



VIA MEDICA

www.fn.viamedica.pl

Hanna Zielińska¹, Magdalena Jankowska², Maciej Zieliński¹, Grażyna Moszkowska¹,
Alicja Dębska-Ślizień², Bolesław Rutkowski², Piotr Trzonkowski¹¹Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny²Katedra i Klinika Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Gdański Uniwersytet Medyczny

Zależne od przeciwciał odrzucanie aloprzeszczepu nerkowego — opis przypadku

Antibody-mediated renal allograft rejection — a case study

ABSTRACT

Acute humoral rejection is one of the most common causes of failure or shorten the survival of the graft survival. The problem affects not only highly sensitized patients with a high percentage of PRA-CDC, but a wide group of recipients with low levels of anti-HLA antibodies, undetectable by routine serological tests. These antibodies, even at low titers indicate the presence of memory cells, which through clonal proliferation can quickly damage the graft. Presented case report concerns on sensitized patient (PRA = 16%), who within 6 months of transplantation lost a kidney as a result of re-

jection-dependent antibodies. Type of rejection was confirmed by the newly available diagnostic tests: Luminex Single Antigen (LSA) and donor specific antibodies cross-match (DSA-XM). Additionally immunogenicity of donor-recipient pairs was evaluated by the HLA Matchmaker software. Utilization of modern diagnostics with the use of these tests may improve the therapeutic management and increase its effectiveness.

Forum Nefrologiczne 2011, vol. 4, no 4, 347–355

Key words: kidney transplantation, antibody dependent kidney rejection, anti-HLA alloantibodies, LSA, DSA, DSA-XM, luminex technique, PRA-CDC

WSTĘP

Pacjenci zimmunizowani stanowią trudną grupę biorców, u których powikłania w postaci ostrego odrzucania, jak i długość przeżycia przeszczepu odbiegają znacznie od wyników przeszczepiania pacjentów nieobarczonych tym czynnikiem ryzyka [1]. Stosowana rutynowo metoda cytotoxyczności zależnej od komplementu z panelem dawców (PRA-CDC, *panel reactive antibodies — complement dependent cytotoxicity*) jest niewystarczająca do prawidłowej oceny stanu immunizowania chorego przed przeszczepem oraz ustalenia dawcy o optymalnej zgodności tkankowej. Wydaje się też, że stosowanie różnych metod oceny immunizacji powoduje głębokie niedoszacowanie liczby zimmunizowanych w Polsce [2]. Niemożliwe jest

również śledzenie humoralnej odpowiedzi biorcy na przeszczepioną tkankę i, co za tym idzie, odpowiednie modyfikowanie leczenia immunosupresyjnego.

Na podstawie dostępnych nowoczesnych technologii powstały w ostatnich latach wysoko-czułe testy umożliwiające dokładną ocenę jakościową (specyficzności przeciwciał) i ilościową przeciwciał anty-HLA (*human leukocyte antigens*) [3–5]. Pozwoliły one na wprowadzenie dla tej grupy chorych specjalnych programów doboru immunologicznego. Zastosowanie algorytmów, takich jak *Eurotransplant Acceptable Mismatch Programm* (ET-AMP) czy UNOS-algorytm Uniwersytetu Emory znacząco obniżyło ryzyko związane z ostrym humoralnym odrzucaniem, zwiększyło dostęp immunizowanych biorców do przeszczepu i przedłużyło prze-

Adres do korespondencji:
mgr Hanna Zielińska
Zakład Immunologii Klinicznej
i Transplantologii GUMed
ul. Dębinki 7, 80–952 Gdańsk
tel.: (58) 349–21–89
e-mail: hzielińska@gumed.edu.pl

▶▶W Polsce ocena stopnia uczulenia potencjalnego biorcy przed przeszczepem rutynowo oceniana jest metodą serologiczną w teście mikrolimfocytotoksycznym (PRA-CDC)◀◀

życie przeszczepów. Podstawową zaletą tych programów jest właściwa ocena stanu immunizacji biorcy przed przeszczepem, umożliwiająca dobór dawcy o odpowiednich antygenach HLA, zwłaszcza w zakresie akceptowalnych dla biorcy niezgodności HLA, a także pozwalająca monitorować pojawianie się po przeszczepieniu aloprzeciwciał anti-HLA *de novo*. **Akceptowalne niezgodności (AM, *acceptable mismatch*) stanowią grupę antygenów HLA, wobec których biorca nie posiada przeciwciał oraz antygeny HLA nieimmunogenne dla biorcy w danej parze dawca–biorca.** Akceptowalne niezgodności określa się w wysokorozdzielczych testach typu *luminex single antigen* (LSA) na podstawie braku reakcji przeciwciał biorcy z określoną grupą antygenów. W Eutotransplancie do ustalenia AM stosuje się dodatkowo program autorstwa Duquesnoya służący ocenie immunogenności HLA pary dawca–biorca HLA Matchmaker® [6].

W ramach stosowanych w Polsce zasad alokacji [7], ocena stopnia uczulenia potencjalnego biorcy przed przeszczepem rutynowo oceniana jest metodą serologiczną w teście mikrolimfocytotoksycznym (PRA-CDC). **Test mikrolimfocytotoksyczny, stosowany też w próbie krzyżowej pomiędzy dawcą a biorcą przed potencjalną transplantacją, wykrywa przeciwciała tylko w wysokich mianach, których ilość wystarczająca jest do wywołania u biorcy odrzucania nadostrego.** Test ten eliminuje wstępnie biorców, u których w przypadku transplantacji groziłoby nadostre odrzucanie. Test mikrolimfocytotoksyczny ma jednak ograniczoną wartość w ocenie immunizacji przed przeszczepem i monitorowaniu odpowiedzi na aloantygeny po przeszczepie, czyli nie eliminuje biorców z ryzykiem późniejszego humoralnego odrzucania.

