МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-р Петя Стефанова Янкова

АЛОИМУНЕН ОТГОВОР – ОЦЕНКА НА РИСКА ОТ РАЗВИТИЕ НА АНТИТЯЛО-МЕДИИРАНА РЕАКЦИЯ НА ОТХВЪРЛЯНЕ ПРИ БЪБРЕЧНА ТРАНСПЛАНТАЦИЯ

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД
За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
ДОКТОРСКА ПРОГРАМА „ИМУНОЛОГИЯ“

Научен ръководител:
Проф. д-р Красимир Проданов Янев, дм

Научен консултант:
Проф. д-р Елисавета Йорданова Наумова-Григорова, дмн

София, 2024

СЪДЪРЖАНИЕ

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 5
1. ВЪВЕДЕНИЕ 7
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 10
2.1. ИСТОРИЧЕСКИ ПРЕГЛЕД 10
2.2. HLA СИСТЕМА – ГЕНЕТИКА, СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ 12
2.3. СЪВМЕСТИМОСТ МЕЖДУ ДОНОР И РЕЦИПИЕНТ 24
2.4. ДРУГИ ФАКТОРИ, ДОПРИНАСЯЩИ ЗА ОТХВЪРЛЯНЕ НА ПРИСАДКАТА . 30
2.4.1. NK КЛЕТКИ 30
2.4.2. НЕ-HLA АНТИГЕНИ 30
2.4.3. MICA АНТИГЕНИ 32
2.4.4. НЕИМУНОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ 33
2.4.4.1 ФАКТОРИ, СВЪРЗАНИ С ДОНОРА 33
2.4.4.2. ФАКТОРИ, СВЪРЗАНИ С РЕЦИПИЕНТА 34
2.4.4.3. ВРЕМЕ НА СТУДОВА ИСХЕМИЯ 34
2.4.4.4. ЗАБАВЕНА ФУНКЦИЯ НА ПРИСАДКАТА 34
2.4.4.5. НАРУШЕНА ГЛОМЕРУЛНА ФИЛТРАЦИЯ 34
2.5. МЕХАНИЗМИ НА КЛЕТЪЧНО ОТХВЪРЛЯНЕ 35
2.6. МЕХАНИЗМИ НА ХУМОРАЛНО ОТХВЪРЛЯНЕ 36
2.6.1. КЛИНИЧНО-ПАТОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ABMR 40
2.6.2. КЛАСИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ABMR 41
2.6.2.1. СВРЪХОСТРО ОТХВЪРЛЯНЕ 41
2.6.2.2. ОСТРА АНТИТЯЛО-МЕДИИРАНА РЕАКЦИЯ 42
2.6.2.3. ХРОНИЧНА АНТИТЯЛО-МЕДИИРАНА РЕАКЦИЯ 43
2.6.2.4. СУБКЛИНИЧНО АНТИТЯЛО-МЕДИИРАНО ОТХВЪРЛЯНЕ 45
2.7. НЕИНВАЗИВНИ БИОМАРКЕРИ ЗА МОНИТОРИРАНЕ НА ABMR 46
2.7.1. ДОНОР-СПЕЦИФИЧНИ АЛОАНТИТЕЛА (DSA) 46
2.7.2. ДРУГИ ПОТЕНЦИАЛНИ БИОМАРКЕРИ ЗА МОНИТОРИРАНЕ НА ABMR 49
2.7.3. МЕНИДЖМЪНТ НА СЪЩЕСТВУВАЩИ DSA 50
2.8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОБОСНОВКА НА ПРОУЧВАНЕТО 56
3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 58
3.1. ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО 58
3.2 ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО 58

4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ 60
4.1.ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА И БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ 60
4.1.1. ПОДБОР НА ГРУПИТЕ 60
4.2. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА АЛОАНТИТЕЛА 62
4.2.1. СТАНДАРТЕН КОМПЛЕМЕНТ-ЗАВИСИМ ЛИМФОЦИТОТОКСИЧЕН МЕТОД (COMPLEMENT-DEPENDENT CYTOTOXICITY – CDC)..... 62
4.2.2. ОТКРИВАНЕ НА HLA АНТИТЕЛА ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА МИКРО-СФЕРОВ ФЛУОРИМЕТРИЧЕН МЕТОД (LUMINEX) 67
4.2.3. ОТКРИВАНЕ НА HLA АНТИТЕЛА ЧРЕЗ ИЗПОЛЗВАНЕ НА ТВЪРДО-ФАЗОВИ АНАЛИЗИ С ЕДИНИЧНИ АНТИГЕНИ..... 71
4.2.4. ТРИЦВЕТЕН МЕТОД ЗА ФЛОУЦИТОМЕТРИЧЕН КРОСМАЧ (FLOW-CYTOMETRIC CROSSMATCH – FCXM)..... 78
4.2.5. МИКРОСФЕРОВ МЕТОД ЗА ОТКРИВАНЕ НА ДОНОР-СПЕЦИФИЧНИ АНТИТЕЛА (ДОНОР-СПЕЦИФИЧЕН КРОСМАЧ) 81
4.3. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ..... 87
5. РЕЗУЛТАТИ 89
5.1. ОБОБЩЕНИЕ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ, КЛИНИЧНИТЕ И ИМУНОЛОГИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ ОТ ПЪРВА ГРУПА..... 89
5.1.1. ХАРАКТЕРИСТИКА НА АЛОАНТИТЕЛНИЯ СТАТУС 96
5.1.2. СЕНСИБИЛИЗИРАЩИ СЪБИТИЯ 103
5.1.2.1. БРЕМЕННОСТ 103
5.1.2.2. КРЪВОПРЕЛИВАНЕ..... 103
5.1.3. СРАВНЕНИЯ НА HLA КЛАС I ПРИ РЕГИСТРАЦИЯ И ПРИ ПЪРВИ, ВТОРИ И ТРЕТИ СКРИНИНГ 108
5.1.4. СРАВНЕНИЯ НА HLA КЛАС II ПРИ РЕГИСТРАЦИЯ И ПРИ ВТОРИ И ТРЕТИ СКРИНИНГ 110
5.2. ОБОБЩЕНИЕ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ, КЛИНИЧНИТЕ И ИМУНОЛОГИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ ОТ ВТОРА ГРУПА. 111
5.3. ОБОБЩЕНИЕ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ, КЛИНИЧНИТЕ И ИМУНОЛОГИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ ОТ ТРЕТА ГРУПА..... 120

5.4 ОБОБЩЕНИЕ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ, КЛИНИЧНИТЕ И ИМУНОЛОГИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ ОТ ЧЕТВЪРТА ГРУПА. 128
5.5 ОБОБЩЕНИЕ НА ДЕМОГРАФСКИТЕ, КЛИНИЧНИТЕ И ИМУНОЛОГИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПАЦИЕНТИ ОТ ПЕТА ГРУПА. 136
6. ОБСЪЖДАНЕ 145
6.1. ДЕМОГРАФСКИ ХАРАКТЕРИСТИКИ 145
6.2. КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ 146
6.3. ИМУНОЛОГИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ 148
6.3.1. АЛОИМУНЕН СТАТУС, СЕНСИБИЛИЗИРАЩИ СЪБИТИЯ 148
6.3.2. HLA СПЕЦИФИЧНОСТИ НА АЛОАНТИТЕЛАТА 156
6.3.3. ДИНАМИКА НА АЛОИМУННАТА РЕАКТИВНОСТ 161
6.3.4. ВЕРОЯТНОСТ ЗА НЕСЪВМЕСТИМИ ДОНОРИ 165
6.4. КРОСМАЧ РЕАКЦИЯ 168
6.4.1. FCXM 168
6.4.2. МИКРОСФЕРОВА ТЕХНОЛОГИЯ ЗА ОЦЕНКА НА КРОСМАЧ РЕАКТИВНОСТТА (LumXM) 174
6.4.3. ВИРТУАЛЕН КРОСМАЧ 177
7. ОБОБЩЕНИЕ 182
8. ИЗВОДИ 186
9. ПРИНОСИ 188
10. ПРИЛОЖЕНИЯ 189
11. БИБЛИОГРАФИЯ 214

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица:

Аг – антиген, антигенен

АПК – антиген-представяща клетка

Ат – антитела

БТ – бъбречна трансплантация

ВСИ – време на студова исхемия

ДК – дендритни клетки

Иг (Ig) – имуноглобулин

ИК – имунни комплекси

КС – кортикостероиди

МФ – моноцити/макрофаги

ХБН – хронична бъбречна недостатъчност

На латиница:

ABMR – антитяло-медиирана реакция на отхвърляне

APC – antigen-presenting cell

AT1R – ангиотензин II тип 1 рецептор

AT1R-Ab – антитела срещу ангиотензин II тип 1 рецептор

CD – cluster of differentiation

CDC – комплемент зависим лимфоцитотоксичен тест

CMV – цитомегаловирус

cPRA – изчислени панел-реактивни антитела

CTL – цитотоксични Т-клетки

DAMPs – damage associated molecular patterns

DGF – забавена функция на присадката

dnDSA – de novo синтезирани донор-специфични алоантитела

DSAs – донор-специфични алоантитела

dsDNA – двойноверижна ДНК

EBV – Epstein-Barr вирус

FCXM – флоуцитометричен кросмач

GFR – съотношение на гломерулна филтрация

HAR – свръхостро отхвърляне

HLA – човешки левкоцитни антигени

IFN – интерферон

IL – интерлевкин

IVIG – интравенозен имуноглобулин

KPD – kidney pair donation

LmXM – донор-специфичен кросмач

MFI – среден интензитет на флуоресценция

MHC – главен комплекс на тъканна съвместимост

NK – Natural killers, естествени клетки убийци

PCR – Polymerase chain reaction, полимеразна верижна реакция

PNV – отрицателна предиктивна стойност

PPV – положителна предиктивна стойност

PRA – панел-реактивни антитела

SAB – единични антигенни сфери

TCR – Т-клетъчен рецептор

TGF-α – трансформиращ растежен фактор-α

Th –Т-хелперни клетките

TLR – toll-like рецептор

TNF – tumor necrosis factor

VEC – vascular endothelial cell

VXM – виртуален кросмач

xMHC – разширен MHC

BCR – В-клетъчен рецептор

XM – кросмач

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Трансплантацията е едно от най-значимите медицински постижения на XX век. Тя често е единственото лечение в краен стадий при чернодробна, сърдечна и белодробна недостатъчност. Пациентите с хронична бъбречна недостатъчност (ХБН) могат да бъдат лекувани чрез различни видове диализно лечение, а бъбречната трансплантация (БТ) обикновено се приема като най-доброто средство както за подобряване качеството на живот, така и за ефективността на разходите на здравната система. Тя е най-често провежданата трансплантация в световен мащаб и е метод за лечение на пациенти в краен стадий на хронично бъбречно заболяване. Докато етиологията на самото заболяване може да бъде специфична, последствията от неговата увреда са системни. Вземането на орган с цел трансплантация може да се извърши от човешки труп (след като смъртта е установена, съгласно медицински критерии и ред, определени от Наредба № 14 от 15 април 2004 г. на Министерството на здравеопазването) или жив донор, от когото може да се вземе само един от чифтните органи, след предварително установяване, че органът, който се взема, и оставащият орган имат напълно запазена функция.

По своята същност трансплантацията е резултат от техническия напредък и фактът, че тя е технически осъществима, даде повод за задълбочено изследване на имуногенетичните механизми, водещи до клинично значими реакции на отхвърляне. Най-новите данни на СЗО (Global Observatory on Donation and Transplantation – GODT) показват, че над 150 000 органни трансплантации се извършват в световен мащаб и въпреки че са впечатляващи, се смята, че този брой представлява помалко от 10% от реалните нужди. Недостигът на донорни органи води до висока степен на смъртност сред нуждаещите се, които са в списъци на

чакащи органна трансплантация. Налице са също и редица етични и законови затруднения, свързани с трансплантацията.

Около 11-13% от възрастното население страдат от заболявания на бъбреците и една част от тях прогресират до бъбречна недостатъчност. Прогнозите са, че 2 милиона души по света страдат от ХБН, а броят на пациентите, които се диагностицират, продължава да нараства с 5-7% годишно. Диализата и трансплантацията са единственият изход, но около 58% от тези болни не достигат до тях, защото умират от сърдечносъдови усложнения, което е с 30 до 40 пъти повече в сравнение с общата популация. Понастоящем пациентите с бъбречна недостатъчност имат две възможности за лечение:

1. Трансплантация: бъбреци от живи и починали донори.
2. Диализа: хемодиализа или перитонеална диализа.

За пациенти, които са трансплантирани, перспективата е положителна. Но има остър недостиг на донорски органи. Има повече от 100 000 пациенти с бъбречна недостатъчност в списъка на чакащите за трансплантация в САЩ, а в България техният брой е около 783.

Ползата от трансплантацията трябва да бъде оценявана в дългосрочен план. Данните за процента преживяемост на трансплантираните бъбреци след една година в различните страни са достъпни на уебсайта на националните организации за трансплантация или са публикувани в медицинската научна литература. Те демонстрират, че БТ дава добри резултати във всички аспекти. Освен това тези данни показват, че разликата в преживяемостта на присадката при трансплантиране на бъбрек от жив и от трупен донори е малка, факт, който насърчава използването на органи от трупни донори, когато е възможно, вместо да се поема риск, макар и малък, да се навреди на жив донор.

Основна цел на трансплантацията е подобряване на дългосрочната преживяемост. Повишението ѝ ще намали броя на пациентите, връщащи се на диализа, и имащи нужда от повторна трансплантация, ще подобри качеството и продължителността на живота им, а това ще доведе и до

намаляване на финансовата тежест както за пациентите, така и за здравната система. Известно е, че след успешна БТ реципиентите възстановяват бъбречната функция, която обикновено достига приблизително до 60% от функция на донорния бъбрек. С течение на времето настъпва постепенното ѝ намаляване, което е резултат от множество променливи, включително фактори, свързани с донора и реципиента, забавена функция на присадката (DGF) и епизоди на остро отхвърляне. По литературни данни 5-годишната преживяемост след трансплантация в световен мащаб е 88% от живи донори и 78% от починали донори. Продължителността на живота на бъбречно трансплантирания пациент е достигнала приблизително 22 години в световен мащаб. Увеличаването ѝ е свързано до голяма степен и с имунологичната подготовка и посттрансплантационния мониторинг, както и с трансплантационната фармакология.

Наличието на алоантитела в реципиентите, чакащи БТ, срещу човешки левкоцитни антигени (HLA) на потенциални донори се смяташе за основна пречка за провеждане на бъбречна трансплантация. С навлизането в рутинната практика на нови методи за измерване и характеристика на силата на тези донор-специфични антитела (DSAs), стана възможно провеждането на БТ и при силно сенсибилизирани реципиенти, след стратификация на имунологичния риск.

Предварително формираните антитела срещу HLA могат да доведат до антитяло-медиирано отхвърляне (AMR) и остават значителна бариера за провеждане на бъбречна трансплантация. Откриването на HLA антитела, особено на донор-специфични антитела (DSA), е много важна стъпка за оценка на риска преди трансплантация, свързана с оптимален подбор на донор, както и за преживяемост на присадката.

В този труд ние описваме предтрансплантационния алоантителен статус на пациентите, включени в листата на чакащи БТ, шанса тези пациенти да получат подходящ орган и възможността да го съхранят функциониращ за по-дълъг период от време.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. ИСТОРИЧЕСКИ ПРЕГЛЕД

Идеята за органна трансплантация е хирургична концепция, базирана на натрупаните познания по анатомия и физиология на органа, който трябва да остане жизнеспособен и да изпълнява своята биологична функция. В началото на XX в. Alexis Carrel изобретява хирургична техника за свързване на кръвоносни съдове, за което през 1912 година получава Нобелова награда. Той прилага тази техника за трансплантация на бъбрек при куче и котка. Това, което установява, е кратката преживяемост на присадката, въпреки добрата хирургична техника.

През 40-те и 50-те години на XX в. Morten Simonsen в Дания и William Dempster в Лондон, независимо един от друг, описват експерименти, подобни на този на Carrel. При трансплантиране на втори бъбрек от същия донор на същия реципиент присадката се унищожава почти мигновено. И двамата описват хистологични промени, настъпили в алографта, който е инфилтриран с неутрофили, еозинофили, макрофаги, лимфоцити и плазматични клетки, като тези възпалителни промени са придружени от некроза на нефроните. И Simonsen, и Dempster обясняват погрешно наблюдението си, като смятат, че клетките вероятно са от присадения орган и всъщност са реакция на присадка срещу гостоприемника [1, 2].

По същото време Peter Medawar et al. [3] публикуват механизма на отхвърляне на кожни присадки при зайци и мишки. Първите присадки след няколко дни се инфилтрират с левкоцити, а некроза се развива след 7-10 дни. Втората присадка от същия донор обикновено се унищожава почти веднага, без дори да се изгради капилярна мрежа. Без съмнение групата на Medawar доказва имунните механизми, стоящи в основата на реакция на отхвърляне при кожни присадки. Изследователите смятат, че

бъбречните присадки между идентични близнаци ще се държат като кожни присадки между идентични близнаци и при условие че операцията е успешна, присадката ще бъде приета без никаква имунна реакция.

Medawar, Billingham и Brent извършват серия от контролирани експерименти между инбредни видове мишки, при които индивидите от всеки вид са идентични. Кожните присадки между членовете на един вид се приемат без проблем, докато присадките от даден вид, трансплантирани в индивиди от друг вид, биват отхвърлени в резултат на процеси, които по-късно са наречени реакция на отхвърляне. Групата на Medawar [3] прави още едно значимо за трансплантологията откритие – „специфична имунологична толерантност“, за което получава Нобелова награда за физиология или медицина. Това откритие повдигна практическия въпрос дали пластичността на развиващата се фетална имунна система може да бъде временно възпроизведена във възрастен, докато се проведе трансплантацията, и след това да бъде възстановен нормалният имунитет.

В началото на 50-те години на миналия век David Hume провежда експерименти, при някои от които присадките функционират и филтрират урина близо 5 месеца. При проведеното хистологично изследване се установява клетъчна инфилтрация в трансплантирания орган, а също така и силно изразено стеснение на артериолите. Наблюдаваният хистологичен образ по-късно е определен като „хронична реакция на отхвърляне на трансплантата“.

