



PRETRANSPLANT İMMÜNOLOJİK TESTLER

**Dr.Murat Yurt, PhD
Diyarbakir Dicle Üniversitesi Hastanesi
Doku Tipleme Laboratuvarı
Sorumlu Yardımcısı**



SUNUM PLANI



- **Amaç**
- **Genel Bilgi**
- **HLA Doku Tiplemesi**
- **Anti-HLA Antikorları-Yöntemler**

Hücresel Yöntemler

CDC Cross-Match (CDCXM)

Flow Sitometri Cross-Match (FCXM)

Solid Fazlı Yöntemler (Luminex)

Panel Reaktif Antikor (PRA)

Single Antijen Testi (SA)



AMAÇ

- **Yüksek immünolojik riskli hasta**
- **Standart immünolojik riskli hasta**
- **Rejeksiyon riskini en aza indirmek**
- **Transplantasyon sonrası greft sağ kalımı ve fonksiyonu**



GENEL BİLGİ

Transplantasyon ;

- Deneysel olarak 1900'lerin başlarında başlamış,
- 1954'te Dr. Joseph Murray tarafından ilk başarılı böbrek nakli gerçekleştirilmiştir.
- Türkiye'de ilk böbrek nakli 1968'de, ilk başarılı canlı vericili böbrek nakli 1975'te yapılmıştır.
- Sağlık Bakanlığı'nın açıkladığı verilere göre, 2023 Kasım ayı itibarıyla, böbrek nakli bekleyen hasta sayısı 24 bin 449'tür.



➤ **Pretransplantasyon Süreci ve Önemi**

Organ ve doku transplantasyonu, birçok hastalığın tedavisinde kullanılan önemli bir tıbbi yöntemdir.

Başarılı bir transplantasyon için donör ve alıcı arasında immunolojik uyumun sağlanması kritik öneme sahiptir.

➤ **İmmünolojik Testlerin Rolü**

Alıcı ve donör arasındaki uyumluluğu değerlendirmek için yapılan bir dizi testtir.

Alıcının immün sisteminin donör greftini reddetme riskini belirlemeye yardımcı olurlar.

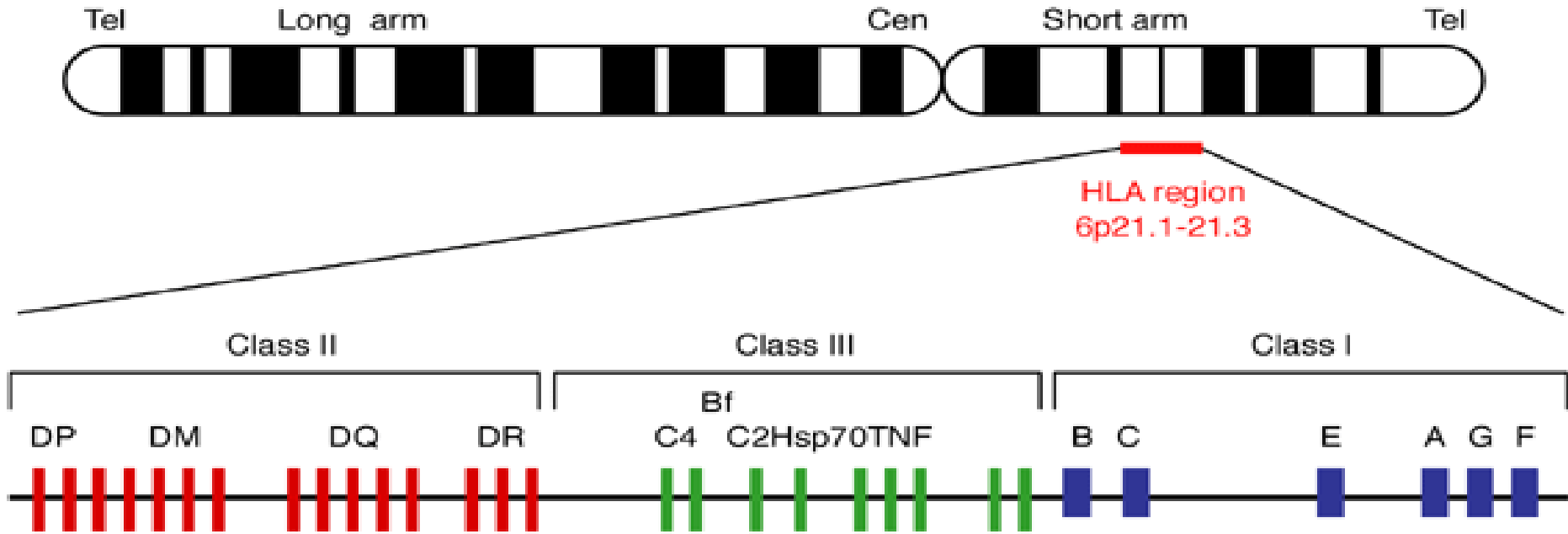


- **Pretransplant immunolojik testlerin önemi ve hedefi**
 - Rejeksiyon açısından kritik bir rol oynar .
 - Donör ve alıcı arasında doku uyumu sağlanması ve organ reddi riskinin azaltılması açısından hayati önem taşır .
 - Uzun dönem transplantasyon başarısını artırır.
 - İmmünolojik komplikasyonları önlemeye yardım eder.