W ostatnich latach dokonał się ogromny postęp w technikach oceny immunizacji biorców zarówno w zakresie czułości wykrywania aloprzeciwciał, jak i możliwości określania ich swoistości (testy LSA) i wiązania z antygenami dawcy (DSA-XM, *donor specific antibodies cross-match*). Główne korzyści z zastosowania tych testów to:

- wykrywanie obecności przeciwciał anti-HLA DSA w ilościach niewykrywalnych w serologicznej próbie krzyżowej CM-CDC;
- identyfikacja wśród chorych zimmunizowanych grupy pozbawionej ryzyka (brak wykrywalnych przeciwciał DSA);
- monitorowanie po przeszczepie przeciwciał anti-HLA o swoistości DSA;

— możliwość standaryzacji w stosunku do subiektywnej oceny mikroskopowej

(dokładniejsze informacje czytelnik znajdzie w pracy „Możliwości diagnostyczne oceny immunizacji biorcy nerki przed i po przeszczepie” zamieszczonej w niniejszym wydaniu „Forum Nefrologicznego”).

Poniżej opisano przypadek chorej, u której w wyniku stosowania standardowych metod diagnostyki immunologicznej przed transplantacją nie oceniono właściwie stopnia immunizacji, a brak odpowiedniej diagnostyki po transplantacji nie ujawnił toczącego się odrzucania, które w efekcie doprowadziło do utraty nerki.

OPIS PRZYPADKU

Pacjentka, 38-letnia, z niewydolnością nerek w przebiegu nefropatii toczniowej została zgłoszona na listę potencjalnych biorców nerki w marcu 2007 roku (wyprzedzająco). Nerka nie została jednak przeszczepiona zanim wystąpiła konieczność leczenia dializami. Dializę otrzewnową (ADO) rozpoczęła w listopadzie 2007 roku. W wywiadzie chora obciążona była powikłaniami choroby podstawowej. Toczeń rumieniowaty układu rozpoznano w 1991 roku, już wówczas obserwowano białkomocz. Chora otrzymywała leczenie steroidami kory nadnerczy i azatiopryną. W 1999 roku rozpoznano zapalenie żył głębokich kończyny dolnej lewej, co w powiązaniu z 2-krotnym poronieniem oraz badaniami dodatkowymi pozwoliło na rozpoznanie zespołu antyfosfolipidowego. W związku z utrzymującym się białkomoczem i wzrostem kreatyninemia do 1,9 mg/dl, w 2000 roku wykonano biopsję nerki, w której rozpoznano zaawansowane zmiany uniemożliwiające postawienie precyzyjnego rozpoznania. Nie stwierdzono zmian aktywnych, wobec czego w 2001 roku odstawiono leczenie immunosupresyjne. W listopadzie 2006 roku obserwowano objawy przemijającego ataku niedokrwienego (TIA, *transient ischaemic attack*). Chorą zakwalifikowano do leczenia plazmaferezami. Przeprowadzono 4 zabiegi plazmaferezy i ponownie włączono steroidoterapię, którą chora otrzymywała do dnia transplantacji (metylprednisolon 6 mg/d.), ponadto od stycznia 2007 roku chora przyjmowała acenokumarol. Ze względu na podejrzenie małopłytkowości indukowanej heparyną (HIT, *heparin induced thrombocytopenia*) nie mogła otrzymywać heparyny. Ponadto, u chorej rozpoznano padaczkę skroniową i z tego powodu była leczona lamitryginą. Do dnia transplantacji pacjentka otrzy-

mała 1800 ml koncentratu krwinek czerwonych (PRBCs, *packed red blood cells*), ostatniego przetoczenia dokonano w grudniu 2006 roku. W czasie oczekiwania na przeszczepienie nerki wielokrotnie obserwowano dodatnie wyniki testu cytotoksycznego (PRA maks. 100%). PRA-CDC oznaczone przed przeszczepem wynosiło 16%, pacjentka zaliczała się więc do średnio zimmunizowanych. Średnia z 5 wcześniejszych wyników PRA-CDC wynosiła $38\% \pm 17$. W lipcu 2009 roku wytypowano chorą na biorczyńnię nerki pobranej od 34-letniego dawcy, zmarłego z powodu urazu czaszkowo-mózgowego. Poniżej przedstawiono genotyp HLA oznaczony u biorcy oraz dawcy z zaznaczonymi niezgodnościami (MM, *mismatch*), które występowały tylko w zakresie klasy I HLA:

Biorca:

HLA-A*24,*26; B*38,*18; DRB1*01,*07

Dawca:

