

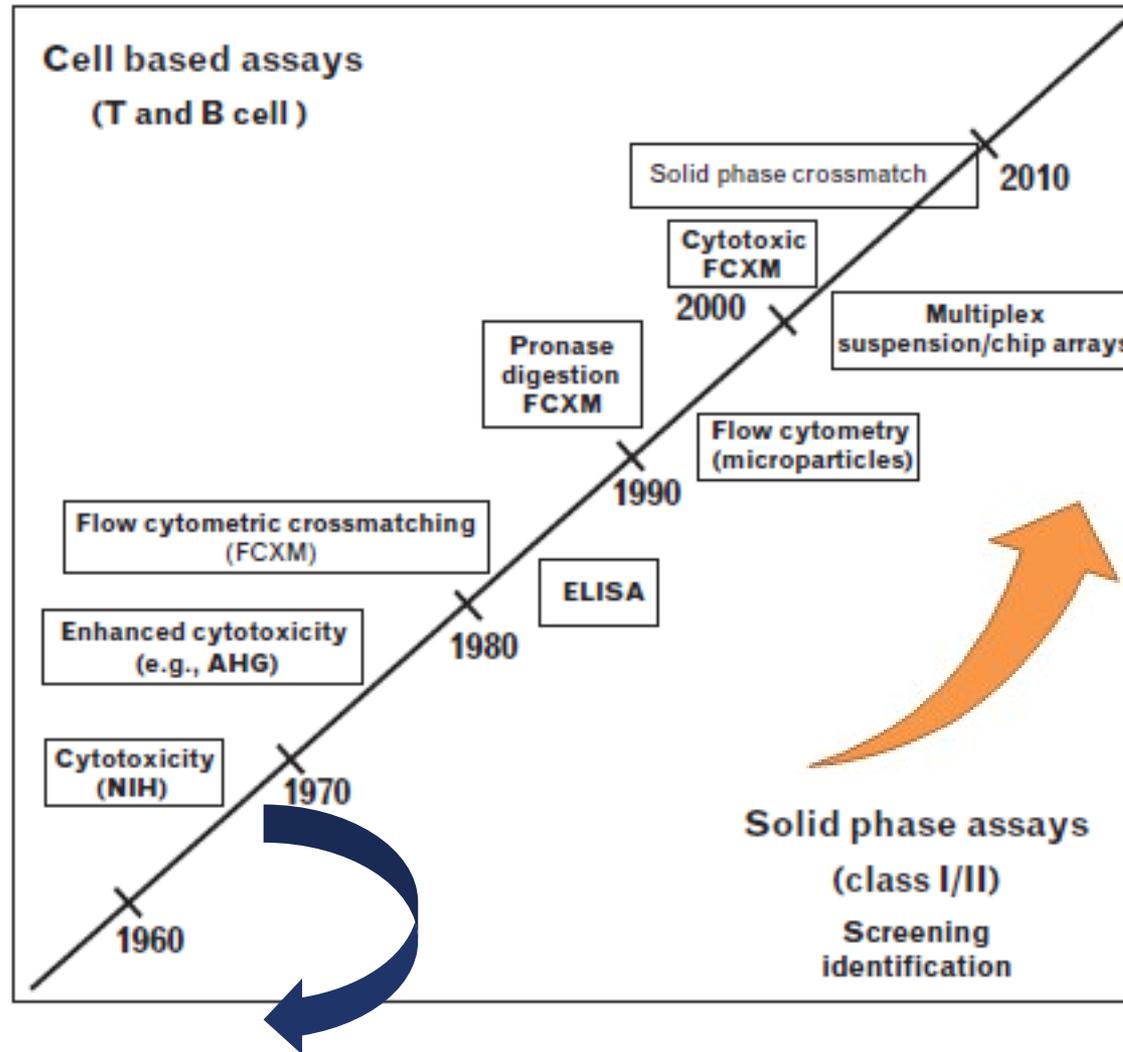
CROSS MATCH VIRTUEL – GÉNÉRALITÉS ET RÉSULTATS RÉGIONAUX



10/11/2017
28^{ème} Congrès Ouest Transplant

Dr F.Delbos
Laboratoire HLA
EFS Nantes

HISTORIQUE des techniques HLA en Transplantation



Cross match Virtuel (2006)

= Luminex

Meilleure sensibilité
Meilleure spécificité

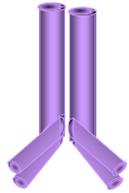
En 1969: XM cellulaire obligatoire avant toute transplantation pour éviter le rejet hyperaigu (*Patel et Tarasaki, NEJM, 1969*)

PRINCIPE DE LA RECHERCHE D'ANTICORPS ANTI HLA

TECHNIQUE LUMINEX/ SINGLE ANTIGEN

Patient

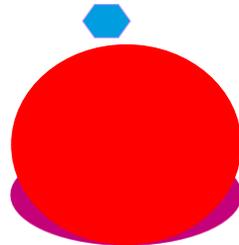
Sérum
(Ac anti-HLA)



+

Bille

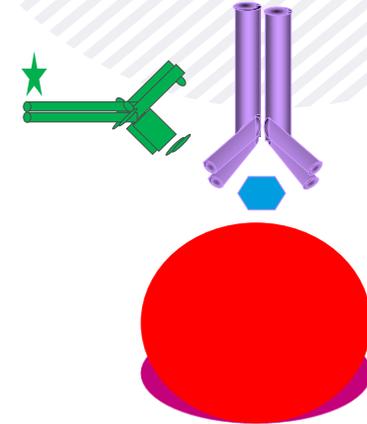
Ag HLA



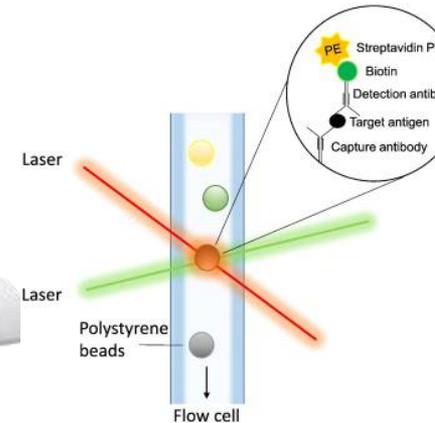
Révélation
anti-IgG PE



Lecture



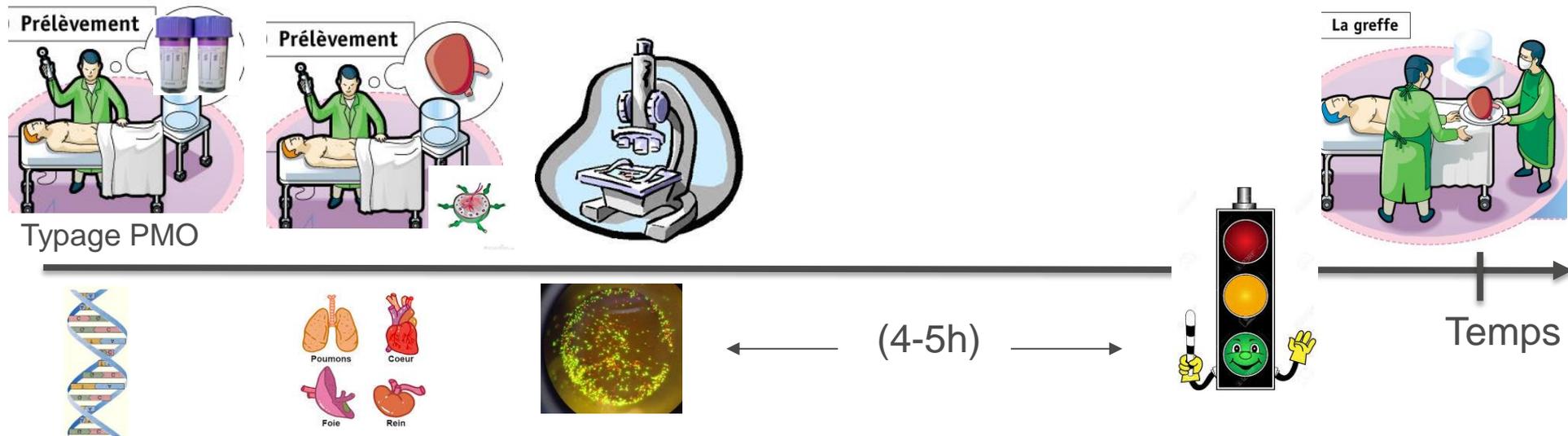
Haute Définition / Single Antigen :
bille coatée avec 1 seul Ag HLA



