno Único, *Single Antigen*.

**TR:** Trasplante Renal.

**UMAE:** Unidad Médica de Alta Especialidad.

**UTR:** Unidad de Trasplante Renal.

## Índice de Figuras

<b>FIG. 1</b> Diagrama de flujo para el tratamiento del paciente diagnosticado con Enfermedad Renal Crónica (ERC) .....	13
<b>FIG. 2</b> Grupos Eritrocitarios Humanos ABO, sus antígenos y anticuerpos .....	20
<b>FIG. 3</b> Mapas esquemáticos de los loci del HLA y ratón .....	21
<b>FIG. 4</b> Estructura de una molécula de Clase I del sistema HLA.....	22
<b>FIG. 5</b> Estructura de una molécula de Clase II del sistema HLA.....	23
<b>FIG. 6</b> Monitoreo de anticuerpo donador específico <i>One-Lambda</i> .....	28
<b>FIG. 7</b> a) Principio de las perlas de Luminex® b) Procedimiento de la realización de la prueba por el método de Luminex® .....	30
<b>FIG. 8</b> Representación de la dispersión de la luz emitida sobre la membrana celular.....	33
<b>FIG. 9</b> Principio de la prueba <i>FlowDSA-XM</i> .....	35

## Índice de Cuadros

<b>CUADRO 1.</b> Compatibilidad De Grupos Sanguíneos ABO/Rh-HR .....	20
<b>CUADRO 2.</b> Técnicas Moleculares de Mayor Uso Para Tipificar el Sistema HLA	24
<b>CUADRO 3.</b> Anticuerpos involucrados en el rechazo del órgano .....	27
<b>CUADRO 4.</b> Tabla De Contingencia 2 x 2 Para La Evaluación De Una Prueba Diagnóstica.....	37
<b>CUADRO 5.</b> Resultados entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad .....	43
<b>CUADRO 6.</b> Resultados entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad .....	45
<b>CUADRO 7.</b> Resultados entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowDSA- XM</i> ”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad .....	47
<b>CUADRO 8.</b> Resultados entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad ..	48
<b>CUADRO 9.</b> Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ”.....	51
<b>CUADRO 10.</b> Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ” .....	52
<b>CUADRO 11.</b> Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ”.....	52

<b>CUADRO 12.</b> Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	53
<b>CUADRO 13.</b> Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowDSA-XM</i> ” .....	53
<b>CUADRO 14.</b> Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowDSA-XM</i> ” .....	54
<b>CUADRO 15.</b> Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	54
<b>CUADRO 16.</b> Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	55
<b>CUADRO 17.</b> Eventos de aloinmunización registrados en los pacientes estudiados a los que se les realizó la comparación entre los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ” .....	57
<b>CUADRO 18.</b> Eventos de aloinmunización registrados en los pacientes estudiados a los que se les realizó la comparación entre los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ”, “ <i>CDC vs FlowDSA-XM</i> ” y “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	59
<b>CUADRO 19.</b> Resultados de los pacientes de acuerdo a su resultado en la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ”, junto con la presencia de algún evento de aloinmunización.....	62
<b>CUADRO 20.</b> Resultados de los pacientes de acuerdo a su resultado en la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ”, “ <i>CDC vs FlowDSA-XM</i> ” y “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ”, junto con la presencia de algún evento de aloinmunización.....	63

## Índice de Gráficos

<b>GRÁFICO 1.</b> Trasplante Renal Histórico en México por año (2007-2019).....	15
<b>GRÁFICO 2.</b> Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total, de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ”	45
<b>GRÁFICO 3.</b> Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	46
<b>GRÁFICO 4.</b> Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowDSA-XM</i> ” .....	48
<b>GRÁFICO 5.</b> Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	50
<b>GRÁFICO 6.</b> Porcentajes del total de pacientes por sexo estudiados en la comparación de los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ” .....	56
<b>GRÁFICO 7.</b> Porcentajes del total de pacientes por sexo estudiados en la comparación de los ensayos “ <i>CDC vs FlowPRA/SA</i> ”, “ <i>CDC vs FlowDSA-XM</i> ” y “ <i>FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA</i> ” .....	56
<b>GRÁFICO 8.</b> Pacientes estudiados que presentaron algún o ningún evento de aloinmunización en la comparación entre los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ” .....	58
<b>GRÁFICO 9.</b> Porcentaje de pacientes estudiados según el servicio de procedencia para la comparación entre los ensayos “ <i>FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA</i> ” .....	58

**GRÁFICO 10.** Pacientes estudiados que presentaron algún o ningún evento de aoinmunización en la comparación entre los ensayos “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM* vs CDC vs *FlowPRA/SA*” ..... 60

**GRÁFICO 11.** Porcentaje de pacientes estudiados según el servicio de procedencia para la comparación entre los ensayos “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM* vs CDC vs *FlowPRA/SA*” ..... 60

**GRÁFICO 12.** Porcentajes del total de pacientes estudiados y organizados de acuerdo a su resultado en la comparación entre “*FlowDSA-XM* vs *FlowPRA/SA*”, y el porcentaje del resultado si *FlowDSA-XM* “+” y *FlowPRA/SA* “-” ..... 62

**GRÁFICO 13.** Porcentajes del total de pacientes estudiados y organizados de acuerdo a su resultado en la comparación entre “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM* vs CDC vs *FlowPRA/SA*”, y el porcentaje del resultado si *FlowDSA-XM* “+” junto con otro ensayo o ambos “-” ..... 63

## Resumen

La necesidad que existe dentro del país y en el mundo por tener un tratamiento alternativo exitoso para combatir la insuficiencia renal crónica, como lo es el trasplante renal, ha obligado a diversas compañías a generar e implementar nueva tecnología para establecer la compatibilidad entre el binomio donador-receptor, asegurando de esta manera, que el injerto trasplantado no sea rechazado por el receptor en un corto o largo plazo. Dentro del protocolo que se desarrolla previo a la realización de un trasplante renal, se incluyen diversas pruebas de laboratorio al receptor y donador para definir la histocompatibilidad que entre ellos puede haber, las cuales son: determinación del grupo sanguíneo ABO/Rh-Hr, la tipificación de los antígenos HLA Clase I/ Clase II, el monitoreo y detección de anticuerpos anti-HLA y la realización de la prueba cruzada linfocitaria, donde, *FlowDSA-XM* es el estándar de oro.

Dentro de las pruebas cruzadas linfocitarias que se han implementado desde 1964 alrededor del mundo, se encuentran principalmente tres diferentes metodologías, la Prueba Cruzada Linfocitaria por Citotoxicidad Dependiente del Complemento (CDC), la Prueba Cruzada Virtual y la Prueba Cruzada Linfocitaria por Citometría de Flujo. A lo largo del tiempo, estas tres pruebas han sido modificadas para atender las necesidades que han ido surgiendo, pero manteniendo el principio o fundamento del método del cual se basan, tal es el caso de "*FlowDSA-XM*", que combina los fundamentos de citometría de flujo (que presenta *Flow-XM*, primer ensayo que usa esta tecnología) y microperlas (como en la metodología usada para la prueba *FlowPRA/SA*), pero adaptados a los avances tecnológicos y científicos que hoy en día se tienen.

Gracias a las metodologías que "*FlowDSA-XM*" combina, ha logrado conseguir un tiempo corto de ensayo y que diferencie selectivamente anticuerpos leucocitarios de otros autoanticuerpos, al incubar el suero del paciente con los leucocitos del donante y las microperlas, diferenciando también a los anticuerpos anti-HLA de Clase I y II, consiguiendo evitar falsos positivos.

Con este conjunto de características, “*FlowDSA-XM*” ha conseguido posicionarse como estándar de oro y, por lo tanto, sea usado como prueba principal en la toma de decisión para la realización de un trasplante renal, o bien en una donación de donador fallecido, elegir al receptor con mejor histocompatibilidad al órgano.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo estandarizada mediante el ensayo “*FlowDSA-XM*”, al realizar un estudio comparativo entre este método con los ensayos de prueba cruzada linfocitaria por CDC y el método para la detección de anticuerpos donador-específico (“*FlowPRA/SA*”).

Para el desarrollo de este proyecto, se realizó un estudio retrospectivo en el que se recopilaron y analizaron resultados entre enero y abril del 2019 en pacientes programados para la realización de un trasplante renal y a los cuales, se les realizaron estudios de compatibilidad HLA, determinación del % de PRA y SA y la prueba cruzada linfocitaria por CDC, con los resultados obtenidos, se elaboró el estudio comparativo y se pudo establecer la sensibilidad y especificidad que tiene el método “*FlowDSA-XM*”. Se obtuvieron valores de sensibilidad de 100%, especificidad de 90%, falsos positivos de 10% y falsos negativos de 0% para el ensayo “*FlowDSA-XM*”. Con base a estos datos se concluye que, los altos valores de sensibilidad y especificidad (100% y 90% respectivamente) de “*FlowDSA-XM*”, lo establecen como el estándar de oro para la toma de decisiones sobre la realización del trasplante renal, por encima del ensayo por CDC o de la prueba cruzada virtual, asegurando el éxito del injerto y evitando rechazos hiperagudos o agudos en el receptor.

## Justificación

En México, la Enfermedad Renal Crónica (ERC) suele ser la consecuencia del padecimiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial, padecimientos que se presentan con mayor frecuencia en la población mexicana, provocando el aumento en la detección y aparición de la ERC en el sector salud público y privado.

El alza en los casos de pacientes con ERC ha provocado que se convierta en un problema de salud a nivel nacional, generando altos costos en su tratamiento al paciente o a la institución que se encarga de cubrirlos. Actualmente se consideran tres terapias sustitutivas para atender los casos de ERC: Cuidados Paliativos, Terapia Dialítica y Trasplante Renal, éste último suele ser un tratamiento alternativo de elección para pacientes con Insuficiencia Renal Crónica Terminal o en pacientes que cuenten con algún donador para realizar el procedimiento.

Con la finalidad de aumentar la tasa de éxito que ya se tenía en el trasplante renal desde que en 1964 se implementó la prueba cruzada linfocitaria con el ensayo de linfocitotoxicidad, se ha adoptado en el sistema de salud una nueva metodología para realizar este tipo de ensayo, "*FlowDSA-XM*", que con la combinación de microperlas y citometría de flujo que ha desarrollado, pronostica resultados más confiables en la compatibilidad entre el binomio donador-receptor, teniendo como consecuencia una alza en la vida del injerto, mejora en la calidad de vida del receptor, disminución en los gastos de salud, pero sobre todo, disminuir la mortalidad que provoca la ERC en el país.

El enfoque que tiene este estudio retrospectivo es conocer los valores de sensibilidad y especificidad que tiene "*FlowDSA-XM*", al compararlo con los resultados de metodologías ya valoradas y conocidas (Citotoxicidad Dependiente del Complemento y "*FlowPRA/SA*") que son importantes para la toma de decisión en un trasplante renal, por lo que, se podrá concluir si "*FlowDSA-XM*" se puede considerar como estándar de oro.

## Marco Teórico

### Trasplante de Órgano Sólido (Riñón)

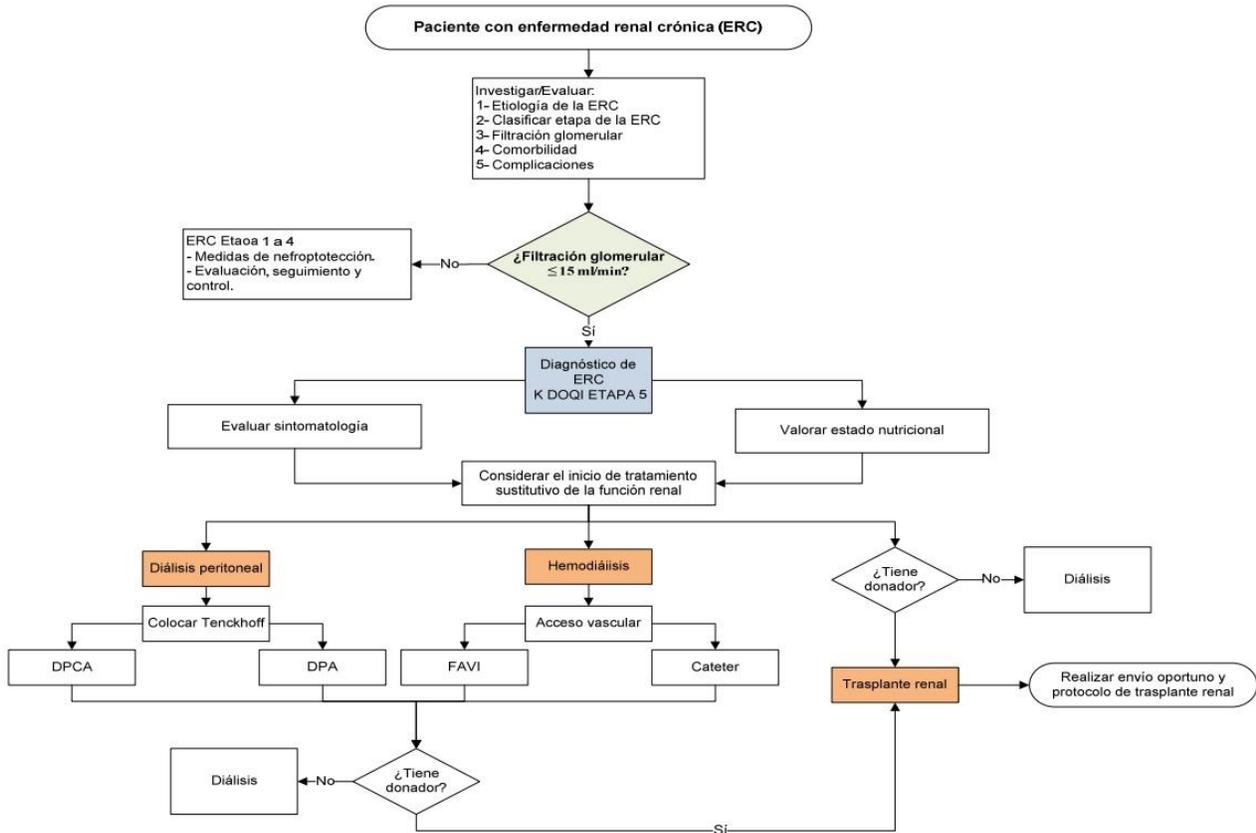
#### Enfermedad Renal Crónica (Insuficiencia Renal Crónica)

La enfermedad renal crónica (ERC) se describe como una disminución de la reserva renal o un daño en la función renal a lo largo del tiempo, que puede llegar a progresar en una insuficiencia renal crónica donde se presenta un filtrado glomerular de entre 15 a 29 mL/min/1,73m<sup>2</sup> y, en una última etapa conocida como insuficiencia renal crónica terminal, el filtrado glomerular es < 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup>; a medida que el tejido renal pierde funcionalidad, se presentan anomalías evidentes en la función de los riñones (como proteinuria o albuminuria, o anomalías del sedimento urinario, como glóbulos rojos dismórficos) o anomalías estructurales en los riñones.

La **diabetes** y la **hipertensión** arterial son dos de las principales enfermedades crónico-degenerativas en la población mexicana en provocar la ERC, teniendo altas probabilidades de padecer la enfermedad si alguno de los dos trastornos tarda en detectarse o se ha tenido un mal control de éstos durante un largo tiempo, también existen altas posibilidades que contraer la ERC si se cuentan con antecedentes familiares o bien, la persona tiene trastornos autoinmunitarios, lesiones en el riñón, cálculos renales, infecciones, flujo retrógrado de la orina hacia los riñones, etc.

El tratamiento para la ERC empieza con el control de la presión arterial y la diabetes, sólo si el paciente presenta alguno de estos padecimientos, posteriormente se le implementa una dieta con restricción de proteínas, fosfatos y potasio que ayuden a reducir su peso, se controlan los lípidos en sangre, se hace un ajuste en los fármacos que frecuentemente el paciente tome y la adición de otros como quelantes de potasio, diuréticos, etc., que le ayuden a prevenir la progresión de la enfermedad y que sea sometido a un tratamiento sustitutivo,

como lo es algún tipo de diálisis o la necesidad de un trasplante de riñón, que son tratamientos invasivos y que tienen ciertas complicaciones (ver Fig.1). 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7



**FIG. 1** Diagrama de flujo para el tratamiento del paciente diagnosticado con Enfermedad Renal Crónica (ERC) (Fuente: Tratamiento Sustitutivo de la Función Renal en la Insuficiencia Renal Crónica. Aguilar, M. et al.)

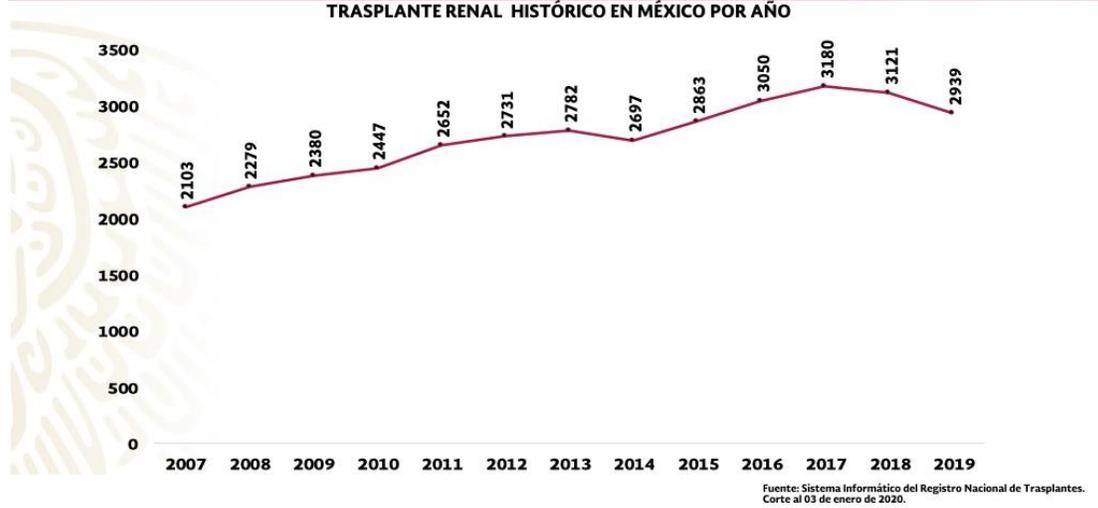
La ERC llegó a provocar en 2017, 51.4 muertes por cada 100 mil habitantes en México y actualmente afecta al 10% de la población adulta en diferentes partes del mundo, en México la incidencia de la ERC se calcula en 466 casos por millón de personas, mientras que la prevalencia hasta el 2017 era del 12.2%. El alza en los casos de pacientes con ERC que ha tenido el sector salud, ha provocado que en el país se inviertan millones de pesos para su tratamiento, convirtiéndose en un problema de salud público y privado de gran impacto y demanda, donde los costos que se generan anualmente para su tratamiento (como la hemodiálisis) van entre los \$400,000.00 y \$900,000.00 por paciente, mientras que la realización de un trasplante renal puede ascender a \$800,000.00, sin sumar los costos de los estudios pretrasplante que rondan los \$50,000.00. 7, 8

## Trasplante Renal

El trasplante renal (TR) es la terapia de reemplazo de elección en la mayoría de los pacientes con ERC en etapa avanzada (Etapa 4 y 5) y que requieren tratamiento dialítico, aunque también se llega a realizar en etapas tempranas de la enfermedad cuando ésta empieza a presentar consecuencias perjudiciales en la calidad de vida del paciente, otro de los motivos para realizar el TR es cuando, se llevan a cabo tratamientos para la ERC que están siendo perjudiciales para el estado de salud del paciente.<sup>1,9</sup>

La principal limitación con la que cuenta este procedimiento es la disponibilidad de riñones en relación a la demanda que se tiene, lo que provoca que la lista de pacientes en espera de este órgano de donador fallecido cada año incrementa en forma acelerada. En esta lista se encuentran pacientes que no tienen un donador vivo compatible (familiar/amigo) con quien se pueda evaluar la histocompatibilidad o bien, se encuentren altamente aloimmunizados, esta necesidad del órgano es lo que provoca el aumento en la mortalidad por el padecimiento de la ERC.