MHC molekül ve genlerinin yapısı

- MHC proteinleri, özgül antikörlerin kullanılması ile lökositlerde tespit edilen antijenler olarak tanımlandığı için insan lökosit antijenleri (HLA) olarak adlandırılır.
- MHC moleküllerini kapsayan genler 6. kromozomun kısa koluna (6p21.3) yerleşiktir

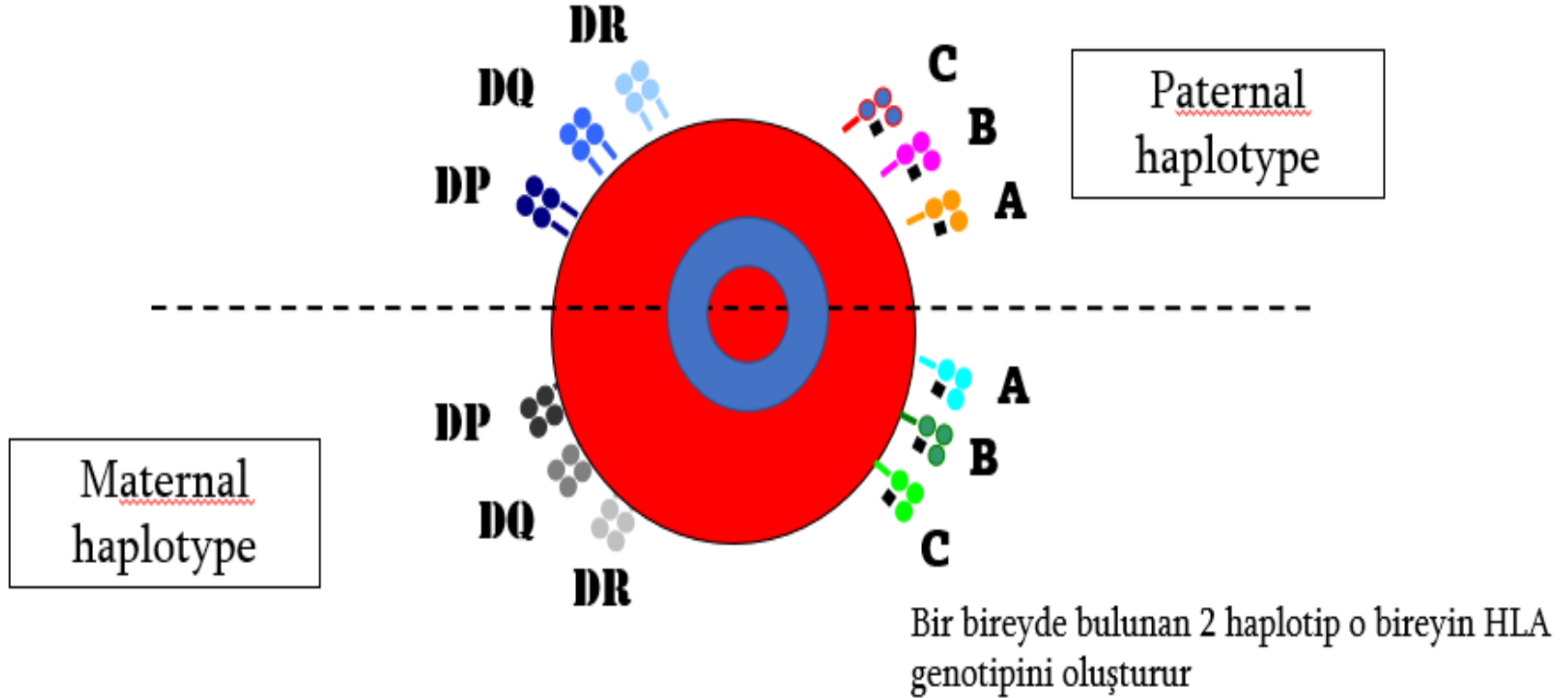
Chromosome 6



Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press

Çekirdekli hücre yüzeylerinde HLA molekülleri



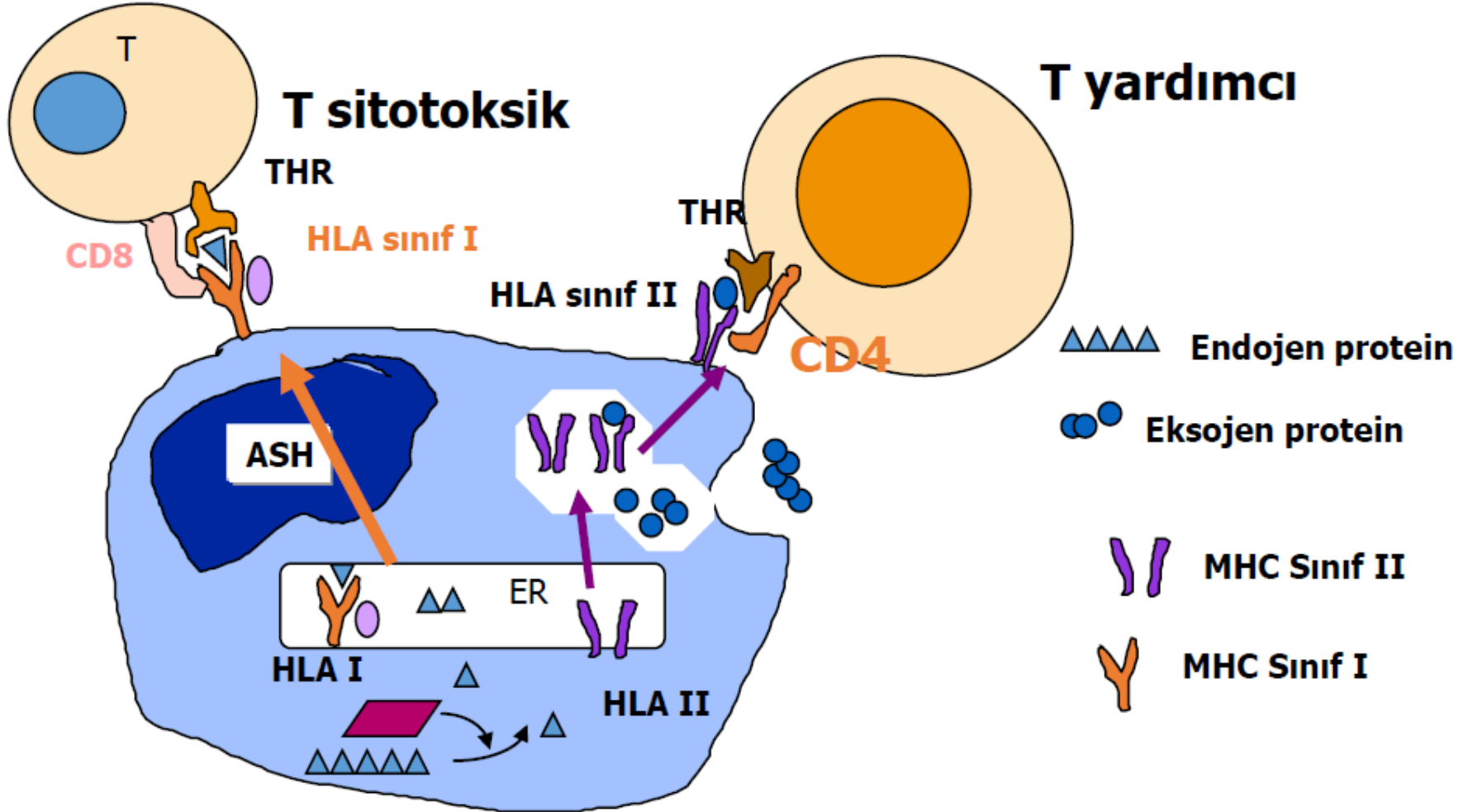
HLA genleri eş-baskındır (kodominant), yani anne ve babadan geçen alleller hücre yüzeylerinde eşit ifade edilir.