Identification des Anticorps et donc des antigènes interdits

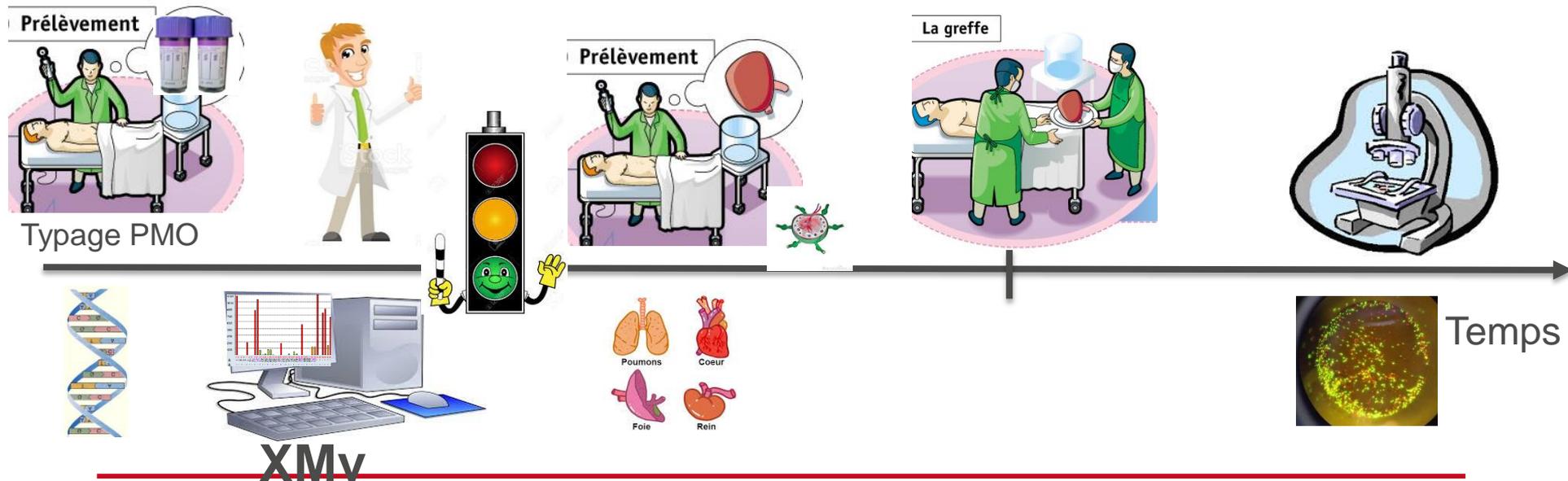
CROSS MATCH VIRTUEL - PRÉ GREFFE

- Définition: Utiliser les résultats des anticorps identifiés par technique sensible (Single Antigen Luminex) pour prédire le résultat du cross match cellulaire prospectif et donc la présence de DSA
- Objectif: S'affranchir du délai de réalisation du XM cellulaire (4-5h) et limiter ainsi la durée d'ischémie froide



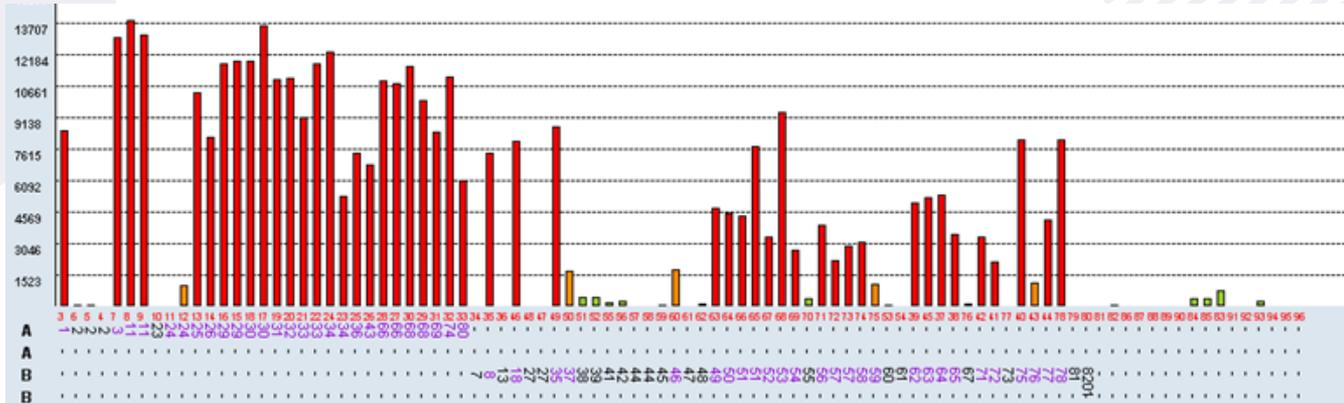
CROSS MATCH VIRTUEL - PRÉ GREFFE

- **Définition:** Utiliser les résultats des anticorps identifiés par technique sensible (Single Antigen Luminex) pour prédire le résultat du cross match cellulaire prospectif et donc la présence de DSA
- **Objectif:** S'affranchir du délai de réalisation du XM cellulaire (4-5h) et limiter ainsi la durée d'ischémie froide

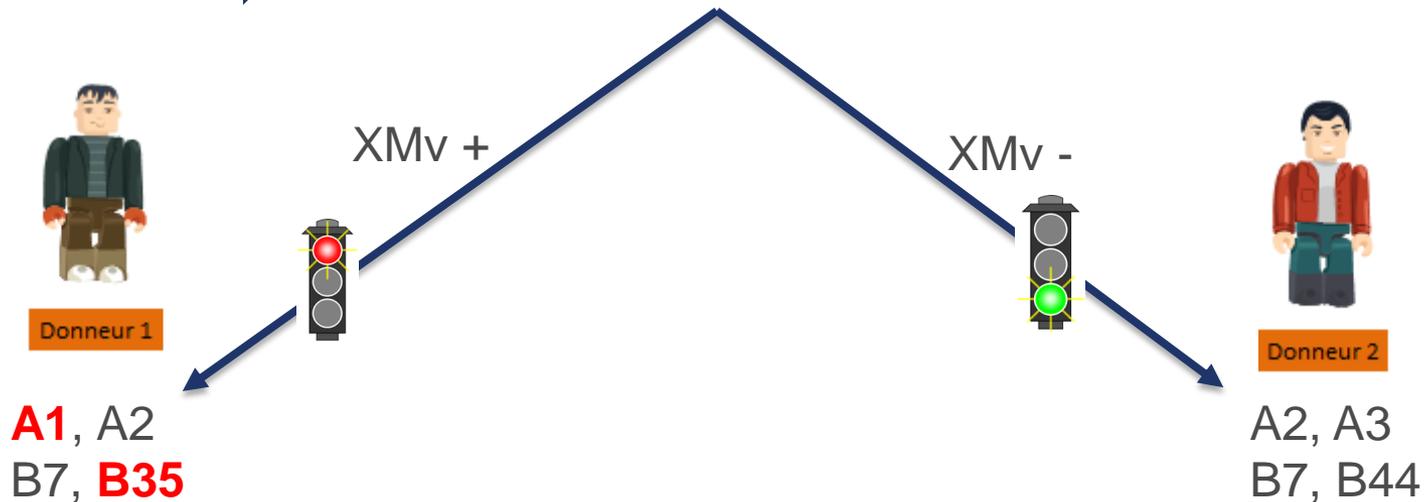


CROSS MATCH VIRTUEL – EN PRATIQUE

Identification des Ac du patients par Single Antigen et suivi régulier de son immunisation



➔ Détermination des Ag interdits: Anti A1, A11, B35



LES LIMITES ET RISQUES DU CROSS MATCH VIRTUEL

VPP / Sensibilité



Faux négatifs

Suivi immuno d'un évènement immunisant incomplet ou non connu

Absence de typage des loci correspondant aux Ac identifiés chez le patient (ex: C, DQA1, DPB1..)