En el país, se han realizado cerca de 3,000 trasplantes anuales desde el 2015 (Ver Gráfico 1.), siendo el seguro social quien más procedimientos lleva a cabo; en el 2019 se realizaron 2,939 trasplantes de los cuales la U.M.A.E. H.E. C.M.N. SXXI realizó 172 intervenciones, donde 75 órganos provinieron de un donador fallecido y 97 de un donador vivo, posicionándose en el segundo sitio a nivel nacional como el Hospital que más trasplantes realiza, por lo que, la necesidad de que los trasplantes que se lleven a cabo sean exitosos, se asociaría con la mejora en la supervivencia del injerto, mejora en la calidad de vida del paciente y en importantes disminuciones de costos en salud en comparación con cualquier modalidad de diálisis.<sup>1, 8, 10</sup>



**GRÁFICO 1.** Trasplante Renal Histórico en México por año (2007-2019). (Fuente: Reporte Anual 2019 de Donación y Trasplantes en México. CENATRA.)

## Inmunidad en el Rechazo del Trasplante de Órgano Sólido

El rechazo es un proceso en donde hay una intervención tanto de la inmunidad celular como de la inmunidad humoral. Las contribuciones de estos mecanismos varían según el injerto y en muchas veces quedan reflejadas en las características histológicas de los órganos rechazados. En el trasplante, la diferencia entre lo propio y lo extraño está mayoritariamente delimitada por la expresión de los antígenos leucocitarios humanos (HLA).

En las reacciones mediadas por las células T, la destrucción del injerto se debe aparentemente tanto a la activación de los Linfocitos T Citotóxicos (LTC) CD8<sup>+</sup> como a las reacciones de hipersensibilidad retardada desencadenadas por las células CD4<sup>+</sup> cooperadoras. La reacción mediada por las células T se inicia cuando los linfocitos del receptor encuentran los antígenos HLA del donador. Se cree que las células dendríticas intersticiales transportadas por los órganos donantes son los inmunógenos más importantes. Las células dendríticas son encontradas por las células T del huésped en el propio órgano injertado, o bien cuando migran hacia los ganglios linfáticos de drenaje.

La identificación de las especificidades de Clase II desencadena la proliferación de la subpoblación T colaboradora CD4<sup>+</sup>. Al mismo tiempo, los precursores de los LTC CD8<sup>+</sup>, que tienen receptores para los antígenos HLA de Clase I, se diferencian hacia los LTC maduros. Las subpoblaciones T y la liberación de citocinas, como la IL-2, la IL-4 y la IL-5, participan en las interacciones de las células presentadoras de antígeno.

Una vez formados los LTC efector, pueden lisar el tejido injertado. Además de las células T citotóxicas específicas, se forman también células T CD4<sup>+</sup> secretoras de citocinas por sensibilización, las cuales se piensan, desempeñan un papel muy importante en el rechazo de los injertos. Al igual que en las reacciones de hipersensibilidad retardada, las citocinas procedentes de las células T CD4<sup>+</sup> activadas incrementan la permeabilidad vascular y favorecen la acumulación local de células mononucleares. La hipersensibilidad retardada junto con la lesión microvascular, isquemia tisular y destrucción mediada por macrófagos atraídos a la zona, es el mecanismo más importante en el rechazo de los trasplantes.

Las diferencias en el HLA del binomio donador-receptor parecen mediar de mayor forma en la citotoxicidad ocasionada por las células T CD8<sup>+</sup> y las reacciones llevadas a cabo por las células T CD4<sup>+</sup>.

La manera en la que las células T llevan a cabo el alorreconocimiento no ha sido descrita completamente, aunque, se han propuesto dos mecanismos posibles, donde las moléculas del sistema HLA extrañas al ser desprendidas de la superficie celular de las células donantes serían procesadas por las células presentadoras de antígeno del huésped y los péptidos así formados serían presentados en moléculas MHC propias. De manera alternativa las células T del huésped reconocerían péptidos en la hendidura de las alo-moléculas del MHC iniciando el alorreconocimiento que derivaría en una recha del injerto. <sup>11, 12, 13, 14</sup>

## **Reacciones Mediadas por Anticuerpos**

No hay duda en que las células T juegan un papel esencial en el rechazo de órganos, sin embargo, dicho rechazo puede también ser mediado por la presencia de anticuerpos. El rechazo mediado por estos anticuerpos puede adoptar dos mecanismos. El primero, es causado por anticuerpos preformados en el receptor debido a eventos aloimmunizantes como un trasplante previo, múltiples embarazos que crean anticuerpos anti-HLA frente a los antígenos paternos desprendidos del feto y, las transfusiones sanguíneas de donantes no HLA idénticos. El segundo mecanismo, consta de los casos en el que los receptores no han sido sensibilizados a los antígenos del trasplante y el HLA de Clase I y Clase II, es capaz de iniciar una respuesta inmune mediante la producción de anticuerpos dirigidos.

En cualquiera de los dos casos descritos, el rechazo se origina inmediatamente después de realizado el trasplante debido a que los anticuerpos preformados reaccionan rápidamente con los antígenos, depositándose en el endotelio vascular del órgano injertado.

Los anticuerpos formados pueden mediar el rechazo por diferentes mecanismos tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos y depósitos de complejos antígeno-anticuerpo. El sistema vascular del injerto parece ser el objetivo inicial en el rechazo ya que es donde se produce una mayor fijación de los complejos antígeno-anticuerpo.<sup>11, 12</sup>

## **Generalidades en el Protocolo de Trasplante Renal**

El protocolo que se lleva a cabo previo a un TR incluye una evaluación a cada paciente con ERC, donde se revisa su historia clínica, se realiza una exploración física y posteriormente, se hacen valoraciones urológicas y vasculares que dan información de posibles riesgos quirúrgicos y complicaciones que puede tener el

paciente durante el procedimiento. Estas evaluaciones previas a los pacientes ayudan no solo a la elección del mejor receptor si no también, a decidir cual es la terapia más adecuada para la ERC, ya que, un TR significaría la terapia con inmunosupresores de por vida, riesgos de infecciones y neoplasias, posibles eventos que lleven al paciente de regreso al tratamiento con diálisis y como última consecuencia un rechazo crónico del injerto, empeorando la calidad de vida del paciente poniendo en riesgo su vida.

Si el paciente presenta contraindicaciones relativas o tiene problemas médicos no contemplados en el protocolo, su caso es discutido por un comité de trasplantes para su realización, o bien, si el paciente tiene una contraindicación absoluta para el trasplante como: una infección activa, abuso de sustancias tóxicas, falta de adherencia al tratamiento, entre otras, el comité pondrá en manifiesto una decisión oportuna y temprana en cuanto a la realización del trasplante, y más aún si se trata de un donador en lista espera.<sup>2, 15</sup>

## **Pruebas de Histocompatibilidad**

La histocompatibilidad es la rama de la Inmunología que estudia los antígenos expresados en la superficie de los leucocitos, los cuales presentan gran polimorfismo y son determinados genéticamente por diferentes variantes alélicas y que también, se encuentran implicados en el rechazo de los trasplantes de órganos y tejidos por su alto grado de inmunogenicidad, es aquí donde los laboratorios de histocompatibilidad toman gran relevancia en los programas de trasplante de órganos sólidos en el sector salud por llevar a cabo la tipificación de los antígenos leucocitarios humanos (HLA).<sup>16</sup>

Al conocer la tipificación del HLA del receptor y del donador, se puede determinar el grado de compatibilidad que existe entre ellos, esta histocompatibilidad entre el binomio donador-receptor significa que la posibilidad en un futuro de la presencia

de un episodio de rechazo agudo o crónico se vea disminuido teniendo un efecto positivo para el receptor.

Las pruebas que se realizan en el laboratorio dentro de los protocolos de trasplantes de órganos son las siguientes:

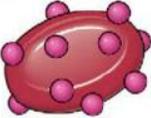
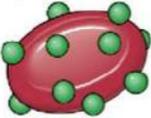
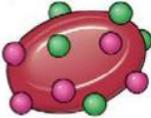
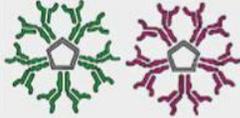
1. Determinación del grupo sanguíneo ABO/Rh-Hr.
2. Tipificación de los antígenos HLA Clase I/ Clase II.
3. Monitoreo y detección de anticuerpos anti-HLA mediante un panel de antígenos HLA purificados.
4. Realización de pruebas cruzadas linfocitarias.

Estas pruebas ayudan a monitorear el estado inmunológico del paciente, y con ello se podría conocer la supervivencia del injerto. El resultado de una prueba cruzada linfocitaria permite tomar la decisión de llevar a cabo o no el trasplante, ya que un resultado positivo contraindica la realización de éste.<sup>16, 17</sup>

### **Determinación de Grupo Sanguíneo (ABO/Rh-Hr)**

La importancia de la determinación del grupo sanguíneo estriba en que están presentes en los endotelios vasculares de diversos órganos. Si se trasplanta un órgano a un individuo ABO incompatible, los anticuerpos naturales llamados isoaglutininas anti A y/o anti B del receptor producen una lesión tisular en el órgano trasplantado, lo que conduce al rechazo (ver Fig. 2).

En consecuencia, el grupo sanguíneo del receptor y el donador debe ser establecido antes de realizar cualquier trasplante del mismo modo que se investiga antes de cualquier transfusión (ver Cuadro 1).<sup>17</sup>

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Tipo de eritrocito	Tipo A 	Tipo B 	Tipo AB 	Tipo O 
Anticuerpos presentes	Anti-B 	Anti-A 	Ninguno	Anti-A y anti-B 
Antígenos presentes	Antígeno A 	Antígeno B 	Antígeno A y B 	Ninguno

**FIG. 2** Grupos Eritrocitarios Humanos ABO, sus antígenos y anticuerpos. (Fuente: Inmunología Celular y Molecular. Abbas.)

**CUADRO 1.** Compatibilidad de grupos sanguíneos ABO/Rh-HR. (Fuente: Inmunología Celular y Molecular. Abbas.)

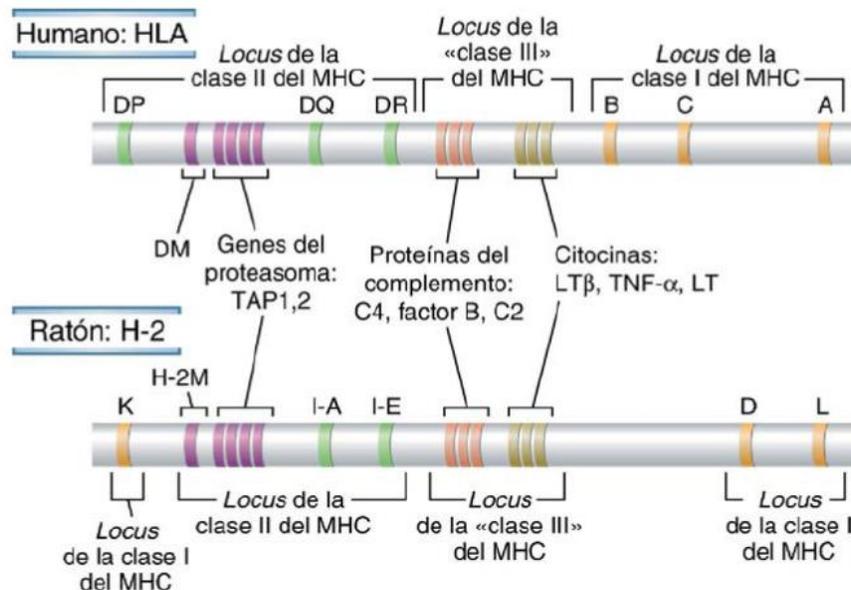
Grupo Sanguíneo	Puede Donar a:	Puede Recibir de:
A+	A+, AB+	A+, O+
B+	B+, AB+	B+, O+
AB+	AB+	A+, B+, AB+, O+
AB-	AB-	A-, B-, AB-, O-
A-	A-, AB-	A-, O-
B-	B-, AB-	B-, O-
O+	A+, B+, AB+, O+	O+
O-	A-, B-, AB-, O-	O-

## Antígenos Leucocitarios Humanos, Sistema HLA

Los genes de los antígenos del sistema HLA, están localizados en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), en el brazo corto del cromosoma 6 en el humano en el segmento 21.2-21.31, mientras que en el ratón están codificados en el cromosoma 17 (ver Fig.3), se hereda en bloque como un haplotipo, constituido por más de 200 genes, de los cuales más de 40 codifican para antígenos leucocitarios, distribuidos en diferentes *locus* estrechamente ligados y denominados como Clase I, Clase II y Clase III. Los genes de Clase II se localizan en posición centromérica, mientras que los genes de Clase I se orientan hacia el telómero, los genes de Clase III están localizados entre estas dos regiones génicas. <sup>18, 19</sup>

Estos genes contribuyen al reconocimiento de los antígenos propios y no propios ante la respuesta inmune a un estímulo antigénico. Los productos del gen HLA son glicoproteínas que se encuentran expresadas sobre la membrana de la mayoría de las células del cuerpo humano, incluyendo: linfocitos, granulocitos y monocitos, además de plaquetas, en eritrocitos maduros se pierde la expresión de antígenos HLA. Después del sistema de antígenos ABO (que es el más importante), sigue el sistema HLA, y está directamente relacionado con:

1. El éxito en el trasplante de medula ósea y en la selección del donante ideal para un trasplante.
2. Generación de anticuerpos anti-HLA relacionados con la presentación de reacciones adversas a la transfusión como:
  - i) Refractariedad plaquetaria mediada por reacción inmune.
  - ii) Reacciones febriles no hemolíticas.
  - iii) Lesión pulmonar aguda por transfusiones.
  - iv) Enfermedad injerto *versus* hospedero pos-transfusión (EIVH). <sup>18, 19, 20, 21</sup>

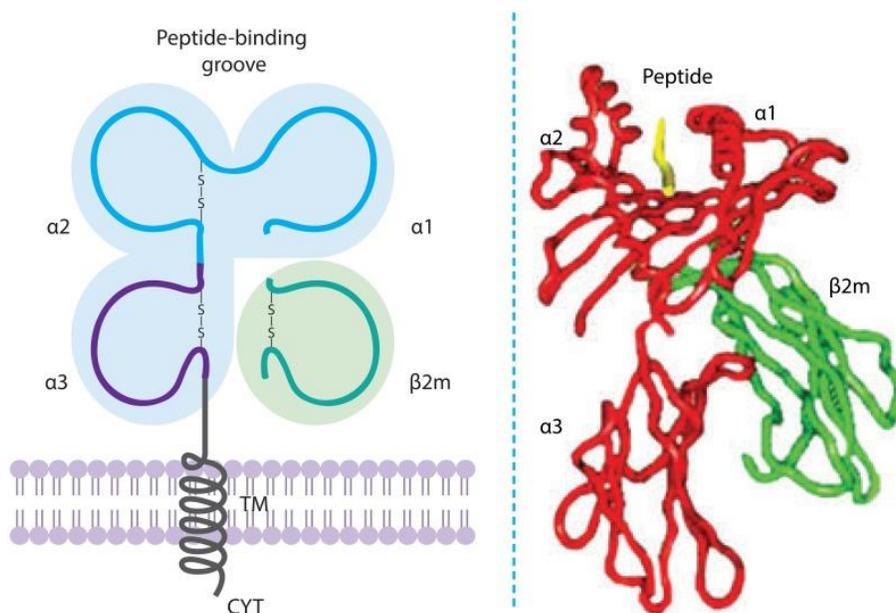


**FIG. 3** Mapas esquemáticos de los loci del HLA y ratón. (Fuente: Inmunología Celular y Molecular. Abbas.)

## HLA de Clase I

El HLA de Clase I, son antígenos formados por dos cadenas: una de glucoproteínas pesadas ( $\alpha$ ) de 44 a 47 KDa y una ligera  $\beta$  ( $\beta_2$ -microglobulina) de 12 KDa; el diagrama esquemático (Ver Fig. 4), ilustra las diferentes regiones de la molécula de Clase I de HLA-A2. La cadena  $\alpha$  de la molécula de Clase I está constituida por dos dominios de unión a péptidos ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ), un dominio similar a inmunoglobulina ( $\alpha_3$ ), la región transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CYT). La función biológica de este grupo de antígenos HLA clase I es intervenir en el brazo eferente de la inmunidad, destruir células con antígenos extraños a la propia constitución corporal del individuo e interactuar con linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CD8+).

Esta clase de moléculas se expresan sobre la membrana de la mayoría de las células: linfocitos, granulocitos y monocitos, además de plaquetas, excepto en las del trofoblasto, eritrocito y neuronas. Cabe mencionar que en esta región se encuentran también los genes de Clase I-like *MICA* y *MICB*, y los pseudogenes HLA-H, -J, -K, -L. <sup>19, 21, 22</sup>

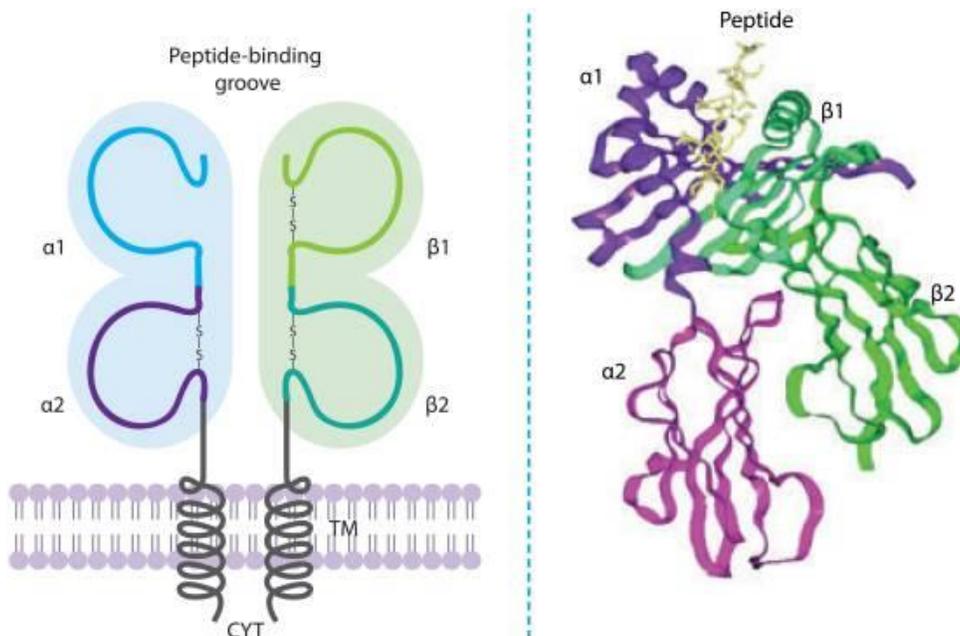


**FIG. 4** Estructura de una molécula de Clase I del sistema HLA. (Fuente: Autoimmunity: From Bench to Bedside. Cruz-Tapias, P. et al.)

