



VIA MEDICA

www.fn.viamedica.pl

Hanna Zielińska¹, Grażyna Moszkowska¹, Alicja Dębska-Ślizień², Maciej Zieliński¹, Magdalena Jankowska², Bolesław Rutkowski², Piotr Trzonkowski¹¹Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego²Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Możliwości diagnostyczne oceny ryzyka immunologicznego biorcy nerki przed przeszczepieniem i po jego wykonaniu

Diagnostic options in pre- and post-transplant immune risk assessment in kidney recipients

ABSTRACT

Although enormous progress made in the use immunosuppressive drugs, still rejection is one of the reasons of kidney loss. Especially at risk are highly sensitized recipients, who are greater exposed to the risk of humoral rejection than non-sensitized recipient. This type of rejection can occur in the early as well as in the late period after transplantation and may cause loss of the kidney. This results in significantly worse graft survival in these patients. Modern immunological diagnostic solutions can bring significant benefits both at the stage of selection for transplantation as well as monitoring the immunological response after transplantation. The study presents methods of measurement and evaluation of immunization based on the identification of the specificity of anti-HLA alloantibodies and their use on the stage:

- improvement in immunological matching for transplantation: using current methods it is possible to determine complete panel of „safe” HLA antigens for each highly sensitized recipient. Against this HLA antigens recipient should not possess any detectable antibodies. Determination of specificity of anti-HLA antibodies is also the basis for

a new, more sensitive and accurate method of assessing immunization in so-called virtual PRA, which determines the frequency of probability a positive cross match against representative population of potential donors. Precise identification of the specificity of anti-HLA antibodies in association with extending the range of HLA typing of donors and recipients allows us to enter so-called virtual Cross-Match, which is based on the best HLA-typing selection and absolute avoiding of donor's HLA antigens against the recipient has antibodies;

- monitoring humoral immune response after transplantation as the identification of antibodies specific for donor HLA, so called DSA — donor specific antibody.

Immunological evaluation before and monitoring after transplantation on the basis of modern immunological diagnostics allows to obtain results comparable with a group of non-sensitized recipients.

Forum Nefrologiczne 2011, vol. 4, no 4, 320–330**Key words: kidney transplantation, anti-HLA alloantibodies, alloantibody assay, antibody dependent graft rejection, Luminex technology, LSA assay (luminex single antigen), DSA (donor specific antibodies)****Adres do korespondencji:**

mgr Hanna Zielińska

Zakład Immunologii Klinicznej GUMed

ul. Dębinki 7, 80–952 Gdańsk

tel./faks: (58) 349 21 91

e-mail: hzielinska@uck.gda.pl

OCENA RYZYKA IMMUNOLOGICZNEGO POTENCJALNYCH BIORCÓW NEREK ZA POMOCĄ METODY CYTOTOKSYCZNOŚCI ZALEŻNEJ OD DOPEŁNIACZA

Wśród przyczyn wpływających na długość przeżycia przeszczepu podstawowe znaczenie mają czynniki immunologiczne: dobór w zakresie HLA (*human leukocyte antigen*) [1] oraz wcześniejsza immunizacja biorcy antygenami HLA dawcy [2]. Do aloimmunizacji HLA, czyli uczulenia na antygeny HLA własnego gatunku, dochodzi bardzo łatwo, ponieważ należą one do jednych z najsilniej uczulających [3, 4]. Przeciwdziałanie aloimmunizacji jest niezwykle istotne, gdyż nawet po jednokrotnym zetknięciu z aloantygenem HLA komórki pamięci mogą zachować gotowość do odpowiedzi wtórnej wiele lat po ekspozycji na antygen, a według niektórych doniesień nawet przez całe życie [5]. Najczęściej do aloimmunizacji HLA dochodzi podczas transfuzji. U 10% chorych wytwarzają się przeciwciała anti-HLA już po pierwszej transfuzji, u 70% po wielokrotnych transfuzjach. Można jej łatwo zapobiec, stosując filtrowanie preparatu krwiopochodnego. Wśród pozostałych przyczyn immunizacji należy wymienić ciężę, inne przeszczepienia oraz niektóre uogólnione infekcje poprzedzające przeszczepienie odpowiadające za zjawisko tak zwanej odporności heterologicznej. Infekcje prowadzą do uczulenia około 10% chorych na zasadzie mimikry molekularnej, czyli podobieństwa antygenów patogenu i antygenów przeszczepionego narządu. Ponowne zakażenie wirusem lub jego reaktywacja powoduje równoległą odpowiedź gospodarza zarówno przeciwwirusową, jak i skierowaną przeciwko antygenom przeszczepu [6].

Przeszczepienie nerki u biorcy wysoko zimmunizowanego jest obarczone wyższym ryzykiem odrzucania zależnego od przeciwciał (AMR, *antibody mediated rejection*), a nawet przy braku AMR przeżycie przeszczepu w tej grupie jest znacząco gorsze, co może się wiązać z procesem przewlekłego odrzucania narządu zależnego od przeciwciał. Nawet znikome ilości przeciwciał specyficznych wobec dawcy są wykładnikiem obecności komórek pamięci, których klonalna proliferacja może w krótkim czasie doprowadzić do uszkodzenia przeszczepu. Dlatego należy stosować coraz czulsze metody umożliwiające precyzyjny dobór narządu w oparciu o identyfikację szkodliwych przeciwciał.

Poniżej przedstawiono metody oceny immunologicznej biorcy obecnie stosowane

w Polsce oraz ograniczenia z nich wynikające. Dzięki zmianie systemu alokacji w Polsce, przeprowadzonej pod koniec 2009 roku, istotnie zwiększył się dostęp do transplantacji dla zimmunizowanych powyżej 50% PRA-CDC (*Panel Reactive Antibodies-Complement Dependent Cytotoxicity*) biorców (z 15,7% w 2009 r. do 30,5% w 2010 r.) [7]. Jednak brak identyfikacji przeciwciał uniemożliwia ocenę skali ryzyka transplantacji dla wysoko zimmunizowanego biorcy. W obecnej praktyce stopień uczulenia wyraża wynik testu mikrolimfocytotoksycznego PRA-CDC przeprowadzanego metodą serologiczną w teście cytotoksyczności zależnej od dopełniacza (CDC). Test polega na ocenie obecności alloprzeciwciał wiążących dopełniacz w surowicy biorcy z panelem limfocytów pochodzących od 30 niespokrewnionych dawców krwi (indeks PRA) i ustaleniu odsetka reakcji dodatnich. Test jest powtarzany u zakwalifikowanego do przeszczepienia biorcy nerki co 12 tygodni w celu obserwowania tendencji. PRA-CDC nie różnicuje ani swoistości, ani klasy przeciwciał anti-HLA. Ma ograniczoną wartość, gdyż wykrywa tylko przeciwciała w wysokim mianie. W klasycznej, stosowanej rutynowo postaci PRA-CDC istnieje również odsetek wyników fałszywie dodatnich spowodowanych przeciwciałami IgM. Wynik testu PRA-CDC jest ściśle uzależniony od dostępnego fenotypu HLA panelu limfocytów, dlatego pojedynczy wynik PRA = 0% nie wyklucza obecności alloprzeciwciał wiążących dopełniacz, nawet w wysokim mianie względem innych dawców.

Jeśli wynik ostatniego testu PRA-CDC wynosi > 80%, przeszczepienie u pacjenta jest traktowane jako obligatoryjne, po spełnieniu warunku ujemnej (–) próby krzyżowej.