Limites techniques du Luminex Single Antigen: effet prozone...

Présence d'Ac dirigés contre des Ag non présents sur les billes du kit (allèles rares..)

Erreur de typage du donneur

Plusieurs DSA avec MFI < seuil

LES LIMITES ET RISQUES DU CROSS MATCH VIRTUEL

VPP / Sensibilité



VPN / Spécificité



Faux négatifs	Faux positifs
Suivi immuno d'un évènement immunisant incomplet ou non connu	Expression +/- importante des Ag HLA intra et inter individus
Absence de typage des loci correspondant aux Ac identifiés chez le patient (ex: C, DQA1, DPB1..)	Seuil de positivité du test Single Antigen (XMc moins sensible que l'HD)
Limites techniques du Luminex Single Antigen: effet prozone...	Limites techniques du Luminex Single Antigen: interférence avec Ivlg, Ag dénaturés..;
Présence d'Ac dirigés contre des Ag non présents sur les billes du kit (allèles rares..)	Identification par excès de certains Ac (anti DQ)
Erreur de typage du donneur	Erreur de typage du donneur
Plusieurs DSA avec MFI < seuil	

LES LIMITES DU XM CELLULAIRE (LCT ET CMF)

Faux négatifs	Faux positifs
Problème technique	Présence d'anticorps non HLA
	Présence d'auto anticorps
Sensibilité de la technique (LCT > CMF)	Seuil de la technique (CMF)
	Interférences médicamenteuses

*Jani V, Human Immunology, 2017
Tambur, AJT, 2009*

QUELQUES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations

Patrizia Amico,¹ Patricia Hirt-Minkowski,¹ Gideon Hönger,¹ Lorenz Gürke,² Michael Jürg Steiger,¹ Helmut Hopfer³ and Stefan Schaub¹

Transplant International © 2011 European Society for Organ Transplantation

Perception Versus Reality?: Virtual Crossmatch—How to Overcome Some of the Technical and Logistic Limitations

Diagnostic accuracy of some of crossmatch strength

Thomas M. Ellis^{a,*}, Jennifer J. Schiller^a, Allan M. Christopher P. Johnson^b

Human Immunology 73 (2012)

Root cause analysis of limitations of virtual crossmatch for kidney allocation to highly-sensitized patients

Vivek Jani^a, Elizabeth Ingulli^b, Kristen Mekeel^c, Gerald P. Morris^{a,*}

Human Immunology 78 (2017) 72-79

Am J Transplant. 2009

Renal Transplantation With Final Allocation on the Virtual Crossmatch

C. P. Johnson^{1,*}, J. J. Schiller², Y. R. Zhu¹, S. Hariharan^{3,†}, A. M. Roza¹, D. C. Cronin¹, B. D. Shames^{1,†} and T. M. Ellis^{2,‡}

American Journ

Implementation of a National Priority Allocation System for Hypersensitized Patients in Spain, Based on Virtual Crossmatch: Initial Results

M.O. Valentin^{a,c,*}, J.C. Ruiz^{b,c}, R. Vega^{a,c}, C. Martín^{a,c}, and R. Matesanz^a, on behalf of the working group PATHI

Transplantation Proceedings, 48, 2871-2875 (2016)

QUELQUES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

- Performance du XMv
 - Comparaison XMv vs XMc (XM LCT et XM CMF)

Méta analyse (2006-2017 → Disparités importantes!!)

- ✓ 2780 XMv vs XM CMF
- ✓ 589 XMv vs XM LCT

XMv vs XM CMF:

Sensibilité = 63 à 100%
Spécificité = 79 à 100%
VPP = 76 à 100%
VPN = 91 à 100%

XMv vs XM LCT:

Sensibilité = 94 à 100%
Spécificité = 74 à 100%

- Performance du XMv

- Comparaison XMv vs XMc dans les laboratoires HLA d'Angers et Nantes

Sur un an:

- Angers: 40 XMv / 29 XM LCT et 3 XM CMF
- Nantes: 141 XMv / 88 XM LCT dont 3 illisibles

	XMc pos	XMc neg
XMv pos	3	12
XMv neg	0	104



XMv vs XM LCT:

Spécificité = 90%

VPN = 100%

6 cas de TX Rénale (+/-) pancréas à Nantes

- 1 cas de rejet à J+1 (non immuno ?)
- 1 décès à 3 mois d'une infection mais greffon fonctionnel
- 4 patients sans signes de rejet à M3

- **Analyse des discordances**
12 cas de XMv pos mais XM LCT neg

- **FN du XM LCT par manque de sensibilité**

- (1): DSA DR1 à 7000 MFI
- (2): DSA DR7 à 2100 MFI
- (3): DSA DP1 à 4255 MFI + DR53 à 22190 MFI
- (4): DSA B44 à 2428 MFI (rem B44 C1q neg)
- (5): DSA DR4 à 5078 MFI
- (6): DSA DP4 à 4000 MFI
- (7): DSA DP4 à 2257 MFI en 2011 et 1822 MFI en 2016

- **FP du XMv:**

- Par typage non suffisamment résolutif du greffon**

- (1): DSA DR4 à 2263 MFI (immunisation allélique DRB1*04:04 et donneur typé DR4)
- (2): DSA DR4 à 2600 MFI (immunisation allélique DRB1*04:04 et donneur typé DR4)

