

**mgr Natasza Olszowska-Zaremba**

**„Rola oceny swoistości przeciwciał anti-HLA  
w analizie ryzyka immunologicznego u  
potencjalnych biorców alloprzeszczepu  
nerki”**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

Promotor: Dr hab. n. med. Jolanta Gozdowska

Zakład Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

**Słowa kluczowe:** przeciwciała anti-HLA, oznaczenie single antigen bead, transplantacja nerki, wirtualna próba krzyżowa, prognozowanie wyniku biologicznej próby krzyżowej.

**Keywords:** HLA antibody, single antigen bead assay, renal transplantation, virtual crossmatch, physical crossmatch prediction.

*Pracę dedykuję  
moim Rodzicom i Mężowi  
w podziękowaniu za ich miłość.  
Dziękuję.*

### **Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską:**

- 1) Olszowska-Zaremba N, Zagożdżon R, Gozdowska J. Accuracy of virtual crossmatch (VXM) prediction of physical crossmatch (PXM) results of donor specific antibody (DSA) in routine pretransplant settings-a single-center experience. *Transpl Immunol.* 2022;72:101583. doi:10.1016/j.trim.2022.101583 – **IF 2.032; 70 pkt. MNiSW**
  
- 2) Olszowska-Zaremba N, Gozdowska J, Zagożdżon R. Clinical significance of low pre-transplant donor specific antibodies (DSA) in living donor kidney recipients with negative complement-dependent cytotoxicity crossmatches (CDCXM), and negative flow cytometry crossmatches (FLXM) - A single-center experience. *Transpl Immunol.* 2022;74:101672. doi:10.1016/j.trim.2022.101672– **IF 2.032; 70 pkt. MNiSW**

## **Wykaz stosowanych skrótów**

**ADCC** – antibody dependent cell cytotoxicity; cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał;

**AHG** – anti-human globulin; przeciwciała skierowane przeciwko ludzkim immunoglobulinom;

**AMR** – antibody-mediated rejection; odrzucanie przeszczepu zależne od przeciwciał;

**APC** – antigen presenting cells; komórki profesjonalnie prezentujące antygeny;

**BMI** – body mass index; wskaźnik masy ciała;

**C4d w PTC** – C4d peritubular capillary deposition; złogi składowej dopełniacza C4d w kapilarach okołocewkowych przeszczepionej nerki;

**CDC-XM** – complement dependent cytotoxicity crossmatch; próba krzyżowa metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza;

**cPRA** – calculated panel reactive antibodies; wyliczony poziom przeciwciał preformowanych;

**DGF** – delayed graft function; opóźnione podjęcie funkcji przez alloprzeszczep nerki;

**DSA** – donor specific antibody; przeciwciała swoiste dla dawcy;

**DTT** – 1,4-ditiotreitol;

**EDTA** – ethylenediaminetetraacetic acid; kwas wersenowy;

**eGFR** – estimated glomerular filtration rate; szacunkowy wskaźnik przesączania kłębuszkowego;

**ELISA** – enzyme-linked immunosorbent assay; metoda immunoenzymatyczna;

**FLXM** – flow cytometry crossmatch; próba krzyżowa metodą cytometrii przepływowej;

**HLA** – human leukocyte antigens; ludzkie antygeny zgodności tkankowej;

**HR** – high resolution; wysoka rozdzielczość;

**KPD** – kidney paired donation; przeszczepienie nerek w ramach wymiany pomiędzy niespokrewnionymi parami biorca-dawca;

**MFI** – mean fluorescence intensity; średnia intensywność fluorescencji;

**MHC** – major histocompatibility complex; główny układ zgodności tkankowej;

**NDSA** – non-donor specific antibodies; przeciwciała anti-HLA, które nie są skierowane przeciwko antygenom HLA potencjalnego dawcy;

**NGS** – next generation sequencing; sekwencjonowanie DNA nowej generacji;

**NIH** – National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA;

**PCR-SSOP** – polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotide probes; reakcja łańcuchowa polimerazy z zastosowaniem swoistych sond oligonukleotydowych;

**PCR-SSP** – polymerase chain reaction with sequence specific primers; reakcja łańcuchowa polimerazy z zastosowaniem sekwencji specyficznych primerów;

**PRA** – panel reactive antibodies; oznaczenie poziomu przeciwciał preformowanych;

**PRA-CDC** – panel reactive antibodies – complement dependent cytotoxicity assay; oznaczenie poziomu przeciwciał preformowanych metodą cytotoxyczności zależnej od dopełniacza;

**PXM** – physical crossmatch; próba krzyżowa biologiczna;

**ROC** – receiver operating characteristic; analiza statystyczna z wykorzystaniem krzywej ROC;

**RT-PCR** – real time polymerase chain reaction; reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym;

**SAB** – single antigen bead assay; oznaczenie przeciwciał anti-HLA metodą fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek opłaszczonych antygenami HLA;

**SBT** – sequencing based typing; sekwencjonowanie produktu łańcuchowej reakcji polimerazy;

**TCMR** – T cell mediated rejection; odrzucanie przeszczepu zależne od limfocytów T;

**VXM** – virtual crossmatch; wirtualna próba krzyżowa;

**XM** – crossmatch; próba krzyżowa;

## Streszczenie w języku polskim

Oznaczenie przeciwciał anty-HLA (human leukocyte antigens) techniką fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek SAB (single antigen beads) stanowi najbardziej czułą i swoistą metodę oceny zimmunizowania potencjalnych biorców nerki. Ponadto, umożliwia wykonanie wirtualnej próby krzyżowej (VXM – virtual crossmatch), która stanowi ważny element oceny ryzyka immunologicznego przed przeszczepieniem. Z wykorzystaniem VXM związanych jest jednak kilka kontrowersyjnych kwestii. Jedną z nich jest znaczenie kliniczne przeciwciał swoistych dla dawcy (DSA – donor-specific antibody), wykrytych wyłącznie metodą SAB. Drugim zagadnieniem spornym jest korelacja pomiędzy wynikami VXM a wynikami prób krzyżowych biologicznych (PXM – physical crossmatch), wykonywanych rutynowo przed transplantacją. Poniższa dysertacja podejmuje temat obydwu wymienionych kwestii w kontekście doświadczeń jednego ośrodka transplantacyjnego (Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie) oraz bieżących zasad alokacji biorców nerki obowiązujących w Polsce.

Celem pierwszej części pracy było zbadanie zdolności pojedynczych DSA oznaczonych metodą SAB do prognozowania wyników próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM – complement-dependent cytotoxicity crossmatch) oraz próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej (FLXM – flow cytometry crossmatch). W ramach realizacji projektu wykonano 261 CDC-XM oraz 180 FLXM w grupie potencjalnych biorców nerki posiadających pojedyncze przeciwciała anty-HLA -A, lub -B, lub -DR swoiste dla potencjalnych dawców zmarłych. Zdolność prognozowania wyników PXM oceniono na podstawie analizy ROC (receiver operating characteristics) w oparciu o wyniki anty-HLA SAB z okresu czterech miesięcy, które były zebrane przed i po wykonaniu PXM. Wyznaczono optymalne punkty odcięcia DSA MFI oraz wskaźniki wiarygodności (LR – likelihood ratio). Wpływ dostępności wyników anty-HLA SAB na wartość prognostyczną VXM został oceniony poprzez porównanie krzywych ROC. Ewaluacji poddano również kinetykę zmian poziomu DSA pomiędzy dostępnymi oznaczeniami anty-HLA SAB.

Wykazano, że zdolność pojedynczych DSA HLA -A, -B, -DR do prognozowania wyniku CDC-XM była mniejsza niż w przypadku FLXM. Przewidywanie wyniku FLXM odbywało się z dobrą dokładnością i wymagało niskiego punktu odcięcia MFI (mean

fluorescence intensity) DSA (około 6000). Natomiast prognozowanie wyniku CDC-XM odznaczało się niską dokładnością przy wysokiej wartości optymalnego punktu odcięcia (około 10 000 MFI). Kwartalna aktualizacja wyników anty-HLA SAB po wykonaniu PXM nie spowodowała istotnej poprawy prognostyki VXM w badanej grupie biorców.

Przyczyną zaobserwowanych różnic w jakości prognostyki FLXM i CDC-XM z wykorzystaniem pojedynczych DSA mogą być różnice w metodologii i czułości analizowanych metod prób krzyżowych. W celu poprawy zdolności VXM do prognozowania wyników PXM można rozważyć następujące rozwiązania: zwiększenie czułości CDC-XM, wprowadzenie systematycznej aktualizacji wyników anty-HLA SAB w oparciu o dane z systemu monitorowania zdarzeń immunizujących, rozszerzenie zakresu typowania antygenów HLA u potencjalnych dawców oraz inkorporację procedur eliminujących czynniki interferujące w oznaczenia anty-HLA SAB.

Druga część projektu skupiona była wokół analizy znaczenia klinicznego niskich poziomów DSA w kohorcie biorców nerki od dawcy żywego. W badaniu uwzględniono zarówno pre-transplantacyjne DSA o swoistości HLA –A, –B i –DR <5000 MFI, która to wartość stanowi punkt odcięcia VXM w Polsce, jak i DSA HLA –DQ, –DP, –Cw, które nie były rutynowo typowane u dawców w momencie trwania badania. Ponadto, w oparciu o dostępne wyniki oznaczenia anty-HLA SAB z okresu po transplantacji, w badanej kohorcie sprawdzono częstość występowania *de novo* DSA oraz pre-transplantacyjnych DSA wykazujących tendencję do utrzymywania się po przeszczepieniu.

Z historycznej kohorty biorców, którzy otrzymali przeszczep nerki od dawcy żywego w latach 2014-2018 w naszym ośrodku transplantacyjnym, wybrano grupę 55 pacjentów stosując następujące kryteria włączenia: wiek >18 lat, dawca niebędący HLA-identycznym rodzeństwem, brak terapii odczulającej, dostępny wynik oznaczenia anty-HLA SAB z okresu przed przeszczepieniem oraz negatywne wyniki CDC-XM i FLXM. W zależności od wykrytych reaktywności DSA u biorców, wykonano uzupełniające typowanie HLA –DQ, –DP lub –Cw dawców. W celu oceny wyników transplantacji pacjentów podzielono na trzy grupy: DSA pozytywnych, posiadających przeciwciała anty-HLA niebędące DSA (NDSA – non-donor specific antibody) oraz biorców, u których nie wykazano obecności żadnych przeciwciał anty-HLA (grupa negatywna). Okres obserwacji wynosił trzy lata.



W badanej kohorcie wykazano obecność niskich pre-transplantacyjnych DSA u 33% pacjentów. Znakomita większość (78%) zaobserwowanych DSA była o swoistości HLA –DQ, –DP oraz –Cw, z których najwyższe MFI wyniosło 5767 dla DSA DQ2, a najniższe przybrało wartość 319MFI dla DSA DP4. Spośród reaktywności DSA HLA –A, –B, –DR najwyższą wartość MFI (2191) osiągnęły DSA DR52.

Obecność niskich pre-transplantacyjnych DSA nie wpłynęła na wielkość przesączania kłębuszkowego wyrażonego wartością eGFR (estimated glomerular filtration rate) ani na częstość występowania proteinurii u biorców. Przeżywalność przeszczepu w grupie DSA wyniosła 94,4% i była w sposób nieistotny niższa ( $p=0.7$ ) w stosunku do grup NDSA (100%) i negatywnej (100%). W 3-letnim okresie obserwacji nie odnotowano w kohorcie żadnego przypadku ostrego odrzucania zależnego od przeciwciał potwierdzonego biopsją, co przemawia za tym, że pacjenci posiadający niskie DSA nie są narażeni na częstsze występowanie epizodów ostrego odrzucania. W grupie DSA-pozytywnych pacjentów odnotowano jednak tendencję do częstszego występowania przeciwciał *de novo* DSA oraz złogów C4d w kapilarach około cewkowych (PTC – peritubular capillaries).

Wyniki uzyskane w obecnym projekcie mogą w istotny sposób przyczynić się do skutecznego wykorzystania informacji wynikających z oceny DSA w transplantologii nefrologicznej. Ze względu na ograniczenia badania, w tym niską liczebność badanej kohorty, w celu wyjaśnienia poczynionych obserwacji, niezbędne są dalsze badania z udziałem większej grupy biorców w dłuższym okresie obserwacji.

## **Streszczenie w języku angielskim**

Virtual crossmatch (VXM) is a new powerful tool in pre-transplant risk assessment. However, the ability of VXM to predict physical crossmatch (PXM) results remains controversial. It is also questionable whether all donor-specific antibodies (DSA) detected by the solid-phase single antigen bead (SAB) assay negatively affect kidney transplantation outcomes. The following dissertation deals with both of these issues in the context of the experience of one transplantation center (Infant Jesus Clinical Hospital in Warsaw) and the current rules for the allocation of kidney recipients in Poland.

The aim of the first part of our study was to evaluate the predictive potential of VXM results, measured by SAB, for prediction of CDC-XM (complement-dependent cytotoxicity crossmatch) and FLXM (flow cytometry crossmatch) results of DSA in sensitized patients.

As part of the first objective, 261 CDC-XM and FLXM measurements were performed for 180 potential kidney transplant candidates, each with a single HLA-A, -B, or -DR DSA against a potential deceased donor. Analysis was conducted with two SAB datasets of four-month distant and collected prior to and after PXM results. Optimal MFI (mean fluorescence intensity) thresholds and likelihood ratios were assigned based on low (<2000 MFI), medium (2001–5000 MFI) and high risk (>5000 MFI). The impact of VXM predictability was determined by the ROC curves comparison. In addition, inter-assay changes of MFI were evaluated.

The accuracy of VXM to predict CDC-XM was inferior to that of FLXM with the AUC (area under ROC curve) of 0.644 vs. 0.849 values, respectively. In contrast, the initial ROC analysis showed that the VXM prediction was good for both T-FLXM with ROC value of 0.849 and by B-FLXM with ROC value of 0.706 for a single antigen of HLA-A, -B, or -DR DSA. In fact, the best VXM prediction was for FLXM with good sensitivity for B-FLXM against HLA-DR-specific DSA (0.851). Similar results of VXM predictability were observed for pre- and post-crossmatch ROC curves.

VXM predictability is better for positive/negative FLXM than for positive/negative CDC-XM results to evaluate a single HLA-A, -B, -DR DSA disparity. This may be related to the fact that VXM and FLXM rely on binding of antibodies to beads or cells, respectively. In contrast, VXM is less predictive for CDC-XM because the latter measures complement-dependent cytotoxic function. In order to improve the VXM's ability to predict PXM results, the following modifications may be considered: increasing the sensitivity of CDC-XM, incorporation of a systematic update of anti-HLA SAB results based on data from the immunization event monitoring system, extending the range of HLA antigen typing in potential donors, and introducing procedures eliminating interferences in the anti-HLA SAB assay.

The subject of the second part of the dissertation was the evaluation of the possible clinical significance of low pre-transplant DSA in living donor kidney recipients. We analyzed a group of patients with HLA-A, -B, and -DR DSA reactivities below a virtual crossmatch (VXM) value of 5000 MFI but with all VXM DSA reactivities at HLA-DQ, -DP, and -Cw,

which were not typed routinely for donors prior to transplantation. We also investigated the incidence of persistent and *de novo* DSAs in available posttransplant SAB assays.

From the historical cohort of living donor recipients transplanted between 2014 and 2018 at our center ( $n = 82$ ), 55 patients met the inclusion criteria, namely: these patients were  $> 18$  years old with non-HLA identical sibling donors, who were not desensitized, who had available pre-transplant SAB results, and who had negative both complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDC-XM) and flow cytometry crossmatch (FLXM) results. An additional donor HLA typing, performed for all 55 recipients, identified donor additional HLA-DQ, -DP, and -Cw DSA reactivities. These patients were then divided by SAB reactivity into three groups: 1) those with DSA-positive reactivities; 2) those with non-donor-specific anti-HLA reactivities (NDSA); and, 3) those who were anti-HLA-negative. All these recipients were followed for three years and checked for their *de novo* or persistent DSA.

In the studied cohort, DSA-positive, NDSA reactive, and anti-HLA negative recipients constituted 33%, 36%, and 31% of 55 patients, respectively. Non-routinely considered pre-transplant HLA-DQ, -DP, and -Cw DSA-positive reactivities were shown in as many as 78% of DSA-positive cases (group 1) with the lowest MFI value of 319 to DP4 and the highest MFI of 5767 to DQ2. Of the pre-transplant HLA-A, -B, and -DR DSA reactivities, only -DR52 DSA reactivity reached the highest MFI value of 2191. These detected DSAs did not reduce the mean estimated glomerular filtration rate (eGFR) values and did not increase the incidence of proteinuria in recipients. While the 3-year graft survival tended to be lower in the DSA-positive group (94.4%) with one recipient who lost kidney transplant, the difference was not significantly different ( $p = 0.7$ ) from the NDSA (100%) and negative (100%) groups. In terms of the incidence of *de novo* acute antibody-mediated rejection (AMR) at three years after transplantation, no case has been reported in the cohort. This may suggest that low DSA-positive recipients do not experience higher rejection rate. However, DSA-positive recipients had a tendency for a higher frequency of C4d deposits in peritubular capillaries (PTC) and *de novo* DSA.

Our 3-year follow-up of patients with low pre-transplant DSA found no association with a deterioration in graft function and worse graft survival. Furthermore, we did not observe an increase in AMR in our patients with low DSA. A larger cohort and a longer follow-up period may be needed to evaluate the tendency of low DSA-positive recipients towards the higher incidence of C4d deposits in PTC and/or *de novo* DSA.

## **Spis treści:**

<b>1</b>	<b>Wstęp</b>	<b>13</b>
1.1	Wprowadzenie	13
1.2	Ocena ryzyka immunologicznego przed transplantacją nerki	15
1.2.1	Charakterystyka kliniczna biorecy i dawcy	15
1.2.2	Charakterystyka immunologiczna biorecy	16
1.2.2.1	Historia zdarzeń immunizujących	16
1.2.2.2	Ocena laboratoryjna poziomu immunizacji biorecy	18
1.2.3	Typowanie antygenów zgodności tkankowej HLA	24
1.2.4	Próba krzyżowa	26
1.2.4.1	Próba krzyżowa biologiczna	28
1.2.4.2	Wirtualna próba krzyżowa	32
1.3	Ocena ryzyka immunologicznego u potencjalnych biorców nerki w Polsce	34
1.4	Optymalizacja wirtualnej próby krzyżowej	38
<b>2</b>	<b>Założenia i cel pracy</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Kopie opublikowanych prac</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Podsumowanie i wnioski</b>	<b>59</b>
4.1	Podsumowanie	59
4.2	Wnioski	67
<b>5</b>	<b>Piśmiennictwo</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Opinia komisji bioetycznej</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Oświadczenia</b>	<b>79</b>

# 1. Wstęp

## 1.1 Wprowadzenie

Transplantacja stanowi optymalną metodę leczenia schyłkowej niewydolności nerek. W porównaniu z długotrwałą dializoterapią przeszczepienie narządu w sposób istotny poprawia jakość życia i przeżywalność pacjentów, obniżając jednocześnie koszty leczenia[1]. Głównym czynnikiem ograniczającym czas przeżycia alloprzeszczepu nerki jest proces odrzucania spowodowany rozpoznaniem obcych antygenów zgodności tkankowej HLA (human leukocyte antigens) dawcy przez układ immunologiczny biorcy[2]. W czasie sześciu dekad jakie upłynęły od pierwszego udanego zabiegu transplantacji nerki w 1954 roku, wiedza na temat mechanizmów odpowiedzi immunologicznej na alloprzeszczep uległa znacznemu poszerzeniu. Dzięki temu możliwe było powstanie nowoczesnych leków immunosupresyjnych, jak i zaawansowanych metod diagnostycznych, które przyczyniły się do znaczącego obniżenia częstości występowania epizodów ostrego odrzucania u biorców.

W przeszłości za główną przyczynę odrzucania przeszczepu uznawano mechanizmy związane z limfocytami T[3, 4]. Obecnie wiadomo jednak, że krytyczną rolę zarówno w ostrym jak i przewlekłym odrzucaniu pełnią również mechanizmy humoralne, w których uczestniczą limfocyty B oraz przeciwciała przeciwko antygenom HLA dawcy (DSA – donor specific antibodies)[4]. O zdolności przeciwciał do uszkodzenia przeszczepu świadczy fakt, że w mechanizmie odrzucania nadostrego wysoki poziom preformowanych DSA u biorcy może doprowadzić do niewydolności przeszczepionej nerki w kilka minut po transplantacji. Aktualnie ryzyko wystąpienia tego rodzaju odrzucania u biorców jest niewielkie. Stało się tak dzięki wprowadzeniu w latach 60' XX wieku próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM – complement-dependent cytotoxicity crossmatch), która umożliwia detekcję wysokich mian cytotoksycznych DSA w surowicy biorcy [5]. Metoda ta jednak charakteryzuje się niską czułością i nie wykrywa niskich mian preformowanych DSA, które poprzez udział we wczesnym i późnym ostrym odrzucaniu zależnym od przeciwciał (AMR-antibody-mediated rejection) również mogą wywierać niekorzystny wpływ na przeżywalność przeszczepu[2].

Podczas AMR przeciwciała preformowane biorcy wiążą się z antygenami HLA obecnymi na powierzchni komórek śródbłonka naczyń przeszczepu. Oddziaływania te prowadzą do

aktywacji układu dopełniacza zarówno drogą klasyczną, jak i w mechanizmie cytotoxyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC – antibody dependent cell cytotoxicity). Następstwem obydwu jest uszkodzenie i apoptoza komórek endotelium naczyń przeszczepionej nerki, która prowadzi do produkcji czynników inicjujących agregację płytek oraz cytokin i chemokin stymulujących rekrutację leukocytów do miejsca zapalenia[6]. W wyniku ostrego AMR obserwuje się pogorszenie funkcji przeszczepu, którego manifestacją jest podwyższony poziom kreatyniny w surowicy biorcy oraz proteinuria.

Obecność preformowanych przeciwciał anti-HLA stanowi główny czynnik ryzyka wczesnego odrzucania i utraty przeszczepionej nerki[7]. Spośród dostępnych metod diagnostycznych, najbardziej czułą techniką wykrywania i charakteryzowania przeciwciał anti-HLA jest oznaczenie fazy stałej z wykorzystaniem mikrosfer opłaszczonych antygenami HLA (SAB – single antigen beads)[8]. Badanie to umożliwia wykonanie wirtualnej próby krzyżowej (VXM – virtual crossmatch) polegającej na sprawdzeniu obecności DSA u biorcy poprzez porównanie wyniku oznaczenia anti-HLA SAB pacjenta z wynikiem oznaczenia antygenów HLA potencjalnego dawcy. Inkorporacja VXM do rutynowych procedur oceny ryzyka immunologicznego przed transplantacją nerki stwarza możliwość przewidywania wyników biologicznych prób krzyżowych (np. CDC-XM) oraz usprawnienia i skrócenia procesu alokacji biorców[9-13].

Pewne aspekty praktycznego zastosowania wirtualnej próby krzyżowej pozostają jednak nadal kontrowersyjne w środowisku transplantologicznym[14]. Po pierwsze, nie ma jednomyślności pomiędzy klinicystami w kwestii zdolności VXM do przewidywania wyników biologicznych prób krzyżowych. Ponadto niepewne pozostaje znaczenie kliniczne niskich mian pre-transplantacyjnych DSA wykrytych metodą SAB[14, 15]. Celem poniższej rozprawy doktorskiej było zbadanie wybranych kwestii z obydwu wymienionych zagadnień.

## 1.2 Ocena ryzyka immunologicznego przed transplantacją nerki

Ocena ryzyka immunologicznego u biorców przed transplantacją nerki stanowi narzędzie umożliwiające optymalny dobór leczenia immunosupresyjnego oraz zminimalizowanie częstości występowania epizodów ostrego odrzucania przeszczepu[16].

Standardowy algorytm oceny ryzyka uwzględnia:

- a) charakterystykę kliniczną biorcy i dawcy;
- b) charakterystykę immunologiczną biorcy (historia zdarzeń immunizujących i wyniki oceny laboratoryjnej poziomu immunizacji);
- c) wyniki badań laboratoryjnych wykorzystywanych przy doborze immunologicznym pary biorca-dawca (oznaczenie antygenów HLA, próby krzyżowe biologiczne, próba krzyżowa wirtualna)[3].

### 1.2.1 Charakterystyka kliniczna biorcy i dawcy

Przed transplantacją nerki para biorca-dawca oceniana jest pod kątem występowania czynników o udowodnionym niekorzystnym wpływie na wynik przeszczepienia. Jednym z ocenianych kryteriów jest wiek biorcy i dawcy. Biorcy poniżej 45 roku życia są bardziej narażeni na suboptymalne wyniki transplantacji ze względu na większe ryzyko braku adherencji do zaleceń lekarzy[17]. Natomiast u biorców pediatrycznych czynnikiem o niekorzystnym wpływie jest zmienność farmakokinetyki leków immunosupresyjnych związana ze zmianami rozwojowymi w aktywności enzymów[18, 19].

W przypadku dawców, wiek >65 lat związany jest z większym ryzykiem wystąpienia u biorcy opóźnionej funkcji przeszczepu (DGF – delayed graft function) oraz jego ostrego odrzucania i niewydolności. Długoterminowa przeżywalność nerki od starszego dawcy jest niższa, co stanowi często podstawę do preferencyjnego doboru biorcy w zbliżonym wieku.

Wynik transplantacji zależy również od rodzaju dawcy. W porównaniu z przeszczepieniem od dawcy zmarłego, transplantacja od dawcy żywego związana jest z wieloma potencjalnymi korzyściami dla biorcy, spośród których można wymienić: krótszy czas zimnego niedokrwienia, skrócenie czasu dializoterapii, możliwość przeszczepienia wyprzedzającego (pre-

emptive), poszerzenie puli dostępnych dawców oraz mniejsze obostrzenia czasowo-organizacyjne, które pozytywnie wpływają na dobór i oszacowanie ryzyka[20]. Pomimo wysokiej skuteczności nowoczesnych leków immunosupresyjnych wyniki przeszczepienia nerki od dawcy żywego są nadal lepsze w porównaniu z tymi uzyskiwanymi po transplantacji od dawcy zmarłego[3].

Czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo utraty przeszczepu jest transplantacja nerki od dawcy spełniającego graniczne kryteria w zakresie wieku, chorób towarzyszących, czy też przyczyny zgonu. Jak wykazały badania, organy od takich dawców są bardziej podatne na występowanie procesu zapalnego spowodowanego uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym, z czym związana jest częstsza pierwotna niewydolność przeszczepionej nerki i większe ryzyko DGF[21].

Pomimo iż nie ma wystarczających dowodów na bezpośredni związek pomiędzy czasem trwania dializoterapii a częstością występowania epizodów ostrego odrzucania przeszczepu, to ze względu na większe ryzyko immunizacji i wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych każdy kolejny rok terapii nerko-zastępczej traktowany jest jako czynnik ryzyka dla biorcy[16].

Spośród innych parametrów, które są często brane pod uwagę podczas oceny ryzyka związanego z przeszczepieniem wymienia się również: płeć żeńską i BMI (body mass index) >35 kg/m<sup>2</sup> dawcy oraz nikotynizm i chorobę wieńcową serca biorcy[16, 17]. Ponadto na większe ryzyko wystąpienia ostrego odrzucania przeszczepu narażeni są czarnoskórzy pacjenci[16].

## **1.2.2 Charakterystyka immunologiczna biorcy**

### **1.2.2.1 Historia zdarzeń immunizujących**

Alloimmunizacja stanowi istotny czynnik o niekorzystnym wpływie na wynik transplantacji nerki[22]. Przyczyną immunizacji jest w dużej mierze ekspozycja układu immunologicznego na inne niż własne antygeny HLA[23]. Nasilenie stopnia immunizacji zależy między innymi od wieku i płci biorcy, przyczyny uczulenia, ładunku antygenowego zdarzenia oraz różnic osobniczych w reaktywności układu immunologicznego[24, 25]. Do najczęstszych przyczyn immunizacji, uszeregowanych malejąco pod względem siły bodźca uczulającego, należą: ciąża, poprzednie transplantacje oraz przetoczenie krwi[26].

Podczas prawidłowej ciąży układ immunologiczny matki wykazuje tolerancję w stosunku do płodu. U większości kobiet na etapie ciąży bądź porodu dochodzi do przenikania niewielkich



objętości krwi dziecka do krwioobiegu matki (przeciek matczyno-płodowy)[27]. Następstwem może być immunizacja matki i powstawanie przeciwciał swoistych dla antygenów HLA płodu odziedziczonych od ojca. W przeszłości częstość immunizacji kobiet po pierwszej ciąży oceniano na 1-10%[23, 26]. Aktualnie, dzięki wysokoczułym technikom oznaczenia przeciwciał anti-HLA, odsetek ten szacuje się nawet na 47,9%[28]. Każda kolejna ciąża wiąże się z silniejszą immunizacją, dlatego pacjentki po wielokrotnych ciążach są obciążone wysokim ryzykiem wystąpienia epizodów ostrego odrzucania w przypadku przeszczepienia nerki od dziecka lub partnera[23]. W wyniku re-stymulacji układu immunologicznego pacjentki antygenami HLA przeszczepu, przeciwko którym nabyta została pamięć immunologiczna podczas ciąży, ma miejsce gwałtowny wzrost DSA w stopniu wyższym i w czasie krótszym niż ma to miejsce w przypadku immunizacji na skutek poprzedniego przeszczepienia czy przetoczenia krwi[29]. Aby zminimalizować ryzyko odrzucania przeszczepu u pacjentek które były w ciąży, zaleca się wykonanie oznaczenia antygenów HLA u partnera lub dzieci. Umożliwia to identyfikację potencjalnie immunizujących niezgodności HLA, których znajomość może istotnie wpłynąć na wynik wirtualnej próby krzyżowej oraz decyzję o przeszczepieniu.

Drugą co do intensywności przyczyną immunizacji jest poprzednie przeszczepienie. W tym przypadku powstawanie alloprzeciwciał jest następstwem niezgodności pod względem antygenów HLA w parze biorca-dawca. Ryzyko immunizacji biorcy rośnie wraz z liczbą otrzymanych niezgodności HLA. Częstość występowania DSA u pacjentów po transplantacji waha się pomiędzy badaniami od 1,6-60% i zależy między innymi od metody oznaczenia przeciwciał anti-HLA, schematu immunosupresji, badanej populacji biorców oraz czasu pobrania badanych surowic[30]. Silna immunizacja w następstwie niskiej zgodności HLA w parze biorca-dawca może w przyszłości znacząco ograniczyć szanse biorcy na kolejną transplantację[31]. Poziom przeciwciał anti-HLA u biorców oczekujących na re-transplantację zależy od decyzji związanych z kontynuacją bądź wycofaniem immunosupresji oraz od tego, czy niewydolny przeszczep został usunięty. Badania wykazały, że wycofanie leczenia immunosupresyjnego wraz z graftektomią wiąże się z silniejszym wzrostem immunizacji niż w przypadku zachowania przeszczepu *in situ*[32]. W wyniku graftektomii średni poziom preformowanych przeciwciał anti-HLA (PRA – panel reactive antibodies) może wzrosnąć do 83-100%, z czym wiąże się drastyczny spadek szans biorcy na kolejne przeszczepienie.

