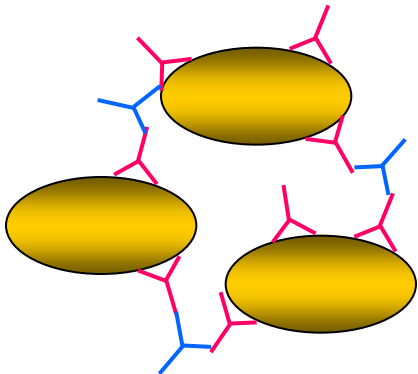


Refractariedad a las transfusiones de plaquetas

Carmen Canals

Laboratorio de Inmunohematología, BST,
Barcelona

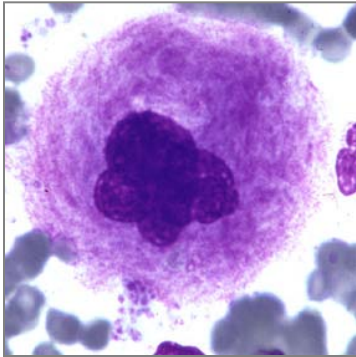


BANC DE SANG
I TEIXITS

- *Antígenos plaquetares*
- *Transfusión de plaquetas: producto transfundido*
- *Refractariedad a la transfusión de plaquetas*

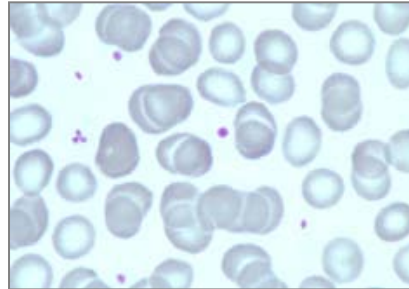
PLAQUETAS

MÉDULA
ÓSEA



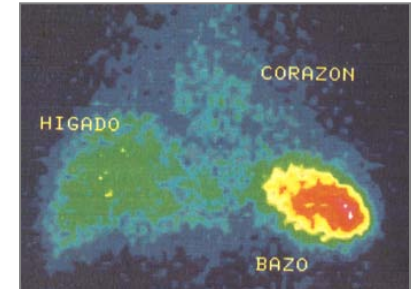
TROMBOCITOPOYESIS

SANGRE
PERIFÉRICA

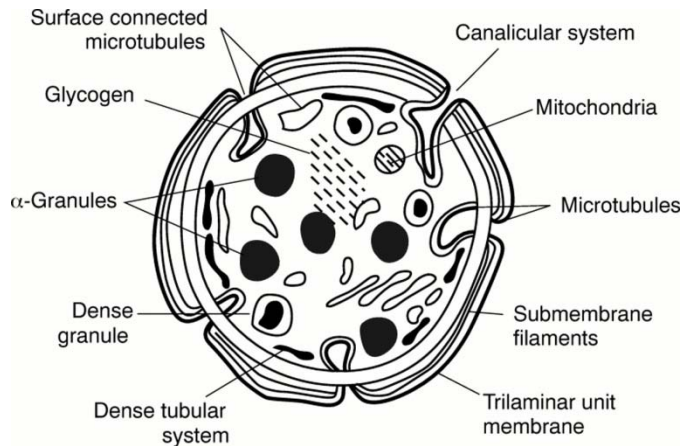


CIRCULACIÓN

BAZO

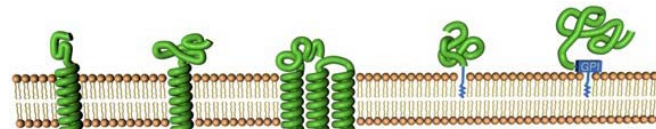


DESTRUCCIÓN

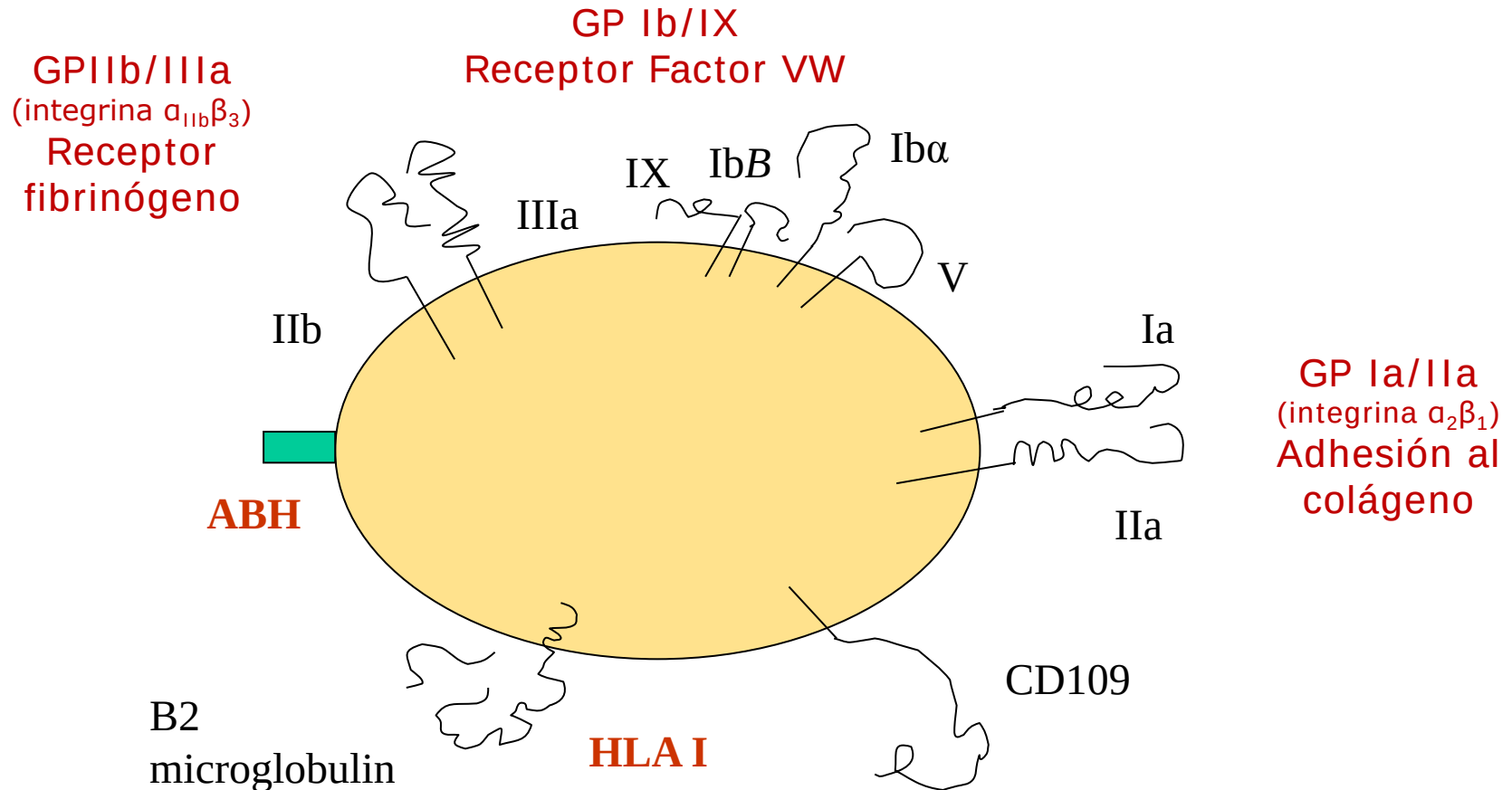


Glicoproteínas de membrana:

- estabilización membrana
- adhesión y agregación
- receptores
- transporte
- actividad enzimática



Complejos GP de la membrana plaquetar



Mutaciones puntuales en los genes que codifican estas GP → sustitución de AA -> alo-antígenos plaquetares (HPA)

Sistemas HPA bialélicos: frecuencias antigénicas en población caucásica

SISTEMA	Antígenos	Frecuencia	Glicoproteína	Cambio AA
HPA-1	HPA 1a HPA-1b	97.9% 28.8%	GPIIIa	Leucina ³³ Prolina ³³
HPA-2	HPA 2a HPA-2b	>99.9% 13.2%	GPIba	Treonina ¹⁴⁵ Metionina ¹⁴⁵
HPA-3	HPA 3a HPA-3b	80.9% 69.8%	GPIIb	Isoleucina ⁸⁴³ Leucina ⁸⁴³
HPA-4	HPA 4a HPA-4b	>99.9% <0.1%	GPIIIa	Arginina ¹⁴³ Glutamina ¹⁴³
HPA-5	HPA 5a HPA-5b	99.0% 19.7%	GPIa	Ac Glutámico ⁵⁰⁵ Lisina ⁵⁰⁵
HPA-15	HPA 15a HPA-15b	74% 81%	CD109	Serina ⁷⁰³ Tirosina ⁷⁰³

HPA-1a

...GCCTC**I**GGG...

HPA-1b

..GCCTC**C**GGG...