Zarówno próba krzyżowa (CM, *cross match*), jak i ocena immunizacji (wcześniej wspomniane PRA-CDC) są wykonywane techniką serologiczną (CDC). Próba krzyżowa (CM-CDC) jest wykonywana bezpośrednio przed transplantacją z limfocytami dawcy (pochodzącymi z węzłów chłonnych lub śledziony), jest jednak znacznie czulsza od testu PRA-CDC w detekcji przeciwciał. Stosowane są bowiem wydłużone czasy inkubacji oraz, jak zaznaczono powyżej, inne źródło limfocytów. Limfocyty do próby krzyżowej od zmarłego dawcy są izolowane z jego węzłów chłonnych, gdzie znacznie więcej (ok. 30%) jest limfocytów B. We krwi obwodowej jest ich 3-krotnie mniej. Limfocyty B zwiększają czułość wykrywania przeciwciał, ponieważ w stosunku do

►► U 10% chorych wytwarzają się przeciwciała anti-HLA już po pierwszej transfuzji, u 70% po wielokrotnych transfuzjach◀◀

►► Nawet znikome ilości przeciwciał specyficznych wobec dawcy są wykładnikiem obecności komórek pamięci, których klonalna proliferacja może w krótkim czasie doprowadzić do uszkodzenia przeszczepu◀◀

▶▶ Dla pacjentów zgłoszonych do retransplantacji czynnikiem dyskwalifikującym jest powtórzona niezgodność HLA z dawcą, niezależnie od przyczyny utraty nerki, a w konsekwencji możliwości i ryzyka immunizacji◀◀

limfocytów T mają wyższą ekspresję antygenów HLA klasy I (A, B, Cw) oraz wykazują ekspresję HLA klasy II (DR, DQ, DP). W niektórych ośrodkach (również w Gdańsku) próbę krzyżową wykonuje się z dodatkowo zagęszczoną pulą limfocytów B, gdzie ich odsetek sięga 80–90%, nie ma jednak jednoznacznych krajowych wytycznych z tego zakresu [8]. W przypadku przeszczepów od żywych dawców nie ma możliwości pobierania węzłów chłonnych i decyzja o transplantacji nie powinna się opierać na teście CM-CDC. W takich przypadkach wykonuje się próbę krzyżową metodą cytometrii przepływowej (FCXM, *flow cytometry cross-match*) z limfocytami T oraz B. Za pomocą FCXM wykrywa się znacznie niższe miana alloprzeciwciał w porównaniu z klasyczną, serologiczną próbą krzyżową (CM-CDC). Negatywny wynik FCXM ogranicza wystąpienie wczesnego odrzucania zależnego od przeciwciał, jednak kosztem zwiększonego odsetka wyników fałszywie pozytywnych (IgG₄ niewiążące dopełniacza). Wydaje się jednak, że rutynowe wykonanie FCXM niezależnie od serologicznej próby krzyżowej przyniosłoby istotne korzyści w postaci informacji o zwiększonym zagrożeniu wystąpieniem AMR. W ośrodku gdańskim FCXM jest wykonywana do 24 godzin od zabiegu transplantacji jako wskaźnik ryzyka odrzucania. W grupie pacjentów z dodatnim FCXM dochodzi 2-krotnie częściej do odrzucania naczyniowego (28,9% z [+] FCXM v. 12,6% z [-] FCXM w grupie 455 biorców), a roczne przeżycie przeszczepu jest o 10% niższe (84% v. 94%) [9].

OCENA RYZYKA IMMUNOLOGICZNEGO BIORCÓW ZGŁOSZONYCH DO RETRANSPLANTACJI

Dla pacjentów zgłoszonych do retransplantacji czynnikiem dyskwalifikującym jest powtórzona niezgodność HLA z dawcą (HLA-MM, *mismatch*), niezależnie od przyczyny utraty nerki, a w konsekwencji możliwości i ryzyka immunizacji. Na przykład biorca, który w przeszłości otrzymał nerkę od dawcy z antygenami HLA-A1,B8,DR7, a sam takich antygenów nie posiada, zgłoszony po raz kolejny na listę oczekujących nie będzie badany, gdy dawca ma którąkolwiek z tych swoistości antygenowych. Sytuacja ta odnosi się do wszystkich przypadków, nawet jeśli u biorcy nie odnotowano obecności przeciwciał anti-HLA, czyli nie wytworzył ich w czasie poprzedniej transplantacji względem antygenów poprzedniego dawcy. Założenie to nie jest ujęte w zasadach alokacji, ale w praktyce biorca nie pojawi się

na liście oczekujących, jeśli u dawcy występuje HLA-MM. Problem widać szczególnie u niezimmunizowanych biorców zgłoszonych do retransplantacji, którzy mają z poprzednim dawcą niezgodność z często występującym w populacji antygenem. I tak na przykład sam antygen HLA-A2 występuje w 20% populacji kaukaskiej, co oznacza dla biorcy 20-procentowe mniejsze szanse na przeszczepienie. Założenie, że każda niezgodność HLA jest przyczyną immunizacji, nie wydaje się w pełni zasadna. W badaniach ośrodka gdańskiego nawet w grupie zimmunizowanych biorców (PRA-CDC > 50%) oczekujących na kolejny przeszczep, 8,1% (3 z 37 biorców) nie posiadało przeciwciał przeciwko żadnej niezgodności HLA z poprzednim dawcą. Ponadto, tylko wobec 68,13% wszystkich poprzednich niezgodności wykazano obecność przeciwciał DSA-specyficznych (*donor specific antibodies*) [10]. Prawdopodobieństwo wytworzenia przeciwciał przez biorcę można określić w programie HLAMatchmaker®, który określa stopień immunogenności każdego niezgodnego antygeny HLA wobec pełnego haplotypu HLA biorcy. Stopień niezgodności wyrażany za pomocą liczby niezgodnych immunogennych miejsc (tzw. mmEp, *mismatch aminoacids eplets*) przekłada się na prawdopodobieństwo wytworzenia przeciwciał przez biorcę [11–13]. Co więcej, w ten sposób można też określić całkowicie bezpieczne dla danego biorcy niezgodności HLA, które nie będą indukowały odpowiedzi humoralnej, co znajduje zastosowanie w europejskim programie dla zimmunizowanych AMP: *Acceptable Mismatch Programme* prowadzonym przez *Eurotransplant Reference Laboratory* (ETRL) dla Eurotransplantu.

Przyjęte w Polsce postępowanie zmniejszające niestety szanse biorców zgłoszonych do retransplantacji na kolejny przeszczep uzasadnia fakt stosowania metody serologicznej (CDC) do oceny immunizacji (PRA-CDC) i do próby krzyżowej (CM-CDC). Niedostateczna czułość metody serologicznej PRA-CDC, brak możliwości różnicowania ich klasy (PRA-CDC nie wykrywa klasy II HLA) i swoistości to przyczyny przyjęcia zachowawczej zasady unikania powtórzonych niezgodności HLA przy kolejnych przeszczepieniach.

Podsumowując, należy zaznaczyć, że pełen obraz poziomu zimmunizowania pacjenta zgłoszonego do transplantacji powinien obejmować oznaczenie klasy i swoistości przeciwciał anti-HLA w ich niskich mianach. Test PRA-CDC, który funkcjonuje w formie nie-

▶▶ Pełen obraz poziomu zimmunizowania pacjenta zgłoszonego do transplantacji powinien obejmować oznaczenie klasy i swoistości przeciwciał anti-HLA w ich niskich mianach◀◀

zmienionej od końca lat 60. XX wieku, nie dostarcza takich informacji. Brak możliwości różnicowania klasy przeciwciał anty HLA i ich swoistości sprawia, że diagnostyka oparta na PRA-CDC zmniejsza szansę chorych zgłoszonych do retransplantacji. Test PRA-CDC z uwagi na ograniczoną czułość oznaczenia (nie wykrywa niskich stężeń przeciwciał) nie nadaje się również do monitorowania alloprzeciwciał po przeszczepieniu w warunkach immunosupresji. W przypadku transplantacji od dawców żywych próba krzyżowa CM-CDC nie jest wystarczającym narzędziem do oceny ryzyka immunologicznego, tym samym nie pozwala na podjęcie bezpiecznej decyzji o transplantacji.