## HLA de Clase II

La presencia y expresión de esta clase de antígenos está codificada por los genes ubicados en los *locus* DR, DQ y DP; están constituidos por dos cadenas  $\alpha$  de 32 a 34 KDa y  $\beta$  de 29 a 32 KDa e intervienen en el brazo aferente de la inmunidad, diseñada para conocer nuevos antígenos intravesiculares o exógenos mediante interacción con los linfocitos T cooperadores (T CD4+). El diagrama esquemático (Ver Fig. 5) ilustra las diferentes regiones de la molécula de clase II de HLA-DR1. Cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de Clase II tiene cuatro dominios: el dominio de unión a péptidos ( $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ), el dominio similar a inmunoglobulina ( $\alpha 2$  y  $\beta 2$ ), la región transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CYT).

Esta clase de moléculas se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (fagocitos y linfocitos), pero por activación con interferón- $\gamma$  o bien, por ciertas condiciones inflamatorias o de estrés celular, se pueden expresar en otras células que no expresan moléculas de histocompatibilidad de Clase II, como los fibroblastos, queratinocitos, células cebadas y endoteliales. <sup>19, 21, 22</sup>



**FIG. 5** Estructura de una molécula de Clase II del sistema HLA. (Fuente: Autoimmunity: From Bench to Bedside. Cruz-

Tapias, P. et al.)

## Tipificación HLA

La correcta tipificación del sistema HLA es de gran importancia en el trasplante de órganos sólidos, así como en el trasplante de células hematopoyéticas, esta tipificación se realiza por métodos moleculares (ver Cuadro 2), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**CUADRO 2.** Técnicas moleculares de mayor uso para tipificar el Sistema HLA.

<b>Estudios moleculares</b>	
<b>Hibridación</b>	<b>SSOP (<i>Sequence-Specific Oligonucleotide Probes</i>)</b>
<b>Electroforesis</b>	<b>SSP (<i>Sequence-Specific Primers</i>)</b>
	SBT ( <i>Sequencing-Based Typing</i> ) RFLP ( <i>Restriction Fragment Polymorphism</i> )
<b>DNA conformacional</b>	SSCP ( <i>Single Stranded Conformational Polymorphism</i> )
	RSCA ( <i>Reference Strand Mediated Conformational Analysis</i> )

El método para la tipificación del sistema HLA, **PCR-SSOP** (Reacción en Cadena de la Polimerasa de secuencias específicas de oligonucleótidos), consiste en la amplificación específica de los locus HLA por PCR, mediante la hibridación del producto genético por medio de sondas de oligonucleótidos. La mayor parte del amplio polimorfismo del sistema HLA resulta de eventos en los cuales pequeñas secciones de nucleótidos de un alelo (no más de 100 bases) son transferidos a otro alelo. De esta manera, muchas de las secuencias tienden a compartir alelos y no son alelo-específicas, surgiendo el uso de sondas de secuencia específica.

Otro de los métodos ampliamente utilizados para la tipificación del sistema HLA, es la **PCR-SSP** (Reacción en Cadena de la Polimerasa de secuencias específicas de iniciadores), la especificidad de los alelos HLA amplificados por esta técnica, se determina por los iniciadores (primers). Dependiendo de la selección que tenga el iniciador con los alelos, la PCR-SSP puede ser de alta, media o baja resolución. Esta técnica requiere de varios controles, cada pozo contiene un par de

iniciadores control que reacciona con una secuencia de DNA diferente a las regiones polimórficas HLA, y que sirve como control interno en todo el proceso de amplificación.<sup>23</sup>

### **Anticuerpos del Sistema HLA**

La aloinmunización o presencia de anticuerpos monoclonales anti-HLA se presentan generalmente en personas que han recibido transfusiones o en las que han tenido un trasplante previo, por lo que han sido estimulados por los antígenos del MHC del donante o en las mujeres que han estado embarazadas y que han sido aloinmunizadas por leucocitos fetales que han pasado transplacentariamente a la madre. Estos anticuerpos son, por ello, de origen inmune del tipo inmunoglobulina G (IgG) con propiedades citotóxicas y leucoaglutinantes.

La existencia de estos anticuerpos preformados, en el paciente que está sujeto a recibir un órgano o transfusión de otro individuo, puede favorecer que el rechazo del órgano o reacción adversa de la transfusión ocurra en un corto o mediano plazo, por lo que el detectarlos de manera previa al acto quirúrgico del trasplante o a la transfusión en pacientes altamente aloinmunizados coadyuva al éxito del mismo.

La necesidad de detectar oportunamente anticuerpos anti-HLA ante la posible realización de un trasplante o, como seguimiento en evaluaciones periódicas de pacientes multitransfundidos, ha hecho que este tipo de ensayos se realicen de forma cotidiana en evaluaciones a este tipo de pacientes, llegándose a encontrar porcentajes de sensibilización pretrasplante entre el 18.7-32% y postrasplante, en un 20-30% de receptores, los cuales desarrollaron alguno de estos anticuerpos.

El uso de ensayos que basan su metodología en marcadores del estado inmunológico del paciente que va a ser transfundido o trasplantado, han tomado relevancia, ya que este tipo de ensayos, permite prevenir el evento de reacción transfusional y, por ende, incrementar su inocuidad.

El reconocimiento de los epítomos por estos anticuerpos, es lo que desencadena la respuesta humoral adaptativa, llevándose a cabo por los triplete o secuencias lineales de tres residuos de aminoácidos que se encuentran en las regiones extracelulares del HLA, según los residuos de aminoácidos críticos en la unión antígeno-anticuerpo, se pueden diferenciar los epítomos lineales y conformacionales, que son los que darán lugar a la reactividad cruzada.<sup>22, 24</sup>

### **Otros Anticuerpos que Contraindican el Trasplante Renal**

Existen anticuerpos no linfocitotóxicos dentro del sistema HLA que no producen una prueba cruzada positiva, ya que este tipo de anticuerpos no logran ser reconocidos por los diferentes ensayos o son de baja afinidad, siendo así nocivos para el injerto. Entre este tipo de anticuerpos, los más relevantes son los dirigidos contra el sistema antigénico endotelio-monocítico, los anticuerpos anti-MICA.<sup>25</sup>

La presencia que tienen antígenos reconocidos por anticuerpos que no son anti-HLA (ver Cuadro 3), también representan una importancia clínica sobre el TR, ya que se ha demostrado que están involucrados en el rechazo del órgano.<sup>26, 27, 28, 29,</sup>

30

**CUADRO 3.** Anticuerpos involucrados en el rechazo del órgano.

---

<b>Anticuerpos que “contraíndican” el trasplante.</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Anti endotelio vascular (VEC).</li><li>• Anti-fosfolípidos.</li><li>• Anti-angiotensina II tipo I.</li><li>• MIC A/B.</li></ul>

---

Anticuerpos asociados a reacciones hiperagudas o rechazo acelerado del injerto.

### **Detección de Anticuerpos Anti-HLA**

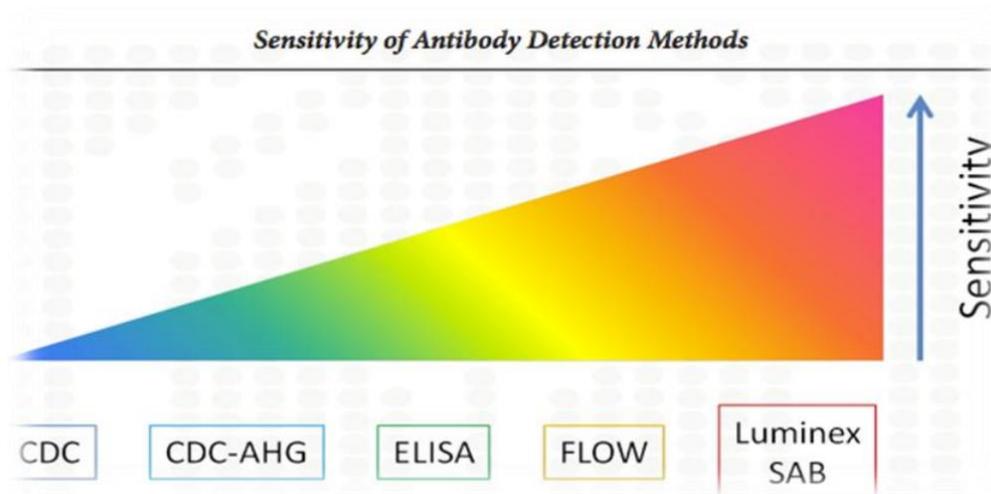
Se ha demostrado que los pacientes con una elevada tasa de anticuerpos linfocitotóxicos presentan una mayor incidencia de episodios de rechazo agudo, por lo que, este tipo de anticuerpos tiene una relación directa con la supervivencia del injerto. Todos los pacientes que van a ser trasplantados, pero sobre todo aquellos que han sido expuestos a estímulos antigénicos (como transfusiones sanguíneas), deben someterse a una evaluación periódica de su suero en busca de anticuerpos linfocitotóxicos para determinar su grado de sensibilización.

Las fuentes más comunes de sensibilización son:

1. Transfusiones.
2. Trasplantes previos.
3. Embarazos y/o abortos.

Dentro de las técnicas empleadas para medir y detectar dichos anticuerpos circulantes están los siguientes (ver Fig. 6):

- Ensayo de microlinfocitotoxicidad CDC.
- Ensayo de microlinfocitotoxicidad CDC con aumento de AHG.
- Métodos por ELISA.
- Citometría de flujo.
- Ensayo basado en técnicas de equipo fluoroanalizador (Luminex®).<sup>24, 31</sup>



**FIG. 6** Monitoreo de anticuerpo donador específico *One-Lambda*. (Fuente: OneLambda A Thermo Fisher Scientific Brand.)

### Porcentaje del Panel Reactivo de Anticuerpos (% PRA)

La información que se obtiene de este método, permite conocer el grado de sensibilización del paciente cuyo objetivo es anticipar el tipo de terapia inmunosupresora u otro tipo de terapia que se requiera en la etapa previa al trasplante o en el proceso postoperatorio. Existen otros factores que pueden estimular la producción de anticuerpos entre los que se incluyen: vacunas, procesos infecciosos y pacientes con enfermedades autoinmunes. La presencia de estos eventos complica la evaluación del receptor y se traduce en respuestas falsas positivas para determinar las pruebas.

Con esta prueba se monitorea periódicamente la presencia de anticuerpos anti-HLA en los sueros de los posibles receptores, así mismo, nos permite conocer si los anticuerpos presentes están dirigidos contra antígenos del donador de Clase I o Clase II. La determinación del % PRA es utilizado como marcador en pacientes con alto grado de aloinmunización, teniendo como máximo un 100% y, aunque se espera un resultado del 0%, cuando el paciente se expone a una fuente de sensibilización el % PRA empieza a aumentar, siendo necesario el comienzo de alguna terapia inmunosupresora.

Un % PRA con un valor  $\geq$  %30, obliga al médico a someter al paciente a un protocolo de desensibilización para realizar una remoción de los anticuerpos y con ello disminuir el porcentaje. El resultado de esta prueba es utilizado como un valor predictivo del estado inmunológico del receptor, donde un valor alto de % PRA nos indica que el paciente se encuentra sensibilizado y tiene poca probabilidad de ser trasplantado.

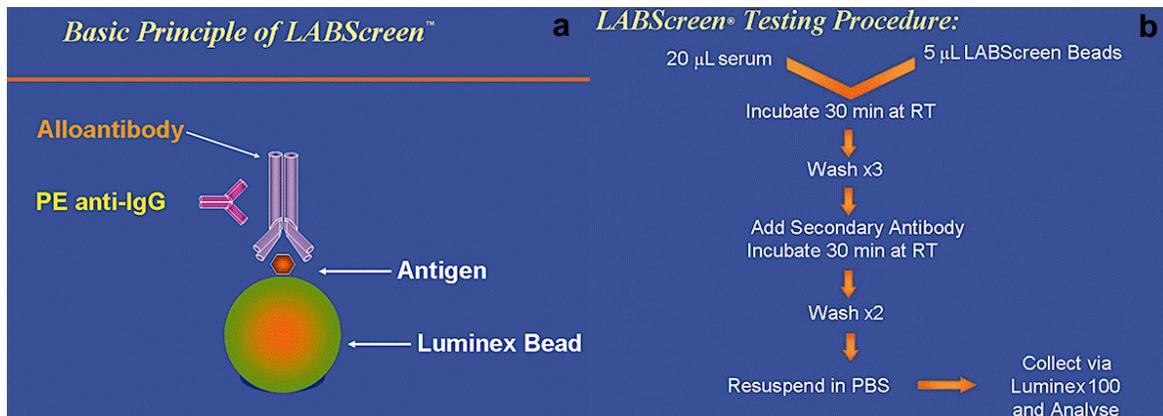
### **Antígeno Único/*Single Antigen* (SA). Anticuerpo Donador Específico (ADE)**

Esta tecnología utiliza microperlas revestidas con antígenos purificados HLA Clase-I y HLA Clase-II, cada microperla se encuentra recubierta con un tipo de antígeno HLA recombinante (loci A, B, Cw, DR, DQ, DP) de una especificidad dada; de acuerdo a Lefaucheur y colaboradores la alta densidad de antígenos HLA presentes en las microperlas en comparación con la que presentan los linfocitos (ver Fig. 7), hacen al SA mucho más específico y sensible, lo que conlleva a la detección de anticuerpos anti-HLA en bajas concentraciones, y adicionalmente determinar el grado de especificidad de los anticuerpos.

La tecnología Luminex® se basa en el principio de la citometría de flujo, con microperlas suspendidas en un líquido el cual, se hace pasar por el haz de un láser. El láser excita el colorante interno de cada microperla y al fluorocromo conjugado, resultando en una emisión de fluorescencia, la cual es detectada por el citómetro y posteriormente interpretada por el software FACSVia® que determina la concentración del anticuerpo y la especificidad del HLA al que va dirigido.

La cuantificación objetiva de la concentración de los anticuerpos anti-HLA en la prueba de SA, se expresa mediante la intensidad media de fluorescencia (*mean fluorescence intensity*, MFI) que alcanzan los sueros de los pacientes. En las monitorizaciones pos-trasplante, las variaciones que se tienen de MFI sirven como marcador en la evolución que tiene el paciente con el injerto.

Se ha observado la relación que existe entre los valores obtenidos de MFI y el valor predictivo que tienen con la sobrevida del injerto, a pesar de que el paciente presente una prueba cruzada negativa. Cuando se observa un valor de MFI >1000 indica una menor sobrevida del injerto, pudiendo presentar algún tipo de rechazo.<sup>12, 17, 32, 33, 34, 35, 36</sup>



**FIG. 7** a) Principio de las perlas de Luminex® b) Procedimiento de la realización de la prueba por el método de Luminex®. (Fuente: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. Tait, B, et al.)

## Prueba Cruzada Linfocitaria

La prueba cruzada linfocitaria, es el principal ensayo aplicado en la selección de donadores o receptores de órganos, tejidos o células, ya que, el principal problema que posee el protocolo de TR es la proporción de pacientes que presentan gran reactividad a los antígenos HLA, por lo que, la prueba cruzada nos da información sobre la sensibilización humoral específica del receptor contra su donador en estudio, ayudando a encontrar los anticuerpos anti-HLA circulantes preformados del receptor, ante el repertorio de antígenos HLA que pueda poseer el donador.

Con la realización de esta prueba se ha conseguido reducir la frecuencia del rechazo hiperagudo, evitando así, daños irreversibles al órgano y problemas en la salud del paciente, convirtiéndose así en el ensayo de mayor impacto para la toma de decisión sobre la realización del trasplante.

En laboratorios de Histocompatibilidad como el laboratorio de HLA del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se han empleado dos tipos de métodos para la realización de la prueba cruzada linfocitaria, el primero fue el método serológico conocido como CDC, el cual fue utilizado por varios años en el laboratorio y que fue sustituido por el actual ensayo por citometría de flujo.<sup>25, 37</sup>

### **Prueba Cruzada Linfocitaria por CDC**

La prueba cruzada por CDC fue desarrollada en 1964 por el Dr. Paul Terasaki, la cual consiste en incubar suero del receptor con linfocitos del donador para producir lisis celular tras una reacción antígeno-anticuerpo con fijación del complemento. La cascada del complemento se inicia con la unión de los ADE a sus dianas antigénicas (HLA) del endotelio vascular del injerto. Los complejos antígeno-anticuerpo se fijan a la molécula C1q disparando la activación del complemento por la vía clásica, la cual, a través de una serie de eventos, conduce a la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). El MAC forma poros transmembrana provocando lisis celular, la cual, es identificada por la entrada de un colorante vital a la célula.

Otros componentes del complemento, como C3a y C5a, actúan como quimioatrayentes para neutrófilos y macrófagos, éste último, actúa también como una potente anafilotoxina y conduce a la formación de edema. Esta activación del complemento por la vía clásica deja un rastro en forma de depósitos de C4d que actualmente se utiliza en el diagnóstico de rechazo, activo o crónico, mediado por anticuerpos.

Las membranas íntegras de las células vivas impiden la entrada del colorante y que, al ser visualizadas en un microscopio invertido con contraste de fases, se pueden distinguir claramente estas células no teñidas de las que sí se teñieron. La interpretación del resultado se basa únicamente en la lisis celular, por lo que, solamente se reporta un resultado negativo o positivo. El resultado positivo en el

ensayo, indica que existen anticuerpos específicos en el suero del receptor contra los antígenos del donador, lo que provocaría un rechazo hiperagudo en el paciente, por ende, la realización del trasplante se contraindica.

La CDC clásica al emplear mayoritariamente linfocitos T, que expresan HLA de Clase I, puede no detectar el HLA de Clase II, por lo que, se emplea en este método células blanco con linfocitos T (HLA Clase I) y linfocitos B (HLA Clase II) para evitar el problema.<sup>38, 39</sup>

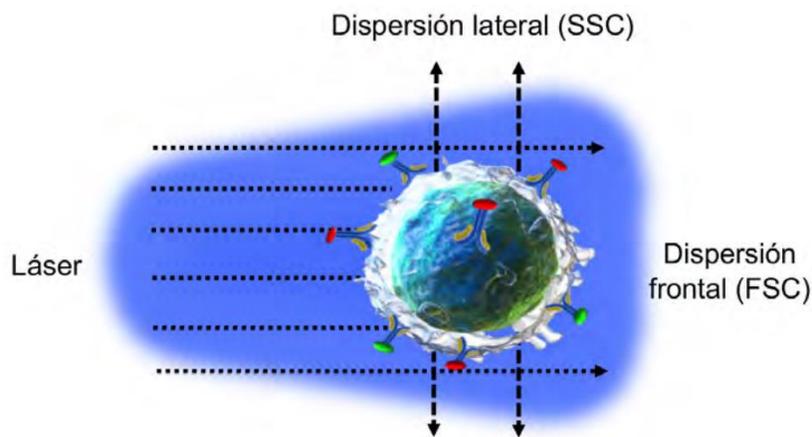
### **Prueba Cruzada Linfocitaria por Citometría de Flujo**

Cuando se tiene la sospecha de la existencia de anticuerpos anti-HLA aún después de haberse realizado la prueba cruzada por CDC y con un resultado negativo, se lleva a cabo el aumento en la sensibilidad de esta técnica, realizando tiempos de incubación más prolongados, lavados y un tratamiento en el suero del receptor con ditiotreitol o ditioeritrol, pero a pesar del incremento en la sensibilidad en esta metodología, la prueba cruzada por citometría de flujo llega a ser mucho más sensible y específica que, por el método de CDC, tal y como lo mencionan los autores Ercilla o López, por lo que, son utilizadas en investigaciones biomédicas y tienen un uso importante en el diagnóstico clínico; este tipo de ensayo por citometría de flujo, empezó a ser utilizado a nivel mundial alrededor de 1995, mientras que este mismo ensayo, pero con la tecnología FlowDSA-XM se ha utilizado dentro del país desde el 2019.