Leu $\Rightarrow$ Pro

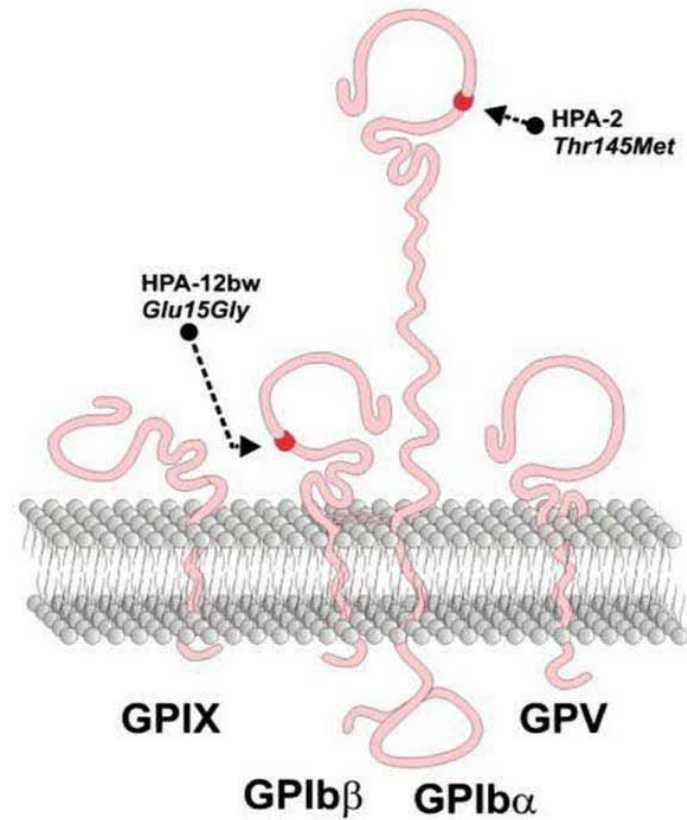
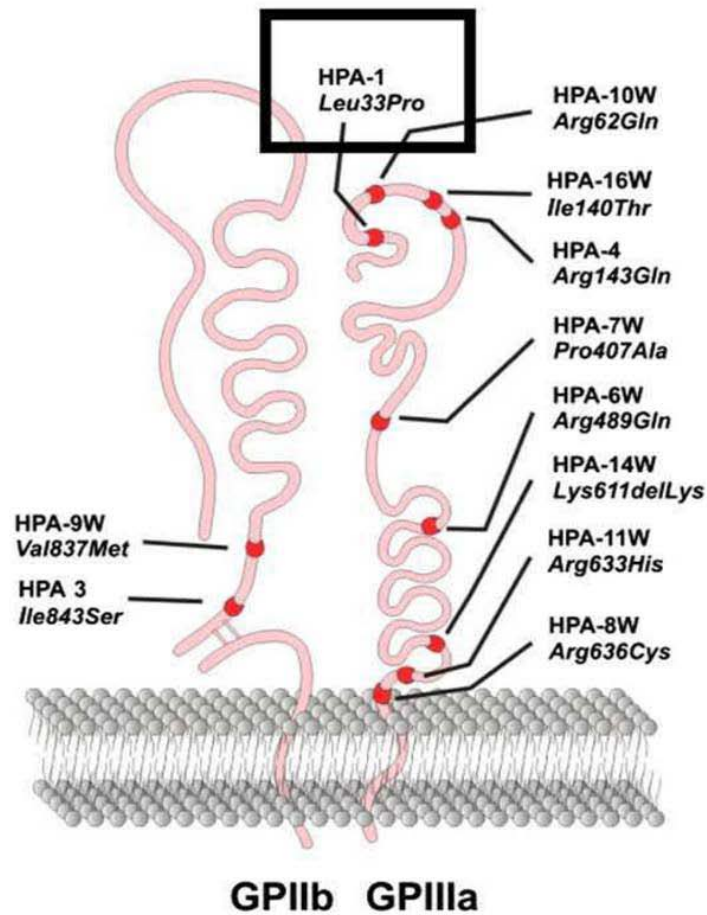


Fig 2. Schematic representation of the genetic mutations associated with HPAs, including HPA-1a (from Webert et al. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12th Edition, with permission).

Antígenos plaquetares



Antígenos Compartidos:

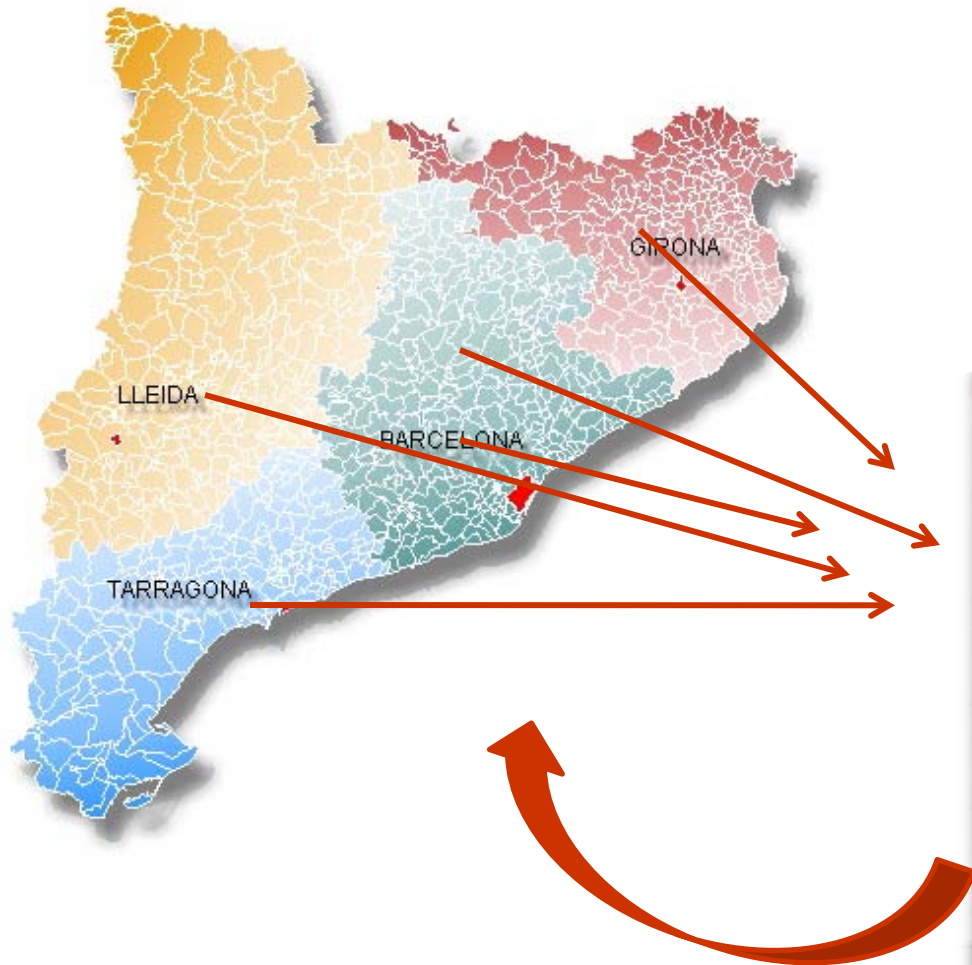
- *Hematíes*: ABO, Lewis, P, I
- *Leucocitos*: HLA clase I

Antígenos Específicos:

- Sistemas HPA

Human Platelet Antigens

- *Antígenos plaquetares*
- *Transfusión de plaquetas: producto transfundido*
- *Refractariedad a la transfusión de plaquetas*



Donación de sangre total

Bolsa ATREUS 3C



ST/CPD

SAG-M

Bolsas vacías



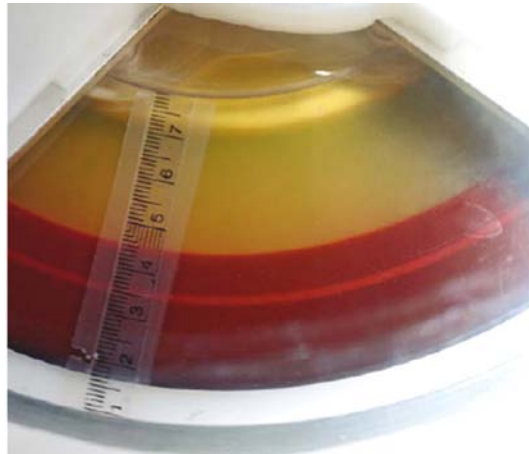
Bolsa principal 1 contiene 63 ml de anti-coagulante (CPD) para recoger 450 ml de sangre total.

Bolsa satélite 2, contiene 100 ml de solución conservadora (SAG-Manitol).

Bolsas satélites 3, 4 y 6, están vacías.

Bolsa satélite 5 es la que se utiliza para llenar los tubos piloto.