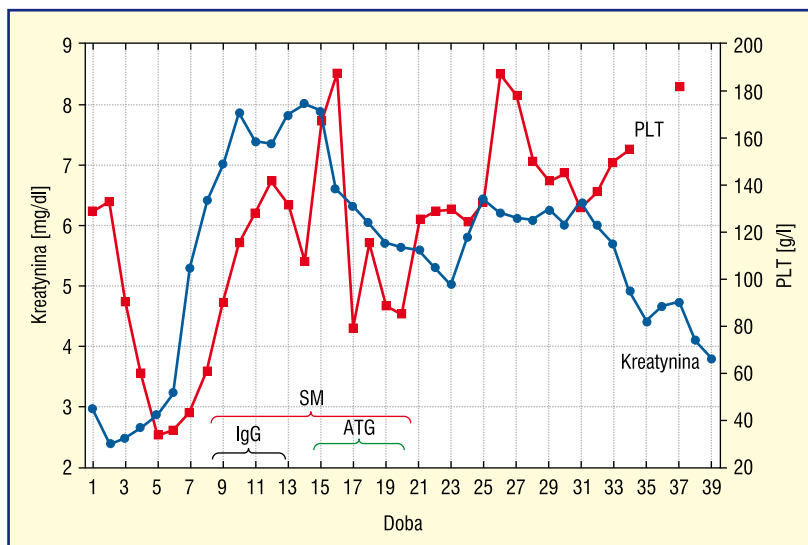
HLA-A*03,*29; B*44,-; DRB1*07,-

Wskaźnik masy ciała (BMI, *body mass index*) chorej przed zabiegiem wynosił 21,3 kg/m², szacowany stopień przesączania kłębuszkowego (eGFR, *estimated glomerular filtration rate*) — 5,81 ml/min/1,73 m², a współczynniki adekwatności dializy otrzewnowej (kT/V) — 2,23. Wobec braku przeciwwskazań ze strony biorczyńni, wykonano transplantację nerki. Zespolono tętnice i żyły nerkowe dawcy i biorcy w sposób typowy, zespolenie moczowodu ze ścianą pęcherza wykonano na drenie J-J. Czas zimnego niedokrwienia wyniósł 6 godzin, 23 minuty; ciepłego 26 minut. Zastosowano leczenie indukcyjne antylimfocytarnymi przeciwciałami poliklonalnymi (tymoglobulina) oraz schemat immunosupresji: steroidy, takrolimus, mykofenalan mofetylu. Ponadto, jako profilaktykę incydentów zakrzepowo-zatorowych chorej otrzymywała fondaparynuks. Ze względu na brak przeciwciał anti-CMV włączono profilaktykę walgancyklowirem.

Przed przeszczepieniem zabezpieczono materiał dawcy (limfocyty izolowane z fragmentu śledziony) oraz surowicę biorczyńni w celu wykonania testów w kierunku obecności aloprzeciwciał i określenia ich swoistości (testy LSA) oraz wiązania z antygenami dawcy (DSA-XM) w przyszłości. Kolejne pobranie surowicy u biorczyńni zaplanowano po 4 miesiącach. W 1. dobie po transplantacji diureza wynosiła 8610 ml (diureza resztkowa 200–300 ml). Wobec okołooperacyjnego spadku stężenia hemoglobiny w 1. dobie po zabiegu chorej przetoczono 2 j. PRBCs. Przebieg pooperacyjny był niepowikłany do 5. doby po zabiegu, od kiedy to nastąpił spa-

dek diurezy, zaczęła narastać kreatyninemia, obserwowano spadek ilości płytek krwi, niedokrwistość i leukopenię. Chora gorączkowała do 38°C przy ujemnych posiewach i wystąpiła biegunka. W 8. dobie po zabiegu, podejrzewając proces ostrego odrzucania, włączono leczenie bolusami metyloprednizolonu (6 × 500 mg), w 11. dobie rozpoczęto leczenie ADO, a w 13., wobec braku odpowiedzi na dotychczasowe leczenie, wykonano biopsję nerki, powikłaną krwakiem okołonerkowym i przetoką tętniczo-żylną. W biopsji nerki przeszczepionej rozpoznano ostre odrzucanie komórkowe naczyniowe (II A wg klasyfikacji Banff 07) oraz ostrą mikroangiopatię zakrzepową. Po uzyskaniu barwienia w kierunku złogów C4d rozpoznano ostre odrzucanie humoralne. Wobec takiego rozpoznania pobrano po raz kolejny próbkę surowicy biorczyńni w celu wykonania testów DSA-XM oraz LSA.

W terapii zastosowano przeciwciała poliklonalne (tymoglobulina) (łącznie 725 mg), a także immunoglobuliny (Kiovig) w łącznej dawce 30 g (ryc. 1). W czasie hospitalizacji chorej otrzymała dodatkowo 6 j. PRBCs. Spadek kreatyninemia i powolne narastanie diurezy pozwoliły na zaprzestanie dializy otrzewnowej w 20. dobie po transplantacji. W sierpniu 2009 roku usunięto dren J-J z moczowodu nerki przeszczepionej. Mimo utrzymywania się przepływu w nerkowej przetoce tętniczo-żylną, odstąpiono od interwencji naczyniowej z uwagi na duże ryzyko powikłań. We wrześniu 2009 roku chorej została wypisana do domu z kreatyninemią 4,72 mg/dl i diurezą około



Rycina 1. Zmiana kreatyninemia oraz stężenia płytek krwi (PLT) w poszczególnych dobach po przeszczepieniu nerki; IgG — immunoglobuliny; SM — metyloprednizolon (Solumedrol); ATG — antylimfocytarne przeciwciała poliklonalne

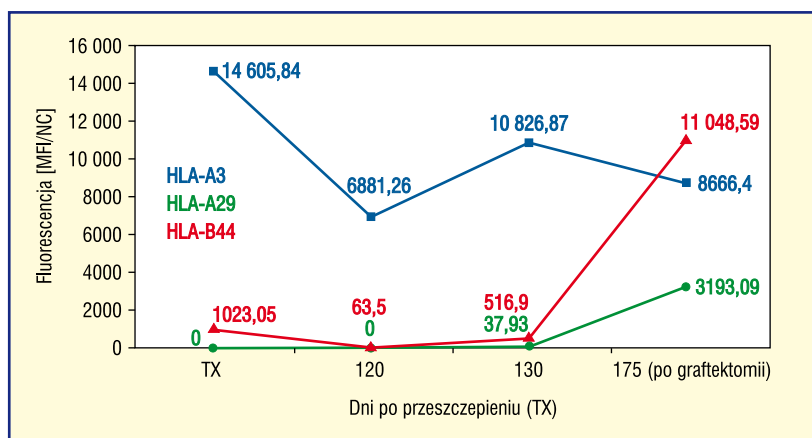
2000 ml/dobę. W obserwacji ambulatoryjnej kreatyninemia obniżyła się do 3,5 mg/dl, przy stabilnych wartościach parametrów układu czerwokrwinkowego oraz płytkach krwi, ale z tendencją do utrzymywania się leukopenii.