Pacjenci poddawani dializoterapii są grupą szczególnie narażoną na wystąpienie anemii ze względu na niedobór erytropoetyny. Pomimo wprowadzenia leków stymulujących erythropoezę, przetoczenie krwi nadal jest często stosowaną metodą leczenia niedokrwistości u potencjalnych biorców nerki. W celu zredukowania ryzyka immunizacji związanego z transfuzją, pacjentom przetaczane są ubogoleukocytarne preparaty krwi. Mimo to, nawet 20% biorców ulega immunizacji w wyniku pojedynczego przetoczenia krwi[1, 33]. Przyczyną powstawania przeciwciał są głównie antygeny HLA obecne na resztkowej populacji leukocytów ( $15 \times 10^6$ ) w przetaczanym preparacie. Źródłem immunizacji mogą być również cząsteczki HLA obecne na erytrocytach (90 cząsteczek/erytrocyt), płytkach krwi (50-120 000 cząsteczek HLA/trombocyt) oraz w osoczu[26]. Chociaż przetoczenie krwi nie jest silnym czynnikiem immunizującym, to może znacząco ograniczyć pulę dostępnych dawców szczególnie u biorców narażonych w przeszłości na inne czynniki immunizujące[33].

Poza zdarzeniami immunizującymi główną przyczyną istotnych zmian w poziomie i repertuarze przeciwciał anti-HLA są infekcje, na które potencjalni biorecy nerki są szczególnie podatni. Dlatego też ocena poziomu zimmunizowania u biorców wymaga ciągłego aktualizowania w oparciu o systematyczne monitorowanie zdarzeń o charakterze immunizującym[34].

#### **1.2.2.2 Ocena laboratoryjna poziomu immunizacji biorecy**

Narzędziem służącym do oceny i monitorowania poziomu immunizacji biorecy przed transplantacją nerki jest oznaczenie PRA wykonywane rutynowo raz na trzy miesiące. W najprostszej wersji badanie to przeprowadzane jest metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC - complement-dependent cytotoxicity). Badanie PRA-CDC oparte jest na testowaniu surowicy biorecy na obecność przeciwciał przeciwko panelowi limfocytów pochodzących od 30-60 zdrowych dawców krwi. Do stworzenia panelu dawcy dobierani są najczęściej przypadkowo, a wysoka liczebność grupy ma zapewnić reprezentatywność pod względem częstości występowania antygenów HLA w danej populacji. Podczas oznaczenia surowica biorecy jest inkubowana z panelem limfocytów, a następnie dodawany jest dopełniacz egzogenny (np. króliczy). Jeśli w badanej surowicy obecne są wysokie miana przeciwciał cytotoksycznych wiążących się z powierzchnią limfocytów dawcy, dochodzi do aktywacji kaskady układu dopełniacza drogą klasyczną. Powstaje wtedy kompleks atakujący błonę komórkową, który doprowadza do lizy komórek dawców[35]. Po dodaniu barwnika

różnicującego (np. eozyna), oceniany jest odsetek martwych komórek w polu widzenia zgodnie ze skalą punktową NIH (National Institutes of Health): 1-1-10%, 2-11-20%, 4-21-50%, 6- 50-80%, 8-81-100%[36]. Wynik dodatni z danym dawcą jest formułowany najczęściej, gdy stwierdzono więcej niż 20% martwych komórek[35]. Ostateczny wynik oznaczenia PRA wyrażany jest, jako % dawców z panelu, z którym badany biorca uzyskał wynik dodatni. Poziom PRA% może być interpretowany, jako odsetek potencjalnych dawców nerki, z którym badany biorca z dużym prawdopodobieństwem uzyska pozytywny wynik próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM), który stanowi przeciwwskazanie do transplantacji.

Niekwestionowaną zaletą oznaczenia PRA-CDC jest wykorzystanie żywych komórek, jako źródła antygenów HLA, co sprawia, że badanie to odzwierciedla reakcje antygen-przeciwciała, jakie występują w warunkach *in vivo*. Spośród najważniejszych wad tej metody należy wymienić niską czułość. Ponadto, technika PRA-CDC obciążona jest wysokim ryzykiem wyników fałszywie pozytywnych w następstwie wiązania przeciwciał swoistych dla antygenów innych niż HLA, autoprzeciwciał oraz nieswoistych przeciwciał IgM[37]. Ograniczeniem tej techniki jest również ryzyko niedoszacowania poziomu immunizacji na skutek niepełnej reprezentacji antygenów HLA w panelu limfocytów użytych do badania. Dodatkowo, bez zastosowania panelu limfocytów o znanych antygenach HLA, oznaczenie PRA-CDC nie pozwala na precyzyjne określenie swoistości wykrytych przeciwciał.

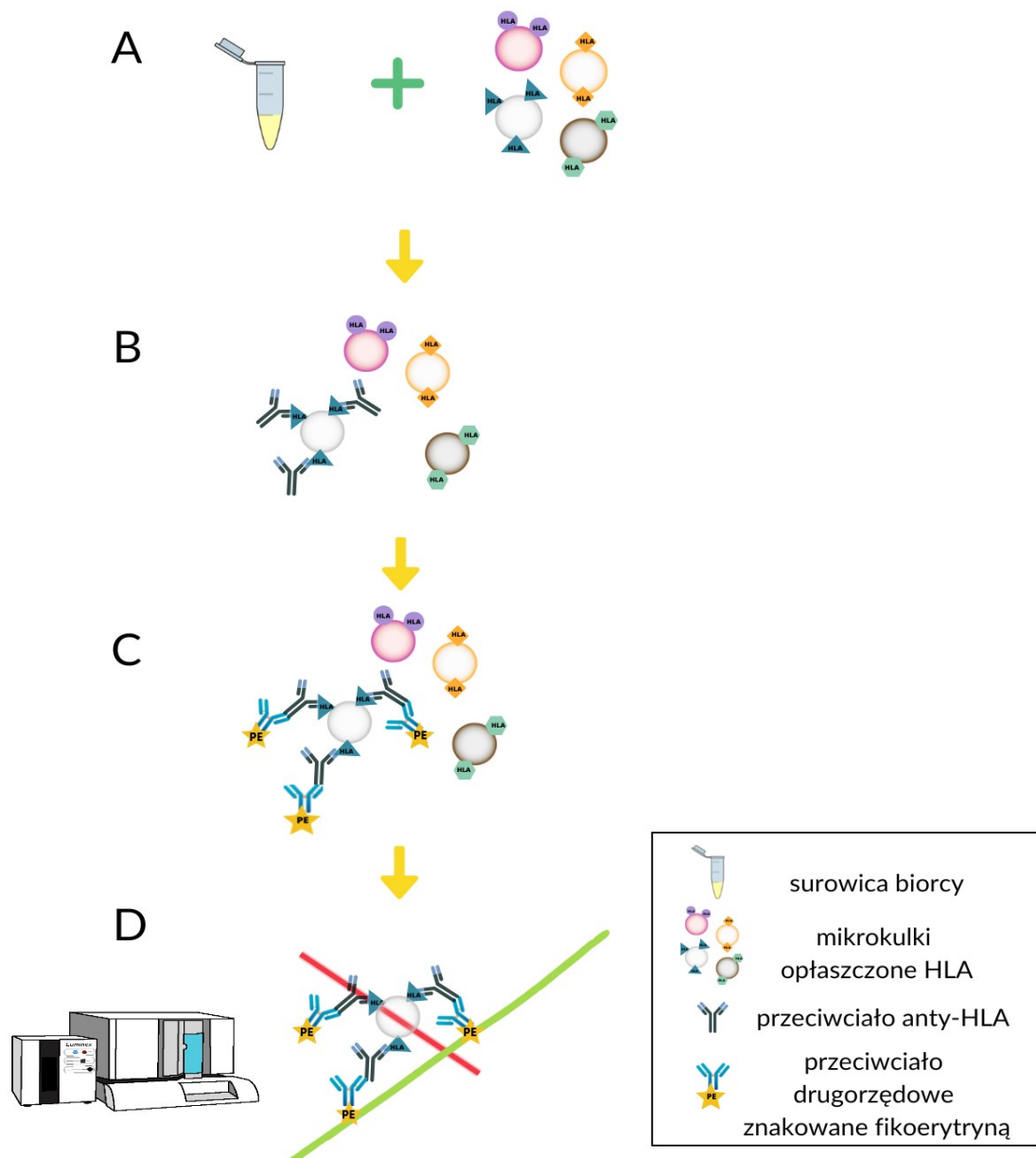
Metodą pozwalającą na podwyższenie czułości badania PRA-CDC jest zastosowanie globuliny antyludzkiej (AHG - anti-human globulin), która wiążąc się z każdym DSA zwiększa liczbę dostępnych receptorów Fc dla składowej dopełniacza C1[35]. W przypadku podejrzenia obecności nieswoistych przeciwciał IgM u biorcy, zaleca się wykonywanie PRA-CDC w wersji rutynowej oraz ze związkami inaktywującym przeciwciała IgM (1, 4-ditiotreiolem, DTT)[38]. Takie postępowanie zmniejsza ryzyko wystąpienia wyników fałszywie dodatnich.

Drugą metodą stosowaną powszechnie w ocenie poziomu zimmunizowania potencjalnych biorców nerki są techniki fazy stałej. Nośnikiem antygenów HLA w tym przypadku nie są żywe komórki, lecz matryca z ciała stałego - płytka (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay) lub plastikowe mikrokulki (beads). Te ostatnie zapewniają najwyższą czułość i swoistość w wykrywaniu przeciwciał anti-HLA[39]. Do oznaczenia PRA można wykorzystać zarówno mikrokulki opłaszczane HLA klasy I lub HLA klasy II (screening beads, FlowPRA), jak i zestaw

kulek, z których każda posiada wyłącznie jeden rodzaj antygeny HLA (single antigen beads, SAB) (**Rycina 1**)[37]. Podczas wymienionych badań zakodowane fluorescencyjnie kulki inkubowane są z surowicą biorcy. Następnie dodawane jest znakowane fluorescencyjnie przeciwciało detekcyjne (anty-ludzie IgG). Badana próbka jest wprowadzana do aparatu Luminex lub cytometru, gdzie mierzone są dwa sygnały fluorescencyjne. Pierwszy z nich pozwala na identyfikację mikrokulek (swoistości HLA), a drugi umożliwia ocenę poziomu wykrytych przeciwciał anti-HLA.

Do oznaczenia FlowPRA stosowany jest panel 60 mikrokulek, z których każda opłaszczona jest antygenami HLA pochodzącymi z pojedynczej linii komórkowej. Panel kulek jest tak wyselekcjonowany, aby zawierał zarówno częste jak i rzadko występujące antygeny HLA[40]. Technika FlowPRA umożliwia wykrywanie przeciwciał anti-HLA IgG wiążących i niewiążących dopełniacza. Poziom PRA jest określany na podstawie odsetka mikrokulek, które pozytywnie zareagowały z badaną surowicą. W porównaniu z PRA-CDC, technika FlowPRA jest bardziej czuła i odporna na interferencję ze strony autoprzeciwciał [40]. Ponadto badanie to pozwala na określenie swoistości wykrywanych przeciwciał w zakresie klasy HLA. Pomimo deklarowanej przez producenta reprezentatywności panelu kulek wykorzystywanych we FlowPRA, istnieje ryzyko, że wynik uzyskany tą metodą w mniejszym stopniu odzwierciedla rzeczywiste prawdopodobieństwo znalezienia dawcy ze względu na brak odniesienia do częstości fenotypów HLA w konkretnej populacji[39].

W technice SAB, próbka analizowana jest z użyciem platformy Luminex, a poziom przeciwciał swoistych dla poszczególnych antygenów HLA oceniany jest w sposób ilościowy i wyrażany w jednostkach średniej intensywności fluorescencji (MFI - mean fluorescence intensity). Mając do dyspozycji wynik oznaczenia przeciwciał anti-HLA metodą SAB oraz wytyczone kryteria definiowania nieakceptowalnych niezgodności HLA, poziom PRA można wyliczyć (cPRA –calculated panel reactive antibodies) na podstawie częstości występowania poszczególnych antygenów HLA w danej populacji.



**Rycina 1. Schemat wykonania oznaczenia poziomu i swoistości przeciwciał anti-HLA metodą fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek Single Antigen Beads (SAB).**

Surowica biorcy inkubowana jest z kulkami SAB, z których każda posiada na swojej powierzchni jeden rodzaj cząsteczek układu zgodności tkankowej (HLA) (A). Jeżeli w badanej surowicy obecne są przeciwciała anti-HLA to wiążą się one z HLA na odpowiedniej kulce (B). Kompleks kulka-przeciwciała anti-HLA jest wykrywany poprzez dodanie przeciwciała drugorzędowego znakowanego fikoerytryną (PE) (C). Podczas analizy w aparacie Luminex (D) na kulki świecą dwa lasery. Laser czerwony wzbudza fluorescencję barwnika identyfikując kulkę i związany z nią antygen HLA. Laser zielony wzbudza fluorescencję znacznika (PE) przeciwciała drugorzędowego. Na podstawie detekcji dwóch sygnałów oceniana jest swoistość i poziom przeciwciał anti-HLA w surowicy biorcy. Poziom przeciwciał anti-HLA oceniany jest w sposób ilościowy w stosunku do kontroli negatywnej i wyrażany jest w jednostkach średniej intensywności fluorescencji (MFI).

Metody fazy stałej charakteryzuje wysoka czułość, swoistość, powtarzalność oraz obiektywność w detekcji przeciwciał anti-HLA[41]. Ze względu na wykorzystanie reprezentatywnych baz zbierających dane na temat częstości fenotypów HLA w danej populacji szansa na niedoszacowanie immunologiczne w przypadku cPRA jest istotnie mniejsza niż w przypadku PRA-CDC. To czy poziom cPRA prawidłowo odzwierciedla szanse danego biorcy na przeszczepienie zależy jednak od interpretacji wyniku oznaczenia przeciwciał anti-HLA SAB, podczas której należy wziąć pod uwagę ograniczenia tej metody (**Tabela 1**). Najważniejszym z nich jest brak zdolność tej techniki do różnicowania przeciwciał cytotoksycznych. Dlatego też znaczenie kliniczne DSA wykrytych metodą SAB, w szczególności o niskim MFI, nie jest jednoznaczne[42]. Ponadto, oznaczenie SAB obciążone jest ryzykiem wystąpienia wyników fałszywie negatywnych w następstwie efektu prozonalnego, zjawiska współdzielenia epitopów przez różne cząsteczki HLA (epitope sharing) bądź interferencji ze strony przeciwciał IgM, endogennego dopełniacza lub leków [37].

Wysoki poziom PRA jest uważany za wskaźnik podwyższonego ryzyka immunologicznego i często stanowi wykładnię dla decyzji związanych z leczeniem immunosupresyjnym[17]. Cykliczne monitorowanie PRA pozwala na wyodrębnienie biorców wysokoimmunizowanych (PRA>80%), u których prawdopodobieństwo znalezienia dawcy jest najniższe. W celu zwiększenia szansy na przeszczepienie pacjenci ci mogą otrzymywać dodatkowe punkty w systemie alokacji lub być włączani do programów przeszczepienia nerki od dawcy niespokrewnionego (KPD – kidney paired donation). Popularne są również programy transplantacyjne, w ramach których indywidualnie określone są tak zwane akceptowalne niezgodności (acceptable mismatch programs) HLA, przeciwko którym pacjent nie wytworzył przeciwciał [43-45]. Pośród nich na szczególną uwagę zasługuje program HLA Matchmaker, w którym biorca i dawca dobierani są w zakresie epitopów HLA, czyli sekwencji aminokwasowych, które są rozpoznawane przez limfocyty B i mogą stymulować produkcję przeciwciał u biorcy[46].

Nieprawidłowa ocena poziomu zimmunizowania może wpłynąć niekorzystnie na czas oczekiwania biorcy na przeszczepienie. Ze względu na ograniczenia powyższych technik zaleca się, aby ocena repertuaru i poziomu przeciwciał anti-HLA u potencjalnych biorców była wykonywana na podstawie wyników uzyskanych różnymi metodami z uwzględnieniem historii medycznej i danych klinicznych pacjenta[3].

**Tabela 1. Wybrane kwestie problematyczne związane z oznaczeniem przeciwciał anti-HLA<sup>a</sup> metodą fazy stałej z wykorzystaniem mikrokulek SAB(single antigen beads).**

<b>Zagadnienie</b>	<b>Znaczenie diagnostyczne</b>
<b>półilościowa ocena poziomu przeciwciał</b>	Wynik badania wyrażony w jednostkach MFI <sup>b</sup> nie odzwierciedla rzeczywistego poziomu przeciwciał anti-HLA. Właściwa interpretacja wymaga korelacji z wynikami innych badań oraz danymi klinicznymi pacjenta.
<b>brak dowodów na znaczenie kliniczne wykrytych przeciwciał</b>	Nie ma możliwości jednoznacznego określenia zdolności wykrytych przeciwciał anti-HLA do aktywacji dopełniacza w warunkach <i>in vivo</i> , jak również do wywoływania epizodów ostrego odrzucania.
<b>interferencja endogennego układu dopełniacza biorcy oraz przeciwciał IgM</b>	Zaburzenie wiązania drugorzędowych przeciwciał detekcyjnych, które może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie negatywnych.
<b>efekt prozonalny</b>	W przypadku testowania wyłącznie nierozcieńczonej surowicy biorcy istnieje ryzyko wyniku fałszywie ujemnego. U pacjentów wysokokozimmunizowanych należy rozważyć rozcieńczenie próbki.
<b>różnice w gęstości antygenów HLA na powierzchni kulek w porównaniu z gęstością na powierzchni komórek</b>	Poziom wykrytych przeciwciał może być zaniżony lub zawyżony, co może powodować niewłaściwą ocenę znaczenia klinicznego przeciwciał i ryzyka z nimi związanego.
<b>zaburzenia struktury antygenów HLA na powierzchni kulek z powodu denaturacji w procesie produkcji</b>	Epitopy HLA obecne na kulkach SAB mogą być inne niż te występujące w warunkach <i>in vivo</i> na komórkach, dlatego istotność kliniczna wykrytych przeciwciał może być wątpliwa. Stanowi potencjalne źródło wyników fałszywie pozytywnych.
<b>różnice w składzie antygenowym pomiędzy poszczególnymi zestawami odczynników</b>	Przy użyciu kolejnych serii odczynników poziomy wykrywanych przeciwciał anti-HLA mogą się różnić.
<b>zaniżenie poziomu przeciwciał na skutek dzielenia wspólnych epitopów przez różne cząsteczki HLA</b>	Stanowi potencjalne źródło wyników fałszywie negatywnych.

<sup>a</sup>human leukocyte antigens – ludzkie antygeny zgodności tkankowej; <sup>b</sup>mean fluorescence intensity – średnia intensywność fluorescencji; Tabelka stworzona na podstawie:[25, 35, 42, 47-49];

### 1.2.3 Typowanie antygenów zgodności tkankowej HLA

Odpowiedź immunologiczna na alloprzeszczep rozwija się w następstwie różnic pomiędzy antygenami zgodności tkankowej biorcy i dawcy. Rolą układu HLA jest prezentowanie endo- i egzogennych peptydów limfocytom T, który to proces warunkuje rozwój tolerancji w stosunku do komórek wykazujących ekspresję własnych antygenów oraz eliminację komórek na powierzchni, których prezentowane są obce antygeny. Wysoce polimorficzne geny kodujące cząsteczki HLA zlokalizowane są na odcinku 6p21.1-3 ramienia krótkiego chromosomu szóstego[50]. Geny ludzkiego układu MHC (major histocompatibility complex) dziedziczone są w postaci haplotypów zgodnie z prawami Mendla. Wyjątkiem od tej reguły są sytuacje, gdy dojdzie do wymiany fragmentów chromatyd pomiędzy chromosomami, tzw. zjawisko crossing-over. Każdy człowiek posiada dwa haplotypy HLA, z których jeden pochodzi od matki, a drugi od ojca. Geny z obydwu haplotypów ulegają ekspresji na powierzchni komórek w sposób kodominujący.

Pośród antygenów HLA biorących udział w odpowiedzi immunologicznej wyróżniamy dwie klasy, które różnią się pod względem budowy i funkcji. Antygeny HLA klasy I (locus –A, –B, –Cw), są obecne na powierzchni większości komórek organizmu, chociaż poziom ich ekspresji może być zróżnicowany. Natomiast antygeny HLA klasy II (locus –DR, –DQ, –DP), występują głównie na komórkach prezentujących antygeny, (APC – antigen presenting cells), do których zaliczamy komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty B[45]. Podczas odpowiedzi immunologicznej prozapalnej na skutek stymulacji interferonem  $\gamma$  cząsteczki HLA klasy II mogą występować konstytutywnie na powierzchni wielu typów komórek, takich jak limfocyty T, komórki nabłonkowe naczyń oraz komórki kanalików nerkowych[51].

W odpowiedzi na alloprzeszczep nerki, którego komórki wykazują ekspresję innych cząsteczek HLA niż te występujące u biorcy, rozwija się odpowiedź immunologiczna. Dlatego też krytycznym elementem doboru pary biorca-dawca do przeszczepienia jest oznaczenie (typowanie) antygenów HLA klasy I oraz klasy II. W przeszłości typowanie wykonywano metodami serologicznymi, których skuteczność była ograniczona żywotnością badanych komórek oraz dostępnością swoistych surowic testowych[37, 52]. Obecnie antygeny HLA oznaczane są na poziomie genów metodami molekularnymi i na tej podstawie budowana jest również ich nomenklatura. Tradycyjnie przed transplantacją nerki u biorcy i dawcy oznaczane są



antygeny HLA klasy I locus –A i –B oraz HLA klasy II locus –DR [53]. Jednak, w wyniku licznych doniesień o niekorzystnym wpływie przeciwciał swoistych dla HLA –Cw (klasa I) oraz HLA –DQ i –DP (klasa II) na losy przeszczepu, zarówno w Polsce jak i na świecie do procedur alokacji wprowadzane jest stopniowo typowanie HLA w zakresie sześciu loci (HLA -A, -B, -Cw, -DR, -DQ, -DP)[54-57]. Ze względu na ograniczenia czasowe, szczególnie przed transplantacją od dawcy zmarłego, powszechnie stosowane jest typowanie niskiej rozdzielczości z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy i swoistych sond oligonukleotydowych (PCR-SSOP) lub swoistych primerów (PCR-SSP)[58, 59]. W ten sposób wynik typowania określa antygeny i grupy alleli dla poszczególnych loci HLA.

Przykładowy wynik typowania HLA metodami genetycznymi wygląda następująco:

**HLA-A\*02,03;B\*07,35;DR\*01,15.**

W zapisie tym gwiazdka (\*) oznacza metodę molekularną oznaczenia. Dla poszczególnych loci układu HLA (-A, -B, -DR), po gwiazdce wymieniane są numery antygenów dla obydwu haplotypów.

W konfrontacji z wysokoczułą metodą SAB, umożliwiającą oznaczanie przeciwciał anti-HLA swoistych dla konkretnych alleli, typowanie technikami niskiej rozdzielczości może być niewystarczające do prawidłowej oceny obecności DSA nawet u jednej piątej biorców[25, 59]. Następstwem niewłaściwej identyfikacji DSA jest obniżenie dokładności wirtualnej próby krzyżowej, nieprawidłowa klasyfikacja biorcy do grupy wysokiego ryzyka oraz zalecenie bardziej agresywnej terapii immunosupresyjnej, której można by uniknąć[60]. Dlatego też coraz więcej ośrodków transplantacyjnych bierze pod uwagę wprowadzenie do alokacji biorców typowania antygenów HLA na poziomie alleli. Ze względu na mniejsze ograniczenia czasowe, typowanie HLA wysokiej rozdzielczości może być z powodzeniem stosowane przed przeszczepieniem od dawcy żywego. Natomiast w przypadku transplantacji od dawcy zmarłego warunkiem jest dostosowanie metody typowania do obostrzeń czasowych. W celu typowania HLA na poziomie wysokiej rozdzielczości stosowane są metody takie jak: HR (high resolution) PCR-SSP, HR PCR-SSOP, a także sekwencjonowanie DNA (m.in. NGS – next generation sequencing, SBT – sequencing based typing)[37, 58].

Wynik typowania HLA stanowi punkt wyjścia dla oszacowania ryzyka związanego z przeszczepieniem poprzez ocenę stopnia niezgodności i wykonanie wirtualnej próby krzyżowej.

Brak niezgodnych antygenów HLA w parze biorca-dawca pozwala na uzyskanie lepszych wyników w zakresie przeżywalności przeszczepu oraz zredukowanie stosowanego leczenia immunosupresyjnego[61]. Rutynowo stopień zgodności oceniany jest pod względem strukturalnym, poprzez analizę liczby antygenów HLA dawcy, które różnią się od antygenów biorcy. Jak wykazały badania na kohorcie biorców przeszczepionych w USA w latach 1987-2013, każda niezgodność HLA w parze biorca-dawca wiąże się z istotnym obniżeniem przeżywalności przeszczepionej nerki[62, 63]. Wysoka liczba niezgodnych antygenów HLA może oznaczać między innymi podwyższone ryzyko powstawania przeciwciał DSA *de novo*, których obecność zwiększa ryzyko wystąpienia epizodów ostrego odrzucania i obniża przeżywalność przeszczepu [25]. Spośród rutynowo typowanych antygenów HLA –A, –B, –DR uważa się, że największy wpływ na losy przeszczepu mają niezgodności w obrębie locus B oraz DR[64]. Ze względu na silne niezrównoważenie sprzężeń (linkage disequilibrium) układu HLA, niezgodności pod względem HLA -DR mogą wiązać się z jednoczesnym brakiem zgodności w zakresie pozostałych antygenów HLA klasy II, z których antygeny HLA -DQ są szczególnie silnym stymulatorem produkcji swoistych dla dawcy przeciwciał *de novo*[57].

Aktualnie dominuje pogląd, że efekt niezgodności HLA nie jest zależny od konkretnego locus, a dobór immunologiczny powinien uwzględniać raczej immunogenność konkretnych niezgodności[61]. W celu ograniczenia stymulacji ramienia humoralnego odpowiedzi immunologicznej korzystny wydaje się dobór biorcy i dawcy pod względem tripletów aminokwasowych HLA, przeciwko którym wytwarzane są przeciwciała (HLA Matchmaker). Przy wzięciu pod uwagę obiecujących wyników wstępnych badań klinicznych z wykorzystaniem HLA Matchmaker, istnieje szansa, że program ten zastąpi w przyszłości tradycyjny dobór pary biorca-dawca, jednak wymagałoby to powszechnego stosowania metod typowania wysokiej rozdzielczości oraz poszerzenia obecnej wiedzy na temat epitopów HLA[46].

#### **1.2.4 Próba krzyżowa**

Rutynowo przed przeszczepieniem nerki wykonywana jest próba krzyżowa (XM – crossmatch), której celem jest sprawdzenie, czy w surowicy biorcy obecne są przeciwciała przeciwko potencjalnemu dawcy. W zależności od metody badania wyróżniamy:

- a) **próbę krzyżową biologiczną (PXM – physical crossmatch)** – wykonywaną w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem surowicy biorcy i limfocytów dawcy (np. CDC-XM, FLXM);
- b) **próbę krzyżową wirtualną (VXM)** – przeprowadzaną na zasadzie analizy danych, polegającą na porównaniu profilu alloprzeciwciał biorcy z antygenami HLA potencjalnego dawcy.

Ze względu na dynamiczną kinetykę repertuaru oraz miana przeciwciał anti-HLA u potencjalnych biorców nerki, zaleca się wykonywanie PXM z bieżącą surowicą pacjenta, a w przypadku VXM z aktualnym wynikiem badania anti-HLA SAB. Mały odstęp czasowy pomiędzy datą pobrania surowicy a datą próby krzyżowej zwiększa szansę na to, że wynik badania będzie stanowił odzwierciedlenie aktualnego statusu immunologicznego biorcy. W praktyce, dopuszcza się, aby PXM był wykonywany z surowicą biorcy pobraną w ciągu ostatnich 2-3 miesięcy. Natomiast w przypadku VXM, w zależności od zasad programu transplantacyjnego, brane są pod uwagę wyniki anti-HLA SAB sprzed 3-6 miesięcy[65].

Poza aktualną surowicą biorcy, XM można również wykonać z surowicą historyczną, na której oznaczono maksymalny poziom PRA%. Takie postępowanie podyktowane jest wysokim prawdopodobieństwem wznowienia syntezy historycznych DSA u pacjenta po przeszczepieniu, w następstwie aktywacji pamięci immunologicznej. Z procesem tym związane jest podwyższone ryzyko wystąpienia wczesnego odrzucania u biorcy[35, 37].

Poprawna interpretacja wyniku XM u potencjalnych biorców nerki, zależy również od dostępności bieżącej historii immunizacji i informacji odnośnie wystąpienia zdarzeń sprzyjających zmianom repertuaru alloprzeciwciał (m.in. infekcja, szczepienie, leczenie z wykorzystaniem terapeutycznych przeciwciał)[65].

Limfocyty niezbędne do wykonania PXM, mogą być izolowane z krwi obwodowej, śledziony bądź węzłów chłonnych potencjalnego dawcy nerki. Dla prawidłowej interpretacji wyników niezbędna jest wiedza na temat charakterystyki ekspresji antygenów HLA na komórkach. Biologiczne próby krzyżowe są wykonywane z populacją limfocytów T i B dawcy. Dodatni wynik badania z limfocytami T (bądź mieszaniną limfocytów B i T, w której dominują te ostatnie), świadczy najczęściej o obecności u biorcy DSA swoistych dla HLA klasy I dawcy. W przeciwieństwie do limfocytów T, na powierzchni limfocytów B występują cząsteczki HLA klasy II, a ekspresja HLA klasy I jest silniejsza. Dlatego też, pozytywny wynik PXM wyłącznie z

limfocytami B związany jest z obecnością DSA swoistych dla HLA klasy II i/lub HLA klasy I dawcy. Próba krzyżowa z limfocytami B jest bardziej czuła, jednak jednocześnie jest obciążona wyższym ryzykiem wystąpienia wyników fałszywie pozytywnych, których główną przyczyną jest zdolność limfocytów B do nieswoistego wiązania przeciwciał przez powierzchniowe receptory Fc oraz immunoglobuliny[66].

Dla interpretacji wyniku próby krzyżowej istotne znaczenie mają również różnice w ekspresji antygenów w zależności od locus HLA (HLA -A, -B, -DR > HLA -Cw, -DP, -DQ) oraz od poszczególnych alleli[67]. Ponadto, istnieją istotne różnice w ekspresji HLA w zależności od materiału, z którego izolowane są komórki dawcy (śledziona, węzeł chłonny, krew obwodowa) oraz od typu dawcy (żywy vs. zmarły). Na poziom ekspresji HLA na komórkach dawcy może również wpływać wiek, choroby towarzyszące oraz przyjmowane leki[68].