W związku z ograniczeniami obecnie stosowanej PRA-CDC wprowadzono do immunologicznej diagnostyki inne metody, które opisano poniżej. Umożliwiają one poznanie klasy i swoistości przeciwciał, a w konsekwencji precyzyjną ocenę stopnia immunizacji i ryzyka związanego z transplantacją i retransplantacją. Umożliwiają również monitorowanie odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu.

INNE METODY OCENY STOPNIA IMMUNIZACJI POTENCJALNYCH BIORCÓW

Porównując liczebność zimmunizowanych biorców w Polsce do danych światowych, zauważa się istotną różnicę: w Polsce zakwalifikowani biorcy PRA > 80% stanowią około 1,7%, w Stanach Zjednoczonych (UNOS) biorców takich jest 15,8% [14]. W Wielkiej Brytanii zimmunizowani (PRA > 10%) stanowią 41% listy oczekujących [15], w tym spośród zgłoszonych do retransplantacji aż 52% jest zimmunizowanych wysoko (PRA > 85%) [16]. Przyczyną niedoszacowania grupy zimmunizowanych w Polsce jest inny rodzaj technik służących ocenie immunizacji. Mimo powszechnie stosowanej wspólnej nazwy dla oceny immunizacji, za skrótem PRA kryją się różne metody o zupełnie innej czułości i właściwościach. W Polsce PRA oznacza wykorzystanie wcześniej opisanej metody serologicznej (CDC). W krajach Eurotransplantu (ET), Wielkiej Brytanii czy w Stanach Zjednoczonych (UNOS) stosuje się testy fazy stałej (SPA, *solid phase assay*) z wykorzystaniem fluorymetru przepływowego (Luminex), cytometru przepływowego czy techniki *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) z identyfikacją swoistości przeciwciał anty-HLA oraz rozróżnieniem ich klasy [15, 17, 18].

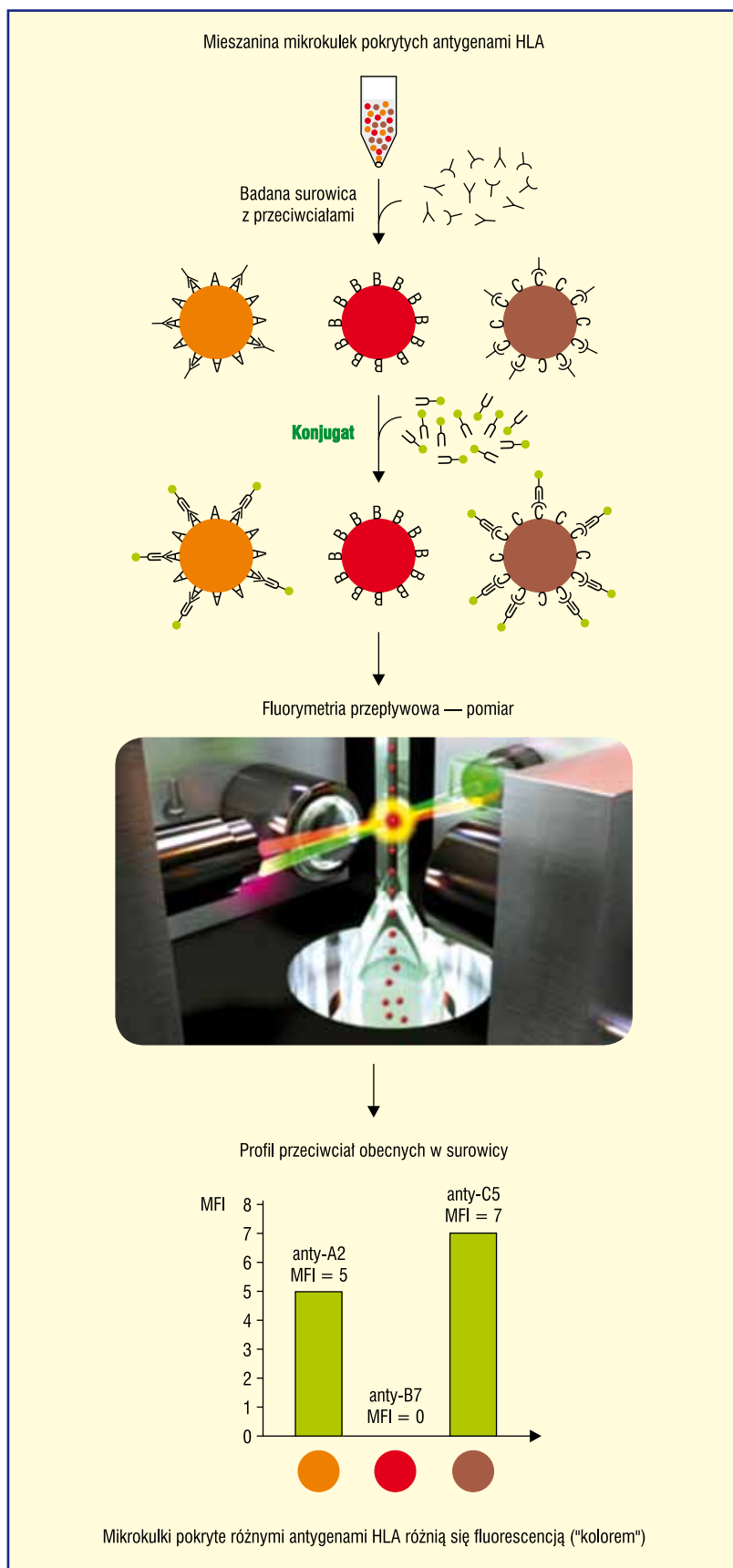
Najpowszechniej do identyfikacji przeciwciał jest używany fluorymetr przepływowy

Luminex. W metodzie wykorzystuje się polistyrenowe, fluorescencyjne mikrokulki pokryte oczyszczonymi antygenami HLA klasy I lub II. Indywidualna fluorescencja mikrokulek, którą wzbudza światło czerwonego lasera, umożliwia różnicowanie rodzaju antygeny HLA pokrywającego mikrokulkę. W jednej próbce można równocześnie badać do 100 różnych swoistości przeciwciał. Po związaniu przez mikrokulkę przeciwciała anty-HLA z badanej surowicy dodaje się antyludzkie przeciwciała IgG sprzężone z barwnikiem fluorescencyjnym — fikoerytryną. W ten sposób są znakowane mikrokulki, które związały przeciwciała z badanej surowicy o określonej swoistości i klasie.