Her bir kromozomda bulunan MHC allellerinin tümüne haplotip denir.

Her ebeveyn 2 haplotip taşır ve bunlardan herhangi birini çocuklarına verebilir.

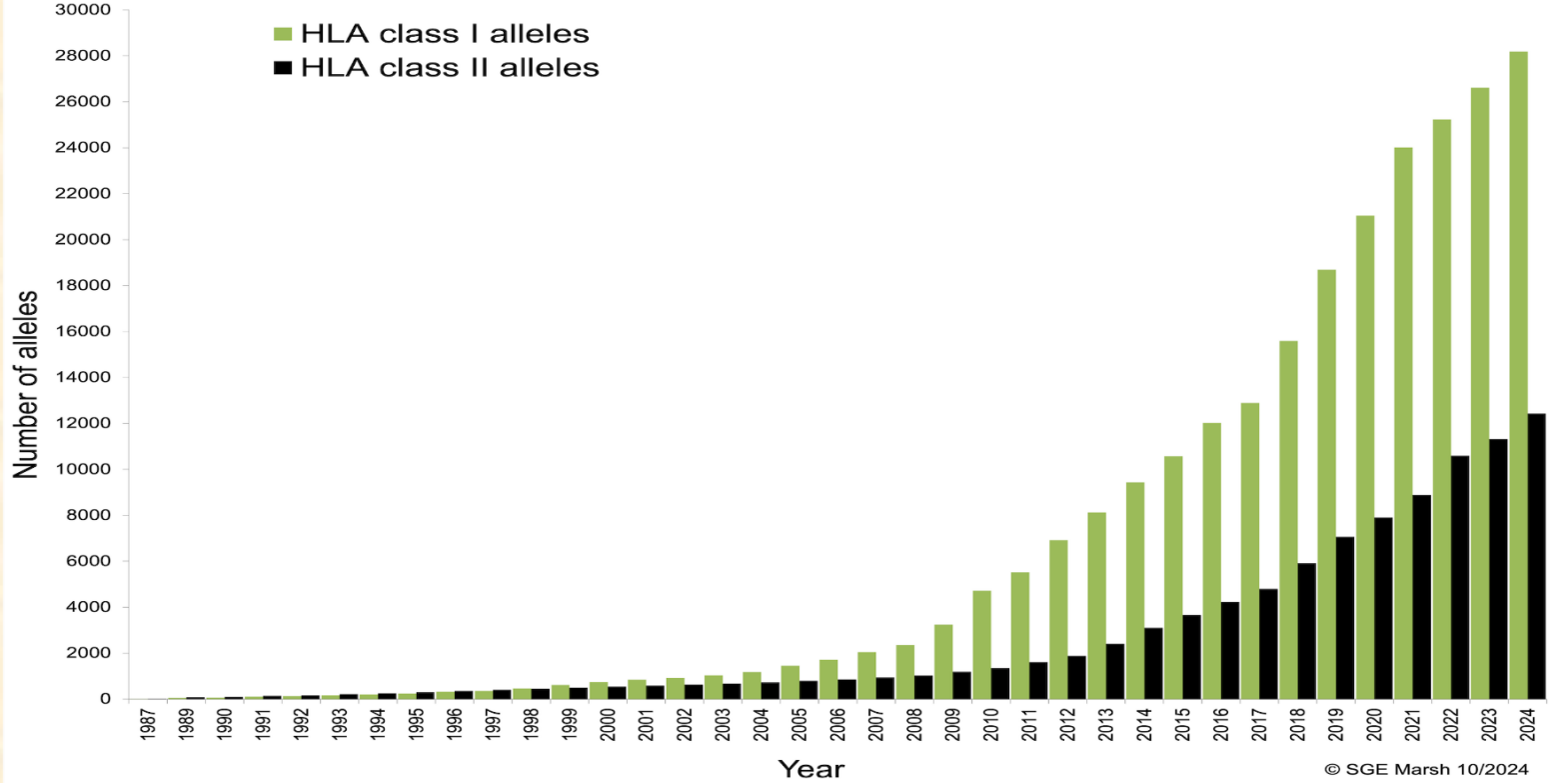
Haplotipler, Mendel kurallarına uygun olarak kalıtılır

Antijen İşleme ve Sunma





HLA Doku Tiplemesi



HLA Allel Sayıları	
HLA Class I	27.717
HLA Class II	11.910
Toplam	39.627

(2024 Eylül itibariyle, Dünya Sağlık Örgütü'nün HLA Nomenklatür Komitesi tarafından düzenlenen <https://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html> veritabanına göre HLA gen ailesinde tanımlanmış 39.627 allel)