Pomimo znaczącego rozwoju metod jakimi wykonywane są próby krzyżowe, nadal nie istnieje jedno oznaczenie pozwalające w sposób jednoznaczny potwierdzić obecność wszystkich istotnych klinicznie DSA oraz wykluczyć wszystkie nieistotne auto- i alloprzeciwciała[65, 69]. Dlatego też prawidłowa ocena ryzyka u biorców zimmunizowanych najczęściej wymaga analizy wyników XM wykonanych różnymi technikami oraz interpretacji z uwzględnieniem ich zalet i ograniczeń.

#### **1.2.4.1 Próba krzyżowa biologiczna**

Złotym standardem diagnostyki immunologicznej jest próba krzyżowa z wykorzystaniem cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM). Procedura ta została opracowana w latach 60' XX wieku i jest bardzo zbliżona do wspomnianego wcześniej oznaczenia PRA-CDC, jednak limfocyty, z którymi inkubowana jest surowica biorcy pochodzą od potencjalnego dawcy nerki (**Rycina 2**). Badanie to umożliwia wykrywanie u biorcy wysokich mian DSA zdolnych do aktywacji układu dopełniacza (IgG1, IgG3 oraz IgM), których obecność stanowi przeciwwskazanie do transplantacji ze względu na wysokie ryzyko wystąpienia odrzucania nadostrego przeszczepu[3, 5].

Główną zaletą CDC-XM jest czynnościowy charakter, odzwierciedlający w wysokim stopniu oddziaływanie przeciwciało-antygen występujące w warunkach *in vivo*. Znaczącą wadą jest natomiast niska czułość[37]. Z tego względu negatywny wynik CDC-XM nie jest równoznaczny z brakiem DSA u biorcy. Niskie miana DSA, których metoda ta nie wykrywa

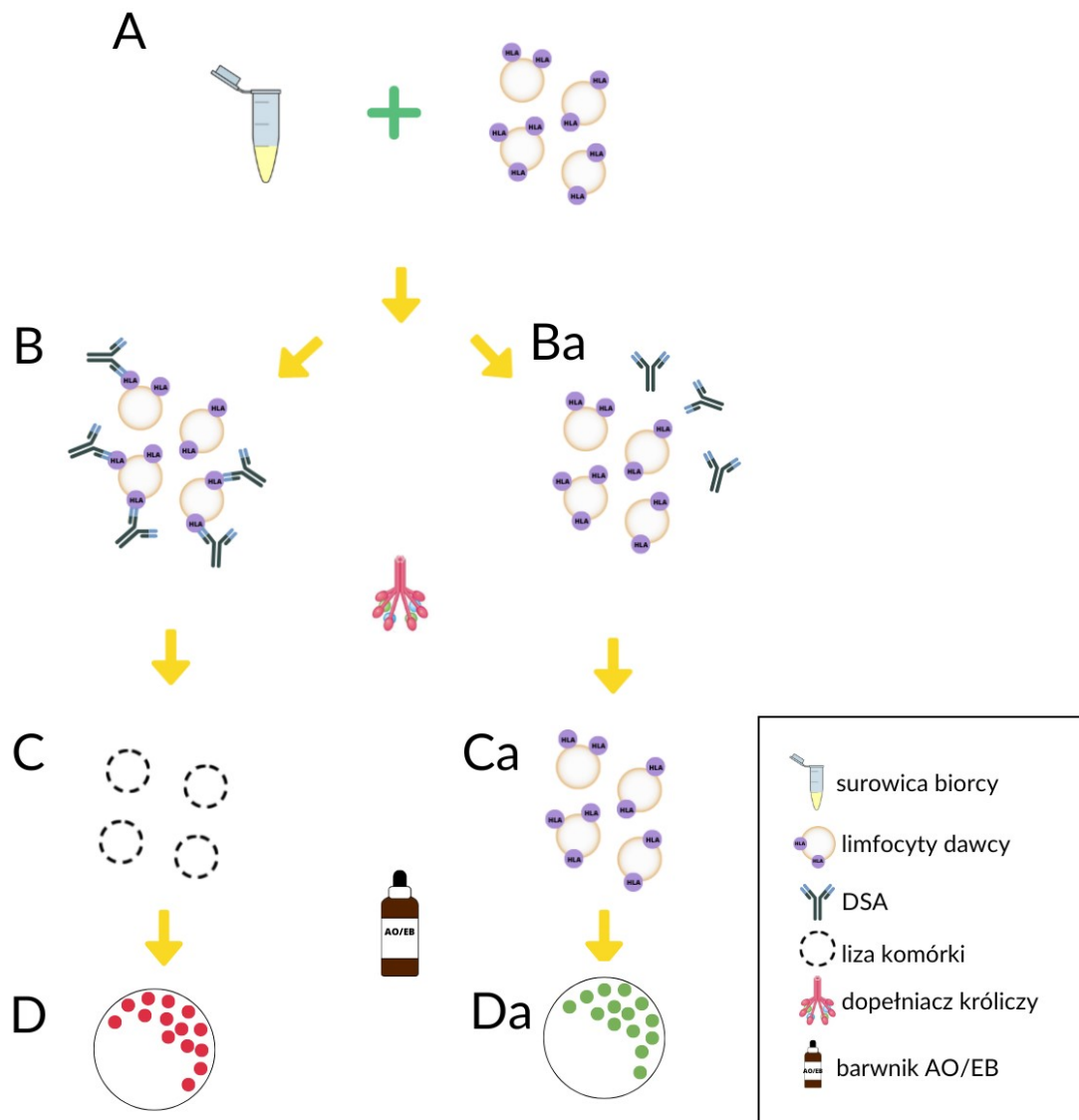
mogą również wiązać się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia wczesnego odrzucania zależnego od przeciwciał[39]. Czulość CDC-XM można poprawić między innymi poprzez wydłużenie czasów inkubacji, dodatkowe płukania po inkubacji surowicy z komórkami dawcy (modyfikacja Amos) bądź dodanie anty-ludzkiej globuliny (AHG)[70]. Wykazano, że zastosowanie powyższych ulepszeń sprzyja redukcji częstości wczesnego odrzucania u biorców przeszczepu nerki[68].

Wynik badania CDC-XM jest zależny od żywotności komórek dawcy oraz od obecności w surowicy biorcy czynników zakłócających działanie układu dopełniacza[68]. Ponadto, badanie to nie pozwala na dokładne określenie klasy ani swoistości wykrywanych przeciwciał anti-HLA. Umożliwia jedynie pośrednią identyfikację swoistości DSA w zakresie klasy HLA, jeśli oznaczenie jest wykonywane równoległe z mieszaniną limfocytów T i B oraz limfocytami B.

Dodatni wynik CDC-XM niekoniecznie związany jest z obecnością przeciwciał istotnych dla wyniku transplantacji [37]. Przykładowo, autoprzeciwciała IgM, które nie są szkodliwe dla alloprzeszczepu są często źródłem fałszywie dodatnich wyników CDC-XM. Sposobem na pozytywną weryfikację takich przypadków jest wykonanie autologicznej próby krzyżowej u biorcy i CDC-XM ze związkiem eliminującym przeciwciała IgM (DTT).

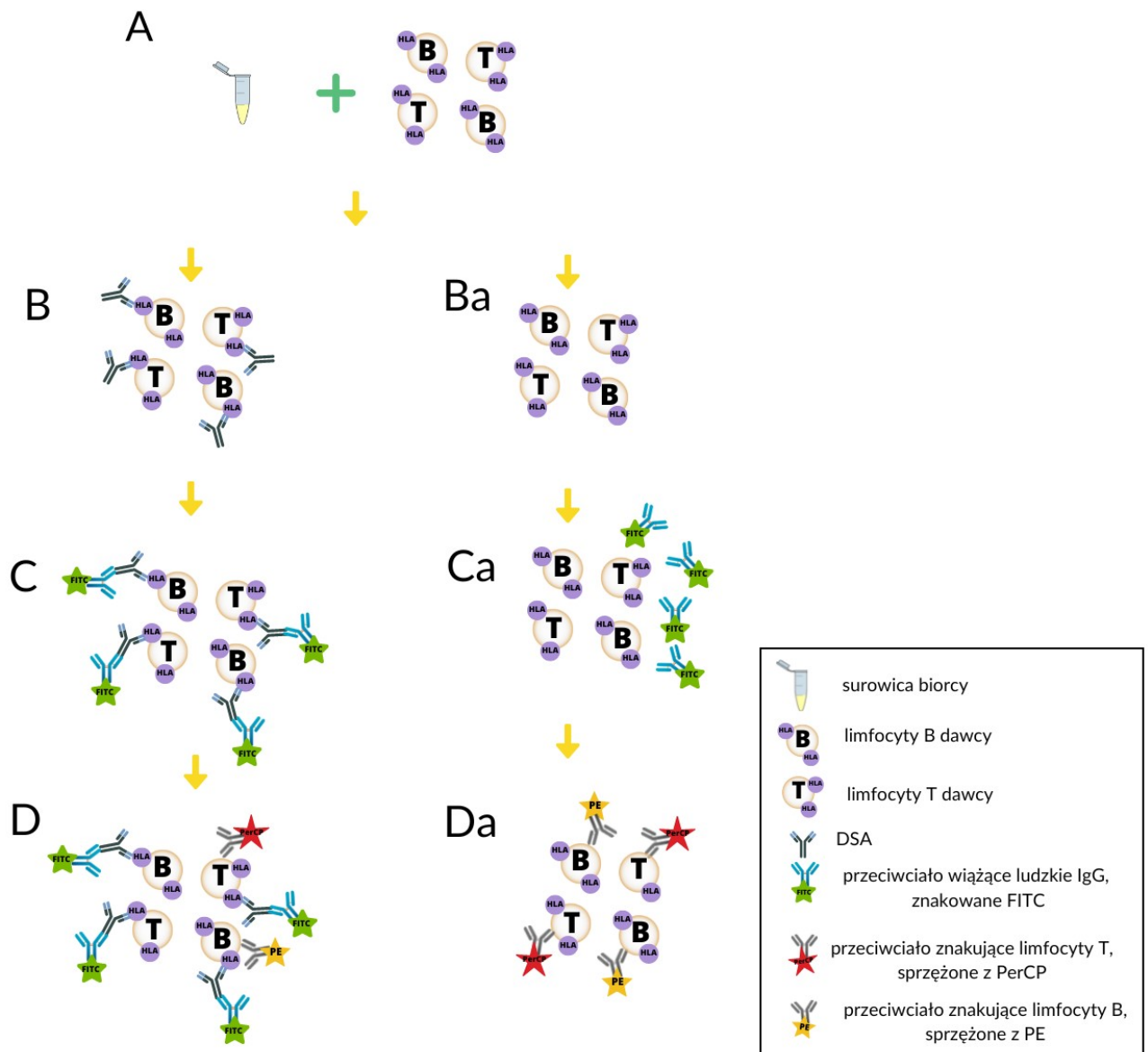
Mając na uwadze poprawę czulości i swoistości wykrywania DSA u biorców przed transplantacją, w 1983 roku stworzono próbę krzyżową metodą cytometrii przepływowej (FLXM)[35, 71]. W porównaniu z CDC-XM, oznaczenie to umożliwia czułą, obiektywną i niezależną od układu dopełniacza detekcję IgG DSA biorcy związanych z limfocytami T i B potencjalnego dawcy. Dzięki zastosowaniu zestawu trzech monoklonalnych przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie, FLXM umożliwia nie tylko wykrycie DSA, ale również określenie ich swoistości limfocytarnej (limfocyty T vs. B) **(Rycina 3)**.

Wynik FLXM formułowany jest na podstawie porównania intensywności fluorescencji związanej z DSA w próbce badanej (komórki dawcy inkubowane z surowicą biorcy) do intensywności fluorescencji próbki kontrolnej (komórki dawcy inkubowane z surowicą negatywną w zakresie obecności przeciwciał anti-HLA). Na podstawie wyniku FLXM poziom DSA u biorcy można ocenić w sposób półilościowy. Punkt odcięcia, powyżej którego wynik FLXM uznawany jest za dodatni zależy od ośrodka transplantacyjnego, co podyktowane jest różnicami pod względem procedur, odczynników oraz typu cytometru przepływowego[41].



**Rycina 2. Schemat wykonania próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM).**

Surowica biorcy inkubowana jest z limfocytami potencjalnego dawcy (A). Jeśli w badanej surowicy obecne są przeciwciała przeciwko antygenom zgodności tkankowej (HLA) dawcy (DSA) to wiążą się one z limfocytami dawcy (B). Jeśli w badanej surowicy nie ma DSA, z antygenami HLA nie wiążą się żadne przeciwciała (Ba). Następnie dodawany jest dopełniacz króliczy. W obecności kompleksów antygen-przeciwciało (B), układ dopełniacza ulega aktywacji i formowany jest kompleks atakujący błonę pod wpływem którego komórki dawcy ulegają lizie (C). W przypadku braku obecności DSA (Ba) układ dopełniacza nie ulega aktywacji i komórki dawcy pozostają nienaruszone. Wynik próby krzyżowej formułowany jest na podstawie oceny odsetka komórek martwych w polu widzenia mikroskopu. Komórki martwe są różnicowane od komórek żywych poprzez wykonanie podwójnego barwienia – oranżem akrydyny (AO) i bromkiem etydydy (EB). Bromek etydydy barwi komórki martwe na czerwono (D), a oranż akrydyny barwi żywe komórki na zielono (Da). W przypadku wystąpienia lizy >10% komórek dawcy wynik CDC-XM jest uznawany za dodatni (D). Negatywny wynik CDC-XM stwierdzany jest gdy odsetek komórek które uległy lizie nie przekracza 10% (Da).



**Rycina 3. Schemat wykonania próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej (FLXM).**

Surowica biorcy inkubowana jest z limfocytami potencjalnego dawcy (A). Jeśli w badanej surowicy obecne są przeciwciała przeciwko antygenom zgodności tkankowej HLA dawcy (DSA) to wiążą się one z komórkami (B). W przypadku braku DSA z cząsteczkami HLA na powierzchni komórek dawcy nie wiążą się przeciwciała (Ba). Niezwiązane przeciwciała oraz inne składniki surowicy są wypłukiwane. Następnie dodawane jest drugorzędowe przeciwciało znakowane izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC), które wiąże DSA IgG połączone z komórkami dawcy (C). Przeciwciało drugorzędowe nie ulega wiązaniu, jeśli z komórkami dawcy nie związały się żadne DSA (Ca). Po płukaniu odbywa się dodatkowa inkubacja z przeciwciałami monoklonalnymi anti-CD3 znakowanymi kompleksem perydynina-chlorofil-białko PerCP oraz anti-CD19 znakowane fikoerytryną (PE), które pozwalają zidentyfikować populacje limfocytów T i B dawcy (D, Da). Po płukaniu komórki wprowadzane są do cytometru przepływowego. Interpretacja badania odbywa się poprzez porównanie intensywności fluorescencji próbki badanej (A) do próbki kontrolnej – komórki dawcy inkubowane z surowicą kontrolną negatywną.

Jak wykazały badania, dodatni wynik FLXM wiąże się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia u biorcy odrzucania zależnego od przeciwciał [72]. Jednak istotną wadą FLXM jest podatność na występowanie wyników fałszywie dodatnich, wywołanych niespecyficznym wiązaniem przeciwciał przez receptory Fc, obecnością przeciwciał o swoistości innej niż HLA oraz interferencją przeciwciał terapeutycznych (m.in. rituximab, daclizumab, alemtuzumab, immunoglobulina przeciw ludzkim tymocytom)[68]. Dlatego też dodatni wynik FLXM nie stanowi podstawy do podjęcia decyzji o odstąpieniu od transplantacji, jeśli obecność DSA nie została potwierdzona metodą SAB[72].

#### 1.2.4.2 Wirtualna próba krzyżowa

Ze względu na ograniczenia metodologiczne biologicznych prób krzyżowych, zaleca się, aby ich wyniki były interpretowane w odniesieniu do aktualnego wyniku wirtualnej próby krzyżowej[35]. Oznaczenie to nie jest badaniem *in vitro per se*, a obecność DSA u biorcy jest określana poprzez odniesienie wyniku oznaczenia przeciwciał anti-HLA metodą SAB do wyniku typowania antygenów HLA potencjalnego dawcy. Wirtualna próba krzyżowa w zestawieniu z wynikami CDC-XM oraz FLXM stanowi punkt wyjścia dla oceny ryzyka immunologicznego przed transplantacją (**Tabela 2**).

Zaletą wirtualnej próby krzyżowej jest wysoka czułość i swoistość w identyfikacji przeciwciał DSA. Ponadto, w porównaniu z PXM, na wynik VXM nie ma wpływu żywotność komórek dawcy ani wiązanie przeciwciał o innej swoistości niż HLA[70].

Podobnie jak każda metoda, również VXM narażona jest na występowanie wyników fałszywie dodatnich i ujemnych (**Tabela 1**). Przyczyną pierwszych jest denaturacja niektórych cząsteczek HLA w procesie produkcji mikrokulek SAB. Jej następstwem jest ekspozycja epitopów HLA, które nie występują naturalnie w warunkach *in vivo*. Przeciwciała wiążące zdenaturowane antygeny, chociaż nie mają znaczenia klinicznego, mogą skutecznie imitować obecność DSA i w ten sposób zafałszowywać wynik VXM.

Przyczyną wyników fałszywie negatywnych VXM może być natomiast zjawisko współdzielenia epitopów przez antygeny HLA. W takim przypadku następuje niedoszacowanie poziomu MFI DSA, gdyż przeciwciała ulegają wiązaniu nie z jednym, a z wieloma podobnymi epitopami na różnych cząsteczkach HLA.



**Tabela 2. Ocena ryzyka immunologicznego u biorców przed transplantacją nerki - na podstawie wytycznych British Society for Histocompatibility and Immunogenetics z 2016 roku[65].**

Wynik próby krzyżowej biologicznej	Metoda próby krzyżowej	Surowica biorcy (aktualna/historyczna)	Wynik oznaczenia przeciwciał anti-HLA <sup>e</sup> metodą SAB <sup>f</sup>	Ocena ryzyka immunologicznego
Dodatni z limfocytami T i B	CDC-XM <sup>a</sup> (DTT <sup>b</sup> )	A <sup>c</sup>	IgG DSA <sup>d</sup> HLA I <sup>g</sup>	Wysokie (przeciwwskazanie do transplantacji)
Dodatni z limfocytami B	CDC-XM(DTT)	A	IgG DSA HLA II <sup>h</sup>	Wysokie
Dodatni z limfocytami B	CDC-XM(DTT)	A	IgG DSA HLA I o niskich wartościach MFI <sup>i</sup>	Pośrednie
Dodatni z limfocytami T i B	CDC-XM (DTT)	H <sup>j</sup>	IgG DSA HLA I	Wysokie
Dodatni z limfocytami B	CDC-XM(DTT)	H	IgG DSA HLA II	Wysokie
Dodatni z limfocytami B	CDC-XM(DTT)	H	IgG DSA HLA I o niskich wartościach MFI	Pośrednie
Dodatni z limfocytami T i B	CDC-XM(neg <sup>k</sup> DTT)	A lub H	IgM HLA I DSA	Standardowe
Dodatni z limfocytami B	CDC-XM(neg DTT)	A lub H	IgM HLA II DSA	Standardowe
Dodatni z limfocytami T i B	CDC-XM(neg DTT)	A lub H	IgM non-HLA <sup>l</sup>	Standardowe
Dodatni z limfocytami B	CDC-XM(neg DTT)	A lub H	IgM non-HLA	Standardowe
Dodatni z limfocytami T i B	FLXM <sup>l</sup> (neg CDC-XM)	A	IgG DSA HLA I	Pośrednie
Dodatni z limfocytami B	FLXM (neg CDC-XM)	A	IgG DSA HLA II	Pośrednie
Dodatni z limfocytami T i B	FLXM (neg CDC-XM)	H	IgG DSA HLA I	Pośrednie
Dodatni z limfocytami B	FLXM (neg CDC-XM)	H	IgG DSA HLA II	Pośrednie
Negatywny z limfocytami T i B	FLXM	A lub H	DSA HLA I lub DSA HLA II wykryte tylko metodą SAB	Standardowe
Dodatni z limfocytami T i/lub z limfocytami B	CDC-XM i/lub FLXM	A lub H	negatywny	Standardowe (IgG/IgM non-HLA)
Dodatni z limfocytami T, negatywny z limfocytami B	CDC-XM i/lub FLXM	A lub H	NDSA <sup>m</sup> lub negatywny	Standardowe
Negatywny z limfocytami T i B	FLXM	A lub H	NDSA	Standardowe
Negatywny z limfocytami T i B	CDC-XM i/lub FLXM	A lub H	negatywny	Standardowe

<sup>a</sup> próba krzyżowa metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza; <sup>b</sup> 1,4 – ditiotreitól – związek stosowany do inaktywacji przeciwciał IgM obecnych w surowicy biorcy; <sup>c</sup> aktualna surowica biorcy; <sup>d</sup> przeciwciała swoiste dla antygenów HLA dawcy; <sup>e</sup> ludzkie antygeny zgodności tkankowej; <sup>f</sup> metoda fazy stałej single antygen beads; <sup>g</sup> antygeny zgodności tkankowej klasy I; <sup>h</sup> antygeny zgodności tkankowej klasy II; <sup>i</sup> średnia intensywność fluorescencji; <sup>j</sup> historyczna surowica biorcy; <sup>k</sup> negatywny; <sup>l</sup> przeciwciała o innej swoistości niż HLA; <sup>l</sup> próba krzyżowa metodą cytometrii przepływowej; <sup>m</sup> obecność u biorcy przeciwciał anti-HLA, które nie są swoiste dla antygenów potencjalnego dawcy.

Na wynik VXM mogą mieć również wpływ czynniki interferujące takie jak: przeciwciała IgM, składowe C1, C4 i C3 endogennego dopełniacza oraz leki podawane biorcy (m.in. dożylnie immunoglobuliny, globulina antytymocytarna). Ponadto, istnieje również możliwość, że metoda SAB nie wykryje przeciwciał skierowanych przeciwko rzadko spotykanym antygenom HLA, ponieważ na mikrokulkach testowych mogą one nie występować [39, 41, 42].

Pomimo ograniczeń, VXM stanowi nadrzędne w stosunku do PXM narzędzie do oceny ryzyka immunologicznego. Badania wykazały, że uzyskanie negatywnego wyniku VXM wiąże się z niskim ryzykiem wystąpienia epizodów wczesnego odrzucania oraz dobrymi wynikami przeżywalności przeszczepu [70, 73]. Dlatego też u pacjentów DSA negatywnych o dobrze znanej historii zdarzeń immunizujących możliwe jest podjęcie decyzji o przeszczepieniu wyłącznie w oparciu o wynik VXM z pominięciem prospektywnej biologicznej próby krzyżowej [74]. Jak wykazały badania, procedura ta umożliwia skrócenie czasu oczekiwania biorcy, usprawnienie procesu alokacji, znaczną minimalizację czasu zimnego niedokrwienia oraz istotną redukcję ryzyka wystąpienia opóźnionego podjęcia funkcji przez przeszczepioną nerkę [45, 65]. Pominięcie prospektywnego PXM nie jest jednak wskazane w przypadku pacjentów o złożonym repertuarze przeciwciał anti-HLA lub gdy typowanie HLA potencjalnego dawcy nie obejmowało wszystkich sześciu loci [75]. Głównym czynnikiem, który może ograniczać praktyczne zastosowanie VXM, jest ograniczona wiedza na temat znaczenia klinicznego przeciwciał DSA wykrywanych metodą SAB, szczególnie tych o niskich wartościach MFI.

### **1.3 Ocena ryzyka immunologicznego u potencjalnych biorców nerki w Polsce**

Ryzyko immunologiczne u potencjalnych biorców nerki w Polsce oceniane jest na podstawie:

- a) poziomu zimmunizowania szacowanego metodą PRA-CDC i testem przesiewowym Luminex screen;
- b) wyniku oznaczenia poziomu i swoistości przeciwciał anti-HLA metodą SAB;
- c) zgodności w parze biorca-dawca w zakresie antygenów HLA-A, -B, -DR;
- d) wyniku wirtualnej próby krzyżowej;
- e) wyniku próby krzyżowej biologicznej:
  - CDC-XM (przed transplantacją od dawcy żywego i zmarłego)
  - FLXM (przed transplantacją od dawcy żywego).

Podstawową metodą oceny poziomu przeciwciał anti-HLA u potencjalnych biorców nerki w Polsce jest oznaczenie PRA-CDC z panelem limfocytów pochodzących od minimum 30 niespokrewnionych dawców krwi. Badanie to jest wykonywane po zakwalifikowaniu biorcy do transplantacji, a następnie w celu monitorowania - raz na trzy miesiące. Biorcy, którzy uzyskali wynik PRA w zakresie 50-79% otrzymują dodatkowe punkty preferencyjne w systemie alokacji, dzięki czemu częściej są brani pod uwagę podczas doboru nerki od dawcy zmarłego. Pacjentom wysokozimmunizowanym ( $PRA \geq 80\%$ ) przypisywany jest natomiast status 'przeszczep obligatoryjny' i mają oni pierwszeństwo w wyborze do przeszczepienia od dawcy zmarłego. Poza PRA-CDC, raz na trzy miesiące u potencjalnych biorców wykonywane jest badanie przesiewowe na obecność przeciwciał anti-HLA metodą fazy stałej (Luminex screen). Dodatni wynik stanowi wskazanie do oznaczenia swoistości i poziomu przeciwciał anti-HLA metodą SAB.

Dobór pary biorca-dawca pod względem antygenów HLA w Polsce odbywa się w zakresie loci HLA -A, -B i -DR, które oznaczane są metodami genetycznymi o niskiej rozdzielczości (PCR-SSP, PCR-SSO). W celu zmniejszenia ryzyka powstawania *de novo* DSA, alokacja biorcy uwzględnia dodatkowe punkty preferencyjne za większą liczbę zgodnych antygenów HLA z dawcą. W przypadku biorców oczekujących na re-transplantację, ze względu na wysokie ryzyko immunologiczne, czynnikiem dyskwalifikującym potencjalnego dawcę jest powtórzenie niezgodności HLA z poprzedniego przeszczepu.

Złotym standardem diagnostyki przed transplantacją nerki od dawcy zmarłego jest wykonanie próby krzyżowej CDC-XM z limfocytami T i B dawcy wyizolowanymi z węzłów chłonnych bądź fragmentu śledziony dawcy zmarłego. Dla zwiększenia czułości badania stosowane są wydłużone czasy inkubacji oraz równoległe oznaczenie z populacją limfocytów B. Dodatni wynik CDC-XM z mieszaniną limfocytów T i B stanowi przeciwskazanie do transplantacji. Natomiast pozytywny wynik CDC-XM z limfocytami B dawcy, informuje jedynie o podwyższonym ryzyku ostrego odrzucania i nie stanowi bezwzględnej podstawy do odstąpienia od transplantacji. Ostateczną decyzję o przeszczepieniu podejmuje klinicysta, w oparciu o całościowy kształt oceny ryzyka u danego biorcy z uwzględnieniem obecności i miana DSA wykrytych metodą SAB (**Tabela 3**).

**Tabela 3. Algorytm oceny ryzyka immunologicznego przed transplantacją w Polsce\*.**

Ocena ryzyka immunologicznego	Wyniki badań
<b>standardowe</b>	CDC-XM <sup>a</sup> T+B ujemny CDC-XM B ujemny/dodatni Brak DSA <sup>b</sup> lub DSA < 2000 MFI <sup>c</sup>
<b>pośrednie</b>	CDC-XM T+B ujemny CDC-XM B ujemny DSA 2000-5000 MFI
<b>wysokie</b>	CDC-XM T+B ujemny CDC-XM B dodatni DSA HLA II > 2000 MFI
<b>nieznane</b>	Brak wyników badań fazy stałej lub starsze niż 200 dni od daty CDC-XM

<sup>a</sup> próba krzyżowa metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza; <sup>b</sup> przeciwciała swoiste dla antygenów HLA potencjalnego dawcy; <sup>c</sup> średnia intensywność fluorescencji; \*tabela została zaczerpnięta z prezentacji pt. „Ocena stopnia immunizacji pacjentów” (autorstwa dr hab. n. med. Grażyny Moszkowskiej i dr n. med. Hanny Zielińskiej) wygłoszonej podczas XV Krakowskich Dni Dializoterapii im. Profesora Olgierda Smoleńskiego w dniach 8-10.09.22.

Przed przeczepieniem nerki od dawcy żywego, ze względu na mniej restrykcyjne ograniczenia czasowe, ocena ryzyka może być poszerzona o próbę krzyżową metodą cytometrii przepływową. Dodatni wynik FLXM, potwierdzony obecnością DSA w badaniu SAB, pozwala na wyodrębnienie pacjentów o podwyższonym ryzyku odrzucania humoralnego, u których korzystniejsze może być odstąpienie od transplantacji i rozważenie kandydatury innego potencjalnego dawcy.

Wirtualna próba krzyżowa (VXM) przed transplantacją wykonywana jest na podstawie wyniku oznaczenia przeciwciał anti-HLA SAB z ostatnich 6 miesięcy. Starsze wyniki mają znaczenie historyczne i obserwacyjne. Ze względu na wysokie ryzyko immunologiczne, w przypadku obecności u biorecy DSA powyżej 5000 MFI biologiczny XM nie jest wykonywany i podjęta zostaje decyzja o odstąpieniu od transplantacji. Za dodatni wynik VXM uważana jest również obecność u pacjenta DSA o MFI w zakresie 2000-5000. Jednak w tym przypadku biorca

jest dopuszczony do wykonania CDC-XM i jeśli wynik jest ujemny to klinicysta może zdecydować o przeszczepieniu. Negatywny wyniku VXM formułowany jest, gdy poziom wykrytych DSA u biorcy jest niższy niż 2000 MFI. Również w tym przypadku o transplatacji ostatecznie decyduje uzyskanie przez pacjenta negatywnego wyniku CDC-XM z dawcą[76].

System alokacji biorców nerki w Polsce stale ewoluuje, dzięki czemu ocena ryzyka immunologicznego u pacjentów staje się doskonalsza[77]. Od 2021 roku typowanie HLA u potencjalnych dawców zostało poszerzone o antygeny HLA -Cw, -DQA1/B1 oraz -DPA1/B1, co stworzyło szansę na poprawę identyfikacji DSA oraz dokładności VXM. W celu eliminacji wpływu efektu prozonalnego na wyniki oznaczenia przeciwciał anti-HLA metodą SAB wprowadzono procedurę pre-analityczną z wykorzystaniem związku EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, kwas wersenowy), który zapobiega interferencji składowej dopełniacza C1q w wiązanie przeciwciał drugorzędowych[78, 79]. Ponadto, w wybranych przypadkach surowice biorców są badane w serii rozcieńczeń. Od niedawna, u biorców, u których wykryto przeciwciała anti-HLA metodą SAB dodatkowo, dwa razy na rok, wykonywana jest ocena ich lityczności poprzez sprawdzenie zdolności do wiązania składowej układu dopełniacza C1q. Rozważane jest również predefiniowanie zasad VXM oraz wyliczanie cPRA w oparciu o dane z oceny lityczności wykrytych przeciwciał anti-HLA u biorców.