Este método se lleva a cabo al enfrentar a los antígenos del posible donador con el suero del receptor, siendo capaz de detectar anticuerpos en títulos bajos y aquellos que no activen el complemento, encontrando de esta manera a los anticuerpos anti-HLA que interfieran en el trasplante (anticuerpos específicos contra el donador). Esta prueba es recomendada para pacientes que clínicamente se sabe han estado expuestos a eventos de aloinmunización (pacientes

sensibilizados), pero, sobre todo está indicada a pacientes que estarán próximos a someterse a un trasplante.

Este método no precisa una separación física de las subpoblaciones de linfocitos (T y B), ya que el uso de anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos permite distinguirlos en el citómetro, teniendo así identificados la Clase I y Clase II del sistema HLA, por lo que, esta técnica permite analizar y cuantificar de manera simultánea las múltiples líneas celulares en una suspensión al transmitir un haz de luz, determinando el tamaño y la granularidad de la célula por la forma en que dispersa el láser y en cómo es la intensidad en la que se emite la fluorescencia en la superficie de los linfocitos (ver Fig. 8).



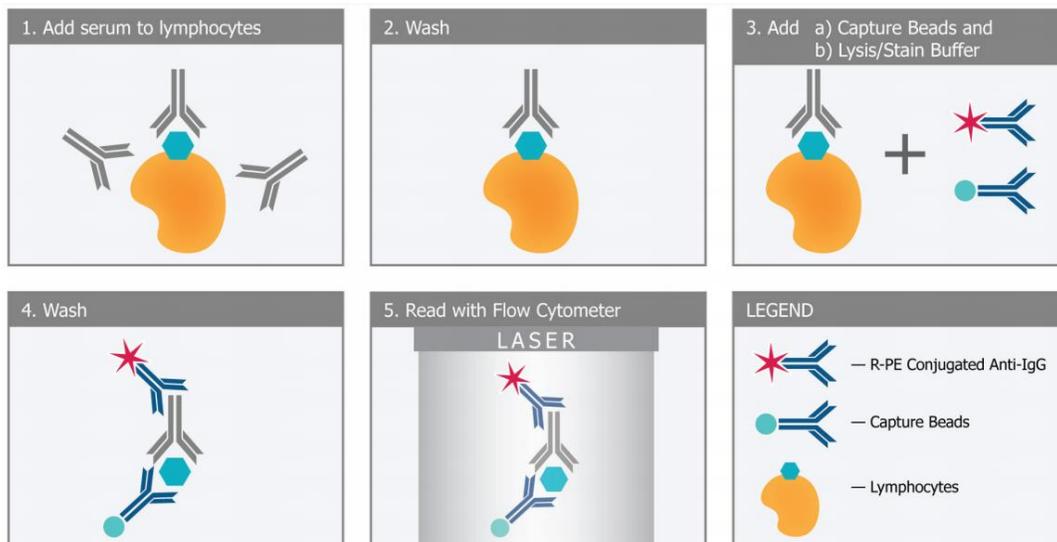
**FIG. 8** Representación de la dispersión de la luz emitida sobre la membrana celular. (Fuente: Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. Pérez, J., et al.)

Para realizar la prueba, se requiere de una viabilidad celular >80% y al no ser un método dependiente de la fijación del complemento, se utiliza un anticuerpo secundario (IgG/IgM) conjugado con el fluorocromo para que pueda llevarse a cabo la cuantificación, usando el ensayo “*FlowDSA-XM (Donor-specific Accelerated-Crossmatch)*”, método descrito por la empresa *OneLambda*.<sup>25, 37, 40, 41, 42, 43</sup>

## ***FlowDSA-XM***

*FlowDSA-XM* es un ensayo de compatibilidad cruzada en fase líquida que utiliza la combinación del método de citometría de flujo estándar con la especificidad de la tecnología de microperlas, logrando distinguir selectivamente a los anticuerpos leucocitarios de los autoanticuerpos, requiriendo menor cantidad de células y un tiempo corto de ensayo, reduciendo de esta manera el tiempo de isquemia fría en el órgano del donador fallecido. *FlowDSA-XM* logra eliminar deficiencias que tienen los métodos por CDC y el *Flow-XM (Flow Crossmatch)*, los cuales no se pueden interpretar en presencia de autoanticuerpos y algunos anticuerpos terapéuticos que pueden aumentar los falsos positivos, particularmente contra los objetivos de células B.

Esta técnica diferencia perfectamente la unión del anticuerpo específico anti-HLA de Clase I o II del receptor, con los antígenos HLA en la superficie de la célula del donante en su conformación nativa que no se ve afectada por la globulina antitimocítica (después de la absorción) o autoanticuerpos (no HLA Ab). El éxito de este método se basa en la incubación de los linfocitos con suero humano, donde, cualquier anti-IgG unida a la superficie celular se marca con ficoeritrina (PE), pigmento de color rojo que absorbe la luz, posteriormente las perlas de captura se unen selectivamente con el complejo resultante (anticuerpo/antígeno/PE-anti-IgG) y se mide la intensidad fluorescente para indicar la cantidad relativa de anticuerpo leucocitario presente en el suero (ver Fig. 9), detectando el anti-HLA de Clase I (A, B, C) y de Clase II, éste último se distingue en CIIa (DQ) y CIIb (DP y DR).



**FIG. 9** Principio de la prueba *FlowDSA-XM*. (Fuente: FlowDSA-XM – Advanced Crossmatch Testing. OneLamda A Thermo Fisher Scientific Brand.)

Se recomienda realizar esta prueba en conjunto con otros métodos de detección de anticuerpos anti-HLA y antígenos HLA para conseguir una mejor selección de un donador y receptor, ya que, aunque los anticuerpos anti-HLA se pueden determinar con una gran especificidad utilizando los ensayos en fase sólida (LUMINEX) y con ello se puede realizar una compatibilidad cruzada virtual, siempre es necesaria la realización de la compatibilidad cruzada de forma física para confirmar el resultado y con ello, se eviten complicaciones médicas para el receptor. Actualmente no hay valores de desempeño reportados por el fabricante para el ensayo *FlowDSA-XM*, ya que se sigue utilizando principalmente para la investigación, pero autores como Kimball y McDougan, han obtenido valores de sensibilidad menores al 70%, mientras que, para los valores de especificidad, obtuvieron resultados entre el 60-100% dependiendo la Clase de HLA que estaban analizando, resultados obtenidos a través de la comparación de *FlowDSA-XM* con el *Flow Crossmatch* convencional.<sup>25, 37, 43, 44, 45, 46, 47</sup>

## **Prueba Cruzada Virtual (PVC)**

La PVC se considera una herramienta con gran valor predictivo para la selección de receptores que están en la lista de espera de un trasplante de donador fallecido, lo que ayuda al órgano a permanecer menos tiempo en preservación en frío, evitando que sufra algún daño en su función, mientras que, en la selección de un posible donador vivo que se encuentre en el círculo familiar del receptor, la prueba conduce a tiempos cortos de espera en la búsqueda de un donador.

Por lo que la exigencia de una perfecta caracterización del sistema HLA expresado en el donador sea un requisito indispensable en esta prueba, para que posteriormente pueda ser contrastado con el sistema HLA y los anticuerpos anti-HLA que tiene el receptor, y de esta forma se encuentren anticuerpos dirigidos presentes en el receptor contra algún antígeno expresado en las células u órgano a trasplantar.

Para la realización de la PVC se requiere que las siguientes pruebas se hayan llevado a cabo previamente:

- A) Tipificación del HLA del receptor.
- B) Prueba de detección de anticuerpos PRA-SA (el cual se llevará a cabo de manera periódica y de manera obligada, más si existe algún evento de aloinmunización reciente) en el paciente/receptor.
- C) Tipificación del HLA del donador.

Esta prueba es solo predictiva, por lo que, es necesario llevarse a cabo la prueba cruzada por citometría de flujo o CDC para confirmar su resultado, logrando el éxito en el trasplante a realizar y previniendo algún tipo de rechazo.<sup>37, 48</sup>

## Sensibilidad y Especificidad

En 1947, Yerushalmy introdujo los términos de sensibilidad y especificidad como índices estadísticos de la eficiencia de una prueba diagnóstica, aunque estos conceptos no sólo se restringen a este tipo de pruebas y no necesariamente son los únicos que se implementan, ya que, para pruebas con resultados cuantitativos se utilizan los siguientes indicadores de validez: sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo.

La sensibilidad y la especificidad son características intrínsecas de la prueba diagnóstica, mientras que los valores predictivos dependen también de la prevalencia o probabilidad pre-prueba de la enfermedad a estudio.

Para la relación entre la condición clínica y el resultado de la prueba, normalmente se muestra con forme al Cuadro 4.

**CUADRO 4.** Tabla De Contingencia 2 x 2 Para La Evaluación De Una Prueba Diagnóstica.

### Condición confirmada

<b>Resultado de la prueba</b>	<i>Positiva</i>	<i>Negativa</i>
<i>Positiva</i>	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
<i>Negativa</i>	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

En la tabla, el encabezado de las columnas indica la condición confirmada del paciente y las cuatro celdas interiores denotan si el diagnóstico del paciente ha sido correcto o falso.

La **sensibilidad** es el número de casos verdaderos positivos dividido entre el número total de casos positivos confirmados, el cual es la suma de verdaderos positivos más los casos falsos negativos:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \%$$

La **especificidad** debe ser el número de casos verdaderos negativos dividido entre el número total de casos negativos confirmados, el cual es la suma de los verdaderos negativos más los casos falsos positivos:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100 \%$$

Por lo que, la sensibilidad es la probabilidad de que la prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo dé positiva si la condición de estudio está presente (paciente enfermo o con patrón de referencia positivo) y, la especificidad es la probabilidad de que la prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo dé negativa si la condición de estudio está ausente (paciente sano o con patrón de referencia negativo), logrando definir la proporción de verdaderos positivos respecto al total de sujetos enfermos y, verdaderos negativos respecto al total de sujetos sanos, de esta forma se detecta y clasifica a un individuo como enfermo o sano.

La información adquirida mediante la utilización de un test diagnóstico no sólo incluye a la presencia o ausencia de una enfermedad, sino que también a la etapificación de una enfermedad o bien, establecer la existencia de determinada condición.<sup>49, 50, 51, 52</sup>

## Planteamiento del problema

El aumento en el diagnóstico de la ERC en el país ha provocado que también se aumenten los gastos que se tienen para cubrir la enfermedad, del mismo modo, la tasa de pacientes que presentan ERC en etapa terminal va en crecimiento lo que provoca que varios de ellos necesiten de un trasplante renal como terapia, ante esta demanda que año tras año se presenta de riñones, ha tenido como consecuencia que se generen diversas problemáticas en el país como: la falta de donadores, lista de espera de más de 15 mil personas y rechazo del injerto por incompatibilidad.

Ante estas problemáticas que se tienen en el sector salud referente a los trasplantes renales, se espera que con la implementación del ensayo “*FlowDSA-XM*” previo a la realización de éstos, los episodios de rechazo agudo o hiperagudo del órgano disminuyan, ayudando con ello no sólo a disminuir los gastos que se tienen de la enfermedad, si no también, que la lista de espera del órgano vaya en decrecimiento y que la calidad de vida de este tipo de pacientes mejore.

Los resultados del análisis de la técnica de prueba cruzada linfocitaria (*FlowDSA-XM*) con la cual tiene enfoque esta investigación, representarían mejores valores de sensibilidad y especificidad para este tipo de pruebas, que ensayos como CDC no tenían, generando así, un incremento en la tasa de éxito en las donaciones de órganos, además de, un aumento en la calidad y seguridad del resultado de la determinación de histocompatibilidad entre el binomio donador-receptor.<sup>8, 53</sup>

## Objetivo General

- Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo estandarizada mediante el ensayo “*FlowDSA-XM*”, al comparar los resultados obtenidos por este método con los de la prueba cruzada por CDC y con los de la metodología para la identificación de anticuerpos donador-específico (*FlowPRA/SA*).

## Objetivos Particulares

- Clasificar los resultados obtenidos en los ensayos por CDC y *FlowPRA/SA* como positivos o negativos de acuerdo a su inserto correspondiente, para desarrollar la comparación entre los ensayos.
- Conocer si la mínima interacción de anticuerpos anti-HLA del receptor con antígenos del donador, marcará diferencia en los resultados del ensayo *FlowDSA-XM*.
- Determinar las diferencias que existen entre los resultados del ensayo *FlowDSA-XM*, con los obtenidos de los otros dos ensayos con los que se lleva a cabo el estudio comparativo (CDC y *FlowPRA/SA*).

## Metodología

### Pacientes

Se llevó a cabo el análisis de resultados de pruebas cruzadas linfocitarias durante el periodo de enero-abril del 2019 en el HE CMN SXXI de pacientes que se encontraban dentro del protocolo de trasplante de órganos sólidos con estudios previos y con un donador vivo o fallecido ya establecido.

Criterios de inclusión:

- ✓ Pacientes próximos a someterse a un TR.
- ✓ Con estudios de compatibilidad HLA.
- ✓ Con determinación previa al trasplante del % de PRA, y el SA (Single Antigen o Antígeno Único).

Se obtuvo una población total de n=36 durante los meses de enero-marzo del 2019, para la comparación entre los ensayos “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM* vs CDC vs *FlowPRA/SA*”; mientras que para realizar la comparación entre los métodos “*FlowDSA-XM* vs *FlowPRA/SA*” se obtuvo una población total de n=46 entre los meses de enero-abril del 2019.

### Lugar de Desarrollo

Laboratorio de HLA, del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

### Descripción del estudio

Es un estudio retrospectivo en el que se recopilaron y analizaron datos obtenidos de pacientes que iban a ser sometidos a un trasplante renal, a los cuales se les realizó la prueba cruzada linfocitaria por citometría de flujo con su potencial

donador. Para determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba cruzada por citometría de flujo (*FlowDSA-XM*) se hizo un estudio comparativo entre los resultados de este método con los de la prueba cruzada por CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) y la presencia de anticuerpos donador específicos (*FlowPRA/SA*), estableciendo la concordancia y correlación de los tres estudios para definir la sensibilidad y especificidad del método.

Para la realización de la prueba cruzada linfocitaria se implementó la técnica de citometría de flujo *FlowDSA-XM* (Ver Anexo I); para el estudio comparativo se llevaron a cabo las técnicas de *FlowPRA/SA* (Ver Anexo II) y CDC (Ver Anexo III).

## Resultados

Los resultados se recopilaron a partir de 36 expedientes de pacientes que iban a ser sometidos a un TR, por lo que, se les realizaron los ensayos de CDC, *FlowDSA-XM* y *FlowPRA/SA*; para la comparación entre los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*” se anexaron 10 expedientes. Teniendo de esta forma un total de 36 expedientes para la comparación entre los ensayos “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA*” y 46 expedientes para la comparación entre “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”.

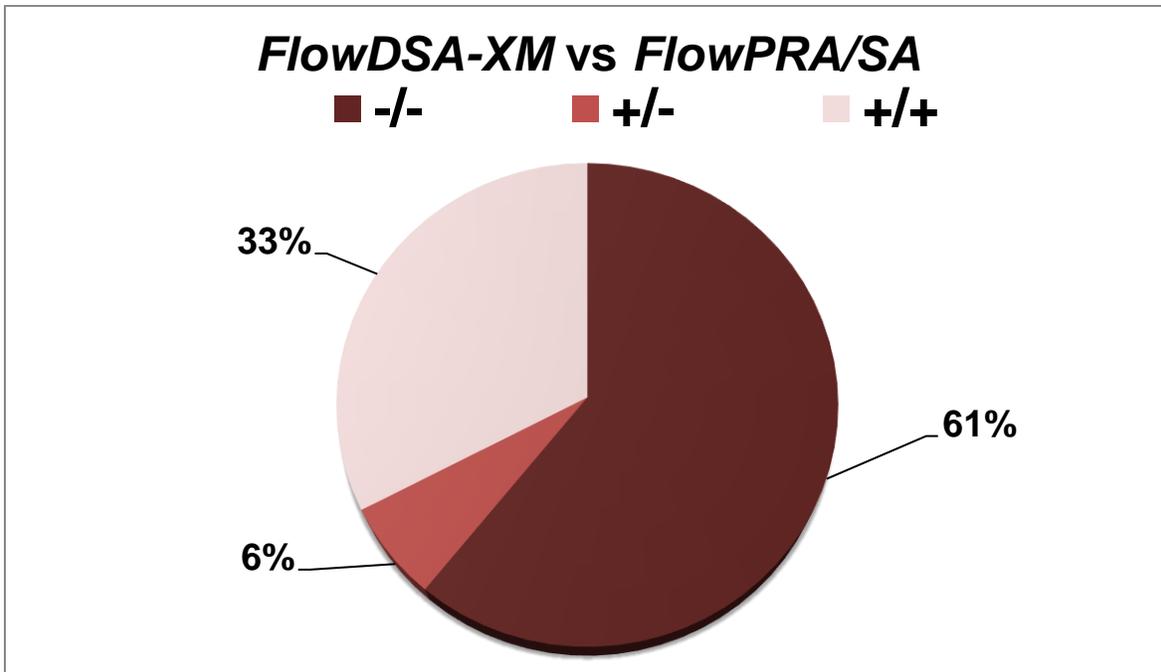
A cada comparación se le realizó un Cuadro (Cuadros 5, 6, 7 y 8) organizando la información de acuerdo a su resultado en los ensayos y desglosando cada resultado de acuerdo al número total de pacientes, su sexo y su edad (en rangos de 10 años), posteriormente se graficaron en porcentajes los resultados obtenidos en cada cuadro, con forme a los datos de la columna “número total de pacientes” (Gráficos 2, 3, 4 y 5).