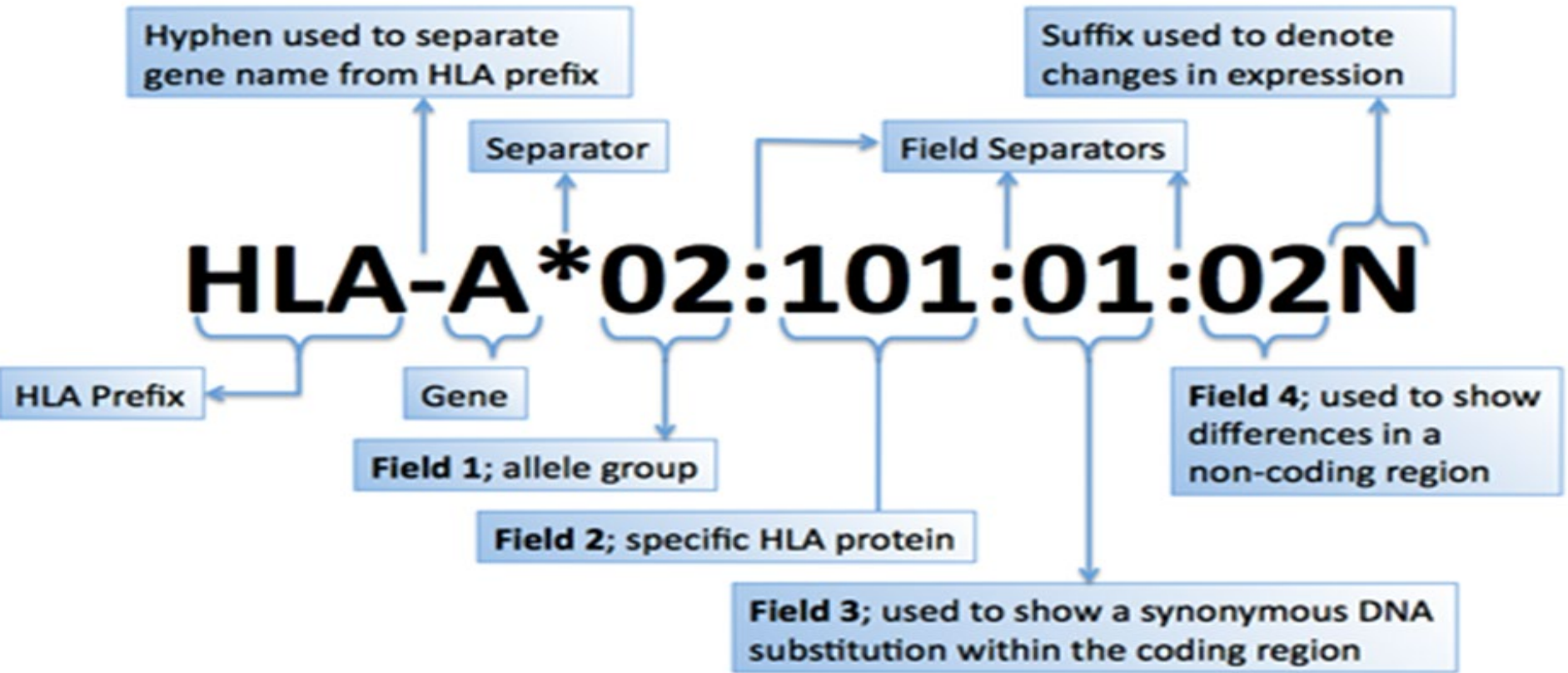
HLA Doku Tiplemesi

Düşük Çözünürlüklü
HLA Tiplemesi

HLA-A*02

Yüksek Çözünürlüklü
HLA Tiplemesi

HLA-A*02:10





HLA Doku Tiplemesi

HLA Uyumunun Önemi

İmmün sistem yanıtını azaltma

(HLA uyumluluğu arttıkça immün sistemin yanıtı azalır)

Uzun Dönem Başarı

(Organın daha uzun süre işlev görmesine yardımcı olur ve nakil sonrası komplikasyon riskini azaltır.)

İmmüsupresif İlaç Kullanımını Azaltma

(Uzun vadeli kullanımı ciddi yan etkilere neden olabileceğinden, HLA uyumunun sağlanması hasta sağlığı açısından büyük önem taşır)



HLA Doku Tiplemesi

Transplantasyonun başarılı sonuçları tam HLA uyumlu donörler ile sağlanır,

Her hasta için tam uyumlu donör bulmak, HLA sisteminin çok polimorfik olması nedeniyle zordur,

Birçok hasta bu nedenle mismatch'li (uyumsuz) greft ile transplante edilmektedir,



➤ **Transplantasyon Başarısızlığı Riski;**

HLA uyumsuzluğunun sayısıyla bağlantılıdır.

Transplant uyumsuzluğu alıcının CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonu ile birlikte B-hücre allo-antikor üretiminin aktivasyonuna yol açar.

Bu durum sellüler ve humoral greft rejeksiyonuna neden olur.