Do rutynowej diagnostyki wprowadzono również procedury mające na celu zidentyfikowanie biorców posiadających autoprzeciwciała bądź alloprzeciwciała IgM. Przeciwciała te są uznawane za nieszkodliwe z punktu widzenia ryzyka odrzucania i przeżywalności przeszczepu, jednak ich interferencja w wyniki PRA-CDC oraz CDC-XM może skutkować fałszywym zawyżeniem poziomu zimmunizowania i ograniczeniem dostępu do transplatacji[80, 81]. Aby wyłonić z populacji biorców oczekujących na przeszczepienie nerki, pacjentów posiadających wysokie poziomy auto/alloprzeciwciał IgM, procedura PRA jest wykonywana w dwóch wariantach: standardowym oraz ze związkiem usuwającym przeciwciała IgM – DTT. U pacjentów o wyniku PRA-CDC-DTT niższym niż w wariantcie standardowym, ostateczny CDC-XM przed transplatacją również wykonywany jest z DTT. Uzyskanie wyniku ujemnego pozwala na podjęcie decyzji o przeszczepieniu.

Ponadto ważną innowacją w systemie alokacji w Polsce, będzie wprowadzenie systematycznego monitorowania zdarzeń immunizujących u biorców oczekujących na przeszczepienie. Odnotowanie takiego zdarzenia będzie stanowiło podstawę do skierowania

pacjenta na ponowne oznaczenie przeciwciał anti-HLA metodami fazy stałej, co sprawi, że status immunologiczny pacjenta będzie na bieżąco aktualizowany.

#### 1.4 Optymalizacja wirtualnej próby krzyżowej

W idealnych warunkach, wynik wirtualnej próby krzyżowej umożliwiłby różnicowanie w sposób jednoznaczny pacjentów o standardowym ryzyku, u których można bezpiecznie podjąć decyzję o transplantacji, od grupy biorców wysokiego ryzyka, u których przeszczepienie od danego dawcy nie jest wskazane. W rzeczywistości VXM podobnie jak każda metoda stosowana w ocenie ryzyka immunologicznego, nie charakteryzuje się stu procentową dokładnością.

Kluczową kwestią dla skuteczności VXM jest prawidłowe określenie akceptowalnych i nieakceptowalnych niezgodności HLA poprzez zdefiniowanie punktu odcięcia MFI DSA, powyżej którego wynik badania uważany jest za dodatni. Niestety, ani pod względem wartości MFI, ani w zakresie sposobu na ustalenie takiego punktu odcięcia nie ma jednomyślności pomiędzy klinicystami. Biorąc pod uwagę wysokie zróżnicowanie procedur badań diagnostycznych oraz klinicznych schematów decyzyjnych wskazane jest, aby optymalizacja VXM odbywała się w sposób indywidualny w ramach jednego ośrodka transplantacyjnego[47]. Wyznaczenie punktu odcięcia VXM można wykonać następującymi metodami:

- a) **statystyczną** – ustalenie poziomu MFI, który będzie uznawany za pozytywny na podstawie odniesienia poziomu fluorescencji próbki badanej do poziomu fluorescencji tła, kontroli negatywnej i pozytywnej;
- b) **praktyczną** – na podstawie oceny korelacji VXM z wynikami biologicznych prób krzyżowych;
- c) **kliniczną** – w oparciu o związek pomiędzy poziomem MFI DSA a wynikiem transplantacji[58].

Żadna z wymienionych powyżej metod nie jest idealna, jednak analiza praktyczna oraz kliniczna poza wyznaczeniem punktu odcięcia często prowadzą do obserwacji, które mogą przyczynić się do udoskonalenia procedur oceny ryzyka immunologicznego i jednoczesnej poprawy dokładności wirtualnej próby krzyżowej[43].

Proces ustalania korelacji VXM z wynikami biologicznych prób krzyżowych zaczyna się zwykle od analizy wyników PXM uzyskanych z wykorzystaniem surowic, w których wykazano

obecność przeciwciał przeciwko jednemu antygenowi HLA dawcy (single DSA)[82]. Następnie na podstawie analizy statystycznej wyznaczany jest punkt odcięcia MFI umożliwiający prognozowanie wyników PXM. Powinien być on zoptymalizowany pod względem czułości i swoistości. Najczęściej jednak nadrzędnym celem jest osiągnięcie wysokiej czułości, kosztem swoistości, co pozwala na wysokie prawdopodobieństwo otrzymania negatywnego wyniku PXM przy negatywnym VXM[83]. Niestety takie postępowanie jednocześnie zwiększa ryzyko uzyskania fałszywie dodatnich wyników VXM, które mogą przyczynić się do ograniczenia dostępu biorców do transplantacji.

Wyniki badań, których przedmiotem było ustalenie korelacji pomiędzy VXM a biologicznymi próbami krzyżowymi są bardzo zróżnicowane i trudne do porównania ze względu na odmienną zastosowanych procedur i sposobów analizy statystycznej. Zagadnieniem szczególnie kontrowersyjnym jest wyznaczenie punktu odcięcia MFI DSA pozwalającego na rzetelne przewidywanie wyniku CDC-XM. Główną przeszkodę stanowi niska czułość tego badania oraz wysokie prawdopodobieństwo występowania wyników fałszywie dodatnich. Jak wykazały badania, czułość prognozowania CDC-XM przez VXM często osiąga wartości niższe niż 60%, pomimo zastosowania punktów odcięcia MFI DSA rzędu 5000-10 000[14, 82, 83]. Według Visentina i wsp. przewidywanie wyniku CDC-XM przez VXM z czułością i swoistością przekraczającą 80%, jest możliwe dopiero, gdy punkt odcięcia MFI DSA przekroczy wartość 11 000[84]. W opozycji do powyższych badań są wyniki analizy Liu i wsp., którzy stosując bardzo niskie punkty odcięcia MFI, rzędu 2500-4000, uzyskali znakomitą czułość i swoistość VXM[85].

W przeciwieństwie do CDC-XM, próba krzyżowa metodą cytometrii przepływowej stanowi badanie o bardzo zbliżonej czułości do oznaczenia anty-HLA SAB[83]. Dlatego też szacuje się, że zgodność pomiędzy wynikami FLXM a VXM osiąga poziom, co najmniej 75%[39]. W porównaniu z CDC-XM optymalny punkt odcięcia MFI DSA dla prognozowania FLXM jest niższy i najczęściej osiąga wartości w zakresie 4000-6000[84, 86]. Dokładność przewidywania wyników FLXM przez VXM na podstawie analizy statystycznej ROC (receiver operating characteristics) oceniana jest zwykle, jako dobra lub bardzo dobra[86].

Główną przeszkodą w ustalaniu korelacji VXM z biologicznymi próbami krzyżowymi jest odmienna metodologia tych badań. Do czynników, które mają decydujący wpływ należą różnice w zakresie: czułości oznaczeń, ekspresji antygenów HLA (komórki dawcy vs.

mikrokulki) oraz rodzaju wykrywanych przeciwciał (cytotoksyczne *vs.* zależne i niezależne od dopełniacza) [83, 84]. Nie bez znaczenia pozostaje również rozdzielczość i zakres typowania antygenów HLA dawcy, która jest kluczowa dla prawidłowej identyfikacji DSA.

Szczególnie ważnym czynnikiem wpływającym na funkcjonalność VXM jest aktualność wyniku anty-HLA SAB. Najkorzystniejsze dla oceny ryzyka jest wykonanie VXM oraz biologicznej próby krzyżowej z wykorzystaniem tej samej, aktualnej surowicy biorcy. W takim, idealnym schemacie najczęściej ustalana jest korelacja wyników tych badań. Jednak rutynowo, pomiędzy datą badania anty-HLA SAB a datą pobrania surowicy do wykonania PXM istnieje odstęp czasu wynoszący od kilku dni do nawet kilku miesięcy. Przyczyną są ograniczenia organizacyjno-czasowe oraz kwartalna częstość monitorowania poziomu i swoistości przeciwciał anty-HLA u potencjalnych biorców nerki. Według najnowszych badań, wykonywanie oznaczenia przeciwciał anty-HLA raz na trzy miesiące może być niewystarczające, w szczególności u pacjentów silnie zimmunizowanych, których status immunologiczny jest podatny na znaczące zmiany w następstwie infekcji lub leczenia[34, 43]. Dlatego też istotnym elementem określenia korelacji VXM-PXM jest uwzględnienie rutynowej dostępności wyników anty-HLA SAB oraz zagadnienia kinetyki przeciwciał.

Niezbędnym etapem określenia indywidualnego poziomu ryzyka immunologicznego biorcy przed transplantacją nerki jest uprzednie ustalenie znaczenia klinicznego DSA wykrywanych metodą SAB. Istnieją liczne dowody na potwierdzenie tezy, że DSA wykryte przed przeszczepieniem mogą zwiększać ryzyko ostrego odrzucania oraz utraty przeszczepu[73, 87-89]. Jednak nadal nie jest jednoznaczne, czy wszystkie DSA, niezależnie od wartości MFI i swoistości, mogą wywierać niekorzystny wpływ na wynik transplantacji nerki. Szczególnie kontrowersyjne jest znaczenie kliniczne niskich poziomów DSA u pacjentów z negatywnym wynikiem CDC-XM oraz FLXM. Zgodnie z raportem Amerykańskiego Towarzystwa ds. Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki oraz Amerykańskiego Towarzystwa Transplantacyjnego, obecność DSA wykrytych wyłącznie metodą SAB może oznaczać podwyższone ryzyko AMR oraz TCMR (T cell-mediated rejection; odrzucanie przeszczepu zależne od limfocytów T) [25]. Częstość występowania AMR u biorców z DSA o niskim MFI (466-3000) szacuje się nawet na 20%[88]. Z drugiej strony, istnieją przekonujące dowody na brak istotnego wpływu DSA wykrytych wyłącznie metodą SAB na częstość epizodów ostrego odrzucania oraz funkcję i przeżywalność przeszczepionej nerki[90, 91].



Spośród zagadnień związanych z klinicznym znaczeniem DSA SAB, niejednoznaczne pozostaje również zagadnienie wpływu DSA swoistych dla HLA -DQ, -DP oraz -Cw. Ze względu na niską ekspresję tych antygenów na powierzchni komórek, potencjalnie patologiczne działanie swoistych DSA przez długi czas nie było brane pod uwagę przez klinicystów a zgodność w zakresie HLA -DQ, -DP i -Cw była często pomijana w algorytmach alokacji par biorca-dawca nerki[55, 92]. Wyniki ostatnich badań sugerują jednak istnienie związku pomiędzy obecnością DSA HLA -DQ, -DP oraz -Cw a wzrostem ryzyka AMR oraz redukcją czasu przeżycia przeszczepu[93]. Szczególnie niekorzystny wpływ na wynik transplantacji przypisuje się niezgodnościom w zakresie antygenów HLA -DQ. Szacuje się, że nawet 77% pacjentów, u których wykazano obecność *de novo* DSA po przeszczepieniu, posiada DSA o swoistości HLA-DQ, które mogą zwiększać ryzyko wystąpienia AMR oraz utraty przeszczepu[94, 95]. Dzięki licznym dowodom na niekorzystny wpływ zarówno pre- jak i post-transplantacyjnych DQ DSA, typowanie antygenów HLA -DQ zostało włączone do procedur wirtualnej prób krzyżowej oraz alokacji biorców na całym świecie.

W porównaniu z DSA swoistymi dla HLA -A, -B, -DR czy -DQ, częstość występowania DSA HLA -DP oraz -Cw u biorców oczekujących na przeszczepienie nerki jest niższa[96]. Mimo to, podobnie jak w przypadku DSA DQ, również rośnie liczba doniesień na temat niekorzystnego wpływu tych DSA na wyniki transplantacji[55-57, 96]. Dlatego też zarówno podczas optymalizacji, jak i w rutynowo wykonywanym VXM konieczne wydaje się uwzględnianie wszystkich loci HLA. Niezbędna jest również analiza znaczenia klinicznego DSA z uwzględnieniem niskich poziomów MFI[93]. Spełnienie powyższych warunków stwarza możliwość udoskonalenia indywidualnej oceny ryzyka immunologicznego.

Pośród publikacji zajmujących się tematem znaczenia klinicznego przeciwciał DSA w kontekście negatywnych wyników FLXM i CDC-XM, niewiele jest prac, które badały to zagadnienie w grupie biorców po przeszczepieniu od dawcy żywego[87]. Poszerzenie puli potencjalnych dawców nerki poprzez zwiększenie częstości transplantacji od dawców żywych (spokrewnionych lub niespokrewnionych) stanowi ważną alternatywę dla przeszczepienia od dawców zmarłych. Jest to szczególnie ważne w kontekście rosnącego zapotrzebowania na narządy do przeszczepienia, przy jednoczesnym pogłębiającym się niedoborze organów[20]. Dlatego też ocena znaczenia klinicznego pre-transplantacyjnych DSA w grupie biorców nerki od

dawcy żywego wymaga kontynuacji i wydaje się niezbędna dla właściwej oceny ryzyka immunologicznego z wykorzystaniem VXM.

## 2. Założenia i cel pracy

Celem pracy było zbadanie wybranych kwestii problematycznych związanych z praktycznym zastosowaniem wirtualnej próby krzyżowej (VXM) w ocenie ryzyka immunologicznego u biorców przed przeszczepieniem nerki, w oparciu o doświadczenia pojedynczego ośrodka transplantacyjnego (Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie) i zasady alokacji obowiązujące w Polsce.

Realizacja celu była dwuetapowa i składała się z następujących części:

### **I. Ocena korelacji pomiędzy poziomem MFI pojedynczych DSA o swoistości HLA-A lub -B lub -DR a wynikiem próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC-XM) oraz próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej (FLXM).**

Celem analizy było wyznaczenie optymalnych punktów odcięcia MFI DSA dla prognozowania wyników CDC-XM oraz FLXM. Do badania wykorzystano wyniki anty-HLA SAB z okresu czterech miesięcy.

W celu ewaluacji wpływu dostępności wyniku anty-HLA SAB na prognozykę VXM badanie wykonano dwukrotnie. Pierwszy raz - na podstawie wyników anty-HLA SAB dostępnych przed wykonaniem CDC-XM i FLXM. Druga analiza została przeprowadzona po wykonaniu biologicznych prób krzyżowych z wykorzystaniem wyników anty-HLA SAB po kwartalnej aktualizacji. Wyniki obydwu badań porównano. Ponadto, na podstawie dostępnych wyników oznaczenia poziomu i swoistości przeciwciał anty-HLA metodą SAB u badanych biorców, została wykonana analiza kinetyki DSA.

### **II. Ocena znaczenia klinicznego niskich poziomów DSA na podstawie wyników transplantacji w kohorcie historycznej biorców nerki od dawcy żywego z negatywnymi wynikami CDC-XM i FLXM.**

Założeniem badania była ocena znaczenia klinicznego pre-transplantacyjnych DSA HLA-A, -B, -DR <5000MFI oraz wszystkich DSA swoistych dla HLA-DQ, -DP, -

Cw, które nie były rutynowo typowane u potencjalnych dawców żywych w czasie trwania badania.

W celu wyłonienia, spośród biorców przeszczepionych od dawców żywych w latach 2014-2018 w Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus w Warszawie, badanej kohorty historycznej zastosowano następujące kryteria włączenia: wiek >18 lat, dawca niebędący HLA-identycznym rodzeństwem, brak terapii odczulającej, dostępny wynik anty-HLA SAB z okresu przed transplantacją, negatywne wyniki CDC-XM i FLXM.

Ocena wyników przeszczepienia odbywała się w trzech grupach: pacjenci DSA pozytywni, pacjenci posiadający przeciwciała anty-HLA niebędące DSA (NDSA – non-donor specific antibody) oraz biorcy, u których nie wykazano obecności żadnych przeciwciał anty-HLA (grupa negatywna). Okres obserwacji wynosił trzy lata. Oceniano następujące parametry: przeżywalność przeszczepu, wielkość przesączania kłębuszkowego (eGFR – estimated glomerular filtration rate), częstość występowania proteinurii oraz częstość epizodów ostrego odrzucania potwierdzonych badaniem biopsji przeszczepionych nerek.

Ponadto na podstawie dostępnych wyników oznaczeń anty-HLA SAB przeanalizowano w badanej kohorcie biorców częstość występowania *de novo* DSA oraz pre-transplantacyjnych DSA, o tendencji do utrzymywania się po transplantacji.

### 3. Kopie opublikowanych prac

Transplant Immunology 72 (2022) 101583



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Transplant Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/trim](http://www.elsevier.com/locate/trim)



## Accuracy of virtual crossmatch (VXM) prediction of physical crossmatch (PXM) results of donor specific antibody (DSA) in routine pretransplant settings—a single-center experience

Natasza Olszowska-Zaremba<sup>a</sup>, Radosław Zagożdżon<sup>a,b,\*</sup>, Jolanta Gozdowska<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Department of Immunology, Transplantology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>c</sup> Department of Transplantation Medicine, Nephrology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

HLA antibody  
Crossmatch prediction  
Complement-dependent cytotoxicity crossmatch  
Flow cytometry crossmatch  
Renal transplantation

#### ABSTRACT

**Background:** Virtual crossmatch (VXM) is a new powerful tool in pre-transplant risk assessment. However, the ability of VXM to predict physical crossmatch (PXM) results remains controversial. Our work evaluated the predictive potential of VXM results, measured by SAB (single antigen bead assay), for CDCXM (complement-dependent cytotoxicity crossmatch) and FLXM (flow cytometry crossmatch) results of DSA (donor specific antibody) in sensitized patients.

**Methods:** In total, 261 CDCXM and FLXM measurements were performed for 180 potential kidney transplant candidates, each with a single HLA-A, -B, or -DR DSA against a potential deceased donor. Analysis was conducted with two SAB datasets of four-month distant and collected prior to and after PXM results. Optimal MFI (mean fluorescence intensity) thresholds and likelihood ratios were assigned based on low (<2000 MFI), medium (2001–5000 MFI) and high risk (>5000 MFI). The impact of VXM predictability was determined by the ROC curves comparison. In addition, inter-assay changes of MFI were evaluated.

**Results:** The accuracy of VXM to predict CDCXM was inferior to that of FLXM with the AUC (area under ROC curve) of 0.644 vs. 0.849. In contrast, the initial ROC analysis showed that the VXM prediction was good for both T-FLXM with ROC value of 0.849 and by B-FLXM with ROC value of 0.706 for a single antigen of HLA-A, -B, or -DR DSA. In fact, the best VXM prediction was for FLXM with good sensitivity for B-FLXM against HLA-DR-specific DSA (0.851). Similar results of VXM predictability were observed for pre- and post-crossmatch ROC curves.

**Conclusion:** VXM predictability is better for positive/negative FLXM than for positive/negative CDCXM results to evaluate a single HLA-A, -B, -DR DSA disparity. This may be related to the fact that VXM and FLXM rely on binding of antibodies to beads or cells, respectively. In contrast, VXM is less predictive for CDCXM because the latter measures complement-dependent cytotoxic function. We intend expand VXM analysis to correlate their results with FLXM results to select low/medium risk patients for kidney transplantation in Poland.

#### 1. Introduction

Anti-HLA (human leukocyte antigen) antibodies are associated with both acute and chronic rejection of kidney allografts [1]. It was shown

that recipients with preformed anti-HLA donor-specific antibody (DSA) detected by a solid-phase single antigen bead (SAB) assay are at greater risk of antibody-mediated rejection and allograft failure [2]. In Poland, virtual crossmatch (VXM) was introduced into pretransplant procedures

**Abbreviations:** HLA, human leukocyte antigen; DSA, donor specific antibody; SAB, single antigen bead assay; VXM, virtual crossmatch; MFI, mean fluorescence intensity; CDCXM, complement-dependent cytotoxicity crossmatch; PXM, physical crossmatch; FLXM, flow cytometry crossmatch; PCR-SSP, sequence-specific primer polymerase chain reaction; ROC, receiver operating characteristics; AUC, area under the ROC curve; LR, likelihood ratio; DTT, 1,4-dithiothreitol; AHG, anti-human globulin; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

\* Corresponding author at: Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland.

**E-mail addresses:** [natasza.olszowska-zaremba@wum.edu.pl](mailto:natasza.olszowska-zaremba@wum.edu.pl) (N. Olszowska-Zaremba), [radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl](mailto:radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl) (R. Zagożdżon), [jolanta.gozdowska@wum.edu.pl](mailto:jolanta.gozdowska@wum.edu.pl) (J. Gozdowska).

<https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101583>

Received 26 October 2021; Received in revised form 15 March 2022; Accepted 15 March 2022

Available online 18 March 2022

0966-3274/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

in 2016. Depending on the mean fluorescence intensity (MFI) of DSA, the individual immunological risk is defined. Patients who are low risk (with DSA <2000 MFI) and intermediate risk (with DSA 2000–5000 MFI) must have negative complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDCXM) to prospective donor to proceed with kidney transplantation. In contrast, patients with DSA above 5000 MFI are considered as high immunological risk: these patients are excluded from the CDCXM testing and from transplantation. Since patients without preexisting DSA are at low risk of early rejection and have good long-term allograft survival, their testing may omit prospective physical crossmatch (PXM) assays, such as CDCXM and/or flow cytometry crossmatch (FLXM) and rely on negative VXMs [3]. This strategy was proved to have the potential to accelerate allocation, shorten the cold ischemia time and even increase access to transplantation for highly sensitized patients [4–6]. The prerequisite to benefit from the advantages of just VXMs testing is the determination of unacceptable antigens by SAB assay and to predict the actual PXM results [2]. It is advised that each center should set MFI cut-off value for the best VXMs predictability for SAB procedures [7,8]. In Poland the SAB is usually performed every 3–4 months. However, literature review recommended a more individual approach [9]. Since the timing of SAB performance can have fundamental significance for the reliability of VXMs, we decided to study PXM prediction by VXMs after SAB performed twice within 3–4 months.

### 1.1. Objective

We evaluated the relationship between single HLA-A, -B, -DR DSA MFI and actual crossmatch (FLXM, CDCXM) in conditions that reflect routine pretransplant settings in Poland regarding the time interval between crossmatched sera and SAB results. The study also includes analysis of antibody kinetics between available measurements.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Selection of recipient sera

Adult recipients awaiting deceased donor kidney transplantation, each with a single HLA-A, -B, or -DR DSA against a potential deceased donor, were selected from the Polish National Waiting List. A broad spectrum of DSA MFI was chosen to assign the optimal MFI cut-off for PXM prediction. Patients with any antibodies against HLA -DQ, -DP, or -Cw that exceeded 10,000 MFI were excluded from the study [10,11]. The serum samples for PXM originated from our HLA laboratory nationwide sera collection of potential renal recipients. HLA-A, -B, -DR typing of cadaver donors was conducted as a pretransplant procedure with sequence-specific primer polymerase chain reaction (Inno-train, Germany).

### 2.2. SAB data

The recipients' SAB data were collected before PXM and later when quarterly updated results were available. All SAB assays were performed as a part of a routine assessment of sensitization by Histocompatibility Laboratories in seven transplant centers using the Luminex platform and commercial kits (LABScreen Single Antigen, One Lambda, USA).

### 2.3. Physical crossmatches (PXMs)

The CDCXM and FLXM were performed using the current recipient's sera ( $\leq 2$  months) and lymphocytes isolated from lymph nodes of cadaver donors. Tests required cell viability >80%. CDCXMs with a mixture of T and B cells and B cells separately were carried out following the National Institute of Health procedure, with extended incubation times (60'/70' with complement) [12]. More than 10% of dead cells were decisive for a positive result.

For FLXM, donor lymphocytes ( $3 \times 10^5$ ) were incubated 30' with 10

$\mu$ l of recipient sera or control sera. For cell staining, FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-human IgG (Bio-rad, USA), PerCp-anti-CD3, and PE-anti-CD19 (Becton Dickinson) were used. The test was performed on a FACSCanto II analyzer (Becton Dickinson), and a positive result was formulated when the sample to control fluorescence ratio was  $\geq 1,50$ .

### 2.4. Statistics

The basic characteristics of patients were taken from the Polish nationwide transplant database. Receiver operating characteristic analysis (ROC) was conducted with two SAB datasets of four-month distant collected prior to and after PXM results. The ROC curves were compared with the Delong test. The accuracy of the prediction of PXM was based on the area under the ROC curve (AUC) and formulated as: 0.5–0.6: fail, 0.6–0.7: poor, 0.7–0.8: fair 0.8–0.9: good, and 0.9–1: excellent. For each PXM method, optimal MFI cut-offs, sensitivity, specificity, positive and negative likelihood ratios (LR) were determined, including the division depending on DSA specificity (HLA class I and II, HLA-A, B and -DR loci). The LR values were interpreted as follows: <1- negative result argues against the diagnosis of interest; =1 – the test does not have diagnostic value; >1 – positive result supports the diagnosis of interest.

Inter-assay antibody changes were assessed with paired Mann-Whitney test. All statistics were conducted with R-project 4.1.1. software, and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Warsaw (AKBE/11/2020) and the Polish Transplant Coordinating Centre - Poltransplant.

## 3. Results

From 2018 to 2020, based on the criteria mentioned earlier, 180 adult potential renal recipients were chosen for the study (Table 1). Overall, 261 crossmatches were conducted (143 CDCXMs and 118 FLXMs) with 32 cadaver donors.

### 3.1. The interval between PXM crossmatches and SAB assays

Among recipients chosen for the study based on MFI of DSA, the initial pre-crossmatch time-space between tested sera and SAB result was  $43 \pm 32$  days. In most cases (49%), SAB was conducted from 31 to 60 days before the date of crossmatched sera. In 23% of recipients, antibody results originated from serum that was used for crossmatching.

**Table 1**

The basic characteristics of recipients whose sera were chosen to study physical cross-match (PXM) prediction by a single HLA<sup>a</sup>-A, -B or -DR donor-specific antibody (DSA) detected by a solid-phase single antigen bead (SAB) assay.

Recipient characteristics	
Mean age $\pm$ SD <sup>b</sup>	56 $\pm$ 17
Sex (% female)	57
Previous transplant (%)	17
Mean pre-crossmatch PRA <sup>c</sup> $\pm$ SD (%)	10 $\pm$ 21
Mean maximum PRA $\pm$ SD(%)	18 $\pm$ 26
Primary cause of ESRD <sup>d</sup>	
■ primary glomerulonephritis n(%)	58(32)
■ aetiology uncertain n(%)	40(22)
■ congenital kidney diseases n(%)	39(22)
■ hypertensive nephropathy n(%)	23(13)
■ diabetic nephropathy n(%)	13(7)
■ obstructive nephropathy n(%)	4(2)
■ secondary glomerulonephritis n(%)	3(2)

<sup>a</sup> Human leukocyte antigen.

<sup>b</sup> Standard deviation.

<sup>c</sup> Panel reactive antibodies

<sup>d</sup> End-stage renal failure.

In the rest of the patients, the interval was between 61 and 130 days (in detail: 61–90–25%; 91–130–3%).

After PXM performance, new SAB results were entered into the database, and DSA status had changed in 28%(50) patients. With SAB quarterly update, the mean time interval had shortened to  $29 \pm 28$  days. Still, 50% of patients had SAB performed 31–60 days before cross-matched sera were collected. The proportion of recipients without any interval increased to 40%. The number of patients with >61 days interval decreased from 28% to 10%.

### 3.2. DSA kinetics between available SAB measurements

No statistically significant change was observed between MFI of DSA results available before PXM, and those entered later with a quarterly update ( $p = 0.954$ ). The decrease of MFI was observed in 58%( $n = 29$ ) of patients ( $1164 \pm 1308$  MFI). In the rest of the recipients DSA increased ( $2935 \pm 2597$  MFI). The maximal MFI DSA change was an increase from 7055 to 15,970 (8915 difference).

In 28%( $n = 14$ ) updated SAB data show appearance of new HLA-A, -B, and -DR DSA in addition to those established in the earlier assay. Disappearance of initial DSA and detection of new, different HLA-A, -B, and -DR DSA was observed in 6% ( $n = 3$ ) of recipients.

### 3.3. VXM vs. CDCXM

The accuracy of prediction of CDCXM result by single pre-crossmatch DSA assessed by AUC was poor (0.644) with the optimal MFI cut-off of 8915 MFI (Table 2). In the case of B-CDCXM, the accuracy of VXM was even lower (0.569 AUC, cut-off of 8915 MFI). The relatively high values of optimal MFI cut-offs showed the difference in sensitivity between CDCXM and VXM by the SAB method.

The prediction of CDCXM and B-CDCXM with VXM was characterized by low sensitivity (46% and 38%, respectively). The high values of LR- (0.66;0.75) confirm discordance between negative VXM and CDCXM results, particularly in case of B cells prone to unspecific non-HLA antibody binding.

The VXM predictability varied depending on DSA specificity. In particular, the DSA descending accuracy was as follows: for HLA-B DSA

of 0.701, for HLA-DR DSA of 0.696, and for HLA-A DSA of 0.644. The optimal threshold for CDCXM prediction with locus HLA-A DSA was lower than cut-offs established for other specificities (3097 MFI).

Based on the positive likelihood ratio value (LR + 2.14-2.54), the probability of positive was only two times higher in recipients with positive VXM than in patients with negative VXM.

Although the anti-HLA SAB quarterly update after crossmatch did not cause significant ROC changes, the LR values improved (Supplement Table 4). It may suggest that shortening the time-space between cross-matched serum and SAB results could enhance the ability of VXM to predict CDCXM.

### 3.4. VXM vs FLXM

The accuracy of prediction by VXM of FLXM outcome was superior to that of CDCXM. The initial ROC analysis has shown that for a single antigen of HLA-A, -B, or -DR DSA the prediction by T-FLXM was good with ROC value of 0.849 and by B-FLXM with ROC value of 0.706. Due to the higher sensitivity of the FLXM assay, the optimal MFI cut-off was lower with 5896 MFI for T and with 6720 MFI for B FLXM in comparison to those for CDCXM.

The prediction by VXM of T-FLXM and B-FLXM was characterized by good sensitivity (78% and 72%, respectively) and relatively low LR-values (0.3 and 0.43, respectively). These values indicate at considerable concordance between VXM and FLXM below the optimal MFI threshold.

The prediction by VXM of positive FLXM assessed by LR+ was similar to that of CDCXM (LR+ 2.06–2.90). Interestingly, the ROC analysis with a single DSA specificity showed that DR DSA above 8709 MFI predicted B-FLXM with the superior accuracy of 0.851 with excellent 100% sensitivity and 76% specificity (LR+ was 4.22 and LR- was 0.00).

Despite the slight improvement in predictability of VXM for T/B-FLXM accuracies the quarterly update of SAB results did not significantly change VXM predictability for FLXM (Supplement Table 4).

## 4. Discussion

The setting of optimal MFI cut-off for actual crossmatch prediction is

**Table 2**

The accuracy of physical crossmatches (PXMs) prediction by single HLA-A, -B or -DR DSA<sup>a</sup> with setting the optimal MFI<sup>b</sup> cut-offs.