Centrifugación (Atreus 3C)



Preparación del pool de plaquetas

4 Unidades de Plaquetas



FILTRADO

Desleucotizar

>3,4 x10¹¹ plaq



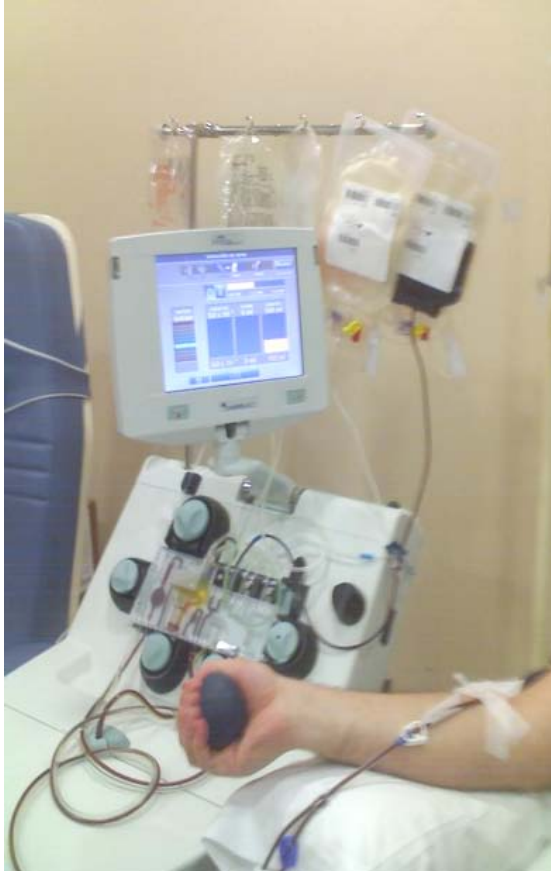
Pool de plaquetas

300 ml vol / 100 plasma

Pool pediátrico: 3 unidades

>2,5 x10¹¹ plaq

Obtención de aféresis de plaquetas



Donante único

Distintos separadores celulares

Proceso aprox. 60-90 minutos

Obtención de $3-4 \times 10^{11}$ plaquetas

Es posible obtener producto
“desplasmaticado”

Es posible fraccionar el producto

Conservación de las plaquetas

Plaquetas (pool / Af) se conservan a 20-24 ° C durante 5 días, en agitación



- *Antígenos plaquetares*
- *Transfusión de plaquetas: producto transfundido*
- *Refractariedad a la transfusión de plaquetas*

Definición

Causas

*Estudio en el laboratorio y
Actitud transfusional*

Experiencia del Laboratorio IH del BST de Cataluña

REFRACTARIEDAD

- Se dice que el paciente es refractario:

“cuando las transfusiones de plaquetas no producen el incremento esperado del recuento plaquetario”

- Refractariedad no es sinónimo de aloinmunización
- Puede producirse por:
 - Factores dependientes del paciente
 - *Inmunes*
 - *No inmunes*
 - Factores dependientes del producto transfundido

En los últimos años se ha observado:

- Una disminución de la aloinmunización (factores inmunes)
- Un aumento relativo de los factores no inmunes

Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients

Sherrill J. et al.

Blood. 2005;105: 4106-4114

Estudio TRAP (Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets)

More than 500 AML patients

Table 1. Platelet transfusion responses

	Pretransfusion platelet count/ μL ; n = 6237*	Posttransfusion platelet count $\times 10^9/\text{L}$		Platelet increment $\times 10^9/\text{L}$	
		1 h after transfusion; n = 6223*	18-24 h after transfusion; n = 5469*	1 h; n = 6209*	18 to 24 h; n = 5455*
Controls	21.8 $\pm$ 13.2	48.7 $\pm$ 21.6	34.5 $\pm$ 19.0	26.9 $\pm$ 17.1	12.5 $\pm$ 15.8
UVB-PCs	21.8 $\pm$ 12.5	45.6 $\pm$ 18.9	33.4 $\pm$ 17.1	23.8 $\pm$ 14.9	11.4 $\pm$ 14.2
F-PCs	21.1 $\pm$ 12.7	43.4 $\pm$ 18.8	31.6 $\pm$ 16.0	22.3 $\pm$ 15.4	10.7 $\pm$ 13.8
F-APs	20.7 $\pm$ 13.1	47.6 $\pm$ 24.6	34.5 $\pm$ 19.7	26.8 $\pm$ 19.9	13.4 $\pm$ 16.5
Total platelet response	21.4 $\pm$ 12.9	46.2 $\pm$ 21.1	33.5 $\pm$ 18.0	24.9 $\pm$ 17.0	12.0 $\pm$ 15.0

Data are given as average $\pm$ SD based on method used to prepare the platelets.

*Total platelet transfusions for which data were available.

Controls: pooled random donor platelet concentrates

F-PCs: filtered, pooled random donor platelet concentrates

UVB-PCs: ultraviolet B-irradiated, pooled random donor platelet concentrates

F-APs filtered, random donor apheresis platelets

Refractariedad plaquetar

- Sospecha de refractariedad a las transfusiones de plaquetas



Valoración del rendimiento transfusional:

Evidenciar un incremento insuficiente tras 2 transfusiones sucesivas de plaquetas de <72 horas y ABO compatibles

Criterios aceptados de Refractariedad:

	1hora post-transfusión
<i>PR (% de recuperación)</i>	<i>< 20%</i>
<i>CCI (incremento corregido)</i>	<i>< 5.000-10.000/μl (Tinmouth, 2006)</i> <i>< 5.000/μl (TRAP, Slichter, 1997)</i>

Valoración del rendimiento

Incremento corregido (*corrected count increment*)

$$CCI = \frac{\text{Superf. Corporal (m}^2\text{)} \times \text{Incremento observado (pqs/}\mu\text{l)} \times 10^{11}}{\text{N}^{\circ} \text{ de pqs transfundidas (10}^{11}\text{)}}$$

Porcentaje de recuperación plaquetar

$$PPR = 100 \times \frac{\text{Volemia (ml)} \times 1000 \times \text{Incremento observado (pqs/}\mu\text{l)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de pqs transfundidas (10}^{11}\text{)} \times 0,62}$$

(0,62 = fracción de pqs circulantes; 1/3 secuestradas en el bazo)

Volemia: 7% del peso corporal en gr

Ejemplo: valoración del rendimiento

Paciente adulto: - peso 60 Kg
 - talla 175 cm
 - superficie corporal: 1,7 m²

Recuento pre-transfusional: 10.000 plaq/μl

Recuento 1h post-transfusión: 15.000 plaq/μl

$$CCI = \frac{1,7 \times 5.000 \times 10^{11}}{4 \times 10^{11}}$$

$$CCI = \frac{8.500}{4} = 2.100$$

CCI a 1 hora < 5.000/μl

$$CCI = \frac{\text{Superf. Corporal (m}^2\text{)} \times \text{Incremento observado (pqs/}\mu\text{l)} \times 10^{11}}{\text{N}^{\circ} \text{ de pqs transfundidas (10}^{11}\text{)}}$$

Ejemplo: valoración del rendimiento

Paciente adulto: - peso 60 Kg
 - talla 175 cm
 - volemia: 4.200 ml

Recuento pre-transfusional: 10.000 plaq/ μ l

Recuento 1h post-transfusión: 15.000 plaq/ μ l

$$\text{PPR} = 100 \times \frac{4.200 \times 1000 \times 5.000}{4 \times 10^{11} \times 0,62}$$

$$\text{PPR} = \frac{4,2 \times 10^{11} \times 5}{2,48 \times 10^{11}} = 8,5\%$$

PPR a 1 hora < 20%

$$\text{PPR} = 100\% \times \frac{\text{Volemia (ml)} \times 1000 \times \text{Incremento observado (pqs}/\mu\text{l)}}{\text{N}^\circ \text{ de pqs transfundidas } (10^{11}) \times 0,62}$$

Platelet transfusion refractoriness

Eldad Hod and Joseph Schwartz

Columbia University Medical Center – New York Presbyterian Hospital

British Journal of Haematology 2008: 142, 348–360

- **CCI**: although generally accepted is not practical because it **requires a platelet count of the infused product**, which is not routinely available
- **One-hour post-transfusion counts are difficult to obtain.** A comparison of the 1-h and 20-h CCI as a predictor of refractoriness shows a reasonably good correlation, with the **20-h CCI** roughly **65% of the 1-h CCI**
- Using an estimate of platelet content (ex 4×10^{11}), and assuming an average adult body surface area of 2 m^2 , an **Absolute Platelet Count Increment** of less than $10,000/\mu\text{l}$ is suspect for refractoriness.

- *Sospecha de refractariedad
a las transfusiones de plaquetas*



ABO

*Transfundir plaquetas ABO compatibles, de < 72 horas
(Revisar dosis administrada / peso – talla paciente)*

- Evidenciar, en 2 ocasiones consecutivas, un **Incremento Absoluto** de < 10.000 plaquetas/ μ l 1 hora post-transfusión o
- Evidenciar, en 2 ocasiones consecutivas, un **Incremento Absoluto** de < 5.000 plaquetas/ μ l hemograma día siguiente

Causas de refractariedad

Factores dependientes del paciente

INMUNES

Aloanticuerpos:

- HLA
- HPA

Autoanticuerpos

No INMUNES

Factores clínicos

Factores de “consumo”

Factores dependientes del componente

- Edad de las plaquetas (lesión de almacenamiento)
- N° de plaquetas transfundidas
- Compatibilidad ABO

Refractariedad Inmune: Acs anti-HLA

Efecto de la leucorreducción en la incidencia de aloinmunización

Estudios en pacientes con LMA	PRE Leucorreducción	POST Leucorreducción
Murphy et al, 1986	48%	16%
Sniecinsky et al, 1988	50%	15%
Slichter, 1997. (TRAP)	45%	17%-21%

TRAP: The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions.

N Engl J Med. 1997;337:1861-1869.

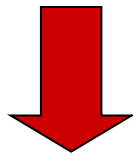
La aloinmunización no siempre implica refractariedad

- Hasta un 50% de pacientes portadores de Acs HLA no muestran signos de refractariedad.

Brand et al, 1988; Legler et al, 1997; Slichter, 1997

- No existe una relación directa entre la cantidad de plaquetas transfundidas (dosis) y la incidencia de aloinmunización (respuesta).