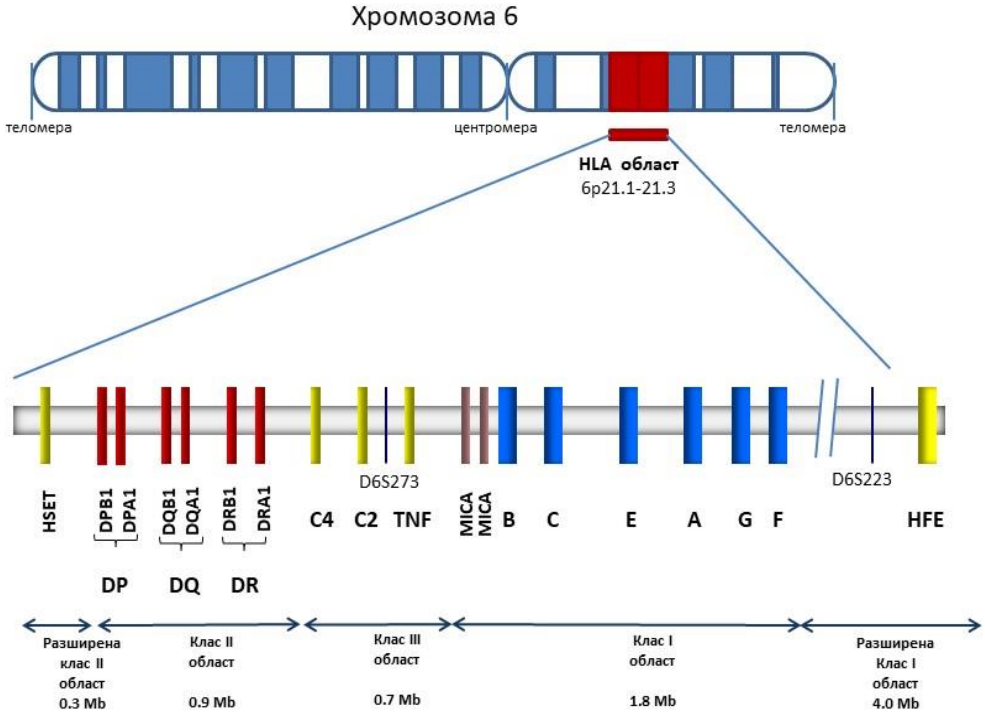
През 1954 г. Murray et al. [4] извършват първата успешна бъбречна трансплантация между близнаци в Peter Bent Brigham Hospital, за което през 1990 година получават Нобелова награда за физиология или медицина. Пациентът е 24-годишен мъж с бъбречна атрофия. Донор е неговия брат близнак. Подготовката за трансплантация включва доказване на идентичност на близнаците чрез провеждане на кожна трансплантация между двамата [4], която е отчетена на 31-вия ден като успешна, т.е. до-

казана е тъканна съвместимост между донор и реципиент. Този тест може да се разглежда и като първия опит за кросмач реакция между донор и реципиент. Трансплантираният бъбрек функционира 12 месеца, след което настъпват увреждания.

Едно от най-значимите открития, свързани с органната трансплантацията, е откриването на главния комплекс за тъканна съвместимост (Major Histocompatiblity Complex – MHC). MHC е термин, използван за описание на група от гени, които кодират различни молекули на клетъчната повърхност, антиген-представящи молекули и други протеини, участващи в имунния отговор. Комплексът човешки левкоцитен антиген (HLA) е синоним на човешкия MHC. HLA регионът е разположен върху късото рамо на шеста хромозома в позиция 6p21.3. Класическият MHC обхваща 3,6 Mb и включва повече от 200 гена, включително много гени на имунната система, но също и гени с все още неизвестна имунна функция. Локализацията на гени, свързани с MHC извън класическите и потвърждаването на неравновесна връзката, доведе до предложението за разширен MHC (xMHC). Този регион обхваща 7,6 Mb и съдържа над 400 локуса. Пълната структура и генна карта на HLA региона са публикувани в Human leukocyte antigens (HLA): A roadmap; https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/

2.2. HLA СИСТЕМА – ГЕНЕТИКА, СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ

MHC гените са групирани в три отделни неприпокриващи се области, обозначени от центромер към теломер, като клас II, III и I област, съответно (фигура 1).



Фигура 1. *Генетична организация на MHC комплекса (Клинична имунология, Казуси, 2019)*

Областта HLA клас I се състои от три групи гени, които кодират протеини със сходна структура, но различни свойства. Гените от клас Ia (класически) включват три силно полиморфни гена (HLA-A, HLA-B и HLA-C), които кодират α-верига, образуваща хетеродимер с нековалентно свързана лека верига, β2-микроглобулин (β2m), кодирана от неполиморфен, не-MHC ген, разположен върху 15 хромозома. И трите молекули, кодирани от гените на клас Ia региона, се експресират върху повърхността на всички ядрени клетки [17].

Гените от клас Ib (некласически) включват три гена, кодиращи функционални молекули (HLA-E, HLA-F и HLA-G), и 12 псевдогена, които не експресират белтък, принадлежащ към тази група. Молекулите

от клас Ib показват висока степен на сходство с клас Ia в тяхната последователност и структурна връзка с β2m, но се различават от тях по ограничена до определени типове клетки експресия и ограничен полиморфизъм.

Клас I подобни гени (или клас Ic) включват седем MHC клас I свързани гени (MIC), от които само два (MICA и MICB) са силно полиморфни и кодират функционални молекули, а останалите са псевдогени. MIC протеините са структурно сходни с HLA клас I молекулите, но не могат да образуват тримолекулни комплекси, защото не се свързват с β2m и следователно нямат антиген-представяща функция. MIC гените при нормални условия се експресират главно от фибробласти и епителни клетки.

HLA клас II региона включва гени, които кодират класически (HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP) и некласически (HLA-DM и HLA-DO) молекули. Молекулите от клас II са хетеродимери на α- и β-вериги, които са кодирани от различни гени в MHC областта (α-верига от ген A и β-верига от ген B). HLA-DR регионът съдържа един мономорфен DRA ген и множество полиморфни DRB гени. Девет различни DRB гена са идентифицирани, от които четири (DRB1, DRB3, DRB4 и DRB5) са функционални и полиморфни и кодират β-веригата на HLA клас II молекулата и пет са нефункционални псевдогени (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 и DRB9). Поради съществуващата силна неравновесна връзката в HLA целият HLA комплекс се унаследява хаплотипно. При ниска честота на рекомбинация някои алелни комбинации са по-чести от очакваното.

DQ регионът съдържа пет гена (DQA1, DQA2, DQB1, DQB2 и DQB3), от които само DQA1 и DQB1 кодират функционални протеини (α- и β-вериги, съответно), които заедно образуват DQ хетеродимер, експресиран върху клетъчната повърхност. DQA1, както и DQB1 гените са

полиморфни и генерират различни „cis“ и „trans“ комбинации, създавайки четири различни DQ хетеродимери.

DP регионът съдържа два DPA гена (DPA1 и DPA2) и два DPB гена (DPB1 и DPB2), от които само DPA1 и DPB1 са функционални. Както при DQ гените, и DPA1, и DPB1 гените са полиморфни и по този начин могат да произведат четири различни DP хетеродимера чрез различни „cis“ и „trans“ комбинации.

Клас III на MHC включва гени, които нямат структурна или функционална връзка с HLA гените. Голям брой от клас III гените кодират молекули, участващи в обработката и представянето на антигена, в системата на комплемента и в процесите на възпаление.

Повечето полиморфизми в кодиращите HLA региони съответстват на аминокиселинни позиции, които взаимодействат с антигенни пептиди или Т-клетъчен рецептор [15]. Полиморфизмите от HLA клас I преобладават в първите 180 аминокиселини от тежката верига, а за клас II се откриват в първите 90-95 аминокиселини от α- и/или β-вериги. Някои HLA гени имат над 1000 алела и техните хаплотипни комбинации създават голямо разнообразие в различните популации.

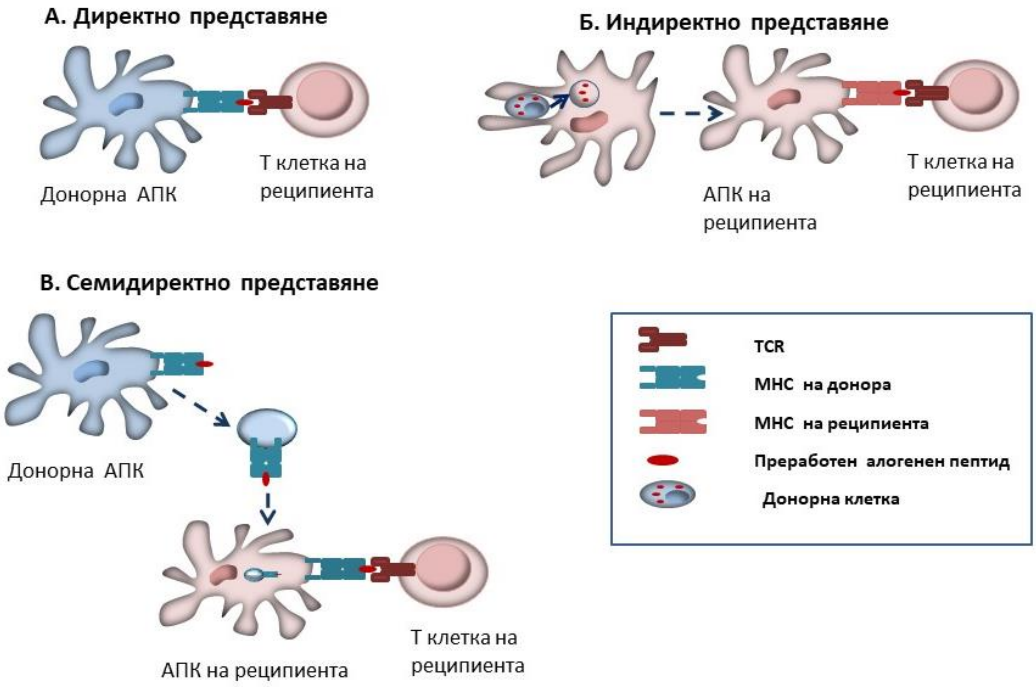
Ролята на HLA молекулата е да представи пептид на Т-лимфоцитите. HLA клас I молекули представят вътреклетъчни протеини. Това са собствени пептиди и вирусни пептиди, резултат от инфекция. HLA клас II молекули представят пептиди, получени от разграждането на извънклетъчни протеини. Представянето на пептиди на Т-клетките е задължително условие за активиране на придобития имунен отговор.

Провеждането на органната трансплантацията се усложнява от наличието на антигени, които са различни между донор и реципиент и водят до отключване на патологичен алоимунен отговор. Молекулите от HLA клас I се експресират върху клетъчната повърхност на всички ядрени клетки, докато молекулите от клас II се експресират само от анти-

ген-представящи клетки, като дендритни клетки, макрофаги, В-лимфоцити и активирани Т-лимфоцити.

HLA молекулите разграничават собствените от чуждите тъканни антигени. Има две основни форми на алогенно разпознаване, директно и индиректно [18]. При директното алогенно разпознаване донорни HLA-пептидни комплекси, представени от донорни дендритни клетки, се разпознават директно от Т-клетките на реципиента, което води до имунен отговор срещу клетките, експресиращи комплекса от чужди молекули. Този отговор е насочен срещу алопептида, представен от чуждата HLA молекула или срещу самата HLA молекула на донорна. При индиректното алоразпознаване алопептидите се представят от антиген-представящите клетки (АПК) на реципиента. Интересното е, че необработените донорни МНС могат да се представят на повърхността на АПК на реципиента и да се разпознаят CD4+ Т-клетки на реципиента; това е т.нар. полудиректен път на разпознаване (фигура 2). Директният път се счита за по-важен при развитие на реакции на отхвърляне. Известно е, че той отслабва постепенно, вероятно поради развитието на толеранс към паренхимните клетки на трансплантата. За разлика от това, индиректният път остава постоянно активен поради наличието на реципиентни дендритни клетки в присадката [179].

Алоантителата, особено насочените срещу HLA антигени, са бариера за дългосрочното оцеляване на алотрансплантата при БТ. Предтрансплантационните алоантитела, особено тези, насочени към донорни HLA антигени, са противопоказание или най-малкото висок риск за трансплантация, което ограничават достъпа на пациента до донорски органи. След трансплантацията тези или de novo синтезирани алоантителата се свързват с епизоди на остро и хронично отхвърляне, както и със загуба на присадка.



(А) При *директно алоразпознаване* донорните антиген-представящи клетки (АПК) представят донорни МНС молекули директно на Т-клетки на реципиента. (Б) При *индиректното алорепознаване* алоантиген от присадката (обикновено МНС антиген) се улавя, преработва и представя от АПК на реципиента (обикновено дендритна клетка – ДК) на Т-клетките чрез собствените МНС. (В) При *семидиректно алоразпознаване* АПК на реципиента улавят МНС алоантиген, който представят директно на Т-лимфоцитите като конформационно интактен протеин или го преработват и представят както при индиректното представяне. (Клинична имунология, Ръководство за студенти, 2021)

Фигура 2. *Механизми на алоразпознаване при органна трансплантация*

Първоначално за тяхното доказване са се използвали серологични методи, които са с по-ниска чувствителност и специфичност. Техниките за алоантителен скрининг претърпяват развитие от комплемент-зависим цитотоксичен анализ през ензим-свързан имуноабсорбционен анализ към мултиплексен микросферов флоуцитометричен и флуориметричен (Luminex) анализ. Скринингът и характеризирането на антитела понастоящем се извършва главно чрез анализи, базирани на Luminex технологията. Основните предимства на този метод са високата специфичност и чувствителност, възможност за мултиплексиране и автоматизация. Чрез

тях се определят не само високотитърни, но и нискотитърни комплемент фиксиращи, както и нефиксиращи комплемента алоантитела. Скрининговите анализи се използват за откриване на наличието на HLA клас I и/или II антитела, които впоследствие се специфицират чрез използване на панели от HLA антигени от клас I или клас II, при което всяка популация от гранули е покрита с множество копия на единичен рекомбинантен антиген (единични антигенни сфери или SAB). Средният интензитет на флуоресценция (MFI) се използва за извършване на полуколичествена оценка на нивото на антитялото.

Неоткриването на HLA антитяло, налично в серума на пациента, което е често срещано явление при серологични анализи, вече е порядко събитие. Въвеждането на този тип анализи на свой ред позволи приложението на т. нар. виртуалното кръстосано съвпадение (виртуален кросмач, vXM), т.е. способността за надеждно прогнозиране на съвместимостта донор/реципиент стана реалност. Друг пробив, основан на способността да се дефинира HLA антителния профил на реципиента, е въвеждането на нов термин, а именно – изчислени PRA (calculated PRA, cPRA). cPRA е оценка на вероятността за съвместимост между всеки пациент и произволен донор и се извлича от честотите на различните HLA антигени на голям брой HLA-типизирани донори в популацията. Калкулираните PRA са въведени през 2009 г. в САЩ в Националната им система за алокация на органи [19] за чакащи бъбречна трансплантация силно сенсибилизирани пациенти с cPRA > 80%. Комбинацията от vXM и cPRA има положително въздействие върху разпределението на органи от трупни донори в Съединените щати [20]. Тези обнадеждаващи резултати довеждат до създаване на софтуери за изчисляване на PRA на базата на донорния пул за съответната страна и въвеждането на cPRA като показател за оценка на тъканната несъвместимост между реципиент и

трупен донор в много системи и програми за обмен на органи за трансплантация.

Въпреки че изисква валидиране, количественото определяне на DSA може да бъде средство за оценка на риска преди трансплантация и за отговора на терапията след трансплантация за пациенти, подложени на протоколи за десенсибилизация. Не само специфичността и количеството на HLA антитялото са важни, но и функционалните им свойства (като способността им да активират комплемента), необходими за стратифициране на риска от реакция на отхвърляне. В последните години се публикуват все повече данни и за не-HLA алоантитела (напр. антитела срещу ендотелни клетки) като рисков фактор за оцеляването на присадката.

Основната причина за образуване на антитела е излагането на чужди HLA антигени в резултат на бременност, кръвопреливане или трансплантация. Синтезът на антитела е резултат от разпознаване на донорни алоантигени, включително разтворими HLA молекули [195]. В-клетките на реципиента ги разпознават чрез В-клетъчни рецептори (BCR) за извънклетъчни (донорни) антигени. Активираните реципиентни В-клетки, в ролята си на АПК, представят преработените алогенни пептиди чрез HLA клас II молекули на Т-клетки, които разпознават МНС пептиден комплекс чрез техния Т-клетъчен рецептор (TCR). Взаимодействието между CD40 лиганд на АПК с CD28 върху Т-клетки или CD80/86 върху В-клетки, комбинирано със синтеза на цитокини, улеснява диференциацията както на Т-, така и на В-клетките в ефекторни и паметови подгрупи [196]. В свое проучване Lopes et al. [203] показват наличие на алоантитела в пациенти без данни за сенсибилизация (12,3%), докато при пациенти със сенсибилизиращи събития, като кръвопреливане, бременност или трансплантация, са 22,8%, 53,1% и 88,5% съответно, т.е. антитела, индуцирани от предишна трансплантация или бременност,

показват по-високи стойности в сравнение с антитела, индуцирани от кръвопреливане. В допълнение, Higgins et al. [215] доказват, че антителата, индуцирани само от едно сенсибилизиращо събитие – бременност, показват значително по-силен отговор спрямо тези, синтезирани след първа или втора трансплантация или трансфузия. Техните резултати показват, че рискът от увеличение на донор-специфични алоантитела след БТ е най-висок, когато антителата са резултат от първоначална сенсибилизация от бременност, дори ако нивото преди трансплантацията на DSA е ниско < 500 MFI. За разлика от това, когато предишната сенсибилизация е резултат от трансплантация, ниското ниво на алоантитела преди втората трансплантация не е последвано от високи нива следтрансплантационно. Тези резултати са важни и имат значение за оценката на риска в клиничната практика, преди повторна трансплантация.

Според хуморалната теория на трансплантация сенсибилизация към HLA антигени при трансплантирани пациенти води до отхвърляне на присадката. Реактивност на едно антитялото означава неговата способност да се свърже към специфични епитопи на HLA антигените. Някои епитопи са специфични (private), т.е. се срещат само върху един антиген; докато други са споделени (public), т.е. се срещат върху два или повече антигена. Феноменът на кръстосана реактивност при анализ на алоантителата, често обясняван с кръстосано реагиращи групи (CREGs), е резултат от синтез на алоантитяло, насочено към общ епитоп, показващо положителна реакция с всички антигени, споделящи този епитоп. От 2006 г. са известни за HLA клас I 194 уникални епитопа и 56 скрити (criptic) епитопа върху дисоциирани HLA клас I (само тежка верига) [21] и 83 уникални за HLA клас II епитопа [15, 19-22], както и 7 епитопа за MICA [15, 22, 197]. Техният брой нараства и може да бъде видян на www.iedb.org при задаване на подходящите критерии.