ROC <sup>c</sup> analysis with SAB <sup>d</sup> data collected before PXM (MIT <sup>e</sup> 43 ± 32 days)										
Type of cross-match	n(pos)	n (neg)	AUC <sup>f</sup>	p	95% CI AUC	optimal cut-off	sensitivity [%]	specificity [%]	LR + <sup>g</sup>	LR- <sup>h</sup>
CDCXM <sup>i</sup>	28	115	0,644	0,009	0.519–0.770	8915	46%	82%	2,54	0,66
B CDCXM	42	101	0,569	0,098	0.456–0.682	8915	38%	82%	2,14	0,75
T FLXM <sup>j</sup>	36	41	0,849	0	0.736–0.962	5896	78%	73%	2,9	0,3
B FLXM	18	100	0,706	0,003	0.575–0.837	6720	72%	65%	2,06	0,43

ROC analysis with quarterly updated SAB results collected after PXM (MIT 29 ± 28 days)											
										p (Delong)*	
CDCXM	23	98	0,661	0,008	0.522–0.800	9167	48%	85%	3,12	0,62	0,865
B CDCXM	34	87	0,564	0,139	0.435–0.692	9167	38%	85%	2,56	0,73	0,955
T FLXM	34	70	0,769	0	0.677–0.862	5064	79%	67%	2,42	0,31	0,882
B FLXM	16	88	0,738	0,001	0.606–0.870	6667	75%	66%	2,2	0,38	0,745

\*The difference between ROC curves with two SAB datasets of four-month distant collected prior and after PXM – determined with Delong test; For detailed ROC analysis in respect to HLA class and loci check Supplement Table 3 and Table 4.

<sup>a</sup> Donor specific antibody.

<sup>b</sup> Mean fluorescence intensity.

<sup>c</sup> Receiver operating characteristics.

<sup>d</sup> Single antigen bead assay.

<sup>e</sup> Mean interval time between the crossmatched serum and SAB result.

<sup>f</sup> Area under the ROC curve.

<sup>g</sup> Positive likelihood ratio.

<sup>h</sup> Negative likelihood ratio.

<sup>i</sup> Complement-dependent cytotoxicity crossmatch.

<sup>j</sup> Flow cytometry crossmatch.

controversial since many factors may adversely affect obtained results [13,14]. The most crucial obstacle are methodology differences between SAB assay and PXM crossmatches. Although the SAB technique is characterized by high sensitivity and specificity, it lacks a biological character and is susceptible to antibody-epitope binding, which does not occur in vivo [3]. Unlike SAB, PXMs depend on complex interactions between recipient serum and cells of a potential donor that may be affected by the presence of non-HLA antibodies and variability in antigen expression on the cell surface [3]. When it comes to sensitivity, FLXM results are much better predicted by VXMs results. Indeed, the CDCXM results had lower sensitivity and ability to detect antibodies which must bind to HLA on donor cells but the measured reactivity depends on the complement engagement: in comparison, VXMs results rely only on binding to HLA molecules on beads [14]. We confirmed these methodological differences by showing the discrepancy in the prediction ability of FLXM and CDCXM by these PXM assays. The CDCXM was predicted with poor accuracy even at a high MFI threshold (app. 10,000 MFI), whereas FLXM required a relatively low MFI cut-off (app. 6000 MFI) for good accuracy.

We observed that both CDCXM and FLXM with B cells were predicted by VXMs with inferior accuracy compared to T cells assays. This may be explained by the susceptibility of B cells to non-HLA antibody binding, which causes a high rate of false-positive reactions [15]. To improve CDCXM prediction by VXMs, we are currently implementing a procedure using 1,4-dithiothreitol (DTT), which eliminates IgM antibodies. In addition, the introduction of sensitivity adjustments, namely anti-human globulin (AHG) and Amos wash techniques, should also be considered.

For both crossmatch methods, locus-specific VXMs cut-offs were diversified, which could be associated with differences in HLA antigen structure and density between SAB beads and donor cells [16]. It is probable that instead of one uniform HLA-A, -B, -DR VXMs cut-off, individual MFI thresholds should be applied for each HLA locus [17]. One example of the above observation was the superior VXMs accuracy with HLA-DR DSA in predicting B-FLXM. This observation may be promising for future use of VXMs in organ transplantation at our center since HLA class II DSA were shown to increase the risk of acute rejection to a greater extent than HLA class I DSA [18,19]. With the established cut-offs, the prediction of FLXM by VXMs was characterized by relatively good sensitivity, which indicates the potential for effective separation of recipients with negative FLXM who would be at low risk of antibody-mediated rejection. It could be a step toward PXM assay omission in the case of negative VXMs.

However, the predictive value of positive VXMs assessed by LR+ was minimal, which indicates the discordance between positive VXMs and the results of PXM. It can be explained by the time interval between crossmatched sera and SAB results and lower sensitivity of PXM compared to VXMs. Moreover, the presence of anti-HLA antibodies against epitopes that are not present on donor cells in vivo should also be considered [3].

In our study, 23% of recipients had anti-HLA antibodies, which could be considered up-to-date from the immunological point of view (performed within 14 days before the crossmatched serum was collected). This share increased to 40% when quarterly updated results entered the base. The shortening of the time interval between crossmatched serum and VXMs results did not significantly improve PXM prediction. Since the interval between VXMs results and crossmatched serum remained more than one month for 50% of patients, the changes in the repertoire of HLA antibodies could affect the accuracy [9]. Likely, an improvement of the PXM methodology and the usage of up-dated VXMs results might increase PXM predictability.

In a relatively small group of patients, the VXMs quarterly updates enabled insight into HLA antibodies kinetics. Observed DSA MFI fluctuations confirmed that patients awaiting renal transplantation are vulnerable to changes of immunological status [9,20]. Therefore, increasing the frequency of anti-HLA antibody monitoring for selected patients and associating it with a history of sensitizing events might be

beneficial for better pre-immunological transplant risk assessment [21]. Among factors that could influence our SAB results may be complement component C3 interference and prozone effect [22]. However, both ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pretreatment and sera dilutions are not routine practices in Poland. Our study's drawback was that SAB results originated from different laboratories, which may be associated with a high risk of discordant results [23]. Additionally, the low-resolution HLA-A, -B, -DR typing of potential donors could also result in an incorrect identification of DSA.

In conclusion, in our center, the prediction by VXMs of positive CDCXM and/or FLXM results about the presence of a single HLA-A, -B, -DR DSA has different accuracy in routine pretransplant settings. The predictive value of negative VXMs for FLXM was relatively good or even excellent, indicating the potential to select recipients with low/medium immunological risk. Our analysis revealed clearly better predictability of VXMs for FLXM than for CDCXM results. This may be explained by the distinct mechanism how VXMs vs. CDCXM and VXMs vs. FLXM are generated. The former requires additional engagement of complement for CDCXM, whereas the latter rely just on binding of antibodies. We believe this is the simple explanation why VXMs is less predictive for CDCXM than for FLXM results. We intend to continue further studies how to better implement VXMs in the decision-making process in Poland. Most practical application would be to use FLXM testing for all patients and correlate results with VXMs analysis in the centralized lab to maintain uniform results.

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101583>.

#### References

- [1] P.I. Terasaki, Humoral theory of transplantation, *Am. J. Transplant.* 3 (6) (2003) 665–673, <https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00135.x>.
- [2] C. Lefaucheur, D. Viglietti, M. Mangiola, A. Loupy, A. Zeevi, From humoral theory to performant risk stratification in kidney transplantation, *J. Immunol. Res.* 2017 (2017) 5201098, <https://doi.org/10.1155/2017/5201098>.
- [3] P. Amico, G. Höniger, J. Steiger, S. Schaub, Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation, *Curr. Opin. Organ Transplant.* 14 (6) (2009) 656–661, <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328331c169>.
- [4] S. Aslam, J. Bugge, K. Wyatt, A. Kumar, E. Rogers, R. Watson, The impact of virtual crossmatch on cold ischemic times and outcomes following kidney transplantation, *Am. Surg.* 87 (1) (2021) 109–113, <https://doi.org/10.1177/0003134820942180>.
- [5] C.M. Puttarajappa, D. Jorgensen, J.G. Yabes, K. Jeong, A. Zeevi, J. Lunz, et al., Trends and impact on cold ischemia time and clinical outcomes using virtual crossmatch for deceased donor kidney transplantation in the United States, *Kidney Int.* (2021), <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.04.020>.
- [6] A.W. Bingaman, C.L. Murphey, J. Palma-Vargas, F. Wright, A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation, *Transplantation.* 86 (12) (2008) 1864–1868, <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e328318191404c>.
- [7] L.A. Baxter-Lowe, M. Cecka, M. Kamoun, J. Sinacore, M.L. Melcher, Center-defined unacceptable HLA antigens facilitate transplants for sensitized patients in a multi-center kidney exchange program, *Am. J. Transplant.* 14 (7) (2014) 1592–1598, <https://doi.org/10.1111/ajt.12734>.
- [8] M. Alzahrani, Z. Qahtani, H. Harbi, S. Kebasi, O. Essa, Attas R. Al, Virtual crossmatch: reality of perception, *Transplant. Proc.* 51 (2) (2019) 488–491, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.01.005>.
- [9] M. Togninalli, D. Yoneoka, A.G.A. Koliou, K. Borgwardt, J. Nilsson, Pretransplant Kinetics of Anti-HLA Antibodies in Patients on the Waiting List for Kidney Transplantation 30(11), 2019, pp. 2262–2274, <https://doi.org/10.1681/ASN.2019060594> %J *Journal of the American Society of Nephrology*.



- [10] K. Marfo, M. Ajaimy, A. Colovai, L. Kayler, S. Greenstein, M. Lubetzky, et al., Pretransplant immunologic risk assessment of kidney transplant recipients with donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies, *Transplantation*. 98 (10) (2014) 1082–1088, <https://doi.org/10.1097/tp.000000000000191>.
- [11] C. Liu, L. Wetter, S. Pang, D.L. Phelan, T. Mohanakumar, G.P. Morris, Cutoff values and data handling for solid-phase testing for antibodies to HLA: effects on listing unacceptable antigens for thoracic organ transplantation, *Hum. Immunol.* 73 (6) (2012) 597–604, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.016>.
- [12] National Institute of Health Lymphocyte Microcytotoxicity Technique, in: J. Ray (Ed.), *NIAID Manual of Tissue Typing Techniques*, Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, 1980, p. 39.
- [13] A.A. Zachary, J.T. Sholander, J.A. Houp, M.S. Leffell, Using real data for a virtual crossmatch, *Hum. Immunol.* 70 (8) (2009) 574–579, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.06.007>.
- [14] A. Konvalinka, K. Tinekam, Utility of HLA antibody testing in kidney transplantation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 26 (7) (2015) 1489–1502, <https://doi.org/10.1681/asn.2014080837>.
- [15] S. Le Bas-Bernardet, M. Hourmant, N. Valentin, C. Paitier, M. Giral-Classe, S. Curry, et al., Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation, *Transplantation*. 75 (4) (2003) 477–482, <https://doi.org/10.1097/01.Tp.0000047311.77702.59>.
- [16] H.M. Gebel, R.A. Bray, HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great? *Am. J. Transplant.* 14 (9) (2014) 1964–1975, <https://doi.org/10.1111/ajt.12807>.
- [17] J. Visentin, T. Bachelet, C. Borg, N. Franchini, T. Nong, J.H. Lee, et al., Reassessment of T lymphocytes crossmatches results prediction with Luminex class I single antigen flow beads assay, *Transplantation*. 101 (3) (2017) 624–630, <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000001239>.
- [18] S.J. Fidler, A.B. Irish, W. Lim, P. Ferrari, C.S. Witt, F.T. Christiansen, Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death, *Transpl. Immunol.* 28 (4) (2013) 148–153, <https://doi.org/10.1016/j.trim.2013.05.001>.
- [19] E.Y. Song, Y.J. Lee, J. Hyun, Y.S. Kim, C. Ahn, J. Ha, et al., Clinical relevance of pretransplant HLA class II donor-specific antibodies in renal transplantation patients with negative T-cell cytotoxicity crossmatches, *Ann Lab Med.* 32 (2) (2012) 139–144, <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.139>.
- [20] J. Locke, A. Zachary, D. Warren, D. Segev, J. Houp, R. Montgomery, et al., Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody, *Am. J. Transplant.* 9 (2009) 2136–2139, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02764.x>.
- [21] A.R. Tambur, P. Campbell, A.S. Chong, S. Feng, M.L. Ford, H. Gebel, et al., Sensitization in transplantation: assessment of risk (STAR) 2019 working group meeting report, *Am. J. Transplant.* 20 (10) (2020) 2652–2668, <https://doi.org/10.1111/ajt.15937>.
- [22] B.D. Tait, Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients - triumphs and challenges of the solid phase bead assay, *Front. Immunol.* 7 (2016) 570, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00570>.
- [23] H.C. Sullivan, R.S. Liwski, R.A. Bray, H.M. Gebel, The Road to HLA Antibody Evaluation: Do Not Rely on MFL 17(6), 2017, pp. 1455–1461, <https://doi.org/10.1111/ajt.14229>.

Supplement

**Table 3. The accuracy of physical crossmatches (PXM) prediction by single HLA –A, –B or –DR DSA<sup>a</sup> with setting the optimal MFI<sup>b</sup> cut-offs. ROC<sup>c</sup> analysis with SAB<sup>d</sup> data collected before PXM (MIT<sup>e</sup> 43 ± 32 days).**

CDCXM <sup>f</sup>										
group	n(pos)	n (neg)	AUC <sup>g</sup>	p	95% CI AUC	optimal cut-off	sensitivity [%]	specificity [%]	LR+ <sup>h</sup>	LR- <sup>i</sup>
all results	28	115	0,644	0,009	0.519-0.770	8915	46%	82%	2,54	0,66
HLA class I	22	75	0,619	0,046	0.472-0.765	9167	41%	85%	2,79	0,69
locus A	12	41	0,644	0,068	0.474-0.815	3097	83%	49%	1,63	0,34
locus B	9	36	0,701	0,033	0.466-0.936	9240	67%	83%	4,00	0,40
locus DR	6	40	0,696	0,065	0.428-0.964	8709	67%	80%	3,33	0,42
<b>B CDCXM</b>										
all results	42	101	0,569	0,098	0.456-0.682	8915	38%	82%	2,14	0,75
HLA class I	34	63	0,549	0,213	0.418-0.681	9167	35%	87%	2,78	0,74
locus A	17	36	0,562	0,239	0.396-0.728	3097	71%	47%	1,34	0,62
locus B	16	29	0,610	0,117	0.408-0.812	10696	38%	100%	22,13	0,63
locus DR	8	38	0,592	0,213	0.330-0.854	4691	75%	61%	1,90	0,41
<b>T FLXM<sup>k</sup></b>										
HLA class I	36	41	0,848	0,000	0.735-0.962	5896	78%	73%	2,90	0,30
locus A	14	23	0,761	0,004	0.598-0.924	5896	79%	70%	2,58	0,31
locus B	22	18	0,848	0,000	0.735-0.962	5552	77%	78%	3,48	0,29
<b>B FLXM</b>										
all results	18	100	0,706	0,003	0.575-0.837	6720	72%	65%	2,06	0,43
HLA class I	15	62	0,665	0,025	0.506-0.823	6667	67%	63%	1,80	0,53
locus A	4	33	0,644	0,190	0.426-0.862	2964	100%	36%	1,57	0,00
locus B	11	29	0,668	0,055	0.458-0.877	9897	45%	93%	6,59	0,59
locus DR	3	38	0,851	0,024	0.715-0.986	8709	100%	76%	4,22	0,00

<sup>a</sup> donor specific antibody; <sup>b</sup> mean fluorescence intensity; <sup>c</sup> receiver operating characteristics; <sup>d</sup> single antigen bead assay; <sup>e</sup> mean interval time between the crossmatched sera and SAB result; <sup>f</sup> human leukocyte antigen; <sup>g</sup> area under the ROC curve; <sup>h</sup> positive likelihood ratio; <sup>i</sup> negative likelihood ratio; <sup>j</sup> complement-dependent cytotoxicity crossmatch; <sup>k</sup> flow cytometry crossmatch; <sup>l</sup> since specificity was 100% Bootstrap correction was used to determine LR+.

Supplement

**Table 4. The accuracy of physical crossmatches (PXM) prediction by single HLA –A, –B or –DR DSA<sup>a</sup> with setting the optimal MFI<sup>b</sup> cut-offs. ROC<sup>c</sup> analysis with quarterly updated SAB results collected after PXM (MIT<sup>e</sup> 29 ± 28 days).**

CDCXM <sup>k</sup>											
group	n(pos)	n (neg)	AUC <sup>g</sup>	p	95% CI AUC	optimal cut-off	sensitivity [%]	specificity [%]	LR+ <sup>h</sup>	LR- <sup>i</sup>	p (DeLong) <sup>l</sup>
all results	23	98	0,661	0,008	0.522-0.800	9167	48%	85%	3,12	0,62	0,865
HLA class I	17	68	0,673	0,014	0.512-0.833	9167	47%	87%	3,56	0,61	0,636
locus A	8	37	0,784	0,006	0.639-0.928	3122	100%	51%	2,06	0,00	0,766
locus B	8	33	0,674	0,068	0.419-0.929	9897	63%	85%	4,12	0,44	0,243
locus DR	6	30	0,633	0,159	0.369-0.898	10445	50%	83%	3,00	0,60	0,889
<b>B CDCXM</b>											
all results	34	87	0,564	0,139	0.435-0.692	9167	38%	85%	2,56	0,73	0,955
HLA class I	27	58	0,569	0,156	0.423-0.715	9167	37%	88%	3,07	0,72	0,851
locus A	12	33	0,606	0,146	0.422-0.790	3122	75%	48%	1,46	0,52	0,793
locus B	14	27	0,606	0,141	0.386-0.825	10671	43%	96%	11,57	0,59	0,737
locus DR	7	29	0,537	0,390	0.253-0.821	10445	43%	83%	2,49	0,69	0,979
<b>T FLXM<sup>l</sup></b>											
HLA class I	31	38	0,795	0,000	0.692-0.899	5064	77%	68%	2,45	0,33	0,882
locus A	13	21	0,733	0,012	0.559-0.906	5024	77%	67%	2,31	0,35	0,822
locus B	18	17	0,850	0,000	0.726-0.973	7972	61%	94%	10,39	0,41	0,989
<b>B FLXM</b>											
all results	16	88	0,738	0,001	0.606-0.870	6667	75%	66%	2,20	0,38	0,745
HLA class I	14	55	0,710	0,008	0.554-0.867	6667	71%	65%	2,07	0,44	0,697
locus A	3	31	0,763	0,077	0.599-0.928	6303	100%	65%	2,82	0,00	0,828
locus B	11	24	0,689	0,039	0.483-0.896	9897	45%	96%	10,91	0,57	0,442
locus DR	2	33	0,879	0,041	0.727-1	9345	100%	79%	4,71	0,00	0,890

<sup>a</sup> donor specific antibody; <sup>b</sup> mean fluorescence intensity; <sup>c</sup> receiver operating characteristics; <sup>d</sup> single antigen bead assay; <sup>e</sup> mean interval time between the crossmatched sera and SAB result; <sup>f</sup> human leukocyte antigen; <sup>g</sup> area under the ROC curve; <sup>h</sup> positive likelihood ratio; <sup>i</sup> negative likelihood ratio; <sup>j</sup> The difference between ROC curves with two SAB datasets of four-month distant collected prior and after PXM – determined with DeLong test; <sup>k</sup> complement-dependent cytotoxicity crossmatch; <sup>l</sup> flow cytometry crossmatch.



## Clinical significance of low pre-transplant donor specific antibodies (DSA) in living donor kidney recipients with negative complement-dependent cytotoxicity crossmatches (CDCXM), and negative flow cytometry crossmatches (FLXM) – A single-center experience

Natasza Olszowska-Zaremba<sup>a,\*</sup>, Jolanta Gozdowska<sup>b</sup>, Radosław Zagożdżon<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Department of Transplantation Medicine, Nephrology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>c</sup> Department of Immunology, Transplantology and Internal Medicine, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Donor specific antibody  
Single antigen bead assay  
Virtual crossmatch  
Kidney transplantation  
Living donor

### ABSTRACT

**Background:** It is controversial whether all donor-specific antibodies (DSA) detected by the solid-phase single antigen bead (SAB) assay negatively affect kidney transplantation outcomes. The study aimed to evaluate the possible clinical significance of low pre-transplant DSA in living donor kidney recipients. We analyzed a group of patients with HLA-A, -B, and -DR DSA reactivities below a virtual crossmatch (VXM) value of 5000 MFI but with all VXM DSA reactivities at HLA-DQ, -DP, and -Cw, which were not typed routinely for donors prior to transplantation. We also investigated the incidence of persistent and *de novo* DSAs in available posttransplant SAB assays.

**Methods:** From the historical cohort of living donor recipients transplanted between 2014 and 2018 at our center ( $n = 82$ ), 55 patients met the inclusion criteria, namely: these patients were  $> 18$  years old with non-HLA identical sibling donors, who were not desensitized, who had available pre-transplant SAB results, and who had negative both complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDCXM) and flow cytometry crossmatch (FLXM) results. An additional donor HLA typing, performed for all 55 recipients, identified donor additional HLA-DQ, -DP, and -Cw DSA reactivities. These patients were then divided by SAB reactivity into three groups: 1) those with DSA-positive reactivities; 2) those with non-donor-specific anti-HLA reactivities (NDSA); and, 3) those who were anti-HLA-negative. All these recipients were followed for three years and checked for their *de novo* or persistent DSA.

**Results:** In the studied cohort, DSA-positive, NDSA reactive, and anti-HLA negative recipients constituted 33%, 36%, and 31% of 55 patients, respectively. Non-routinely considered pre-transplant HLA-DQ, -DP, and -Cw DSA-positive reactivities were shown in as many as 78% of DSA-positive cases (group 1) with the lowest MFI value of 319 to DP4 and the highest MFI of 5767 to DQ2. Of the pre-transplant HLA-A, -B, and -DR DSA reactivities, only -DR52 DSA reactivity reached the highest MFI value of 2191. These detected DSAs did not reduce the mean estimated glomerular filtration rate (eGFR) values and did not increase the incidence of proteinuria in recipients. While the 3-year graft survival was lower in the DSA-positive group (94.4%) with one recipient who lost kidney transplant, the difference was not significantly different ( $p = 0.7$ ) from the NDSA (100%) and negative (100%) groups. In terms of the incidence of *de novo* acute antibody-mediated rejection (AMR) at three years after transplantation, no case has been reported in the cohort. This may suggest that low DSA-positive recipients do

**Abbreviations:** DSA, donor specific antibody; HLA, human leukocyte antigen; SAB, single antigen bead assay; VXM, virtual crossmatch; AMR, acute antibody-mediated rejection; CDCXM, complement-dependent cytotoxicity crossmatch; FLXM, flow cytometry crossmatch; MFI, mean fluorescence intensity; PCR-SSP, single-specific primer polymerase chain reaction; NDSA, non-donor specific antibody; eGFR, estimated glomerular filtration rate; PTC, peritubular capillaries; DGF, delayed graft function; PRA, panel reactive antibody assay; IL2R-Ab, anti-interleukin two receptor antibody; TCMR, T-cell mediated rejection; IVIg, intravenous immunoglobulin therapy; ATG, anti-thymocyte globulin; ANOVA, analysis of variance; ESRD, end-stage renal disease.

\* Corresponding author: Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland.

E-mail addresses: [natasza.olszowska-zaremba@wum.edu.pl](mailto:natasza.olszowska-zaremba@wum.edu.pl) (N. Olszowska-Zaremba), [jgozdowska@wum.edu.pl](mailto:jgozdowska@wum.edu.pl) (J. Gozdowska), [radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl](mailto:radoslaw.zagozdzon@wum.edu.pl) (R. Zagożdżon).

<https://doi.org/10.1016/j.trim.2022.101672>

Received 26 April 2022; Received in revised form 14 July 2022; Accepted 15 July 2022

Available online 19 July 2022

0966-3274/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

not experience higher rejection rate. However, DSA-positive recipients had a tendency for a higher frequency of C4d deposits in peritubular capillaries (PTC) and *de novo* DSA.

**Conclusion:** Our 3-year follow-up of patients with low pre-transplant DSA found no association with a deterioration in graft function and worse graft survival. Furthermore, we did not observe an increase in AMR in our patients with low DSA. A larger cohort and a longer follow-up period may be needed to evaluate the tendency of low DSA-positive recipients towards the higher incidence of C4d deposits in PTC and/or *de novo* DSA.

## 1. Introduction

One of the most significant problems of organ transplantation is the antibody-mediated rejection of the graft. It was shown that it might be responsible for over one-half of all death-censored graft loss over time [1]. The detrimental influence of preformed donor-specific antibodies (DSA) against human leukocyte antigens (HLA) in renal recipients was recognized more than five decades ago by Patel and Terasaki [2]. Since then, antibody detection methods have been extensively developed. Currently, the most widespread technique is a highly sensitive and specific solid-phase single antigen bead (SAB) assay. Relating the result of this assay to the potential donor's HLA antigens allows for a virtual crossmatch (VXM) to be performed. In many transplant centers, VXM has become an integral element of pre-transplant immunological risk stratification and the planning of immunosuppression strategy [3].

Patients without preexisting SAB DSA had a low risk of acute antibody-mediated rejection (AMR) and good kidney graft survival [4]. However, it is controversial whether all SAB DSAs, regardless of their levels, exert a detrimental effect on transplantation outcomes [5]. The clinical significance of low-level DSA in patients with negative complement-dependent cytotoxicity crossmatch (CDCXM), and negative flow cytometry crossmatch (FLXM) is particularly questionable. The recent meta-analysis conducted by Tambur et al. showed that low DSA detectable only by SAB might cause AMR [6]. According to Lefaucheur et al., the risk of AMR rises with mean fluorescent intensity (MFI) of DSA as low as 465 [7]. However, at the same time, other studies are reporting that pre-transplant SAB DSA alone constituted a minimal risk unless crossing donor specific MFI cut-off [3,8,9].

Even more problematic appears the impact of DSA against HLAs rarely included in recipient-donor matching algorithms, namely Cw, DQ, DP, and DR51/52/53 [10]. Compared to HLA-A, -B, and -DR antigens, their tissue expression is weaker and antibodies of those specificities occur to a lesser extent in the list of waiting patients [11,12]. Despite these earlier observations, there are rapidly mounting examples that HLA-DQ, -DP, -Cw, and -DR 51/52/53 DSAs may also exert adverse effects on transplantation outcomes by increasing the risk of AMR and reducing graft survival [11,13,14].

We have chosen to examine the outcomes of transplantation and the frequency of AMR in living donor kidney recipients qualified based on our VXM approach, and physical crossmatches (CDCXM and FLXM). Our goal was to investigate the clinical impact of pre-transplant HLA-A, -B and -DR DSA that were below the VXM value of 5000 MFI and DSA of HLA-Cw, -DQ and -DP specificity not routinely typed for donors at the time of transplantation. In addition, we also tracked the available post-transplant anti-HLA SAB results for *de novo* and persistent DSAs known to be associated with a higher risk of graft loss and AMR [15–17].

To our best knowledge, there are only a few reports on the subject of low SAB DSA significance in living kidney recipients. Research related to the assessment of immune risk in this group is vital to facilitate the allocation process, which is often complicated, especially in the case of paired donation. In the context of the increasing organ shortage, living donor kidney transplantation has become not only the optimal method of treating the end-stage renal failure but also an opportunity to expand the pool of potential donors [18].

### 1.1. Objective

The study evaluated the results of transplantation and the frequency of AMR in the group of non-desensitized adult living donor kidney transplant recipients qualified with our VXM approach (HLA-A, -B and -DR DSA <5000 MFI) and with negative CDCXM and FLXM results. We aimed to investigate the clinical relevance of pre-transplant HLA-A, -B and -DR DSA below a VXM value of 5000 MFI but with all VXM DSA reactivities at HLA-DQ, -DP, -Cw, which were not typed routinely for donors before transplantation. In addition, we checked the prevalence of *de novo* and persistent DSA in available post-transplant SAB assays.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Selection of patients

The historical cohort of 55 adult recipients was selected from the group of all patients transplanted from living donors at our center from 2014 to 2018 ( $n = 82$ ). The primary inclusion criterion was the availability of the pre-transplant SAB results. All pre-transplant SAB assays were performed as part of the routine quarterly monitoring of potential kidney recipients using the Luminex platform and commercial kits (LABScreen Single Antigen, One Lambda, USA). The study included negative pre-transplant SAB results not older than six months and all positive results regardless of the time taken before transplantation. According to the transplant policy in Poland, each HLA -A, -B or DR DSA above VXM value of 5000 MFI was a contraindication to transplantation, as was a repeat HLA-A, -B, and -DR mismatch from the previous transplant. All recipient-donor pairs were negative for CDCXM and FLXM with T and B lymphocytes.

All patients were checked for the presence of DSA in SAB assays performed up to three years after transplantation. Post-transplant SAB determinations were performed as part of routine monitoring or due to lesions of unclear significance in biopsy (e.g., C4d deposits in PTC without graft tissue damage).

For donor-recipient pairs, the HLA-A, -B, and -DR were routinely typed prior to transplantation using the low-resolution method by a single specific primer polymerase chain reaction (PCR SSP). Sibling pairs with identical HLA antigens were excluded from the study due to belonging to a different risk group - lower than the rest of the patients [19–21].

When HLA-DQ, -DP, or -Cw DSA was found in the pre- or post-transplant SAB assay, the HLA typing for donors was performed with PCR SSP (OneLambda, Inno-train, USA) on historical frozen whole blood samples collected during the qualification for the transplant.

The final patient cohort was divided by SAB reactivity into three groups: 1) those with DSA-positive reactivities; 2) those with non-donor-specific anti-HLA reactivities (NDSA); and, 3) those who were anti-HLA-negative. The NDSA group has been isolated for comparison of the immune risk between immunized recipients without DSA and anti-HLA negative recipients [22,23]. To check whether pre-transplant DSAs tend to persist after transplantation, post-transplant three-year SAB results were analyzed.

The final recipient cohort ( $n = 55$ ) was followed for three years. The study's primary endpoints were estimated for the glomerular filtration rate (eGFR; calculated using the formula of the Modification of Diet in Renal Disease Study) and the occurrence of proteinuria (measured with

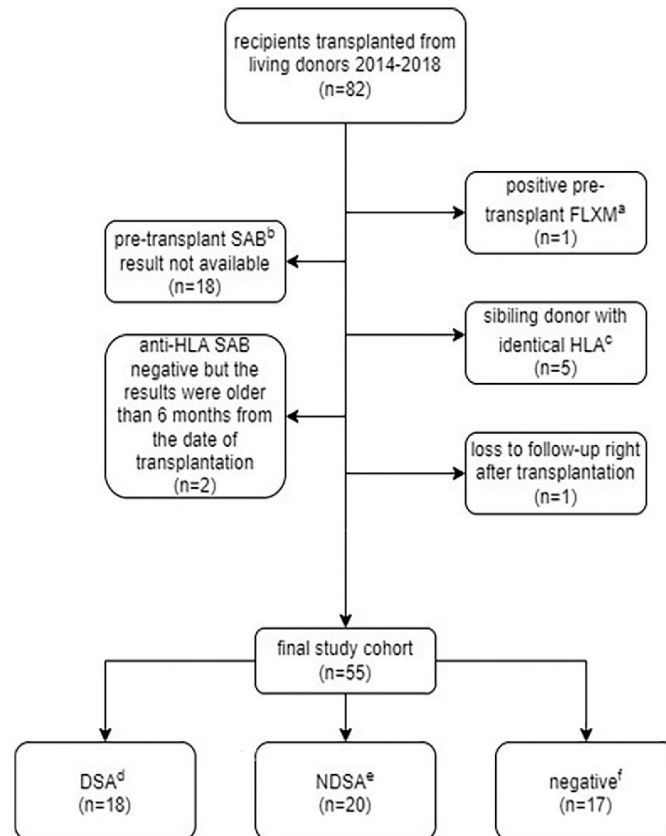


Fig. 1. Flow diagram visualizing the exclusion criteria taken into consideration during the creation of the study cohort.