Dwa miesiące po wypisie chora wymagała ponownej hospitalizacji z powodu gorączki do 39°C, osłabienia i kaszlu. W badaniach dodatkowych stwierdzono wzrost kreatyninemii, małopłytkowość i leukopenię. Włączono leczenie empiryczne piperacyliną z tazobaktamem (Tazocin) oraz czynnikiem wzrostu granulocytów (Filgrastim). W badaniu tomografii komputerowej o wysokiej rozdzielczości (CTHR, *high resolution computed tomography*) klatki piersiowej stwierdzono rozległe obszary „matowej szyby” w polach płucnych oraz w płatach dolnych płuc zęszczania pod postacią pseudoguzków otoczone sferą halo, co sugerowało wczesną postać aspergillozy płucnej, którą potwierdzono w badaniu popłuczyn oskrzelowych. Włączono amfoterycynę B (Ambisone), a następnie worikonazol (Vifend). Dodatkowo rozpoznano zakażenie dróg moczowych szczepem ESBL+ (szczone wytwarzające β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym) oraz dodatnie posiewy krwi (metycylinooporny szczep bakterii *Staphylococcus epidermidis* [MRSE, *methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis*]), wobec czego stosowano imipenem (Tienam) i wankomycynę (Vancocin). Ze względu na ciężki stan chorej zminimalizowano leczenie immunosupresyjne, odstawiając mykofenolan mofetilu i zmniejszając dawkę takrolimusu do 0,5 mg co 2. dzień. Z uwagi na przewodnienie i pogorszenie funkcji przeszczepu nerkowego chora wymagała leczenia ADO przez 7 dni. Uzyskano poprawę kliniczną, która pozwoliła na zakończe-

nie dializoterapii i wypisanie chorej do domu z kreatyninemią 3,5 mg/dl w grudniu 2009 roku. Utrzymano dotychczasowe leczenie immunosupresyjne (metylprednisolon 12 mg/d. + takrolimus 0,5 mg co 2. dzień).

Na początku stycznia 2010 roku konieczna była ponowna hospitalizacja z powodu osłabienia i gorączki. Przy przyjęciu nie obserwowano zmian w morfologii krwi obwodowej, natomiast kreatyninemia wzrosła do 4,2 mg/dl. Do leczenia worikonazolem dołączono leczenie przeciwwirusowe gancyklowirem, doksycykliną oraz meropenem. Po uzyskaniu dodatniego miana przeciwciał anty *Pneumocystis jiroveci* zwiększono dawkę Biseptolu do terapeutycznej. Zaprzesztano podawania inhibitora kalcyneuryny, a wobec gwałtownej reakcji w postaci bólu i obrzęku przeszczepu nerkowego, jak również postępującej niewydolności nerki i konieczności leczenia ADO wykonano graftektomię w trybie pilnym, dokładnie 6 miesięcy po przeszczepieniu nerki. Przebieg pooperacyjny był niepowikłany i po poprawie stanu ogólnego chora opuściła szpital. Dalsze leczenie pod kontrolą Ośrodka Dializy Otrzewnowej było powikłane udarem niedokrwiennym mózgu, po którym chora po rehabilitacji wróciła do wcześniejszego trybu życia.

W celu oceny komponenty humoralnej, miesiąc po graftektomii i po odstawieniu inhibitora kalcyneuryny, ponownie pobrano surowicę chorej. Tym samym dysponowano materiałem pobranym w 4 punktach czasowych: przed przeszczepieniem, 4 miesiące po transplantacji, w czasie objawów odrzucania oraz miesiąc po graftektomii. Surowicę do momentu wykonania badań przechowywano w temperaturze -80°C. Otrzymane rezultaty w postaci zmian w poziomie wykrywalnych przeciwciał przedstawiono na rycinach 2 i 3. Opis zastosowanych metod badawczych przedstawiono w aneksie do niniejszego artykułu. Należy dodać, że badania immunologiczne (LSA i DSA-XM) nie były wykonywane na bieżąco, oceniono je kompleksowo dopiero po powrocie chorej na dializę. Na rycinie 2 przedstawiono wyniki otrzymane testem LSA w zakresie przeciwciał HLA klasy I. Wobec HLA klasy II nie stwierdzono przeciwciał. W momencie przeszczepienia obecne były przeciwciała HLA-A3 w wysokim stężeniu (wartość fluorescencji skorygowana o wartość tła [MFI, *mean fluorescent intensity*] = 14 605) oraz graniczne przeciwciała HLA anty-B44 (MFI = 1023). Tym samym w surowicy krwi biorcy obecne były przeciwciała przeciw antygenom biorcy już przed transplantacją. Po 4 miesiącach ilość wszystkich

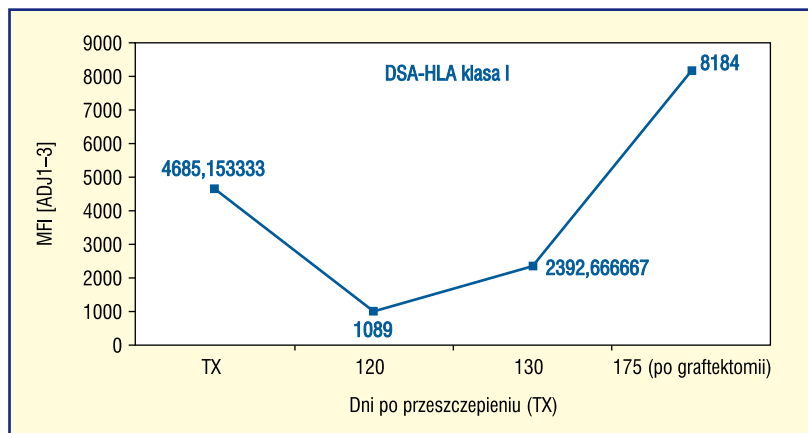


Rycina 2. Zmiany w czasie aloprzeciwciał specyficznych dla dawcy (HLA-A3, A29, B44). Oznaczenie wykonano testem *Luminex Single Antigen* (LSA)