➤ **Alternatif Stratejiler**

Yüksek doz immunsupresif ilaçlar

Antikorların ortadan kaldırılması için plazmaferez gibi işlemler

Nakil sonrası hastanın immün tepkilerini yakından izleme



➤ İyi HLA Uyumu

Daha uzun greft canlılığı

Daha düşük immün baskılama

Daha az yan etki

Daha az duyarlılaşma (PRA)

“Birçok hasta ilk naklindeki HLA uyumsuzluğunun sıkıntısını tekrar nakil ihtiyacı olduğunda farketmektedir”



Anti-HLA Antikorları

- İnsan lökosit antijenlerine (Human Leucocyte Antigens-HLA) karşı oluşmuş olan antikorlar
- Kan Transfüzyonu
- Gebelik (Özellikle Multiparlarda)
- Retransplant (2. veya 3. transplantasyona hazırlanan hastalar)



Anti-HLA Antikorları

- Duyarlı hastaların organ bulma şansları diğer hastalara göre düşüktür.
- Birçok antijene karşı antikor taşıdıkları için cross-match testleri pozitif çıkmaktadır.
- Bazı hastalar geniş spektrumda antikor üretmeye meyillidirler. Özellikle nadir doku grupları (A29, A33, B37, B70, CW3) taşıyan ve BW4 ve BW6 homozigot olan hastalar



CDC Cross Match

- Patel ve Terasaki'nin 1960' ların sonlarında böbrek allograft alıcısının serumunun donörün lenfositleriyle verdiği reaksiyonu izledikleri "Lenfosit Cross Match testi" (LCM), halen doku tipleme laboratuvarlarında nakil öncesinde uygun solid organ alıcısını seçmek için çalışılmaktadır.
- HLA Laboratuvarları CM için en az iki yöntem kullanmaktadırlar. Kompleman bağımlı sitotoksisite ve flow sitometrik testler.



CDC XM

- Kompleman aktivasyonu yoluyla hücre ölümüne dayanan bir yöntem,
- Kompleman yolaklarından klasik yol aktivasyonu,
- Potansiyel sitotoksik antikörlerin varlığını doğrudan tespit etmemizi sağlayan tek test.



CDC XM



- Sadece aktivasyonu komplemana bağlı olan antikorların (IgG1,IgG3) saptanabilmesi,
- Canlı lenfosit izolasyonuna ihtiyaç göstermesi, subjektif ve zaman alıcı olması gibi dezavantajları vardır
- CDC-XM, nakil sonrası saatler/günler içerisinde meydana gelen ve allogreft rejeksiyonu ile greft kaybı açısından artmış risk ile ilişkili olan düşük seviyedeki DSA'ları tespit etmek için yeterli hassasiyete sahip değildir (Gebel HM et al. Am J Transplant, 2003)



CDC XM

➤ **CDC-XM: Pozitif**

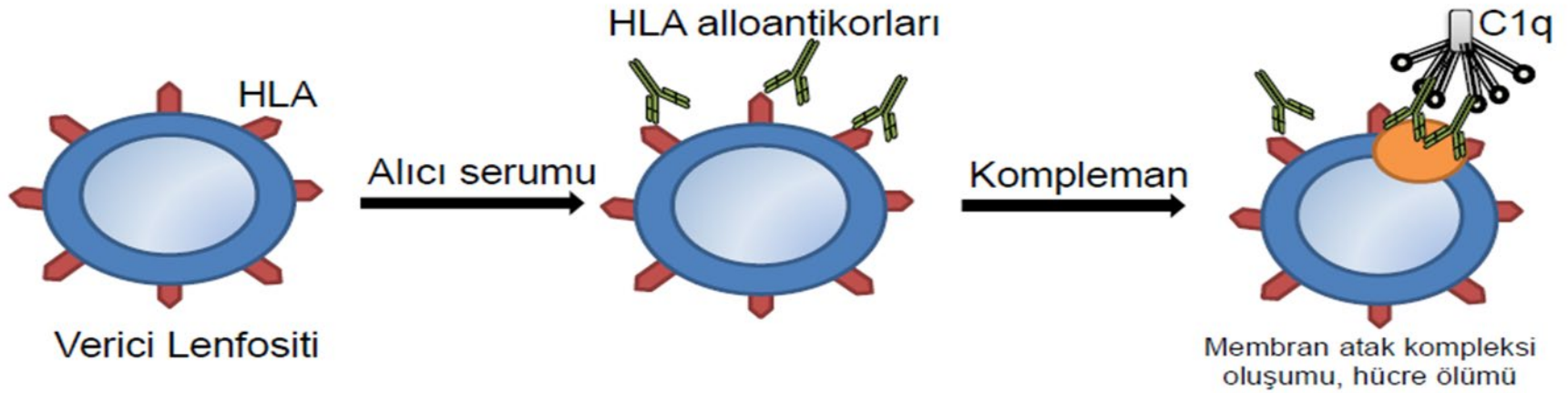
- Yüksek immünolojik risk

➤ **CDC-XM: Negatif**

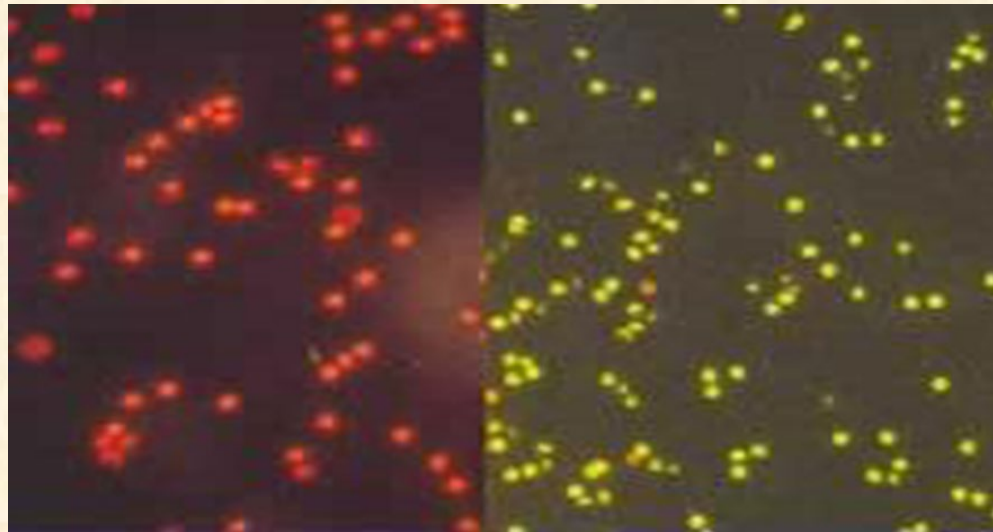
- Düşük titre antikor var mı?