<sup>a</sup>flow cytometry crossmatch; <sup>b</sup>single antigen bead assay; <sup>c</sup>human leukocyte antigens; <sup>d</sup> recipients with donor-specific (DSA) anti-HLA reactivities; recipients with non-donor-specific (NDSA) anti-HLA reactivities; <sup>f</sup> anti-HLA negative recipients.

urine testing strips) at 1, 3, and 6 month(s) as well as annually up to three years. Secondary endpoints include graft loss (defined as return on dialysis), patient's death with a functioning graft, the occurrence of biopsy-proven AMR, or C4d deposits in peritubular capillaries (PTC). Delayed graft function (DGF) was defined as a need for dialysis within the first week of transplantation.

## 2.2. Immunosuppression

All patients at low immune risk (first transplant, low level of panel reactive antibodies - PRA) were subjected to intravenous induction on days 0 and 4 with 20 mg of anti-interleukin two receptor antibody (IL-2R-Ab, Basiliximab). In the case of elevated PRA and re-transplantation, patients were administered anti-thymocyte globulin (Thymoglobulin) infusion (1–1,5 mg/kg for 2–5 days) before and after revascularization. The subsequent regimen was adjusted to the patient lymphocyte (CD3) count.

As for maintenance, the standard triple therapy was used: calcineurin inhibitor (tacrolimus: target serum levels were 12–15 ng/ml in the first month, then 8–12 ng/ml, and after three months 5–10 ng/ml or cyclosporine: recommended levels were 200–300 ng/ml by the first 3 months, gradually reduced to 100–150 ng/ml after 6 months, then maintain the level of 75–125 ng/ml), mycophenolic acid (mycophenolate mofetil – 2 × 1000 mg/day), and glucocorticosteroid. Steroid treatment started with methylprednisolone (Solumedrol) infusion on day 0 (250 mg) and continued until the third day (125 mg/day). Then it was switched to prednisone with a gradual dosage reduction (from 20 mg to 5 mg/day). In the case of mycophenolic acid intolerance, recipients received azathioprine (2 mg/kg body weight).

## 2.3. Diagnosis and treatment of rejection

Biopsy was performed only on the cause when graft function was considered unsatisfactory (extended DGF, elevated creatinine level, new onset of proteinuria). All rejection episodes were biopsy-proven. Specimens were examined with light microscopy and immunofluorescence for C4d deposits. Biopsies were assessed according to the Banff '07 classification with current updates [24–26]. AMR was diagnosed only when three following criteria were met: 1) presence of evidence of acute tissue injury; 2) evidence of antibody interaction with vascular endothelium; and, 3) serologic evidence of DSA to HLA antigens. The criterion 'C4d staining without evidence of rejection' was reported when, apart from linear C4d deposits (grade 2 or 3) in PTC, no evidence of acute tissue injury specific for active AMR or chronic T-cell mediated rejection (TCMR) or borderline changes were observed. Active AMRs were treated with plasmapheresis (daily or every other day, 4–6 treatments) and intravenous immunoglobulins (IVIg). IVIg was administered at the dose of 100 mg/kg b.w. after each plasmapheresis or in the dose of 2.0 g/kg b.w. after plasmapheresis treatments. Rejection therapy was not introduced when C4d deposits were detected in PTC without sign of graft tissue injury. A separate analysis was performed based on all biopsies with C4d deposits, including those with the C4d of minimal grade (C4d1), as it may also indicate a smoldering inflammatory process [24]. Biopsy-proven TCMR episodes (Banff grade: borderline to III) were treated with 3–5 steroid intravenous pulses of 500 mg each. In case of steroid-resistant rejections anti-thymocyte globulin (ATG) treatment was introduced. Rejection episodes were followed by augmentation of maintenance immunosuppression and inclusion of glucocorticosteroids, if not used early.

**Table 1**

Baseline characteristics of recipients and donors stratified by the occurrence of pre-transplant anti-HLA antibodies detected by a single antigen bead assay (SAB).

Recipient's characteristics:	DSA <sup>a</sup> (n = 18)	NDSA <sup>b</sup> (n = 20)	negative <sup>c</sup> (n = 17)	p
<b>Mean age ± SD<sup>d</sup></b>	35.72 ± 11.56	38.65 ± 13.39	35.71 ± 10.13	0,721
18–49 n(%)	15 (83.33%)	15(75%)	14(82.35%)	0,780
50–59 n(%)	2(11.11%)	3(15%)	3(17.65%)	0,858
>60 n(%)	1(5.56%)	2(10%)	0(0%)	0,410
female, n (%)	8(44.44%)	10(50%)	3(17.65%)	0,1044
<b>Mean BMI<sup>e</sup> ± SD</b>	22.67 ± 3.56	24.14 ± 3.77	24.34 ± 3.41	0,324
<18,5 n(%)	2(11.11%)	2(10%)	1(5.88%)	0,852
18,5–24,9 n(%)	11 (61.11%)	8(40%)	9(52.94%)	0,421
25–29,9 n(%)	5(27.78%)	9(45%)	7(41.18%)	0,526
>30 n(%)	0(0%)	1(5%)	0(0%)	0,410
<b>Primary cause of ESRD<sup>f</sup> n(%):</b>				
primary glomerulonephritis	8(44.44%)	10(50%)	7(41.18%)	0,861
secondary glomerulonephritis	1(5.56%)	1(5%)	1(5.88%)	0,993
hypertensive nephropathy	1(5.56%)	1(5%)	0(0%)	0,351
congenital kidney diseases	3(16.67%)	6(30%)	4(23.53%)	0,627
obstructive nephropathy	2(11.11%)	1(5%)	1(5.88%)	0,743
renal cancer	1(5.56%)	0(0%)	0(0%)	0,351
diabetic nephropathy	1(5.56%)	0(0%)	0(0%)	0,351
etiology uncertain	0(0%)	1(5%)	4(23.53%)	0,039*
dialysis before transplantation (mean months±sd)	21.78 ± 24.76	16.6 ± 14.03	13.59 ± 13.67	0,738
preemptive transplantation n(%)	5(27.78%)	3(15%)	5(29.41%)	0,519
retransplantation n(%)	3(16.67%)	1(5%)	0(0%)	0,147
<b>Maximum PRA<sup>g</sup> n(%):</b>				
0%	10 (55.56%)	14(70%)	15(88.24%)	0,103
1–20%	6(33.33%)	3(15%)	2(11.76%)	0,220
20–50%	1(5.56%)	2(10%)	0(0%)	0,410
50–80%	1(5.56%)	1(5%)	0(0%)	0,626
>80%	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
<b>Pre-transplant PRA n(%):</b>				
0%	13 (72.22%)	20(100%)	16(94.12%)	0,017*
1–20%	4(22.22%)	0(0%)	1(5.88%)	0,051
20–50%	1(5.56%)	0(0%)	0(0%)	0,351
50–80%	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
>80%	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
<b>HLA ABDR mismatches (mean ± SD)</b>				
total number	3.22 ± 1.77	2.8 ± 1.44	3.47 ± 1.74	0,640
locus A	0.89 ± 0.76	1 ± 0.56	1.18 ± 0.73	0,453
locus B	1.28 ± 0.67	0.95 ± 0.60	1.24 ± 0.66	0,224
locus DR	1.06 ± 0.73	0.85 ± 0.67	1.06 ± 0.66	0,555
<b>Donor's characteristics:</b>				
<b>Mean age ± SD</b>	43.44 ± 10.83	50.2 ± 8.99	46.76 ± 11.39	0,145
18–49n(%)	13 (72.22%)	11(55%)	10(58.82%)	0,526
50–59n(%)	3(16.67%)	5(25%)	5(29.41%)	0,664
>60n(%)	2(11.11%)	4(20%)	2(11.76%)	0,686
kobiety, n (%)	11 (61.11%)	14(70%)	14(82.35%)	0,382
<b>Mean BMI ± SD</b>				0,166

**Table 1 (continued)**

Recipient's characteristics:	DSA <sup>a</sup> (n = 18)	NDSA <sup>b</sup> (n = 20)	negative <sup>c</sup> (n = 17)	p
	25.01 ± 3.41	25.45 ± 2.78	23.59 ± 2.61	
<18,5 n(%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	
18,5–24,9 n(%)	9(50%)	9(45%)	12(70.59%)	0,369
25–29,9 n(%)	8(44.44%)	8(40%)	5(29.41%)	0,580
>30 n(%)	1(5.56%)	1(5%)	0(0%)	0,612
<b>Relationship with recipient n(%):</b>				
parent to child	6(33.33%)	10(50%)	8(47.06%)	0,552
siblings	2(11.11%)	2(10%)	0(0%)	0,378
child to mother	0(0%)	1(5%)	0(0%)	0,410
child to father	0(0%)	1(5%)	0(0%)	0,410
wife to husband	1(5.56%)	2(10%)	7(41.18%)	0,012*
husband to wife	3(16.67%)	0(0%)	0(0%)	0,038*
distant	3(16.67%)	0(0%)	0(0%)	0,038*
none	3(16.67%)	4(20%)	2(11.76%)	0,796

<sup>a</sup> Recipients with donor-specific (DSA) anti-HLA reactivities.

<sup>b</sup> Recipients with non-donor-specific (NDSA) anti-HLA reactivities.

<sup>c</sup> Anti-HLA negative recipients.

<sup>d</sup> standard deviation.

<sup>e</sup> Body mass index

<sup>f</sup> End-stage renal disease.

<sup>g</sup> Panel reactive antibodies.

\* Statistically significant difference between groups ( $p \leq 0.05$ ).

#### 2.4. Statistics

All data were collected retrospectively from patients' medical records and Polish National Transplant Database. The square Chi, Kruskal-Wallis, analysis of variance (ANOVA), logistic regression, Wilcoxon rank-sum and log-rank tests were applied for comparative data as appropriate. All statistics were conducted with R software version 4.1.1. and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Warsaw (AKBE/11/2020) and the Polish Transplant Coordinating Centre – Poltransplant.

### 3. Results

From the initial cohort of 82 patients, 55 recipients fulfilled the study inclusion criteria (Fig. 1). Mean follow-up was  $1018 \pm 226$  days with no difference between DSA, NDSA, and anti-HLA negative groups ( $p = 0.292$ ). For 27 donors, the complementary HLA-DQ, -DP, or -Cw typing was performed retrospectively to check whether the antibodies represented DSA in the pre- or post-transplant SAB reactivities.

#### 3.1. Basic characteristics of recipients

There were no significant differences in immunosuppression between the three analyzed groups. In 95% ( $n = 52$ ) of recipients, the IL-2R-Ab was used as the induction therapy. There were three patients who were treated with ATG, one in the negative group and two in the DSA-positive group. One DSA-positive recipient in addition to ATG received also the IVIg therapy. The standard triple immunosuppression was used in all patients, except of two patients (both in the DSA-positive group) who received azathioprine instead of the mycophenolate mofetil treatment. The primary causes of the end-stage renal disease (ESRD) were equally dispersed between three groups, except for unknown etiology, which occurred more frequently in the negative group ( $p = 0.039$ ; Table 1). The DGF occurred in seven patients with no statistically significant difference between groups ( $p = 0.433$ ).

The studied patients were moderately immunized, as evidenced by the lack of recipients with PRA >50%. However, in the DSA-positive group, the proportion of patients with PRA >0% was significantly higher than in the other groups ( $p = 0.017$ ). Moreover, the DSA group

**Table 2**

Characterization of the DSA<sup>a</sup>-positive group concerning the specificity and the level of donor specific antibodies detected by single-antigen-bead assay (SAB) prior- and post-transplantation.

Patient number	Pre-transplant HLA <sup>b</sup> -A,-B or -DR DSA <sup>c</sup> < 5000 <sup>d</sup> MFI (MFI <sup>e</sup> )	Pre-transplant HLA-DQ,-DP or -Cw <sup>f</sup> DSA (MFI)	Timing of pre-transplant DSA (months before transplantation)	Post-transplant DSA (MFI)	Timing of post-transplant DSA (months after transplantation)
1	-*	DQ2(5767)	4	DQ2(1884), DQ8(1111)	3
2	-	DQ2(1838)	>12	<b>B13(727)</b>	26
3	-	DQ9(801)	8	<b>A2(763), DQ4(447)</b>	26
4	-	DQ2(768)	<1	x**	x
5	-	DQ2(660)	3	x	x
6	-	DQ5(556)	1	x	x
7	-	DQ5(497)	5	x	x
8	DR13(1960)	-	>12	x	x
9	DR52(929)	-	3	x	x
10	DR52(527)	-	>12	-*	1
11	DR7(409)	-	1	x	x
12	-	DP4(319)	1	x	x
13	-	DP4(660)	3	x	x
14	-	DP1(643)	3	-	37
15	DR52(2191)	DQ5(3358)	4	x	x
16	-	DQ7(2822);Cw2(371)	1	x	x
17	DR52(653)	DP5(551)	3	DR52(783);DP5(554)	39
18	DR13(595)	DQ7(552)	3	DQ7(1570);DR13(785)	10

<sup>a</sup> Donor specific antibody.

<sup>b</sup> Human leukocyte antigens.

<sup>c</sup> HLA antigens routinely typed for donors prior to living donor kidney transplantation.

<sup>d</sup> The virtual crossmatch cut-off, above which transplantation is contraindicated according to transplantation policy in Poland.

<sup>e</sup> Mean fluorescence intensity.

<sup>f</sup> HLA antigens typed retrospectively for donors, not routinely typed prior living donor kidney transplantation.

\* single-antigen-bead assay was performed but did not show DSA presence.

\*\* single-antigen-bead assay was not performed within three years after transplantation; *De novo* DSAs were marked in bold.

was burdened with higher share of donor-recipient pairs with increased immunological risk (husband-to-wife, child-to-mother, distant related, or unrelated;  $p = 0.018$ ).

### 3.2. SAB characteristics

In the studied cohort, DSA-positive, NDSA reactive, and anti-HLA negative recipients constituted 33% ( $n = 18$ ), 36% ( $n = 20$ ), and 31% ( $n = 17$ ) of 55 patients, respectively. In 83% of DSA-positive patients SAB testing was performed within eight months before transplantation. In only three recipients, DSA could be described as historic (older than one year).

Of the routinely typed HLA-A, -B, and -DR for donors, the DSA of the DR specificity occurred in 39% of all DSA-positive recipients with the lowest value of 409 MFI to DR7 and the highest MFI of 2191 to DR52 (Table 2). The DSA of DR51/52/53 specificity cumulatively comprised of as much as 57% of all DR-directed DSAs.

The retrospective post-transplant analysis of not routinely considered HLA-DQ, -DP and -Cw DSA reactivities revealed that as many as 78% of DSA-positive patients had these DSAs with the highest MFI of 5767 to DQ2 and the lowest of 319 MFI to DP4. Out of not considered specificities, the most common were DQ DSAs (71%), followed by DP DSAs (29%), and Cw DSAs (7%).

The post-transplant SAB testing was performed in 35% (19) of recipients (33% in DSA-positive, 40% in NDSA positive, and 29% in negative groups;  $p = 0.789$ ). The SAB assays were performed on the average at  $16 \pm 13$  months after transplantation. Most *de novo* DSA cases (17%,  $n = 3$ ) were observed in the DSA-positive group ( $p = 0.585$ ) and the HLA DQ *de novo* DSA accounted for 50% of all specificities detected. There were two *de novo* DSA cases (10%) in the NDSA group (to DR4 with 456 MFI and to DR52 with 1225 MFI) and one (6%) case in the negative group (to B35 with 420 MFI).

In the DSA-positive group, three recipients had persistent DSA which

MFI value either increased (to DR52, DP5, DR13 and DQ7) or decreased (to DQ2; Table 3). The disappearance of pre-transplant DSA reactivities (to DR52, DP1, DQ2 and DQ9) was observed in four recipients.

### 3.3. Graft survival and function

The overall graft survival in the entire study cohort, determined after one and three years, was excellent (both at 98.2%) with only one patient losing graft due to the vascular thrombosis of unknown etiology, which occurred in the DSA-positive group. Therefore, although the 3-year graft survival in the DSA-positive group was lower (94.4%), it was not significantly different ( $p = 0.7$ ) from the NDSA (100%) and negative (100%) groups.

The overall baseline mean value of eGFR in the entire cohort was satisfactory ( $49.33 \pm 17.35$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>) and remained stable throughout the 3-year observation period ( $54.51 \pm 19.32$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>). One month after transplantation, the negative group was characterized by a slightly higher mean eGFR compared to the DSA-positive and NDSA groups (51,49 vs. 49,23 and 47,57 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, respectively;  $p = 0.796$ ; Fig. 2). On one hand, from the third month to three years, the mean eGFR in the NDSA and negative groups was very similar. On the other hand, at the same time points, the DSA-positive group showed a tendency to higher eGFR values in relation to the other groups. At the end of the observation, there was a statistically significant difference between the DSA-positive group and the anti-HLA negative group ( $59.83 \pm 16.61$  vs.  $50.6 \pm 23.52$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>, respectively;  $p = 0.047$ ).

In terms of the occurrence of proteinuria, no differences between groups were observed at any of the tested time points.

### 3.4. Biopsy-proven rejection episodes

Indication biopsies were performed in 53% (29) of recipients evenly

**Table 3**

Biopsy results of living donor kidney transplant recipients divided by pre-transplant single-antigen bead (SAB) reactivity.

Diagnostic category of renal allograft biopsy n (%) <sup>a</sup>	DSA-positive group <sup>b</sup> (n = 18)	NDSA-positive group <sup>b</sup> (n = 20)	anti-HLA negative group <sup>c</sup> (n = 17)	p value
antibody-mediated rejection (AMR) <sup>d</sup>	0(0%)	0(0%)	0(0%)	–
C4d staining without evidence of rejection <sup>b</sup>	1(6%)	1(5%)	2(12%)	0.691
minimal C4d staining (C4d1; >0% but <10% of PTC <sup>e</sup> )	2(11%)	2(10%)	0(0%)	0.533
all cases of C4d deposits in PTC	3(17%)	3(15%)	2(12%)	0.917
C4d deposits outside PTC <sup>f</sup>	4(22%)	1(5%)	2(12%)	0.279
all cases of C4d deposits in PTC and outside PTC	6(33%)	3(15%)	3(18%)	0.347
acute T-cell mediated rejection <sup>g</sup>	1(6%)	2(10%)	2(12%)	0.803
suspicious (borderline) for T-cell mediated rejection <sup>h</sup>	3(17%)	2(10%)	2(12%)	0.776
acute T-cell mediated rejection+ suspicious (borderline) for T-cell mediated rejection	4(22%)	4(20%)	4(24%)	0.966

<sup>a</sup> Antibody-mediated rejection according to Banff 07' criteria with current updates.

<sup>b</sup> Linear C4d deposits (C4d2 or C4d3 grade) in >10% peritubular capillaries (PTC) without histologic evidence of acute tissue injury and acute or chronic active T-cell mediated rejection, or borderline changes.

<sup>c</sup> Peritubular capillaries.

<sup>d</sup> Linear C4d deposits in the glomerular capillaries or along the contour of the basement membrane of some renal tubules.

<sup>e</sup> Acute T-cell mediated rejection including grades AI, BI, AII, BII and III according to Banff 07' with current updates.

<sup>f</sup> 'Suspicious' for acute T-cell-mediated rejection according to Banff 07'.

<sup>g</sup> Recipients with donor-specific (DSA) anti-HLA reactivities.

<sup>h</sup> Recipients with non-donor-specific (NDSA) anti-HLA reactivities.

<sup>i</sup> Anti-HLA negative recipients.

\* All biopsies were performed on-cause when allograft function had deteriorated. A biopsy was performed for 8/18(44%), 11/20(55%) and 9/17(53%) patients in the DSA-positive, NDSA-positive and anti-HLA negative groups, respectively. The percentage of recipients with a specific diagnosis was calculated in relation to the total number of patients in the group.

distributed between groups, namely 44% in the DSA positive group, 55% in the NDSA group and 53% in the negative group ( $p = 0.706$ ). Most recipients (76%, 22/29) had a biopsy taken within the first year after transplantation. In the 1- to 3-year postoperative period, the biopsies were taken in 3 (15%) NDSA positive recipients, 2 (11%) DSA positive recipients and 1 (6%) negative patient ( $p = 0.675$ ).

During three years of the follow-up period, no cases of AMR occurred in the entire study cohort. Moreover, there were only four cases of C4d deposits in PTC (C4d2 or C4d3 grade) without evidence of rejection with the following division into groups: 1 (6%) in the DSA-positive group, 1 (5%) in the NDSA group, and 2 (12%) in the anti-HLA negative group ( $p = 0.691$ ; Table 3). Among them, one patient from each group demonstrated *de novo* DSA of low MFI value (to A2 with 763 MFI and DQ4 with 447 MFI in one DSA-positive recipient; to B35 with 420 MFI in one anti-HLA negative recipient, and to DR4 with 456 MFI in one NDSA-positive recipient).

Minimal C4d staining in PTC (C4d1 grade), which may also have an adverse effect on the transplantation outcomes, was more common in the DSA positive (11%) and NDSA (10%) groups than in the negative group (0%), but without statistical significance ( $p = 0.533$ ). *De novo* DSA was not found in any of the above cases. With the inclusion of minimal

C4d staining, the overall incidence of C4d deposits in PTC tended to be higher in the DSA-positive group ( $p = 0.917$ ; Table 3).

In the DSA-positive group, there was a trend towards higher frequency of positive linear C4d staining in the glomerular capillaries (17% vs. 5% of NDSA and 12% of anti-HLA negative group;  $p = 0.279$ ) with one case accompanied by borderline lesions and two cases of independent occurrences. In one of the DSA-positive recipients, apart from the positive C4d staining in PTC, the presence of C4d deposits in the basement membrane of some renal tubules was noted, which was probably related to the occurrence nephropathy from the BK virus [27].

Taking into account all degrees and locations of C4d staining, a trend was observed for the higher incidence of C4d deposits in the group of DSA-positive recipients (33%) compared to the NDSA (15%) and negative (18%) groups ( $p = 0.347$ ).

Regarding the occurrence of T-cell mediated lesions in biopsies (active TCMR and borderline changes), 4 cases were noted in each group (22%, 20% and 24% in DSA positive, NDSA positive and anti-HLA negative groups, respectively) and no significant differences were observed ( $p = 0.966$ ; Table 3).

#### 4. Discussion

Our cohort of living donor kidney recipients was characterized by good graft survival and function within the 3-year follow-up period. Low pre-transplant DSA levels, which were the subject of our study, have been observed in as many as one-third of the recipient cohort. Most of the DSAs were not historical as they were detected within the one year prior to transplantation. The majority of the observed DSAs were of HLA-DQ, -DP, -Cw or -DR51/52/53 specificities, not routinely taken into account at the time of the qualification according to transplant policy in Poland. The MFI values of detected DSA were low, as expected in the context of negative FLXM results. The most common pre-transplant DSA in our cohort were HLA-DQ specific, which are known to have a tendency to persist after transplantation even despite immunosuppressive treatment [10,28].

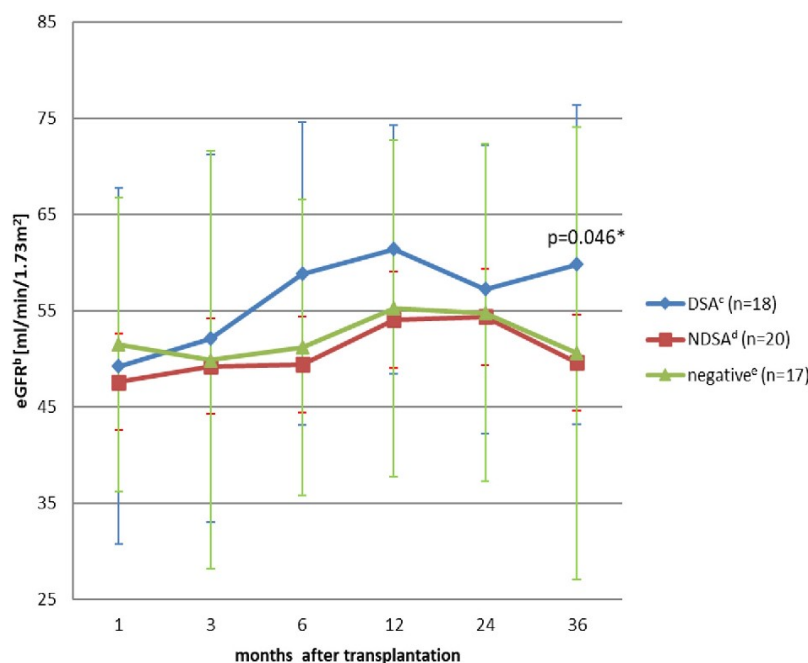
Although very few recipients had post-transplant anti-HLA SAB performed, there was a trend towards a higher prevalence of *de novo* DSA in the DSA-positive group. In these group the HLA-DQ DSA accounted for half of *de novo* DSA specificities. Among pre-transplant DSA which persisted after transplantation, HLA-DQ specificity was also frequent. The low size of the cohort and low *de novo* and persistent DSAs incidence did not allow us to evaluate its clinical significance. It is probable, that it could be revealed only with a longer follow-up period and a larger cohort of recipients [15]. The significance of the high prevalence of DQ DSA as both persistent and *de novo* requires further research, which seems necessary due to the reports of possible adverse effects of these antibodies on the fate of the transplant [10].

The short (1 year) and intermediate (3 years) graft survival in our cohort were excellent, with only one case of graft loss in the DSA positive group. We did not observe the detected pre-transplant DSA to have a significantly negative impact on the survival of the graft. Our results are in line with these reported by Kwon et al. With a similar pattern of immunosuppression and without desensitization they also ruled out unfavorable effects of pre-transplant DSA on allograft survival in a group of living donor kidney recipients with negative FLXM.

The transplant function assessed by the frequency of proteinuria and eGFR was satisfactory. The incidence of proteinuria was equal in all evaluated groups. Whereas eGFR in DSA-positive group tended to be higher than in the anti-HLA negative group, with a significant difference at three years. There is a possibility that the high share (72,2%) of young donors (18–49 years old) in DSA-positive group was partly responsible for the observed superior graft function. The treatment-related bias should also be taken into account as the recipients undergoing ATG treatment (two cases in the DSA group) have been reported to have superior graft survival [29].

In our cohort, a for-cause biopsy within 3 years after transplantation





**Fig. 2.** The estimated glomerular filtration rate (eGFR) in recipients after living donor kidney transplantation with division into groups depending on anti-HLA<sup>a</sup> antibody status.

<sup>a</sup>human leukocyte antigens; <sup>b</sup> estimated glomerular filtration rate calculated with Modification of Diet in Renal Disease (MDRD 2006) formula; <sup>c</sup> recipients with donor-specific (DSA) anti-HLA reactivities; <sup>d</sup> recipients with non-donor-specific (NDSA) anti-HLA reactivities; <sup>e</sup> anti-HLA negative recipients \*the difference of mean eGFR between DSA-positive and the anti-HLA negative groups reached the level of significance at 36 months after transplantation ( $p \leq 0.05$ ) – *p*-value was generated using Wilcoxon rank-sum test.

was performed in over half of recipients. Acute TCMR was noted in 9% of recipients, which is comparable to other studies [30]. Interestingly, AMR was not observed in any of biopsies. In each group there was only one recipient with a 'C4d deposits (grade 2 or 3) in PTC without evidence of rejection' diagnosis accompanied by the persistent or *de novo* DSA. The presence of both may increase the risk of developing chronic AMR [26]. There was a trend towards more frequent occurrence of C4d deposits in PTC, including minimal grade, in the positive DSA group. The discovery of C4d in PTC usually indicates the occurrence of antibody-mediated allograft injury, and even at the minimal grade it can be associated with inferior kidney outcomes [31]. The C4d accumulation is transient and its discovery may either precede or succeed the occurrence of acute AMR [31,32]. The one-year incidence of AMR in kidney recipients varies between studies from 1.2% to 12.6% [3,8,9]. The timing of the biopsy may be crucial in detecting lesions that meet all AMR criteria. It is possible that in our cohort at least some of the cases of C4d positive PTC staining could be related to AMR although it was not diagnosed in a single biopsy. Moreover, the presence of AMR could be underestimated due to the lack of protocol biopsy performance.

There is no consensus between studies in terms of the clinical impact of allosensitization status *per se* on kidney transplantation outcomes [22,29,33]. We observed no detrimental effect of pre-transplant non-donor-specific anti-HLA reactivities on renal graft survival, function and frequency of acute rejection episodes. Therefore, there seems to be no reason to consider such patients as a higher risk group, which is consistent with research conducted by Lefaucheur et al. and Caro-Oleas et al. [7,34].

The study had several potential limitations. First, the patient cohort may be too small to show statistically significant differences between the groups. On the other hand, the immunosuppression regimen was consistent and the risk factors were equally distributed between investigated groups. The knowledge of the pre-transplant CDCXM, and FLXM using both T and B lymphocytes for all patients was also an advantage. Because of the low typing resolution of HLA antigens in donors there is a possibility that DSA may have been identified incorrectly in some cases. Due to the retrospective character of the study, it may have been exposed to selection and information bias.

In conclusion, we did not observe an adverse effect on

transplantation outcomes of low pre-transplant DSA, including HLA-DQ, -DP, -Cw and -DR51/52/53 specificities. We have observed that these often-underestimated DSA are very common, especially of HLA-DQ specificity, among living donor kidney recipients qualified in accordance with the VXM applicable in Poland. We observed excellent graft survival, a stable function of most of the transplanted kidneys and low incidence of biopsy-proven acute rejection episodes over a three-year period. It may suggest that the immunosuppression regimen of IL-2R-Ab induction followed by standard triple therapy was sufficient for patients with our qualification regimen and desensitization was not needed. On the other hand, we showed a trend in the DSA-positive recipients for a higher incidence of C4d deposits in PTC and *de novo* DSA. However, given the shortcomings of our study, assessment of the clinical significance of these observations requires further studies in a larger cohort of living donor recipients, with longer follow-up and high-resolution donor HLA typing.

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### References

- [1] S. Davis, J.E. Cooper, Acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients, *Transplant Rev. (Orlando)*. 31 (1) (2017) 47–54, <https://doi.org/10.1016/j.ttre.2016.10.004>.
- [2] R. Patel, P.I. Terasaki, Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation, *N. Engl. J. Med.* 280 (14) (1969) 735–739, <https://doi.org/10.1056/nejm196904032801401>.
- [3] D. Zeher, C. Bach, C. Staudner, C.A. Böger, T. Bergler, B. Banas, et al., Characteristics of donor-specific anti-HLA antibodies and outcome in renal transplant patients treated with a standardized induction regimen, *Nephrol. Dial. Transplant.* 32 (4) (2017) 730–737, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw445>.
- [4] P. Amico, G. Hönger, J. Steiger, S. Schaub, Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation, *Curr. Opin. Organ. Transplant.* 14 (6) (2009) 656–661, <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328331c169>.