Schiffer et al, 1976; Dutcher et al, 1981



Otros factores van a determinar qué pacientes aloinmunizados van a ser refractarios

Refractariedad Inmune: Acs anti-HPA

- Papel más limitado
- En la década de los 80: 2%-20%
 - incidencia sobrestimada
 - no siempre Acs específicos
 - algunos son autoanticuerpos (panreactivos)
- En estudios más recientes: 2-11%
 - generalmente combinados con HLA
 - anti HPA-1b y anti HPA-5b son los más comunes
 - anti-HPA-15b y anti-HPA-15a: 4%

Isohemagglutininas ABO

- **Incompatibilidad mayor** (Ex: Receptor O/Donante A)
 - ↓ 20% con isohemagglutininas IgG > 64 en el receptor
 - Refratariedad precoz
- **Incompatibilidad menor** (Ex: Receptor A/Donante 0)
 - Hemólisis grave con isohemagglutininas > 128 en el donante
 - Complejos Inmunes
 - Fijación a las plaquetas (Receptores Fc) → Eliminación SMF

ABO and platelet transfusion therapy. L. Cooling 2007 Immunohematology vol 23 (1)

Platelet transfusion refractoriness responding preferentially to single donor aphaeresis
Platelets compatible for both ABO and HLA. M McVey & CM Cserti-Gazdewich. Transf Med, 2010

Refractariedad no inmune

Los factores no inmunes, clínicos o de consumo, se han estudiado en pacientes con LMA o Trasplante de progenitores hematopoyéticos, identificándose como más relevantes:

- Sepsis
- Fiebre
- Esplenomegalia
- CID
- Hemorragia
- Enfermedad venoclusiva
- Enfermedad de injerto contra huésped
- Fármacos

Actuación del clínico ante una refractariedad

- Valoración del paciente y de los posible factores no inmunes
- Riesgo de alo-inmunización (mujer, paciente politransfundido)
- Comentar el caso con el Servicio de Transfusiones
- Valorar la indicación de solicitar un estudio de refractariedad plaquetar al Laboratorio de IH:



Investigación de causas inmunes

Actuación del laboratorio de IH

- Investigación de Acs anti-HLA de clase I
 - Investigación de Ac anti-HPA
- Si se identifican Acs justificantes de la refractariedad:
- Información clínica: **continúa precisando transfusiones ?**
- ↓
- Búsqueda de donantes compatibles (prueba cruzada/HLA/HPA)



Objetivo: Mejorar el Rendimiento Transfusional

Búsqueda de donantes compatibles

Plaquetas procedentes de un sólo donante (aféresis):

1. Con Prueba cruzada negativa (“Cross-matching”)
2. Con fenotipo HLA igual o parecido al receptor (“HLA matching”).
3. Carentes del antígeno/s HLA / HPA contra los que va dirigido el/los anticuerpos (“Antibody specificity prediction”)



Refractariedad

*Investigaciones a realizar en el
Laboratorio de IH*

Laboratorio IH: Estudio de refractariedad

Estudio básico

- Investigación de Acs anti-HLA clase I
- Investigación de anticuerpos anti-HPA
- Genotipo plaquetar

Si se detectan Acs anti-HLA --> pruebas cruzadas, que permiten identificar donantes compatibles de forma rápida

El BST dispone de un panel de 800 donantes de plaquetas, de los que cerca de 500 están tipificados (HLA locus A y B y sistemas HPA 1 a 5 y HPA 15)

Panel de Donantes de Plaquetas Tipificados para los Antígenos HLA de Clase I y HPA

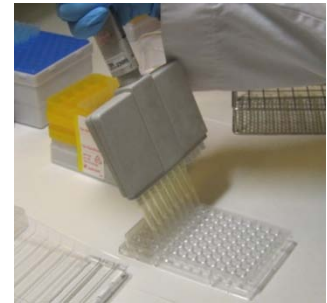
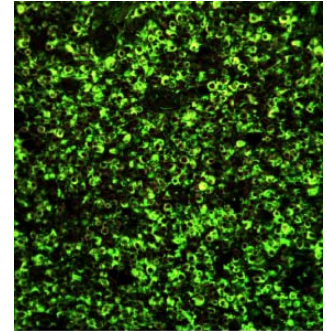
Donants PQ tipificats : Tabla												
Codi Donant	Nom i Cognoms	Telèfon Contacte	ABO	HLA-A	HLA-A2	HLA-B1	HLA-B2	Nº DNA	HPA-1	HPA-2	HPA-3	F
3516157		115	A+	A1	A2	B8	B35	A207-001	1a1a	2a2b	3a3a	5e
3328055			A+	A2	A23	B44	B45	A207-500	1a1a	2a2a	3a3a	5e
3375673		700										
3470957		48										
3309462		56										
3501807		48										
3278978		56										
3245963		56										
3385774		56										
4112202		56										
3685103		28										
3597436		36										
3275768		90										
3287454		12										
3327242		41										
3607517		04										
3490677		04										
3401512		28										
3282669		00										
0198714		56										
3244685		00										
3412786		4										
0207555		4										
3569626		90										
4124607		36										
3466863		56										
3467682		51										
3481673		600	A+	A3	A26	B14	B14	A207-192	1a1b	2a2a	3a3b	5e
3551358		977	A-	A3	A23	B8	B50	A207-511	1a1b	2a2a	3a3a	5e
3510185		414	A+	A32	A33	B51	B14	A207-387	1a1a	2a2a	3a3a	5e
3460200			O+	A2	A2	B62	B51	A207-527	1a1a	2a2a	3a3a	5e

Técnicas de Investigación de Acs HLA

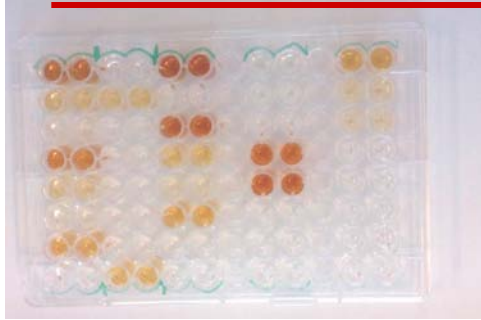
- La técnica de Linfocitotoxicidad (LCT):
 - No todos los Acs HLA son linfocitotóxicos (fijadores de C)
 - No todos los Acs linfocitotóxicos son HLA
 - Se requiere una segunda técnica que detecte Acs HLA no linfocitotóxicos
- Una técnica basada en el ELISA, sólo o combinado con fase sólida (MAIPA), o en la Inmunofluorescencia (LIFT) son estrategias complementarias adecuadas a la LCT.
- Técnicas comerciales ELISA /Fase sólida
 - Quikscreen®, GTI
 - Pocillos con moléculas HLA de mezclas de donantes
- Técnicas comerciales basadas en la citometría de flujo
 - FlowPRA®, One Lambda / Luminex®, Austin
 - “Beads” con moléculas HLA

Detección de Ac anti-HPA

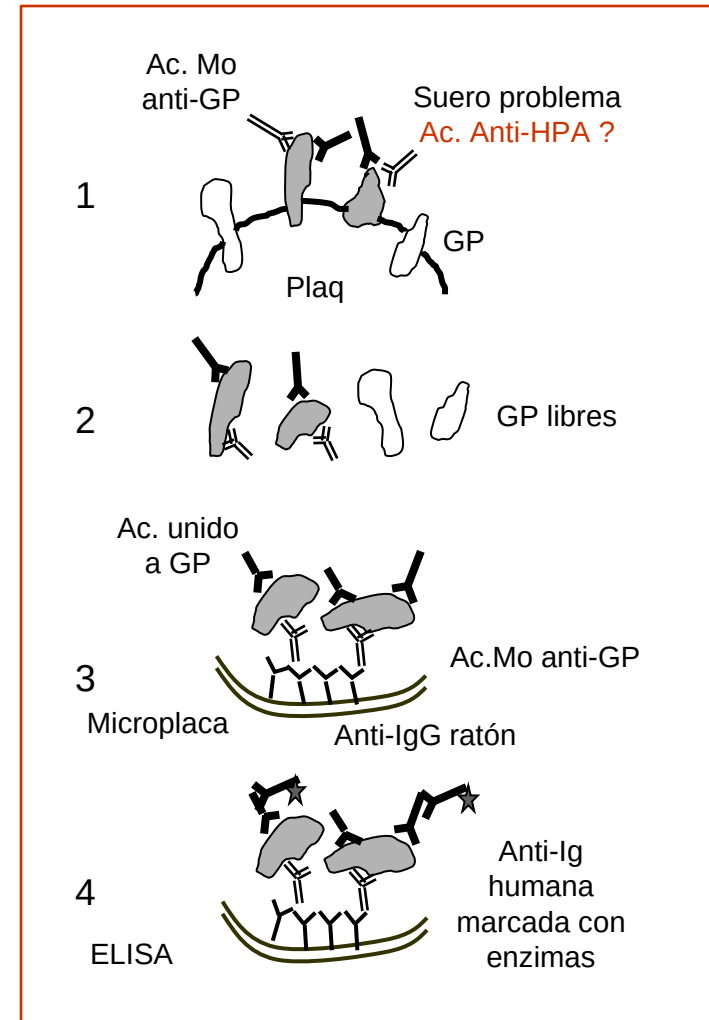
- Inmunofluorescencia (PIFT) con plaquetas tratadas y sin tratar con cloroquina:
 - Sensibilidad limitada
 - Puede no detectar anti-HPA-5 y anti-HPA-15
 - No distingue las mezclas HLA+HPA, o mezclas de varios HPAs
- ELISA / Fase sólida (MAIPA , MACE):
 - Mucho más sensibles
 - Largas y laboriosas
- Técnicas comerciales basadas en Fase sólida / ELISA:
PAK12[®], PAKPLUS[®], GTI; CAPTURE-P[®], Immucor.
 - Son relativamente rápidas
 - Muy sensibles