### ***FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA***

**CUADRO 5.** Resultados entre la comparación de los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad.

Sexo	Edad (Años)	Total de Pacientes por Edad	Total de Pacientes por Sexo	Total de Pacientes	Resultados	
					<i>Flow DSA-XM</i>	<i>Flow PRA/SA</i>
Femenino	10-19	1	7	15	+	+
	20-29	4				
	30-39	1				
	40-49	1				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	1	8	15	+	+
	20-29	2				
	30-39	5				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				

Femenino	10-19	0	1	3	+	-
	20-29	0				
	30-39	1				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	2	0	-	+
	20-29	1				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	1				
	60-69	0				
Femenino	10-19	0	0	0	-	+
	20-29	0				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	0	28	-	-
	20-29	0				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Femenino	10-19	1	8	20	-	-
	20-29	4				
	30-39	1				
	40-49	2				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	1	20	28	-	-
	20-29	10				
	30-39	3				
	40-49	0				
	50-59	5				
	60-69	1				



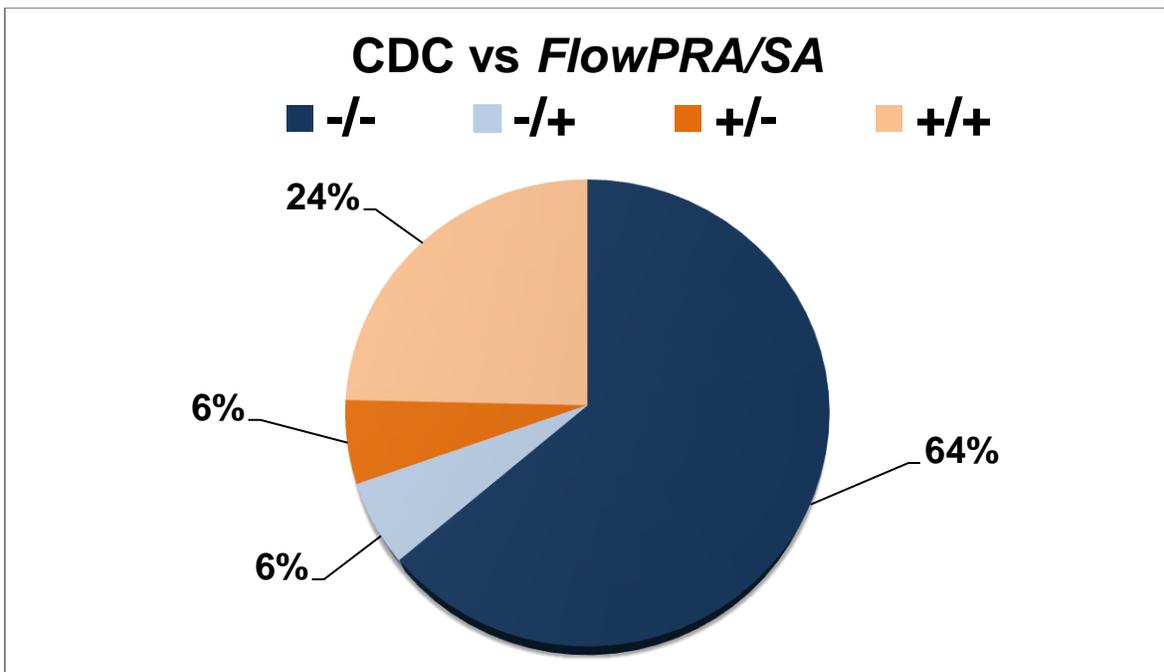
**GRÁFICO 2.** Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA”.

## CDC vs FlowPRA/SA

**CUADRO 6.** Resultados entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowPRA/SA”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad.

Sexo	Edad (Años)	Total de Pacientes por Edad	Total de Pacientes por Sexo	Total de Pacientes	Resultados	
					CDC	Flow PRA/SA
Femenino	10-19	0	4	9	+	+
	20-29	3				
	30-39	1				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	5	2	+	-
	20-29	1				
	30-39	4				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Femenino	10-19	0	0	2	+	-
	20-29	0				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				

Masculino	10-19	0	2	2	-	+
	20-29	2				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Femenino	10-19	1	2	2	-	+
	20-29	1				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	0	2	-	+
	20-29	0				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Femenino	10-19	1	9	23	-	-
	20-29	4				
	30-39	2				
	40-49	2				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	1	14	23	-	-
	20-29	5				
	30-39	3				
	40-49	0				
	50-59	4				
	60-69	1				

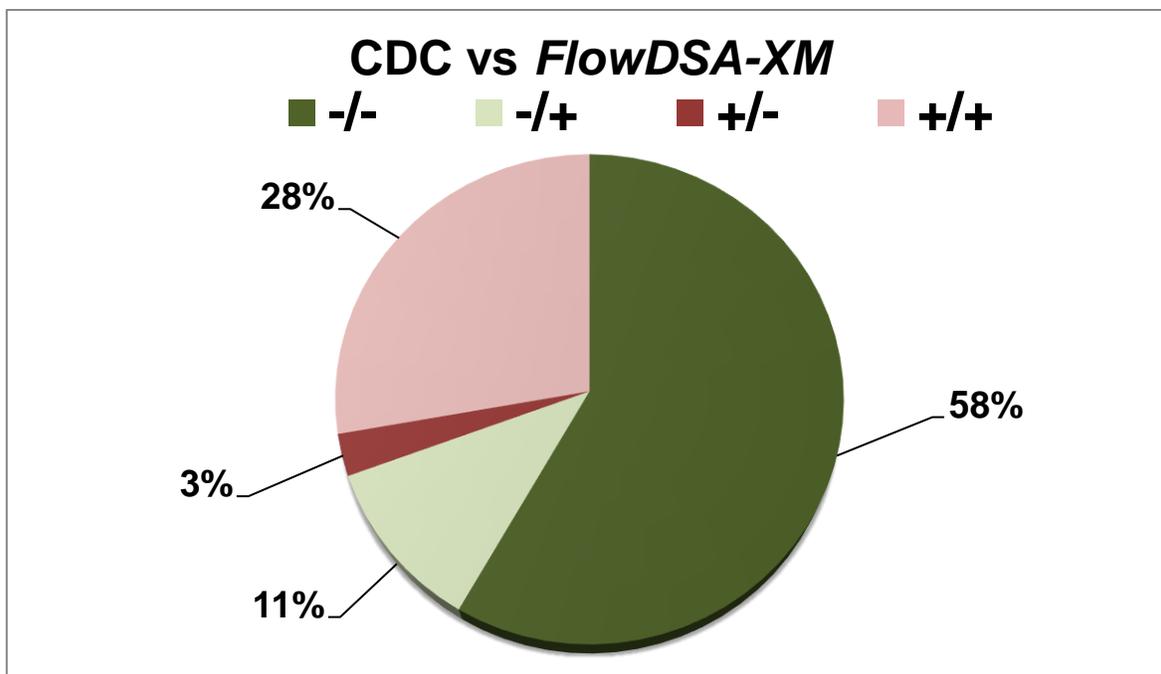


**GRÁFICO3.** Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowPRA/SA”.

## CDC vs FlowDSA-XM

**CUADRO 7.** Resultados entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowDSA-XM”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad.

Sexo	Edad (Años)	Total de Pacientes por Edad	Total de Pacientes por Sexo	Total de Pacientes	Resultados	
					CDC	Flow DSA-XM
Femenino	10-19	0	4	10	+	+
	20-29	3				
	30-39	1				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	6	10	+	+
	20-29	2				
	30-39	4				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Femenino	10-19	0	0	1	+	-
	20-29	0				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	1	1	+	-
	20-29	1				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Femenino	10-19	1	3	4	-	+
	20-29	1				
	30-39	1				
	40-49	0				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	0	1	4	-	+
	20-29	0				
	30-39	0				
	40-49	0				
	50-59	1				
	60-69	0				
Femenino	10-19	1	8	21	-	-
	20-29	4				
	30-39	1				
	40-49	2				
	50-59	0				
	60-69	0				
Masculino	10-19	1	13	21	-	-
	20-29	5				
	30-39	3				
	40-49	0				
	50-59	3				
	60-69	1				



**GRÁFICO 4.** Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowDSA-XM”.

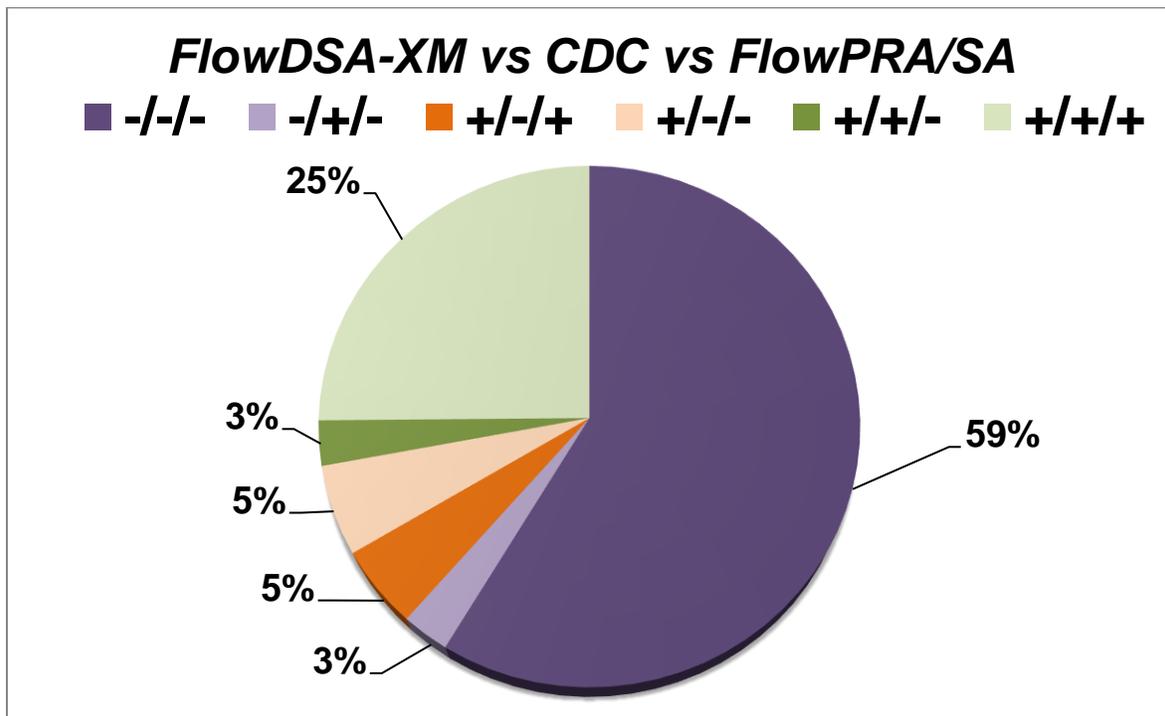
### **FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA**

**CUADRO 8.** Resultados entre la comparación de los ensayos “FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA”, clasificados por total de pacientes, por sexo y por edad.

Sexo	Edad (Años)	Total de Pacientes por Edad	Total de Pacientes por Sexo	Total de Pacientes	Resultados		
					Flow DSA-XM	CDC	Flow PRA/ SA
Femenino	10-19	0	4	9	+	+	+
	20-29	3					
	30-39	1					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	5	9	+	+	+
	20-29	1					
	30-39	4					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					

Femenino	10-19	0	0	1	+	+	-
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	1	1	+	+	-
	20-29	1					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Femenino	10-19	0	1	2	+	-	-
	20-29	0					
	30-39	1					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	1	2	+	-	-
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	1					
	60-69	0					
Femenino	10-19	1	2	2	+	-	+
	20-29	1					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	0	2	+	-	+
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Femenino	10-19	0	0	1	-	+	-
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	1	1	-	+	-
	20-29	1					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Femenino	10-19	0	0	0	-	+	+
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	0	0	-	+	+
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					

Femenino	10-19	0	0	0	-	-	+
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	0	0	0	-	-	+
	20-29	0					
	30-39	0					
	40-49	0					
	50-59	0					
	60-69	0					
Femenino	10-19	1	8	21	-	-	-
	20-29	4					
	30-39	1					
	40-49	2					
	50-59	0					
	60-69	0					
Masculino	10-19	1	13	21	-	-	-
	20-29	5					
	30-39	3					
	40-49	0					
	50-59	3					
	60-69	1					



**GRÁFICO 5.** Porcentajes de los resultados de acuerdo al No. total de pacientes estudiados entre la comparación de los ensayos “FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA”.

Para cada comparación se elaboró un Cuadro (Cuadros 9, 11, 13 y 15) donde se muestran los resultados necesarios para poder llevar a cabo los cálculos requeridos para obtener los valores de sensibilidad, especificidad, falso positivo y falso negativo; estos datos son del total de pacientes incluidos en cada ensayo, que se encuentran dentro de alguna combinación de resultados de las comparaciones realizadas. A los resultados obtenidos de los valores de sensibilidad, especificidad, falso positivo y falso negativo, se les ordenó en un respectivo cuadro (Cuadros 10, 12, 14 y 16).

### ***FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA***

**CUADRO 9.** Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”.

		<b><i>FlowPRA/SA</i></b>			
		<b>+</b>	<b>-</b>		
<b><i>Flow DSA-XM</i></b>	<b>+</b>	15	3	<b>PRA/SA +</b>	15
	<b>-</b>	0	28	<b>PRA/SA -</b>	31
	<b>Total</b>	15	31	<b>Total</b>	46

$$\text{Sensibilidad} = \frac{15}{15+0} \times 100 \% = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{28}{28+3} \times 100 \% = 90\%$$

$$\text{Falso +} = \frac{3}{3+28} \times 100 \% = 10\%$$

$$\text{Falso -} = \frac{0}{0+15} \times 100 \% = 0\%$$

**CUADRO 10.** Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”.

<b>Sensibilidad</b>	100%
<b>Especificidad</b>	90%
<b>Falso +</b>	10%
<b>Falso -</b>	0%

### **CDC vs *FlowPRA/SA***

**CUADRO 11.** Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “*CDC vs FlowPRA/SA*”.

		<i>FlowPRA/SA</i>			
		+	-		
<b>CDC</b>	+	9	2	<b>PRA/SA +</b>	11
	-	2	23	<b>PRA/SA -</b>	25
	<b>Total</b>	11	25	<b>Total</b>	36

$$\text{Sensibilidad} = \frac{9}{9+2} \times 100 \% = 82\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{23}{23+2} \times 100 \% = 92\%$$

$$\text{Falso +} = \frac{2}{2+23} \times 100 \% = 8\%$$

$$\text{Falso -} = \frac{2}{2+9} \times 100 \% = 18\%$$

**CUADRO 12.** Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowPRA/SA”.

<b>Sensibilidad</b>	82%
<b>Especificidad</b>	92%
<b>Falso +</b>	8%
<b>Falso -</b>	18%

### **CDC vs FlowDSA-XM**

**CUADRO 13.** Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowDSA-XM”.

		<b>FlowDSA-XM</b>			
		<b>+</b>	<b>-</b>		
<b>CDC</b>	<b>+</b>	10	1	<b>DSA-XM +</b>	14
	<b>-</b>	4	21	<b>DSA-XM -</b>	22
	<b>Total</b>	14	22	<b>Total</b>	36

$$\text{Sensibilidad} = \frac{10}{10+4} \times 100 \% = 71\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{21}{21+1} \times 100 \% = 95\%$$

$$\text{Falso +} = \frac{1}{1+21} \times 100 \% = 5\%$$

$$\text{Falso -} = \frac{4}{4+10} \times 100 \% = 29\%$$

**CUADRO 14.** Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “CDC vs FlowDSA-XM”.

<b>Sensibilidad</b>	71%
<b>Especificidad</b>	95%
<b>Falso +</b>	5%
<b>Falso -</b>	29%

### **FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA**

**CUADRO 15.** Desglose de resultados obtenidos entre la comparación de los ensayos “FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA”.

		<b>FlowPRA/SA</b>	
		<b>+</b>	<b>-</b>
<b>FlowDSA-XM / CDC</b>	<b>+/+</b>	9	1
	<b>+/-</b>	2	2
	<b>-/+</b>	0	1
	<b>-/-</b>	0	21
	<b>Total</b>	11	25

<b>PRA/SA +</b>	11
<b>PRA/SA -</b>	25
<b>Total</b>	36

$$\text{Sensibilidad} = \frac{9}{9+2} \times 100 \% = 82\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{21}{21+4} \times 100 \% = 84\%$$

$$\text{Falso +} = \frac{4}{4+21} \times 100 \% = 16\%$$

$$\text{Falso -} = \frac{2}{2+9} \times 100 \% = 18\%$$

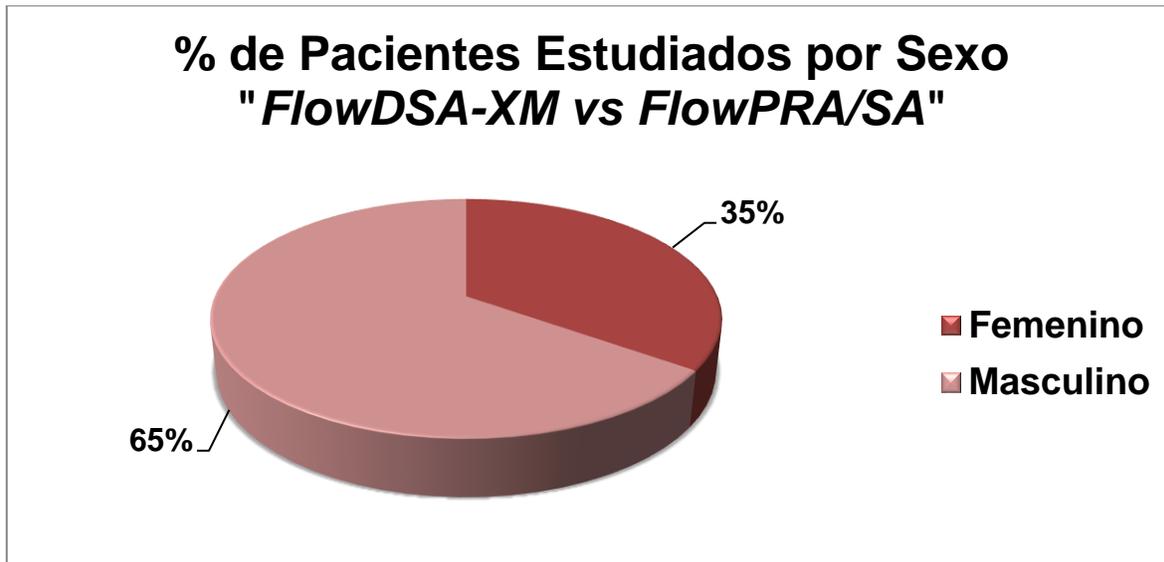
**CUADRO 16.** Porcentajes de la Sensibilidad y Especificidad entre la comparación de los ensayos “*FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA*”.

<b>Sensibilidad</b>	82%
<b>Especificidad</b>	84%
<b>Falso +</b>	16%
<b>Falso -</b>	18%

En los siguientes cuadros y gráficos se muestran resultados correspondientes a la comparación entre los ensayos. Para el análisis entre “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”, se presentan cuadros y gráficos separados debido a que el total de expedientes es diferente; mientras que para las comparaciones entre “*CDC vs FlowPRA/SA*”, “*CDC vs FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA*”, los resultados se muestran con un solo cuadro y gráfico, ya que éstos engloban a los 36 expedientes utilizados en las tres comparaciones.