- [5] P. Amico, G. Höniger, M. Mayr, J. Steiger, H. Hopfer, S. Schaub, Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads, *Transplantation*. 87 (11) (2009) 1681–1688, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a5e034>.
- [6] A.R. Tambur, P. Campbell, A.S. Chong, S. Feng, M.L. Ford, H. Gebel, et al., Sensitization in transplantation: assessment of risk (STAR) 2019 working group meeting report, *Am. J. Transplant.* 20 (10) (2020) 2652–2668, <https://doi.org/10.1111/ajt.15937>.
- [7] C. Lefaucheur, A. Loupy, G.S. Hill, J. Andrade, D. Nochy, C. Antoine, et al., Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (8) (2010) 1398–1406, <https://doi.org/10.1681/ASN.2009101065>.
- [8] O.O. Adebisi, J. Gralla, P. Klem, B. Freed, S. Davis, A.C. Wiseman, et al., Clinical significance of Pretransplant donor-specific antibodies in the setting of negative cell-based flow cytometry crossmatching in kidney transplant recipients, *Am. J. Transplant.* 16 (12) (2016) 3458–3467, <https://doi.org/10.1111/ajt.13848>.
- [9] H. Kwon, Y.H. Kim, J.Y. Choi, S. Shin, J.H. Jung, S.K. Park, et al., Impact of pretransplant donor-specific antibodies on kidney allograft recipients with negative flow cytometry cross-matches, *Clin. Transpl.* 32 (6) (2018), e13266, <https://doi.org/10.1111/ctr.13266>.
- [10] A.R. Tambur, V. Kosmoliaptis, F.H.J. Claas, R.B. Mannon, P. Nickerson, M. Naesens, Significance of HLA-DQ in kidney transplantation: time to reevaluate human leukocyte antigen-matching priorities to improve transplant outcomes? An expert review and recommendations, *Kidney Int.* 100 (5) (2021) 1012–1022, <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.06.026>.
- [11] T. Bachelet, C. Martinez, A. Del Bello, L. Couzi, S. Keiji, G. Guidicelli, et al., Deleterious impact of donor-specific Anti-HLA antibodies toward HLA-Cw and HLA-DP in kidney transplantation, *Transplantation*. 100 (1) (2016) 159–166, <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000000821>.
- [12] M. Ling, K. Marfo, P. Masiakos, A. Aljanabi, J. Lindower, D. Giedlich, et al., Pretransplant anti-HLA-Cw and anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients, *Hum. Immunol.* 73 (9) (2012) 879–883, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.07.320>.
- [13] E.J. Filippone, J.L. Farber, Humoral immunity in renal transplantation: epitopes, Cw and DP, and complement-activating capability—an update, *Clin. Transpl.* 29 (4) (2015) 279–287, <https://doi.org/10.1111/ctr.12524>.
- [14] B.G. Park, Y. Park, K.H. Huh, M.S. Kim, Y.S. Kim, H.-S. Kim, Clinical significance of donor specific ANTI-HLA DR51/52/53 antibodies for antibody mediated rejection in kidney transplant recipients, *Hum. Immunol.* 76 (2015) 84, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.07.119>.
- [15] S. Lionaki, K. Panagiotellis, A. Iniotaki, J.N. Boletis, Incidence and clinical significance of de novo donor specific antibodies after kidney transplantation, *Clin. Dev. Immunol.* 2013 (2013), 849835, <https://doi.org/10.1155/2013/849835>.
- [16] S. Caillard, C. Becmeur, G. Gautier-Vargas, J. Ollagne, C. Muller, N. Cognard, et al., Pre-existing donor-specific antibodies are detrimental to kidney allograft only when persistent after transplantation, *Transpl. Intern.: Off. J. Eur. Soc. Organ Transpl.* 30 (1) (2017) 29–40, <https://doi.org/10.1111/tri.12864>.
- [17] J.M. DeVos, S.J. Patel, K.M. Burns, S. Dilioglou, L.W. Gaber, R.J. Knight, et al., De novo donor specific antibodies and patient outcomes in renal transplantation, *Clin. Transpl.* 35:1–8 (2011).
- [18] S. Baid-Agrawal, U.A. Frei, Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives, *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 3 (1) (2007) 31–41, <https://doi.org/10.1038/nepneph0383>.
- [19] M. Boran, M. Boran, E. Boran, HLA-identical sibling renal transplantation: influence of donor and recipient gender mismatch on long-term outcomes, *Transplant. Proc.* 46 (10) (2014) 3423–3425, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.06.076>.
- [20] J.M. Cecka, Living donor transplants, *Clin. Transpl.* (1995) 363–377.
- [21] P.S. Verghese, T.B. Dunn, S. Chinnakota, K.J. Gillingham, A.J. Matas, M.S. Mauer, Calcineurin inhibitors in HLA-identical living related donor kidney transplantation, *Nephrol. Dial. Transplant.* 29 (1) (2014) 209–218, <https://doi.org/10.1093/ndt/gft447>.
- [22] C. Süsal, B. Döhler, G. Opelz, Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a collaborative transplant study report, *Hum. Immunol.* 70 (8) (2009) 569–573, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.04.013>.
- [23] R. Richter, C. Süsal, S. Köhler, S. Qidan, A. Schödel, L. Holschuh, et al., Pretransplant human leukocyte antigen antibodies detected by single-antigen bead assay are a risk factor for long-term kidney graft loss even in the absence of donor-specific antibodies, *Transpl. Intern.: Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 29 (9) (2016) 988–998, <https://doi.org/10.1111/tri.12786>.
- [24] K. Solez, R.B. Colvin, L.C. Racusen, M. Haas, B. Sis, M. Mengel, et al., Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions, *Am. J. Transplant.* 8 (4) (2008) 753–760, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x>.
- [25] M. Haas, The revised (2013) Banff classification for antibody-mediated rejection of renal allografts: update, difficulties, and future considerations, *Am. J. Transplant.* 16 (5) (2016) 1352–1357, <https://doi.org/10.1111/ajt.13661>.
- [26] M. Haas, A. Loupy, C. Lefaucheur, C. Roufosse, D. Glotz, D. Seron, et al., The Banff 2017 kidney meeting report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials, *Am. J. Transplant.* 18 (2) (2018) 293–307, <https://doi.org/10.1111/ajt.14625>.
- [27] I. Batal, A. Giritita, A. Zeevi, B.A. Saab, S. Stockhausen, R. Shapiro, et al., Clinical significance of the distribution of C4d deposits in different anatomic compartments of the allograft kidney, *Mod. Pathol.* 21 (12) (2008) 1490–1498, <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.152>.
- [28] A. Senev, E. Lerut, V. Van Sandt, M. Coemans, J. Callemeyn, B. Sprangers, et al., Specificity, strength, and evolution of pretransplant donor-specific HLA antibodies determine outcome after kidney transplantation, *Am. J. Transplant.* 19 (11) (2019) 3100–3113, <https://doi.org/10.1111/ajt.15414>.
- [29] J. Malheiro, S. Tafufo, L. Dias, S. Martins, I. Fonseca, I. Beirão, et al., Impact on mid-term kidney graft outcomes of pretransplant anti-HLA antibodies detected by solid-phase assays: do donor-specific antibodies tell the whole story? *Hum. Immunol.* 78 (9) (2017) 526–533, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.07.011>.
- [30] A.M. Patel, C. Pancoska, S. Mulgaonkar, F.L. Weng, Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches, *Am. J. Transplant.* 7 (10) (2007) 2371–2377, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01944.x>.
- [31] Ž. Kikić, A. Kainz, N. Kozakowski, R. Oberbauer, H. Regele, G. Bond, et al., Capillary C4d and kidney allograft outcome in relation to morphologic lesions suggestive of antibody-mediated rejection, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (8) (2015) 1435–1443, <https://doi.org/10.2215/cjn.09901014>.
- [32] V. Nickenleit, M. Zeiler, F. Gudat, G. Thiel, M.J. Mihatsch, Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (1) (2002) 242–251, <https://doi.org/10.1681/asn.V131242>.
- [33] A. Gupta, V. Iveson, M. Varagunam, S. Bodger, P. Sinnott, R.C. Thuraisingham, Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? *Transplantation*. 85 (8) (2008) 1200–1204, <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31816b1c37>.
- [34] J.L. Caro-Oleas, M.F. González-Escribano, F.M. González-Roncero, M.J. Acevedo-Calado, V. Cabello-Chaves, M. Gentil-Govantes, et al., Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation, *Nephrol. Dial. Transplant.* 27 (3) (2012) 1231–1238, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr429>.

## 4. Podsumowanie i wnioski

### 4.1 Podsumowanie

Wprowadzenie w latach 90' XX wieku metod fazy stałej, pozwoliło na detekcję przeciwciał anti-HLA u potencjalnych biorców nerki z niespotykaną dotychczas czułością i swoistością[97]. Równocześnie, pojawiła się możliwość wykonania wirtualnej próby krzyżowej pozwalającej na ocenę ryzyka immunologicznego oraz zaplanowanie schematu leczenia immunosupresyjnego przed wykonaniem prospektywnej biologicznej próby krzyżowej. Procedura VXM została z sukcesem wcielona do programów transplantacyjnych w wielu państwach umożliwiając usprawnienie alokacji biorców oraz wzrost odsetka transplantacji pośród pacjentów silnie zimmunizowanych[44, 65, 98, 99].

Wykonanie VXM związane jest z koniecznością określenia, na podstawie wyniku anti-HLA SAB, antygenów HLA, których obecność u dawcy będzie stanowić nieakceptowalnie wysokie ryzyko immunologiczne dla danego biorcy[100]. Sposób, w jaki antygeny te są definiowane nie jest ujednolicony. Jednak, kluczową rolę w tym procesie stanowi znajomości korelacji pomiędzy poziomem MFI DSA a wynikiem biologicznych prób krzyżowych oraz ocena znaczenia klinicznego DSA, które to zagadnienia były przedmiotem poniższej rozprawy doktorskiej.

Wirtualna próba krzyżowa jest stosowana w Polsce od niedawna, dlatego jej optymalizacja laboratoryjna i kliniczna jest ważna z punktu widzenia przyszłości transplantologii w naszym kraju. Na wynik VXM i jego interpretację duży wpływ wywierają charakterystyczne dla danego ośrodka transplantacyjnego procedury laboratoryjne i kliniczne. Dlatego też, nasz projekt badawczy powstał w oparciu o badania diagnostyczne oraz schematy postępowania klinicznego swoiste dla jednego ośrodka - Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie, który współpracuje z wieloma centrami transplantacyjnymi i stanowi jeden z większych (pod względem liczby typowań tkankowych przed przeszczepieniem nerki od dawców zmarłych i żywych) ośrodków w Polsce. Ponadto kontekstem wszystkich analiz były zasady alokacji potencjalnych biorców nerki obowiązujące w Polsce w momencie trwania badania.

Celem pierwszej części projektu była analiza zależności pomiędzy wartościami MFI pojedynczych DSA swoistych dla HLA -A lub -B, lub -DR dawcy, a wynikami biologicznych

prób krzyżowych CDC-XM oraz FLXM. Pierwsza z nich stanowi złoty standard przed przeszczepieniem nerki zarówno od dawcy żywego jak i zmarłego, podczas gdy druga jest rutynowo wykonywana w Polsce przede wszystkim przed transplantacją od dawcy żywego. W przyszłości FLXM może jednak stanowić dodatkowy etap oceny ryzyka immunologicznego przed i po przeszczepieniu od dawcy zmarłego, dlatego włączenie tej próby krzyżowej do analizy było niezbędne.

Intencją obecnego projektu było zachowanie podczas badania warunków zbliżonych do postępowania przed transplantacją nerki od dawcy zmarłego w Polsce, szczególnie w aspekcie odstępu czasowego pomiędzy wynikiem anty-HLA SAB biorcy a datą pobrania surowicy do wykonania próby krzyżowej. Zależało nam również na uwzględnieniu często pomijanego, ale bardzo aktualnego zagadnienia, jakim jest kinetyka przeciwciał anty-HLA u pacjentów.

Badania wykazały, że przy zachowaniu czteromiesięcznego okresu ważności wyników oznaczenia poziomu oraz swoistości przeciwciał anty-HLA metodą SAB, wyznaczenie punktów odcięcia MFI DSA umożliwiających prognozowanie wyników biologicznych prób krzyżowych jest możliwe, chociaż nie zawsze z zadowalającą dokładnością. Wartości optymalnych punktów odcięcia MFI DSA oraz ich funkcjonalność wydają się zależeć w głównym stopniu od czułości metody PXM. Przewidywanie wyniku CDC-XM, który wykrywa wyłącznie wysokie miana przeciwciał zależnych od dopełniacza, okazało się możliwe dopiero przy poziomie DSA około 10 000 MFI. Dokładność prognozowania wyniku CDC-XM przez MFI DSA została oceniona jako słaba. Podobne obserwacje odnotowano również w innych publikacjach na ten temat, a najczęściej braną pod uwagę przyczyną niskiej dokładności są różnice metodologiczne pomiędzy CDC-XM a oznaczeniem anty-HLA SAB[14, 82, 83]. Wynik próby krzyżowej metodą cytotoksyczności zależnej od dopełniacza zależy od złożonych interakcji pomiędzy surowicą biorcy a komórkami potencjalnego dawcy, na które mogą wpłynąć między innymi przeciwciała o innej swoistości niż HLA oraz zmienna ekspresja antygenów HLA na komórkach. Z drugiej strony, metoda SAB, chociaż bardzo czuła i swoista, pozbawiona jest biologicznego charakteru i wykazuje podatność na oddziaływania antygen-przeciwciało, które nie występują w warunkach *in vivo*[42].

W celu poprawy przewidywania wyniku CDC-XM, który pozostaje złotym standardem diagnostyki przed transplantacją, można rozważyć wprowadzenie technik zwiększających czułość i swoistość metody. Jednym z potencjalnych rozwiązań jest poszerzenie podstawowej

procedury o dodatkowe płukania po inkubacji surowicy biorcy z limfocytami dawcy (modyfikacja Amos) oraz zastosowanie globuliny anty-ludzkiej (AHG). W celu eliminacji wyników fałszywie dodatnich, spowodowanych nieistotnymi dla wyniku transplantacji autoprzeciwciałami klasy IgM, najczęściej wdrażane są procedury badań z DTT oraz autologicznych prób krzyżowych w momencie kwalifikacji biorcy do transplantacji.

W przeciwieństwie do CDC-XM, dokładność przewidywania wyniku FLXM przez VXM okazała się dobra, przy zastosowaniu optymalnego punktu odcięcia MFI DSA na poziomie około 6000. Wartości punktów odcięcia w zakresie 4410-6500 MFI wykazał również Visentin i wsp. oraz Moreno i wsp., przy czułości oscylującej w granicach 69-89%[84, 101]. Czułość prognozowania wyniku FLXM wyniosła w naszym badaniu 72-78%, co potwierdza potencjał wyznaczonego punktu odcięcia do różnicowania pacjentów o niskim ryzyku immunologicznym. Obowiązujący aktualnie w Polsce punkt odcięcia MFI DSA wynoszący 5000, jest zbliżony do wartości uzyskanych w badaniu. W związku z powyższym, obecny schemat VXM stwarza możliwość prognozowania wyniku FLXM. Należy jednak podkreślić, że powyżej wyznaczonego przez nas optymalnego punktu odcięcia, zgodność wyników VXM z FLXM, była ograniczona. Przyczyną mogą być zmiany poziomu i repertuaru przeciwciał anty-HLA w odstępie czasowym pomiędzy oznaczeniem anty-HLA SAB a FLXM, niższa czułość FLXM w porównaniu z metodą SAB oraz możliwość wykrywania przez technikę SAB przeciwciał anty-HLA, które nie występują w warunkach *in vivo*[42].

Podobnie jak inni badacze zajmujący się tematem prognozowania wyników FLXM i CDC-XM przez VXM, również zaobserwowaliśmy zróżnicowanie wartości MFI punktów odcięcia w zależności od analizowanej swoistości HLA DSA[84, 101]. Jednym z możliwych wytłumaczeń są różnice w ekspresji antygenów HLA na powierzchni komórek w zależności od locus oraz antygenów w obrębie pojedynczego locus[67]. Źródłem uzyskanych wyników mogą być również różnice w gęstości antygenów HLA pomiędzy komórkami dawcy badanymi w biologicznej próbie krzyżowej a mikrokulkami stosowanymi w oznaczeniu anty-HLA SAB[102]. Należy również wziąć pod uwagę fakt, iż pomiędzy poszczególnymi dawcami zmarłymi, z których węzłów chłonnych izolowane były badane limfocyty, może wystąpić nawet sześciokrotna różnica w ekspresji antygenów HLA[103]. Dlatego też wyciągnięcie jednoznacznych wniosków w aspekcie konieczności zróżnicowania punktów odcięcia MFI w zależności od swoistości DSA wymaga dalszych badań.

Zgodnie z przewidywaniami, prognozowanie wyników biologicznych prób krzyżowych z limfocytami B dawcy odbywało się z mniejszą dokładnością niż miało to miejsce w przypadku testów z limfocytami T lub mieszaniną limfocytów T i B. Szacuje się, że poziom wyników fałszywie dodatnich wywołanych nieswoistym wiązaniem przeciwciał przez receptory Fc oraz immunoglobuliny obecne na limfocytach B może wynosić nawet 50%[35, 66]. W celu poprawy czułości i swoistości FLXM z limfocytami B można stosować procedurę z pronazą, która usuwa receptory Fc. Jednak, jak wykazały badania związek ten może powodować również uszkodzenie innych cząsteczek na powierzchni limfocytów, włączając antygeny HLA, czego następstwem może być brak detekcji istotnych dla losów przeszczepu alloprzeciwciał[104]. Praktyczne zastosowanie prób krzyżowych z limfocytami B dawcy w ocenie ryzyka immunologicznego pozostaje kontrowersyjne i najczęściej zaleca się, aby interpretacja wyników odbywała się w kontekście oznaczenia przeciwciał anti-HLA metodą SAB oraz autologicznej próby krzyżowej[35].

W naszej grupie badanej, VXM przed przeszczepieniem nerki od dawcy zmarłego został przeprowadzony na podstawie aktualnego immunologicznego wyniku anti-HLA SAB (wykonanego na surowicy pobranej w ciągu 14 dni przed PXM) tylko u 23% biorców. W pozostałych przypadkach odstęp pomiędzy wynikiem anti-HLA SAB a datą surowicy wykorzystanej do PXM wynosił 1-4 miesięcy. Kwartalna aktualizacja wyników anti-HLA SAB zwiększyła odsetek aktualnych immunologicznych wyników anti-HLA SAB do 40%, jednak nie był to poziom wystarczający do osiągnięcia statystycznie istotnej poprawy dokładności VXM. Rutynowo w Polsce do wykonania VXM wykorzystywane są wyniki anti-HLA SAB z ostatnich sześciu miesięcy. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że parametry oceny prognozy VXM przy tak długim okresie ważności wyniku anti-HLA SAB byłyby gorsze niż te uzyskane w badaniu.

U niewielkiej grupy pacjentów zbadaliśmy kinetykę przeciwciał anti-HLA pomiędzy oznaczeniami SAB wykonanymi w odstępie trzech miesięcy. Choć porównanie zmian MFI DSA nie wykazało statystycznie istotnych różnic, to patrząc z perspektywy pojedynczych biorców, indywidualne fluktuacje przeciwciał anti-HLA były znaczące i mogą potencjalnie niekorzystnie wpływać na wartość prognostyczną VXM. Ponadto zaobserwowane zmiany poziomu przeciwciał anti-HLA potwierdzają podatność biorców nerki na zmianę statusu immunologicznego[34, 105]. Ze względów praktyczno-organizacyjnych zwiększenie częstości monitorowania poziomu i swoistości przeciwciał anti-HLA jest raczej mało prawdopodobne.

Jednak poprawę predykcyjności VXM można uzyskać w sposób alternatywny, poprzez odnotowywanie u biorców istotnych zdarzeń immunizujących, których wystąpienie stanowi podstawę do aktualizacji oznaczenia przeciwciał anti-HLA metodą SAB[65].

Spośród ograniczeń naszego badania należy wymienić fakt, że wyniki anti-HLA SAB pochodziły z różnych laboratoriów w Polsce, co może sprzyjać ich rozbieżności. Dokładność identyfikacji DSA była ograniczona ze względu na niepełny zakres i niską rozdzielczość typowania HLA dawców. W oparciu o dostępne piśmiennictwo, punkt odcięcia dla DSA HLA-DQ, -DP oraz -Cw został ustalony na 10 000 MFI, jednak nie można wykluczyć, że w niektórych przypadkach przeciwciała o niższym MFI mogą powodować dodatni wynik PXM. W momencie trwania badania rozcieńczanie surowic biorców oraz dodawanie EDTA w ramach procedury oznaczenia przeciwciał anti-HLA SAB nie były rutynowo stosowane w Polsce, dlatego też nie można wykluczyć wpływu efektu prozonalnego oraz interferencji endogennego dopełniacza na uzyskane przez nas wyniki. Obciążeniem badania było również wykonywanie prób krzyżowych z limfocytami pochodzącymi od dawców zmarłych, na których poziom ekspresji antygenów HLA może być niższy i charakteryzować się wysoką zmiennością[103, 106].

Warto podkreślić, że ze względu na różnice metodologiczne oraz ograniczoną dostępność aktualnego wyniku anti-HLA SAB, podyktowaną ograniczeniami czasowo-organizacyjnymi, zdolność VXM do przewidywania biologicznej próby krzyżowej nie jest doskonała. Wytyczenie punktów odcięcia, które mogłyby być stosowane w praktyce wymaga dalszych badań między innymi w oparciu o wyniki anti-HLA SAB pochodzące z jednego laboratorium. Należy jednak pamiętać, że w przypadku pacjentów o bogatym repertuarze przeciwciał anti-HLA pominięcie prospektywnej biologicznej próby krzyżowej może okazać się niemożliwe.

Przedmiotem drugiej części projektu badawczego była ocena znaczenia klinicznego pre-transplantacyjnych DSA wykrytych wyłącznie metodą SAB. Historyczna kohorta biorców nerki od dawcy żywego, z udziałem, której wykonane było badanie, była kwalifikowana w latach 2014-2018 w Szpitalu Klinicznym Dzieciątka Jezus w Warszawie, zgodnie z zasadami alokacji obowiązującymi w Polsce. Wszystkie pary biorca-dawca posiadały negatywny wyniki CDC-XM oraz FLXM a przeciwwskazanie do przeszczepienia stanowiła obecność DSA HLA-A lub -B lub -DR o wartości przekraczającej 5000 MFI. U 95% biorców zastosowano jednolity schemat immunosupresji składający się z indukcji i standardowej trój-lekowej immunosupresji podtrzymującej.

Badanie wykazało obecność niskich poziomów DSA przed transplantacją u jednej trzeciej biorców. Należały do nich DSA o swoistości HLA -A, -B, -DR i wartości MFI<5000 jak również DSA swoiste dla HLA -DQ, -DP, -Cw, które w momencie trwania badania nie były rutynowo typowane u potencjalnych dawców nerki. Zgodnie z przewidywaniami, wartości MFI wykrytych DSA były niskie i wynosiły odpowiednio 409-2191 MFI oraz 319-5767 MFI. Spośród zaobserwowanych swoistości dominowały (78%) przeciwciała skierowane przeciwko antygenom HLA -DQ, -DP oraz -Cw. Na szczególną uwagę zasługuje wysoka częstość występowania przeciwciał swoistych dla HLA-DQ, które według ostatnich doniesień mogą wykazywać tendencję do utrzymywania się po transplantacji i wywierać niekorzystny wpływ na losy przeszczepu [92, 107].

Znaczenie kliniczne wykrytych DSA zostało zbadane poprzez porównanie wyników przeszczepienia w trzech grupach: DSA (biorcy posiadający przeciwciała anti-HLA przeciwko dawcy), NDSA (biorcy posiadający przeciwciała anti-HLA niebędące DSA) i negatywnej (biorcy negatywni pod względem przeciwciał anti-HLA).

Spośród biorców posiadających DSA przed transplantacją, tylko jedna osoba utraciła przeszczepioną nerkę. Przeżywalność przeszczepu w okresie 3 lat była w grupie DSA pozytywnej niższa (94, 4%) niż w grupach NDSA (100%) i negatywnej (100%), jednak bez istotnej statystycznie różnicy.

Nie zaobserwowano negatywnego wpływu wykrytych DSA na wielkość przesączania kłębuszkowego (eGFR) oraz na częstość występowania proteinurii u biorców. W celu oceny wpływu niskich poziomów DSA na częstość występowania epizodów ostrego odrzucania poddano ewaluacji wszystkie dostępne wyniki biopsji przeszczepionych nerek. Biopsję ze wskazań wykonano u 53% pacjentów, którzy byli równomiernie rozłożeni pomiędzy grupami. Częstość epizodów TCMR w kohorcie była zbliżona do wyników uzyskanych w innych publikacjach i nie przekroczyła 9%[108, 109]. W ciągu 3-letniego okresu obserwacji nie odnotowano żadnego przypadku AMR. W każdej z grup był tylko jeden biorca, w którego biopsji zdiagnozowano obecność złogów C4d (stopień 2 i 3) w kapilarach okołocewkowych nerek (PTC - peritubular capillary deposition) bez dowodów wskazujących na toczący się proces odrzucania. Na podstawie dostępnych wyników anti-HLA SAB z okresu po transplantacji, zaobserwowaliśmy, że wszystkim tym przypadkom towarzyszyła obecność utrzymujących się



pre-transplantacyjnych DSA bądź *de novo* DSA, co może stanowić czynnik ryzyka wystąpienia przewlekłego odrzucania zależnego od przeciwciał[109].

W grupie DSA-pozytywnej odnotowano trend do częstszego występowania złogów C4d w PTC. Obserwacja ta była oparta na analizie wszystkich biopsji, w których wykryto obecność złogów, włączając również te minimalnego stopnia. Obecność C4d w PTC jest zwykle związana z uszkodzeniem alloprzeszczepu na drodze mechanizmu zależnego od przeciwciał[110]. Wykazano, że wystąpienie nawet niewielkiej ilości złogów C4d w PTC może powodować pogorszenie wyników przeszczepienia. Gromadzenie złogów jest zjawiskiem o charakterze przejściowym i może poprzedzać lub następować po epizodzie ostrego AMR[110, 111]. Dlatego też w diagnostyce tego rodzaju odrzucania istotną rolę odgrywa czas wykonania biopsji. Biorąc pod uwagę częstość AMR u biorców nerki szacowaną przez inne publikacje (1,2-12, 6%) należy brać pod uwagę możliwość, że w naszej kohorcie przynajmniej niektóre przypadki obecności C4d w PTC mogły być związane z AMR, chociaż nie wykazano tego w pojedynczej biopsji. Ponadto, przyczyną zaniżenia częstości występowania AMR w badanej kohorcie mógł być brak biopsji protokolarnych.

Na podstawie wyników oznaczenia anty-HLA SAB wykonanych po transplantacji zaobserwowano trend do częstszego występowania DSA *de novo* w grupie biorców DSA pozytywnych. Aż połowę wykrytych swoistości DSA w tej grupie stanowiła HLA-DQ. Ponadto, niektóre pre-transplantacyjne DSA, włączając DSA-DQ, wykazywały tendencję do utrzymywania się po transplantacji. Niestety, grupa biorców, u których było wykonane badanie anty-HLA SAB po transplantacji była mało liczna. Dlatego też znaczenie powyższych obserwacji wymaga dalszych badań. W kontekście potencjalnie niekorzystnego efektu zaobserwowanych przeciwciał na losy przeszczepu, wskazanym wydaje się monitorowanie DSA po transplantacji w takich przypadkach [112, 113].

Status biorcy zimmunizowanego pomimo braku obecności DSA często jest traktowany, jako czynnik ryzyka dla biorcy. W naszym badaniu, w grupie NDSA nie zaobserwowaliśmy niekorzystnego wpływu obecności przeciwciał anty-HLA nieswoistych dla dawcy na przeżywalność i funkcję przeszczepu oraz częstość epizodów ostrego odrzucania w okresie trzech lat po transplantacji. Nasze obserwacje są zbieżne z tymi dokonanymi przez Lefaucheur i wsp. oraz Caro-Oleas i wsp. i sugerują, że nie wszyscy pacjenci posiadający przeciwciała anty-HLA oznaczone metodą SAB należą do grupy podwyższonego ryzyka immunologicznego[88, 114].

Jednak, aby wyciągnąć jednoznaczne wnioski konieczne są dalsze badania z uwzględnieniem dłuższego okresu obserwacji, większej grupy pacjentów NDSA o wyższym i bardziej zróżnicowanym poziomie PRA.

Przeszczepienie od dawcy żywego stanowi około 6% wszystkich przeszczepień nerki wykonywanych w Polsce[115]. Dlatego też liczebność badanej kohorty była niewielka, co niekorzystnie wpłynęło na zdolność do wykazania statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami. Zaletą naszego badania był jednak ujednolicony schemat leczenia immunosupresyjnego oraz równomierne rozłożenie czynników ryzyka pomiędzy analizowanymi grupami. Spośród ograniczeń badania należy wymienić niską rozdzielczość i niepełny zakres typowania HLA dawców, czego konsekwencją mogła być nieprawidłową identyfikacja DSA w niektórych przypadkach.

Podsumowując, w badanej kohorcie biorców nerki od dawcy żywego kwalifikowanych zgodnie z zasadami VXM w Polsce, nie zaobserwowano niekorzystnego wpływu niskich pretransplantacyjnych DSA na wyniki przeszczepienia. W naszej grupie biorców zaobserwowaliśmy wysoką częstość występowania DSA o swoistości HLA -DQ, -DP, -Cw, które dotychczas nie były brane rutynowo pod uwagę podczas kwalifikacji. Znakomita przeżywalność, dobra funkcja przeszczepów nerki oraz niska częstość epizodów ostrego odrzucania w ciągu trzech lat obserwacji wskazuje ponadto na skuteczność stosowanego schematu immunosupresji.

Interpretacja znaczenia klinicznego zaobserwowanego przez nas trendu do częstszego występowania złogów C4d w PTC oraz przeciwciał *de novo* DSA w grupie biorców DSA pozytywnych wymaga dalszych badań z udziałem liczniejszej kohorty biorców nerki od dawcy żywego, dłuższego okresu obserwacji oraz z zastosowaniem typowania HLA dawców metodami wysokiej rozdzielczości.