Jeśli przeciwciała z surowicy zostanie związane, kompleks taki będzie wzbudzony światłem drugiego — zielonego lasera. Odpowiednie oprogramowanie przetwarza dane z detektorów fluorescencji i przedstawia wynik reakcji w postaci średniej fluorescencji MFI (*mean fluorescent intensity*) każdej mikrokulki opłaszczonej danym antygenem. Wartość MFI jest proporcjonalna do zawartości przeciwciała anty-HLA w badanej surowicy (ryc. 1). W zależności od rodzaju testu mikrokulki są pokryte jednym antygenem (testy typu *single antigen*) lub sześcioma antygenami (testy typu *screening* i PRA), co przekłada się na rozdzielczość testu. W pierwszej kolejności jest wykonywany **skrining anty-HLA IgG**, który daje odpowiedź, czy są obecne przeciwciała anty-HLA i w której klasie (I i /lub II) oraz czy są obecne przeciwciała endotelialne anty-MICA. Antygeny MICA obecne są na nabłonku kanalików nerkowych, a obecność przeciwciał anty-MICA może powodować odrzucanie [19]. Testy typu *screening* cechuje najniższa rozdzielczość. Ich zaletą są wysoka czułość i niski koszt. W razie pozytywnego wyniku jest zalecane wykonanie testu **typu PRA** w odpowiedniej klasie. Tu pojedyncza mikrokulka o danej fluorescencji jest opłaszczona 6 antygenami z danego locus klasy I (HLA-A, B, Cw) lub klasy II (DR, DQ, DP). Częstość populacyjna występowania poszczególnego antygeny w przybliżeniu pokrywa się z ilością mikrokulek opłaszczonych danym antygenem. Na podstawie tej zależności jest wyliczamy %PRA jako (%) mikrokulek określonych jako pozytywne. Test wykazuje pośrednią rozdzielczość, nie można na jego podstawie określić kompletu „bezpiecznych” dla biorcy antygenów, tak zwanych akceptowalnych niezgodności, ponieważ duża część z nich jest zamaskowana. Test służy do wyodrębnienia grupy wysoko zimmunizowanych bior-

▶▶W pierwszej kolejności jest wykonywany skrining anty-HLA IgG, który daje odpowiedź, czy są obecne przeciwciała anty-HLA i w której klasie oraz czy są obecne przeciwciała endotelialne anty-MICA◀◀

▶▶W razie pozytywnego wyniku jest zalecane wykonanie testu typu PRA w odpowiedniej klasie◀◀



Rycina 1. Uproszczony schemat wykrywania swoistości alloprzeciwciał anti-HLA metodą fluorymetrii przepływowej (test typu *Single Antigen*, klasa I). Objasnienie w tekście (źródło: na podstawie <http://media.progen.de>)

ców (PRA > 85%), u których należy wykonać test typu *single antigen* o najwyższej rozdzielczości, gdzie dana mikrokulka jest opłaszczona tylko jednym antygenem, przez co można opisać wszystkie istotne swoistości anti-HLA z danej klasy. Metoda *single antigen* znajduje główne zastosowanie w określaniu akceptowalnych niezgodności w programach dla wysoko zimmunizowanych oraz w monitorowaniu stężenia przeciwciał DSA-specyficznych po przeszczepieniu.

Oznaczenie swoistości anti-HLA pozwala na dalsze działania polegające na wprowadzeniu konkretnych swoistości anti-HLA w zakresie HLA-A, B, (Cw), DR, (DQ), (DP) do ogólnodostępnego programu: *calculated PRA* (cPRA) w Stanach Zjednoczonych (listy UNOS) [20, 21] lub *virtual PRA* (vPRA) w Eurotransplancie [22] (opisany poniżej). Wynik PRA jest kalkulowany w odniesieniu do częstości populacyjnej wprowadzonych swoistości anti-HLA. Częstość antygenów HLA jest określona w dużych grupach, na przykład vPRA opiera się na 4000 dawców oznaczonych w krajach Eurotransplantu. Poznanie konkretnych swoistości anti-HLA pozwala również na precyzyjne znalezienie dawcy dla wysoko immunizowanego biorcy. Na przykład wysoko zimmunizowany biorca z wynikiem cPRA lub vPRA > 80%, ale bez obecnych DSA wobec konkretnego dawcy, ma zapewnione przeszczepienie obligatoryjne.

Można się spodziewać, że przy zastosowaniu oznaczania swoistości przeciwciał liczebność biorców wysoko zimmunizowanych (vPRA > 80%) w Polsce byłaby 10-krotnie wyższa i przekraczałaby 200, co potwierdzają wyniki badań Ośrodka Gdańskiego [10].

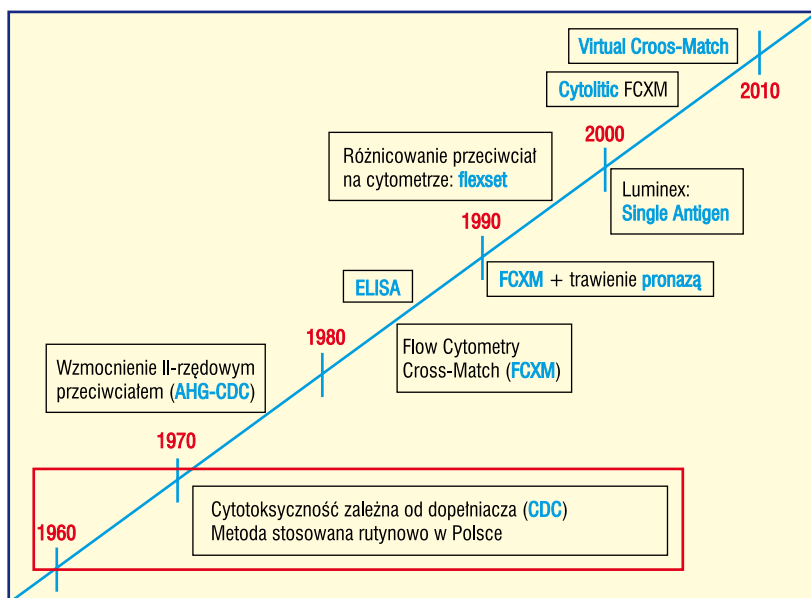
PROGRAMY DLA IMMUNIZOWANYCH BIORCÓW

Od wprowadzenia techniki CDC (lata 70. XX wieku) dokonał się ogromny postęp w zakresie oceny odpowiedzi humoralnej w rutynowej praktyce, możliwe stało się precyzyjne różnicowanie, które z przeciwciał anti-HLA mogą być szkodliwe dla biorcy (ryc. 2) [23]. W dobie możliwości określania swoistości przeciwciał powstało wiele programów dla wysoko zimmunizowanych biorców [24], takich jak Algorytm Uniwersytetu Emory w ramach list *United Network for Organ Sharing* (UNOS), Stany Zjednoczone [17], Program Akceptowalnych Niezgodności w ramach Eurotransplantu (ET-AMP) [25–27] z późniejszą modyfikacją uwzględniającą charakterystykę immunogennych epitopów antygenów HLA dla biorcy z użyciem oprogramowania HLAMatchma-

ker® [15, 28–30], oraz wytyczne dla detekcji i charakteryzacji klinicznie istotnych przeciwciał w allotransplantacjach w ramach Brytyjskiego Towarzystwa Transplantacyjnego i Immunogenetycznego (*British Transplantation Society* i *British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*) [31, 32]. W przypadku wymienionych programów do przeszczepiania dla zimmunizowanego chorego dochodzi tylko w przypadku znalezienia dawcy, wobec którego biorca nie wytwarza przeciwciał. W przypadku chorych wysoko zimmunizowanych jest to przeszczep obligatoryjny. Dane dotyczące akceptowalnych niezgodności HLA są wprowadzane i bieżąco aktualizowane w programach komputerowych służących do alokacji narządów (analogicznych z polskim programem Krajowych Rejestrów Transplantacyjnych). Każdy biorca posiada też pełną informację dotyczącą swoistości wykrytych przeciwciał. Nie ma natomiast zgodności co do poziomu odcięcia dla wykrywanych przeciwciał. Rozpiętość fluorescencji (MFI) uznawanej za pozytywną waha się tu w granicach 500–3000 MFI. W obliczu częstości występowania przeciwciał anty-Cw, DQ, DP ewoluuje również zakres doboru tkankowego na podstawie tych antygenów. Programy bezpiecznego przeszczepiania zimmunizowanych są stale doskonalone i różnią się w poszczególnych krajach. Wpływają na to obszar geograficzny, który obejmuje dany program, zagęszczenie ludności oraz udział przeszczepów od żywych dawców. Wspólnym mianownikiem tych programów jest przeżycie przeszczepu u wysoko zimmunizowanego biorcy bez przeciwciał DSA porównywalne z przeżyciem przeszczepu u niezimmunizowanych, możliwość stosowania odpowiedniego (niekoniecznie bardzo silnego) protokołu immunosupresji i wbrew przewidywaniom zwiększony dostęp do przeszczepu dla biorcy zimmunizowanego. Prawie 60% pacjentów wysoko zimmunizowanych otrzymało przeszczep w ciągu 2 lat od wprowadzenia programu ET-AMP. Dla porównania, według wcześniejszych zasad (KAS-ET: *Kidney Allocation System, Eurotransplant*), biorcy ci mieliby tylko 20% szans na przeszczepienie w tym samym czasie [26].