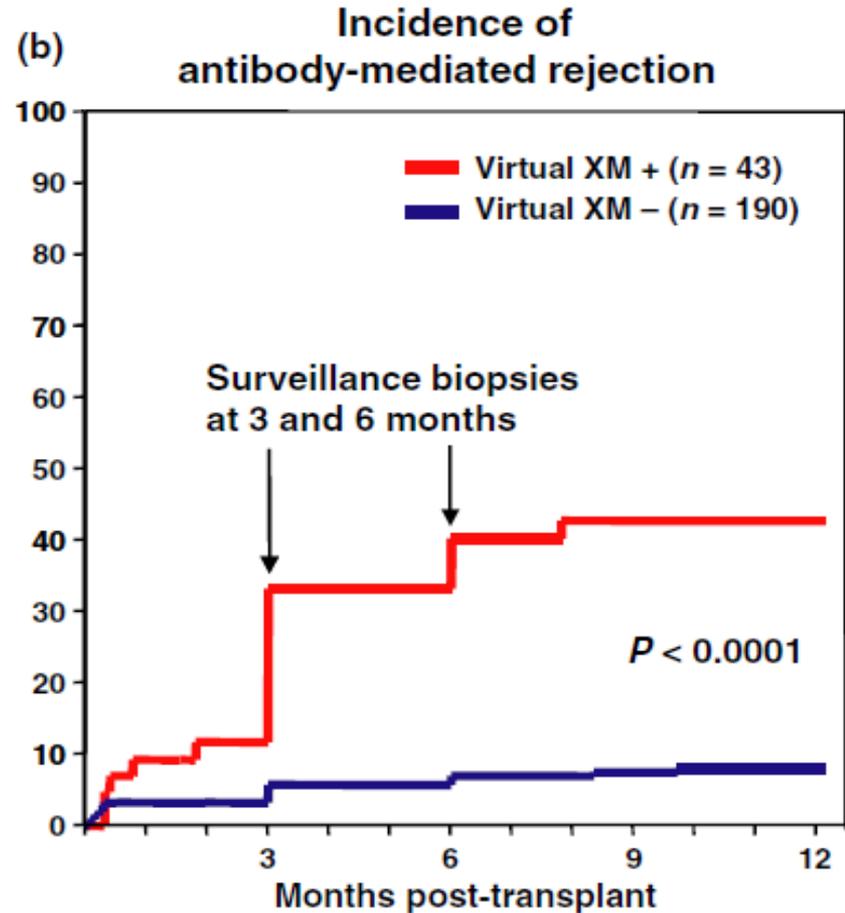
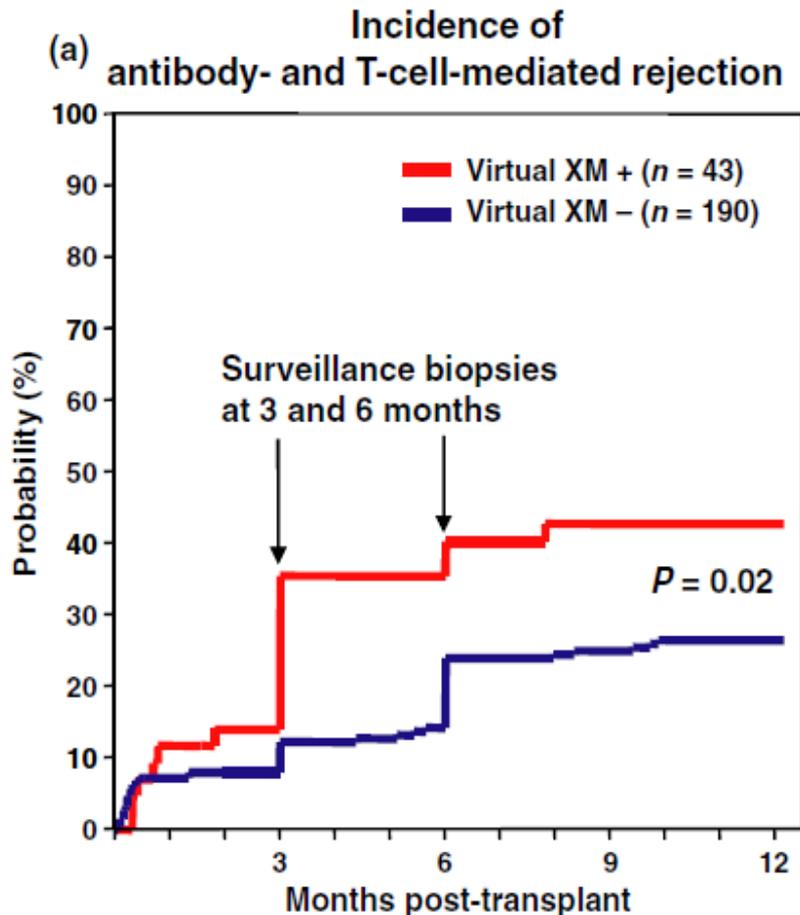
- Par présence de DSA historique**

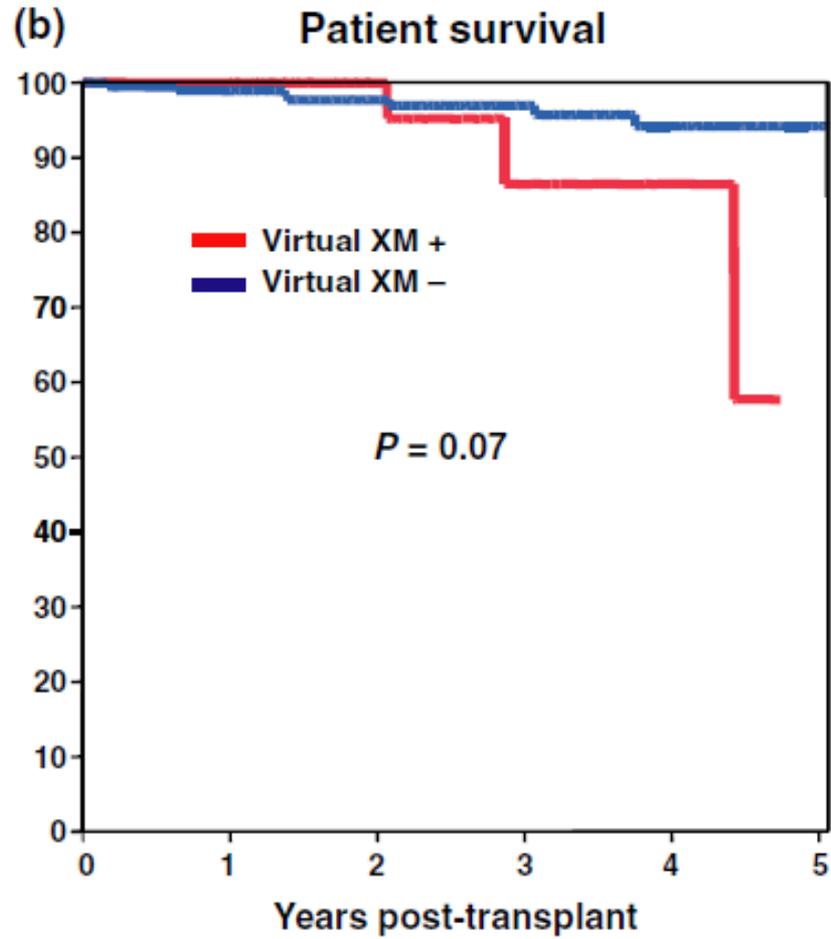
- (3) DSA DQ9 à 2538 MFI (positif uniquement sur le sérum du 03/08/1989)
- (4) DSA DP13 à 2400 MFI (positif uniquement sur le sérum du 31/07/2000)
- (5) DSA A32 à 19772 MFI 1985 (sérum non testé en XM_c) et inférieure à 3000 depuis 1987

QUELQUES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

- Intérêt clinique du XMv
 - Comparaison **AMR/Survie** des transplantations réalisées sans XMv mais XMc neg vs XMv neg sans XMc
 - En transplantation cardiaque:
 - ✓ 78 patients greffés avec XMc neg vs 90 patients greffés avec XMv Neg
 - **Pas de différence sur le nombre de rejet cellulaire, d'AMR ni sur la survie du greffon**
 - Yanagida R, Ann Thorac Surg, 2011*

- 233 greffes rénales → 190 avec XMv neg et 43 avec XMv pos (induction avec traitement classique + ATG+ IvIG)
 Pour ces 43 cas, le XM cellulaire était négatif
 Rem: typage HLA C et DP des donneurs non pris en compte

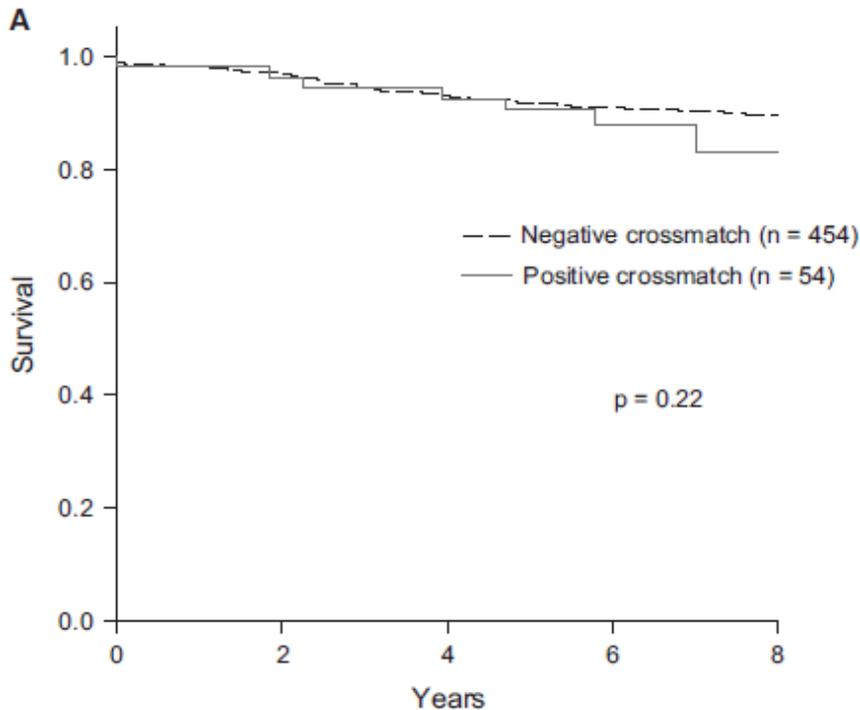




A noter: Pas de différence sur Créatinine post transplant ni sur la protéinurie

- 508 transplantations rénales avec XMv neg
→ Comparaison des greffes avec XM CMF Neg (454) vs XM CMF pos (54)