## 4.2 Wnioski

### CZEŚĆ 1.

**Analiza zależności pomiędzy MFI pojedynczych DSA swoistych dla HLA-A lub -B lub -DR dawcy a wynikami CDC-XM oraz FLXM z uwzględnieniem procedur laboratoryjnych charakterystycznych dla ośrodka transplantacyjnego, jakim jest Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie wykazała, że:**

1. Przy zachowaniu czteromiesięcznej ważności wyników anty-HLA SAB potencjalnych biorców nerki:
  - a) dokładność prognozowania wyniku CDC-XM przez MFI pojedynczych DSA jest słaba przy wartości optymalnego punktu odcięcia około 10 000 MFI;
  - b) dokładność prognozowania wyniku FLXM przez MFI pojedynczych DSA została oceniona, jako dobra przy wartości optymalnego punktu odcięcia około 6000 MFI.
2. Zarówno w przypadku prognozowania wyniku CDC-XM jak i FLXM wartości MFI optymalnych punktów odcięcia różnią się w zależności od analizowanej swoistości DSA.
3. Dokładność prognozowania wyników CDC-XM oraz FLXM wykonanych z limfocytami B potencjalnych dawców zmarłych była niższa niż w przypadku prób krzyżowych wykonywanych odpowiednio z mieszaniną limfocytów T i B oraz limfocytami T.
4. Przy okresie ważności wyników anty-HLA SAB ustalonym na 4 miesiące, średni odstęp czasowy pomiędzy datą surowicy wykorzystaną do PXM a datą surowicy, na której wykonano badanie anty-HLA SAB wynosił  $43 \pm 32$  dni. Tylko u 23% biorców badanie anty-HLA SAB wykonane było w okresie 14 dni przed wykonaniem próby krzyżowej biologicznej i można uznać, że odzwierciedlało ono aktualny status immunologiczny pacjenta.
5. Kwartalna aktualizacja wyników oznaczeń anty-HLA SAB w badanej grupie biorców nie spowodowała statystycznie istotnej poprawy dokładności prognozowania wyników CDC-XM oraz FLXM przez MFI pojedynczych DSA HLA -A lub -B lub -DR.

6. Na podstawie porównania zmian poziomu MFI DSA pomiędzy oznaczeniami anty-HLA SAB wykonanymi w odstępie trzech miesięcy, nie odnotowano statystycznie istotnej różnicy. Jednak, w indywidualnych przypadkach zarówno repertuar jak i poziom MFI DSA uległ znaczącym zmianom.

**CZEŚĆ II. Analiza znaczenia klinicznego niskich poziomów DSA w kohorcie biorców przeszczepu nerki od dawcy żywego, z negatywnymi wynikami CDC-XM oraz FLXM wykazała, że:**

1. U 33% biorców odnotowano obecność pre-transplantacyjnych DSA HLA –A, –B lub –DR o MFI<5000 lub DSA HLA -DQ, -DP, -Cw, które nie były rutynowo typowane u dawców w momencie kwalifikacji do transplantacji.
2. U 78% biorców, u których wykazano obecność niskich poziomów DSA, były one skierowane przeciwko antygenom HLA -DQ, -DP oraz -Cw. Swoistością DSA o najwyższej częstości występowania było HLA –DQ.
3. U niewielkiej liczby biorców pre-transplantacyjne DSA wykazywały tendencję do utrzymywania się również po przeszczepieniu. Zgodnie z istniejącym piśmiennictwem w takich przypadkach wskazane wydaje się być monitorowanie DSA również po transplantacji.
4. Na podstawie porównania wyników przeszczepienia w grupach DSA, NDSA i negatywnej wykazano, że w czasie obserwacji wynoszącym trzy lata, niskie poziomy DSA nie wpłynęły niekorzystnie na:
  - a) wielkość przesączania kłębuszkowego wyrażonego eGFR oraz na częstość występowania proteinurii;
  - b) częstość występowania epizodów AMR oraz TCMR potwierdzonych biopsją;
  - c) przeżywalność przeszczepu.
5. Pacjenci z przeciwciałami anty-HLA nie-swoistymi dla dawcy, w porównaniu do grupy negatywnej, nie różnili się w sposób istotny pod względem żadnego z parametrów ocenianych w badaniu.
6. W grupie DSA-pozytywnej odnotowano tendencję do częstszego występowania przeciwciał *de novo* DSA po transplantacji oraz do częstszego występowania złogów C4d w PTC (stopień 1-3) w biopsjach.

7. Ze względu na ograniczenia badania, w tym niską liczebność badanej kohorty, uzyskane wyniki nie przesądzają w sposób jednoznaczny od braku niekorzystnego wpływu niskich poziomów pre-transplantacyjnych DSA na wyniki przeszczepienia nerki od dawcy żywego. Niezbędne są dalsze badania z udziałem większej grupy biorców w dłuższym okresie obserwacji.

## 5. Piśmiennictwo

- [1] Yabu JM, Anderson MW, Kim D, Bradbury BD, Lou CD, Petersen J, et al. Sensitization from transfusion in patients awaiting primary kidney transplant. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(11):2908-18. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft362>.
- [2] Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(15):1451-62. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0902927>.
- [3] Choi J, Chandraker A. Immunologic Risk Assessment and Approach to Immunosuppression Regimen in Kidney Transplantation. *Clin Lab Med*. 2019;39(4):643-56. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.07.010>.
- [4] Terasaki PI. Humoral Theory of Transplantation. 2003;3(6):665-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1600-6143.2003.00135.x>.
- [5] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 1969;280(14):735-9. <https://doi.org/10.1056/nejm196904032801401>.
- [6] Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant*. 2012;2012:193724. <https://doi.org/10.1155/2012/193724>.
- [7] Gebel HM, Bray RA, Nickerson P. Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. *Am J Transplant*. 2003;3(12):1488-500. <https://doi.org/10.1046/j.1600-6135.2003.00273.x>.
- [8] Piazza A, Ozzella G, Poggi E, Caputo D, Manfreda A, Adorno D. Virtual crossmatch in kidney transplantation. *Transplantation proceedings*. 2014;46(7):2195-8. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.053>.
- [9] Leffell MS. Real Benefits From Virtual Crossmatches. *Transplantation*. 2010;89(2):138-9. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c92591>.
- [10] Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F. A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2008;86(12):1864-8. <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e318191404c>.
- [11] Abuhelaiqa E, Alkadi M, Thappy S, Saleh S, Mahmoud J, Jar-Man M, et al. The effect of exclusive virtual crossmatch to allocate deceased donor kidney transplant on cold ischemia time and acute rejection. *American Journal of Transplantation*. 2019;19:498-9. <https://doi.org/10.1111/ajt.15405>.
- [12] Aslam S, Buggs J, Wyatt K, Kumar A, Rogers E, Watson R. The Impact of Virtual Crossmatch on Cold Ischemic Times and Outcomes Following Kidney Transplantation. *The American surgeon*. 2021;87(1):109-13. <https://doi.org/10.1177/0003134820942180>.
- [13] Jaramillo A, Reddy KS, Heilman RL. Using the virtual crossmatch to allow for safer and more efficient kidney transplantation of highly sensitized patients. *Transplantation*. 2019. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000002925>.
- [14] Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, Mohanakumar T. Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: A 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Human immunology*. 2010;71(3):268-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.01.003>.
- [15] Tambur AR, Ramon DS, Kaufman DB, Friedewald J, Luo X, Ho B, et al. Perception versus reality?: Virtual crossmatch--how to overcome some of the technical and logistic limitations. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(8):1886-93. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02724.x>.

- [16] Lebranchu Y, Baan C, Biancone L, Legendre C, Morales JM, Naesens M, et al. Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation. *Transpl Int*. 2014;27(2):129-38. <https://doi.org/10.1111/tri.12205>.
- [17] Pratschke J, Dragun D, Hauser IA, Horn S, Mueller TF, Schemmer P, et al. Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2016;30(2):77-84. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2016.02.002>.
- [18] Oweira H, Ramouz A, Ghamarnejad O, Khajeh E, Ali-Hasan-Al-Saegh S, Nikbakhsh R, et al. Risk Factors of Rejection in Renal Transplant Recipients: A Narrative Review. *J Clin Med*. 2022;11(5). <https://doi.org/10.3390/jcm11051392>.
- [19] Filler G. Optimization of immunosuppressive drug monitoring in children. *Transplantation proceedings*. 2007;39(4):1241-3. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.03.049>.
- [20] Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007;3(1):31-41. <https://doi.org/10.1038/ncpneph0383>.
- [21] Ravindranath MH, El Hilali F, Filippone EJ. The Impact of Inflammation on the Immune Responses to Transplantation: Tolerance or Rejection? *Frontiers in immunology*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.667834>.
- [22] Akgul SU, Ciftci HS, Temurhan S, Caliskan Y, Bayraktar A, Tefik T, et al. Association Between HLA Antibodies and Different Sensitization Events in Renal Transplant Candidates. *Transplantation proceedings*. 2017;49(3):425-9. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.004>.
- [23] Alelign T, Ahmed MM, Bobosha K, Tadesse Y, Howe R, Petros B. Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies. *J Immunol Res*. 2018;2018:5986740. <https://doi.org/10.1155/2018/5986740>.
- [24] Filippone EJ, Farber JL. Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis*. 2015;66(2):337-47. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.03.033>.
- [25] Tambur AR, Campbell P, Claas FH, Feng S, Gebel HM, Jackson AM, et al. Sensitization in Transplantation: Assessment of Risk (STAR) 2017 Working Group Meeting Report. *Am J Transplant*. 2018;18(7):1604-14. <https://doi.org/10.1111/ajt.14752>.
- [26] Weinstock C, Schnaidt M. Human Leucocyte Antigen Sensitisation and Its Impact on Transfusion Practice. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019;46(5):356-69. <https://doi.org/10.1159/000502158>.
- [27] Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion*. 1990;30(4):344-57. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1990.30490273444.x>.
- [28] Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Human immunology*. 2013;74(8):946-51. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.04.025>.
- [29] Higgins R, Lowe D, Daga S, Hathaway M, Williams C, Lam FT, et al. Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation. *Human immunology*. 2015;76(8):546-52. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.06.013>.
- [30] Akalin E, Pascual M. Sensitization after Kidney Transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;1(3):433-40. <https://doi.org/10.2215/cjn.01751105>.
- [31] Meier-Kriesche HU, Scornik JC, Susskind B, Rehman S, Schold JD. A lifetime versus a graft life approach redefines the importance of HLA matching in kidney transplant patients. *Transplantation*. 2009;88(1):23-9. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a9ec89>.
- [32] Nimmo A, McIntyre S, Turner DM, Henderson LK, Battle RK. The Impact of Withdrawal of Maintenance Immunosuppression and Graft Nephrectomy on HLA Sensitization and Calculated Chance

- of Future Transplant. *Transplant Direct*. 2018;4(12):e409.  
<https://doi.org/10.1097/txd.0000000000000848>.
- [33] Leffell MS, Kim D, Vega RM, Zachary AA, Petersen J, Hart JM, et al. Red blood cell transfusions and the risk of allosensitization in patients awaiting primary kidney transplantation. *Transplantation*. 2014;97(5):525-33. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000437435.19980.8f>.
- [34] Togninalli M, Yoneoka D, Kolios AGA, Borgwardt K, Nilsson J. Pretransplant Kinetics of Anti-HLA Antibodies in Patients on the Waiting List for Kidney Transplantation. 2019;30(11):2262-74. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019060594> %J *Journal of the American Society of Nephrology*.
- [35] MULLEY WR, KANELIS J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology*. 2011;16(2):125-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01414.x>.
- [36] National Institute of Health Lymphocyte Microcytotoxicity Technique. In: Ray J, editor. NIAID manual of tissue typing techniques. Bethesda: Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Allergy and Infectious Diseases.; 1980. p. 39.
- [37] Althaf MM, El Kossi M, Jin JK, Sharma A, Halawa AM. Human leukocyte antigen typing and crossmatch: A comprehensive review. *World journal of transplantation*. 2017;7(6):339-48. <https://doi.org/10.5500/wjt.v7.i6.339>.
- [38] Histocompatibility testing: Eurotransplant Foundation; 2021 [Available from: <https://www.eurotransplant.org/allocation/eurotransplant-manual/> Access Date].
- [39] Morris AB, Sullivan HC, Krummey SM, Gebel HM, Bray RA. Out with the old, in with the new: Virtual versus physical crossmatching in the modern era. *HLA*. 2019;94(6):471-81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tan.13693>.
- [40] Pei R, Wang G, Tarsitani C, Rojo S, Chen T, Takemura S, et al. Simultaneous HLA Class I and Class II antibodies screening with flow cytometry. *Human immunology*. 1998;59(5):313-22. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(98\)00020-2](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(98)00020-2).
- [41] Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013;95(1):19-47. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31827a19cc>.
- [42] Amico P, Hönger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009;14(6):656-61. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328331c169>.
- [43] Baxter-Lowe LA, Cecka M, Kamoun M, Sinacore J, Melcher ML. Center-defined unacceptable HLA antigens facilitate transplants for sensitized patients in a multi-center kidney exchange program. *Am J Transplant*. 2014;14(7):1592-8. <https://doi.org/10.1111/ajt.12734>.
- [44] Heidt S, Haasnoot GW, Witvliet MD, van der Linden-van Oevelen MJH, Kamburova EG, Wisse BW, et al. Allocation to highly sensitized patients based on acceptable mismatches results in low rejection rates comparable to nonsensitized patients. *Am J Transplant*. 2019;19(10):2926-33. <https://doi.org/10.1111/ajt.15486>.
- [45] Nguyen HD, Williams RL, Wong G, Lim W. The Evolution of HLA-Matching in Kidney Transplantation. 2013. p. 273-97.
- [46] Larkins NG, Wong G, Taverniti A, Lim WH. Epitope matching in kidney transplantation: recent advances and current limitations. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019;24(4):370-7. <https://doi.org/10.1097/mot.0000000000000657>.
- [47] Alzahrani M, Qahtani Z, Harbi H, Kebasi S, Essa O, Al Attas R. Virtual Crossmatch: Reality of Perception. *Transplantation proceedings*. 2019;51(2):488-91. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.01.005>.



- [48] Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Human immunology*. 2009;70(7):496-501. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.04.001>.
- [49] Jani V, Ingulli E, Mekeel K, Morris GP. Root cause analysis of limitations of virtual crossmatch for kidney allocation to highly-sensitized patients. *Human immunology*. 2017;78(2):72-9. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.11.003>.
- [50] Wiktorowicz K, Kaszkowiak K. Budowa i funkcja ludzkich antygenów zgodności tkankowej. Część 1. Kodowanie i budowa. *Rheumatology Forum*. 2018;4(1):37-44.
- [51] Sá H, Leal R, Rosa MS. Renal transplant immunology in the last 20 years: A revolution towards graft and patient survival improvement. *Int Rev Immunol*. 2017;36(3):182-203. <https://doi.org/10.1080/08830185.2016.1225300>.
- [52] Ringquist S, Lu Y, Trucco M, Bellone G. Chapter 40 - Transplantation Genetics. In: Rimoin D, Pyeritz R, Korf B, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition)*. Oxford: Academic Press; 2013. p. 1-33.
- [53] Reynolds BC, Tinckam KJ. Sensitization assessment before kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017;31(1):18-28. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2016.10.001>.
- [54] Süsal C, Roelen DL, Fischer G, Campos EF, Gerbase-DeLima M, Hönger G, et al. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue antigens*. 2013;82(2):83-92. <https://doi.org/10.1111/tan.12137>.
- [55] Bachelet T, Martinez C, del Bello A, Couzi L, Keiji S, Guidicelli G, et al. Deleterious impact of donor-specific Anti-HLA antibodies toward HLA-Cw and HLA-DP in kidney transplantation. *Transplantation*. 2015;100. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000821>.
- [56] Filippone EJ, Farber JL. Humoral immunity in renal transplantation: epitopes, Cw and DP, and complement-activating capability--an update. *Clinical transplantation*. 2015;29(4):279-87. <https://doi.org/10.1111/ctr.12524>.
- [57] Tambur AR. HLA-DQ antibodies: are they real? Are they relevant? Why so many? *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(4):441-6. <https://doi.org/10.1097/mot.0000000000000325>.
- [58] Bhaskaran MC, Heidt S, Muthukumar T. Principles of Virtual Crossmatch Testing for Kidney Transplantation. *Kidney International Reports*. 2022;7(6):1179-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ekir.2022.03.006>.
- [59] Senev A, Emonds MP, Van Sandt V, Lerut E, Coemans M, Sprangers B, et al. Clinical importance of extended second field high-resolution HLA genotyping for kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2020;20(12):3367-78. <https://doi.org/10.1111/ajt.15938>.
- [60] Baxter-Lowe LA. Growing evidence that 2-field high-resolution HLA typing is important for kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2020;20(12):3277-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ajt.16092>.
- [61] Claas FHJ, Dankers MK, Oudshoorn M, van Rood JJ, Mulder A, Roelen DL, et al. Differential immunogenicity of HLA mismatches in clinical transplantation. *Transplant Immunology*. 2005;14(3):187-91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trim.2005.03.007>.
- [62] Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkera HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation*. 2016;100(5):1094-102. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000001115>.
- [63] Williams RC, Opelz G, Weil EJ, McGarvey CJ, Chakkera HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts 2: Living Donors, Summary, Guide. *Transplant Direct*. 2017;3(5):e152. <https://doi.org/10.1097/txd.0000000000000664>.
- [64] Zachary AA, Leffell MS. HLA Mismatching Strategies for Solid Organ Transplantation – A Balancing Act. *Frontiers in immunology*. 2016;7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00575>.

- [65] British Society for Histocompatibility & Immunogenetics BTS. The detection & characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. Available from: [https://bts.org.uk/wp-content/uploads/2016/09/06\\_BTS\\_BSHI\\_Antibodies-1.pdf](https://bts.org.uk/wp-content/uploads/2016/09/06_BTS_BSHI_Antibodies-1.pdf). [accessed 8 Dec 2019].
- [66] Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Valentin N, Paitier C, Giral-Classe M, Curry S, et al. Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation. *Transplantation*. 2003;75(4):477-82. <https://doi.org/10.1097/01.Tp.0000047311.77702.59>.
- [67] Carey BS, Poulton KV, Poles A. Factors affecting HLA expression: A review. *International Journal of Immunogenetics*. 2019;46(5):307-20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/iji.12443>.
- [68] Jaramillo A, Ramon D, Stoll S. Technical Aspects of Crossmatching in Transplantation. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.07.002>.
- [69] Süsal C, Opelz G. Options for immunologic support of renal transplantation through the HLA and immunology laboratories. *Am J Transplant*. 2007;7(6):1450-6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01824.x>.
- [70] Halawa A. Understanding human leukocyte antigen typing and crossmatch techniques in renal transplantation. *British Journal of Renal Medicine*. 2017;22:115.
- [71] Garovoy, Rheinschmidt M, Bigos M, Perkins HA, Colombe BW, Feduska NJ, et al., editors. Flow cytometry analysis: A high technology cross-match technique facilitating transplantation 1983.
- [72] Karpinski M, Rush D, Jeffery J, Exner M, Regele H, Dancea S, et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12):2807-14. <https://doi.org/10.1681/asn.V12122807>.
- [73] Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation*. 2009;87(11):1681-8. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181a5e034>.
- [74] Taylor CJ, Kosmoliaptsis V, Sharples LD, Prezzi D, Morgan CH, Key T, et al. Ten-year experience of selective omission of the pretransplant crossmatch test in deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2010;89(2):185-93. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c926f2>.
- [75] Dodd P, Willicombe M, Brookes P, Roufosse C, Santos-Nunez E, Goodall D, et al. Significance of HLA IgM and IgM Donor Specific Antibodies in Renal Transplantation.: Abstract# A123. 2014;98:435.
- [76] Zasady alokacji nerek z dnia 1 stycznia 2016: POLTRANSPLANT Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds. Transplantacji w Polsce; [Available from: <http://www.poltransplant.org.pl/alokacja2.html#gsc.tab=0> Access Date].
- [77] Algorytm badań immunologicznych: POLTRANSPLANT -Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds Transplantacji w Polsce; [updated 14-04-21. Available from: <http://www.poltransplant.org.pl/pzt.html> Access Date].
- [78] Kim HS, Choi AR, Yang M, Oh EJ. EDTA Treatment for Overcoming the Prozone Effect and for Predicting C1q Binding in HLA Antibody Testing. *Ann Lab Med*. 2019;39(6):572-6. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.6.572>.
- [79] Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*. 2011;92(5):510-5. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31822872dd>.
- [80] Bryan CF, Martinez J, Muruve N, Nelson PW, Pierce GE, Ross G, et al. IgM antibodies identified by a DTT-ameliorated positive crossmatch do not influence renal graft outcome but the strength of the IgM lymphocytotoxicity is associated with DR phenotype. *Clinical transplantation*. 2001;15 Suppl 6:28-35. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0012.2001.00005.x>.
- [81] Vaidya S, Ruth J. Contributions and clinical significance of IgM and autoantibodies in highly sensitized renal allograft recipients. *Transplantation*. 1989;47(6):956-8. <https://doi.org/10.1097/00007890-198906000-00008>.

- [82] Batal I, Zeevi A, Lunz JG, 3rd, Aggarwal N, Shapiro R, Randhawa P, et al. Antihuman leukocyte antigen–specific antibody strength determined by complement-dependent or solid-phase assays can predict positive donor-specific crossmatches. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(10):1534-40. <https://doi.org/10.5858/2009-0581-oa.1>.
- [83] Peräsaari JP, Jaatinen T, Merenmies J. Donor-specific HLA antibodies in predicting crossmatch outcome: Comparison of three different laboratory techniques. *Transpl Immunol*. 2018;46:23-8. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2017.11.002>.
- [84] Visentin J, Bachelet T, Borg C, Franchini N, Nong T, Lee JH, et al. Reassessment of T Lymphocytes Crossmatches Results Prediction With Luminex Class I Single Antigen Flow Beads Assay. *Transplantation*. 2017;101(3):624-30. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000001239>.
- [85] Liu C, Wetter L, Pang S, Phelan DL, Mohanakumar T, Morris GP. Cutoff values and data handling for solid-phase testing for antibodies to HLA: effects on listing unacceptable antigens for thoracic organ transplantation. *Human immunology*. 2012;73(6):597-604. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.016>.
- [86] Ellis TM, Schiller JJ, Roza AM, Cronin DC, Shames BD, Johnson CP. Diagnostic accuracy of solid phase HLA antibody assays for prediction of crossmatch strength. *Human immunology*. 2012;73(7):706-10. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.04.007>.
- [87] Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(12):2061-71. <https://doi.org/10.1681/asn.2012070664>.
- [88] Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1398-406. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009101065>.
- [89] Malheiro J, Tafulo S, Dias L, Martins S, Fonseca I, Beirão I, et al. Impact on mid-term kidney graft outcomes of pretransplant anti-HLA antibodies detected by solid-phase assays: Do donor-specific antibodies tell the whole story? *Human immunology*. 2017;78(9):526-33. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.07.011>.
- [90] Adebisi OO, Gralla J, Klem P, Freed B, Davis S, Wiseman AC, et al. Clinical Significance of Pretransplant Donor-Specific Antibodies in the Setting of Negative Cell-Based Flow Cytometry Crossmatching in Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2016;16(12):3458-67. <https://doi.org/10.1111/ajt.13848>.
- [91] Orandi BJ, Garonzik-Wang JM, Massie AB, Zachary AA, Montgomery JR, Van Arendonk KJ, et al. Quantifying the risk of incompatible kidney transplantation: a multicenter study. *Am J Transplant*. 2014;14(7):1573-80. <https://doi.org/10.1111/ajt.12786>.
- [92] Tambur AR, Kosmoliaptsis V, Claas FHJ, Mannon RB, Nickerson P, Naesens M. Significance of HLA-DQ in kidney transplantation: time to reevaluate human leukocyte antigen-matching priorities to improve transplant outcomes? An expert review and recommendations. *Kidney Int*. 2021;100(5):1012-22. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.06.026>.
- [93] Frischknecht L, Deng Y, Wehmeier C, de Rougemont O, Villard J, Ferrari-Lacraz S, et al. The impact of pre-transplant donor specific antibodies on the outcome of kidney transplantation – Data from the Swiss transplant cohort study. *Frontiers in immunology*. 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1005790>.
- [94] Willicombe M, Brookes P, Sergeant R, Santos-Nunez E, Steggar C, Galliford J, et al. De novo DQ donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Transplantation*. 2012;94(2):172-7. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182543950>.

- [95] DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int.* 2012;82(5):598-604. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.190>.
- [96] Ling M, Marfo K, Masiakos P, Aljanabi A, Lindower J, Glicklich D, et al. Pretransplant anti-HLA-Cw and anti-HLA-DP antibodies in sensitized patients. *Human immunology.* 2012;73(9):879-83. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.07.320>.
- [97] Gibney EM, Cagle LR, Freed B, Warnell SE, Chan L, Wiseman AC. Detection of donor-specific antibodies using HLA-coated microspheres: another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(9):2625-9. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl202>.
- [98] Weinreich I, Bengtsson M, Lauronen J, Naper C, Lokk K, Helanterä I, et al. Scandiatransplant acceptable mismatch program—10 years with an effective strategy for transplanting highly sensitized patients. *American Journal of Transplantation.* n/a(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ajt.17182>.
- [99] Bray RA, Nolen JD, Larsen C, Pearson T, Newell KA, Kokko K, et al. Transplanting the highly sensitized patient: The emory algorithm. *Am J Transplant.* 2006;6(10):2307-15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01521.x>.
- [100] Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): The New Measure of Sensitization for Transplant Candidates. *American Journal of Transplantation.* 2010;10(1):26-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02927.x>.
- [101] Moreno C, Burgos L, Pérez-Robles C, Delgado JA, Mata JJ, Errasti P, et al. Predictive value of the Luminex single antigen panel for detecting flow cytometry cross-match positivity. *Human immunology.* 2012;73(5):517-21. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.02.022>.
- [102] Gebel HM, Bray RA. HLA Antibody Detection With Solid Phase Assays: Great Expectations or Expectations Too Great? *American Journal of Transplantation.* 2014;14(9):1964-75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ajt.12807>.
- [103] Badders JL, Jones JA, Jeresano ME, Schillinger KP, Jackson AM. Variable HLA expression on deceased donor lymphocytes: Not all crossmatches are created equal. *Human immunology.* 2015;76(11):795-800. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.029>.
- [104] Guillaume N. Improved flow cytometry crossmatching in kidney transplantation. *Hla.* 2018;92(6):375-83. <https://doi.org/10.1111/tan.13403>.
- [105] Locke J, Zachary A, Warren D, Segev D, Houp J, Montgomery R, et al. Proinflammatory Events Are Associated with Significant Increases in Breadth and Strength of HLA-Specific Antibody. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* 2009;9:2136-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02764.x>.
- [106] Hönger G, Krähenbühl N, Dimeloe S, Stern M, Schaub S, Hess C. Inter-individual differences in HLA expression can impact the CDC crossmatch. 2015;85(4):260-6. <https://doi.org/10.1111/tan.12537>.
- [107] Betjes MGH, Sablik KS, Otten HG, Roelen DL, Claas FH, de Weerd A. Pretransplant Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and the Risk for Rejection-Related Graft Failure of Kidney Allografts. *J Transplant.* 2020;2020:5694670. <https://doi.org/10.1155/2020/5694670>.
- [108] Patel AM, Pancoska C, Mulgaonkar S, Weng FL. Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. *Am J Transplant.* 2007;7(10):2371-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01944.x>.
- [109] Haas M, Loupy A, Lefaucheur C, Roufosse C, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant.* 2018;18(2):293-307. <https://doi.org/10.1111/ajt.14625>.

- [110] Kikić Ž, Kainz A, Kozakowski N, Oberbauer R, Regele H, Bond G, et al. Capillary C4d and Kidney Allograft Outcome in Relation to Morphologic Lesions Suggestive of Antibody-Mediated Rejection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(8):1435-43. <https://doi.org/10.2215/cjn.09901014>.
- [111] Nickeleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(1):242-51. <https://doi.org/10.1681/asn.V131242>.
- [112] Caillard S, Becmeur C, Gautier-Vargas G, Olagne J, Muller C, Cognard N, et al. Pre-existing donor-specific antibodies are detrimental to kidney allograft only when persistent after transplantation. *Transpl Int*. 2017;30(1):29-40. <https://doi.org/10.1111/tri.12864>.
- [113] DeVos JM, Patel SJ, Burns KM, Dilioglou S, Gaber LW, Knight RJ, et al. De novo donor specific antibodies and patient outcomes in renal transplantation. *Clinical transplants*. 2011:351-8.
- [114] Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, González-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes M, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):1231-8. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr429>.
- [115] Statystyka przeszczepień narządów od dawców żywych i zmarłych w 2021 roku: POLTRANSPLANT-Centrum Organizacyjno-Koordynacyjne ds Transplantacji w Polsce; [Available from: [http://www.poltransplant.org.pl/statystyka\\_2021.html](http://www.poltransplant.org.pl/statystyka_2021.html) Access Date].



## **Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym**

**Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165**

**ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa**

**e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl**

Warszawa, dnia 13 stycznia 2020r.

AKBE/ 11 / 2020

Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon  
Zakład Immunologii Klinicznej  
ul. Nowogrodzka 59  
02-006 Warszawa

### **OŚWIADCZENIE**

Niniejszym oświadczam, że Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 13 stycznia 2020 r. przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt.: "Rola oceny swoistości przeciwciał anty-HLA w analizie ryzyka immunologicznego u potencjalnych biorców alloprzeszczepu nerki." Przedstawione badanie nie stanowi eksperymentu medycznego w rozumieniu art. 21 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz.U. z 2018 r. poz. 617) i nie wymaga uzyskania opinii Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, o której mowa w art. 29 ust. 1 ww. ustawy.

**Przewodnicząca Komisji Bioetycznej**

  
**Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz**

Warszawa, 27.01.23

Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon  
Zakład Immunologii Klinicznej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Accuracy of virtual crossmatch (VXM) prediction of physical crossmatch (PXM) results of donor specific antibody (DSA) in routine pretransplant settings-a single-center experience**” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór merytoryczny nad koncepcją publikacji, metodyką oraz interpretacją wyników.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20%.

Wkład mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby w powstawanie publikacji określam jako 70%, obejmował on: przygotowanie koncepcji artykułu, metodyki oraz interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby.

.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 27.01.23

Dr hab. n. med. Jolanta Gozdowska  
Klinika Medycyny Transplantacyjnej, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Accuracy of virtual crossmatch (VXM) prediction of physical crossmatch (PXM) results of donor specific antibody (DSA) in routine pretransplant settings-a single-center experience**” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór merytoryczny nad całością artykułu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby w powstawanie publikacji określam jako 70%,

obejmował on: przygotowanie koncepcji artykułu, metodyki oraz interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby.

.....  
(podpis oświadczającego)



Warszawa, 27.01.23

Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon  
Zakład Immunologii Klinicznej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Clinical significance of low pre-transplant donor specific antibodies (DSA) in living donor kidney recipients with negative complement-dependent cytotoxicity crossmatches (CDCXM), and flow cytometry crossmatches (FLXM) – a single-center experience**” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór merytoryczny nad publikacją.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby w powstawanie publikacji określam jako 70%,

obejmował on: przygotowanie koncepcji artykułu, metodyki oraz interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby.

.....  
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 27.01.23

Dr hab. n. med. Jolanta Gozdowska  
Klinika Medycyny Transplantacyjnej, Nefrologii i Chorób Wewnętrznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. „**Clinical significance of low pre-transplant donor specific antibodies (DSA) in living donor kidney recipients with negative complement-dependent cytotoxicity crossmatches (CDCXM), and flow cytometry crossmatches (FLXM) – a single-center experience**” oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: nadzór merytoryczny nad koncepcją publikacji, metodyką oraz interpretacją wyników.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20%.

Wkład mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby w powstawanie publikacji określam jako 70%, obejmował on: przygotowanie koncepcji artykułu, metodyki oraz interpretacji wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Nataszy Olszowskiej-Zaremby.

.....

(podpis oświadczającego)