VIRTUAL CROSS-MATCH

Dzięki wysokiej przewidywalności wyniku próby krzyżowej na podstawie wcześniejszego określenia swoistości anty-HLA dopuszczono w rutynowym stosowaniu tak zwany *virtual cross-match*, czyli dobór nerki dla pacjenta wysoko zimmunizowanego (cPRA > 80%) na podstawie braku przeciwciał anty-HLA prze-



Rycina 2. Ewolucja immunologicznej diagnostyki oceny odpowiedzi humoralnej w rutynowej praktyce. W ramce zaznaczono metodę stosowaną w Polsce (źródło: na podstawie [23])

ciwko zgłoszonemu dawcy [18, 32–34]. Co więcej, w przypadku pacjentów niezimmunizowanych (na podstawie skriningu anty-HLA Luminex) dopuszcza się dobór na podstawie pozostałych, obowiązujących w danym kraju zasad alokacji z wyłączeniem konieczności przeprowadzania prospektywnej próby krzyżowej z dawcą [32]. Oprócz dokładnej charakterystyki wytwarzanych przez biorcę przeciwciał kluczem dla powodzenia aplikacji *virtual cross-match* jest rozszerzenie zakresu doboru tkankowego o HLA-Cw, DQ oraz DP. Obecnie dobór w Polsce jest prowadzony w zakresie HLA-A, B, DR. Na przykład aplikacja *virtual cross-match* w Stanach Zjednoczonych prowadzona w ramach programu przeszczepień od żywych dawców poprawnie przewidywała wynik FCXM tylko w 43% w 2009 roku. Pod koniec 2010 roku zwiększyła się do 91% dzięki rozszerzeniu zakresu typowania dawcy i biorcy o locus HLA-Cw, DQ, DP oraz ujednoczeniu zasad określania nieakceptowanych niezgodności w cPRA [34–36].

WPLYW NA PRZEŻYCIE PRZESZCZEPU OBECNOŚCI SPECYFICZNYCH WOBEC DAWCY PRZECIWCIAŁ ANTY-HLA PRZED TRANSPLANTACJĄ

Mimo upływu już prawie 8 lat od wprowadzenia wysoko czułych testów fazy stałej do algorytmów diagnostycznych ich wpływ na powodzenie transplantacji szczególnie w niskich mianach wciąż jest szeroko dyskutowany

►► Dane dotyczące akceptowalnych niezgodności HLA są wprowadzane i bieżąco aktualizowane w programach komputerowych służących do alokacji narządów ◀◀

[37–39]. Przeszkodę stanowi brak możliwości różnicowania zależnej od dopełniacza lityczności przeciwciał. Obecnie problem wydaje się rozwiązany przez możliwość zastosowania przeciwciała anti-C1q [40] lub anti-C4d [41], skierowanych przeciwko składowym dopełniacza wykrywalnych tylko w razie obecności podklas IgG1 oraz IgG3 alloprzeciwciał anti-HLA. Różnicowanie lityczności alloprzeciwciał DSA jest możliwe też podczas próby krzyżowej metodą cytometrii przepływowej z modyfikacją pozwalającą na identyfikację komórek uszkodzonych pod wpływem przeciwciał wiążących dopełniacz [42, 43]. Kolejnym problemem był poziom odcięcia przyjmowany dla wysoko czułych testów typu *single antigen* i definicja nieakceptowanej niezgodności HLA. W ostatnim czasie ukazało się wiele badań z tego zakresu [44–46]. Na uwagę zasługują wyniki ostatniej pracy Lefaucheur i wsp. [47]. W grupie 402 biorców przeszczepu w badaniach retrospektywnych obejmujących 8-letni przedział czasowy określili różnice w czasie przeżycia przeszczepu, częstość incydentów AMR w odniesieniu do poziomu (MFI) wykrywalnych przeciwciał o swoistości DSA. Przed przeszczepieniem w surowicy historycznej o maksymalnym indeksie PRA, preformowane DSA przeciwciała były wykrywalne u 70,3% (n = 83). Wśród biorców DSA(+) przeżycie przeszczepu było zasadniczo krótsze: w pierwszym roku o 10% (95 v. 85%), w 5. roku różnica wynosiła 18% (89,2 v. 71,2%), w 8. aż 22% (83,6 v. 60,8%). Co więcej, sama immunizacja nie stanowiła czynnika ryzyka, pod warunkiem że wśród przeciwciał nie było DSA-specyficznych. Na gorsze wyniki przeżycia przeszczepu nie miała wpływu klasa przeciwciał DSA-specyficznych; AMR w 40% poprzedzała obecność DSA, jednak nawet przy braku incydentu AMR przeżycie przeszczepu było krótsze w grupie DSA(+): 69,5 v. 84,4%. Na wartość prognostyczną silnie oddziaływał poziom DSA wyrażony jako średnia fluorescencja MFI. Wartości DSA > 3000 MFI wiązały się istotnie częściej z incydentami AMR oraz przeżyciem przeszczepu w każdym z badanych punktów czasowych. U 36,4% biorców z potwierdzonym AMR stwierdzono przeciwciała DSA w ilości przekraczającej 3000 MFI. Przy poziomach DSA w granicach 465–3000 MFI częstość AMR wynosiła 18,7%, a poniżej 465 MFI AMR zaobserwowano tylko w 0,9%.

Na podstawie powyższych danych oraz doświadczeń krajów już korzystających z wyników identyfikacji alloprzeciwciał na rycinie

3 zaprezentowano algorytm ich identyfikacji u biorców zgłoszonych do przeszczepu.