Дефинирани са 138 специфични епитопа за един или група от два или повече интактни HLA клас I антигени. Като цяло липсва установена връзка между броя на епитопите и честотата на антигена в популацията. Например за HLA-A2, най-честия антиген, съществуват 16 епитопа, докато за A25, който е с по-малка честота, броят на епитопите е 19. Авторите [21] също така са установили, че епитопите от клас I се споделят от антигени от същия локус или от други локусни антигени – HLA-B, C или HLA-A, B, C. Например за A-локуса епитоп 422 се споделя от A-локусни антигени **A2, A3, A11, A24, A68 и A69**, дефинирани от 149A+150A+151H комбинация. Три аминокиселини на три позиции са необходими за определяне на този епитоп; и наистина, HLA−A*02:01 и A*02:06 са положителни, докато A*02:03 е отрицателен, защото не споделя епитопа. Друг пример за B-локус е епитоп 21, който се споделя от B-локусните антигени **B13, B*40:05, B41, B44, B45, B47, B49, B50, B60 (B*40:01) и B61 (B*40:02)** и е определен от 41T. Треонинът (T) е изключително уникален за антигените на позиция 41, разположена в алфа 1 домейна на HLA клас I тежката верига. El-Awar et al. посочват и епитоп 40 за C-локусни антигени. Този епитоп е споделен от C-локусните антигени **C*08:01 и C*05:01** и дефиниран от 177K, разположен в алфа 2 домейна на HLA тежката верига. Епитоп 205, споделен от A, B-локусите **A32, A74, B7, B8, B*40:05, B41, B42, B48, B60, B61, B73** и **B81,** е дефиниран от 109L+131R. Епитоп 24 се споделя от A, B-локусните Bw4-свързани антигени **A23, A24, A25, A32, B13, B*27:05, B37, B38, B44, B47, B49, B51, B52, B53, B57, B58, B59, B63** и **B77** и е определен от 82L или 83R, разположени в алфа 1 домейн на HLA клас I тежката верига. Епитоп 423 се споделя от A, B-локусните Bw4-свързани антигени **A23, A25, A32, B*27:05, B37, B38, B44, B47, B49, B51, B52, B53, B57, B58, B59, B63** и **B77** (A24, B13 отрицателни). Епитоп 246 се споделя от B, C-локусни антигени **B46, B73, Cw1, Cw7, Cw8, Cw9, Cw10, Cw12, Cw14** и

Cw16. Епитоп 38 се споделя от A, B, C-локусите антигени **A2, A25, A26, A29, A31, A32, A33, A34, A43, A66, A68, A69, A74, B73, Cw7** и **Cw17** и се определя от аминокиселина глутамин (Q) в позиция 253 на тежката верига на HLA клас I, разположена в алфа 3 домейна, близо до клетъчната мембрана.

Естествено срещащи се анти-HLA антитела са открити в здрави, неалоимунизирани мъже [26] и 96 от техните таргетни епитопи са определени [16]. Епитоп 5007 се споделя от HLA клас I A-локусни антигени **A31 и A33** и е определен от изолевцин (I) на криптирана позиция 73. Епитоп 5024 се споделя от HLA клас I B-локусни антигени **B7, B42, B54, B55, B56, B67, B81 и B82** и дефиниран от 66I + 70Q. Реакционната сила на антитялото е по-силна с епитопа след дисоциация на пептида от тежката верига.

За разлика от епитопите от клас I, 60 HLA клас II DRB1 епитопи са определени въз основа единствено на аминокиселинна последователност на DR антиген бета-верига. Например епитоп 1028 се споделя от клас II DR антигени **DR1, DR4, DR7, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR51, DR53** и **DR103** и е дефиниран от треонин (T) на позиция 77.

За HLA клас II DQB1 и DQA1 са дефинирани 18 епитопа. 15 от епитопите са разположени върху β-веригата на DQ антигена и 3 на α-веригата. Епитоп 2018 се споделя от α-вериги на **DQ4, DQ5 и DQ6** антигените и е определен от глутамин (Q) на позиция 53. Епитоп 2002 се споделя изключително от β-веригите на DQ4 антигена и се определя от левцин (L) в позиция 56. Епитоп 2010 се споделя от β-веригите на DQ антигените **DQ4, DQ5, DQ6, DQ8 и DQ9** и е определен от 45G + 46V. Епитоп 2006 се споделя от **DQ7, DQ8 и DQ9.**

HLA клас II DPB има 5 епитопа. Епитоп 4001 се споделя от HLA клас II DPB1 вериги на DP антигените **DPB1*01:01, DPB1*03:01,**

DPB1*05:01, DPB1*09:01, DPB1*10:01, DPB1*11:01, DPB1*13:01, DPB1*14:01, DPB1*17: 01 и DPB1*19:01 и се определя от 84D+85E+86A+87V, т.е. от четирите аминокиселини, необходими за определяне на епитопа. HLA клас II DP епитоп 4003 се споделя от DPB1 вериги на **DPB1*02:01, DPB1*04:02, DPB1*10:01 и DPB1*18:01** и се определя от 84D + 85E + 86A + 87V [21].

Определянето на HLA с единични антигенни сфери е опростено до изброяване на положителните специфичности, които са дали MFI стойности над 1000, т.е. антитялото от серума се е свързало с антигена от сферата. Това се вижда ясно, когато има имунологичен отговор към несъответстващ, често собствен, антиген и в някои случаи към редки антигени, като A80 и B76. Това вече може да бъде обяснено като свързване на антитела към споделени епитопи, разположени върху положителните антигени. Дефинирането на тези епитопи на HLA позволява по-добро разбиране на специфичностите, открити в серума. HLA епитопите са определени с помощта на компютърен алгоритъм (програма), чрез търсене в публикувани секвенции на клас I и клас II антигени, за определени аминокиселини в същата(ите) позиция(и), които се споделят от всички положително реагиращи антигени.

Съобщенията за подбор на донори на органи въз основа на епитопно съвпадение са многобройни. Duquesnoy съобщава за съвпадение на базата на HLA епитопи за трансплантация на органи [22, 23]. Между януари 1999 г. и декември 2008 г. Wiebe извършва анализ на 286 трансплантирани пациенти на стандартна имуносупресия, от които 39 деца [24]. Антителата са определени с флоуцитометрични микросферови тестове (FlowPRA^{TM}), като HLA антителните специфичности са потвърдени с микросфери, натоварени с единични антигени (LABScreen^{TM} single antigen beads), използвайки MFI > 300. HLA типизирането на донор и реципиент е извършено чрез ДНК методи с ниска разграничителна спо-

собност (SSOP – sequence-specific oligonucleotide probes, или SSP – sequence-specific primer). Софтуерът, използван за определяне на потенциални епитопни несъответствия, е HLAMatchmaker (HLA-Matchmaker DRDQDP Matching версия 3.0, http://www.hlamatchmaker.net). Определен е оптимален праг за несъответствия на епитопите (под 10 за HLA-DR, под 17 за HLA-DQ след медианно проследяване от 6,9 години), който е свързан с минимално развитие на клас II de novo синтезирани донор-специфични антитела (dnDSA). Анализът на специфичността на епитопа разкрива, че 3 HLA-DR и 3 HLA-DQ епитопи са независими многовариантни предиктори за развитие на клас II dnDSA и че някои епитопи изглеждат по-имуногенни от други. Несъответствието на епитопите дава по-подробна оценка на степента на разлика между донора и реципиента. Въвеждане на HLA типизирането с висока разделителна способност е част от развитие на стратегията за съвместимост на епитопно ниво, позволяващо и провеждане на VXM. Вече множество изследвания показват, че HLA-DQ dnDSA се срещат по-често от HLA-DR dnDSA и са свързани с антитяло-медиирана реакция на отхвърляне (ABMR), гломерулопатия и увреждане на трансплантата. В проучването на Wiebe [24] пациентите, които са развили изолирано HLA-DQ dnDSA, са имали значително повече HLA-DQ епитопни несъответствия. Въпреки че механизмите, по които епитопните разлики увеличават риска от развитие на dnDSA, не са напълно изяснени, вероятността за алореактивиране на специфичен B-клетъчен клон нараства с увеличаване на броя на несъответствията и наличие на имунодоминиращ епитоп.

2.3. СЪВМЕСТИМОСТ МЕЖДУ ДОНОР И РЕЦИПИЕНТ

Многобройните проучвания през последните години утвърждават HLA несъвместимостта между донор и реципиент като един от основните фактори, повлияващи изхода от трансплантациите на органи и тъкани.

Високата съвместимост осигурява няколко предимства при бъбречна трансплантация, като по-дълго оцеляване на присадката, по-добра функция и по-малък риск от инфекции и злокачествени заболявания, поради възможност за редуциране на имуносупресията [25]. Въпреки това трансплантации с висока съвместимост не са достъпни за всички пациенти в рамките на едно разумно време на изчакване поради редкостта на някои антигени. Според ранните открития на Collaborative Transplant Study през 1985 г. трансплантациите без несъответствие в HLA-B и -DR локус показват 20% по-висок процент на успех [26]. HLA несъответствията поддържат риска от сенсибилизация при загуба на присадката. За пациенти, чакащи за повторна трансплантация, предишните несъответствия могат да намалят шанса за намиране на подходящ орган и по този начин да увеличат времето за чакане. Тъй като несъответствията носят риск от усложнения, те също имат ефект върху медицинските разходи. Установено е, че антителата у реципиента, насочени срещу несъвместимите антигени на донора, могат да предизвикат свръхостро отхвърляне на трансплантирания бъбрек [6]. Още през 1971 г. Terasaki и съавтори [6] публикуват резултати от проспективно проучване на 1715 пациенти, чакащи бъбречна трансплантация, които са изследвани за цитотоксични антитела срещу лимфоцити, получени от 40 до 120 случайни донори. Сенсибилизацията при тези пациенти е довела до синтез на цитотоксични антитела преди трансплантация. Авторите намират ясна връзка между преформираните лимфоцитотоксични антитела и свръхострото отхвърляне, доказана от по-високата честота на свръхостра реакция сред пациентите с антитела (12%) за разлика от тези без антитела (0,9%). През първите от 3 до 6 месеца след трансплантация сенсибилизираните пациенти са високорискови за ранна загуба на присадката, като този риск се увеличава от броя на HLA несъвместимостите, както и от броя на трансплантациите. Тази връзка, изчислена на шестия месец след трансплантацията, е

статистически значима при първа трансплантация (p = 0,05) и силно значима при втора трансплантация (p < 0,001) [6]. Освен това трансплантираните от трупни донори сенсибилизирани пациенти имат по-ниска преживяемост спрямо трансплантираните от жив родствен донор. Количеството на цитотоксичните антитела нараства с удължаване времето на диализа (25,5%), а при пациенти след първа или втора бъбречна трансплантация те достигат до 54,8%.

HLA-DR несъвместимостите също са от значение и те често се комбинират с DQ несъвместимости. В допълнение, HLA клас II антитела имат по-силно въздействие върху ABMR и загуба на присадка. В проучване, проведено от Willicombe et al. [27], с 505 пациенти без предварително формирани DSA, 18% развиват de novo DSA. DSA срещу антигени HLA-A, -B, -DR и -DQ локуси са свързани с развитието на ABMR и гломерулопатия на графта, докато HLA-Cw се свързва само с гломерулопатия. HLA-DQ DSA, се свързват с по-ниска 40-месечна преживяемост на алотрансплантата в сравнение с не-DQ DSA (76% срещу 95%) [27]. Трябва също така да се отбележи, че самото образуване на антитела не е рисков фактор, ако антителата не са насочени срещу антигени, присъстващи в присадката. Не са наблюдавани значителни разлики в епизодите на отхвърляне между неимунизирани пациенти и пациенти с недонор-специфични антитела. В проучване на Everly et al. [28] при пациенти, тествани след трансплантация за DSA, се наблюдава кумулативен ефект между класове и подкласове на имуноглобулините. Почти всички (95%) от пациентите, развили алоимунен отговор, са показали IgM DSA, а половината (47%) са имали и IgG DSA. IgM DSA самостоятелно не повишават риска от загуба на присадката. Въпреки това пациентите с IgG3 и персистиращи IgM антитела (19%) имат най-висок риск (47%, средно 72 месеца проследяване) за загуба на присадката [183].

Lucisano et al. [221] проследяват алоантителния статус на пациенти 3 месеца след проведена нефректомия на алографта (NX+) и установяват, че те синтезират поне едно DSA (47,7%; 64,9%; 83,0%; 85,2%, съответно 3, 6, 12, 24 месеца, $p < 0,001$) в сравнение с тези без алографт нефректомия (NX-), като в тази група синтезът на DSA е по-малко и забавен (10,3%; 24,4%; 41,0%, съответно на 6, 12, 24 месец). Делът на пациентите, които остават отрицателни за DSA, но развиват HLA антитела, не се променя значително с времето. Средният брой на HLA клас I антитела нараства значително с времето в групата с нефректомия (NX+), но не и в групата без нефректомия (NX-) ($p < 0,001$ и $p = 0,064$, съответно), докато средният брой на специфичностите на HLA клас II антитела се увеличава с времето и в двете групи ($p < 0,001$ и $p = 0,002$; NX+ и NX-, съответно). Методите на логистичен регресионен модел за търсене на рискови фактори за развитие на DSA доказват, че алографт нефректомията, както и доказаната реакция на отхвърляне остават единствените значими рискови фактори за развитието на DSA. Извеждането на такролимус от терапията непосредствено след нефректомията е независим рисков фактор за образуване на DSA 24 месеца след неуспешна трансплантация [221].

Внимателният анализ на тези проучвания показа съществуването на проблем, свързан със затруднения, възникващи при отчитане на точната специфичност при силно сенсибилизирани пациенти, където най-важният въпрос е кои антигени са отрицателни и следователно приемливи при търсене на подходящ донор, както и определяне на неприемливите антигети, т.е. тези, срещу които има синтезирани алоантитела. През 1982 г. Mickey et al. [29] разработват първия модел за компютърна програма, необходим им да преодолеят трудностите при идентифициране на специфичните антитела при силно сенсибилизирани пациенти. На база познанията за HLA-A, B и DR изработват приемливи емпирични оценки за честотното разпределение на 18 400 000 възможни HLA генотипа и

чрез помощта на компютър изчисляват шанса за намиране на един или повече съвместими реципиенти от реципиентския пул серуми. Впоследствие са разработени много подобни програми. Направени са опити да се използват отрицателните реакции за идентифициране на специфичности (96,5% негативна корекция). Прогнозата се извършва чрез хибридна експертна система (HES), която използва стохастични (SCORES), изкуствени невронни мрежи (ANN) и генетичен алгоритъм (GA) [10]. HES анализира резултата от пробата в 3 категории измервания: r-стойност, процент корекция и процент негативна корекция. HES прогнозира отрицателни кросмач реакции с достатъчна точност, за да увеличи шанса на силно сенсибилизираните пациенти да получат орган.

Програмата HLAMatchmaker е разработена въз основа на компютърен алгоритъм, за да се улесни намирането на съвместими донори при силно сенсибилизирани пациенти [11]. Чрез нея се оценява съвместимостта по HLA на структурно ниво чрез интралокусни и интерлокусни сравнения на къси линейни последователности (триплети) от полиморфни аминокиселини в достъпни за антителата позиции на HLA клас I молекули. Триплетите са ключови елементи на епитопи, които могат да индуцират образуването на специфични антитела. Тази програма позволява идентифициране на несъвместими HLA антигени, които споделят всичките тези полиморфни триплети с HLA антигените на пациента и следователно може да се считат за напълно съвместими. Валидността на този алгоритъм е проверена чрез анализ на антителни специфичности от 127, добре характеризирани серума, чрез лимфоцитотоксичен тест с големи HLA типизирани клетъчни панели (панел-реактивни антитела – PRA $\geq$ 80%). Този серумен анализ е позволил идентифициране на триплети с различна степен на имуногенност. Откриването на триплети с ниска имуногенност осигурява допълнителни възможности за намиране на донори с приемливи HLA несъответствия за извършване на трансп-

лантация при силно сенсибилизирани пациенти. Алгоритъмът е приложим за HLA клас I антитела, използвайки две концепции – (1) факта, че HLA клас I антигените представляват поредица от множество триплети – дефинирани епитопи, които могат да предизвикат хуморален имунен отговор; и (2) алосенсибилизираните пациенти не могат да синтезират антитела към триплети от несъвместимите HLA клас I антигени на донора, ако такива триплети присъстват със същата секвенция в тяхна HLA клас I молекула.

Концепцията за съвпадение на триплетите има клинично значение, тъй като HLA-A, -B несъвместими бъбречни трансплантации, които са съвместими на триплетно ниво, показват практически същите проценти на оцеляване на присадката като нулевите несъответствия по HLA-A, -B антигени, определени по конвенционални критерии. HLAMatchmaker е особено полезен при определяне на приемливи несъответствия за високосенсибилизирани пациенти, чакащи за бъбречна трансплантация. Въпреки че триплетната версия на HLAMatchmaker се е оказала клинично полезна, тя предоставя непълно описание на структурния HLA епитопен репертоар.

Нова версия на HLAMatchmaker разглежда хипотеза, разработена на базата на кристалографски молекулен модел на антиген-антитяло комплекса, използвайки еплети (eplets), като част от тях представляват къси линейни последователности. Другата част са редуващи се през известно разстояние секвенции, които се струпват на групи върху молекулната повърхност на комплекса антиген-антитяло. Еплетната версия на HLAMatchmaker съдържа по-голям репертоар от структурно добре дефинирани епитопи. Тя дава по-добра прогноза за развитието на dnDSA срещу HLA клас II антигени. Те също така и характеризират интерлокусни еплети от клас II. Използвайки аминокиселинни последователности на α- или β-вериги, те идентифицират група от интерлокусни еплети,

които се определят от един или два полиморфни остатъка, уникално споделени между алели, контролирани от комбинации между DR, DQ и DP локус. Авторите изказват предположението, че получената информация може да се използва за навременно откриване на тези пациенти, изискващи по-чест имунологичен мониторинг и/или по-агресивна имуносупресия след трансплантация [30].

2.4. ДРУГИ ФАКТОРИ, ДОПРИНАСЯЩИ ЗА ОТХВЪРЛЯНЕ НА ПРИСАДКАТА

2.4.1. NK КЛЕТКИ

При HLA съвместими трансплантации реципиентните NK клетки могат да бъдат активирани, когато срещнат донорни клетки, лишени от съответния HLA лиганд за инхибиторните NK-клетъчни рецептори [97]. Kunert et al. [27] показват връзка между по-големия брой инхибиторни рецептори в генотипа на реципиенти и стабилната бъбречна функция. Vampa и др. [28] наблюдават увеличаване на NK-клетъчната цитотоксичност спрямо донорните клетки при реципиенти с наличието на повече активиращи KIR гени, отколкото при експресиращите по-малко активиращи KIR гени. Тези изследвания предоставят доказателства, че потискането на NK-клетъчната активност може да е важно за подобряване оцеляването на алографта.

2.4.2. НЕ-HLA АНТИГЕНИ

Въпреки че имунният отговор към HLA антигените играе централна роля в отхвърлянето на трансплантата, съществуват доказателства, че не-HLA антигените също допринасят за патогенезата на остро и хронично отхвърляне. Стана ясно, че HLA антителата не обясняват всички случаи на отхвърляне: от 40 до 50% от реакциите на отхвърляне са съпро-

водени от тежки съдови промени, дори и при HLA идентични бъбреци. Съвсем наскоро бе призната ролята на автоимунитета при бъбречна трансплантация. Не-HLA антигените, експресирани от присадения ендотел, са показани за потенциални мишени на автоантитела с възможност за нарушаване функцията на присадката [41, 42]. Няколко публикации са анализирали клиничното въздействие на антителата срещу ангиотензин II тип 1 рецептор [42, 43], ендотелин-1 тип А рецептор [42, 43] и перлекан при бъбречна трансплантация.

