

Két Új Vesetranszplantációt Megelőző Antitest Detektálási Technika Összehasonlításának Értékelése

Doktori tézisek

Dr. Gombos Petra

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Langer Róbert, Ph.D.

Konzulens:

Dr. Caner Süsal

Hivatalos bírálók:

Dr. Sótonyi Péter, Ph.D.

Dr. Káposztás Zsolt, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szabó Zoltán, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szőnyi László, Ph.D.

Dr. Czebe Krisztina, Ph.D.

Budapest

2014

1. BEVEZETÉS

Az új immunszuppressziós korszakban az akut celluláris rejekció okozta graft károsodás szinte eltűnt. Az emelkedő számú humán leukocytá antigén (HLA)-mismatch transzplantációknak, valamint a B-sejt szintű szenitizálódásnak köszönhetően az antitest-mediált rejekció (AMR) problémája továbbra is fennáll, így prevenciója a vesetranszplantáció területének egyik fontos kérdésévé vált.

Az AMR patogenezisében a preformált donor-specifikus immunglobulin (Ig) G típusú HLA antitestek (DSA) által okozott komplement aktiváció kritikus szerepet játszik. A graft működés megóvása érdekében olyan diagnosztikai eljárások kombinációja szükséges, mint a HLA-tipizálás, a keresztpróba (XM) és az antitest szűrés (screening).

A XM technikák olyan vizsgálatok, melyek a vesetranszplantáció előtt a várólista recipienseinek szérumban a donor HLA I. és II. osztályú antigénjei ellen előforduló preformált DSA meghatározására szolgálnak. Elvégzéséhez a recipiens széruma és a donor lymphocytái szükségesek.

A pozitív XM elkerülése, tehát az AMR prevenciója érdekében a transzplantációs centrumok a HLA antitestek jelenlétére a vesetranszplantációs recipiensek periodikus szűrését végzik, ezzel definiálva a „nem tolerálható HLA antigén mismatch-

eket” transzplantáció előtt. Az antitest szűréshez a recipiens széruma mellett a potenciális donor lymphocytái helyett egészséges véradók HLA tipizált lymphocytáinak egy panelja, ezek szolubilizált HLA antigénjei vagy mesterségesen előállított rekombináns HLA molekulák egy panelja szükséges. A HLA antitestek meghatározására szolgáló különböző módszerek a célpont típusában, formájában, szenzitivitásukban és specificitásukban térnek el egymástól. A célpont lehet sejt, mint például a citotoxicitási vizsgálatoknál, úgymint a komplement-dependens citotoxicitási teszt (CDC), vagy szolubilis antigén a szilárd-fázisú immunológiai metódusoknál, úgymint az enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) vagy a Luminex single antigen bead (SAB) teszt. A diagnosztikai eljárások szenzitivitásának emelkedésével az alacsonyabb reaktivitású DSA is detektálható a vesetranszplantációs várólista recipienseinek szérumában. Ennek megfelelően, amíg a CDC technika nagyon magas és magas vagy mérsékelt reaktivitású DSA detektálására alkalmas, addig az ELISA módszer szenzitívebb, így mérsékelt vagy alacsony antitest reaktivitásokat is detektál a recipiens szérumában. Manapság a magas szenzitivitású Luminex SAB az egyetlen metódus, mely alacsony titerű DSA nagy pontosságú meghatározására képes.

Jelenleg a transzplantációs immunológia komoly kihívása, hogy mennyire szenzitív tesztet használjunk az alloantitestek meghatározására vesetranszplantációt megelőzően.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A vesetranszplantációs várólista recipienseinél a HLA antitest státusz korrekt értékelésében mind a hibásan pozitív eredmények, mind az alacsony szenzitivitás nehézségeket okozhatnak. A tézis két nemrég bevezetett HLA antitest detektálási technika előnyeit, illetve a velük kapcsolatos problémákat elemezi.

Az első tanulmány a kereskedelmileg elérhető AbCross[®] ELISA XM potenciális előnyeit vizsgálja a graft vesztés előrejelzésében a B-sejt CDC XM (BXM)-val szemben. Mivel a vesetranszplantáció területén komoly vita folyik a BXM szenzitivitásáról és klinikai relevanciájáról, megvizsgálja, hogy az új AbCross[®] technika kiküszöbölheti-e a BXM hátrányait, úgymint a nem specifikus reakciókat vagy autoantitesteket.