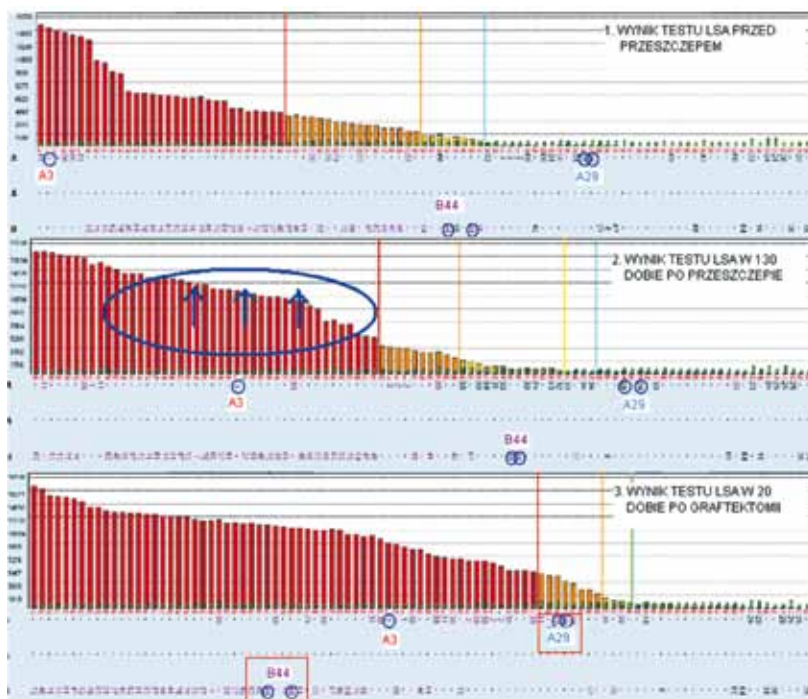
przeciwciał (nie tylko DSA) obniżyła się. Podczas objawów odrzucania przeciwciała DSA HLA anty-A3 ponownie wzrosły, stężenie anty-B44 nie zmieniło się znacząco, anty-A29 pozostały niewykrywalne. Odrzucanie zależne od przeciwciał doprowadziło do niewydolności przeszczepu, 2 miesiące od incydentu wykonano graftektomię. Interesujące wyniki otrzymano po 24 dniach od graftektomii i odstawieniu takrolimusu (175 dni po przeszczepieniu), gdzie oznaczono najwyższe spośród przeciwciał DSA stężenie anty-B44, wcześniej występujących w stężeniu na granicy oznaczalności, następnie obecne od początku anty-A3 oraz wysokie stężenie niewykrywalnych wcześniej anty-A29. Wyniki oznaczeń typu LSA mogły być silnie uzależnione od zmian w poziomie tła próbki będącego wynikiem zmiennej ilości albumin surowicy, leczenia (IVIg czy plazmaferezy).

Wyniki testu DSA-XM, przedstawione na rycinie 3 są niezależne od wspomnianych zmiennych, przez co test dedykowany jest do monitorowania przeciwciał po przeszczepie [8, 9]. Otrzymane rezultaty DSA-XM pokrywają się z testem LSA i przedstawiają tę samą tendencję zmian w ilości przeciwciał DSA. Test DSA-XM nie rozróżnia poszczególnych swoistości przeciwciał, ukazuje efekt wiązania przeciwciał biorcy z antygenami HLA izolowanymi bezpośrednio od dawcy, co zapewnia wysoką swoistość wyniku.

Warto też zwrócić uwagę na zmiany w natężeniu obecności pozostałych przeciwciał opisywanych jako nie-DSA (ryc. 4). Można zaobserwować wzrost stężenia większości przeciwciał, a nie tylko selektywną produkcję przeciwciał DSA. Taką tendencję może wyjaśniać analiza immunogenności niezgodnych dla biorcy antygenów HLA dawcy przeprowadzona w programie HLA Matchmaker (tab. 1). Program jest zaakceptowany, wykorzystywany w krajach Eurotransplantu i jest dostępny na stronie www.hlamatchmaker.net. Algorytm zastosowany w oprogramowaniu opiera się na zasadzie, że przeciwciała skierowane są nie przeciwko całemu antygenom, a epitopom, czyli krótkim fragmentom białkowym zdolnym do indukcji produkcji przeciwciał. Epitopy te (tzw. eplety) są powtarzalne, a poszczególne antygeny HLA stanowią ich kombinację. Tym samym możliwość oraz stopień rozpoznania niezgodnego antygeny HLA jest ściśle uzależniony od komplety antygenów HLA biorcy. Oznacza to, że dana niezgodność HLA (MM) dla jednego biorcy może być silnie immunogenna, podczas gdy u drugiego biorcy



Rycina 3. Zmiany w czasie aloprzeciwciał oznaczonych w teście *Donor specific antibodies cross-match* (DSA-XM), HLA klasa I



Rycina 4. Wyniki oznaczenia swoistości aloprzeciwciał anty-HLA w teście *Luminex Single Antigen* (LSA) w kolejnych punktach czasowych. Zaznaczono niebieskimi obwódkami przeciwciała anty-HLA o swoistości DSA. W 130. dobie po przeszczepie zaznaczono wyraźny wzrost stężenia przeciwciał anty-HLA (nie-DSA). W 20. dobie po graftektomii oznaczono wcześniej nieobecne przeciwciała anty-HLA-B44, -A29 DSA specyficzne

jest zupełnie niegroźna. Wyniki oceny immunogenności przedstawionej pary dawca-biorca wskazują, że niezgodne antygeny, szczególnie A3 i B44 są silnie immunogenne dla biorcy (tab. 1A). Ponadto, przeciwciała z grupy najsilniej reagujących u biorcy mają epitopy wspólne z epitopami niezgodnych antygenów (tab. 1B). Wcześniej wykazano, że ładunek immunogenności wyrażany liczbą niezgodnych epletów koreluje z prawdopodobieństwem wytworzenia przeciwciał po przeszczepieniu u biorcy [10–12].