-T ve B Cxm ayrımı yoksa HLA sınıf II'ye karşı DSA var mı?

CDC XM



Lizise uğrayan hücre membranından içeri girebilen **Ethidium Bromide** parçalanmış hücrelerin kırmızı boyanmasını sağlar



Reaksiyonun olmadığı hücreler Acridin Orange ile yeşil floresan verir.



CDC XM



SCORING OF COMPLEMENT-DEPENDENT CYTOTOXICITY REACTIONS

Dead cells, %	Assigned value	Interpretation
0–10	1	Negative
11–20	2	Borderline negative
21–50	4	Weak positive
51–80	6	Positive
80–100	8	Strong positive
Unreadable	0	No cells, contamination, bubble



Flow Sitometri Cross-Match

- CDC Cross-Match'e göre daha hassas,
- DSA tespitinde kullanılan hücre tabanlı mevcut en iyi test, ancak anlamlı olmayan antikörlerin, hücre yüzeyine özgül olmayan bağlanmaları nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilir.(Wen R et al. Kidney Int, 2006)
- Duyarlılığı yüksek
- Düşük titredeki HLA antikörlerini
- Antikörün hedef hücrelerini (T-XM, B-XM)
- Tüm IgG alt gruplarını saptar.
- Maliyeti CDC Cross-Match testine göre daha yüksektir



Flow Sitometri XM



Flow Cross-match

Lenfosit (donör) + Serum (alıcı)

30 dk

YIKAMA

Goat anti-human IgG (FITC)

10 dk

CD19 (PE) + CD3 (PerCP)

20 dk

ANALİZ

YIKAMA

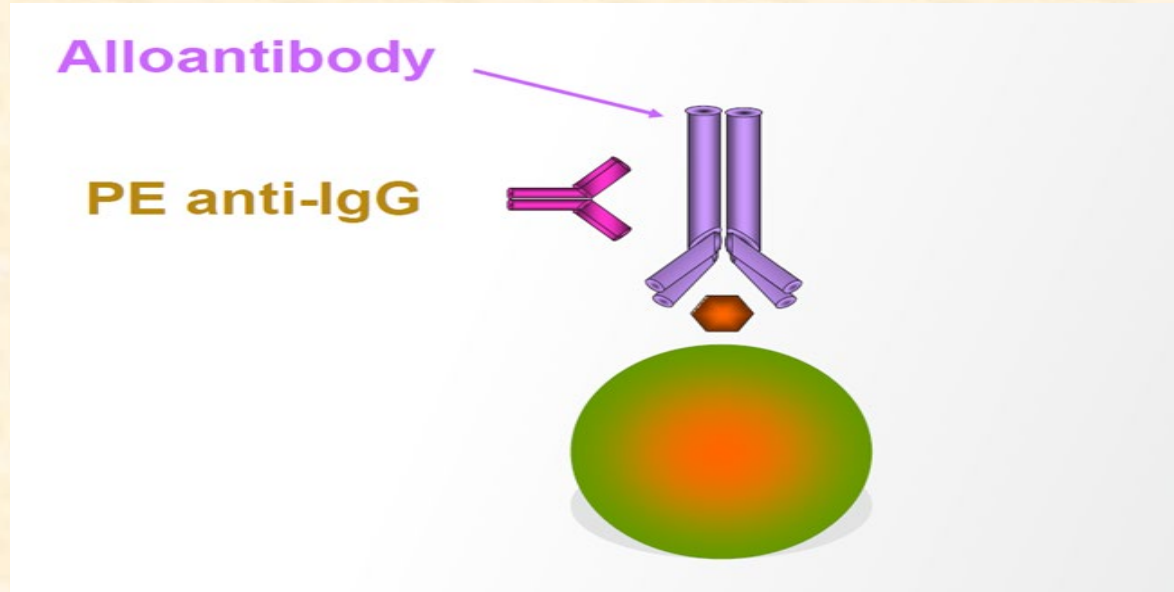


Flow Sitometri XM

T Hücre Crossmatch	B Hücre Crossmatch	Değerlendirme
Negatif	Negatif	HLA sınıf I ve II alloantikoru bulunmuyor/ Alloantikoru değerlendirilemeyecek kadar düşük seviyede
Pozitif	Pozitif	Yalnız HLA sınıf I alloantikoru var/ Hem HLA sınıf I hem HLA sınıf II alloantikoru var
Negatif	Pozitif	HLA sınıf II alloantikoru var/ HLA sınıf I'e karşı zayıf alloantikoru var
Pozitif	Negatif	Hatalı test

Solid Faz Immunoassay-Luminex

- Test serumu önce sınıf I ve sınıf II HLA antijeni kaplı mikroboncuklarla inkübe edilir.
- Serumdaki mevcut HLA antikoru (varsa) boncukların üzerindeki antijenlere bağlanır





Solid Faz Immunoassay-Luminex

Panel Reaktif Antikor (PRA)-Tarama

- Donör lenfositleri paneline karşı anti-HLA antikorların varlığını belirlemek için yapılır
- Paneldeki tarama boncukları, HLA sınıf-I ve II antijenlerine karşı üretilmiş IgG antikorlarını tespit etmek için tasarlanmıştır
- Farklı bireylerden elde edilmiş HLA sınıf-I ve II antijenleri saflaştırılarak mikroboncuklara tutturulmuştur



Single Antijen-Luminex



- Test prensibi ve uygulanışı açısından PRA tarama ve tanımlama ile aynıdır.
- Farkı, herbir boncuğun tek bir antijen içermesidir.
(A*02:01 -veya- A*02:03 -veya- A*02:06 gib)
- Boncuklar (Bead'ler), HLA Sınıf I için 97 antijen, HLA Sınıf II için 95 antijen içermektedir.