A második tanulmány a kitűnő szenzitivitású Luminex SAB technika hatását vizsgálja az immunstátusz meghatározására a vesetranszplantációs várólista recipienseinél, különös tekintettel a technika által potenciálisan „hibásan pozitív” reakciók problémájának felbecsülésére. Tanulmányozza a HLA

antitestek előfordulását a heidelbergi transzplantációs centrum várólistás betegeinél három különböző módszert párhuzamosan alkalmazva, úgymint CDC T-sejt screening, AbScreen[®] ELISA screening és SAB. A HLA antitestek magas előfordulása nem immunizált betegekben SAB módszerrel, azt jelzi, hogy az „hibásan pozitív” reakciókat okozhat. A tanulmány ezeket a „hibásan pozitív” specifitásokat és erősségüket részletesen is elemezi. Egy ilyen információ a napi rutinban hasznos lehet a betegek SAB eredményeinek individuális kiértékelésénél.

2.1 Az ELISA és B-sejt CDC keresztpróbák klinikai relevanciájának összehasonlítása vesetranszplantáció előtt

A disszertáció a következő kérdésekre kereste a választ:

- a. Mekkora a 2 éves graft vesztés aránya vesetranszplantációt követően az AbCross[®] ELISA XM pozitív és az AbCross[®] ELISA XM negatív betegekben?
- b. Mekkora a 2 éves graft vesztés aránya vesetranszplantációt követően a BXM pozitív betegekben a BXM negatív betegekhez viszonyítva?

- c. Alátámasztják-e az AbScreen[®] ELISA screening eredményei az AbCross[®] ELISA XM pozitívitas graft túlélésre gyakorolt hatásának eredményeit?
- d. Fenn áll-e összefüggés a vese graft túlélése és a BXM és AbCross[®] ELISA XM vagy AbScreen[®] ELISA screening eredményei között?

2.2 A nemrég bevezetett Luminex SAB szenzitizációs státuszra gyakorolt hatásának vizsgálata a vesetranszplantációs várólistán

Ezzel összefüggésben a következő kérdésekre kereste a disszertáció a választ:

- a. Mekkora a vesetranszplantációs várólistán a pozitív betegek aránya SAB technikát használva a kevésbé szenzitív ELISA és CDC módszerekhez képest?
- b. Mekkora a nem immunizált HLA antitest pozitív betegek aránya?
- c. Milyenek a mean fluorescence intensity (MFI) értékei a nem immunizált betegeknek?
- d. Megoldható-e a “hibásan pozitív” reakciók problémája a cutoff értékének megemelésével?

- e. Mekkora az SAB-pozitív betegek aránya a pozitívan reagáló SAB gyöngyök vonatkozásában?
- f. Mely HLA specifitások reagálnak pozitívan SAB módszerrel a nem immunizált betegekben?
- g. Megoldhatják-e más módszerek, úgymint egy másik forgalmazó vagy egy alapjaiban eltérő teszt a „hibásan pozitív” reakciók problémáját?

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Betegek

Az első tanulmány az ELISA XM potenciális előnyeit vizsgálta a BXM-val szemben. 271, 1998 és 2010 között, a heidelbergi transzplantációs központban vesetranszplantált, élő vagy agyhalott donoros recipiens – akiknek a fagyasztott donor sejtei elérhetőek voltak - pretranszplantációs szérumának vizsgálata történt, AbScreen[®] ELISA screening módszerrel HLA antitestek jelenlétére, valamint BXM és AbCross[®] ELISA XM módszerekkel antitest reaktivitásra donor B-sejtek illetve donor HLA I. és II. osztálya ellen.

A második tanulmány a Luminex SAB módszer hatását vizsgálta a vesetranszplantációs várólistán lévő recipiensek immunológiai státuszára vonatkozóan. Az ELISA és CDC

screening metódusokkal párhuzamosan 534, a heidelbergi vesetranszplantációs várólistán lévő recipiens pretranszplantációs szérumát SAB módszer segítségével is analizálta.

3.2 Módszerek

3.2.1 Tanulmány 1: Az ELISA és B-sejt CDC keresztpróbák klinikai relevanciájának összehasonlítása vesetranszplantáció előtt

Az első tanulmány a CDC XM-hoz a donor szeparált B-sejtjeit használta és a citotoxikus hatást fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálta (Leica, Wetzlar, Germany). A tesztet sejthalál >20% esetén pozitívnak értékelte.

