

Análisis de sueros anti-HLA por ordenador

A. Rementería Núñez, I. Millán Santos, J.R. Martínez Alonso,
M. Moreno Barba, C. Pascau Rooney y M. Kreisler García

Sección de Bioestadística. Servicio de Inmunología.
Clínica Puerta de Hierro. Madrid.

Computer analysis of anti-HLA sera

We describe an informatic application for three serological analysis of anti HLA sera.

Data obtained by the typing laboratory are transferred to files in magnetic discs to be processed by computer: the definition of HLA specificities present on serum antibodies is determined by a repetitive process evaluating every HLA antigen present on the panel cells, selecting the one with the highest correlation coefficient and eliminating after the subsequent analysis the cells which are positive for a given selected antigen, until there are not any more positive reaction with each serum.

We describe each computer program indicating in each case schematically the input-output calculus process.

Results obtained in different analysis allowed us to confirm the advantages of this method when comparing to not-computerized methods.

En el presente trabajo se describe la aplicación informática realizada para el análisis serológico de los sueros anti-HLA.

La organización de los datos obtenidos por el laboratorio se basa en la creación de ficheros en disco magnético para ser procesados por ordenador.

La determinación de anticuerpos específicos de un suero se realiza mediante un proceso iterativo, valorando cada uno de los antígenos presentes en las células, seleccionando el de mayor coeficiente de correlación cuadruple y eliminando las células que tienen presente dicho antígeno, hasta finalizar el estudio cuando no quedan reacciones positivas.

Se describe el funcionamiento de cada programa de la aplicación, mediante el análisis por bloques o módulos que los caracterizan, indicando esquemáticamente los procesos de entrada salida y cálculo.

La aplicación del proceso diseñado en diversos análisis nos permite comprobar las ventajas del método automático, contrastadas con los métodos manuales.

INTRODUCCION

A lo largo de los últimos meses, los servicios de inmunología y bioestadística de la clínica Puerta de Hierro hemos diseñado y puesto en marcha una aplicación informática para el estudio serológico de los sueros anti-HLA, con el fin de detectar las especificidades principales y secundarias, valorando determinadas características cualitativas de los mismos.

Los programas fueron aplicados, a título experimental, con material (sueros y células) propio, contrastado por nosotros y en diferentes *workshops*. Posteriormente, ha sido aplicado para el análisis y elaboración de resultados durante el VI Workshop de Histocompatibilidad. Dado que creemos que los resultados han sido satisfactorios, que no existen, por otra parte, demasiadas facilidades para adquirir este tipo de programas, procedentes de otros laboratorios extranjeros y que, según nuestro conocimiento, éste es el primero que se realiza en España, hemos consi-

derado que puede ser de utilidad transmitir nuestra experiencia y publicar los fundamentos del programa.

Por brevedad de espacio, no se incluyen en este artículo los listados de los programas que están a libre disposición de todos los laboratorios que realizan este tipo de estudios serológicos.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico

El material biológico sobre el que se ha trabajado en las pruebas previas para la comprobación del método desarrollado consistió:

1. En las células y los sueros que el laboratorio de histocompatibilidad de la clínica Puerta de Hierro utilizó en el V Workshop Nacional.

2. El análisis de 536 células caracterizadas por HLA y 567 sueros de multiparas, repartidos en 10 pruebas diferentes a lo largo de varios meses.

3. Los sueros de 600 enfermos en lista de espera de trasplante renal, enfrentados a 30 células de panel.

Una vez considerado el método como satisfactorio se realizó un segundo estudio con el material biológico de 693 células tipadas para HLA A-B-C, y con 361 células ti-

Correspondencia y separatas: A. Rementería Núñez. Sección de Bioestadística. Clínica Puerta de Hierro. San Martín de Porres, 4. Madrid-35.

padas para DR, presentado por los distintos laboratorios participantes al VI Workshop de Histocompatibilidad. Los sueros que se sometieron al análisis automatizado fueron 106 anti-HLA-A-B-C y 52 anti-DR, que fueron estudiados simultáneamente por todos los laboratorios.