Основните антигенни таргети се експресират от клетките на трансплантата, включително ендотел и епител. Антиендотелните клетъчни антитела (AECA) са хетерогенна група антитела, съдържаща както IgM, така и IgG клас, и са насочени срещу различни антигенни детерминанти [29]. Dragun et al. [34] показват за първи път участието на не-HLA антитела при пациенти с епизоди на остро отхвърляне и тежка хипертония. Разглеждат кохорта от 33 бъбречно трансплантирани реципиенти, с рефрактерно съдово отхвърляне, от които само 13 са развили донор-специфични анти-HLA антитела. Двадесет пациенти не са имали анти-HLA антитела и при тях отхвърлянето е придружено от злокачествена хипертония, а при 4 – с неврологична симптоматика. Dragun et al. [34] изказват хипотеза, че антитела, насочени към ангиотензин II тип 1 рецептор (AT1R), може да са причината за отключване реакция на отхвърляне, водеща до ендотелна клетъчна активация или апоптоза. Биопсичните проби от графта са показали съдово отхвърляне, проявено като ендартерит или некротизиращ васкулит с фибриноидна некроза и отлагания на C4d и тъканен фактор. Антитела от подклас IgG1 и IgG3, активиращи AT1R, са доказани в серумите на всички 16 пациенти със злокачествена хипертония и без анти-HLA антитела, но не и при другите пациенти. Тези проучвания показват ролята на ренин-ангиотензин системата като участник в имуномедиирано бъбречно увреждане. Данните

сочат, че антителата срещу AT1R могат да участват в патогенезата на съдовото отхвърляне. Остава неясно защо AT1R антителата (AT1R-Ab) се развиват при определени пациенти и защо тези антитела са насочени към трансплантата [35]. И AT1R антитела, и HLA DSA могат директно да увредят ендотелните клетки и това налага хипотезата за взаимодействие между двата вида антитела. Pearl и колеги [36] анализират серумни цитокини, свързани с активиране на AT1R и съдово възпаление, с цел разграничаване от тези, които се свързват с HLA DSA. Повишени стойности на IL-8 и IL-1β се откриват при AT1R-Ab-положителни и HLA DSA-отрицателни, докато TNF-α и IL-17 са по-високи при пациенти, положителни и за двата типа антитела. Taniguchi и колеги [37] доказват наличието на синергичен ефект на AT1R-Ab и HLA-DSA, което води до лоша преживяемост на присадката при положителни и за двата вида антитела пациенти. Изследване, проведено от Malheiro и колеги [38], на кохорта от 76 пациенти, трансплантирани през 2009 г., демонстрира връзка между AT1R-Ab и HLA-DSA с остро отхвърляне и влошаване функцията на присадката и подкрепя хипотезата, че наличието на AT1R-Ab и DSA са независим предиктор на загуба функцията на присадката. Въз основа на тези данни предлагат при стратифициране на имунологичния риск на пациенти, чакащи бъбречна трансплантация, да бъде проведен и предтрансплантационен анализ за AT1R антитела.

2.4.3. MICA АНТИГЕНИ

MICA антигените имат ограничено разпространение в тъканите и се експресират в епител, ендотел, кератиноцити и фибробласти. Тяхната експресия се увеличава в отговор на клетъчен стрес, медииран от исхемична реперфузия и цитокини като IL-2, IL-4 и IL-15. MICA действат като лиганди за активиращия NKG2D рецептор на NK клетки и част от Т-клетките.

Алоантителата срещу MICA се свързват с остро и хронично съдово отхвърляне при бъбречни и сърдечни трансплантации. Точните механизми, чрез които се образуват тези антитела, до голяма степен са неизвестни. Въпреки че бременност и предишни трансплантации могат да доведат до синтеза на анти-MICA антитела, ролята на кръвопреливането в тяхното индуциране не е напълно изяснена. Първото голямо международно проучване за оценка на потенциалната връзка на MICA антитела с обща преживяемост на алотрансплантата е проведено от Zou и др. [46] и включва 20 центъра в 13 страни със серумни проби, получени от 1910 пациенти преди трансплантация. Експериментът е проведен чрез сляпо тестване на MICA антитела, независимо от клиничния ход на трансплантацията. Резултатите показват, че 11,4% от пациентите са имали предтрансплантационно MICA антитела и едногодишната преживяемост на присадката при тях е 88,3% в сравнение с 93% в групата без MICA антитела ($p = 0,01$).

В голямо мултицентрово проучване при пресенсибилизирани към MICA бъбречни реципиенти е отчетен повишен процент на загуба на присадката, въпреки добрата съвместимост с донора по HLA [46]. За MICA антитела е доказано, че медиират комплемент-зависимата цитотоксичност срещу ендотелни клетки, което предполага, че тези антитела могат да причинят комплемент-медиирано увреждане на трансплантата [44]. Въпреки че има данни за връзка на MICA антителата с неблагоприятен изход от трансплантация, все още не е постигнат окончателен консенсус и изследването им не е включено в рутинната практика.

2.4.4. НЕИМУНОЛОГИЧНИ ФАКТОРИ

2.4.4.1. Фактори, свързани с донора

Има известни фактори, свързани с донора, които имат отношение към изхода от трансплантацията, като възраст на донора и причина за

мозъчна смърт. Използването на донори, подбрани по т.нар. разширени критерии (възраст над 60 години в комбинация с две от следните допълнителни характеристики: анамнеза за мозъчносъдов инцидент, хипертония и ниво на серумен креатинин над 132,6 μmol/L) [31], показва намалена тригодишна преживяемост на присадка със 75% в сравнение с 84% за донори, подбрани по стандартни критерии [32].

2.4.4.2. Фактори, свързани с реципиента

Факторите, предразполагащи към неблагоприятен изход, свързани с реципиента, са анамнеза за вирусен хепатит В и/или С, наднормено тегло, диабет, хипертония и дълго време на диализата[33].

2.4.4.3. Време на студова исхемия (ВСИ)

Проучване на Giblin et al. показва, че ВСИ има ефект върху оцеляването на присадката. Те правят сравнение между времето за трансплантация на първия и втория бъбрек на донора [34]. Със средно ВСИ от 19,9 часа за първия бъбрек и 25,7 часа за втория бъбрек се наблюдава значителна разлика в преживяемостта на присадката. Преживяемостта на присадката след 1 година е по-добра за първия бъбрек, отколкото за втория (88,5 срещу 84,7%), а разликата продължава и след 10 години на проследяване (съответно 55,2 срещу 40%). Въпреки че ВСИ е неимунологичен фактор, продължителният период може да повиши имуногенността на трансплантата и оттук повишения синтез на HLA клас I антитела [35].

2.4.4.4. Забавена функция на присадката (DGF)

В проучване на Humar et. al. повишен PRA от > 75% предтрансплантационно води до повишен риск за DGF (RR 3.4, p = 0.0001) [36, 37]. Други, свързани с реципиента рискови фактори за DGF според автора, са мъжки пол, ИТМ > 30 kg/m2, диабет и по-продължително време на диализа.

2.4.4.5. Нарушена гломерулна филтрация (GFR)

Данните за връзката между DSA и GFR са ограничени. Известно е, че хроничното антитяло-медиирано отхвърляне се причинява от DSA и в

крайна сметка води до повишена протеинурия и намален GFR. Доказано е, че възрастните пациенти с DSA имат значително по-висока протеинурия и тя е важен фактор за бързия спад на GFR [38]. Пряката връзка между DSA и GFR е донякъде неубедителна. В проучване на Rusai et al. не е открита връзка между статуса на DSA и ниската GFR [39]. Противоречиви резултати са докладвани от Chaudhuri et al., описващи намаляване на функцията на присадката при наличие на DSA [75].

2.5. МЕХАНИЗМИ НА КЛЕТЪЧНО ОТХВЪРЛЯНЕ

Органи, трансплантирани между генетично различни индивиди, се отхвърлят по Т-клетъчен зависим начин. Способността на реципиентните Т-клетки да разпознават антигени от трансплантирания орган в рамките на същия вид е известена като алогенно разпознаване и при липса на имунна модулация води до активиране, пролиферация и диференциация на Т-клетките, които мигрират към трансплантирания орган, предизвикващи реакция на отхвърляне и дисфункция на присадката. АПК са от съществено значение за първоначалното представяне на алоантигена на наивните Т- лимфоцити във вторичните лимфоидни органи, превръщайки ги в ефекторни Т-клетки, които чрез секреция на възпалителни фактори увреждат присадката. Освен това активираните Т-клетки стимулират В-лимфоцитите да секретират алоантитела чрез хуморални имунни механизми, които антитела също могат да увредят трансплантирания орган.

Въпреки че обучените в тимуса Т-клетки имат TCRs рестриктиран за собствени MHC молекули, много Т-клетки могат да се свържат с алогенни MHC молекули, вероятно защото няма процес, чрез който алореактивните Т-клетки да бъдат елиминирани в тимуса. В действителност, докато приблизително 1 на 10^6 Т-клетки могат да разпознаят „чужд“ ан-

тиген, представен от собствените им MHC алели, то 1-10% от Т-клетките могат да свържат алогенни MHC молекули директно [46, 47].

Имуномодулиращи терапии, които са в клинична употреба, са насочени към предотвратяване или потискане на този възпалителен отговор, но продължителното им приложение води до увеличаване честотата на опортюнистични инфекции и злокачествени новообразувания. Хроничното отхвърляне на трансплантата, както и неговата резистентност към имуносупресивно лечение, е основна причина за намаляване дългосрочната преживяемост на присадката. По-малко се знае за ефекторни механизми, които посредничат при реакции на отхвърляне на присадката.

2.6. МЕХАНИЗМИ НА ХУМОРАЛНО ОТХВЪРЛЯНЕ

Хуморалните механизми на отхвърляне включват алоантитела, комплемент, фактори на коагулация и цитокини. Като резултат хуморалните медиатори могат да причинят свръхостро, остро до хронично отхвърляне на трансплантата.

Синтезираните антитела могат да бъдат от различни имуноглобулинови класове, от които IgM и IgG са важни, предимно при трансплантация на органи. Въпреки че се счита, че IgM антителата нямат отношение към оцеляването на присадката [40], те оказват влияние върху резултатите от тестовете, използвани в лабораторната диагностика като комплемент медиирана цитотоксичност и тестове, базирани на Luminex технология. Повечето техники за скрининг на антитела измерват анти-HLA IgG антителата. Не всички IgG антитела са еднакви. IgG3 показва най-силен капацитет за свързване на комплемента, следван от IgG1. Докато IgG2 активира слабо комплемента, а IgG4 изобщо не го активира, тези антитела показват способност да свързват ефекторни клетки чрез Fc рецептора си [199].

Донор-специфичните антитела са се превърнали в установен биомаркер, предсказващ антитяло-медиирано отхвърляне, което е водеща причина за загуба на присадка след бъбречна трансплантация. Има няколко фенотипа на антитяло-медиирано отхвърляне след трансплантация, които се определят от времето и степента на хуморалния отговор и различните характеристики на DSA, като антигенни класове, специфичност, сила на антитела, IgG подкласове и свързване на комплемент. Предварително формирани DSA при сенсибилизирани пациенти могат да предизвикат свръхостро, акселерирано и остро антитяло-медиирано отхвърляне. dnDSA са свързани с късно остро медиирано отхвърляне, хронично медиирано отхвърляне и гломерулопатия на трансплантата.

Патогенезата на антитяло-медиирано отхвърляне включва не само комплемент-зависима цитотоксичност, но и комплемент-независими пътища на антитяло-медиирана клетъчна цитотоксичност и директно ендотелно активиране и пролиферация. C1q свързващите DSA са тясно свързани с остро антитяло-медиирано отхвърляне, по-тежки увреждания на присадката и ранна загуба, докато C1q несвързващи DSA корелират със субклинично или хронично антитяло-медиирано отхвърляне и късна загуба на присадката [71]. Развитието на de novo DSAs след БТ се съобщава при 13-30% от пациентите, които преди това не са били сенсибилизирани [70]. DnDSA са предимно насочени към несъответствия на HLA клас II на донора и обикновено се появяват през първата година от БТ, но могат да се появят по всяко време, дори няколко години по-късно. Свързването на DSA с антиген, експресиран върху ендотелни клетки на алографта, може да активира класически път на комплемента, ключов патологичен процес при остро антитяло-медиирано отхвърляне [70]. Дори при липса на активиране на комплемента, някои DSAs могат да причинят увреждане на присадката чрез антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност. Неутрофили, макрофаги и НК клетки могат да се свържат с

Fc фрагменти на DSA, да предизвикат дегранулация и да освободят литични ензими, които причиняват увреждане на тъканите и клетъчна смърт [66]. Този процес участва в патогенезата на субклинично и хронично антитяло-медиирано отхвърляне. Освен това DSA могат да увредят присадката, активирайки процеси на ендотелна пролиферация, чрез повлияване синтеза на васкуларен ендотелен растежен фактор, регулиране на рецептора му и увеличаване на свързването му с лиганда. Всички тези процеси водят до развитие на гломерулопатия и васкулопатия на графта, които се характеризират със задебеляване на съдовата интима и инвазия на гладкомускулни клетки [68]. Последните два процеса са независими от комплемента и могат да обяснят клиничните фенотипове на антитяло-медиирано отхвърляне с отрицателна реакция за C4d в перитубулните капиляри.

Предварително формираните DSAs при сенсибилизирани пациенти могат да бъдат от клас I, клас II или и двата и могат да са насочени или към специфични, или към споделени епитопи. Наличието на преформирани DSA пряко влияе върху вземането на решение за трансплантация. По-голямата част от dnDSA след БТ са антитела от клас II, особено DQ. Тези антитела обикновено се появяват по-късно и са подклас IgG2 или IgG4, т.е. слабо свързващи (IgG2) или несвързващи (IgG4) комплемента. Те са стабилни и се свързат с хронично антитяло-медиирано отхвърляне и гломерулопатия на трансплантата [137-142]. Агресивният опит за елиминиране на dnDSA от клас II, особено DQ, може да не е успешен и да изложи пациентите на висок риск от прекомерна имуносупресия без голяма полза. dnDSA от клас I обикновено се откриват по-рано след трансплантацията и по-често са IgG1 и IgG3. Те са свързани с остро антитяло-медиирано отхвърляне и ранна загуба на присадката. Силата на DSA обикновено се изразява като среден интензитет на флуоресценция (MFI). Ранните проучвания показват клинична-

та корелация между MFI и риска от антитяло-медиирано отхвърляне. Високият титър на DSA е свързан със способността за свързване на комплемента и по-тежки тъканни увреждания. Теоретично високият DSA титър осигурява достатъчен брой IgG молекули, които да активират комплемента по-ефективно. Въпреки това корелацията между силата на DSA и клиничния резултат далеч не е такава. DSA с висок MFI не винаги активират каскадата на комплемента. Има трансплантирани пациенти с високи титри на циркулиращи DSAs, които не водят до реакция на отхвърляне или дисфункция на присадката. Това може да е резултат от разлика в силата на свързаване на DSAs с HLA върху миросферите при флуориметричните тестове, която да е различна от тази на свързването им с HLA антигени на ендотелните клетки. Прагове за клинично значим MFI варират в широки граници между различните трансплантационни центрове – от 1000 до 10 000 и в зависимост от специфичността на антигена. Положителният C1q DSA се свързва с независим риск от антитяло-медиирано отхвърляне и загуба на присадка над традиционния DSA среден интензитет на флуоресценция. Sicard и др. [34] сравняват както C1q, така и C3d-свързващи DSA. Те доказват, че наличието на C3d-свързващи DSA води до по-висок риск от загуба на присадка, независимо от MFI стойността, и е по-добър предиктор, отколкото C1q-свързващото DSA [34)]. Comoli и др. [38] съобщават за подобни резултати в педиатричната популация: C3d-свързващо DSA е по-добро от C1q-свързващо DSA при стратифициране на риска от антитяло-медиирано отхвърляне и загуба на присадката. Теоретично, тези два анализа отразяват различни етапи на активирането на комплемента. C1q е първата стъпка от класическия път и не е задължителен показател за пълно активиране на каскадата на комплемента, докато C3d по-вероятно показва пълно активиране на комплемента. В друго проучване се съобщава, че предварително формирани DSA, способни да свързват C3d фракция на комплемента, предсказват

антитяло-медиирано отхвърляне и загуба на присадка, въпреки че кросмач реакцията преди трансплантацията е била отрицателна [5].

Оценката на степента на активиране на комплемента от донор-специфични анти-HLA антитела може да позволи по-рационална и патогенетично базирана терапия с медикаменти, таргетни за комплементни протеини [106]. Освен това задълбочените познания за комплексните характеристики на DSA могат да стратифицират имунологичния риск за пациента и да предскажат различните фенотипове на антитяло-медиирано отхвърляне, което ще подобри резултатите от трансплантацията и по-специално дългосрочната преживяемост.

2.6.1. КЛИНИКО-ПАТОЛОГИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА ABMR

Антитяло-медиираното отхвърляне, наричано също така и хуморално отхвърляне, е една от най-важните причини за дисфункция и загуба на присадката до 76% след първата година от трансплантацията. [95, 96]. Според настоящите доказателства активираните В лимфоцити и плазматични клетки генерират DSA, които са насочени срещу HLA или не-HLA молекули, експресирани от ендотелни клетки в бъбречния алотрансплантат [97]. ABMR, често е съчетана с Т-клетъчно отхвърляне [97]. Антитяло-медиирано отхвърляне при бъбречни трансплантации беше въведено като отделна клинико-патологична единица в международната класификация на Banff - отхвърляне на бъбречния алотрансплантат от 1997 г. с редовни актуализации оттогава [98]. Разпознаването на ABMR при БТ доведе до разработването на стандартизирана номенклатура, диагностични критерии и унифицирани схеми за докладване, които по-късно са приети и променени за нуждите на сърдечна, белодробна, черноробна и панкреатична трансплантация.

2.6.2 КЛАСИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НА ABMR

Според Banff 2017 има два вида ABMR – активна ABMR (по-рано наричана остра ABMR) и хронично активна ABMR [117]. Доклад на Banff, 2017, подчертава важността на правилното определяне на ABMR, включвайки допълнителни характеристики като вида на антитялото, значимостта на C4d, степента на микрокапилярното увреждане, генните транскрипти, молекулярни и клетъчни маркери. Терминът „активен“ е избран за обозначаване на лезии с микросъдова увреда и доказателства за текущи или скорошни взаимодействия на антитела с ендотела на присадката, но без морфологични данни за хронично съдово увреждане.

ABMR може да се прояви като свръхостра (възниква в рамките на минути след съдовата анастомоза), остра (възникваща дни до седмици след трансплантацията), късна остра (настъпваща 3 месеца след трансплантацията) или хронична (възникваща месеци до години след трансплантацията) [118, 119].

2.6.2.1. Свръхостро отхвърляне (HAR)

При HAR са налице голямо количество антитела, които активират комплемента, надхвърляйки всички регулаторни бариери и водещи до лизис на съдови ендотелни клетки, предизвиквайки кръвоизливи и тромбози, както и мобилизиране на множество активирани неутрофили. Тя се медиира от висок титър на предварително формирани антидонорни антитела: анти-HLA, анти-ABO или други не-HLA антитела [116]. През 1969 г. Patel и Terasaki [93] описват и въвеждат серологичен тест за откриване на предварително формирани (преформирани) антитела. През 1974 г. Mel Williams докладва, че прилагането на теста за кръстосано съвпадение (кросмач реакция) елиминира свръхострото отхвърляне в серия от 24 пациенти с втора трансплантация [94]. В наши дни свръхострото отхвърляне е рядко събитие при БТ, водещо до загуба на присадката, което може да настъпи до минути (но понякога може да се забави

за няколко дни) след трансплантацията [120]. Появата на този тип отхвърляне е изключително рядка, тъй като пациентите с предварително формираните антитела обикновено могат да бъдат изключени чрез кросмач реакция и верифициране на кръвната група. Съществуват обаче все повече доказателства, че може да има свръхостро отхвърляне, медиирано от ендотелни клетки и не-HLA антитела, които не могат да бъдат открити в стандартните Т- и В-лимфоцитни техники за кръстосана съвместимост [121].