A szérumok vizsgálata a nemrég bevezetett AbCross[®] ELISA XM (BioRad, Munich, Germany) technikával is megtörtént, melyben a DSA detektálására szolubilizált donor HLA molekulák szolgálnak. Az AbCross[®] ELISA XM egy kereskedelmileg elérhető szilárd fázisú XM technika, előnyökkel a standard BXM-val szemben. A módszert magasabb reprodukálhatóság, objektivitás, szenzitivitás és specificitás jellemzi a HLA antigénekre. Az AbCross[®] ELISA XM monoklonális antitestekkel fedett mikrotiter tálcán

detektálja az antitesteket. Az eredmények kiértékelése fotometrikus mérésekkel ELISA reader segítségével történt. Az optikai denzitás (OD) nagyobb vagy egyenlő, mint a negatív kontroll kétszerese pozitív értéket jelentett.

Megtörtént a szérumok vizsgálata IgG-anti-HLA I. és II. osztályú alloantitestek jelenlétére is, AbScreen[®] ELISA (BioRad) tesztet használva, mely poolozott HLA molekulákat használ 96-lyukú mikrotiter tálcákon. A recipiens HLA antitestjeinek meghatározása szeparált tálcákon történt, poolozott I. vagy II. osztályú HLA molekulák ellen. Az anti-HLA pozitivitás meghatározására korábbi klinikai eredmények alapján $OD \geq 0,300$ szolgált cutoff értékként.

Két éves klinikai nyomonkövetésre és ennek dokumentációjára a 271 betegből 223 esetben volt lehetőség. A statisztikai analízis chi-square teszt segítségével történt.

3.2.2 Tanulmány 2: A nemrég bevezetett Luminex SAB szenzitizációs státuszra gyakorolt hatásának vizsgálata a vesetranszplantációs várólistán

A második tanulmány a különböző szűrési technikákat vizsgálta. A heidelbergi transzplantációs centrumban a várólistás betegek rutinszerű szűrése HLA antitestekre

háromhavonta történik ELISA és CDC screening technikák alkalmazásával. Kiegészítőleg 2010 harmadik negyedéből megtörtént az 534 szérumból SAB vizsgálta is.

A panel reaktív antitestek (PRA) mértékének meghatározása nem szeparált lymphocytákkal (főleg T-sejtek) egy 56 sejtdonorból álló panellel szemben, fagyasztott/olvasztott sejtekből álló tálcán történt CDC módszert alkalmazva, DTT hozzáadása nélkül (<http://www.ctstransplant.org/public/reagents/serolCell.shtml>).

A standard eljárást követve, a betegek szérumának lymphocytákkal történő inkubálása, valamint komplement hozzáadása után, a tálcák fluoreszcens mikroszkóppal végzett kiértékelése történt (Leica, Wetzlar, Germany). PRA >5% pozitív tesztet jelentett.

Továbbá, megtörtént mind az 534 szérumból tesztelése HLA I. és II. osztályú antitestek jelenlétére AbScreen[®] ELISA módszerrel (BioRad, Munich, Germany), melyben a már fent említettek szerint poolozott HLA molekulák vannak mikrotiter tálcához kötve, lehetővé téve IgG izotípusú HLA-A, -B, -C, -DR és -DQ antitestek detektálását. Szintén a korábbi klinikai eredményekre alapozva OD $\geq 0,300$ szolgált cutoff-ként az anti-HLA pozitivitás meghatározására. Egy SAB negatív betegben, aki AbScreen[®] ELISA pozitív volt, ELISA-PRA teszt

alkalmazása történt (AbIdent[®], BioRad, Munich, Germany) a HLA antitestek hiányának megerősítésére, melyben poolozott készítmény helyett egy-egy személyből előállított sejt készítmény szolgál az antitestek detektálására.

Ezen kívül megvalósult minden szérum vizsgálata LABScreen[®] Luminex SAB (One Lambda, Canoga Park CA, USA, LS1A04 Lot006 and LS2A01 Lot008) teszt segítségével, mely egy-egy HLA antigént hordozó gyöngyöket használ, lehetővé téve az IgG típusú antitest specifikítások identifikálását HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 és -DPB1 antigének ellen. Mivel az SAB teszt esetén nincs a forgalmazó által meghatározott szabványérték a cutoff-ra vonatkozóan, így a pozitivitás megállapítása az irodalomban is legelterjedtebb MFI ≥ 1.000 -nél történt.

Megtörtént 10 nem immunizált várólistás beteg szérumának, melyek a LabScreen[®] SAB teszttel az átlag népességben nagy gyakorisággal előforduló HLA allélekkel szemben pozitivitást mutattak, utólagos tesztelése Lifecodes[®] SAB (Gene-Probe Transplant Diagnostics, Lifecodes[®] LSA, Stamford, CT) módszerrel is. A pozitivitást a gyártó software-je adta meg, amennyiben három alap mérési értékből kettő az előre meghatározott cutoff érték fölé került.