Résultats: Pas de différence significative sur les rejets, les AMR, la survie du greffon



XMv ok sans XMc



118 patients immunisés greffés dont 34 avec XMc pos (29%; VPN =72%)
→ plus d'AMR à 1 an et de rejet à 5 ans dans le groupe avec XMc pos

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL PRE GREFFE DANS LA RÉGION ZIPR6

- **6 centres:**

- Angers → 
- Brest → 
- Nantes →    
- Poitiers → 
- Tours →  
- Rennes →  

- XM virtuels réalisés (et formalisés) dans les laboratoires HLA depuis au moins **2 ans**
- XM cellulaire réalisé par **LCT** par tous les labo et XM CMF en don vivant

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL DANS LA RÉGION ZIPR6

- Critères d'éligibilité au XM virtuel
- **Au moins 2 sérums testés** pour la recherche des anti HLA: 100% des labos
- Délai maximum entre la dernière recherche d'anti HLA et la demande de XMv
 - **Patients immunisés: 6 mois** (A, B, N,P, T), **3 mois** pour R et T (patients H3)
 - **Patients non immunisés: 6 mois** pour tous les centres
- Single Antigen non obligatoire pour les patients non immunisés pour tous les centres

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL DANS LA RÉGION ZIPR6

- Interprétation du XMv

- Prise en compte de **tous les sérums** et donc des DSA historiques: 100% des labos
- Seuil de positivité du test Single Antigen pour le XMv:
 - **2000 MFI** pour A, B, N, P (H3), T
 - **1500 MFI** pour P
 - **500 - 2000 MFI** pour R (discussion au cas par cas)

Rem: Seuil identique pour tous les locus

Capacité des Ac à fixer le complément non pris en compte

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL DANS LA RÉGION ZIPR6

- Nombre, résultats et performance des XMv du 31/10/16 au 31/10/17

	Nombre total	Nbre XMv +	Nbre XMv -	Nbre XMv ind ou NR	% concordance avec XMc	% discordance avec XMc
Angers	40	4	33	3	93 (27/29)	7 (2/29)
Brest	15	1	14	0	100	0
Nantes	141	49	89	3	92 (65/71)	8 (6/71)
Poitiers	44				100% XMV - / XMc -	
Tours	Pas de possibilité d'estimation du nombre de XMv mais en TX rénale: → XMv pour tous les patients immunisés					
Rennes	8	7	1	0	100	0

- 1 cas avec 1 seul sérum
- 1 cas avec typage incomplet du D
- 4 cas avec dernier HD > 6 mois

XMv + / XMc -

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL DANS LA RÉGION ZIPR6

- Pourcentage de cas où la transplantation a eu lieu sans attendre le résultat du XM cellulaire:
 - Rein:
 - Angers: 35%
 - Brest: 41%
 - Nantes: 50%
 - Poitiers: 49%
 - Tours: <5% sauf M3
 - Rennes: 5%
 - Rein/Pancréas:
 - Nantes: 100%
 - Cœur / Poumon :
 - Nantes et Rennes:100% pour les patients immunisés

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL DANS LA RÉGION ZIPR6

- Temps estimé gagné en moyenne par le XMv:
 - Rein:
 - Angers: 12h
 - Brest: 12h
 - Nantes: 3 à 6h
 - Poitiers: 0 à 12h
 - Tours: ø (attente systématique des résultats du XM LCT)
 - Rennes: 3h
 - Rein/Pancréas:
 - Nantes: 4h
 - Cœur:
 - Nantes: 4h
 - Rennes: 3h

SYNTHÈSE DES PRATIQUES DU XM VIRTUEL DANS LA RÉGION ZIPR6

- Raisons principales pour lesquelles les XMv sont demandés:
 - **Demande de l'ABM pour les hyper immunisés (N, R)**
 - **Pour améliorer l'organisation des blocs (B)**
 - **Pour diminuer l'ischémie froide (A, P, T)**

CONCLUSIONS (1)

- Cristal réalise un XMv partiel pour l'allocation des organes (reins)
→ Limite: Ne tient pas compte du locus C, du DQA, du DP et des anticorps anti allèles
- **Excellente valeur prédictive négative du XMv** réalisé sur le base des résultats du Single Antigen Luminex®
Greffes avec XMv négatif sont associées à un risque faible d'AMR et de rejet
- **Valeur prédictive positive et spécificité plus faible**
→ Un XMv positif ne doit pas être systématiquement une CI absolue à la transplantation

 **Collaboration cliniciens/biologistes +++**



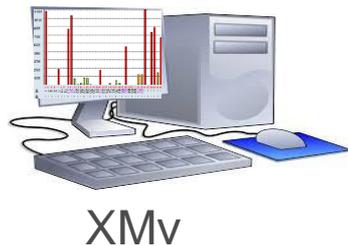
- Risque immunologique à mesurer en fonction des patients (H3, 2nd greffe..)
- Résultat d'HD à discuter: DSA anti C, Anti DP, DSA historique, valeur de la MFI, capacité à fixer le complément...

CONCLUSIONS (2)

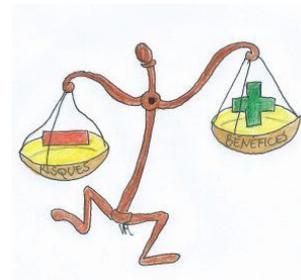
Le XMv est une avancée majeure en transplantation d'organe via le fait qu'il permet notamment **de diminuer l'ischémie froide**

La question n'est pas seulement de décider si un XMv est possible ou non

➔ Le plus important est de savoir apprécier au mieux **le bénéfice pour le patient** si on omet le XM cellulaire prospectif en se basant sur les résultats du XMv en ayant bien conscience de **ses avantages et de ses limites**