Акселерирано остро отхвърляне (или забавено свръхостро отхвърляне) може да настъпи в рамките на 24 часа до няколко дни след трансплантация и представлява имунен отговор на паметови В- и плазматични клетки, резултат от предишна сенсибилизация. Кросмач реакцията може да бъде отрицателна преди трансплантацията, защото преформираните DSA са с твърде нисък титър или липсват в пробата, получена от реципиента преди транплантация, но алоимунният отговор на паметовите клетки предизвиква рязко повишение на техния титър след трансплантация [135]. Предизвикателство остава не само доказването им, но и терапията, тъй като те обикновено са устойчиви на налични в момента медикаменти.

2.6.2.2. Остра антитяло-медиирана реакция

Острата ABMR се характеризира със серологични доказателства за DSA, хистологична находка, сравнително бързо влошаване на функцията на алотрансплантата и с добър терапевтичен отговор. Тази реакция почти винаги се проявява с повишаване на серумния креатинин, което понякога е придружено с олиго- и анурия, налагащо диализно лечение. Обикновено се наблюдава през първите няколко седмици след трансплантацията, но може да възникне и по-късно, което най-често се свързва със степента на несъвместимост или промяна в имуносупресията [123]. Честотата варира в зависимост от количеството DSA към момента на

трансплантация. При пациенти с високи нива на DSA (т.е. достатъчни за силно положителен кросмач) честотата може да достигне до 40% през първия месец след трансплантацията, докато честотата е по-малка от 10% при пациенти с отрицателен кросмач и DSA, доказани само с твърдофазов анализ [124]. Според системата за оценка на Banff, 2017 [117], хистологията при тези пациенти е свързана с характеристиките на активна ABMR.

2.6.2.3. Хронична антитяло-медиирана реакция

Повишаването на серумния креатинин обикновено е постепенно и често се съпровожда от протеинурия, понякога резултат от развитие на нефротичен синдром. Тези пациенти развиват хипертония от ренален произход. Въпреки това пациентите често нямат клинични симптоми, свързани с хронично отхвърляне, освен ако бъбречната функция не е достатъчно намалена и има симптоми на уремия. В редки случаи прогресията може да бъде бърза, особено при активни лезии (**хронично активна ABMR**), което води до отказ на присадката в рамките на месеци [125].

Подобряване на дългосрочна преживяемост на присадката при пациенти с ABMR е ограничено от липсата на надежни ранни маркери, по които да се оцени отговорът от проведената терапия. Проведени са няколко проучвани с цел изграждане на модел за проследяване. Едно от тях на Viglietti и съавт. [125] определя динамичен прогностичен скор при ABMR за прогнозиране на преживяемостта на бъбречния алотрансплантат, включващ характеристиките на заболяването при диагностициране и отговора на лечението. Проведено е при 278 БТ реципиенти, претърпели трансплантация между 2008 и 2014 г., с диагностицирана активна ABMR и лекувани с плазмафереза, интравенозен имуноглобулин и ритуксимаб. Тази терапевтична комбинация е най-често използваната за лечение на ABMR в клиничната практика в световен мащаб и се счита за

стандарт за лечение при тези пациенти [126, 127]. Ефектът от тази терапия върху дългосрочната преживяемост на бъбречния алографт никога не е определян, тъй като доказателствата, осигурени от клинични изпитвания, са малко. Създаденият от Viglietti и съавт. [125] динамичен модел за прогнозиране на ABMR включва: оценка на изчислената скорост на гломерулна филтрация (eGFR) при поставяне на диагнозата и след проведено лечение ($p < 0,001$); наличие на интерстициална фиброза/тубулна атрофия ($p = 0,003$) при диагностициране и перитубуларен капилярит Banff точки ($p = 0,002$) след терапия; промяна в MFI на DSA ($p < 0,001$) преди и след лечение. От него са идентифицирани три рискови групи – група с висок риск, група с междинен риск и група с нисък риск, с което доказват, че не всички пациенти, развили антитяло-медиирана реакция на отхвърляне, имат едно и също ниво на риск от загуба на алотрансплантата. След лечение на ABMR при високорисковите пациенти отчитат понижение на eGFR, увеличение на протеинурията, леко повлияване на хистологичните промени и персистиращо комплементно отлагане в алографта, без промяна на MFI за имунодоминантните анти-HLA DSA. Пациентите с нисък риск показват увеличение на eGFR, намаление на протеинурията, на перитубуларния капилярит, в отлагането на комплемента в алотрансплантата и на нивото на MFI на анти-HLA DSA.

Динамичният прогностичен скор е валидиран в независима кохорта от 202 БТ реципиенти с ABMR (C-статистика = 0,79). Този метод за прогнозиране на загуба на присадка е изграден на базата на анализ на шест независими клинично-прогностични фактора, използвани в рутинната практика, и интегриран с характеристиките на заболяването при диагностициране заедно с отговора на лечението. Прогнозният резултат за ABMR може да се използва за вземане на терапевтични решения в клиничната практика и за проектиране на клинични изпитвания.

2.6.2.4. Субклинично антитяло-медиирано отхвърляне

Реакцията се развива при БТ пациенти със стабилна функция на присадката, но с хистологични данни за тлееща активна ABMR [128]. Тези пациенти често имат ниско ниво на DSA. Литературните данни сочат, че нелекувана субклинично протичаща ABMR е важен предиктор за лош изход от трансплантацията. Липсата на данни от дългосрочно проследяване пречи за разработването на насоки за ефективни терапевтични интервенции.

Следователно наличието на специфични за донора анти-HLA антитела е ключов момент за диагностициране на ABMR при БТ. В допълнение към преформираните DSA могат да се появят по всяко време след трансплантацията и dnDSA, често в резултат на недостатъчна или неадекватна имуносупресивната терапия [99, 100].

Хроничната ABMR, от друга страна, се характеризира с гломерулопатия на графта, резултат от повтарящи се тромботични събития и възпалителни промени, които водят до увреждане на ендотелните клетки и ремоделиране на алотрансплантата, водещо до бавен и прогресивен спад на бъбречната функция, което трудно се повлиява от съвременните терапевтични стратегии [102, 103]. За разлика от остри епизоди на ABMR, водещи до хронично отхвърляне, има и микроваскуларни аномалии с бавен ход, които могат да възникнат без остри епизоди, резултат от специфични за донора анти-HLA антитела [104]. Отхвърлянето, причинено от антитела, сега се счита за болестен процес, започващ по всяко време след трансплантацията и продължаващ с различна степен на интензивност, прогресивно водещ до развитието на хронично увреждане, дисфункция и загуба на алотрансплантата.

Комплексността на ABMR на отхвърляне и ограниченията на хистологичната оценка доведоха до разработването на нови подходи за подобряване на диагностиката ѝ. От 2003 г. насам се изследват микросате-

литни ДНК профили при БТ, откриващи асоциации с дискретен фенотип и лезии [107]. Съвсем наскоро бяха идентифицирани молекулярни сигнатури със специфичност за антитяло-медиирано отхвърляне при пациенти с БТ [108].

2.7. НЕИНВАЗИВНИ БИОМАРКЕРИ ЗА МОНИТОРИРАНЕ НА ABMR

2.7.1. ДОНОР-СПЕЦИФИЧНИ АНТИ-HLA АНТИТЕЛА (DSA)

DSA играят важна роля за AMR и могат да бъдат независим предиктор на загуба на алотрансплантата [79]. Установено е, че когато пациентите са имали DSA по време на клинично отхвърляне, намалението с 50% на DSA в рамките на 14 дни след поставянето на диагнозата е свързано с по-висока степен за оцеляване на алографта. В проучване, извършено от Everly et al. [79], са анализирани 650 пациенти с остра реакция на отхвърляне, при 94 от които е биопсично доказана. Установено е, че 52 от тези 94 пациенти имат DSA. Анализ за предсказване загуба на алотрансплантата показва, че DSA са независим предиктор, водещ до шесткратно увеличаване на шанса от загуба на присадката. В същото проучване се отбелязва, че DSA присъстват и при липса на положителна реакция за C4d в биопсичен материал. Авторите стигат до заключението, че намаляването на DSA трябва да се разглежда като потенциална терапевтична цел за реакциите на отхвърляне. Потискането на DSA с бортезомиб дава обещаващи резултати за намаляване на DSA. По-честото проследяване на DSA, особено при силно сенсибилизирани пациенти, може да бъде средство за предотвратяване на реакциите на отхвърляне [80].

Свръхострото отхвърляне се наблюдава все по-рядко след въвеждането на кросмач реакцията и твърдофазовия микросферов анализ за антитела. За съжаление, тези анализи не прогнозират ABMR, както първоначално се е предполагало. Повечето проучвания са съгласни, че

претрансплантационните DSA са свързани с по-лоши резултати за присадката и по-голяма честота на остри и хронични ABMR на отхвърляне [81, 82, 83].

Лечението на остра и хронична ABMR често е неуспешно. Инхибирането на каскадата на комплемента е атрактивна терапевтична опция, особено при пациенти с остра реакция и цитотоксични DSA антитела, доказани с микросферов анализ [84]. Eculizumab е моноклонално антитяло срещу C5, което блокира разцепването на C5 фракция на комплемента и следователно неговото активиране. Първият докладван случай на ABMR, лекувана с екулизумаб, е на силно сенсибилизиран БТ пациент, който развива тежка реакция на отхвърляне в рамките на дни след трансплантацията [87]. Пациентът е резистентен към стандартните терапии за намаляване на антителата, но възстановява бъбречната функция след лечение с две дози екулизумаб. Докладвани са допълнителни случаи на успешно лечение на остра ABMR при силно сенсибилизирани бъбречни реципиенти [87, 88]. В най-голямото, публикувано досега, проучване, профилактично лечение на сенсибилизирани пациенти след бъбречна трансплантация с екулизумаб в допълнение към плазмафереза намалява честотата на остра AMR през първата година в сравнение с контроли (7,7 срещу 42,2%), но не намалява честотата на хроничната ABMR на втората година [90]. Ранните успехи на терапията с екулизумаб подчертават потенциала на имуномодулиращите терапии за профилактика и лечение ABMR, докато неговите неуспехи подчертават хетерогенността на острата и хронична ABMR.

Системното наблюдение на анти-HLA антителата понастоящем е част от консенсусните ръководства [109]. Но мониторингът на пациента за наличието на DSA антитела е все още ограничен подход за стратификация на риска от антитяло-медиирано отхвърляне и загуба на алотрансплантата, тъй като не всички анти-HLA антитела са патогенни. Биопсия-

та на алотрансплантата остава важна за откриването на реакция на отхвърляне след трансплантация, дори за пациенти в стабилно състояние и некомпрометирана функция на присадката. Натрупват се все повече доказателства, че точното характеризиране на DSA по отношение на сила, способност за активиране на комплемента или субкласа на IgG може значително да подобри способността за прогнозиране на антитяло-медиирано отхвърляне и загуба на алотрансплантата [110].

Оценка на кинетиката на DSA и силата на комплемент-свързващите антитела може да предскаже изхода от трансплантацията след проведено стандартно лечение за антитяло-медиирано отхвърляне [111-114], което е важно за менажирането на тези пациенти [115].

Чрез Luminex технологията може да се характеризират предварително формираните HLA антитела при сенсибилизирани пациенти, които чакат трансплантация. Повтарящите се антитела или силно експресираните антитела се считат за клинично значими, като антигените, срещу които са насочени, се считат за неприемливи за този пациент. Пациенти с антитела срещу неприемливи антигени на трупен донор (положителен виртуален кросмач) не се трансплантират от него. Само тези пациенти, чиито HLA антитела не са насочени срещу донорни антигени (отрицателен виртуален кросмач), могат да бъдат трансплантирани от този донор, след проведен окончателен реален кросмач с пресен серум от реципиента и лимфоцити от донора.

Методите за кръстосано съвпадение (crossmatch – XM) претърпяват развитие също като тези за алоантителата. Комплемент-зависимият цитотоксичен кросмач (CDC-XM) се счита от много години за стандартна практика за определяне на съвместимостта при трансплантация на органи. Въпреки това, тъй като този метод е трудоемък, времеемък, слабо чувствителен и неспецифичен, той е заменен в много лаборатории по света от флоуцитометричен кросмач (FCXM). Независимо от повишена-

та чувствителност, автоматизиране и възможност за едновременно определяне на Т- и В-клетъчен ХМ, FCXM се базира на използването на клетки като таргети за свързването на антителата от серума. Като се имат предвид предимствата на миросферовите методи за детекция на анти-HLA антитела, бяха въведени твърдофазови тестове и за кръстосано съвпадение, като Luminex crossmatch (LumXm). LumXm тестът използва естествени HLA молекули, изолирани от лимфоцити на конкретен донор, фиксирани върху микросфери като таргет за свързване на DSA, и не изисква жизнеспособни клетки, което го прави много специфичен и чувствителен при откриване на антидонорна реактивност. Подобренията в техниките за HLA типизиране и въвеждането на твърдофазови анализи, по-специално SAB тестовете, позволиха на лабораториите за тъканно типизиране да оценят по-добре неприемливите антигени при пациенти в списъка на чакащи и превърнаха виртуалното кръстосано съвпадение в реалност.

2.7.2. Други потенциални биомаркери за мониториране на ABMR

Други неинвазивни биомаркери в кръв или урина са изследвани за възможността да бъдат използвани при диагностицирането на реакции на отхвърляне при пациенти с органна трансплантации в частност бъбречна. По този начин се цели да се намали нуждата от биопсия и същевременно да се осигурят по-ефективни начини за имунологично проследяване на увреждания на присадката.

Един от тези подходи включва оценка на генната експресията на специфични маркери от левкоцити в пълна кръв чрез мултигенен анализ [129, 130], оценени при БТ пациенти, с цел предсказване на остра реакция на отхвърляне. Чрез микросателитен количествен PCR анализ на пет генни групи (DUSP1, PBEF1, PSEN1, MAPK9 и NKTR) и в зависимост от тяхната експресия може да се докаже развитието на остра реакция на

отхвърляне с висока точност – 91% чувствителност и 94% специфичност.

Няколко молекули са оценени като потенциални биомаркери за отхвърляне на бъбречен алотрансплантат в урина – протеини CXCL9 и CXCL10, перфорин, гранзим B и гранулизин mRNA, и в кръвта – гранзим B и перфорин mRNA [131].

Скорошни проучвания за подобряване на неинвазивните биомаркери за разграничаване на антитяло-медиирано отхвърляне от друг тип отхвърляне са фокусирани върху dd-cfDNA (donor-derived cell free DNA) в плазма [132, 133], HLA специфични паметови B-клетки в периферна кръв [134, 135] и донорспецифични тъканни екзозоми в циркулацията на реципиента [135].

Чрез използване на B-клетъчен ELISpot анализ са оценени циркулиращи паметови B-клетки, насочени срещу HLA антигени от клас I и II както при сенсибилизирани и несенсибилизирани пациенти в списъка на чакащите за бъбречна трансплантация, така също и при бъбречно трансплантирани пациенти с доказана ABMR [134, 135]. HLA специфични паметови B-клетки в периферна кръв са доказани в групата на сенсибилизираните и при тези с ABMR, но липсват при несенсибилизираните и здравите контроли. Освен това е доказано, че колкото по-силен е донорспецифичният паметов B-клетъчен отговор, толкова по-агресивна е реакцията на отхвърляне на алотрансплантата.

2.7.3. МЕНИДЖМЪНТ НА СЪЩЕСТВУВАЩИТЕ DSA

При трансплантация на сенсибилизирани реципиенти рискът от развитие на антитяло-медиирано отхвърляне и преждевременна загуба на алотрансплантата е по-висок спрямо тези без антитела. При тази група пациенти съществуват две възможности: избягване на донори, към които са сенсибилизирани, или приемане на DSA и адаптиране на терапията [149].

HLA антигени на трупен донор, срещу които са открити антителата в реципиента, в стойност, която се счита за неприемлива от трансплантационния център, прилагайки техника за виртуален кросмач, се означават като „неприемливи несъответствия“ със съответния донор [150]. С помощта на тази информация се гарантира, че донорският орган няма да бъде предоставен на реципиент, който има съществуващи DSA [150, 151, 152]. Когато пациентът е образувал алоантитела към > 85% от HLA антигени, срещащи се в донорната популация, този пациент се счита за силно сенсибилизиран. Такива пациенти остават дълго време в листата на чакащи за трансплантация, поради малкия брой възможности за отрицателен реален кросмач с потенциален нефродонор. Програмата на Eurotransplant за „Acceptable Mismatch” (приемливи несъвместимости) е създадена през 1989 година, преди почти 35 години, с цел да се даде възможност на силно сенсибилизирани пациенти да бъдат трансплантирани, което е довело до провеждане на повече от 1500 трансплантации от трупни донори [152].

Разпределението на органи при силно сенсибилизирани пациенти в рамките на програмата Eurotransplant Acceptable Mismatch (EAM) се основава на HLA фенотипа на потенциалния реципиент плюс приемливите антигени, създавайки т.нар. "разширен" HLA фенотип. Това са HLA антигени, към които пациентът никога не е синтезирал антитела, доказано след провеждане на обширни лабораторни изследвания. Всеки наличен орган на починал донор, който съответства на този разширен фенотип, задължително се разпределя на тези пациенти от EAM, което води до намаляване времето на чакане [153, 154]. Пациентите, трансплантирани по програма EAM, са с по-добра дългосрочна преживяемост на присадката в сравнение със силно сенсибилизирани трансплантирани без тази програма [169]. От PROCARE (нидерландско мултицентрово проучване) кохорта, включваща всички БТ, проведени в Нидерландия, за

периода 1995-2005 г., са селектирани трансплантираните от трупен донор с минимум 1 HLA несъответствие. За да определят ефекта на различните схеми за разпределение на органи върху процента на късното отхвърляне, анализаторите проследяват кумулативната честота на отхвърляне между 6 месеца и 5 години и не наблюдават разлики в този по-късен период [168]. Критерии за допустимост за включване в програмата EAM са кумулативно време на изчакване в списъка на Eurotransplant Kidney Allocation System (ETKAS) ≥ 2 години и CDC PRA > 85% в исторически или текущи серумни проби. CDC анализите са извършени чрез използване на пациент-специфични клетъчни панели от лимфоцити, които имат само 1 HLA несъответствие с пациента, в които отрицателните реакции позволяват да се определят приемливите антигени [172]. Пациентите, трансплантирани чрез програмата EAM, показват значително по-ниски проценти на отхвърляне в сравнение със силно сенсибилизирани пациенти, трансплантирани без АМ програма (p = 0,004) и сравними с несенсибилизираните пациенти, независимо от други рискови фактори за отхвърляне. Независимо от успеха на програмата, все пак остават пациенти, които няма да бъдат трансплантирани чрез нея, поради високия процент PRA в комбинация с техните по-редки HLA фенотипове. За тези пациенти е необходимо да се търсят алтернативни възможности.