Megvalósult a LabScreen® SAB által pozitívnak értékelt 20 nem immunizált, várólistás, férfi recipiens és 15 előzetes LabScreen® SAB eredménnyel nem rendelkező, nem immunizált, egészséges, férfi véradó szérumának vizsgálata LabScreen® PRA módszerrel (One Lambda), melyben 55 gyöngyöt borít tisztított HLA antigén 55 különböző humán sejtvonalból (fenotípusú panel). A pozitivitás cutoff 1,000 MFI értéket jelentett.

A klinikai anamnézishez, beleértve a vértranszfúziókat, terhességeket, korábbi transzplantációkat, a betegek kórlapjai szolgáltak. A statisztikai analízis Fisher's exact teszt segítségével történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Az ELISA és B-sejt CDC keresztpróbák klinikai relevanciájának összehasonlítása vesetranszplantáció előtt

A tézis a kérdésekre a következő válaszokat kapta:

- a. Az HLA I. vagy II. osztálya ellen DSA pozitivitást mutató 37 recipiens 19%-os 2 éves poszttranszplantációs graft vesztese szignifikánsan magasabb volt, mint a 186,

mindkét HLA osztály ellen AbCross[®] negatív recipiens 8%-os graft vesztese ($P=0,043$).

- b. A 2 éves graft túlélés 14 BXM pozitív beteg esetében 7% volt, mely nem volt magasabb, mint a 9% 206 BXM negatív beteg esetében ($P=0.79$).
- c. Az AbCross[®] ELISA XM eredményeivel megegyezően 48 betegnek, akik a HLA I. vagy II. osztályát tekintve ELISA screening technikával pozitívak voltak, szignifikánsan rosszabb volt a 2 éves graft túlélése, mint a 174 recipiensnek, akik a HLA I. és II. osztályát tekintve negatívak voltak (graft vesztes aránya, 21% vs. 6%; $P=0,002$).
- d. A BXM és az AbCross[®] kombinált analízisében a 2 éves graft vesztes 34 BXM negatív, de AbCross[®] pozitív beteg esetében 21% volt. 172 BXM és AbCross[®] negatív betegell összehasonlítva 7% volt a 2 éves graft vesztes ($P=0,012$), illetve 11 BXM pozitív, de AbCross[®] negatív beteg esetében 9% ($P=0,39$). A BXM és AbCross[®] pozitív betegek alacsony száma nem tette lehetővé az igényes analízst ($n=3$; 2 éves graft vesztes aránya, 0%). A BXM és az ELISA screening kombinált analízisében, a 2 éves graft vesztes aránya 44 BXM negatív, de AbScreen[®] pozitív

betegben 21% volt, szignifikánsan magasabb, mint a 6% 162 BXM és AbScreen[®] negatív betegben ($P=0,002$), valamint magasabb, mint a 0% 9 BXM pozitív, de AbScreen[®]-negatív betegben ($P=0,14$).

4.2 A nemrég bevezetett Luminex SAB szenzitizációs státuszra gyakorolt hatásának vizsgálata a vesetranszplantációs várólistán

A disszertáció a kérdésekre a következő válaszokat kapta:

- a. 534 transzplantációs várólistán lévő beteg szenzitizációs státuszának analízise során, HLA antitestek jelenlétét a CDC technika a betegek csupán 5%-ánál ($n=28$), az ELISA screening a 14%-ánál ($n=73$), az SAB technika a 81%-ánál ($n=435$) bizonyította.
- b. A betegek anamnézise alapján 133 (32%) recipiensnél nem szerepelt immunizáció, úgymint korábbi transfúzió, terhesség vagy transzplantáció. Míg a 133 recipiensből csak 1 (1%) beteg volt ELISA screening pozitív HLA II. osztálya ellen, és minden beteg negatív ELISA módszerrel HLA I. osztálya ellen, 2 recipiens (2%) CDC-vel mutatott pozitivitást. Ezzel szemben, a nem immunizált betegek

77%-a (n=102) HLA antitestekkel rendelkezett a SAB technikát használva.