Método de análisis

Para la realización de este trabajo se han confeccionado los programas en Fortran IV, para un ordenador Digital PDP-11/55, de uso general para las aplicaciones médicas de la clínica Puerta de Hierro. El sistema operativo RSX-11M permite trabajar en multiprogramación, tiempo compartido y protección multiusuario. El Servicio de Inmunología posee una terminal interactiva VT-100 de uso propio y tiene reservada una capacidad de almacenamiento de una *Megabyte*, en disco magnético RL02 de 10 MG, que se comparte con aplicaciones de otros servicios hospitalarios.

Los datos de la aplicación vienen dados en función de la propia naturaleza de la técnica analítica experimental llevada a cabo en el laboratorio. Esta información consiste en la estructura antigénica de las células utilizadas y en los resultados de la reacción de cada suero problema con dichas células.

En el diseño de la aplicación se prevé la creación de dos ficheros correspondientes a estos dos tipos de datos y de un fichero de referencia con todas las especificidades antigénicas, organizados de manera que faciliten su proceso por el ordenador.

Los tres ficheros citados se configuran de la forma siguiente:

1. Fichero de especificidades antigénicas: sirve de referencia para realizar una codificación interna de cada antígeno, para ser usada por el ordenador, al mismo tiempo que se conserva la denominación habitual para ser utilizada por el usuario.

Contiene todas las especificidades antigénicas perfectamente identificadas y la información sobre las relaciones entre diversos antígenos referidas a los subtipos y especificidades públicas que aparecen recogidas en *Histocompatibility Testing 80*.

2. Fichero con el tipaje HLA celular: contiene la información referente al conjunto de antígenos de cada célula que forma el panel que se enfrenta a la batería de sueros problema.

3. Fichero de resultados de las reacciones de los sueros: consiste en una matriz de dimensiones N x M (células x sueros) con los valores 1, 2, 4, 6 u 8, correspondientes al resultado de la reacción de cada suero con cada célula. Asimismo, se incluye la identificación alfanumérica de cada suero para su reconocimiento en los resultados finales.

RESULTADOS

Determinación de anticuerpos presentes en un suero

La determinación de anticuerpos específicos de un suero, a partir de los resultados de las reacciones de dicho suero con el grupo de células de antígenos conocidos se realiza mediante un proceso iterativo de los siguientes pasos:

Valoración de cada uno de los antígenos presentes en las células. Esta valoración se da con el coeficiente de correlación cuádruple del antígeno en el suero problema.

Suero Células	Reacciones positivas	Reacciones negativas	Total
Células con antígeno I	A	B	J
Células sin antígeno I	C	D	K
Total	l	m	n

$$\chi^2 = \frac{N(|AD-BC| - \frac{N}{2})^2}{JKLM} \quad \phi \sqrt{\frac{\chi^2}{N}}$$

Fig. 1. Tabla de contingencia para la detección del antígeno I en el suero problema. Expresión de χ^2 corregida por Yates y coeficiente de correlación cuádruple.

Selección del antígeno de mayor coeficiente de correlación, determinando sus porcentajes de fuerza e inclusión.

Eliminación de las células que tienen presente dicho antígeno, considerando que su reacción con el suero ha sido debida al antígeno seleccionado.

El proceso finaliza cuando no quedan células con las que el suero haya reaccionado positivamente o bien esas reacciones no se pueden atribuir a ninguna especificidad concreta.

Valoración de un antígeno definido por un suero

Se estableció mediante:

El coeficiente de correlación cuádruple de un antígeno I respecto a un suero. Se determina a partir del valor χ^2 de la tabla de contingencia de la fuerza de reacción contra la presencia o ausencia del antígeno en las células (fig. 1).

Las reacciones de grado 1 y 2 se consideran negativas y las de grado 6 y 8 positivas. Las reacciones de grado 4 son consideradas positivas o negativas en función del coeficiente de correlación más alto.

El porcentaje de inclusión (Inc) se define como el porcentaje de reconocimiento del suero de las células que presentan el antígeno I.

El porcentaje de fuerza (Str) es el tanto por ciento del grado de reacción 8 de las reacciones positivas.

Programas realizados

La creación y puesta en marcha de toda la aplicación¹ ha sido prevista para que el Servicio de Inmunología realice en la mayor medida posible la explotación de sus programas desde su propia terminal. El personal informático interviene exclusivamente en los procesos que exigen su realización en la sala del ordenador para la obtención de listados desde la impresora central y para la adopción de medidas de seguridad de los datos, a través del dispositivo de cinta magnética.