Single Antijen-Luminex



- Tek HLA molekülleri ile kaplanmış [single antigen bead (SAB)] solid faz çalışmaları, hastanın HLA antikor spesifisitelerini, donörün HLA tiplemesi ile sanal olarak karşılaştırarak donöre özgü HLA antikorlarının saptanmasına imkan sağlar.
- Özel bir test olan SAB ile saptanan donöre özgü antikor (DSA)'ların klinik ile ilişkisinin belirlenmesi son derece önemlidir.

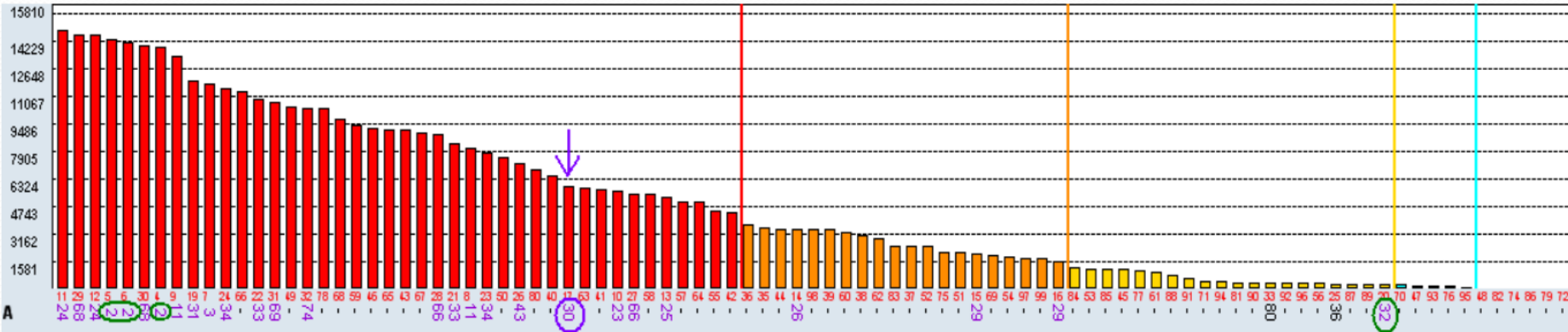


Single Antijen-Luminex

➤ Boncuğun pozitif ya da negatif olup olmadığını belirlemek için "arka plan MFI (background MFI)" değeri, boncuğun "Ham MFI (Bead Raw MFI) değerinden çıkartılır.

Pozitif nedir?

Negatif nedir?



MFI 2000

MFI değerleri için konsensus yok!!!: DSA için değişik yorumlamalar : evet/hayır



Single Antijen Explex Kiti



- Boncuklar Tek Antijen içerir

A*02:01, A*02:03, A*02:06, A*02:10

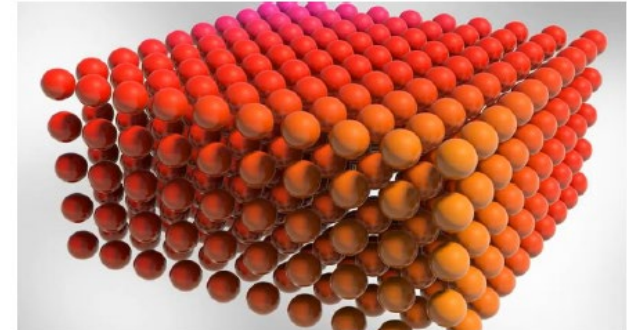
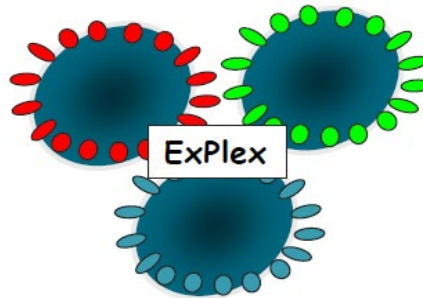
- Boncukları kaplamak için rekombinant teknoloji kullanır

- 500 adede kadar floresan kodlu boncuk mevcuttur.