Пълното изчистване на DSA несъмнено е свързано с най-ниския имунологичен риск при трансплантация на органи. Трансплантацията обаче е процес, при който за всеки отделен пациент трябва да се вземат предвид множество рискове. Всеки реципиент, обмислящ трансплантация, е изправен пред анестезиологичен, хирургичен, имунологичен и медицински риск (с потенциалната имуносупресия се увеличава рискът от обостряне на хронични заболявания или развитието на нови) и икономически риск (с цената на потенциални финансови загуби). Всички тези аспекти трябва да бъдат взети предвид, така че общият риск от

трансплантация да бъде балансиран спрямо риска да не се трансплантира. Десенсибилизацията на пациентите преди извършване на трансплантация се възприема като висок риск поради наличие на съпътстващи заболявания. В този контекст може би е по-подходящо да се приеме този повишен имунологичен риск от трансплантацията поради степента на риска от увреждане, с който се сблъскват пациентите, ако не са трансплантирани [174].

За силно сенсибилизирани се считат пациенти, чийто HLA антителен профил е реагирал с ≥ 85% от антигените, представени в донорската популация [175]. Относителното ниво на сенсибилизация на даден реципиент може да бъде изчислено на базата на неприемлив антигенен профил спрямо честотата на тези HLA антигени в донорната популация, която се нарича изчислени (cPRA), или виртуални панел-реактивни антитела (vPRA) или изчислена реакционна честота (cRF). Тази стойностти дават информация към какъв процент от актуалния донорски пул пациентът е сенсибилизиран [171]. Изследване на Wehmeier и колеги показва, че не количеството на HLA антителата, а тяхната специфичност към несъвместимите HLA върху донорския орган определят изхода за присадката [193].

Най-ефективният начин за повишаване на честотата на трансплантациите при сенсибилизирани пациенти е да им се даде по-голям приоритет при разпределение на донорски органи. Системата за разпределение на бъбреците (Kidney Allocation System – KAS) в САЩ е довела до увеличаване процента на трансплантация на сенсибилизирани пациенти, чрез използване на точкова система с подвижна скала за пациенти с cPRA > 20%. В тази система силно сенсибилизираните пациенти (определени като cPRA ≥ 98%) получават допълнително предимство – при регионално разпределение за пациенти с cPRA от 99% и при национално разпределение за пациенти с cPRA от 100% [183, 184, 185]. Честотата на

трансплантации на силно сенсибилизирани пациенти се е увеличила от 2,4 до 13,4% през първата година на приложение [185]. Това увеличение на процента на трансплантация е довело до намаляване на средното време на чакане за силно сенсибилизирани пациенти от > 19 години до 3,2 години [185]. Дори и с приложението на тази система се предполага, че най-силно сенсибилизираните пациенти с cPRA 99,95-100% се трансплантират рядко и остават дълго време в листата на чакащите [175].

Поради недостиг на органи от трупни донори, още преди 30 години в Южна Корея е създаден алтернативен път за донорство, чрез разширени стратегии за живо донорство. Те включват десенсибилизация при антитяло несъвместими трансплантации и програми за донорство на бъбречни двойки – KPD (kidney paired donation). В тази програма за намиране на HLA съвместими донори, HLA и/или AB0 несъвместими двойки пациент-донор се въвеждат в специални кръгове за съвпадение, за да се намери най-голям брой съвместими комбинации [187]. За да увеличат максимално съвместимостта между донор и реципиент и да се сведе до минимум имунологичният риск, тези многоцентрови KPD програми използват усъвършенствани алгоритми за откриване на оптимална съвместимост, с едновременен дву-, три- или повече многостранни обмени. Началното определяне на съвместимостта се основава на виртуален кросмач, с последващ реален такъв. Логистично е възможно да има няколко типа обменни комбинации, като директен обмен между две двойки, кръгов обмен между три или повече двойки или домино обмен, недиректен обмен от анонимен донор, като крайният донор дарява на пациент в списъка на чакащи трансплантация [187]. Резултатите от трансплантацията на тези пациенти, трансплантирани чрез KPD програми, са отлични и съпоставими с резултатите от трансплантацията на несенсибилизирани пациенти [188, 189]. Въпреки че KPD програмите са изключително успешни, силно сенсибилизираните пациенти отново ос-

тават най-трудните за трансплантация. По-малко от 15% от тях могат да намерят съвместима двойка в KPD програмите [190]. За силно сенсибилизирани пациенти се съобщава, че реалният кросмач често е положителен, въпреки че първоначалният виртуален кросмач е бил отрицателен [187]. От друга страна, определянето на твърде много неприемливи антигени може да доведе до невъзможност да се намери съвместима двойка. Скорошно наблюдение показва, че преформирани DSA, насочени срещу HLA клас I, клас II или и двата класа, показват различен риск от загуба на присадката. DSA от клас I и II са ясен рисков фактор за загуба на присадка при трансплантации от трупни донори, докато при живи донорни DSA от клас I и II са свързани с повишен риск от отказ на присадката, но това не може да бъде оценено поради ниското им разпространение [191].

Десенсибилизацията обикновено се използва за създаване на възможност за трансплантация на HLA несъвместими бъбреци с отрицателен кросмач. Повечето протоколи за десенсибилизация използват или високи дози интравенозен имуноглобулин (IVIg) или ниска доза IVIg в съчетание с плазмафереза. През последните няколко години се прилага бортезомиб, който е по-мощен, когато се използва заедно с плазмафереза и ритуксимаб [62, 172]. Съвсем наскоро нов медикамент, наречен ензим, разграждащ IgG, получен от Streptococcus pyogenes (IdeS), се използва за целите на десенсибилизацията. Тази ендопептидаза има способността незабавно и селективно да разцепи човешки IgG в $F(ab')_2$ и Fc фрагменти. В проучване, проведено в САЩ и в Швеция, общо 25 пациенти са били лекувани с IdeS непосредствено преди HLA несъвместима БТ. Лечение с IdeS е довело до пълно изчезване на IgG DSA в рамките на 6 часа след приложението [192]. В момента се провежда многоцентрово, многонационално, фаза 2 изпитване на IdeS за десенсибилизация (NCT02790437) на пациенти с положителен кросмач.

2.8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ОБОСНОВКА НА ПРОУЧВАНЕТО

От направения обзор на литературата може да се направят следните заключения:

1. HLA съвместимостта е основен имунологичен маркер за успешна трансплантация.

2. Наличието на DSA, преформирани или de novo синтезирани, е биомаркер, предсказващ лош изход от трансплантация – висока честота на реакции отхвърляне, причинени от антитела, дисфункция и по-ниска преживяемост на присадката.

3. Развитие на de novo DSA след бъбречна трансплантация има при 13-30% от пациентите, които преди това не са били сенсибилизирани.

4. Наличието на преформирани DSA влияе пряко върху вземане на решение за трансплантация. Бъбречната трансплантация не може да се осъществи, ако има положителен кросмач, съпътстван от антидонорни IgG антитела.

5. Не-DSA от клас I се откриват по-рано след трансплантация и се свързват с остра антитяло-медиирана реакция и ранна загуба на присадката.

6. Опитът агресивно да се елиминират преформирани DSA от клас II, особено DQ, може да постави пациента в риск от прекомерна имуносупресия без голяма полза.

Въз основа на изложеното считаме, че с оглед повишаване шанса на сенсибилизираните пациенти за трансплантация и повишаване на преживяемостта е необходима преоценка на критериите за позитивност на претрансплантационния кросмач, показател за нивото на антидонорна алореактивност на пациента. Допускаме, че задълбоченият анализ на характеристиките на HLA антителата в серумите на потенциалните реципиенти, оценени чрез различни параметри (MFI = сила на алоантителата), HLA антигенна/локусна специфичност и др., ще ни позволи да изра-

ботим предиктивен модел за претрансплантационния кросмач, степента на алореактивност на дадения реципиент, а оттам и на риска от антитя-ло-медииран имунен отговор в посттрансплантационния период. Това ще допринесе за индивидуализиран терапевтичен подход при бъбречно трансплантирани пациенти.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

3.1. Цел на изследването

1. Да се характеризират демографският, клиничният и алоимунният статус на кандидатите за бъбречна трансплантация, регистрирани в служебния регистър на ИАМН.

2. Да се проучи ролята на алоимунния профил на потенциалния реципиент при оценка на имунологичния риск преди трансплантация.

3.2. Задачи на изследването

1. Да се анализират демографски и клинични фактори и връзката им с алоимунния отговор при реципиенти за бъбречна трансплантация, регистрирани в служебния регистър на ИАМН.

2. Да се анализират наличието/честотата, видът, специфичността и силата на алоимунния отговор при реципиенти за бъбречна трансплантация, регистрирани в служебния регистър на ИАМН.

3. Да се анализират класически и некласически сенсибилизиращи фактори, които могат да повлияят върху продукцията на анти-HLA антитела.

4. Да се проследи динамиката в алоантителния статус на пациентите, чакащи БТ във времето.

5. Да се съпоставят честотите на HLA-A, -B, -C, DRB1 и DQB1 алелни групи/антигени в групи от здрави индивиди и донори на органи от българската популация с алоантителните специфичности на сенсибилизираните потенциални реципиенти за БТ, за да се оцени делът на потенциалните донори, носещи съответния несъвместим антиген и следователно неподходящи за пациента от имунологична гледна точка.

6. Да се въведе твърдофазов микросферов метод за откриване на донор-специфични антитела (Luminex кросмач) и да се оцени възможността за приложение в рутинната практика.

7. Да се анализират данните от рутинните кръстосани проби за съвместимост и да се оцени прогностичната стойност на алоантителния статус на пациента за резултата от проспективния кросмач – виртуален кросмач.

8. На базата на анализите да се разработи алгоритъм за оценка на антидонорна имунна реактивност от хуморален тип, който да намери приложение в рутинната практика за оптимизиране и прецизиране под-бора на реципиентите при трансплантация.

4. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

4.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА И БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

4.1.1. Подбор на групите

Подборът на пациентите, включени в дисертационния труд, беше извършен в Клиника по клинична имунология (ККИ) с банка за стволови клетки на УМБАЛ „Александровска“ – София. Оформени бяха следните групи изследвани лица.

Първата група (група I) включва 600 пациенти (359 мъже и 241 жени на средна възраст 42,18 г. и 43,41 г., съответно), с хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), регистрирани в служебния регистър на Изпълнителната агенция медицински надзор (ИАМН), на които през периода от януари 2021 до декември 2021 г. беше анализиран антителният статус (табл. 1).

Таблица 1. *Възрастова характеристика на пациентите*

Пол		**Възраст**			
	N	Mean	SD	Min	Max
Мъже	359	42,18	12,80	29,0	72,70
Жени	241	43,41	12,18	13,30	69,70
Общо	600	42,68	12,56	29,0	72,70

Втората група (група II) включва 208 пациенти (100 мъже и 108 жени) от регистъра на чакащи бъбречна трансплантация, които според алоантителния си статус бяха подразделени на две групи: **IIa** – реципиенти, положителни за анти-HLA антитела (n = 109), на средна възраст 48,66 ± 10,86 г., от които 31 мъже и 71 жени; **IIb** – отрицателни за алоантитела (n = 99), на средна възраст 48,81 ± 11,43 г., от които 62 мъже и 37 жени. Детайлното разпределение по възраст и пол в група II е представено в табл. 2.

Таблица 2. *Възрастово-полова структура на изследваните пациенти от група II*

Група	Пол	N	Възраст			
			Mean	SD	Min	Max
Позитивни IIa	Мъже	38	48,11	10,92	26,00	68,00
	Жени	71	48,96	10,89	26,00	71,00
	Общо	109	48,66	10,86	26,00	71,00
Негативни IIb	Мъже	62	47,26	11,53	14,00	72,00
	Жени	37	51,41	10,91	20,00	72,00
	Общо	99	48,81	11,43	14,00	72,00

Третата група (група III) включва 204 случайно подбрани неродствени клинично здрави индивиди от българската популация, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания и с нормална бъбречна функция. 104 от изследваните индивиди са мъже, а 100 са жени, на средната възраст 32,5 ± 6,5 години. Мотивът за включването на контролна група от здрави индивиди беше въз основа на честотите на различните HLA-A, -B, -C, DRB1, DQB1 алелни групи/антигени в здравата българска популация да се оценят шансовете за наличие на антитела към тях при пациентите с положителен алоантителен статус. С този анализ целим да се опитаме да прогнозираме вероятността за антидонорна реактивност при сенсибилизираните реципиенти от листата на чакащите БТ.

Четвъртата група включва 197 трупни донори от българската популация, без фамилна анамнеза за наследствени заболявания и с нормална бъбречна функция, включваща 114 мъже и 83 жени, на средната възраст 45,1 ± 20,5 г., подадени за типизиране от ИАТ или ИАМН в периода януари 2008 до май 2023 година. С този анализ целим да се опитаме да прогнозираме вероятността за антидонорна реактивност при сенсибилизираните реципиенти от листата на чакащите БТ въз основа на честотите на различните HLA алелни групи/антигени в групата от трупни донори.

Петата група се състои от реципиенти и донори, между които е извършен проспективен и/или ретроспективен кросмач. В нея са включени 746 потенциални реципиенти за БТ, 155 потенциални живи и 102 трупни донори. 679 от пациентите са били отрицателни за алоантитела, при 58 са установени недонор-специфични антитела, а при 9 са специфицирани антидонорни антитела при периодичните скрининги. Данни за сенсибилизиращи събития има при 561 от реципиентите: кръвопреливания (n = 353), бременности (n = 112), бременности и кръвопреливания (n = 84), предходни трансплантации (n = 7), предходни трансплантации и кръвопреливания (n = 5). Обобщени и анализирани са резултатите от 913 флоуцитометрични кросмача (Flow cytometry crossmatch – FCXM), извършени в периода януари 2010 г. – декември 2017 г., от които 755 с актуални и 158 с исторически серуми. Идеята е да се потърси корелация между наличието, локусната специфичност и силата на донор-специфичните антитела с резултатите от проспективния и/или ретроспективния кросмач при сенсибилизирани и несенсибилизирани реципиенти, с което да се допринесе за разработването на протокол/алгоритъм за виртуален кросмач при бъбречна трансплантация.

4.2. МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА АЛОАНТИТЕЛА

4.2.1. Стандартен комплемент-зависим лимфоцитотоксичен метод (complement-dependent cytotoxicity – CDC)

CDC анализът идентифицира фиксиращи комплемента антитела, които могат да предизвикат свръхостра реакция на отхвърляне. Съществуват модификации на техниката за повишаване на чувствителността и специфичността, които са публикувани, но не се използват рутинно във всички лаборатории.

Материал за изследване: Серум

Необходими реактиви и консумативи: резервоарни плаки – 60 гнездни за съхранение на серуми; плаки на Терazаки (Greiner Bio-One 60 well HLA Terasaki, каталожен номер 653180); заешки комплемент (One lambda Inc., каталожен номер CABC-5); флуоресцентна боя – FluoroQuenchTM Stain (One lambda Inc., каталожен номер FQAE 100); положителна и отрицателна серумна контрола, течен парафин, вариабилни пипети, накрайници за пипети, фетален телешки серум (Fetal calf serum – FCS), оптимизиран дилуент за клетъчна подготовка, аналог на фосфатно буфериран солев разтвор – PBS (Cell wash – Becton Dickinson).

Необходима апаратура: флуоресцентен инверторен микроскоп; шестканална Хамилтонова спринцовка (1,0 мкл и 5,0 мкл), центрофуга Eppendorf.

Принцип на метода:

Лимфоцити с познати HLA антигени се инкубират с непознат серум и заешки комплемент. Замразеният заешки комплемент трябва да се съхранява при температура ≤ -65º C. Лиофилизираният комплемент може да се съхранява при 2-5º C до употреба. Преди употреба замразеният комплемент трябва да се размрази на водна баня при температура 20º C, след което се поставя в съд, пълен с начупен лед. Не се допуска повторно замразяване след първоначалното размразяване.

Ако серумът съдържа антитела, способни специфично да се свържат с антигените върху мембраната на лимфоцитите, настъпва комплемент-медиирана лимфолиза. Тестът се извършва с неразреден, необработен серум или серум, който предварително е третиран с дитиотреитол (ДТТ) с цел диференциране на IgM от IgG алоантитела. ДТТ инактивира IgM антитела чрез редукция на дисулфидните мостове.

Отчитането се извършва на флуоресцентен инвенторен микроскоп, като отрицателните (живи) лимфоцити светят със зелена флуоресценция, а положителните (мъртви) лимфоцити – в червено. Реакцията се оценява

с процента на положителните (мъртви) лимфоцити. Методът е разработен от Mittal и колектив. Този метод определя основно цитотоксични анти-HLA клас I алоантитела. За определянето на HLA клас II алоантитела е необходимо използване на изолирани B-клетки.

Процедура за работа

Серумите на пациентите се получават в ККИ, взети от диализните центрове и транспортирани според изискванията на добрата лабораторна практика. Проверяват се за съответствие, след което се разкапват в резервоарни плаки в две гнезда за пациент (дублиране). Във всяка плака се накапва положителна и отрицателна серумна контрола. Допълнително серумът на всеки реципиент се разпределя по 500 мкл в две криоепруветки. Съхраняват се на температура -80^{o} C. Ако резултатът е положителен, разпределените в криоепруветки проби на пациента се запазват за бъдещи изследвания. Ако резултатът от теста е отрицателен, пробата се унищожава според изскванията на РЗИ.

За получаване на клетки се взема кръв от 45 здрави донори, с предварително определени HLA формули, които съставят т.нар. клетъчен панел. Кръвта се взема върху антикоагулант – натриев хепарин, и може да се съхранява до 72 часа, на температура 20-25^{o} C, хоризонтално. Необходимото количество е най-малко 10 мл. Всеки ден серумите на реципиентите се обработват с клетки на два донора.

Изпълнение на метода

1. В четири пластмасови облодънни епруветки от 10 мл се разпределят по 3 мл сепарационна среда (HiSepTMLSM 1077, Density 1.077 + 0.0010g/ml HIMEDIA), предварително темперирана на стайна температура.

2. В отделна градуирана епруветка се разрежда 8 мл кръв с 8 мл с оптимизиран дилуент за клетъчна подготовка (Cell wash).

3. Разредената кръв – 7,5 мл, се наслоява внимателно чрез стичане по стената на епруветката върху сепарационната среда.

4. Центрофурира се пробата на 450 x g за 30 минути на стайна температура.

5. Образуваните върху сепарационната среда пръстени се аспирират внимателно с пипета и се прехвърлят в нова 10 мл епруветка. Добавят се 2 мл миещ разтвор (Cell wash).

6. Центрофугират се на 200 x g за 15 минути за максимално отстраняване на тромбоцитите.

7. Супернатантата се отлива, а утаената на дъното на епруветката клетъчна суспензия се размесва внимателно на вортекс.