PRZECIWCIAŁA ANTY-HLA PO PRZESZCZEPIENIU

Przed wprowadzeniem wysoko czułych technik oceny specyficzności przeciwciał anti-HLA monitorowanie odpowiedzi humoralnej nie było możliwe, gdyż w warunkach immunosupresji czułość metody serologicznej (CDC) była niewystarczająca. W praktyce, w razie pogorszenia funkcji nerki, czego jedną z przyczyn może być odrzucanie wykonuje się biopsję nerki [48]. Tymczasem takie objawy, jak wzrost kreatyniny, pogorszenie kontroli ciśnienia tętniczego czy pojawienie się białkomoczu, mogą już odpowiadać znacznemu uszkodzeniu tkanki nerkowej. Ponadto około 1/3 potwierdzonych histologicznie epizodów ostrego odrzucania przebiega subklinicznie, to znaczy przy prawidłowych wartościach kreatyniny i braku innych objawów klinicznych [49]. Przyjęte postępowanie sprawdza się w utrzymaniu przeszczepu w krótkim okresie, gdzie ostre odrzucanie stosunkowo łatwo odwrócić, jednak gdy proces jest subkliniczny i przebiega przewlekłe, łatwo przeoczyć moment, gdy jeszcze można zastosować skuteczne leczenie lub zwiększyć natężenie immunosupresji, aby zapobiec dalszemu tworzeniu się przeciwciał przeciw antygenom nerki [50]. Monitorowanie obecności przeciwciał po przeszczepieniu wciąż nie jest rutynowym działaniem, ale obszarem intensywnie badanym [51, 52]. Szczególnie istotna jest produkcja *de novo* przeciwciał anti-HLA, nie tylko DSA-specyficznych. W efekcie badań prowadzonych wspólnie przez ponad 20 ośrodków w ramach 13th *International Histocompatibility Workshop* zbadano łącznie 1329 biorców przeszczepu nerki bez wykrywalnych przeciwciał anti-HLA przed przeszczepem [53]. Przeciwciała anti-HLA *de novo* wystąpiły u 25,7% biorców, przy czym w zależności od metody (ELISA, cytometria, Luminex) ich wykrywalność wahała się od 15,9% (ELISA) do 25,7% (Luminex). Dodatkowo, u 5,3% biorców pojawiły się przeciwciała endotelialne typu anti-MIC. Większość anti-HLA(+) biorców wytwarzała przeciwciała w pierwszym roku i utrzymywała je na podobnym poziomie. Roczne przeżycie przeszczepu u biorców, którzy wytworzyli *de novo* przeciwciała, było niższe o 3% (96% v. 93%) (przeszczep od dawcy zmarłego) i 6% (żywy dawca). Czteroletnie przeżycie przeszczepów *de novo* anti-HLA(+) wyniosło 58% (n = 158),

w porównaniu z 81% anty-HLA(-). *De novo* obecność przeciwciał anty-MIC wiązała się z gorszym przeżyciem nerki (o 9%). Najwydatniej na przeżycie przeszczepu wpływają przeciwciała anty-HLA o swoistości DSA obecne wśród innych swoistości wytworzonych *de novo*. Już w pierwszym roku przeżycie przeszczepu wynosiło 64% v. 92%. *De novo* DSA przeciwciała wykryto jednak tylko u 12 z 74 biorców anty-HLA(+). **Na niską wykrywalność DSA-specyficznych przeciwciał może mieć wpływ ich adsorpcja w tkance przeszczepu.** W badaniach retrospektywnych u 53 pacjentów z niewydolnością przeszczepionej nerki, a potem nefrektomią, w okresie poprzyszczepowym zaledwie u 16% były obecne przeciwciała swoiste dla HLA dawcy (DSA), natomiast liczba biorców z przeciwciałami anty-HLA nie-DSA wzrosła w tym okresie z 38% do 87%. Liczba biorców DSA-pozytywnych wzrosła wydatnie dopiero po nefrektomii (z 16 do 84%) [54]. Podobne obserwacje poczynili także wcześniej Adeyi i wsp. [55]. Na pytanie o wzrost po przeszczepieniu liczby zimmunizowanych przy braku u większości przeciwciał DSA-specyficznych odpowiadają niezależnie Rosenberg i wsp. [56] oraz Mao i wsp. [57]. Zaobserwowano, że panel swoistości aloprzeciwciał HLA nie-DSA wytwarzany *de novo* po przeszczepieniu ściśle odpowiada immunogennym epitopom dla biorcy w relacji do danego dawcy. Immunogenność graftu dla biorcy określano za pomocą programu Duquesnoya HLAMatchmaker® [58]. **Może to wskazywać, że wszystkie pojawiające się *de novo* przeciwciała anty-HLA (niekoniecznie DSA-specyficzne) lub ich nasilenie jest wykładnikiem aktywacji odpowiedzi humoralnej i może być zagrożeniem dla przeszczepu.** Dlatego tak ważne jest ustalenie algorytmu monitorowania przeciwciał anty-HLA po przeszczepieniu, dające szansę na odniesienie bieżącego wyniku badania do poprzednich. Jednocześnie brak przeciwciał DSA-specyficznych w panelu wykrywanych przeciwciał anty-HLA po przeszczepieniu nie musi oznaczać braku ich produkcji.

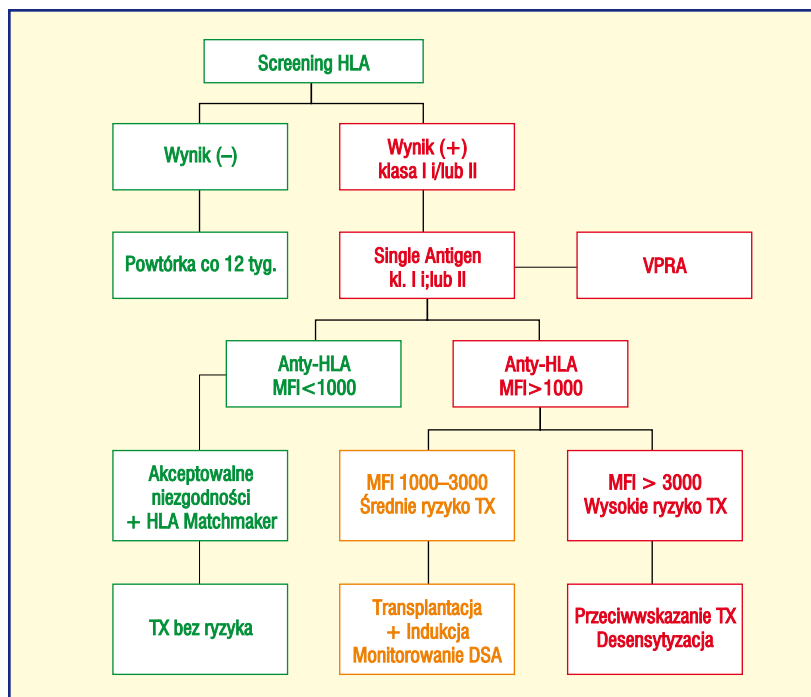
PODSUMOWANIE

Ocena ryzyka immunologicznego prowadzona na podstawie metod serologicznych (PRA-CDC) jest niewystarczająca i odbiega od standardów światowych. Główne wady tych metod to: niska czułość, brak możliwości różnicowania klasy przeciwciał oraz ich swoistości

umożliwiających wskazanie przeciwciał DSA-specyficznych. Metody serologiczne stosowane w próbie krzyżowej (CM-CDC) są czulsze, głównie z uwagi na inny rodzaj matrycy HLA (węzły chłonne dawcy). Jednak w przypadku przeszczepów od żywych dawców, gdzie matrycą pozostają limfocyty krwi obwodowej dawcy, metoda jest niewystarczająca. W takich przypadkach decyzja o transplantacji powinna być oparta na wyniku próby krzyżowej wykonanej metodą cytometrii przepływowej z limfocytami T oraz B (FCXM); FCXM może stanowić także cenny wskaźnik ryzyka zagrożenia odrzuceniem u biorców przeszczepu od dawcy zmarłego. W takim przypadku może być wykonywana w krótkim czasie po transplantacji.

Włączenie do standardu diagnostycznego wysoko czułych metod umożliwiających dokładną identyfikację jakościową i ilościową alloprzeciwciał u zimmunizowanych chorych oczekujących na przeszczepienie narządu unaczynionego pozwoliłoby na identyfikację chorych z podziałem na grupy niskiego, średniego i wysokiego ryzyka immunologicznego. W pracy przedstawiono propozycję zmodyfikowanego algorytmu doboru do przeszczepu (ryc. 3). Dokładna ocena alloprzeciwciał anty-HLA oraz rozszerzenie zakresu typowania dawcy i biorcy o antygeny HLA-Cw, DQ, DP pozwo-

▶▶ Na niską wykrywalność DSA-specyficznych przeciwciał może mieć wpływ ich adsorpcja w tkance przeszczepu ◀◀



Rycina 3. Proponowany algorytm oceny immunizacji u pacjentów zgłoszonych do przeszczepu nerki
Anand S.S., Yusuf S. Oral anticoagulants in patients with coronary artery disease. J. Am. Coll. Cardiol. 2003; 41: 62S-69S.

liły także w niektórych krajach na wprowadzenie tak zwanego *virtual cross-match*, co oprócz usprawnień logistycznych świadczy o wysokiej wiarygodności testów identyfikujących alloprzeciwciała.