Tabela 1. Wyniki analizy HLA Matchmaker® w zakresie: **A.** wytwarzanych przez biorcę przeciwciał. Zaznaczono wspólne epitopy dla niezgodnych antygenów HLA z dawcą oraz epitopy antygenów HLA, przeciwko którym biorca wytworzył przeciwciała; **B.** immunogenności HLA niezgodnych dla biorcy antygenów

A. Najsilniej reagujące przeciwciała anti-HLA u biorcy w 130. dobie po przeszczepie (wg wyników testu LSA)

Swoistość Anti-HLA	Nasilenie przeciwciał (MFI)	Liczba niezgodnych epitopów [mm Ep]	Immunogenne epitopy (eplet) (czerwono zaznaczone epitopy obecne u dawcy)
B62 (B*1501)	16055	5	11AMR, 44RMA, 62RE, 151RE, 163L
A11 (A*1101)	16012	7	62QE, 70AQS, 73TD, 76VGT, 113YR, 151HA, 275EL
B13 (B*1302)	15945	8	11AMR, 41T, 44RMA, 62RE, 76ERT, 116L, 144TQL, 163L
A36 (A*3601)	15218	8	9F, 44KME, 62QE, 113YR, 149AVH, 151HA, 158V, 275EL
A1 (A*0101)	14387	8	9F, 44KME, 62QE, 90D, 113YR, 149AVH, 151HA, 158V
B49 (B*4901)	13668	8	11AMR, 41T, 44RKE, 62RE, 113YN, 116L, 151RE, 163L

B. Analiza immunogenności HLA badanej pary dawca–biorca przy użyciu oprogramowania HLA Matchmaker. Czerwonym kolorem zaznaczono niezgodne dla biorcy epitopy HLA dawcy oraz niezgodności HLA

HLA Biorcy	HLA dawcy	„Ładunek” immunogenności: liczba niezgodnych epeletów [mm Ep]	Immunogenne dla biorcy epitopy dawcy (Ep: eplet)
A*2402	A*0301	8	9F, 161D, 62QE, 70AQS, 73TD, 76VGT, 113YR, 275EL
A*2601	A*2902	4	9T, 62LQ, 70AQS, 113YR
B*3801	B*4402	10	11AMR, 199V, 41T, 44RKE, 62RE, 76ERT, 94I, 113YD, 163L, 166ES
B*1801	x	–	–
DRB1*0701	DRB1*0701	–	–
DRB1*0101	x	–	–

*analiza HLA Matchmaker opiera się na wysokiej rozdzielczości typowania HLA, która uwzględnia 3-rzędową strukturę białka. Do celów oceny posłużono się częstościami alleli najczęściej występującymi w populacji europejskiej

OMÓWIENIE PRZYPADKU

W prezentowanym przypadku szczególnie istotny w ocenie immunizacji pacjentki jest moment przed przeszczepieniem. W próbce surowicy przedtransplantacyjnej testem LSA wykryto przeciwciała niewykrywalne w próbie krzyżowej przed zabiegiem. Kluczowe w prawidłowej ocenie jest ustalenie wartości poziomu odcięcia (*cut-off*) i odpowiedź na pytanie czy właściwe jest ignorowanie swoistości DSA-alopreciwciał występujących w niskich stężeniach. Pośrednią odpowiedź na pytanie można uzyskać, analizując zasady programu ET-AMP [13], gdzie równą wartość przykłada się do przeciwciał wykrytych w tak zwanej historycznej surowicy immunizowanego (z maksymalną wartością testu PRA), jak bieżący wynik testu LSA otrzymany przed przeszczepieniem. Można stąd wywnioskować, że **nawet znikome ilości oznaczonych przeciwciał w momencie przeszczepienia mogą być istotne klinicznie**, ponieważ są pochodną obecności komórek plazmatycznych, które rozpoznają dany antygen, a ich klonalna proliferacja może w krótkim czasie doprowadzić do niewydolności przeszczepu.

Kolejny problem dotyczy interpretacji wyników monitorowania humoralnej odpowiedzi po przeszczepieniu. Czy wystarczająca jest jedynie obserwacja miana przeciwciał DSA będących niezgodnościami HLA z dawcą? W opisywanym przypadku, 4 miesiące po przeszczepieniu (130. doba) zaobserwowano obniżenie wartości przeciwciał DSA (ryc. 2, 3) przy jednoczesnym wzroście innych swoistości (ryc. 4). Na pytanie, czy przeciwciała HLA, tak zwane nie-DSA indukowane immunogenami HLA przeszczepu, mogą mieć dodatkowe działanie uszkodzające, może odpowiedzieć ocena immunogenności przeprowadzona według oprogramowania HLA Matchmaker® [14] stosowanego w krajach Eurotransplantu dla biorców zimmunizowanych. Według niektórych autorów [10–12, 15] **podobieństwo epitopów HLA dawcy do epitopów przeciwko którym biorca ma przeciwciała powoduje zagrożenie, że wzrost przeciwciał tzw. nie-DSA może mieć dodatkowe działanie uszkodzające**. W prezentowanym przypadku tezy tej nie można jednoznacznie potwierdzić, ponieważ pacjentka wymagała przetoczeń preparatów PRBCs (łącznie 8 j.), które mogły być przyczyną dodatkowej immunizacji. Kolejnym ob-

►► Nawet znikome ilości oznaczonych przeciwciał w momencie przeszczepienia mogą być istotne klinicznie ◀◀

ciążeniem jest autoimmunologiczne podłoże niewydolności nerek (nefropatia toczniowa) i rozpoznany zespół antyfosfolipidowy (APS, *antiphospholipid syndrome*).