Detección de Ac anti-HPA: MAIPA

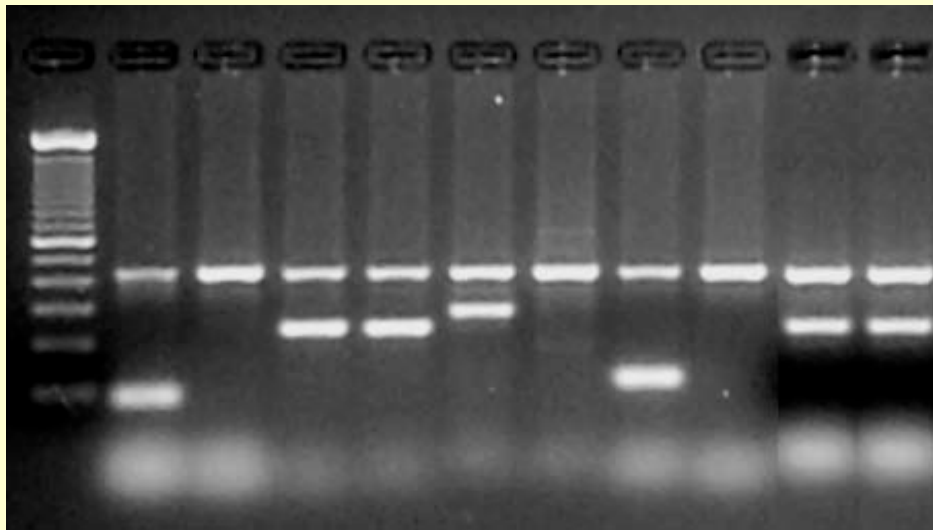


1. Incubación suero problema frente a un panel de células genotipadas + Incubación con Ac Mo anti-GP
2. Lisis → liberación de las GP
3. Incubación en microplaca con anticuerpo de fijación (anti-Ac de ratón)
4. Incubación con Anti-Ig humana marcada con peroxidasa
Lectura de la D.O



Análisis del genotipo HPA (PCR-SSP)

1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b 5a 5b

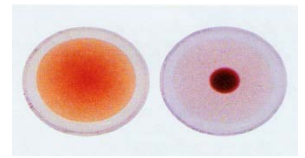


Ejemplo:

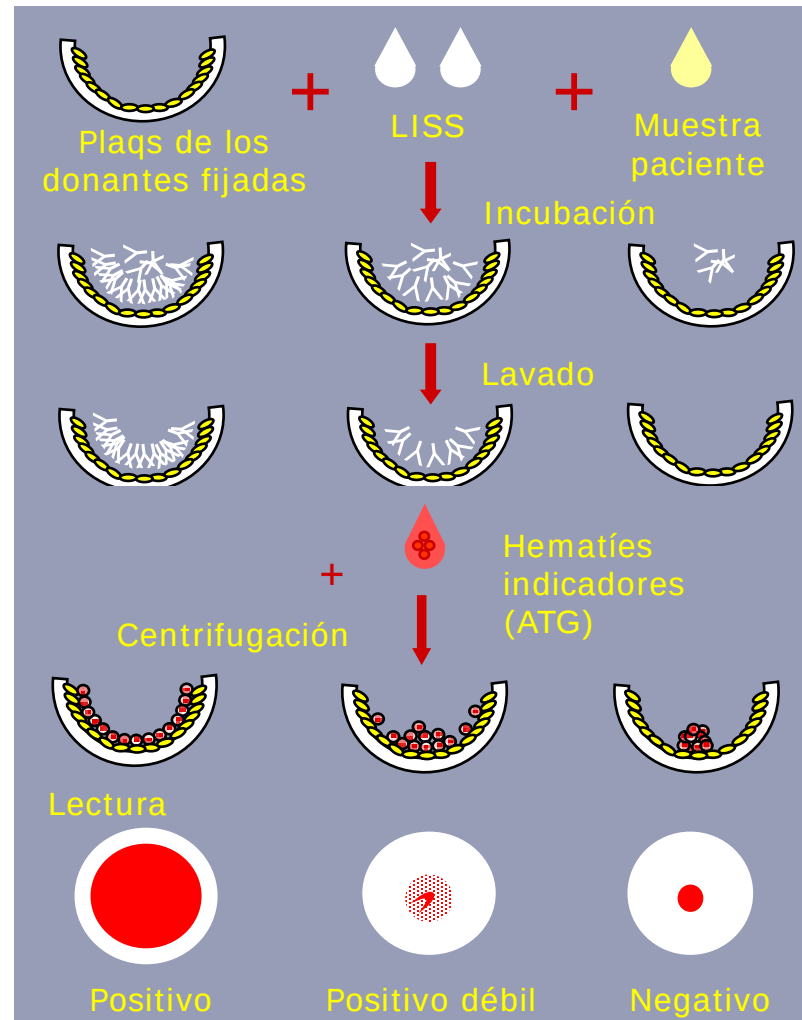
1a1a , 2a2b, 3a3a, 4a4a, 5a5b

← Amplificación específica
para cada uno de los alelos

Pruebas cruzadas plaquetares

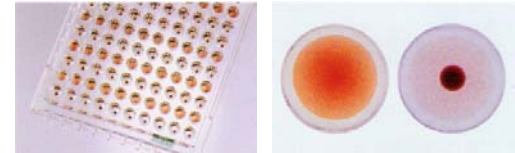


- Cruzar PQs de donantes isogrupo y seleccionar las que cursan con prueba cruzada (PC) negativa
- La técnica de elección es la de Adherencia de hematíes en fase sólida (SPRCA): Capture-P[®], Immucor
- Permite cruzar hasta 96 plaquetas
- En >3h, resultados disponibles



Pr. cruzadas: selección de donantes por HLA

- Si en el momento de estudiar la refractariedad se dispone ya del tipaje HLA del paciente, seleccionaremos para PC aquellos donantes con más identidad HLA con el paciente



- Esta selección aumenta las posibilidades de obtener PC negativas

Grado de compatibilidad	
A	Los 4 Ags (2 HLA-A, 2 HLA-B) son idénticos
BU	No diferencias por homocigosidad HLA-A o HLA-B en el donante; ex: R (A2, A11, B5, B27) D (A2,A2,B5,B5)
BX	Disparidad en 1 Ag, pero es CREGs
C	Disparidad en 1 Ag pero no es CREGs
D	Disparidad en 2 o más Ags no CREGs

CREGs: grupos de antígenos con reactividad cruzada

Ags HLA con reacción cruzada (CREGs)

Locus A

1. A1, A3, A11, A36
2. A9, A23, A24
3. A10, A25, A26, A34, A43, A66
4. A19, A29, A30, A31, A32, A33, A74
5. A2, A28, A68, A69

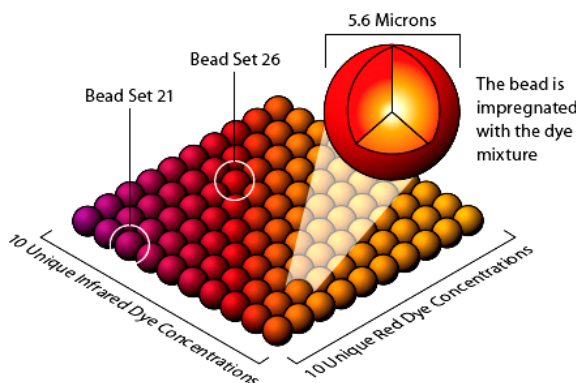
Locus B

1. B5, B18, B35, B51, B52, B53, B70, B71, B72
2. B12, B21, B44, B45, B49, B50
3. B14, B64, B65
4. B8, B59
5. B15, B17, B46, B57, B58, B62, B70, B71, B72, B75, B76, B77
6. B16, B38, B39, B67
7. B7, B27, B42, B73
8. B7, B22, B54, B55, B56, B67
9. B7, B40, B41, B48, B60, B61
10. B13, B47

Refractariedad: ampliación del estudio

En pacientes hematológicos “jóvenes”, candidatos a recibir en el futuro nuevas tandas de QT o candidatos a Auto o Alo-TPH, que precisarán soporte transfusional en varias ocasiones:

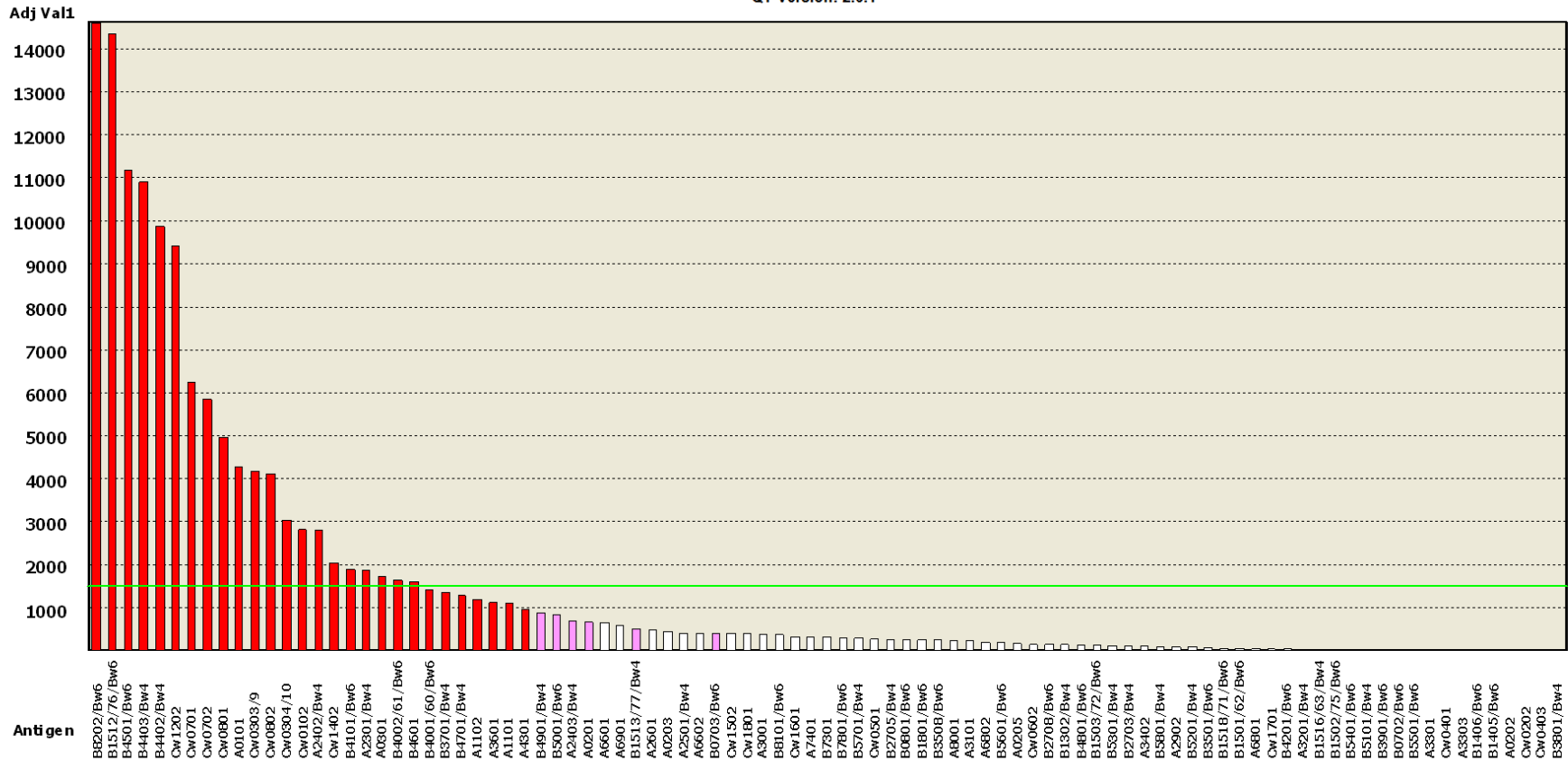
- Investigación del **tipaje HLA** de clase I del paciente
- Investigación de la **especificidad de los Acs anti-HLA** presentes en el suero del paciente refractario Tecnología Luminex



Estudio de la especificidad de los Acs HLA – Luminex single antigen -

– Resultados -

Results for: Class I - Single Antigen
Session: 190112IDCRIS / Sample: 1202576
Report Date: 2/22/2012
QT Version: 2.6.1



– Luminex single antigen -

– Resultados-

Nos permite una mejor selección de donantes

Evitaremos aquellos donantes con HLA frente a los que el paciente presenta Acs:

En el ejemplo: A01
A24
A11
B44
.....

	Bead	Adj1	Adj2	Adj3	AdjC	Assign	Raw	A	B	Bw	Cw	
1	281	14611	64.08	78.44	0	Pos	14792	--	B8202	--	Bw6	--
2	245	14360	62.98	71.17	0	Pos	14574	--	B1512/76	--	Bw6	--
3	264	11185	49.06	64.29	0	Pos	11391	--	B4501	--	Bw6	--
4	263	10904	47.82	74.84	0	Pos	11083	--	B4403	Bw4	--	--
5	262	9866	43.27	75.26	0	Pos	10086	--	B4402	Bw4	--	--
6	294	9419	35.95	39.77	0	Pos	9739	--	--	--	--	Cw1202
7	290	6232	23.79	31.76	0	Pos	6614	--	--	--	--	Cw0701
8	291	5844	22.31	32.8	0	Pos	6113	--	--	--	--	Cw0702
9	292	4949.5	18.89	21.49	0	Pos	5259	--	--	--	--	Cw0801
10	207	4275	20.85	27.77	0	Pos	4571	A0101	--	--	--	--
11	284	4174	15.93	18.97	0	Pos	4521	--	--	--	--	Cw0303/9
12	293	4123	15.74	19.38	0	Pos	4396	--	--	--	--	Cw0802
13	285	3036	11.59	14.1	0	Pos	3379	--	--	--	--	Cw0304/10
14	282	2812	10.73	12.31	0	Pos	3114	--	--	--	--	Cw0102
15	216	2794	13.63	14.94	0	Pos	3090	A2402	--	Bw4	--	--
16	295	2046	7.81	11.42	0	Pos	2469	--	--	--	--	Cw1402
18	260	1885	8.27	10.95	0	Pos	2111	--	B4101	--	Bw6	--
17	215	1863	9.09	10.87	0	Pos	2165	A2301	--	Bw4	--	--
21	212	1720	8.39	10.76	0	Pos	1866	A0301	--	--	--	--
20	259	1625	7.13	7.29	0	Pos	1930	--	B4002/61	--	Bw6	--
19	265	1603.5	7.03	11.04	0	Pos	2014	--	B4601	--	--	--
23	258	1408.5	6.18	7.24	0	Pos	1603	--	B4001/60	--	Bw6	--
22	255	1347	5.91	6.21	0	Pos	1863	--	B3701	Bw4	--	--
24	266	1284.5	5.63	6.54	0	Pos	1473	--	B4701	Bw4	--	--
26	214	1190.5	5.81	6.31	0	Pos	1333	A1102	--	--	--	--
25	227	1122	5.47	6.3	0	Pos	1374	A3601	--	--	--	--
27	213	1098	5.36	7.02	0	Pos	1269	A1101	--	--	--	--
28	228	954.5	4.66	6.05	0	Pos	1164	A4301	--	--	--	--
29	268	865	3.79	5.58	0	Weak	1072	--	B4901	Bw4	--	--
30	269	825.5	3.62	5.49	0	Weak	1064	--	B5001	--	Bw6	--
31	217	682	3.33	4.18	0	Weak	909	A2403	--	Bw4	--	--
32	208	659	3.21	5.65	0	Weak	883	A0201	--	--	--	--
34	229	648	3.16	3.65	0	Neg	853	A6601	--	--	--	--
33	233	597.5	2.91	3.98	0	Neg	861	A6901	--	--	--	--
36	246	509.5	2.23	4.2	0	Weak	780	--	B1513/77	Bw4	--	--
37	219	488	2.38	3.26	0	Neg	758	A2601	--	--	--	--
39	210	444	2.17	2.9	0	Neg	666	A0203	--	--	--	--
41	218	405	1.98	2.46	0	Neg	632	A2501	--	Bw4	--	--
46	230	405	1.98	2.08	0	Neg	558	A6602	--	--	--	--
42	237	403	1.77	4.23	0	Weak	608	--	B0703	--	Bw6	--
40	296	399	1.52	2.22	0	Neg	666	--	--	--	--	Cw1502
38	299	396	1.51	1.87	0	Neg	682	--	--	--	--	Cw1801
45	221	379	1.85	2.28	0	Neg	562	A3001	--	--	--	--
48	280	373	1.64	1.94	0	Neg	550	--	B8101	--	Bw6	--
35	297	320	1.22	3.48	0	Neg	790	--	--	--	--	Cw1601
47	234	313.5	1.53	1.89	0	Neg	552	A7401	--	--	--	--
44	278	308	1.35	1.94	0	Neg	594	--	B7301	--	--	--
52	279	300	1.32	1.52	0	Neg	472	--	B7801	--	Bw6	--
49	276	281	1.23	1.7	0	Neg	505	--	B5701	Bw4	--	--
43	288	268	1.02	1.24	0	Neg	599	--	--	--	--	Cw0501

– Luminex single antigen -

– Resultados-

Citaremos donantes con HLA frente a los que el paciente No presenta Acs

En el ejemplo: A33
B14
.....

Posibilidad de utilizar el software **HLA-Matchmaker** (“tripletes” o “eplets” específicos)

Realiza una selección escalada de los fenotipos compatibles con el paciente (Duquesnoy RJ, 2008).