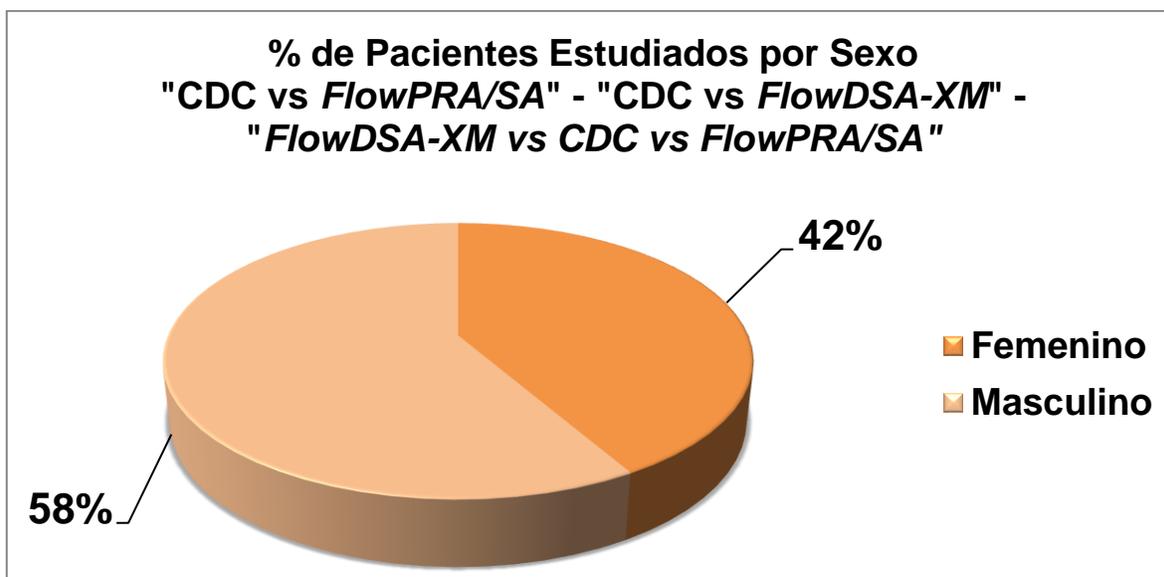
En los Gráficos 6 y 7 se observan en porcentajes el número total de pacientes estudiados de acuerdo a su sexo, sin importar el resultado obtenido en los ensayos ni su edad.

## **FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA**



**GRÁFICO 6.** Porcentajes del total de pacientes por sexo estudiados en la comparación de los ensayos "FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA".

## **CDC vs FlowPRA/SA, CDC vs FlowDSA-XM y FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA**



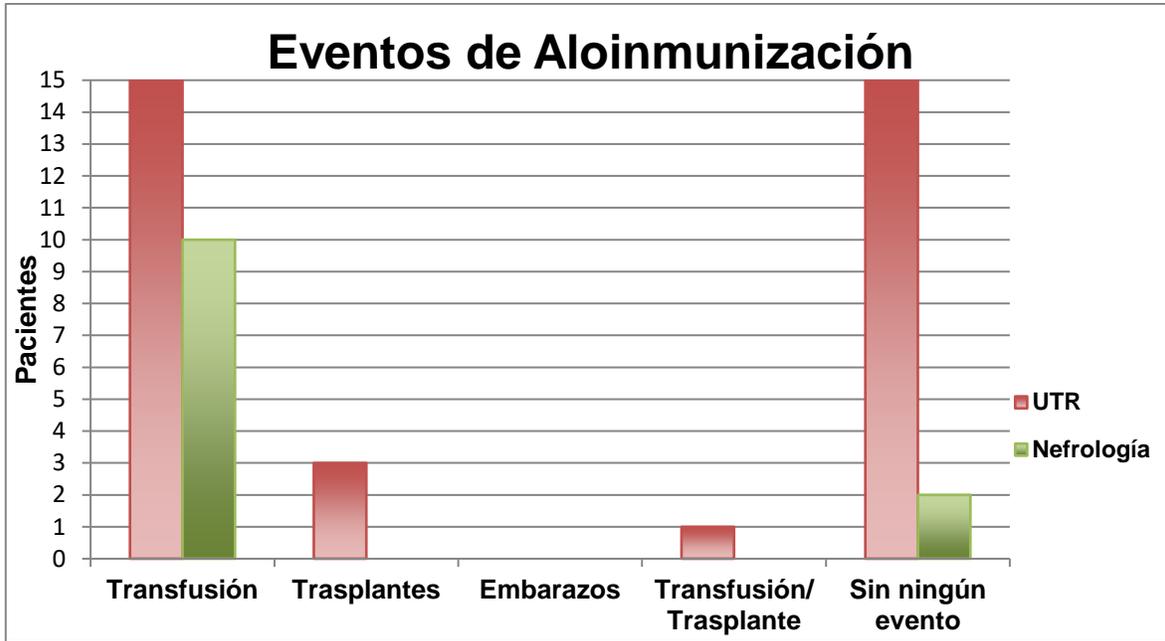
**GRÁFICO 7.** Porcentajes del total de pacientes por sexo estudiados en la comparación de los ensayos "CDC vs FlowPRA/SA", "CDC vs FlowDSA-XM" y "FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA".

En los Cuadros 17 y 18 se muestran cuantos pacientes provenían de alguna de las dos unidades de servicio a las que se les realiza principalmente estos estudios, Unidad de Trasplante Renal (UTR) o Nefrología, posteriormente se organizaron a los pacientes de acuerdo a que evento de aloinmunización habían sido expuestos o si no se habían expuesto nunca. Los Gráficos 8 y 10 muestran la información recopilada de los pacientes dependiendo si habían estado expuestos a eventos de aloinmunización y ordenados de acuerdo el servicio de procedencia. En los Gráficos 9 y 11 se muestran en porcentajes la cantidad de pacientes estudiados dependiendo del servicio del que provenían.

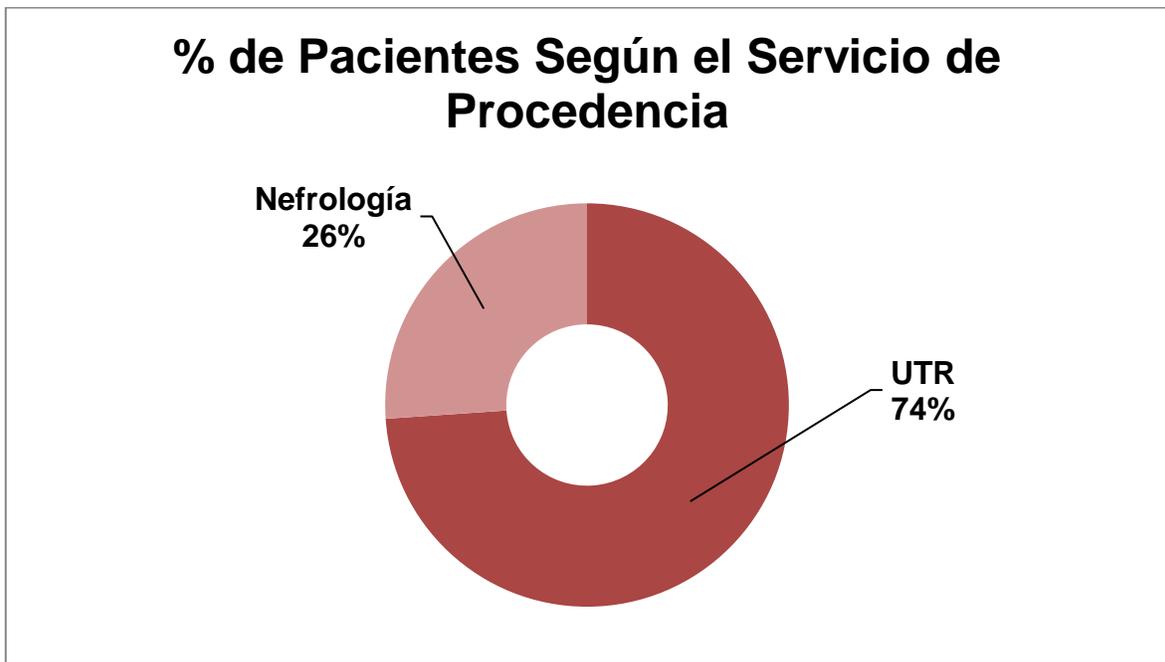
### ***FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA***

**CUADRO 17.** Eventos de aloinmunización registrados en los pacientes estudiados a los que se les realizó la comparación entre los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”.

Eventos de Aloinmunización	Servicio de Procedencia	
	UTR	Nefrología
	Pacientes (n)	
	34	12
<b>Transfusión</b>	15 (44%)	10 (83%)
<b>Trasplantes</b>	3 (9%)	0 (0%)
<b>Embarazos</b>	0 (0%)	0 (0%)
<b>Transfusión/Trasplante</b>	1 (3%)	0 (0%)
<b>Sin ningún evento</b>	15 (44%)	2 (17%)



**GRÁFICO 8.** Pacientes estudiados que presentaron algún o ningún evento de aloinmunización en la comparación entre los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”.

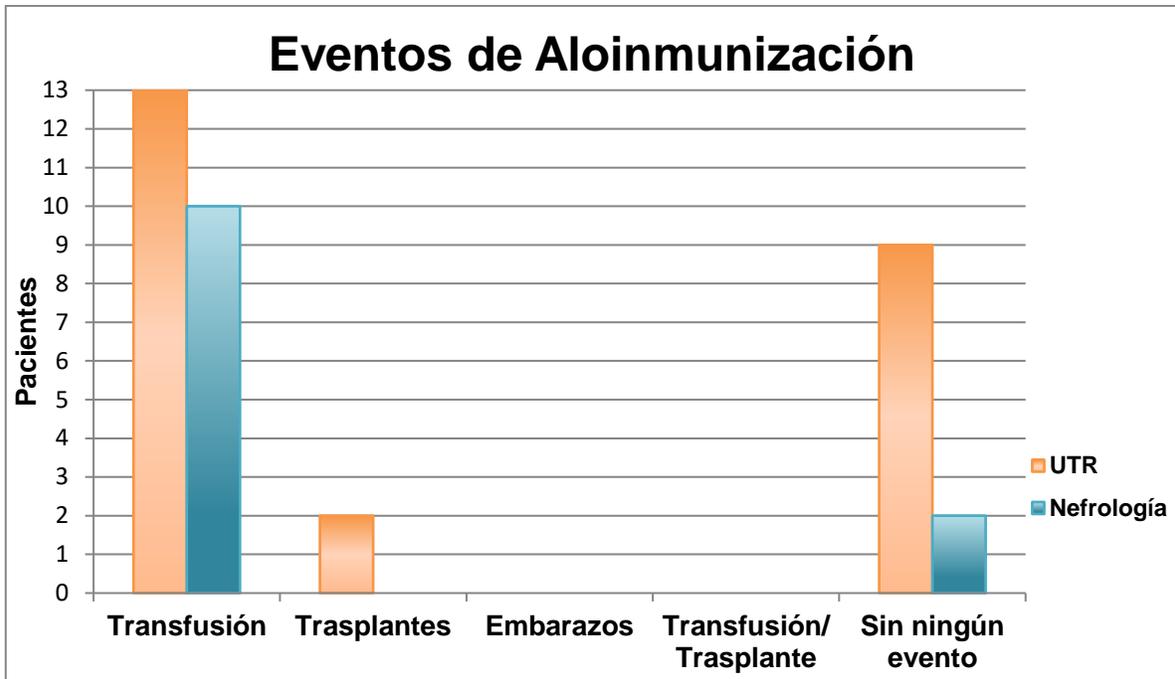


**GRÁFICO 9.** Porcentaje de pacientes estudiados según el servicio de procedencia para la comparación entre los ensayos “*FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA*”.

## ***CDC vs FlowPRA/SA, CDC vs FlowDSA-XM y FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA***

**CUADRO 18.** Eventos de aloinmunización registrados en los pacientes estudiados a los que se les realizó la comparación entre los ensayos “CDC vs FlowPRA/SA”, “CDC vs FlowDSA-XM” y “FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA”.

<b>Eventos de Aloinmunización</b>	<b>Servicio de Procedencia</b>	
	<b>UTR</b>	<b>Nefrología</b>
	<b>Pacientes (n)</b>	
	<b>24</b>	<b>12</b>
<b>Transfusión</b>	13 (54%)	10 (83%)
<b>Trasplantes</b>	2 (8%)	0 (0%)
<b>Embarazos</b>	0 (0%)	0 (0%)
<b>Transfusión/Trasplante</b>	0 (0%)	0 (0%)
<b>Sin ningún evento</b>	9 (38%)	2 (17%)



**GRÁFICO 10.** Pacientes estudiados que presentaron algún o ningún evento de aloinmunización en la comparación entre los ensayos “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM* vs CDC vs *FlowPRA/SA*”.



**GRÁFICO 11.** Porcentaje de pacientes estudiados según el servicio de procedencia para la comparación entre los ensayos “CDC vs *FlowPRA/SA*”, “CDC vs *FlowDSA-XM*” y “*FlowDSA-XM* vs CDC vs *FlowPRA/SA*”.

Para observar la influencia de los eventos de aloinmunización en los resultados, se crearon los Cuadros 19 y 20, ordenando los resultados de tal forma que se tuvieran dos filas, la primera señala que en todos los ensayos se obtuvo un resultado negativo y en la segunda que al menos en un ensayo se tuviera un resultado positivo o en todos se diera dicho resultado. Posteriormente se dividieron los resultados de acuerdo a cuantos pacientes habían tenido algún evento aloinmunizante y cuantos pacientes no, creando las columnas “Con Algún Evento Aloinmunizante” o “Sin Algún Evento Aloinmunizante”.

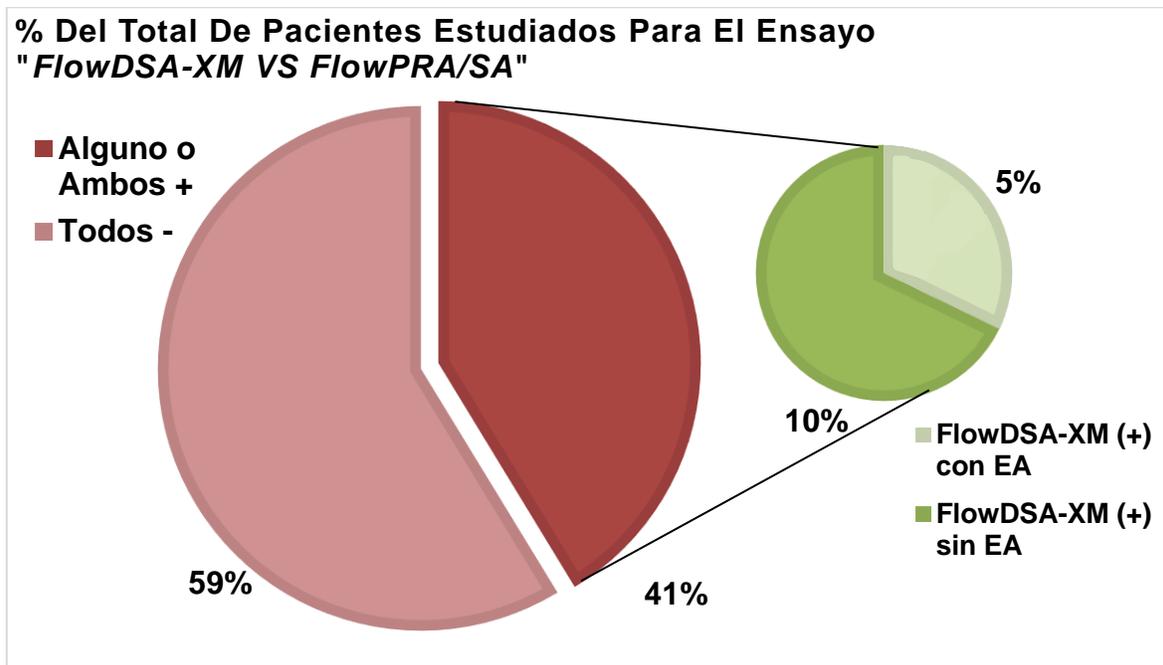
En la última fila de los Cuadros 19 y 20 se muestran los resultados donde el ensayo *FlowDSA-XM* obtuvo un resultado positivo y los otros ensayos un resultado negativo. Cabe aclarar que para el Cuadro 20 se incluyó la comparación “*FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA*”, por lo que pudieran existir combinaciones donde no solo diera positivo *FlowDSA-XM* si no también otro ensayo, por lo que, se decidió anotar en esos espacios los resultados con el criterio de que, sin importar que otro ensayo (*CDC* o *FlowPRA/SA*) diera positivo sería reportado, siempre y cuando, el otro de alguno de estos dos ensayos arrojara un resultado negativo, un doble negativo en ambos resultados (*CDC* y *FlowPRA/SA*) sería contado inmediatamente y por último, un resultado triple positivo no sería contado para la suma. Los porcentajes mostrados en dicha fila se obtuvieron a partir de un 100% de resultados positivos, por lo que la fila de resultados negativos no se contó para dicho cálculo.

Los Gráficos 12 y 13, muestran el desglose de los resultados en porcentajes a partir de la información obtenida en los Cuadros 19 y 20, sólo tomando en cuenta la columna de “Total de Pacientes”, y en el área de positivos se desprende otra gráfica representando el porcentaje de los resultados de la fila de *FlowDSA-XM* positivos.

## FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA

**CUADRO 19.** Resultados de los pacientes de acuerdo a su resultado en la comparación de los ensayos “FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA”, junto con la presencia de algún evento de aloinmunización.

Resultados de los Ensayos	Con Algún Evento Aloinmunizante	Sin Algún Evento Aloinmunizante	Total de Pacientes
Todos -	16 (35%)	11 (24%)	27 (59%)
Alguno o Ambos +	13 (28%)	6 (13%)	19 (41%)
<i>FlowDSA-XM +</i> <i>FlowPRA/SA -</i>	1 (5%)	2 (10%)	3 (15%)

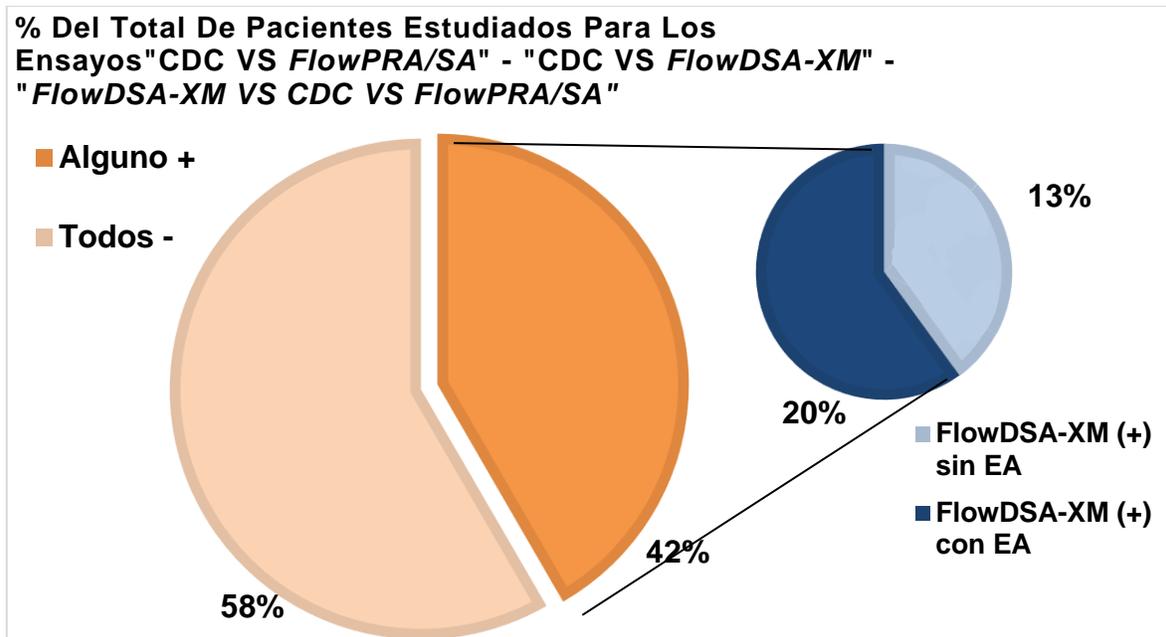


**GRÁFICO 12.** Porcentajes del total de pacientes estudiados y organizados de acuerdo a su resultado en la comparación entre “FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA”, y el porcentaje del resultado si FlowDSA-XM “+” y FlowPRA/SA “-”.