W opisywanym przypadku interesujące zmiany zanotowano w badaniu swoistości i stężenia przeciwciał anti-HLA DSA w surowicy pobranej 24 dni po graftektomii i po odstawieniu inhibitora kalcyneuryny. W wysokim stężeniu pojawiają się swoistości przeciwciał DSA wcześniej nieobecne (HLA-B44, A29). Może to wskazywać, że **niestwierdzenie przeciwciał w surowicy pobranej w okresie poprzyszczepowym nie musi oznaczać braku ich obecności, a może być skutkiem wysycenia nimi przeszczepu**. Tezę taką potwierdzają wcześniejsze publikacje [16, 17]. Wyniki badań Duquesnoy i wsp. wskazują, że wykrywalność testami LSA przeciwciał DSA wynosiła odpowiednio dla HLA-MM (*locus* A, B) 64% v. 87% (przed i po graftektomii) oraz 57% v. 86% dla MM HLA-DR. Być może jest to tylko potencjalne ograniczenie dla testów LSA w wykrywaniu przeciwciał u pacjentów, ale pod uwagę należy wziąć również fakt, że sam zabieg usunięcia nerki sprzyja uwolnieniu antygenów HLA i immunizacji pacjenta w warunkach odstawienia immunosupresji.

PODSUMOWANIE

Opisano przypadek utraty przeszczepu nerkowego u pacjentki, u której wystąpiła koincydencja autoimmunologicznego charakteru niewydolności nerek własnych i wcześniejszej immunizacji. Immunizacja spowodowana była między innymi licznymi przetoczeniami i być może poronieniami oraz obecnością przeciwciał o epitopach zgodnych z epitopami antygenów obecnych u dawcy. **Precyzyjna analiza zmian w poziomie i swoistości przeciwciał przed transplantacją oraz systematyczne monitorowanie odpowiedzi immunologicznej po transplantacji być może umożliwiłoby skuteczniejsze leczenie i zapobiegło utracie nerki**. Badania te nie są jednak dostępne w rutynowej praktyce.

WNIOSKI

Przedstawione wyniki badań dodatkowych potwierdzają korzyści z zastosowania nowoczesnych testów oceny immunizacji przed przeszczepem w postaci:

- dokładnej informacji o ryzyku transplantacji w przypadku konkretnego dawcy (obecność DSA przed przeszczepieniem);

- możliwości monitorowania odpowiedzi immunologicznej po przeszczepieniu z umożliwieniem odpowiednio wczesnej ingerencji terapeutycznej w wymagających tego przypadkach.

ANEKS

METODY:

Ocena specyficzności przeciwciał — test *Luminex Single Antigen (LSA)*

Oznaczenie wykonano z zastosowaniem firmowych zestawów (One Lambda, LabScreen Single Antigen) z wykorzystaniem fluorymetru przepływowego Luminex 200 i oprogramowania HLA Fusion®. Test opiera się na idei multipleksu (wiele sygnałów z jednego źródła), w którym każda z 99 fluorescencyjnych opłaszczona jest tylko jednym antygenem, co przekłada się na wysoką rozdzielczość wyniku. Spektrum wykrywanych przeciwciał obejmuje z zakresu HLA klasy I *locus* A, B, Cw oraz klasy II *locus* DR, DQ, DP. Kalkulację wyniku dokonano według formuły BASELINE, opisanej w specyfikacji producenta.

Donor Specific Antibodies Cross Match (DSA-XM)

Oznaczenie wykonano z zastosowaniem firmowych zestawów (GenProbe Lifecodes, Stamford z wykorzystaniem fluorymetru przepływowego Luminex 200 i oprogramowania LIFEMATCH v2.1 (GenProbe, Lifecodes, Stamford). Test jest odmianą próby krzyżowej i polega na opłaszczeniu fluorescencyjnych mikrosfer antygenami HLA dawcy, przeciwko którym wykrywane są selektywnie przeciwciała anti-HLA DSA biorcy, osobno dla klasy I oraz II HLA. Poprzez selektywne opłaszczenie eliminowany jest wpływ krzyżowej reaktywności z mikrosferami opuszczonymi innymi antygenami HLA niż antygeny dawcy, sygnał jest więc wysoce swoisty.

Kryteria oceny testu w DSA-XM

W mieszaninie mikrosfer użytych w badaniu, oprócz mikrosfer ulegających opłaszczeniu, standardowo występują 2 rodzaje mikrosfer kontrolnych: negatywne i pozytywne. Mikrosfery negatywne (3 populacje), opłaszczone są białkami surowicy w celu ustalenia wartości niespecyficznego wiązania (tła) dla mierzonej wartości fluorescencji (MFI, *mean fluorescent intensity*). Graniczną wartością tła, wobec którego oceniano próbki było MFI < 500.

Sygnał z mikrosfery kontroli pozytywnej, który weryfikuje funkcję koniugatu (przeciw-

▶▶ **Niestwierdzenie przeciwciał w surowicy pobranej w okresie poprzyszczepowym nie musi oznaczać braku ich obecności, a może być skutkiem wysycenia nimi przeszczepu** ◀◀

ciał anty-IgG skoniugowanych z fikoerytryną) nie mógł być niższy niż MFI > 10 000.

Równoległe z postępowaniem zastosowanym do prób badanych, w teście weryfikowano poprawne opłaszczenie mikrosfer antygenami dawcy. W tym celu, w każdej serii badanej surowicy testowana jest próbka *lysate control reagent* (LCR), do której zamiast surowicy badanej dodawane są monoklonalne, biotynylowane przeciwciała anty-HLA, które znakowane są SAPE.