	Bead	Adj1	Adj2	Adj3	AdjC	Assign	Raw	A	B	Bw	Cw
51	251	260	1.14	1.23	0	Neg	477	--	B2705	Bw4	--
63	238	239.5	1.05	1.05	0	Neg	413	--	B0801	--	Bw6
56	249	238.5	1.05	1.12	0	Neg	440	--	B1801	--	Bw6
54	254	238	1.04	1.1	0	Neg	466	--	B3508	--	Bw6
50	235	227	1.11	1.77	0	Neg	479	A8001	--	--	--
55	222	226	1.1	1.3	0	Neg	441	A3101	--	--	--
59	232	189	0.92	1.06	0	Neg	426	A6802	--	--	--
61	275	181	0.79	0.95	0	Neg	425	--	B5601	--	Bw6
60	211	169	0.82	0.92	0	Neg	425	A0205	--	--	--
58	289	144	0.55	0.94	0	Neg	427	--	--	--	Cw0602
62	252	141	0.62	0.69	0	Neg	418	--	B2708	--	Bw6
53	239	138.5	0.61	0.71	0	Neg	468	--	B1302	Bw4	--
57	267	123.5	0.54	1.18	0	Neg	429	--	B4801	--	Bw6
80	244	123	0.54	0.57	0	Neg	271	--	B1503/72	--	Bw6
72	272	112.5	0.49	0.53	0	Neg	313	--	B5301	Bw4	--
68	250	111.5	0.49	0.67	0	Neg	375	--	B2703	Bw4	--
71	226	108.5	0.53	0.6	0	Neg	314	A3402	--	--	--
64	277	102	0.45	0.61	0	Neg	412	--	B5801	Bw4	--
76	220	85	0.41	0.47	0	Neg	282	A2902	--	--	--
65	271	77	0.34	0.6	0	Neg	399	--	B5201	Bw4	--
88	253	62.5	0.27	0.29	0	Neg	248	--	B3501	--	Bw6
77	248	54	0.24	0.41	0	Neg	280	--	B1518/71	--	Bw6
85	242	52	0.23	0.23	0	Neg	265	--	B1501/62	--	Bw6
81	231	34.5	0.17	0.18	0	Neg	270	A6801	--	--	--
67	298	32	0.12	0.19	0	Neg	376	--	--	--	Cw1701
92	261	30	0.13	0.14	0	Neg	228	--	B4201	--	Bw6
86	223	27	0.13	0.17	0	Neg	263	A3201	--	Bw4	--
91	247	18	0.08	0.09	0	Neg	234	--	B1516/63	Bw4	--
89	243	16	0.07	0.08	0	Neg	241	--	B1502/75	--	Bw6
66	273	15	0.07	0.08	0	Neg	395	--	B5401	--	Bw6
74	270	12	0.05	0.08	0	Neg	286	--	B5101	Bw4	--
78	257	-3	-0.01	-0.02	0	Neg	280	--	B3901	--	Bw6
83	236	-6.5	-0.03	-0.03	0	Neg	268	--	B0702	--	Bw6
73	274	-16.5	-0.07	-0.08	0	Neg	292	--	B5501	--	Bw6
69	224	-30	-0.15	-0.18	0	Neg	322	A3301	--	--	--
70	286	-34	-0.13	-0.31	0	Neg	315	--	--	--	Cw0401
93	225	-41	-0.2	-0.23	0	Neg	205	A3303	--	--	--
79	241	-46	-0.2	-0.46	0	Neg	277	--	B1406	--	Bw6
84	240	-47	-0.21	-0.45	0	Neg	267	--	B1405	--	Bw6
75	209	-55.5	-0.27	-0.31	0	Neg	283	A0202	--	--	--
82	283	-118	-0.45	-0.74	0	Neg	269	--	--	--	Cw0202
87	287	-138	-0.53	-0.69	0	Neg	262	--	--	--	Cw0403
90	256	-164	-0.72	-1.54	0	Neg	238	--	B3801	Bw4	--

Actuación una vez identificados los donantes

- El laboratorio de IH informa a Donación de los posibles donantes compatibles para el paciente refractario
- Promoción contacta con los donantes. Se citan para aféresis “dirigidas”, siguiendo una programación según la evolución de cada caso
- Las aféresis, una vez validadas e irradiadas, se envían al servicio de transfusión correspondiente
- Es importante monitorizar el rendimiento transfusional de estas aféresis. Es un dato que puede ayudar a la selección de nuevos donantes
- En ocasiones, si existen factores no inmunes, a pesar de transfundir con PC -, el rendimiento no mejora

Actitud en pacientes que no responden a la Tx de PQs seleccionadas

- Restringir las transfusiones de plaquetas:
No administrar plaquetas “profilácticas”
- Transfundir terapéuticamente, aumentando la dosis o la frecuencia, si es necesario
- Monitorizar muy estrictamente al paciente
- Valorar la situación clínica del paciente, independientemente de la cifra de plaquetas
- Repetir el estudio inmunológico periódicamente



Aspectos inmunológicos a considerar

- Aparición **secuencial** de anticuerpos → HLA → HPA
- Aparición de otros Acs HLA (nuevas especificidades)
- Pensar en posibilidad de “auto-Acs” **Acs panreactivos**
Muestran especificidad glicoproteica (IIb-IIIa, Ib-IX, Ia-IIa, IV), independientemente del fenotipo de las plaquetas
- **Pensar en los Acs inducidos por fármacos**
Investigación compleja y resultados poco informativos
Valorar la coincidencia temporal con la administración y/o la conocida acción del mismo → Suprimir o sustituir el fármaco

Actitud en pacientes que no responden a la Tx de PQs seleccionadas

- Esplenectomía Hogge et al, 1984; Heddle et al, 1995.
- Inmunoglobulinas ev Kickler et al, 1990; Ratko et al, 1995.
- Recambio plasmático
- Adsorción en columnas de proteína A Christie et al, 1993.
- Infusión masiva de plaquetas Nagasawa et al, 1978.
- Antifibrinolíticos Kalmadi et al, 2006.
- Factor VII recombinante Heuer&Blumenberg, 2005.
- Rituximab
- Inmunosupresores (ciclosporina A, γ -globulina anti-timocítica)

Experiencia del Laboratorio de Inmunohematología



Patients studied

- From January 2005 to December 2008:

- ❑ Patients: **n = 83**
- ❑ Episodes of refractoriness: **n = 100**

✓ 12 patients had several consecutive studies:

n	Diagnosis	Episodes
8	7 Acute leukemia / 1 Ewing S.	2
3	AML	3
1	AML	4

- Patients from 14 Spanish hospitals

Patient Characteristics (n=83)



BANC DE SANG
I TEIXITS

Sex	49 Female (59%) 34 Male (41%)
Age	Median 51 years (0.8 – 89) 12 cases <16 years
Underlying disease	41 Acute leukemias (59%) 7 Aplastic anaemia / Fanconi A. 9 Lymphomas 3 MM 8 MDS / MPS 5 Solid tumours 10 Other pathologies

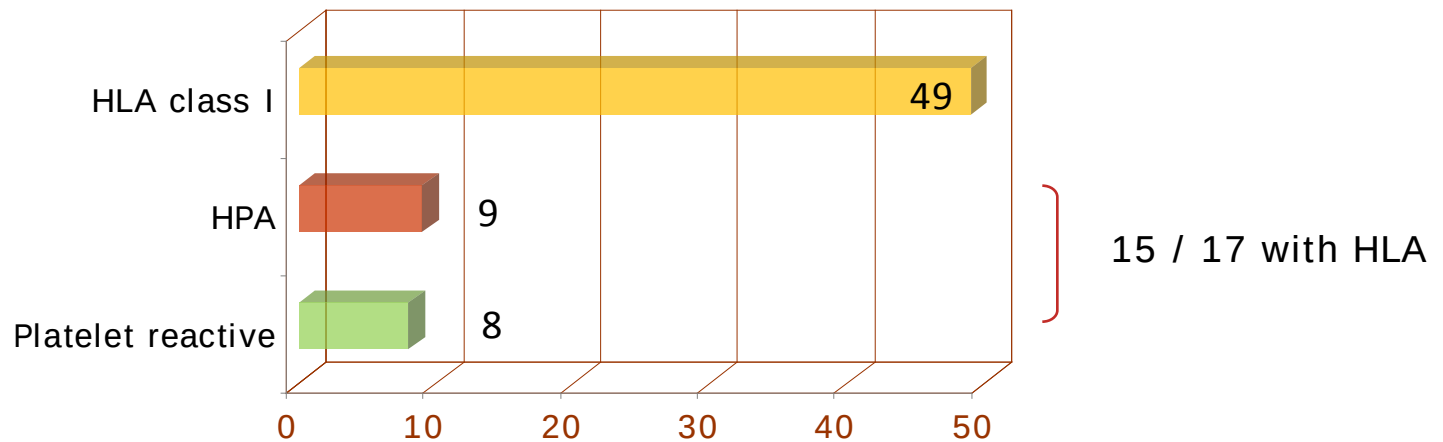
Laboratory investigations



- HLA class I antibodies (ELISA, Quikscreen®, GTI)
- HPA antibodies (Solid Phase, PAK12®, GTI & MAIPA)
- Platelet genotype (PCR-SSP)
- If HLA Abs present: Cross-matching with apheresis platelet samples (SPRCA, CAPTURE-P®, Immucor).
 - *Platelet donor panel: 800 donors / 450 HLA & HPA typed.*
- **Selected cases**, i.e. those that will require platelet transfusions for a long period or in subsequent episodes:
 - HLA genotype of patient (PCR-SBT)
 - HLA class I Abs specificity (Luminex Single Antigen)
 - HLAMatchmaker Software

Results

- Positive results n= 51 patients (**61 %**)
 - HLA, HPA, Platelet reactive abs



- Negative results n= 32 patients (**39 %**)
- All negative cases had non-immune factors present:
 - 2 or more factors in > 80%
 - 3 or more factors in > 40%

Results: HLA class I Abs

- Positive in 49 patients **(59 %)**
- Median (range): 85% (4%-100%)
 - More frequent in women (75% vs 35%; $p < 0.01$)
 - No differences by the underlying diseases (AL vs others)