## CDC vs FlowPRA/SA, CDC vs FlowDSA-XM y FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA

**CUADRO 20.** Resultados de los pacientes de acuerdo a su resultado en la comparación de los ensayos “CDC vs FlowPRA/SA”, “CDC vs FlowDSA-XM” y “FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA”, junto con la presencia de algún evento de aloinmunización.

Resultados de los Ensayos	Con Algún Evento Aloinmunizante	Sin Algún Evento Aloinmunizante	Total de Pacientes
Todos -	13 (36%)	8 (22%)	21 (58%)
Alguno +	12 (33%)	3 (9%)	15 (42%)
<i>FlowDSA-XM+/-/-</i> CDC+ +/+ <i>FlowPRA/SA +/-/+</i>	3 (20%)	2 (13%)	5 (33%)



**GRÁFICO 13.** Porcentajes del total de pacientes estudiados y organizados de acuerdo a su resultado en la comparación entre “CDC vs FlowPRA/SA”, “CDC vs FlowDSA-XM” y “FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA”, y el porcentaje del resultado si FlowDSA-XM “+” junto con otro ensayo o ambos “-”.

## Discusión

El desarrollo de nuevos métodos de histocompatibilidad para ser incorporados en los protocolos de trasplante de órganos sólidos ha ido en aumento, desde que en 1969 Patel y Terasaki publicaron un estudio en el que demostraban que la presencia de anticuerpos en el receptor contra los antígenos expresados en los leucocitos del donador eran un factor de riesgo importante para la pérdida inmediata del injerto; de igual forma, Patel y Terasaki informaron que esta pérdida temprana del injerto ocurría también en pacientes que tuvieron una prueba cruzada negativa, por lo que, desde entonces el desarrollo de técnicas de compatibilidad más sensibles ha tomado gran relevancia en los trasplantes de órganos.

En la década de 1970 y 1980 se implementaron en los laboratorios las primeras pruebas cruzadas, donde los ensayos por CDC se introdujeron de manera obligatoria antes de la realización del trasplante y, con ello se consiguió reducir la frecuencia del rechazo hiperagudo. A pesar de las ventajas que esta técnica presentó, contaba con un gran problema, su sensibilidad, por lo que a lo largo del tiempo esta técnica fue siendo modificada para poder mejorar este aspecto, logrando obtener una detección tanto de anticuerpos anti-HLA de Clase I y anti-HLA de Clase II y, no únicamente los anticuerpos anti-HLA de Clase I que la CDC clásica lograba detectar, este ensayo fue tan relevante que en nuestro país se utilizó hasta hace un par de años, antes de la implementación dentro de los laboratorios del ensayo *FlowDSA-XM*.

En los últimos años el desarrollo y la introducción de técnicas por citometría de flujo fueron tomado un papel importante en el área clínica, ya que se ha demostrado que estas técnicas son mucho más sensibles que los ensayos por CDC, donde destacan los ensayos basados en el sistema *Flow*, como lo son: el *Flow-XM* y el *FlowPRA/SA*. Este último ensayo, de fase sólida, al utilizar una tecnología de perlas fluorescentes se llegó a convertir en un estándar de oro para

la detección de anticuerpos anti-HLA, ya que logra detectar anticuerpos débiles, llegando a tener hasta el día de hoy un uso importante para la realización de la prueba cruzada virtual, por lo que logró superar a la técnica *Flow-XM* empleada para la prueba cruzada, ya que ésta aunque de igual forma tenía una buena sensibilidad, contaba con falsos positivos con anticuerpos no anti-HLA y tiempos de respuesta muy largos, que para los trasplantes de donadores cadavéricos no era muy funcional, por lo que diversos laboratorios optaron por implementar únicamente los ensayo por CDC y *FlowPRA/SA*.<sup>18, 54, 55, 56</sup>

En el presente estudio, se analizaron un máximo de 46 expedientes de pacientes que iban a ser sometidos a un TR. A los pacientes se les realizaron, de manera simultánea y obligatoria, los ensayos de CDC, *FlowPRA/SA* y *FlowDSA-XM*, de esta forma se logró llevar a cabo la comparación entre los ensayos. Se evaluó la sensibilidad y especificidad que tienen los ensayos usados para la realización de la prueba cruzada, el ensayo por CDC y el *FlowDSA-XM*, ésta última prueba por citometría de flujo hoy en día es la más novedosa para la realización de las pruebas cruzadas linfocitarias alrededor del mundo, por lo que, se pudo evaluar de igual forma la utilidad que tiene este método ante los diversos retos que se pueden presentar dentro del laboratorio.

La obtención de los valores de sensibilidad y especificidad de los ensayos por CDC y del método *FlowDSA-XM*, se llevaron a cabo por medio de una comparación directa con el ensayo *FlowPRA/SA*, ya que, como mencionan diversos autores, entre ellos Brian Tait y Smita Vaidya, la técnica que tiene este ensayo por perlas y es analizado atreves del Luminex<sup>®</sup>, es un método altamente sensible para la detección de anticuerpos anti-HLA, que representa un antes y un después en la evolución actual de los ensayos para la detección de éstos, ya que, la sensibilidad con la que cuenta ha permitido que se logren detectar anticuerpos que no pueden ser detectados por otros métodos en pacientes potenciales a un trasplante. La determinación y descripción que tiene *FlowPRA/SA* sobre los

anticuerpos anti-HLA logró dar resultados altamente confiables sobre los valores de sensibilidad y especificidad.<sup>56, 57</sup>

En la comparación entre los ensayos “***FlowDSA-XM vs FlowPRA/SA***”, se obtuvieron valores de sensibilidad (100%) y especificidad (90%), al igual que valores de falsos positivos (10%) y falsos negativos (0%), mostrados en el cuadro 10. Estos resultados son parecidos a los informados por otros autores, ya que de igual forma, J. Lee y J. Ryu<sup>58</sup> analizaron sueros y linfocitos entre donadores y receptores en ensayos de pruebas cruzadas y, de esta manera pudieron evaluar el ensayo *FlowDSA-XM* en comparación con el ensayo *Flow-XM* y la compatibilidad cruzada virtual con el ensayo *FlowPRA/SA*, utilizando un total de 19 muestras, donde *FlowDSA-XM* detectó el 100% de anticuerpos anti-HLA de Clase I, sin importar que valor (>1000) de MFI se obtuviera en el ensayo por *FlowPRA/SA*, mientras que *Flow-XM* obtuvo resultados negativos en los resultados donde *FlowPRA/SA* tenía valores de MFI bajos.

En los resultados de los anticuerpos anti-HLA de Clase II, *FlowDSA-XM* obtuvo el 69% de resultados positivos a comparación de los resultados positivos que tuvo el ensayo *FlowPRA/SA*, ésto se puede deber a que los valores de MFI que obtuvieron estos autores en el ensayo de *FlowPRA/SA* para los anticuerpos anti-HLA de Clase II fueron muy bajos y, como mencionan otros autores como Brian Tait, no existe un valor de “corte” recomendado para la positividad del MFI, por lo que, J. Lee y J. Ryu pudieron tener valores de MFI realmente bajos en ese ensayo que fueron reportados como positivos para la prueba cruzada virtual y, que probablemente el equipo de *FlowPRA/SA* sí detectó pero, no se consiguieron las interacciones suficientes para que se determinara la prueba cruzada como positiva. Ahora bien, cabe aclarar que estos autores no mencionan la presencia de eventos aloinmunizantes que de igual forma pudieron influir en sus resultados.

En los resultados que obtuvimos en el laboratorio no discriminamos entre Clase I o Clase II, tanto para los ensayos por *FlowPRA/SA* y *FlowDSA-XM*, por lo que,

bastaba con que se diera un resultado positivo en cualquier Clase para ser reportado como tal, ya que, no se necesita tener resultados positivos en ambas Clases para que sea negada la realización del trasplante. En nuestros resultados del cuadro 9, se observa que obtuvimos 3 resultados positivos para *FlowDSA-XM* y que fueron negativos para *FlowPRA/SA*, lo que disminuyó la especificidad del método *FlowDSA-XM* y fueron nombrados como falsos positivos, pero eso no quiere decir que realmente lo sean, ya que nuestra sensibilidad fue del 100% y como lo mencionan diversos autores, la prueba cruzada física no se compara con una virtual, ya que la forma en que se realizan y se analizan los ensayos puede afectar en los resultados y, muy probablemente la interacción Antígeno-Anticuerpo (entre el donador y receptor) en la prueba de *FlowDSA-XM* fue muy baja, pero lo suficiente para ser detectada por el citómetro, mientras que la interacción de los anticuerpos del receptor con las perlas pudo ser insuficiente para ser detectada por el ensayo *FlowPRA/SA* lo que arrojó dichos resultados.

Para la comparación entre los ensayos “**CDC vs FlowPRA/SA**”, se obtuvieron valores de sensibilidad (82%) y especificidad (92%), al igual que valores de falsos positivos (8%) y falsos negativos (18%), mostrados en el cuadro 12. Estos valores son muy diferentes a los que autores como Nataša Katalinić y Alma Starčević<sup>59</sup> obtuvieron en su estudio retrospectivo de 3 años, donde presentaron valores de sensibilidad del 39%, especificidad del 100%, falsos positivos del 0% y falsos negativos del 61% para el ensayo por CDC, mostrando un valor de sensibilidad muy bajo y un valor de falsos negativos muy alto respecto a nuestros resultados, estos resultados podrían relacionarse con un mal manejo de la prueba, títulos bajos de anticuerpos, los cuales suelen ser complicados de detectar por el ensayo de CDC, la presencia de anticuerpos no citotóxicos o la no detección contra anticuerpos anti-HLA de Clase II, por lo que, la falta de sensibilidad y el alto porcentaje de falsos negativos que estas autoras tuvieron por el ensayo de CDC provocarían fracasos en el injerto trasplantado, teniendo de esta forma rechazos agudos o incluso hiperagudos por parte del receptor si es que se llegara a realizar el trasplante.

Ahora bien, en la comparación que se realizó entre los ensayos “**CDC vs FlowDSA-XM**”, se obtuvieron valores de sensibilidad (71%) y especificidad (95%), al igual que valores de falsos positivos (5%) y falsos negativos (29%), mostrados en el cuadro 14. Aunque no se encontraron autores que hicieran alguna comparación entre estos ensayos, ya que las comparaciones más comunes que se realizan son entre el primer *Flow-XM* y el *FlowDSA-XM* o bien entre CDC y *FlowPRA/SA*, se puede observar como el porcentaje de sensibilidad del ensayo por CDC disminuyó en un 11% en comparación con el estudio entre “CDC vs *FlowPRA/SA*”, lo que nos muestra la alta sensibilidad que tiene el método estudiado (*FlowDSA-XM*). En esta comparación podemos observar de igual forma el aumento de falsos negativos por parte del ensayo por CDC, los cuales fueron 4, ésto se dio ya que ni el ensayo por *FlowPRA/SA* y ni el CDC fueron capaces de detectar dichos resultados positivos y, gracias a la alta especificidad y sensibilidad del ensayo *FlowDSA-XM* sí, pero también en el cuadro 13 se nos muestra un solo resultado como falso positivo del ensayo por CDC, algo en que la comparación con *FlowPRA/SA* no ocurrió, ya que en esta última hubo dos falsos positivos por parte del ensayo por CDC (cuadro 11), lo que nos vuelve a indicar que el ensayo *FlowDSA-XM* puede detectar complejos antígeno-anticuerpo que pueden ser perjudiciales al trasplante y que otros métodos no pueden, mientras que el único resultado como falso positivo que se muestra puede deberse a la presencia de autoanticuerpos, anticuerpos no HLA o complejos inmunes desarrollados dentro de la realización del ensayo por CDC.

Por último, en la comparación que se realizó entre los ensayos “**FlowDSA-XM vs CDC vs FlowPRA/SA**”, se obtuvieron valores de sensibilidad (82%) y especificidad (84%), al igual que valores de falsos positivos (16%) y falsos negativos (18%), mostrados en el cuadro 16. Esta comparación se realizó para observar la forma en que pudieran interactuar dichos estudios si se realizaran al mismo tiempo, observando que no sería algo conveniente, ya que, los porcentajes de falsos negativos y positivos son un poco altos y, pudiera causar conflictos al momento de tomar una decisión sobre si es conveniente llevar a cabo o no el

trasplante por la presencia de un resultado positivo en alguno de estos tres ensayos y en que los otros se presente un resultado negativo, por lo que escoger solamente una prueba para tomar esta decisión es lo más recomendable para asegurar el éxito en cualquier trasplante.

En nuestro estudio retrospectivo que se llevó a cabo desde el mes de Enero a Abril del 2019 fueron estudiados casi el doble de hombres (65%) que de mujeres (35%) como lo muestra el Gráfico 6, mientras que en el Gráfico 7 que fueron archivos del mes de Enero a Marzo del mismo año, fueron casi la misma cantidad de pacientes estudiados tanto en hombres (58%) como en mujeres (42%), un aumento de cerca del 10% de pacientes hombres que iban a someterse a un TR con tan solo un mes de diferencia, de Marzo a Abril, datos que coinciden con los informados por el CENATRA <sup>60</sup>, donde mencionan que hay más hombres que mujeres en lista de espera por la realización de un TR. En los cuadros 17 y 18 observamos que el evento aloinmunizante que destaca en los pacientes estudiados fue el de las transfusiones sanguíneas, seguido por los trasplantes, eventos a los que fueron expuestos los pacientes estudiados en alguna etapa de su vida previa a la realización de los estudios de histocompatibilidad hechos por el laboratorio; mientras que, en los servicios de procedencia destaca la UTR, que es el servicio dentro del Hospital que cuenta con más pacientes en espera a la realización de un trasplante.

En relación al efecto que tienen los eventos de aloinmunización en los resultados de los ensayos de histocompatibilidad realizados en el laboratorio para este estudio, podemos observar en el cuadro 19 y 20 que son muy variados, ya que se esperaría que todos o la mayoría de los pacientes que han tenido algún evento de aloinmunización tuvieran resultados positivos en los ensayos, mientras que, los que nunca han tenido un evento de aloinmunización tuvieran resultados negativos, por lo que, en estos cuadros podemos observar que aunque nunca hayas estado expuesto a algún evento aloinmunizante puedes presentar una incompatibilidad con el donador y, de igual forma que, aunque hayas estado expuesto a algún

evento aloinmunizante puedes encontrar algún donador con el cual puedes ser compatible; cabe mencionar que no se sabe si los pacientes que fueron estudiados y que habían estado expuestos a algún evento aloinmunizante también estaban siendo sometidos a algún tratamiento inmunosupresor, el cual actuaría en el receptor de manera positiva al disminuir la cantidad de anticuerpos anti-HLA que pudieran contraindicar la realización del trasplante y por ende se tiene este aspecto en los resultados que se obtuvieron.

En la última fila de los cuadros 19 y 20 nos enfocamos específicamente en los datos donde el ensayo *FlowDSA-XM* tuviera resultados positivos y que los otros ensayos presentaran resultados negativos, observando que aunque fueron pocos los resultados que presentaron esta tendencia, son significativos, ya sea positiva o negativamente para el paciente y para todo el proceso que se tiene dentro del protocolo de TR, ya que este resultado obtenido con el ensayo (*FlowDSA-XM*) está evitando un posible rechazo renal que puede poner en peligro la vida del paciente y que con la realización de algún otro ensayo no podría haber sido detectado.

## Conclusiones

1. Los valores diagnósticos determinados para el ensayo *FlowDSA-XM*, utilizado en el laboratorio para realizar la prueba cruzada linfocitaria entre el receptor y donador dentro del protocolo de trasplantes de órganos, fueron: sensibilidad de 100%, especificidad de 90%, falsos positivos de 10% y falsos negativos de 0% ante la comparación con FlowPRA/SA,
2. Los resultados de los ensayos fueron obtenidos y reportados conforme a los insertos que el fabricante elabora, asegurando de esta manera que todos los procesos, mediciones y resultados fueran confiables y seguros.
3. La mínima interacción que exista entre el complejo antígeno-anticuerpo puede ser detectada por el ensayo *FlowDSA-XM* (aunque esta puede no ser suficiente para negar el trasplante).
4. Los valores diagnósticos obtenidos por el ensayo *FlowDSA-XM* fueron muy superiores al anterior ensayo que se realizaba en el laboratorio (CDC), por lo que la implementación previa de *FlowDSA-XM* antes del trasplante, aumentará el éxito de éste en el receptor.
5. Los valores de diagnóstico obtenidos hacen que la confiabilidad del ensayo *FlowDSA-XM* sea alta, por lo que, el resultado positivo en la prueba cruzada linfocitaria contraindicaría la realización del trasplante, mientras que el resultado negativo permitiría la realización del mismo.
6. La alta sensibilidad y especificidad del ensayo *FlowDSA-XM* lo hacen establecerse como el estándar de oro para la toma de decisiones sobre la realización del trasplante renal.

## Referencias

1. Tamayo, J., Lastiri, H. (2016). *La enfermedad renal crónica en México Hacia una política nacional para enfrentarla*. México: Intersistemas.
2. Correa, E., Vilatobá, M. & Torres, P. (2015). *Protocolo de Trasplante Renal*. México: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
3. Aguilar, M., Barrera, A., Gómez, C., González, G., (2014). Tratamiento Sustitutivo de la Función Renal en la Insuficiencia Renal Crónica. Catálogo Maestro de *Guía de Práctica Clínica: IMSS, 727(14)*.
4. Malkina, A. (2020). *Enfermedad Renal Crónica*. Recuperado de <https://msdmnls.co/3ptUbe1>
5. Drawz, P. & Rahman, M. (2015). Chronic Kidney Disease. *Annals of Internal Medicine*, 162(11), ITC1–ITC16. Recuperado de <https://doi.org/10.7326/AITC201506020>
6. Latif, W. (2019). *Chronic Kidney Disease*. Recuperado de <https://medlineplus.gov/ency/article/000471.htm>
7. Sánchez, A., Cruz, J., Mariño, B., (2020). Carga de la enfermedad: insuficiencia renal, diálisis-hemodiálisis y trasplante renal en México. Costo de la enfermedad. *Revista Mexicana de Trasplantes*, 9(1), 15-25. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=94025>.
8. Centro de Información para Decisiones en Salud Pública. (2020). *La Enfermedad Renal Crónica en México*. Recuperado de <https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html>

9. Martínez, P., Cruz, R., Parmentier, C., Grimaldo, O., Castelán, N., Madrigal, J. & Rodríguez, F. (2019). FirstKidney Domino Transplant in Mexico. *Nefrología: Publicación Oficial de la Sociedad Española de Nefrología*, 39(4), 452–454. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.10.001>
  
10. Centro Nacional de Trasplantes. (2020). *Reporte Anual 2019 de Donación y Trasplantes en México*. Recuperado de [www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/528301/Presentacion\\_anual\\_2019.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/528301/Presentacion_anual_2019.pdf)
  
11. Gómez, M. (2016). *Tipificación De Las Moléculas Hla-Dp Para Establecer Su Importancia Clínica En El Desarrollo De Anticuerpos Anti-Dp En Pacientes En Protocolo De Trasplante Renal De La UMAE HE CMN SXXI DE 2010 a 2015*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
  
12. Lozano, K. & Morán, M. (2015). *Determinación del antígeno único como biomarcador de rechazo agudo en pacientes en protocolo de trasplante renal de la UMAE HE CMN SXXI de 2007 a 2014*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
  
13. Cornell, L., Smith, R. & Colvin, R. (2008). Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol*, 3. 189-220.
  
14. Nefropatología. (2016). *Patología del Trasplante Renal*. Recuperado de: [www.kidney pathology.com/Trasplante.html](http://www.kidney pathology.com/Trasplante.html)
  
15. Martín, P. & Errasti, P. (2006). Kidney Transplant. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 29 (Supl 2), 79–91. Recuperado de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272006000400008](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000400008)

16. Macías, C. (2014). Histocompatibilidad: pasado, presente y futuro. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(1). Recuperado de <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/240/158>
17. De Leo Cervantes, C. (2005). Pruebas de Histocompatibilidad en el Programa de Trasplantes. *Revista de Investigación Clínica*, 57(2), 142-146. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-83762005000200006&lng=es&tling=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762005000200006&lng=es&tling=es).
18. López, M., Ruíz, J., San Segundo, D. & Rodrigo, E. (2019). Inmunobiología del Trasplante. Estudios inmunológicos del donante y del receptor del trasplante renal. *Nefrología al día*. Recuperado de <https://www.nefrologiaaldia.org/146>.
19. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., Baker, D. & Baker, A. (2015). *Inmunología Celular y Molecular*. (8ª ed.). España: Elsevier.
20. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya JM. (2018), *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Colombia: El Rosario University Press.
21. Vega, G. (2009). Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(2). Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2009/un092j.pdf>
22. Martínez, J.C. (2013). Anticuerpos, Antígenos Leucocitarios Humanos y Biomoduladores en los Efectos Adversos Agudos de las Transfusiones. *Gaceta Médica de México*, 149(1), 81-88.
23. Arrazola, M. (2005). Tipificación de los Alelos HLA Clases I y II. *Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguro Social*. 43 (Suppl 1), 95-97.