Przedtransplantacyjna identyfikacja pacjentów, zwłaszcza średniego i wysokiego ryzyka, byłaby wskazówką dla klinicysty, decydującą o przeszczepieniu i ustaleniu protokołu immunosupresji.

Korzyści z rutynowego stosowania przedstawionych badań diagnostycznych i proponowanego algorytmu dotyczyłyby:

- właściwego /lepszego doboru immunologicznego (realna ocena immunizacji biorców w klasie I i II HLA);

- możliwości oceny immunogenności wytypowanej pary w programie Eurotransplantu HLA-Matchmaker);
- zwiększenia dostępu do transplantacji (dodatkowe punkty dla chorych z grupy określonej w PRA-CDC jako słabo zimmunizowani);
- zwiększenia szansy pacjentów zgłoszonych do retransplantacji (ustalenie braku alloprzeciwciał, pomimo niezgodności (MM) z poprzednim dawcą).

Ważnym aspektem jest także potransplantacyjne monitorowanie pojawiania się *de novo* przeciwciał anty-HLA, a zwłaszcza DSA. Badania takie pozwoliłyby podejmować szybsze decyzje o modyfikacji leczenia, szczególnie w przypadku procesów subklinicznych.

STRESZCZENIE

Mimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w zakresie stosowanych leków immunosupresyjnych, wciąż jedną z przyczyn utraty nerki jest odrzucanie. Szczególnie zagrożeni tym powikłaniem są biorcy zimmunizowani, którzy w większym stopniu niż biorcy niezimmunizowani są narażeni na ryzyko odrzucania humoralnego. Ten typ odrzucania może wystąpić zarówno we wczesnym okresie po transplantacji, jak i być przyczyną utraty nerki z przyczyn immunologicznych w późniejszym okresie. Przekłada się to na znacznie gorsze wyniki transplantacji w tej grupie chorych.

Rozwiązania nowoczesnej diagnostyki immunologicznej mogą przynieść istotne korzyści zarówno na etapie doboru do przeszczepu, jak i monitorowania odpowiedzi po transplantacji. W pracy przedstawiono metody pomiaru i oceny immunizacji na podstawie identyfikacji swoistości alloprzeciwciał anty-HLA i ich wykorzystanie na etapie:

- poprawy doboru do przeszczepienia — za pomocą obecnych metod możliwe jest określenie u zimmunizowanego biorcy kompletnej grupy „bezpiecznych” antygenów HLA, wobec których nie wykrywa się u niego przeciwciał. Oznaczenie swoistości przeciwciał anty-HLA jest też podstawą dla nowej, czulszej

i dokładniejszej metody oceny immunizacji, tak zwanej *virtual PRA*, czyli określeniu częstości prawdopodobieństwa dodatniej próby krzyżowej wobec reprezentatywnej populacji potencjalnych dawców. Precyzyjna identyfikacja swoistości przeciwciał anty-HLA w połączeniu z rozszerzeniem zakresu typowania antygenów HLA u dawców i biorców umożliwia wprowadzenie tak zwanego *virtual cross-match*, który jest oparty na najlepszym doborze HLA przy jednoczesnym bezwzględny unikaniu antygenów HLA dawcy, wobec którego biorca posiada przeciwciała;

- monitorowania odpowiedzi humoralnej po przeszczepieniu jako identyfikacja przeciwciał specyficznych dla HLA dawcy, tak zwane *donor specific antibody*.

Ocena immunologiczna przed przeszczepieniem i monitorowanie po przeszczepieniu na podstawie nowoczesnej diagnostyki immunologicznej umożliwia uzyskanie wyników porównywalnych z grupą biorców niezimmunizowanych.

Forum Nefrologiczne 2011, tom 4, nr 4, 320–330

Słowa kluczowe: transplantacja nerki, alloprzeciwciała anty-HLA, odrzucanie zależne od przeciwciał, techniki Luminex, testy LSA (*Luminex single antigen*), DSA (*donor specific antibodies*)

Piśmiennictwo

1. Opelz G. Recipient age, rejection and HLA matching. Collaborative Transplant Study, Newsletter 2011; 1: 1–3.
2. Boratyńska M., Lao M., Rowiński W. (red.). Przewlekła niewydolność alloprzeszczepu. Transplantologia kliniczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004; 707–720.
3. Blattman J.N., Antia R., Sourdive D.J. i wsp. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. J. Exp. Med. 2002; 195: 657–664.
4. Suchin E.J., Langmuir P.B., Palmer E., Sayegh M.H., Wells A.D., Turka L.A. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. J. Immunol. 2001; 166: 973–981.