8. Клетките се промиват отново с 2 мл Cell wash и се центрофугират на 300 g за 10 минути.

9. Отстранява се супернатата и клетките се адаптират до 1-2 x 10^6/мл (8-10 клетки на среден квадрат в камерата на Bürker) в Cell wash, съдържащ 2% FCS.

10. В предварително подготвени плаки на Terasaki с 5 мкл парафин във всяко гнездо с шестканална Хамилтонова микроспринцовка се накапват по 1 мкл/гнездо от разпределените в резервоарната плака серуми на пациентите. Между всеки ред микроспринцовката се промива двукратно с Cell wash.

11. Накапва се по 1 мкл от адаптираните клетки на донора във всяко гнездо. Серумите на всички реципиенти, чакащи БТ са инкубират с различните донори.

12. Плаките се инкубират за 30 минути на стайна температура.

13. Във всички гнезда се накапва по 5,0 мкл заешки комплемент.

14. Инкубират се на стайна температура – 60 минути.

15. Във всяко гнездо се накапва по 5 мкл флуоресцентна боя – FluoroQuenchTM Stain, съдържаща смес от реагенти, улесняващи мик-

роскопската оценката на клетките и удължаващи времето за отчитане на резултатите до 24 часа.

16. Плаките се оставят 15 минути на стайна температура, за да се утаят и оцветят клетките. Отчита се на флуоресцентен инверторен микроскоп. Живите клетки светят в зелено, а умрелите (лизираните от комплемента) – в оранжево. Реакцията се оценява според процента на умрелите клетки по таблица 3.

***Таблица 3**. Оценка на реакцията, според процента умрели клетки, при стандартен комплемент-зависим лимфоцитотоксичен метод*

Оценка (Score)	**Умрели лимфоцити (%)**	**Интерпратация/Резултат**
1	0-10	Отрицателен
2	11-20	Съмнително отрицателен
4	21-50	Слабоположителен
6	51-80	Положителен
8	81-100	Силноположителен
0	Липсват клетки	Неотчитаем

Вътрешен качествен контрол

Тестът се приема за валиден, когато са изпълнени следните критерии:

1. Отчетена негативна контрола с оценка 1.

2. Отчетена позитивна антилимфоцитна контрола с оценка 8.

Определяне на алоантителния статус на пациента

Изчислява се т.нар. Панел реактивни антитела (ПРА). Броят на положителните реакции за даден пациент се разделя на броя донорни клетки. Напр., ако е тествана реактивността спрямо 50 донори на клетки и серумът е реагирал с 20 от тях, то ПРА на този пациент са 40%. За положителен се приема ПРА $\geq$ 6%.

4.2.2. Откриване на HLA антитела чрез използване на микросферов флуориметричен метод (Luminex)

За разлика от клетъчните методи при този се използват рекомбинантни HLA молекули. Пречистени HLA молекули са прикачени към микросфери, които свързват само HLA антитела от добавения серум на реципиента, ако има такива. Добавя се флуоресцентно-конюгиран античовешки IgG, който се свързва и открива HLA антиген-антитяло комплекса, а самият анализ се извършва с Luminex платформа. Последната генерира полуколичествен резултат за всяка сфера със среден интензитет на флуоресценция (mean fluorescence intensity – MFI), който се сравнява с отрицателен контролен MFI, за да се определи дали има HLA антитяло в анализираната проба. Базираните на микросфери анализи са с висока специфичност и чувствителност, откриват алоантитела – фиксиращи и нефиксиращи комплемента, както и нискотитърни. Чрез тях могат да бъдат разграничени клас I от клас II антитела в една проба; да се определи изотипът на антитялото и неговият субклас. Броят на идентифицираните HLA алели продължава да расте и пълният спектър от уникални HLA антигени не може да бъде практически представен при анализи в твърда фаза. Следователно HLA формулата на донора винаги трябва да бъде съпоставяна с антигените, включени в панела, използван от твърдофазовите методи, преди да може да бъде изключено отсъствието на DSA.

Материал за изследване

Серум, съхраняван в хладилник до 7 дни или замразен при температура -20° C или -80° C. Замразеният серум се размразява, центрофугира се на 8000-10 000 x g за 10 минути, непосредствено преди тестването. Всякакви агрегати или замърсяване на пробата могат да доведат до фалшивоположителни или фалшивоотрицателни резултати. Серумът не трябва да се инактивира чрез топлина, тъй като това може да даде висок

фон в теста. Обикновено за теста се използва неразреден серум. Въпреки това, ако серумната проба покаже висок фон, е необходимо да бъде разредена или предварително обработена с EDTA. Отрицателният контролен серум също трябва да се тества при същото разреждане или обработване с EDTA.

Необходими реактиви и консумативи

LABScreen Mixed кит (каталожен номер LSM12); PE-конюгиран кози античовешки IgG (каталожен номер LS-AB2); PBS, филтриран (USA Scientific каталожен номер 9242 – 500 ml 10x); пипети, накрайници за пипети; отрицателен контролен серум, несъдържащ HLA антитяло при тестване по метода LABScreen (каталожен номер LS-NC); 96-гнездна микроплака, 250 микрол, с нетретирана повърхност (Whatman каталожен номер 7701-3250); уплътнители за плаката – лепящо се пластмасово фолио (каталожен номер SSPSEA300).

Необходима апаратура

LABScan 3DTM (Luminex FLEXMAP 3D) за анализ до 500 сфери в един тест и течност, необходима за осигуряване на потока при анализ с каталожен номер LABSCNXS4; центрофуга с ротор за 96 гнездни плаки (1300 g); вортекс за микротитърни плаки; въртяща се платформа; софтуерна програма – HLA Fusion™ (OLI Cat. # FUSPGR).

Принцип на метода

LABScreen Mixed кит е скринингов тест, предназначен за откриване на антитела срещу HLA клас I и клас II, както и към MHC клас I свързана верига A (MICA).

Изпълнение на метода

1. Подготовка на HLA сферите: флаконът със сферите се центрофугира при 600-800 x g за кратко (30 сек), за да се отстранят всички сфери или следи от течност от капачето или стените на флакона.

2. Разбърква се с вортекс-миксер (за около 1 минута) за равномерно суспендиране на сферите.

3. Поставят във всяка ямка на 96-гнездната плака по 5 микрол от LABScreen сферите.

4. Поставят по 20 микрол негативна контрола, позитивна контрола и серуми на пациенти в съответните ямки на плаката, в които преди това са поставени сферите.

5. Плаката се покрива с лепящото се пластмасово фолио и я се поставя в кутия, за да се предпази от достъпа на светлина.

6. Инкубира се за 30 минути при стайна температура (20-24°C) на тъмно, върху въртящата се платформа (200 завъртания в минута).

7. Приготвя се 1 x работен разтвор от 10 X промивен буфер с дестилирана вода.

8. След изтичане на времето за инкубиране към всяка ямка се добавя по 150 микрол от 1 x промивен буфер.

9. Размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

10. Надстоящата течност се отстранява с рязко изхвърляне.

11. Добавя се 200 микрол от работния промивен буфер към всяка ямка на плаката. Покрива се плаката с ново лепящо фолио, размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

12. Повтарят се стъпки 10 и 11.

13. От приготвения ex tempore 1x работен разтвор от 100 x PE-конюгиран античовешки IgG буфер се разкапват по 100 микрол към всяка ямка.

14. Плаката се покрива с ново лепящото се пластмасово фолио, след това се поставя в кутия, за да се предпази от достъпа на светлина.

15. Инкубира се за 30 минути при стайна температура (20-24°C) на тъмно, върху въртящата се платформа (200 завъртания в минута).

16. Размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 g за 5 минути.

17. Надстоящата течност се отстранява с рязко изхвърляне.

18. Добавя се 200 микрол от 1x промивен буфер към всяка ямка на плаката. Покрива се с ново лепящо фолио, размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

19. Повтаряме стъпки 10 и 11.

20. Добавяме по 80 µl 1 x PBS към всяка ямка. Покриваме плаката с ново лепящо фолио и вортексираме за 1 минута.

21. Отстранява се покривното фолио и се събират пробите на анализатора – Luminex FLEXMAP 3D

Вътрешен качествен контрол

Отрицателна конторола (NC) – отрицателен контролен серум, валидиран за дадена партида LABScreen сфери.

Положителна контрола (PC) – референтни серумни проби с дефинирана специфичност на HLA антителата.

Когато е необходимо, зададената гранична стойност на анализа (cut-off) може да се коригира. Това е необходимо за серуми с висок процент ПРА, в които се откриват положителна реакция и собствен(и) антиген(и) на пациента. Стойността на флуоресценция за собствения антиген може да се използва като гранична стойност.

Ако някоя сфера в скрининговия тест е положителна, тогава резултатът се определя като положителен и е необходимо да бъде проведен допълнителен анализ за определяне на специфичността на антитялото или антителата.

Отчитане на резултатите

1. Данните от анализа се събират на апарат Luminex FLEXMAP 3D след направена калибрация, съгласно ръководството за потребителя на Luminex.

2. Избира се шаблон според каталожния номер на продуктовия комплект и неговия партиден номер, изтеглени от уебсайта на One lambda, версия xPONENT 4.2.

3. Създава се име на файл за пробите, които ще се събират.

4. Плаката, която ще се анализира, се поставя върху XY платформата.

5. Плаката се стартира за събиране на пробите, а получените данни се съхраняват в .csv файл.

6. Реактивността на всяка проба се изчислява от „суровите“ стойности на флуоресценция, записани от LABScan анализатор, като (.csv файл) за всяка сфера покрита с HLA антигени.

7. Изчислената анти-HLA серумна реактивност се коригира за неспецифично свързване на отрицателната контролна сфера и фонови стойности (получени от тестването на отрицателния контролен серум за определяне на нормализирано фоново съотношение (NBG съотношение).

8. Резултатите се анализират чрез софтуер HLA Fusion™.

4.2.3. Откриване на HLA антитела чрез използване на твърдофазови анализи с единични антигени

Материал за обработка

Серум, съхраняван в хладилник до 7 дни или аликвотни части, които са замразени при температура -20° C или -80° C и размразени точно преди анализ. Агрегатите трябва да бъдат отстранени от тестовия серум чрез центрофугиране на 8000 – 10 000 g за 10 минути. Всякакви агрегати или замърсяване на пробата може да доведе до фалшивоположителни или фалшивоотрицателни резултати. Серумът не трябва да се инактивира чрез топлина, тъй като това може да даде висок фон в теста. Обикновено за теста се използва неразреден серум. Въпреки това, ако пробата от серум даде висок фон, е необходимо да бъде разредена или предвари-

телно обработена с EDTA. Отрицателният контролен серум също трябва да се тества при същото разреждане или обработване с EDTA.

Необходими реактиви и консумативи

LABScreen™ Single Antigen HLA Class I (каталожен номер LS1A04); LABScreen™ Single Antigen HLA Class II (каталожен номер LS2A01); PE-конюгиран кози античовешки IgG (каталожен номер LS-AB2); PBS, филтриран (USA Scientific каталожен номер 9242 – 500 ml 10X); накрайници за пипети; отрицателен контролен серум, несъдържащ HLA антитяло при тестване по метода LABScreen (каталожен номер LS-NC); 96-гнездна микроплака, 250 микрол, с нетретирана повърхност (Whatman каталожен номер 7701-3250); уплътнители за плаката – лепящо се пластмасово фолио (каталожен номер SSPSEA300).

Необходима апаратура

LABScan 3D^{TM}(Luminex FLEXMAP 3D) за анализ до 500 сфери в един тест и течност, необходима за осигуряване на потока при анализ с каталожен номер LABSCNXS4; центрофуга с ротор за 96 гнездни плаки (1,300 x g); вортекс за микротитърни плаки; въртяща се платформа; софтуерна програма – HLA Fusion™ (OLI Cat. # FUSPGR) .

Принцип на метода

Предназначен е за откриване на антитела срещу HLA клас I и HLA клас II антигени в човешки серум. С единични антигенни сфери (SAB) могат да бъдат открити индивидуални HLA специфичности. За извършване на тези анализи серумът на реципиента се инкубира с пречистени HLA антигени, фиксирани върху твърдофазова платформа (обикновено микрочастици). Добавя се флуоресцентно-конюгиран античовешки IgG, който се свързва и открива HLA антиген-антитяло комплекса, а самият анализ се провежда на Luminex платформа. Последната генерира полуколичествен резултат за всяка сфера със среден интензитет на флуоресценция (MFI), който се сравнява с отрицателен контролен MFI, за да се

определи дали има HLA антитяло и неговата сила. Предварително приети стойности на MFI, като клинично значими от трансплантационния център, служат за вземане на решения за и против трансплантация, както и за определяне на необходимостта от десенсибилизация, преди или след трансплантация, за да предскажат резултати от кросмач реакцията и да се диагностицира и мониторира антитяло-медиирано отхвърляне, резултат от DSA. Измерените MFI стойности в рамките на и между лабораторните е много трудно да бъдат сравнявани. SAB анализите са бързи (3-6 часа), с до 100 уникални антигенни сфери, които могат да бъдат тествани в една реакционна ямка, с висока производителност, с допълнителна възможност за мултиплексиране за тестване на много пациенти едновременно.

Изпълнение на метода

1. Подготовка на HLA сферите: за целта е необходимо флаконът със сферите (клас I или II) първо да се размрази, след което да се центрофугира при 600-800 x g за кратко (30 секунди), за да се отстранят всички сфери или следи от течност от капачето или стените на флакона.

2. Разбърква се с вортекс-миксер (за около 1 минута) за равномерно повторно суспендиране на сферите.

3. Накапват се във всяка ямка по 5 микрол от LABScreen сферите (клас I или II)

4. Накапват се по 20 микрол негативна контрола, позитивна контрола и серуми на пациенти в отделни ямки на 96-гнездната плака, в които преди това са поставени сферите.

5. Плаката се покрива с лепящото се пластмасово фолио, след това се поставя в кутия, за да се предпази от достъпа на светлина.

6. Инкубира се за 30 минути при стайна температура (от 20 до 24° C) на тъмно, върху въртящата се платформа (200 завъртания в минута).

7. Приготвя се 1x работен разтвор от 10x промивен буфер с дестилирана вода.

8. След изтичане на времето за инкубиране към всяка ямка се добавя по 150 микрол от 1x промивен буфер.

9. Размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

10. Надстоящата течност се отстранява с рязко изхвърляне.

11. Добавя се 200 микрол от 1x промивен буфер към всяка ямка на плаката. Покрива се с ново покривно фолио, размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

12. Повтарят се стъпки 10 и 11.

13. От приготвения ex tempore 1x работен разтвор от 100x PE-конюгиран античовешки IgG разтвор се разкапват по 100 микрол към всяка ямка.

14. Плаката се покрива с лепящото се пластмасово фолио, след това се поставя в кутия, за да се предпази от достъпа на светлина.

15. Инкубира се за 30 минути при стайна температура (от 20 до 24° C) на тъмно, върху въртящата се платформа (200 завъртания в минута).

16. Размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

17. Надстоящата течност се отстранява с рязко изхвърляне.

18. Добавя се 200 микрол от 1x промивен буфер към всяка ямка на плаката. Покрива се с ново покривно фолио, размесва се за 1 минута на вортекс и се центрофугира при 1300 x g за 5 минути.

19. Повтарят се стъпки 10 и 11.

20. Добавят се по 80 микрол 1x PBS към всяка ямка. Плаката се покрива за 1 минута на вортекс с ново покривно фолио.

21. Покривното фолио се отстранява и се събират пробите на апарат Luminex FLEXMAP 3D, калибриран преди анализа чрез специфичен за апарата калибрационен кит.

Вътрешен качествен контрол

Качественият контрол на клас I и клас II се провежда чрез включването на серуми за положителна и отрицателна контрола в серията с подлежащите на анализ проби. Тези контроли трябва да се включват във всеки един тест, за да може да се определи появата на техническа грешка или невалидност на реактивите, необходими за анализа. За SA китове, серумите за положителна контрола трябва да реагират с повечето или всички HLA конюгирани сфери (> 85%) със стойности, близки до посочените в таблицата към съответния партиден номер. Серумите за отрицателна контрола трябва да реагират с малък или никакъв брой сфери, генерирайки MFI стойности под 1000.

Отчитане и оценка на резултатите

Отчитането на пробите се осъществява със специализиран програмен продукт (HLA Fusion™ software), който определя като положителни алоантителни специфичности с предефинирани MFI стойности, изчислени от данните, записани от апарата при събирането на пробите за всяка HLA сфера, като .cvs file. Изчислява се анти-HLA серумна реактивност след корекция за неспецифично свързване към отрицателни контролни сфери и стойностите на фона (получени от тестване на отрицателна фабрична контрола, необходима при анализа за определяне на нормализирано фоново съотношение – NBG ratio).

$$\text{NBG ratio} = \frac{\text{S\#N}bead/SNCbead}{BG\#N/BGNCbead}$$

S#Nbead – специфична за пробата флуоресцентна стойност за сфера#N;
SNCbead – специфична за пробата флуоресцентна стойност за отрицателни контролни сфери;

BG#Nbead – фонова флуоресцентна стойност за отрицателна серумна контрола за сфери#N;
BGNCbead – фонова флуоресцентна стойност за отрицателна серумна контрола за отрицателни контролни сфери.

При оценка на HLA антитела клинично значимият праг първоначално е определен като стойността на MFI, при която ХМ ще бъде положителен. Освен това алоантителата са локус-специфични – например за антителата срещу С-локусни антигени би трябвало да се приеме по-висок праг в сравнение с А и В локуси, тъй като експресията на С-локусни антигени е по-ниска. Наличието на споделени епитопи, т.е. такива, които са разпределени върху много сфери, води до генерирането на твърде слаб сигнал, а това от своя страна може да доведе до неотчитане на дадено антитяло – „ефект на разреждане“. Например общият („public”) епитоп Bw6 се експресира върху 36 сфери. В анализа Luminex, ако антитяло срещу Bw6 е ограничаващият фактор (т.е. недостатъчно за насищане на микрочастиците), антитялото ще бъде равномерно разпределено върху всичките 36 сфери и нито една отделна сфера няма да бъде покрита с достатъчно количество антитяло, за да генерира на силен флуоресцентен сигнал. Когато антитялото Bw6 е разпределено върху по-малък брой сфери, сигналът може да бъде открит и да има положителен резултат, тъй като е налице по-висока плътност на дадения антиген върху сферата. Трябва да се отбележи, че дори в рамките на един и същи анализ се съобщава за вариабилност в MFI между многото антигенни сфери. Ако нивото на антитела се повиши от 2000 на 4000 MFI за един месец, това повишаване на MFI не означава непременно, че нивото на антитялото се е удвоило, то може да е резултат от ежедневната вариабилност в една лаборатория. Един от подходите за разрешаване на въпроса дали стойностите на MFI действително са се увеличили, или са останали същите, е да се изработят двете проби (текуща и историческа) едновременно.