=



→ Définir **un risque immunologique acceptable** pour le patient

REMERCIEMENTS

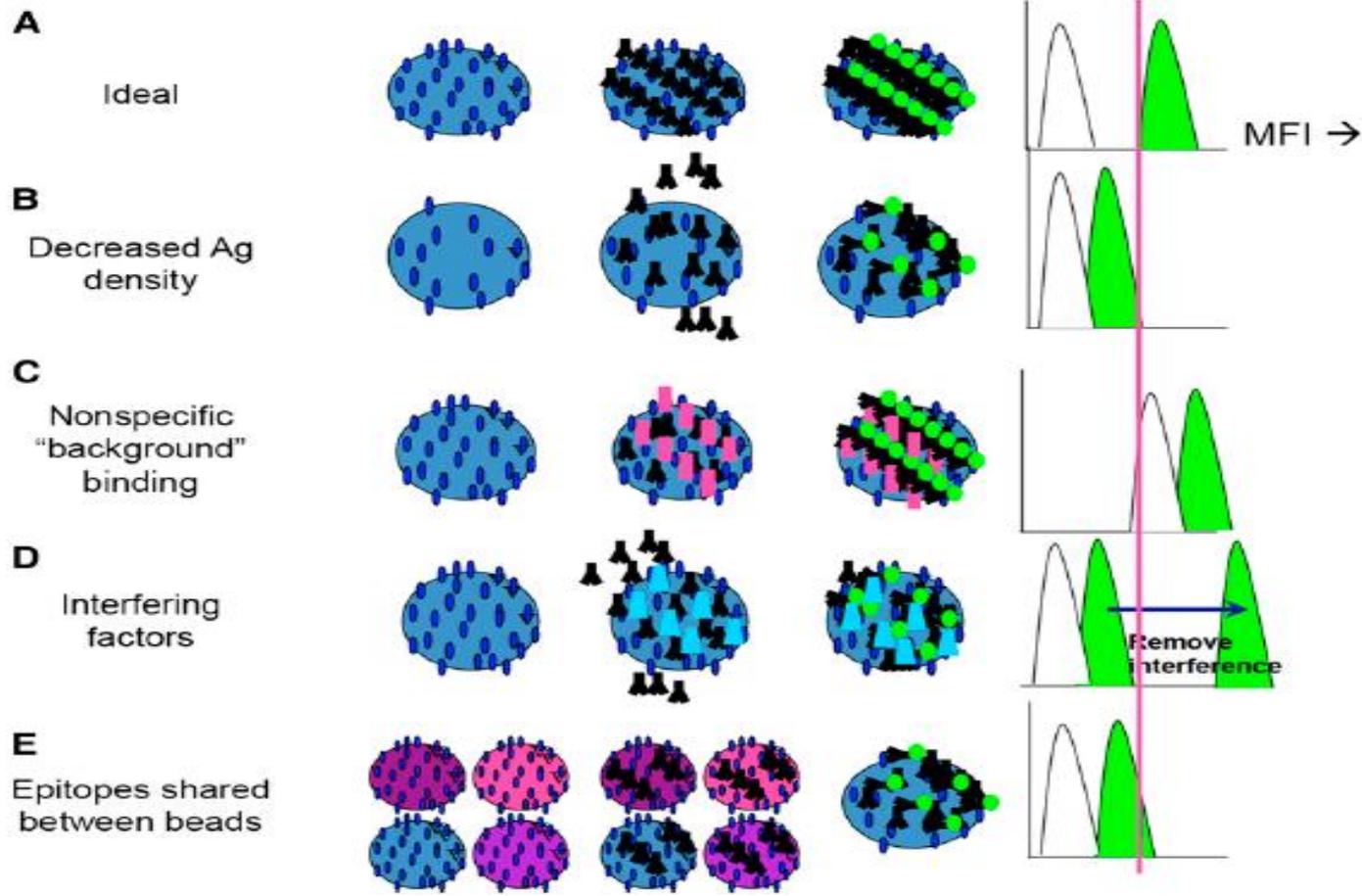
- ❖ Les biologistes des laboratoires HLA
Dr Anne Devys (Angers)
Dr Virginie Moalic et Dr Bernard Mercier (Brest)
Dr Isabelle Jollet et Caroline Bouille (Poitiers)
Dr Barbara Proust (Tours)
Dr Virginie Renac, Dr Mathilde Cherel, Dr Gérald Bertrand (Rennes)
Dr Anne Cesbron Gautier et Alexandre Walencik (Nantes)

- ❖ Les cliniciens des CHU
Dr Johnny Sayegh (Angers)
Pr Yann Lemeur (Brest)
Dr Claire Garandeau (Nantes)
Pr Antoine Thierry (Poitiers)
Dr Marie Pascale Morin (Rennes)
Pr Matthias Büchler (Tours)

MERCI POUR VOTRE ATTENTION



LIMITES DU TEST SA-IgG



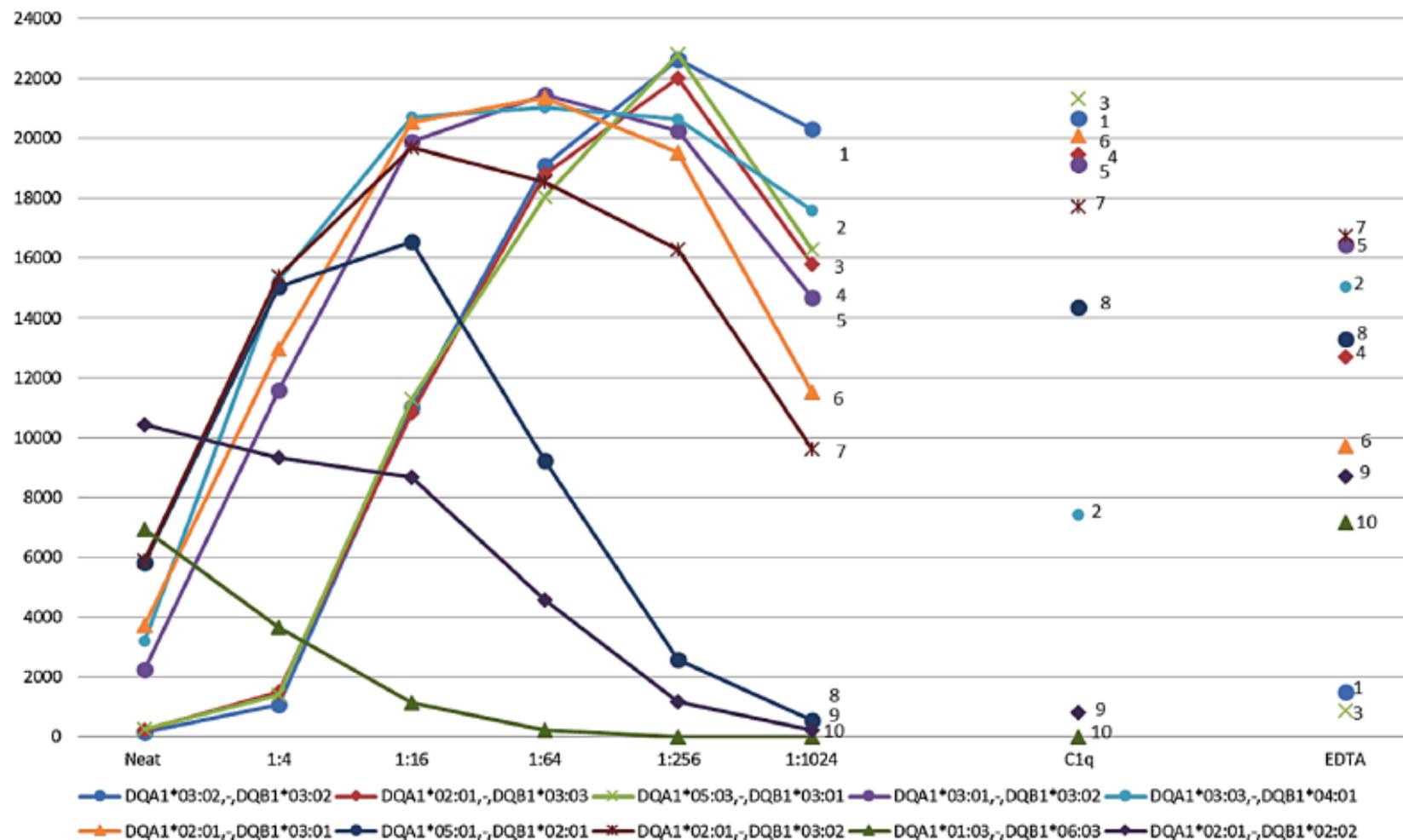
Konvalinka, JASN 2015

Limites du test SA:



La MFI ne reflète pas la concentration des anticorps

Determining Antibody Strength



III. Cross match HLA :examen d'urgence

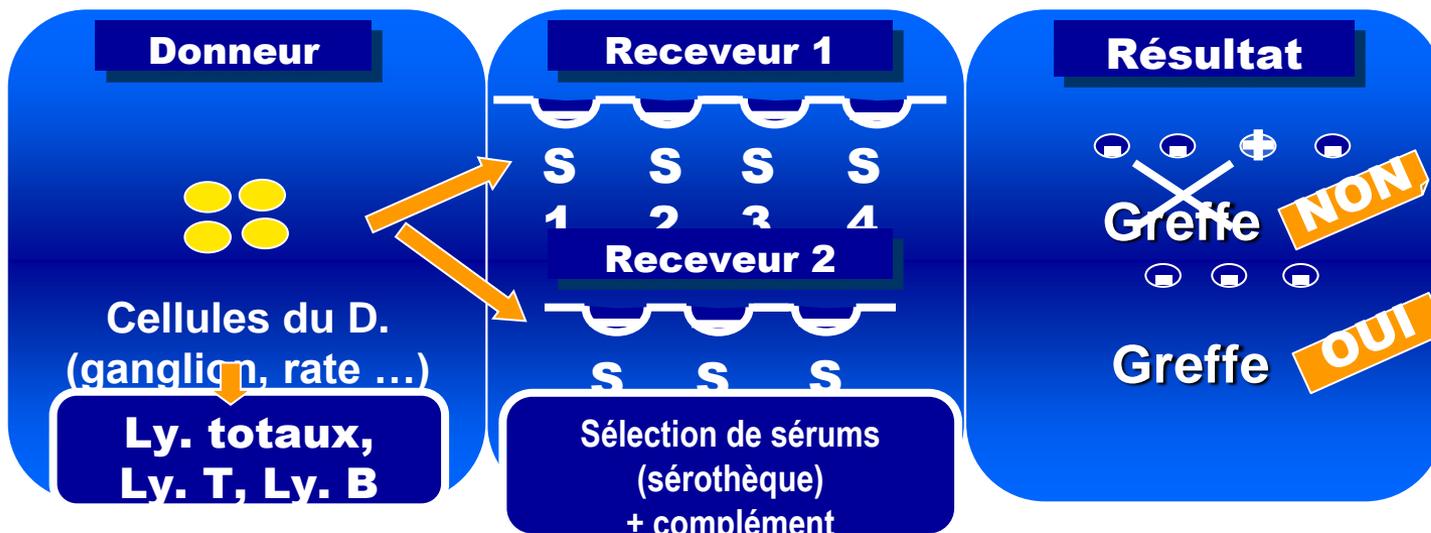


Mise en présence des cellules du greffon + sérums du receveur

Cross-match pré-greffe : épreuve ultime de compatibilité

Cross-match post-greffe : aide au diagnostic de rejet

- Technique de référence : **LCT**



- Technique sensible : **CMF**

- **Cross math virtuel** → via les résultats du Single Antigen

Tambur 2009 : concordance positive avec XM virtuel 95% et concordance négative 91%

Protocole d'éligibilité à la réalisation du XMv défini en partenariat avec les cliniciens

- Nombre minimum de recherche d'anticorps anti-HLA chez le receveur
- Délai maximum entre le dernier test SA et le XMv (patient immunisé / patient non immunisé)
- Suivi immuno post événement immunisant
- Typage HLA du donneur (DP obligatoire??)



Protocole pour définir un XMv positif

- Seuil de positivité du test Single Antigen (\neq organes, \neq locus..)
- Historique des sérums pris en compte pour l'interprétation du XMv

QUELQUES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE

- VPN du XMVv: 91,3% (57 transplantations rénales, patients hyper immunisés

Mazuecos A, Transplantation proceedings, 2016

- En transplantation cardiaque:

- ✓ 78 patients greffés av XMC neg vs 90 patients greffés avec XMv Neg → Pas de différence sur le nombre de rejet cellulaire, d'AMR et sur la survie du greffon

Yanagida R, Ann Thorac Surg, 2011

- ✓ Comparaison XMv vs XM CMF pour des patients en pédiatrie hyper immunisés

Groupe 1 (7 patients) XMv pos

Groupe 2 (7 patients) XMV neg

Résultats: VPP du XMv = 100%; VPN = 71,4% (2 cas XMv neg mais XM CMF pos); Sensibilité = 77,8% et Spécificité = 100%

Limite: Pas de Single Antigen pour tous les patients...

Zangwill SD, Pediatr Transplantation 2006

- 82 greffes rénales avec donneurs vivants.

Comparaison XMV vs XM CMF et XM LCT

- XMV VS XM CMF: Sensibilité = 90%, Spécificité = 100%
- XMv Vs XM LCT: Sensibilité= 94%, Spécificité = 84%

Elis TM, Human Immunology, 2012

- 507 XMv comparés avec les résultats des XMCMF et LCT

- XMv VS XM CMF: Sensibilité = 100%, Spécificité = 79%
- XMv Vs XM LCT: Sensibilité= 100%, Spécificité = 74%

Spécificité assez faible du à la présence de DSA DQA et DP n'induisant pas souvent de XM cellulaire positif

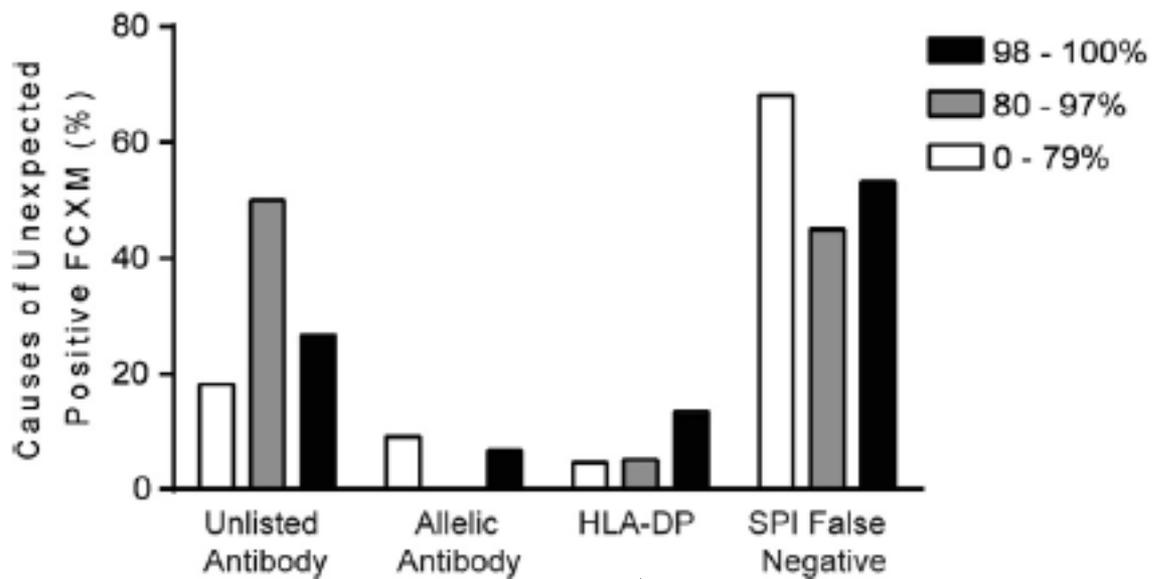
Piazza A, Transplantation proceedings, 2014

- 645 XM (greffes rénales)

Evaluation de la fiabilité du XMV vs XMC en CMF

Sensitivity 62.6%	Specificity 97.2%	
	PPV	NPV
Living donor	75.8%	97.5%
Deceased donor	77.6%	93.9%