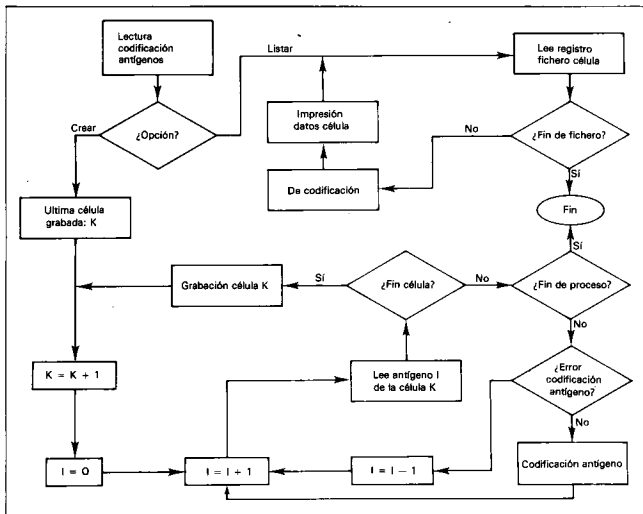


Fig. 2. Programa célula: tratamiento de la información del tipaje celular.

Por este motivo, se ha tenido en cuenta una serie de normas a la hora de realizar la aplicación de uso para el personal no especializado:

1. Los programas se organizan por bloques o módulos.

2. Los programas de entrada son de tipo conversacional con el ordenador, de forma que los datos son introducidos de manera literal.

3. Existen controles de estructura, verosimilitud, aritméticos y de secuencia, que permiten la detección y control de errores.

4. La corrección de datos erróneos se ha previsto en el momento en que se produzcan, dando aviso al operador. Asimismo se prevé el uso de listados que permiten la comprobación de datos por parte del usuario.

El programa *célula* (fig. 2) permite dos alternativas. Con la opción *ampliar* crea y amplía el fichero que contiene el tipaje de las células empleadas en el análisis serológico. Lee por pantalla los antígenos ce-

lulares determinados por el laboratorio para cada célula, dando un mensaje de error cuando el antígeno no está correctamente dado. Con la opción *listar* produce por impresora un listado del tipaje de las células y una relación de los antígenos no testados. Estos listados pueden servir de control final de la información recogida en el ordenador.

El programa *meter* (fig. 3) crea el fichero que contiene la identificación del suero con los resultados leídos en el laboratorio. Está realizado en forma dialogada, pidiendo el resultado del suero para cada célula, no admitiendo más que valores posibles (1, 2, 4, 6, 8). Un listado del fichero así creado puede obtenerse con el programa *resul*, que imprime los datos de dicho fichero en forma de matriz.

El programa *previo* (fig. 4) procesa los datos contenidos en los ficheros anteriormente descritos, creando un nuevo fichero con los resultados del análisis de los sueros problemas, con la siguiente información:

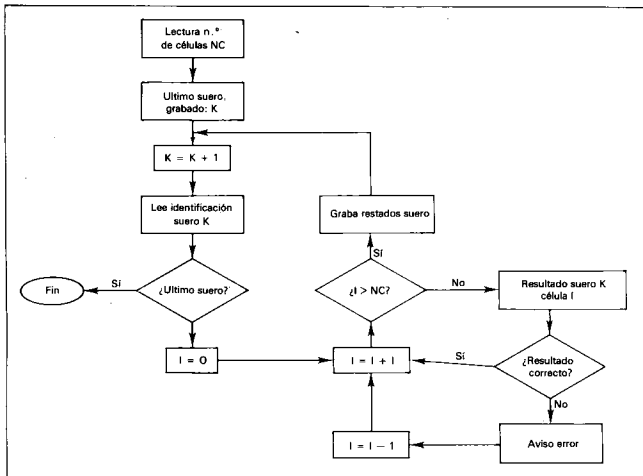


Fig. 3. Programa meter: tratamiento de la información de los resultados de las reacciones.