- 54 Yeni Sınıf I alelleri

- 24 Yeni Sınıf II alelleri

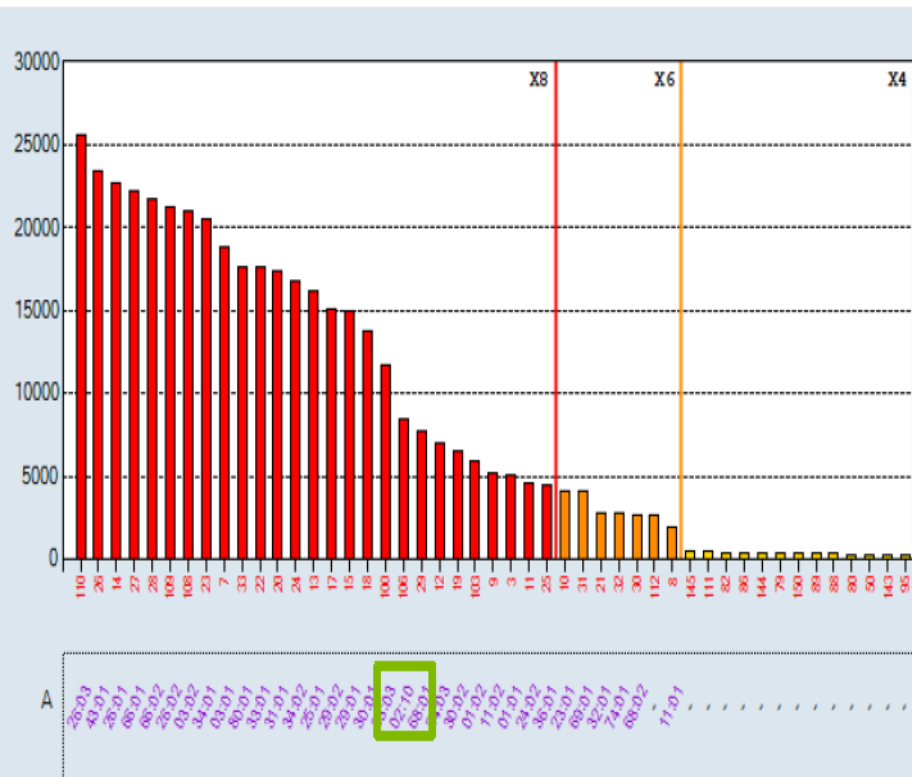
- LABScan3D gerektirir



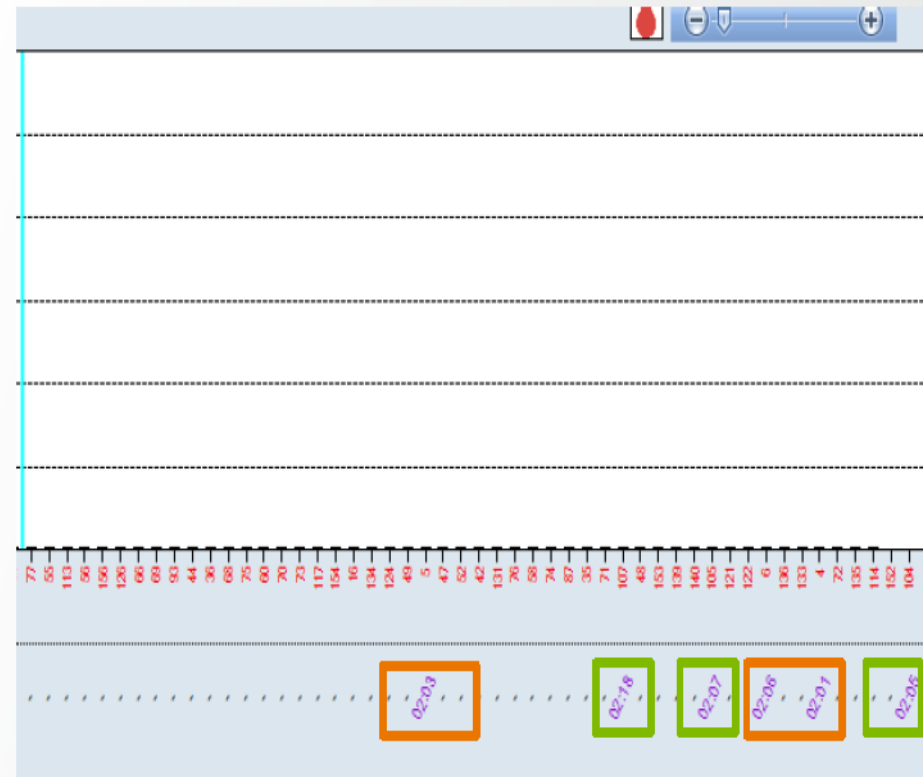


Core Kit: Sample is negative for A2 – A*02:01, A*02:03, A*02:06

Explex Kit: Sample is **Positive** for **A*02:10**



Core Kit A2 Specificities



ExPlex A2 Specificities



Luminex teknolojisi antikor kitleri



- Duyarlıdır,
- Kadavra çalışmasında soğuk iskemi süresini kısaltır,
- Yüksek oranda sensitif hastaların kabul edebileceği graft HLA tipi önceden belirlenebilir,
- Bekleme listesindeki süre ???
- Boncuk temelli
- Denatüre edilmiş HLA antijenleri kullanıldığından yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir.
- MFI değerleri??
- HLA tiplene yüksek çözünürlüklü olması önemli
- Maliyet



HLA Antikor Yöntemlerinin Karşılaştırılması



HLA ANTİKOR TARAMA YÖNTEMLERİ

	CDC	ELISA	FCM	SPA (Luminex)
Duyarlılık	+	++	+++	++++
Özgüllük	+++	+	++	+++
HLA antikorları	+	+	+	+
Non_HLA antikor	+	-	+	+, MICA
C fikse eden antikorlar	+	+	+	+
C fikse etmeyen antikorlar	-	+	+	+
Alt sınıf	IgG1,G3,IgM	IgG1,G2,G3,G4	IgG1,G2,G3,G4,IgA,IgM	IgG1,G2,G3,G4
Canlı hücre gereksinimi	+	-	+	-
Avantajı	Fonksiyonel test	C fikse eden / etmeyen antikorların ikisi de tayin edilebilir	Bütün antikorları tayin eder, sensitize/retransplant hastalarda önemli	DSA'ları tanımlar Sanal CM
Sınırlamaları	C fiske etmeyen antikorları tayin edemez	Non HLA antikorları tayin edemez	Yanlış +/- sonuçlar	Yanlış +/- sonuçlar, Optimal MFI değerleri konusunda konsensus yok



Sonuç Olarak

- Renal transplantasyonda başarılı sonuçlar elde edebilmek için deneyimli ve donanımlı bir “HLA Laboratuvarı-İmmünoloji ekibi ” ile çalışmak şarttır.
- Pretransplant immunolojik risk değerlendirilmesi iyi yapılmalıdır.
- Bu riskler hastaya objektif şekilde anlatılmalıdır.
- Posttransplant dönemde İmmünoloji ve Patoloji ile sıkı işbirliği devam etmelidir.



- Kan transfüzyonu yapılmışsa DTL mutlaka bilgilendirilmeli ve 1 ay sonra antikor testi için kan alınmalıdır.
- Hastadan antikor tayini için kan alınırken herhangi bir enfeksiyonun olması antikor testini etkilemektedir.
- Özellikle çoklu gebelik ve retransplant (2. veya 3. transplantasyona hazırlanan hastalar) bilgileri laboratuvarla paylaşılmalıdır.

Soğuk iskemi zamanı

HLA Uyumu

İmmünesupresyon

PRA

Graft Sağkalım

Gecikmiş graft
fonksiyonu

Alıcı Yaşı

Verici yaşı

Akut rejeksiyon





DİNLEDİĞİNİZ İÇİN TEŞEKKÜRLER...