79 cas de résultats faux négatifs du XMV



Erreur de saisi des Ac

Non pris en compte pour le XMV

Anti HLA non détectés par le kit standard

- Comparaison des résultats de 1480 XM CMF vs XMv

	Virtual/DSA	
	Positive	Negative
Actual/FCXM		
Positive	480	63
Negative	83	854

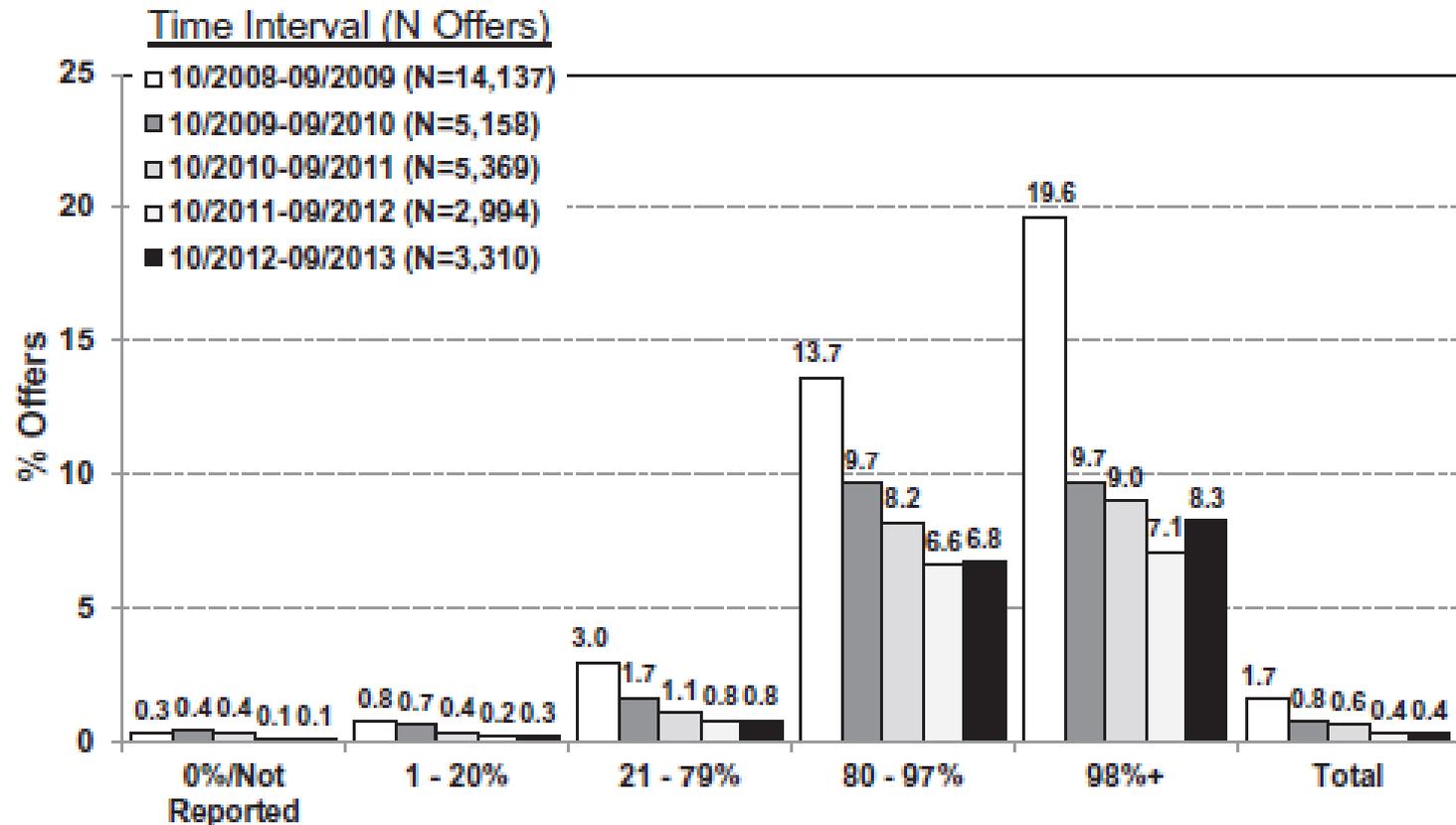
Sensitivity = 85.3%; specificity = 93.1%; positive predictive value = 88.4%; negative predictive value = 91.1%.

- FN du XMv:
 - 50 liés liés à des DSA Anti HLA C (typage HLA C du donneur non effectué)
 - 50% liés la présence d'auto Ac ou d'anticorps non HLA (FP du XM CMF)
- FP du XMv:
 - 91% liés à des DSA de titres faibles ou modérés
 - Anti hétérodimère DQ β /DQ α

CONCLUSIONS (2)

- Le XMV est une avancée majeure en transplantation d'organe via le fait qu'il permet notamment **de diminuer l'ischémie froide**
 - Cependant il a **des limites** à bien connaître et ne doit pas entraîner une CI systématique à la transplantation
 - Sa généralisation passera par:
 - **meilleure détermination des antigènes HLA du donneur** (résolution/locus..)
 - **meilleure identification des anti HLA pertinents par Single antigen** (C1q, dosage par dilution ou SPR, kits supplémentaires...)
- Importance de prendre en compte l'ensemble des DSA et non le DSA immunodominant

Proportion de cas XMV neg mais XMC positif en CMF



➔ Plus le receveur est immunise et plus le nombre de faux négatifs ↑

EVALUATION IMMUNOLOGIQUE DES RISQUES DE REJET HUMORAL EN PRÉGREFFE

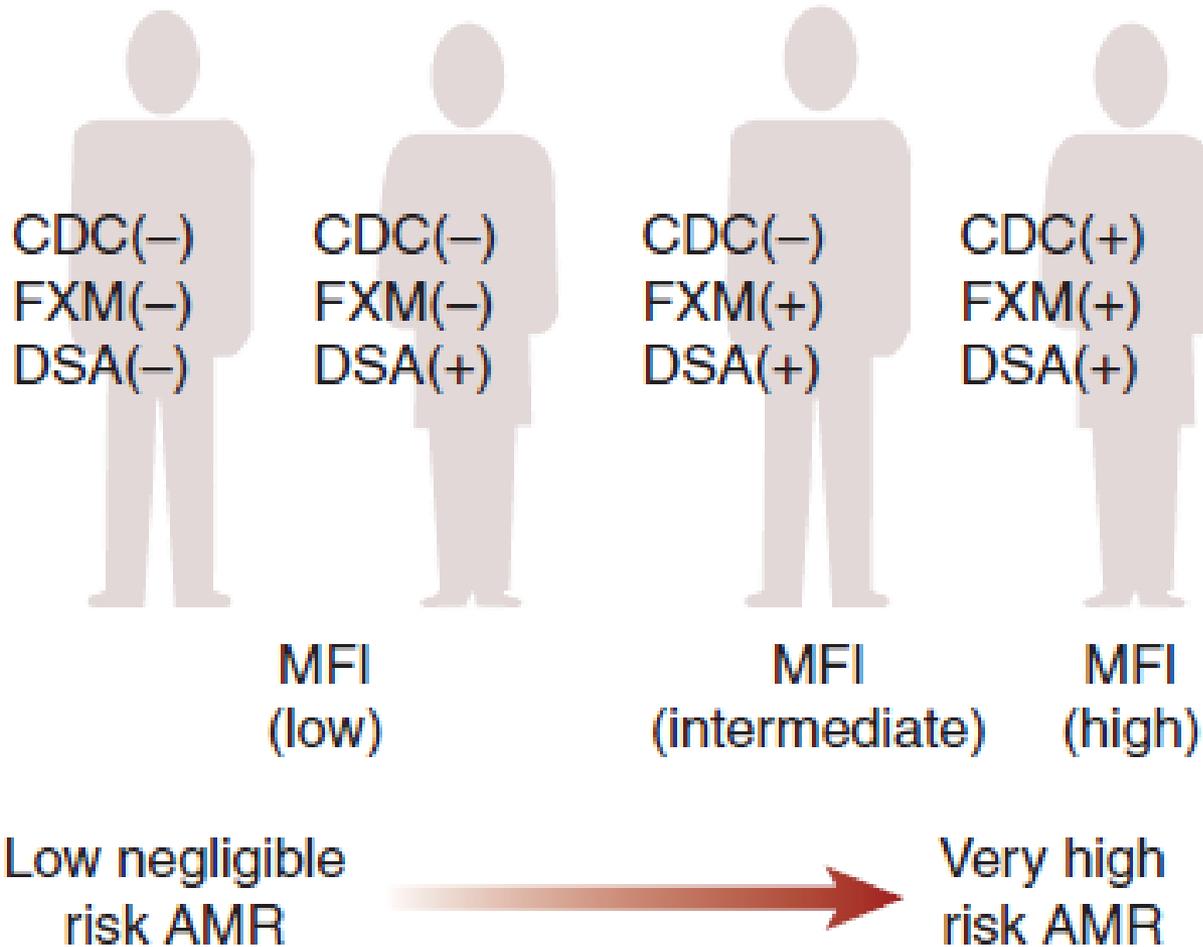


Figure 3. Caractéristiques d'un test

		Maladie +	Maladie -	Définition	
Résultat du test	+	vrai positif A	faux positif B	→	Valeur prédictive positive $A/(A+B)$ Proportion des patients ayant la maladie parmi ceux qui ont un test positif
	-	C faux négatif	D vrai négatif		→
Définition		↓	↓	Probabilité a priori (prévalence) $(A+C)/(A+B+C+D)$	
		Sensibilité $A/(A+C)$ Proportion de patients avec un test positif parmi les patients ayant la maladie	Spécificité $D/(B+D)$ Proportion de patients avec un test négatif parmi les patients n'ayant pas la maladie		