Figure 1: HLA class I results

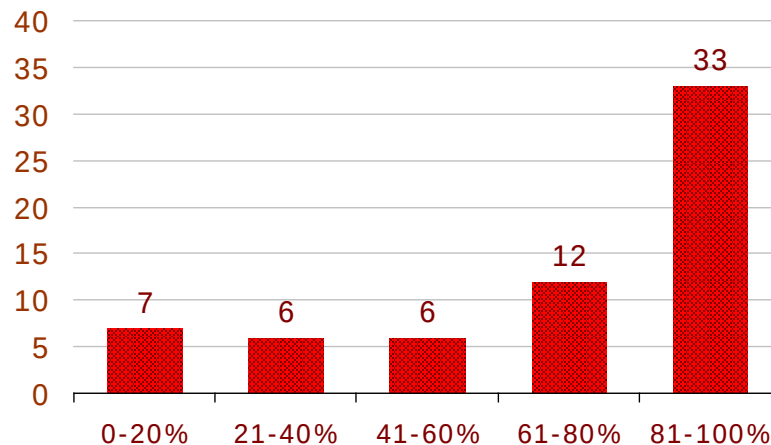
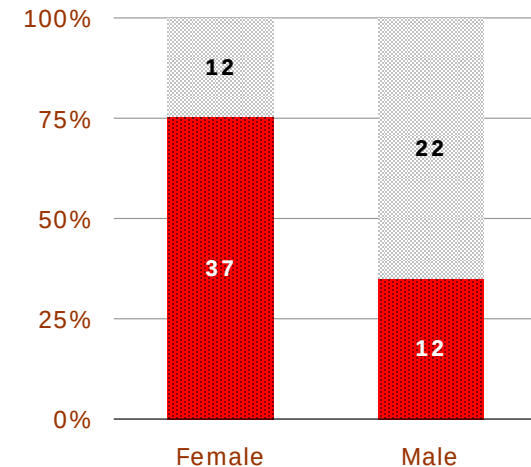


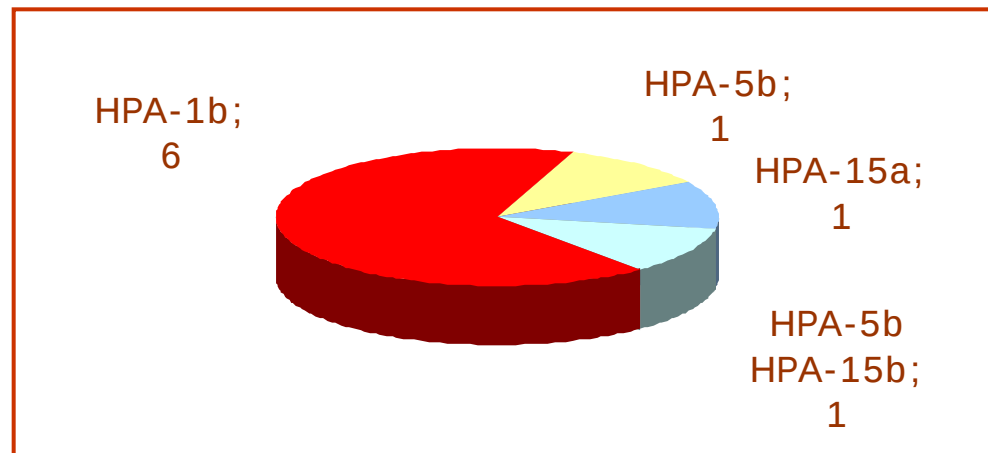
Figure 2: Results by Sex



Results: Platelet Abs

- **HPA specific Abs: n= 9 cases (11 %).**

All of them with HLA class I Abs.



- **Platelet reactive Abs: n=8 cases (9 %).**

- A pattern of auto-antibody reactive with different platelet glycoproteins (IIb-IIIa plus Ib-IX and/or Ia-IIa) was observed in Solid Phase / MAIPA assays.
- In 3 patients auto-Abs were confirmed by a positive direct IF test.
- Six had HLA class I Abs

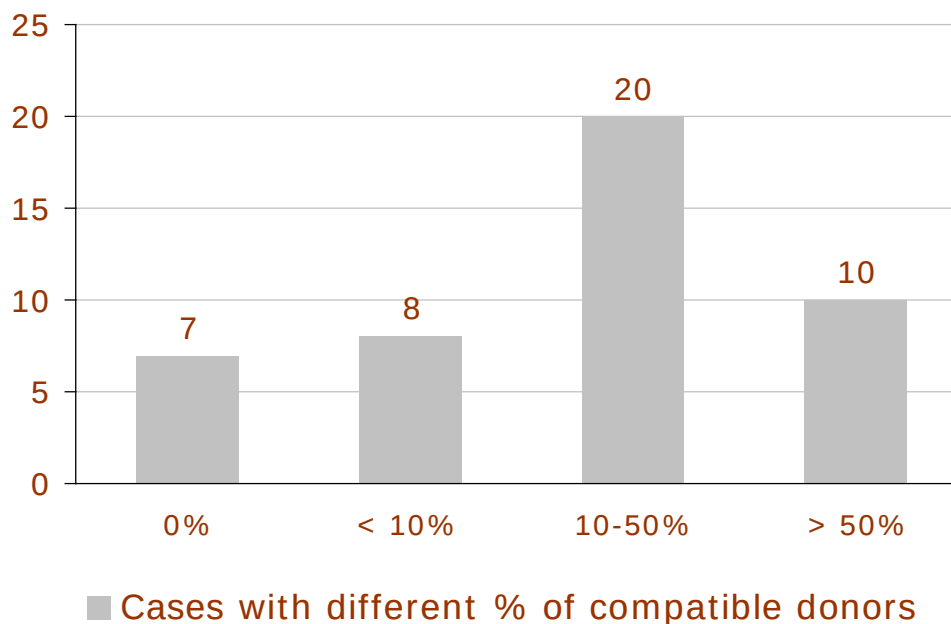
Results

- Patients studied in several episodes: n=12
 - All of them had HLA class I Abs.
 - The % of reactivity studied 3 to 6 months later was:
 - Stable or increased in subsequent episodes in 7 cases.
 - Decreased in 5 cases (AML). Two had received an ASCT and 3 QT+ATRA treatments.
- In one AL patient with HLA class I (100%) + HPA-1b (weak) Abs:
 - The HPA-1b Ab was undetectable in a 2nd study, 10 months later.



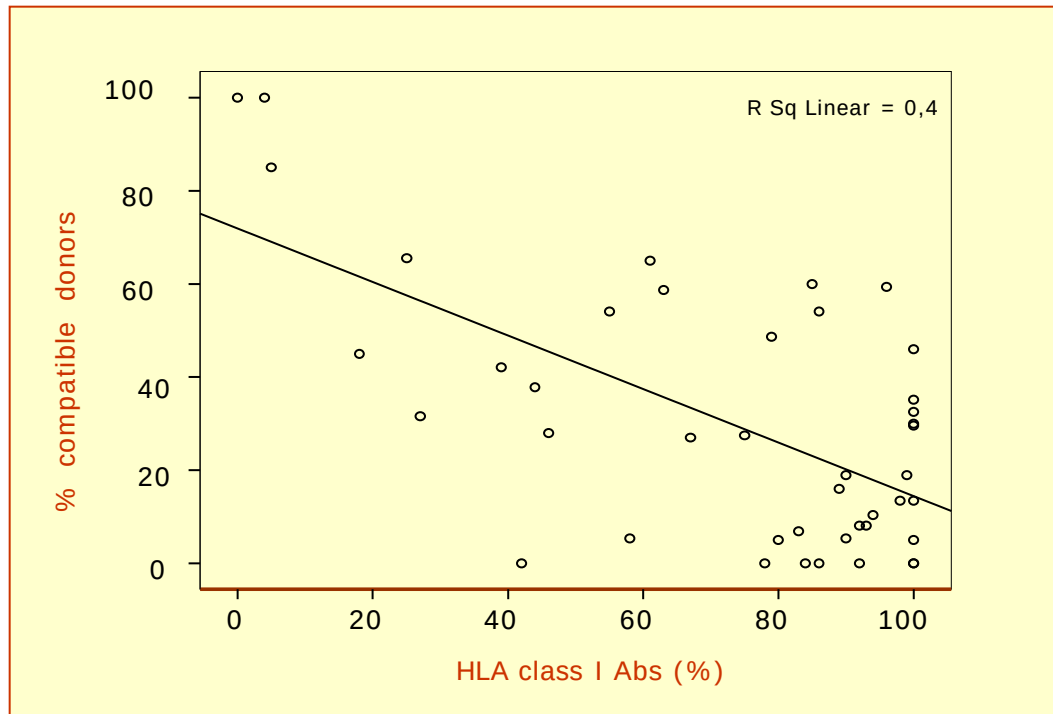
Results: Cross-matching

- Performed in 45 episodes
 - Median number of donors cross-matched: 37 (5-60)
 - Percentage of compatible donors found: 28% (0-100%)



Results: Cross-matching

- An inverse correlation between the degree of HLA class I reactivity and the probability of finding matched donors was observed (0.007).



> % of HLA reactivity



< % of compatible donors

Results

- HLA typing was already available in 10 patients; cross-matching with selected donors, based on HLA-A and HLA-B typing (most BX to D match grade)
 - ↳ Higher chance of finding compatible donors
- The specificity of the HLA Abs was investigated in 3 cases;
 - ↳ The HLAMatchmaker Software results were used to select compatible donors.
- Platelet support with apheresis products from selected donors was given to 35 patients:
 - Post-transfusion 1 hour increment $>25 \times 10^9$ plat/L or 18/24 hours increment $>10 \times 10^9$ plat/L were observed in 70% of the cases
 - Non-immune factors (splenomegaly / fever/ active bleeding) were present in all cases with inadequate increments.

- Immune factors were found in 61% of our patients:
 - ✓ HLA Abs were present in 59% of cases, 75% of the women
 - ✓ HPA antibodies were present in 11%, being HPA-1b the most prevalent specificity, and platelet reactive Abs in 9%.

- Compatible donors could be found for most of these patients, improving the post-transfusion yield in 70% of them.

MUCHAS GRACIAS