- c. Cutoff 2.000 MFI esetén a nem immunizált betegek 50%-a, 5.000 MFI esetén 25%-a HLA antitest pozitivitást mutatott, mely arra utal, hogy az SAB által detektált „hibásan pozitív” reakciók nem korlátozódnak „alacsony” reakciókra.
- d. Nem immunizált recipiensek esetében az SAB által detektált antitestek néha kifejezetten magas, akár MFI 14.440 értékekkel is reagáltak, így a cutoff emelése nem oldja meg ezeknek a „hibásan pozitív” reakcióknak a problémáját.
- e. A CDC és ELISA negatív, nem immunizált betegek behatárolt SAB reaktivitást mutattak. Ezeknek a betegeknek 86%-a reagált $\leq 5\%$ -ával a SAB gyöngyöknek. Ezzel szemben az ELISA vagy CDC pozitív betegek 94%-a reagált pozitívan az SAB gyöngyöknek $> 5\%$ -a ellen.
- f. Néhány nem immunizált beteg olyan HLA specifikusok ellen reagált magas MFI értékekkel, melyek nagy gyakorisággal fordulnak elő az átlag népesség körében, mint például az A*24:02 (előfordulása a tanulmányban: 8,8%, max. MFI: 12.197), B*08:01 (7,8%, MFI: 9.862),

B*44:02 (7,8%, MFI: 10.427) vagy C*05:01 (7,8%, MFI: 3.962) (8,7%, 12,5%, 9,0% valamint 9,1% gyakoriság az átlag népességben). Hasonlóan reagált néhány beteg a HLA II. osztálya ellen, a népességben gyakori DQB allélt hordozó SAB gyöngyökkel szemben, úgymint a DQB1*03:01 (előfordulása a tanulmányban: 7,8%, MFI: 9.804), mely 18,5%-ban fordul elő az átlag népességben.

- g. Az átlag népesség körében nagy gyakorisággal előforduló HLA specifitások tekintetében végzett analízis a másik forgalmazó SAB tesztjével azt mutatta, hogy amíg 8 a 10 nem immunizált betegből nem mutatott HLA antitest reaktivitást, 2 beteg a 10-ből igen. Továbbá a LabScreen[®] PRA módszerrel cutoff 1.000 MFI-t használva 6 (30%) a 20 nem immunizált férfi, várólistás betegből, akik SAB pozitívak voltak, LabScreen[®] PRA-val szintén pozitivitást mutattak. Egyetlen 15 egészséges férfi véradó sem volt pozitív a LabScreen[®] PRA technikával, míg 9 közülük LabScreen[®] SAB-vel pozitivitást mutatott MFI 1.011-4.424 intervallumba tartozó értékekkel, 21 különböző HLA allél ellen, köztük a B*44:02 is, mely több mint 7%-ban fordul elő a kaukázusi népességben.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Az eredmények azt mutatják, hogy az AbCross[®] ELISA XM hatékonyabb a BXM-val szemben, leginkább, mert az antitesteket a donor HLA antigénjei ellen magasabb szenzitivitással detektálja.

Donor vesék visszautasítása olyan HLA antitest specifikításokra alapozva, melyek kizárólag az SAB metódussal detektálhatók, nem ajánlott. Az SAB technikával hibásan pozitív reakciók felfedhetők egyéb antitestet detektáló tesztekkel.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1 Disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- 1. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, Süsal C. (2013) Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. Am J Transplant, 13: 2075-2082. (IF 6.192)**
- 2. Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, Langer RM, Süsal C. (2013) Superiority of AbCross Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Cross-Match Over the B-Cell Complement-Dependent Lymphocytotoxicity Cross-Match. Transplant Proc, 45: 1383-1385. (IF 0.952)**

6.2 További publikációk

- 1. Opelz G, Döhler B, Ruhstroth A, Cinca S, Unterrainer C, Stricker L, Scherer S, Gombos P, Süsal C, Daniel V, Tran H. (2013) The collaborative transplant study registry. Transplant Rev, 27: 43-45. (IF 2.675)**
- 2. Schaefer B, Tönshoff B, Schmidt J, Golriz M, Mehrabi A, Gombos P, Morath C, Wühl E, Schaefer F, Schmitt CP. (2013) Bleeding complications in pediatric ABO-**

incompatible kidney transplantation. *Pediatr Nephrol*, 28: 327-332. **(IF 2.939)**

3. **Gombos P**, Langer RM, Korbely R, Varga M, Kaposi A, Dinya E, Müller V. (2010) Smoking following renal transplantation in Hungary and its possible deleterious effect on renal graft function. *Transplant Proc*, 42: 2357-2359. **(IF 0.993)**
4. Süsal C, Wettstein D, Döhler B, Ruhenstroth A, Scherer S, Tran H, **Gombos P**, Morath C, Schemmer P, Weimer R, Norman D, Bösmüller C, Slavcev A, Zivcic-Cosic S, Wagner E, Zeier M, Opelz G. Association of Kidney Graft Loss With Posttransplant Presence of HLA Antibodies Detected by Single Antigen Testing. **(előkészületben)**