1. Tablas de frecuencias de cada antígeno por grado de reacción y presencia o no del antígeno en las células.

2. Cálculo de χ^2 con la corrección de Yates, a partir de las tablas de contingencia 2×2 .

3. Cálculo del coeficiente de correlación cuádruple.

4. Porcentaje de los grados de reacción 4, 6 y 8 en las células que presentan ese antígeno.

5. Cálculo de la fuerza del suero dado como porcentaje del grado de reacción 8, frente al total de reacciones positivas.

6. Cálculo de la inclusión como porcentaje de las reacciones positivas, frente a las células también positivas.

7. Especificación del nivel de significación estadística para cada antígeno definido.

Los resultados elaborados por el programa *previo* y recogidos en un fichero son impresos mediante dos programas distintos con dos modalidades de presentación de resultados. En ambas salidas aparecen las identificaciones de cada suero con las especificidades detectadas, según su orden de selección en la realización del proceso.

El programa *finin 1* ofrece un listado en que aparece cada suero con el número de células consideradas y los porcentajes de resultados 4-6-8, 6-8 y 8. Para cada especificidad presenta la tabla 2×2 correspondiente, el valor χ^2 , los porcentajes de fuerza y de inclusión, el coeficiente de correlación cuádruple y la significación estadística. En el caso de sueros que no han reaccionado, la definición del suero viene dada por la frase *no reacciona*.

El programa *finin 2* ofrece un listado en el que las distintas especificidades de cada suero vienen descritas por el número total de células empleadas y el número de células positivas para dicho antígeno en total y para cada grado de reacción.

En la figura 5 se presenta el proceso general de la información desde la introducción de datos por pantalla hasta la obtención de resultados en papel impreso.

DISCUSION

Las principales ventajas de la utilización de un ordenador para la realización del análisis serológico

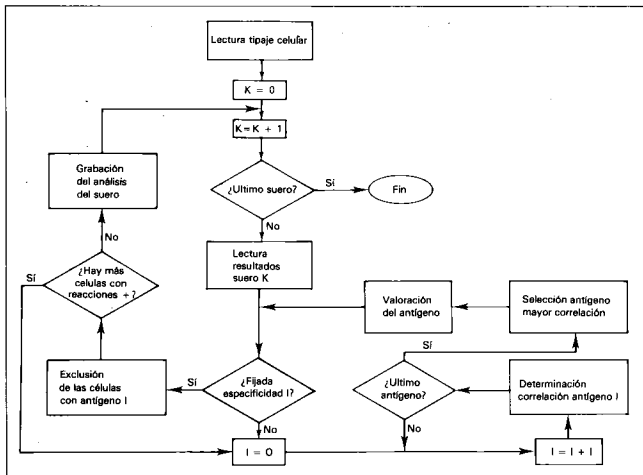


Fig. 4. Programa previo: proceso general del análisis de especificidades en los sueros.

son la precisión, rapidez, objetividad y posibilidad del estudio de "colas" o especificidades secundarias.

El rigor que exige el proceso automatizado se manifiesta en el trabajo de laboratorio en una mayor calidad y claridad de los datos (tipajes celulares e informes de los grados de reacción), con la consiguiente precisión de los resultados de análisis.

La rapidez es una cualidad propia del ordenador, que se manifiesta en la realización del proceso que maneja en cada prueba un gran número de datos.

La exhaustividad con que se realiza el análisis permite el estudio de la reactividad global del suero, eliminando la subjetividad de la persona que realiza el análisis en forma manual.

El contraste de resultados obtenidos de forma manual y automática presenta una clara correspondencia entre ellos, con la ventaja, en el segundo caso, de la detección de reacciones de menor intensidad definidas como "colas", que significa un mayor grado de información.

Se ha efectuado una comparación con procesos diseñados en otros países a los que nos ha sido posible su acceso y se ha visto la similitud en el planteamiento

del problema. El grupo de París (comunicación personal del Dr. J. Hors) no realiza la corrección de Yates por continuidad en el cálculo de la χ^2 . Las bajas frecuencias que nos aparecen en algunos casos al no utilizar muchas células implica la necesidad de esta corrección para nuestra aplicación. El método de UCLA² presenta los antígenos detectados como "especificidades" (superior al 50%) o como "colas".