Sygnal pochodzący z koniugatu dodawanego do prób badanych oceniany był wobec załączonych w zestawie komórek kontrolnych, których opracowanie (liza i pozostałe etapy badania) przeprowadzone były jednakowo z badanymi. Kryteria oceny lizatu pozostają identyczne, jak w przypadku prób badanych.

Kalkulacja wyniku

Obliczanie wyniku przeprowadzono wobec formuły ustalonej przez producenta, która opisana jest w specyfikacji. Warto podkreślić, że ocenie nie podlegają tu średnie MFI, ale wartości *adjusted value* (ADJv) ustalone indy-

widualnie dla każdej mikrosfery, będące wynikiem korekcji o wynik fluorescencji MFI mikrosfer negatywnych załączonych w teście oraz faktor tła *calculated background factor* (cBAF) obliczany dla każdej kombinacji mikrosfera badana/tło mikrosfery kontrolnej. Wartość cBAF jest stała dla danej partii testu.

Podlegające wartości ADJ informują ilukrotnie został przekroczony faktor cBAF, przez to wynik kalkulacji uniezależniony jest od indywidualnego tła surowicy i można go porównywać w czasie.

Wprowadzono tu istotną zmianę w stosunku do testów przesiewowych, gdzie wynik kalkulacji ADJ oznaczał, ile razy sygnal surowicy przekracza wartość mikrosfer negatywnych (matrycowych), przez co był silnie uzależniony od tła surowicy.

Wprowadzona różnica jest szczególnie istotna w przypadkach wartości granicznych oraz w razie dużych zmian w wartościach tła próbki będących wynikiem leczenia czy zmiennością biologiczną (np. wahania stężenia albumin czy wlewy IVIg).

STRESZCZENIE

Ostre odrzucanie zależne od przeciwciał stanowi jedną z częstszych przyczyn niewydolności bądź skrócenia przeżycia przeszczepu. Problem dotyczy nie tylko pacjentów wysoko zimmunizowanych z wysokim odsetkiem PRA-CDC, ale i szerokiej grupy biorców z niskim stężeniem przeciwciał anty-HLA, niewykrywalnych w rutynowych testach serologicznych. Przeciwciała te, nawet w niskich mianach, są pochodną obecności komórek pamięci, które w szybkim czasie poprzez klonalną proliferację mogą doprowadzić do uszkodzenia przeszczepu. Zaprezentowany opis przypadku dotyczy

pacjentki średnio zimmunizowanej (PRA = 16%), która w ciągu 6 miesięcy od przeszczepienia utraciła nerkę w wyniku odrzucania zależnego od przeciwciał, potwierdzonego nowo dostępnymi testami diagnostycznymi typu LSA oraz DSA-XM i oceną immunogenności pary dawca-biorca w programie HLA Matchmaker. Możliwość wczesnej diagnostyki z użyciem tych testów może usprawnić postępowanie terapeutyczne i zwiększyć jego skuteczność.

Forum Nefrologiczne 2011, tom 4, nr 4, 347–355

Słowa kluczowe: przeszczepienie nerki, odrzucanie zależne od przeciwciał, aloprzeciwciała anty-HLA, testy LSA, DSA, DSA-XM, techniki luminex, PRA-CDC

Piśmiennictwo

1. Zielińska H., Zieliński M., Moszkowska G. i wsp. Znaczenie diagnostyczne swoistych aloprzeciwciał anty-HLA u chorych przed i po transplantacji nerek. Programy dla wysoko zimmunizowanych. Postępy Hig. Med. Dośw. 2009; 63: 435–448.
2. 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.
3. 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.
4. Goodman R., Taylor C., O'Rourke C. 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; 61: 1331–1336.
5. McLaughlin K., Manns B., Nickerson P. The routine use of high resolution immunological screening of recipients of primary deceased donor renal allografts is cost effective. Transplantation 2006; 81: 1278–1284.
6. Duquesnoy R. HLA Matchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. Hum. Immunol. 2002; 63: 339.

7. Kaliciński P. Zasady alokacji nerek. *Poltransplant. Biuletyn Informacyjny* 2007; 1 (15): 53–54.
8. Billen E.V.A., Voorter C.E.M., Christiaans M.H.L., van den Berg-Loonen E.M. Luminex donor-specific crossmatches. *Tissue Antigen* ISSN 0001-2815; 2008.
9. Billen E.V.A., Christiaans M.H.L., van den Berg-Loonen E.M. Clinical relevance of Luminex donor-specific crossmatches: data from 165 renal transplants. *Tissue Antigen* 2009; 74: 205–212.
10. 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; 15, 81 (9): 1331–1336.
11. Kosmoliaptsis V., Chaudhry A.N., Sharples L.D. i wsp. Predicting HLA class I aloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 2009; 27, 88 (6): 791.
12. Kosmoliaptsis V., Sharples L.D., Chaudhry A.N., Halsall D.J., Bradley J.A., Taylor C.J. Predicting HLA class II aloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 2011; 27, 91 (2): 183–190.
13. Zasady algorytmu przeszczepiania pacjentów zimmunizowanych ET-AMP (25.10.2011). <http://etrl.eurotransplant.nl/cms/index.php?page=amprogram>
14. Goodman R., Taylor C., O'Rourke C., Lynch A., Bradley A., Key K. Utility of HLA Matchmaker and single-antigen HLA-antibody detection beads for identification of acceptable mismatches in highly sensitised patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation* 2006; 81: 1331–1336.
15. Cai J., Terasaki P.I. Post-transplantation antibody monitoring and HLA antibody epitope identification. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: 602–606.
16. Marrari M., Duquesnoy R.J. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. *Transplant. Immunology* 2010; 22: 105–109.
17. Billen E., Christiaans M.H.L., 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; V (87) 4: 563–569.