5. Campos M., Godson D.L. The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune response. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33: 655–661.
6. Adams A.B., Williams M.A., Jones T.R. i wsp. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* 2003; 111 (12): 1887–1895.
7. Lewandowska D., Hermanowicz M., Hattiński R. i wsp. Krajowa Lista Oczekujących na przeszczepienie. *Poltransplant Biuletyn Informacyjny* 2011; 1 (19): 17.
8. Kaliciński P. Zasady alokacji nerek. *Poltransplant Biuletyn Informacyjny* 2007; 1 (15): 53–54.
9. Ilham M.A., Winkler S., Coates E., Rizzello A., Rees T.J., Asderakis A. Clinical significance of a positive flow crossmatch on the outcomes of cadaveric renal transplants. *Transplant. Proc.* 2008; 40 (6): 1839–1843.
10. Zielińska H., Moszkowska G., Zieliński M., Dębska-Ślizień A., Rutkowski B., Trzonkowski P. Algorithm to Manage Highly Sensitized Kidney Transplant Recipients in Poland. *Transplant Proc.* 2011; 43 (8): 2903–2907.
11. Goodman R.S., Taylor C.J., O'Rourke C.M., Lynch A., Bradley J.A., Key T. Utility of HLA-Matchmaker and single-antigen HLA-antibody detection beads for identification of acceptable mismatches in highly sensitized patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation* 2006; 81 (9): 1331–1336.
12. Kosmoliaptsis V., Chaudhry A.N., Sharples L.D. i wsp. Predicting HLA class I alloantigen immunogenicity from the number and physicochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 2009; 88 (6): 791–798.
13. Kosmoliaptsis V., Sharples L.D., Chaudhry A.N., Halsall D.J., Bradley J.A., Taylor C.J. Predicting HLA class II alloantigen immunogenicity from the number and physicochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 2011; 91 (2): 183–190.
14. Cecka J.M., Kucheryavaya A.Y., Reinsmoen N.L., Leffell M.S. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. *Am. J. Transplant.* 2011; 11 (4): 719–724.
15. Duquesnoy R.J., Witvliet M., Doxiadis I.I., de Fijter H., Claas F.H. HLA-Matchmaker- based strategy to identify acceptable HLA-Class I mismatches for highly sensitized kidney transplant candidates. *Transpl. Int.* 2004; 17: 22–30.
16. Gupta A., Sinnott P. Clinical relevance of pretransplant human leukocyte antigen donor-specific antibodies in renal patients waiting for a transplant: a risk factor. *Hum. Immunol.* 2009; 70 (8): 618–622.
17. Bray R.A., Nolen J.D.L., Larsen C. i wsp. Transplanting the highly sensitized patient: the Emory Algorithm. *Am. J. Transplant.* 2006; 6: 2307–2315.
18. Nikaein A., Cheriak W., Nelson K. i wsp. Organ procurement and transplantation network/united network for organ sharing histocompatibility committee collaborative study to evaluate prediction of crossmatch results in highly sensitized patients. *Transplantation* 2009; 87 (4): 557–562.
19. Mizutani K., Terasaki P., Bignon J.D. i wsp. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum. Immunol.* 2006; 67 (9): 683–691.
20. Calculated PRA (serwis UNOS) <http://optn.transplant.hrsa.gov/resources/allocationcalculators.asp> (20.11.2011)
21. Cecka J.M. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am. J. Transplant.* 2010; 10 (1): 26–29.
22. Virtual PRA (serwis Eurotransplantu) <http://www.etrl.org/etrlpra/webform1.aspx> (20.11.2011)
23. Gebel H.M., Bray R.A. The evolution and clinical impact of human leukocyte antigen technology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2010; 19 (6): 598–602.
24. Zielińska H., Zieliński M., Moszkowska G. i wsp. Diagnostic value of specific anti-HLA alloantibodies before and after renal transplantation. *Programs for highly sensitized. Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009; 63: 435–448.
25. Eurotransplant Reference Laboratory — acceptable mismatch program <http://etrl.eurotransplant.nl/cms/index.php?page=amprogram> (20.11.2011)
26. Claas F.H.J., Witvliet M.D., Duquesnoy R.J., Persijn G.G., Doxiadis I.I.N. The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome. *Transplantation* 2004; 78: 190–193.
27. Claas F.H., Rahmel A., Doxiadis I.I. Enhanced kidney allocation to highly sensitized patients by the acceptable mismatch program. *Transplantation* 2009; 88 (4): 447–452.
28. Duquesnoy R.J., Howe J., Takemoto S. HLA-Matchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. An alternative strategy to increase the number of compatible donors for highly sensitized patients. *Transplantation* 2003; (75) 6: 889–897.
29. Duquesnoy R.J., Marrari M. HLA-Matchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination II. Verification of the algorithm and determination of the relative immunogenicity of amino acid triplet-defined epitopes. *Hum. Immunol.* 2002; 63: 353–363.
30. Duquesnoy R.J., Takemoto S., De Lange P. i wsp. HLA-Matchmaker: A molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A, B amino acid triplet level on kidney transplant survival. *Transplantation* 2003; 75 (6): 884–889.
31. Howell W.M., Harmer A., Briggs D. i wsp. Guidelines for detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. *Intern. J. Immunogen.* 2010; 37: 435–437.
32. A collaborative publication by: British Society for Histocompatibility & Immunogenetics and British Transplantation Society, Publication at www.bts.org.uk & www.bshi.org.uk, May 2010 [Strona 12: możliwość przeszczepu niezimmizowanych oczekujących na podstawie virtual cross-match]
33. Zachary A.A., Sholander J.T., Houp J.A., Leffell M.S. Using real data for a virtual crossmatch. *Hum. Immunol.* 2009; 70 (8): 574–579.
34. Zasady alokacji UNOS z 29.06.2011 http://optn.transplant.hrsa.gov/PoliciesandBylaws2/policies/pdfs/policy_7.pdf część 3.5.3.3 (sharing) oraz 3.5.11.3: (Sensitized Wait List Candidates — Calculated PRA (CPRA)).
35. Veale J., Hil G. National Kidney Registry: 213 transplants in three years. *Clin. Transpl.* 2010: 333–344. UCLA Department of Urology, USA.
36. Tambura A.R., Ramona D.S., Kaufman D.B. i wsp. Perception versus reality? Virtual crossmatch — how to overcome some of the technical and logistic limitations. *Am. J. Transplant.* 2009; 9: 1886–1893.
37. Süsal C., Ovens J., Mahmoud K. i wsp. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive luminex single-antigen testing: a collaborative transplant study report. *Transplantation* 2011; 91 (8): 883–887.
38. Morath C., Opelz G., Zeier M., Süsal C. Kidney Transplantation for High-Risk Sensitized Patients — The “Heidelberg Algorithm”. *Transplantation Proceedings* 2011; 43: 801–804.

39. Vlad G., Ho E.K., Vasilescu E.R. i wsp. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. *Hum. Immunol.* 2009; 70: 589–594.
40. Yabu J.M., Higgins J.P., Chen G., Sequeira F., Busque S., Tyan D.B. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation* 2011; 91 (3): 342–347.
41. Bartel G., Wahrmann M., Exner M. i wsp. In vitro detection of C4d-fixing HLA alloantibodies: associations with capillary C4d deposition in kidney allografts. *Am. J. Transplant.* 2008; 8 (1): 41–49.
42. Zielinska H., Zielinski M., Moszkowska G., Debska-Slizien A., Rutkowski B., Trzonkowski P. Modified flow cytometry cross match method detecting cytolytic anti-donor antibodies as a potential way to distinguish clinically relevant/harmless antibodies. *Tissue Antigens* 2011; 77: 460.
43. Saw C.L., Bray R.A., Gebel H.M. Cytotoxicity and antibody binding by flow cytometry: a single assay to simultaneously assess two parameters. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2008; 74 (5): 287–294.
44. Mujtaba M.A., Goggins W., Lobashevsky A. i wsp. The strength of donor-specific antibody is a more reliable predictor of antibody-mediated rejection than flow cytometry crossmatch analysis in desensitized kidney recipients. *Clin. Transplant.* 2011; 25 (1): E96–102.
45. Loupy A., Suberbielle-Boissel C., Hill G.S. i wsp. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am. J. Transplant.* 2009; 9 (11): 2561–2570.
46. Gloor J.M., Winters J.L., Cornell L.D. i wsp. Baseline donor-specific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 2010; 10 (3): 582–589.
47. Lefaucheur C., Loupy A., Hill G.S. i wsp. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21 (8): 1398–1406.
48. Mannon R.B., Kirk A.D. Beyond histology: novel tools to diagnose allograft dysfunction. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 1: 358–366.
49. Rush D. Protocol transplant biopsies: an underutilized tool in kidney transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 1: 138–143.
50. Tantravahi J., Womer K.L., Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu. Rev. Med.* 2007; 58: 369–385.
51. Mao Q., Terasaki P.I., Cai J., Briley K., Catrou P., Haisch C., Rebellato L. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *Am. J. Transplant.* 2007; 7 (4): 864–871.
52. Everly M.J., Terasaki P.I. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Hum. Immunol.* 2009; 70 (8): 655–659.
53. Terasaki P.I., Ozawa M., Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am. J. Transplant.* 2007; 7 (2): 408–415.
54. Billen E.V., Christiaans M.H., Lee J., van den Berg-Loonen E.M. Donor-directed HLA antibodies before and after transplantectomy detected by the luminex single antigen assay. *Transplantation* 2009; 87 (4): 563–569.
55. Adeyi O.A., Girnita A.L., Howe J. i wsp. Serum analysis after transplant nephrectomy reveals restricted antibody specificity patterns against structurally defined HLA class I mismatches. *Transpl. Immunol.* 2005; 14 (1): 53–62.
56. Rosenberg J.C., Berri R., Jackowski M., Levis D., Nehlsen-Cannarella S., Oh H. Multi-array antibody screening in detecting antibodies to mismatched HLA in patients awaiting a second transplant. *Transplant. Proc.* 2006; 38 (10): 3393–3395.
57. Mao Q., Terasaki P.I., Cai J., El-Awar N., Rebellato L. Analysis of HLA class I specific antibodies in patients with failed allografts. *Transplantation* 2007; 15; 83 (1): 54–61.
58. Duquesnoy R. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Hum. Immunol.* 2002; 63: 339.