Un hecho a señalar es el tratamiento dado al grado de reacción intermedio definido como "4". Su valoración como positiva o negativa está sujeta al juicio de la persona que lo realiza, cuando el análisis se lleva a cabo de forma manual. Esta información no puede ser despreciada ni utilizada de forma rígida o estricta, asignando siempre un valor positivo o negativo. Para la realización del proceso automático se ha tenido en cuenta esta situación particular y se ha intentado dar un tratamiento objetivo, pero con la flexibilidad necesaria. La manera práctica en que se ha solucionado es por el cálculo de pruebas χ^2 paralelas para cada caso, una con el valor "4" como positivo y la otra como negativo, seleccionando una de ellas en función del coeficiente de correlación más alto.

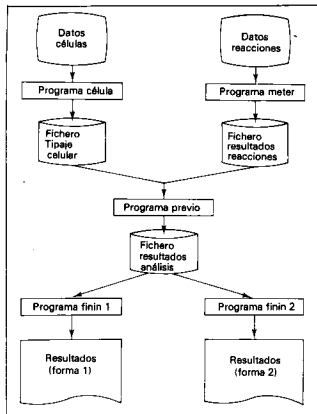


Fig. 5. Esquema global de la aplicación.

El análisis serológico realizado por ordenador no se limita exclusivamente a la determinación de las especificidades de los sueros, sino que incluye asimismo un estudio de la calidad³ de estos sueros y de la técnica empleada. Cada suero aparece caracterizado por la fuerza con que reacciona para la especificidad principal y por la capacidad de reconocimiento de cada especificidad (número de células positivas que reconoce para un antígeno determinado). La combinación de ambas características define los sueros que son buenos para utilizar dentro del trabajo de rutina del laboratorio, los que son "cortos" y los que son "flojos". La calidad de la técnica del laboratorio se valora con un coeficiente de correlación que mide la reproducibilidad de los resultados mediante la utilización de parejas de sueros duplicados.

Los sueros definidos con un alto porcentaje de fuerza pero baja inclusión ("fuertes y cortos") presentan una consideración especial, pudiendo aplicárseles un estudio de complementariedad⁴ que consiste

en valorar entre dos sueros característicos que reconocen la misma especificidad la dependencia de sus reacciones. El interés de este estudio que permite valorar si cada pareja de sueros está reconociendo distintas partes de la estructura antigénica o si por el contrario reconocen lo mismo pero con baja reacción, radica en la posibilidad de obtener reactivos mejores con mezcla de sueros cortos.

El estudio de las características "index" y "quality" de cada suero no se ha dejado de abordar en el presente trabajo. La característica "quality", que da un valor de calidad para cada suero, se determina a partir de las frecuencias de inclusión de cada uno de los grados de reacción. La característica "index" clasifica a un suero en una escala de 1 a 12, que valora los distintos grados de reacción como positivos o negativos.

La aplicación del método automático al análisis de los sueros del VI Workshop Nacional de Histocompatibilidad ha permitido la obtención rápida y clara de los resultados individuales de cada laboratorio y su control de calidad para decidir los que se consideraban aptos para su inclusión en el estudio global, en base a los datos estadísticos obtenidos.

El análisis de los sueros de los pacientes en lista de espera de trasplante renal proporciona información, no sólo de la tasa de anticuerpos presentes, sino también de la especificidad contra la que se dirigen cuando el enfermo presenta sensibilización.

Por lo expuesto anteriormente, consideramos que la aplicación del método diseñado, tanto estadístico como informático, resulta plenamente justificada por su rapidez, claridad y precisión.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido en parte subvencionado por el FIS (23/80). La Lda. A. Rementería es becaria del FIS.

Bibliografía

1. Pickboun P, Richards S, Bodmer JG, Bodmer WF. Data Organization and methods of Analysis. Histocompatibility Testing 1977. Oxford, 1977; 295-324.
2. Mickey MR, Terasaki PI. The serological data of the 8th Workshop and Summary Analysis. Histocompatibility Testing 1980. Los Angeles, California, 21-136.
3. Bodmer JG, Pickboun P, Richards S. In Serology. Histocompatibility Testing. 1977. Oxford, 1977; 35-84.
4. Mickey MR, Mittal KK. An Information theory quality score for reagent sera. Tissue Antigens 1981; 18:13-23.