24. Marcell, L., Morera, L., Ustariz, C., Costales, D., Chang, A. & Bencomo, A. (2015). Identificación de Anticuerpos Anti-HLA en Pacientes en Espera de Trasplante Renal. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(2). Recuperado de <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/266/171>
25. Ercilla, M. & Martorell, J. (2010). Immunologic Study of the Donor-Receptor Couple. *Nefrología: Publicación Oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 30(2), 60–70. Recuperado de <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10692>
26. Sorohan, B., Ismail, G., Leca, N., Tacu, D., Obrișcă, B., Constantinescu, I., Baston, C. & Sinescu, I. (2020). Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies in Kidney Transplantation: An Evidence-Based Comprehensive Review. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)*, 34(4). Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.trre.2020.100573>
27. Morera, L., Socarrás, B., Marcell, L., Segura, F. & Bencomo, A. (2017). Antígenos MICA y Trasplante. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 33(3). Recuperado de <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/550/520>
28. Sánchez, E. (2017). *Significado de los Anticuerpos Anti-Mica y Anti-Edoteliales en la Evolución del Trasplante Renal*. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
29. Sociedad Española de Reumatología. (2018). *Recomendaciones SER Sobre Síndrome Antifosfolípido Primario*. Recuperado de <https://bit.ly/2Nej4xl>
30. Bienaimé, F., Legendre, C., Terzi, F. & Canaud, G. (2017). Antiphospholipid Syndrome and Kidney Disease. *Kidney International*, 91(1), 34–44. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.026>

31. Sancho, A., Gavela, E., Crespo, J., Górriz, J., Ávila, A., Núñez, A., Molina, P., García, J. & Pallardó, L. (2006). Trasplante Renal en Presencia de Una Prueba Cruzada Positiva. *Nefrología: Publicación Oficial de la Sociedad Española de Nefrología*, 26(2), 261-266.
32. Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D. & Suberbielle, C. (2010). Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(8), 1398–1406. Recuperado de <https://doi.org/10.1681/ASN.2009101065>
33. Keven, K., Sengul, S., Celebi, Z. K., Tuzuner, A., Yalcin, F., Duman, T. & Tutkak, H. (2013). Kidney Transplantation In Immunologically High-Risk Patients. *Transplantation Proceedings*, 45(3), 919–922. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.02.061>
34. Caro, J., González, M., González, F., Acevedo, M., Cabello, V., Gentil, M. & Núñez, A. (2012). Clinical Relevance of HLA Donor-Specific Antibodies Detected by Single Antigen Assay in Kidney Transplantation. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 27(3), 1231–1238. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr429>
35. Otten, H., Verhaar, M., Borst, H., Hené, R. & Van Zuilen, A. (2012). Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and -II Antibodies are Associated with an Increased Risk for Kidney Graft Failure. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(6), 1618–1623. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03985.x>
36. Gloor, J., Winters, J., Cornell, L., Fix, L., DeGoey, S., Knauer, R., Cosio, F., Gandhi, M., Kremers, W. & Stegall, M. (2010). Baseline Donor-Specific Antibody Levels and Outcomes in Positive Crossmatch Kidney Transplantation. *American Journal of*

*Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(3), 582–589. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02985.x>

37. Martínez, J. C. y D'Artote, A. L. (2012). *Asociación Mexicana de Medicina Transfusional*. (1ª ed.). México: AMMTAC.
38. Molina, J. & Navas, A. (2018). Avances en inmunología del trasplante renal. *Nefrología: Publicación Oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 10(2). Recuperado de <https://n9.cl/w43vb>
39. Kanter, J. (2015). *Análisis de la sensibilización HLA pretrasplante y postrasplante en pacientes receptores de un injerto renal: factores de riesgo e implicaciones pronósticas*. Tesis de Doctorado. Universidad de Valencia.
40. Ramírez, M. (2012). Citometría de Flujo: Qué Puede Aportar al Diagnóstico Hematológico en Pediatría. *Anales de Pediatría continuada*, 10(5), 282-285. Recuperado de [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(12\)70099-9](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(12)70099-9)
41. Pérez, J., Santiago, W., Romero, H. & Rodríguez, J. (2018). Fundamentos de Citometría de Flujo: Su Aplicación Diagnóstica en la Investigación Biomédica y Clínica. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 18(2), 41-52. Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=85259>
42. Lentine, K. L., Graff, R. J., Xiao, H., Modanlou, K. A., Salvalaggio, P. R., Brennan, D. C., Pinsky, B. W., Burroughs, T. E., & Schnitzler, M. A. (2008). Flow cytometry crossmatch before kidney transplantation in contemporary practice: target cell utilization, results patterns, and associated long-term graft survival. *Clinical transplants*, 253–266.

43. Morales, L. E. (2020) Evaluación del riesgo inmunológico. *Revista Mexicana de Trasplantes*, 9(1), 13-17. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.35366/93478>
44. OneLamda A Thermo Fisher Scientific Brand. (2019). *FlowDSA-XM – Advanced Crossmatch Testing*. Recuperado de <https://www.onelambda.com/content/dam/onelambda/en/TDX/Documents/securedocs/docs/TDX-MARKETING/TDX-MKT-0006.pdf>
45. Ficner, R. & Huber, R. (1993), Refined Crystal Structure of Phycoerythrin From *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm Resolution and Localization of the  $\gamma$  Subunit. *European Journal of Biochemistry*, 218(1), 103-106. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18356.x>
46. Chen, G., Lin, L. & Tyan, D. (2020). DSA-FXM: Accelerated Donor-specific Flow Crossmatch Discriminating Class I and II Antibody Specifically and Only to Donor HLA for Determining True Incompatibility. *Transplantation*, 104(4), 813–822. Recuperado de <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002900>
47. Kimball, P. & McDougan, F. (2018). Comparison of New One Lambda Flow DSA-XM With Conventional Flow Crossmatch. *Transplantation*, 102, 299. Recuperado de <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000543530.79282.ca>
48. Neumann, J. (2014). *Prueba Cruzada Virtual, Por qué y Cómo Usarla*. Recuperado de <https://cdn1.redemc.net/campus/wp-content/uploads/2015/03/Prueba-cruzada-virtual-Neumann-ESP.pdf>
49. Ochoa, C. & Orejas, G. (1999). Epidemiología y Metodología Científica Aplicada a la Pediatría (IV): Pruebas Diagnósticas. *Anales Españoles de Pediatría*, 50(3), 301-314. Recuperado de <http://www.aeped.es/sites/default/files/anales/50-3-19.pdf>

50. Bravo, S. & Cruz, J. P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista chilena de radiología*, 21(4), 158-164. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-93082015000400007>
51. Fernández, P. & Pértegas, S. (2003). Pruebas Diagnósticas: Sensibilidad y Especificidad. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña*, 10, 120-124. Recuperado de <https://www.fisterra.com/formacion/metodologia-investigacion/pruebas-diagnosticas-sensibilidad-especificidad/>
52. Martínez, J. C. (2001). *Identificación de blastos en sangre periférica por el autoanalizador en hematología Coulter Gen-s*. Tesis de Especialidad en Bioquímica Clínica. Universidad Nacional Autónoma de México.
53. Cortés, L., Álvarez, G., Orozco, C., Soto, H., Martínez, H. & Cueto, A. (2017). Impacto Económico de la Enfermedad Renal Crónica: Perspectiva del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 55(2), 124-132. Recuperado de <http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista-medica/article/viewFile/2502/2869>
54. Gebel, H., Bray, R. & Nickerson, P. (2003). Pre-Transplant Assessment of Donor-Reactive, HLA-Specific Antibodies in Renal Transplantation: Contraindication vs. Risk. *American Journal of Transplantation*, 3(12), 1488-1500. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1600-6135.2003.00273.x>
55. Tait, B., Hudson, F., Cantwell, L., Brewin, G., Holdsworth, R., Bennett, G. & Jose, M. (2009). Review Article: Luminex Technology for HLA Antibody Detection in Organ Transplantation. *Nephrology*, 14(2), 247–254. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2008.01074.x>

56. Tait B. (2016). Detection of HLA Antibodies in Organ Transplant Recipients - Triumphs and Challenges of the Solid Phase Bead Assay. *Frontiers in immunology*, 7, 570. Recuperado de <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00570>
57. Vaidya S. (2008). Clinical Importance of Anti-Human Leukocyte Antigen-Specific Antibody Concentration in Performing Calculated Panel Reactive Antibody and Virtual Crossmatches. *Transplantation*, 85(7), 1046–1050. Recuperado de <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318168fdb5>
58. Lee, J., Ryu, J., Choi, A. & Oh, E. (2017). Evaluation of FlowDSA Crossmatch for Detection of Donor-Specific HLA Antibodies. *American Journal of Trasplantation*, 17 (Suppl 3). Recuperado de <https://atcmeetingabstracts.com/abstract/evaluation-of-flowdsa-crossmatch-for-detection-of-donor-specific-hla-antibodies/>
59. Katalinić, N., Starčević, A., Mavrinac, M.& Balen, S. (2017). Complement-Dependent Cytotoxicity and Luminex Technology for Human Leucocyte Antigen Antibody Detection in Kidney Transplant Candidates Exposed to Different Sensitizing Events. *Clinical Kidney Journal*, 10(6), 852–858. Recuperado de <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx050>
60. CENATRA. (2020). Donaciones y Trasplantes de Órganos y Tejidos en la Epidemia de COVID-19, México. Período: Enero-Junio, 2020. *Boletín Estadístico Informativo del Centro Nacional de Trasplantes (BEI-CENATRA)*, 5(1).

## Anexos

### Anexo I

#### Procedimiento del ensayo de FlowDSA-XM.

- Separación de linfocitos de Donadores.
  1. Separar linfocitos a partir de sangre total con ACD, realizar centrifugación 20 min 1330 g. para separar la buffy coat.
  2. Separar la buffy coat y colocarla en tubos Falcon y llevar a un volumen de 1.5 mL con medio dubelcco's con agitación en el vortex.
  3. Agregar 75  $\mu$ L de *EasyStep*<sup>®</sup> cocktail y 75  $\mu$ L de *RapidSpheres*<sup>®</sup> mezclar e incubar 5 min a temperatura ambiente.
  4. Llevar a un volumen de 2.5 mL con *buffer Easy Step*<sup>®</sup>.
  5. Incubar 5 min. en la gradilla magnética.
  6. Pipetear el sobrenadante a un tubo nuevo, evitando llevar glóbulos rojos.
  7. En el tubo nuevo con el sobrenadante agregar 75  $\mu$ L de *RapidSpheres*<sup>®</sup> e incubar 5 min.
  8. Repetir pasos 4, 5 y 6.
  9. Centrifugar 5 min. 1200 g y eliminar sobrenadante.
  10. Al final resuspender en 1 mL de medio de *EasyStep*<sup>®</sup>.
  11. Cuantificar linfocitos.
  
- Cuantificación de linfocitos.
  1. Realizar la cuantificación de los linfocitos aislados. (Cel/ $\mu$ L o cel/mL).
  2. Determinar el volumen necesario para una concentración de 200 000 cel/pozo.
  
- Preparación de la placa con un donador.
  1. Colocar el volumen obtenido en el cálculo en cada pozo de la placa de 96, dependiendo el número de donadores y receptores.
  2. Centrifugar 3 min. 1360 g. Eliminar sobrenadante.
  3. Vortex en seco 30 seg.
  4. Colocar el suero correspondiente en cada pozo y dar vortex.

5. Incubar 20 min la placa en movimiento y bien sellada a una temperatura de 20-25°C con agitación suave.

- Lavados.

1. Colocar 150  $\mu$ L de *Buffer* de lavado-1 en cada pozo y mezclar inmediatamente con pipeteo.

2. Centrifugar 3 min. 1360 g.

3. Eliminar sobrenadante.

4. Cubrir perfectamente y dar vortex por 30 seg.

5. Repetir pasos del 1 al 4.

- Tinción.

1. Mezclar las perlas de captura mediante pipeteo.

2. Agregar 5  $\mu$ L a cada pozo y dar vortex por 30 seg.

3. Adicionar 150  $\mu$ L de *Buffer* de lavado-1 en cada pozo y mezclar mediante pipeteo.

4. Eliminar sobrenadante y dar vortex por 30 seg.

5. Mezclar por pipeteo el *Lysis/Stain Buffer (LSB)* evitando hacer burbujas.

6. Adicionar 25  $\mu$ L de *LSB* en cada pozo.

7. Cubrir perfectamente y dar vortex por 30 seg.

8. Incubar 30 min. en oscuridad y en movimiento.

9. Colocar 150  $\mu$ L de *Buffer* de lavado-1 en cada pozo y mezclar mediante pipeteo, sellar, centrifugar y eliminar sobrenadante.

10. Cubrir perfectamente y dar vortex por 30 seg.

11. Realizar un segundo lavado con 200  $\mu$ L del *Buffer* de lavado-2 en cada pozo, mezclar, mediante pipeteo, sellar, centrifugar y eliminar sobrenadante.

12. Resuspender con 100  $\mu$ L del *Buffer* de lavado-3 en cada pozo, homogenizar y pasar a un tubo Falcon de 5 mL.

13. Colocar otros 100  $\mu$ L del *Buffer* de lavado-3 en cada pozo y traspasar al mismo tubo Falcon, cuidando de que se trasvasen en el tubo correcto las muestras y llevar a analizar al citómetro.

## Anexo II

### Procedimiento del ensayo de FlowPRA/SA.

1. Poner una alícuota de suero en un microtubo de 1.5 mL.
  2. Separar la muestra a analizar en 3 pocillos dentro de una placa para PCR.
  3. Agregar en el primer pocillo 5  $\mu$ L de perlas *Single Antigen* Clase I, en el segundo 5  $\mu$ L de perlas *Single Antigen* Clase II *LABScreen*® y en el tercero 10  $\mu$ L de la mezcla de PRA CI/CII.
    - Realizar vortex a los reactivos al menos 20 segundos antes de su uso.
    - Mezclar suavemente el reactivo con el suero usando una pipeta.
  4. Incubar durante 30 minutos sin luz vigilando que la temperatura esté entre 20 – 25 °C con agitación suave (opcional).
  5. Lavar 3X usando 1mL del *buffer* de lavado. Centrifugar a 1300 rpm por 2 min.
  6. Después del último lavado, retirar cuidadosamente todo el *buffer*.
    - Durante el tiempo de incubación preparar la anti-IgG humana de cabra conjugada con PE y preparar también suficiente *buffer* de lavado.
- Marcaje de la muestra.
1. Añadir 100  $\mu$ L de IgG-PE a cada muestra y realizar vortex.
  2. Incubar en ausencia de luz durante 30 minutos vigilando que la temperatura esté entre 20 – 25 °C con agitación suave (opcional).
  3. Lavar 2X con 1mL de *buffer* de lavado. Centrifugar a 1300 rpm por 2 min.
  4. Después del último lavado, retirar cuidadosamente todo el *buffer*.
  5. Añadir 70  $\mu$ L de 1XPBS a cada muestra y mezclar.
  6. Guardar las muestras en ausencia de luz a 4°C hasta su lectura.
- Lectura de la muestra con Luminex® versión 2.2 o posterior.
1. Si no está ocupando el sistema de suministro, llenar la botella del líquido de revestimiento y cerrar la tapa.
  2. Una vez que el equipo ha pasado por el calentamiento, seguir con el revestimiento, enjuagar con alcohol y lavar con líquido de revestimiento.

Calibrar con esferas de control y calibración, realizar 4 lavados obligatorios.  
Prepara el sistema de suministro una vez terminado.

3. Seleccionar el ícono de NUEVO LOTE o NUEVO MULTI-LOTE. Seleccionar la mezcla correcta de perlas, verificar que el número de lote sea el correcto. Asignar un nombre a la sesión.
  4. Introducir el ID de la muestra o importar el ID de una lista de pacientes. Verificar la correcta posición de las muestras en la placa. Seleccionar GUARDAR.
  5. Si se está trabajando con un multi-lote, repetir los pasos 3 y 4 hasta completar el lote.
  6. Una vez terminado, seleccionar “paso único” desde la barra del menú principal. Esto permitirá verificar si la elección de la plantilla fue la correcta y asegura que la muestra se está leyendo correctamente.
  7. Colocar el equipo en la orientación apropiada y seleccionar INICIO, el tiempo de lectura varía entre 10 seg. y 1.5 min. dependiendo del recuento de perlas *LABScreen®*. Si la primera muestra fue leída correctamente quitar la selección de configuración única.
  8. Cuando el equipo termine de leer una muestra continuará con la siguiente hasta leer el total de muestras.
  9. Una vez terminado el proceso se realiza un guardado automático de los datos.
- Apagado (obligatorio).
1. Lavar 2X con fluido de revestimiento, desinfectar 1X con lejía (cloro) al 20%, lavar 3X con agua desionizada y remojar 1X con agua desionizada.
  2. El equipo se puede apagar y aflojar la tapa de la botella del fluido de revestimiento.

## **Anexo III**

### **Procedimiento del ensayo de CDC.**

1. Adicionar suero de los receptores en placas para PCR.
2. Adicionar los linfocitos de los donadores a los sueros de los receptores en la placa e incubar a 22°C por 30 minutos.
3. Agregar complemento de conejo e incubar durante 1 hora.
4. Teñir las células con una solución compuesta por naranja de acridina, bromuro de etidio y adicionando tinta “*quenching*” a cada pozo de la placa.
5. Leer las placas usando un microscopio de fluorescencia de doble fase, donde la reacción positiva es notada cuando el número de células lisadas en cada pozo es del 20% o más y la reacción negativa es notada por la muerte celular en menos del 20% en cada pozo.