Един от техническите проблеми, свързани с SAB методите, е наличието на така наречените „интерфериращи фактори“, които маскират откриването на антитела. Това явление най-често се наблюдава при силно сенсибилизирани пациенти и е известно в литературата като "прозона ефект". Терминът се използва, за да се опише повишаване на реактивността на сферите при разреждане на серумите, показващо наличие на интерфериращи вещества в серума на пациента. Такива серумни съставки блокират свързването на HLA IgG антителата с антигените върху сферите и включват компоненти на комплемента, IgM антитела и имунни комплекси. Добавянето на EDTA, дитиотреитол (DTT), топлинна инактивация или разреждане може да преодолее блокиращото действие на тези фактори, при което ще бъдат детектирани маскирани от тях антитела. Всеки от горните подходи изисква обработка на серума преди теста, което означава допълнително време, увеличени разходи и възможности за възникване на технически грешки.

Доказаните чрез микросферови методи алоантитела може да са свързани със значителен риск от ранно антитяло-медиирано отхвърляне и загуба на присадката, но съществуват и данни, че част от тези антитела нямат клинично значение. Тези разлики в интерпретацията вероятно могат да се обяснят с различни клинични фактори и/или методологични аспекти на твърдофазовите методи. Първите включват пациент (първична срещу ретрансплантация, комбинация мъж/жена, трупен донор срещу жив донор, анамнеза за сенсибилизация и т.н.), индукционна и поддържаща имуносупресивна терапия, честота на последващи прегледи, дали са извършени биопсии и други. Многобройни технически фактори също могат да допринесат за несъответствията в данните, включително граници на MFI; източник на антиген; антигенна структура (интактен или денатуриран); плътност на антигена; наличие на интерфериращи фактори; биологични характеристики на HLA антителата (напр. активиране на

комплемента, субклас на имуноглобулина, реактивност към HLA-E). И накрая, платформата, използвана за идентифициране на HLA антитела (Flow срещу Luminex), също влияе на специфицирането на антителата.

Друга пречка при SAB тестването са денатурирани антигени, т.е. неправилно нагънати или разградени HLA протеини на повърхността на единични антигенни перли. За първи път се съобщава за денатурирани антигени в серуми, получени от здрави и неалоимунизирани мъже, в които се откриват HLA антитела. Антителата са предимно към редки HLA специфичности, което прави малко вероятно да са резултат от предишна сенсибилизация. Впоследствие се съобщава, че тези неочаквани алоантитела се насочват към скрити (“criptic”) епитопи върху HLA молекули, които не са в нативна конфигурация; най-вероятно е те да са резултат от различни стъпки в производството на рекомбинантни HLA антигени, като по този начин стават имунологично достъпни. Често антитела срещу денатурирани антигени показват положителен виртуален кросмач и отрицателен реален. Въпреки това в литературата има данни, че антителата, които вероятно са насочени към денатурирани антигени, не могат да бъдат игнорирани. Тъй като HLA антигените са съставени от множество и припокриващи се епитопи, едно антитяло към споделена аминокиселинна последователност може да реагира с множество антигени. Именно тук познанията по серология и кръстосано реагиращи групи (CREG) могат да помогнат при тълкуването на резултати от съвременните анализатори.

4.2.4. Трицветен метод за флоуцитометричен кросмач (Flowcytometric crossmatch – FCXM)

Материал за обработка

Лимфоцити, изолирани от периферна кръв (EDTA или хепарин) или слезка; серум – пресен или исторически. Кръвта трябва да се съхранява при стайна температура (15-25° C), за да се осигури добро разделя-

не и висока жизнеспособност на изолираните клетки. Кръвта трябва да бъде обработена възможно най-скоро след получаването за максимално разделение и запазване виталитета на клетките. След шестия час от вземането се наблюдава увеличен брой на еритроците при градиентно изолираните мононуклеарни клетки.

Необходими реактиви и консумативи

HiSepTMLSM 1077 (HiMedia, с каталожен номер LS001) – изоосмотична среда с нисък вискозитет, съдържаща полизахароза и натриев диатризоат, регулиран до плътност 1,0770 ± 0,0010 г/мл; центрофуга Ependorf; CD3 PerCP (BD clone SK7 с каталожен номер 345 766); CD19 PE (BD clone 4G7 с каталожен номер 345 777); античовешки IgG (Fab')2 фрагмент (Invitrogen с каталожен номер 31 628); 10x CellFix (BD с каталожен номер 340 181); епруветки – BD Falcon; положителна контрола и отрицателна контрола. Положителната контрола представлява пул от серуми с анти-HLA активност (ПРА > 85%,); отрицателната контрола не трябва да има антилимфоцитна активност. срещу лимфоцити.

Необходима апаратура

Флоуцитометър FACSCanto II (BD Biosciences, анализиран със софтуера BD FACSDIVA™ (BD Biosciences) с 1024 канална скала.

Принцип на метода

Кросмач реакция с поточна цитометрия (FCXM) се използва като част от оценката на риска преди трансплантация и откриване на донор-специфични анти-HLA антитела. Той е по-чувствителен от цитотоксичния кросмач (CDC-XM), позволявайки откриване и на нискотитърни, както и на нефиксиращи комплемента HLA антитела, като по този начин подпомага оценката за имунологичния риск преди трансплантация. Стандартният трицветен FCXM може да бъде разделен на две части. Първата част се състои от изолиране на донорни лимфоцити. Втората част включва инкубация на изолираните лимфоцити със серума на реци-

пиента, която позволява, ако има налични антитела, те да се свържат със съответните несъвместими донорни антигени, експресирани от изолираните лимфоцити. Откриването на свързаните към лимфоцитите антитела се осъществява чрез допълнително прибавено FITC конюгиран античовешки IgG (Fab')2 фрагмент. Едновременно с това чрез моноклонални антитела, белязани с различни флуорохроми, се маркират Т- (CD3 PerCP) и В- (CD19 PE) клетките.

Анализът на резултатите се осъществява чрез използване на софтуера BD FACSDIVA™, където с помощта на електронен прозорец (gate), оформен по физичен (FSC) и флуоресцентен параметър (FL), се селектират за анализ само флуоресцентно маркираните Т- (FL3) или В- (FL2) лимфоцити. Построяват се отделни хистограми за Т-клетките и за В-клетките, показващи силата на флуоресценция за FITC маркирания (FL1) античовешки имуноглобулин. Количественото изражение на резултатите е на базата на флуоресцентен индекс (FI = съотношение между стойност на пробата и на отрицателната контрола). За положителни са приемани стойности на FI > 1.57 за Т-клетъчен и FI > 2.0 за В-клетъчен FCXM, определени при валидиране на метода.

Вътрешен качествен контрол

При всяко изследване трябва да се включат положителна и отрицателна контрола. Контролите се използват при анализа на резултатите. За оценка на неспецифично светене/свързване се използват клетки, инкубирани с PBS/2% FCS вместо серум.

Отчитане на резултатите

Отчита се на флоуцитометър (FACSCanto или FACSCalibur). Събират се 1000 събития (клетки) в електронния прозорец (gate) за В-клетките (CD19+), определен по силата на експресия на маркери CD19/CD45. Анализира се хистограмата (сила на флуоресценция – geo

mean) за зелената флуоресценция (anti-Human IgG (Fab')2 FITC) в Т-клетъчния (CD3+) и В-клетъчния (CD19+) електронен прозорец.

Изчисляват се на флуоресцентните индекси (FI) за Т- и В-лимфоцити, като първо се осредняват стойностите от двете епруветки за отрицателната контрола и за всеки серум на пациент.

4.2.5. Микросферов метод за откриване на донор-специфични антитела (донор-специфичен кросмач)

Материал за обработка

Донорни лимфоцити и серум/и на реципиенти

Необходими реактиви и консумативи

Използван е LIFECODES Donor Specific Antibody (DSA) кит (Immucor, USA), предназначен за откриване на HLA клас I и клас II антитела в серума на реципиента срещу несъвместимите HLA антигени на донора.

Необходими апаратура

Апарат Luminex 100 със софтуер MATHCHIT v.13

Принцип на метода

Донорни лимфоцити, изолирани от периферна кръв или слезка, се използват като изходен материал за HLA антигени. Изолираните клетки се разтварят с нейонен детергент. След етап на центрофугиране за отстраняване на клетъчните остатъци и фрагменти лизатът може да се използва незабавно или да се съхранява замразен за бъдеща употреба.

DSA китът включва смес от сфери Luminex. Две групи от сферите в сместа са конюгирани с моноклонални антитела, специфични за HLA клас I или клас II. При смесване с лизата тези две групи сфери ще уловят разтворените HLA на донора, превръщайки ги в донор-специфична HLA мишена за антитела в серумната проба на потенциалния реципиент. Сместа от сфери съдържа и контролни сфери, за да се мониторира коли-

чеството на фона при анализа и да се гарантира, че в теста е използван подходящият конюгат.

След свързване на донорните HLA молекули сферите се прехвърлят на филтърна плака и се промиват. Добавя се серум на потенциалния реципиент, предварително разреден в дилуент, и се инкубира със сферите за 30 минути. Следва друго промиване и прибавяне на разреден античовешки IgG-PE конюгат към пробата. След последна инкубация за 30 минути в ямките се прибавя промиващ буфер, плаката се поставя в апарат Luminex, чрез който се събират пробите и данните за анализ.

DSA наборът съдържа и контролен реагент, който да се използва с всеки лизат. Контролният реагент за лизата (Lysate Control Reagent – LMLCR) се тества паралелно със серумните проби, за да се потвърди свързването на HLA към сферите. Този реагент представлява смес от биотинилирани моноклонални антитела, специфични за HLA и свързващи HLA клас I и клас II гликопротеините. Биотинилираните моноклонални антитела се детектират със стрептавидин-PE конюгат (SA-PE).

DSA съдържа и контролна система за верифициране на цялата работна процедура: суха (лиофилизирана) лимфоцитна контрола, отрицателен контролен серум и положителен контролен серум (съдържащ антитела към HLA клас I и клас II антигени). Контролната система трябва да се включва при всяко тестване.

Преди тестването на серумите е необходима подготовка, включваща приготвяне на лизата на донора/ите и на лиофилизираната лимфоцитна контрола.

Приготвяне на лимфоцитната контрола

Лиофилизатът от лимфоцити се разтваря с 500 микрол клетъчна културелна среда (RPMI 1640), като е готов за употреба след най-малко 1 час престой на стайна температура (от 20 до 24° C) и периодично внимателно размесване, гарантиращо равномерно суспендиране на клетки-

те. За да се утаят клетките, се центрофугират на 1000-1500 rcf за 5 минути. Супернатантата се отстранява и към утаените рехидратирани клетки се прибавя 500 микрол, разреден 1:10 с дестилирана вода, лизизиращ буфер. За да се лизират напълно клетките, клетъчната суспензия се оставя да престои в рамките на 3 минути, след което се вортексира и центрофугира на 1000-1500 rcf за 5 минути, за да се утаят клетъчните мембрани. Супернатанта (лимфоцитен лизат) се прехвърля в чиста етикетирана епруветка.

Готовият лимфоцитен лизат е годен при съхранение на 2-8° С, за предпочитане върху лед за кратък период от време, не по-дълъг от 4 часа. Може да се разпредели в малки количества (за еднократна употреба) в добре затворени етикирани епруветки и да се съхранява на -70 до -80° С в продължение на две години. Ако се използва замразен лизат, след размразяването му той трябва да се центрофугира на 12 000 rcf за 5 минути.

Приготвяне на лизат от донорни лимфоцити

Използват се изолирани чрез градиентно центрифугиране лимфоцити от периферна кръв или от слезка. Независимо от източника на донорни клетки, е необходимо да се оцени общият обем клетки, необходим за извършване на изследването. За целта клетъчната суспензия се центрофугира, утаените клетки се разтварят в равен обем RPMI 1640 и се определя концентрацията им (с автоматичен брояч или с камера на Bürker). Необходимата концентрация за всяка ямка е приблизително 2,2 x 10^6 клетки. Според изходната концентрация на клетките се изчислява какъв обем от пробата трябва да се взема, за да се получи желаната концентрация от 2,2 x 10^6 клетки за ямка.

Необходимият обем клетъчна суспензия се центрофугира на 1000-1500 rcf за 10 минути, за да се утаят клетките. Супернатантата се отстранява и се добавя необходимия обем разреден лизиращ буфер към кле-

тъчният седимент. За всеки 10 микрол от клетъчната суспенсия се изисква 100 микрол, разреден лизиращ буфер. За да се лизират напълно клетките, се разбъркват и вортексират в продължение на 3 минути. Следва центрофугиране на сместа при 1000-1500 rcf за 5 минути за утаяване на клетъчните мембрани. Супернатантата (лимфоцитен лизат) се прехвърля в чиста етикетирана епруветка и се центрофугира на 12 000 rcf за 5 минути.

При използване на замразени серуми те се центрофугират след размразяването на 12 000 rcf за 5 минути.

Изпълнение на теста

1. Необходимите за анализа сфери се центрофугират за 30 секунди на 600-800 rcf, за да се отстранят всякакви частици или течности от капачката или стените на флакона. Разбъркват се добре (~1 минута) за равномерно суспендиране на сферите.

2. 8 микрол лизат и 5 микрол сфери, които са необходими за всяко гнездо (за всеки донор и контрола) се поставят в етикетирана микроцентрофужна епруветка.

3. Сместе от лизатите и сферите се инкубират за 30 минути на тъмно при стайна температура (20-24° C). Сместа се разклаща/вортексира на всеки 10 минути.

4. Ямките на филтърната плака се подготвят спрямо протокола. Добавят се по 300 микрол дестилирана вода към определените кладенчета. След 2-5 минути, водата от плаката се аспирира чрез вакуумна помпа.

5. След 30-минутната инкубация във всяка проба се добавя по 42 микрол буфер за промиване. Разбърква се на вортекс за 30 секунди и се прехвърля цялото количество (55 микрол) от всяка разредена суспензия от сфери/лизат в ямките на филтърната плака.

6. Прибавя се по 100 микрол буфер за промиване към всяка ямка. Размесва се добре чрез потупване на плаката отстрани и съдържимото се аспирира чрез вакуумен колектор.

7. Следват три промивания с по 250 микрол буфер за ямка.

8. Прибавят се по 50 микрол, разреден контролен реагент за лизата (LMLCR) в съответните ямки.

9. Добавят се по 38 микрол разредител за проби към всяка ямка на филтърната плака, след това 12 микрол от тествания серум или контролен серум във гнездата по работния протокол.

10. Плаката се покрива със залепващ пластмасов уплътнител, поставя се в кутия, за да се предпази от светлина. Инкубира се 30 минути при стайна температура (20-24° C) на тъмно върху клатачка (200 оборота в минута).

11. След 30-минутната инкубация следват три миенета с буфер за промиване, поставен във всяка ямка. Пробите се разбъркват, като плаката се почуква отстрани и след това се аспирира.

12. Поставят се по 50 микрол, разреден стрептавидин-PE конюгат (SA-PE) в ямките, в които предварително е поставен разреден LMLCR и по 50 микрол разреден конюгат към ямките, които съдържат разредени серумни проби и серумни контроли.

13. Плаката се покрива със залепващ пластмасов уплътнител, поставя се във фолио или кутия, за да се предпази от светлина. Инкубира се 30 минути при стайна температура (20-24° C) на тъмно върху клатачка (200 оборота в минута).

14. След последната 30-минутната инкубация към гнездата на филтърната плака се добавят по 150 микрол буфер за промиване към всяка ямка. Разбърква се чрез почукване отстрани на плака и след това пробите се събират на апарат Luminex.

Качествен контрол

Комплектът от сфери съдържа контролни сфери (CON сфери) за мониториране на качеството на работа. CON сферите измерват фона в анализа и се използват за нормализиране на сигнала от детекционните сфери. Проба 77 е конюгирана с човешки IgG и ще покаже, че конюгатът (LMCJS) е добавен към ямката. Проба 78 е конюгирана с биотинилиран протеин и ще покаже, че SA-PE (LMSA) е добавен към ямката.

Контролът на качеството на DSA се осъществява чрез включването на положителни и отрицателни контролни серуми, съответстващи на лиофилизираната лимфоцитна контрола. Тези контроли трябва да бъдат включени при всяко тестване, за да се определи дали са възникнали технически грешки или замърсяване на реактивите. При двете контролни серумни проби, проба 77 трябва да показва стойности > 10 000 MFI. Когато изсушеният лимфоцитен контрол се тества с реагент за лизатен контрол, LMLCR ще реагира както с HLA клас I, така и с клас II, давайки среден интензитет на флуоресценция > 10 000. Проба 78 трябва да показва стойности > 8 000 MFI. Ако контролите не отговарят на тези критерии, то тестът, конюгатът или SA-PE е замърсен.

Отчитане на резултатите

За да се определи, дали свързаните сфери са положителни, или отрицателни за DSA, стойността на средния индекс на флуоресценция (MFI) на всяка свързана сфера се сравнява с три cut-off стойности (фактори за корекция на фона, BAFs). Трите cut-off стойности се изчисляват от фона, измерен на трите контролни сфери във всяко тестово кладенче. Всяка CON сфера има формула за изчисляване на cut-off стойност на сферите за свързване на HLA от клас I и друга формула за изчисляване на cut-off стойност за свързване на HLA клас II. Двете формули за всяка сфера CON са lot-специфични. Cut-off стойността, изчислена за CON сфери, се изважда от MFI стойността на свързаните сфери. Процесът се

повтаря за всяка от останалите две CON сфери, за да се получат три резултата (адаптирани MFI стойности). Пробата се счита за положителна за DSA, ако две или повече коригирани стойности на MFI са положителни. Една проба се счита за отрицателна за DSA, ако две или повече коригирани стойности на MFI са отрицателни (фиг.)

Пример:

Class I HLA BAF for CON1 = 49.465(CON1)0.5312

Class I HLA BAF forCON2 = 34.622(CON2)0.5673

Class I HLA BAF forCON3 = 29.615(CON3)0.6532

Пример:

Class I HLA CaptureBead MFI – (BAF for CON1) = Adjusted MFI 1

Class I HLA CaptureBead MFI – (BAF for CON2) = Adjusted MFI 2

Class I HLA CaptureBead MFI – (BAF for CON3) = Adjusted MFI 3

4.3. Статистически методи

4.3.1. Дескриптивна статистика

средна аритметична – за оценка на централната тенденция;

стандартно отклонение – за оценка на разсейването;

честотни таблици – абсолютни честоти – броят на единиците в отделно взета група; относителни честоти – броят на единиците в отделно взета група, отнесен към общия брой единици в съвкупността

4.3.2. Хи-квадрат тест (Chi-square test) – при изследване на зависимости между описателни данни.

4.3.3. Критерий на Мак Немар – разновидност на хи-квадрат. Отнася се за свързани извадки и е алтернативен метод за проверка на хипотеза.

4.3.3. Сравняване на пропорции с корекция на p-стойността по метода на Бонферони (Bonferroni method).

4.3.4. Тест на Колмогоров-Смирнов при една извадка (One-Sample Kolmogorov-Smirnov test) – използва се за проверка на формата на честотното разпределение. Най-често проверката е спрямо формата на нормалното разпределение.

4.3.5. Т-тест при две независими групи (Independent-Samples T-test) – при нормално разпределение на изследваната променлива.

4.3.6. Отношение на шансовете (Odds Ratio)

Шанс (odds) – отношение на вероятността едно събитие да се сбъдне към вероятността то да не се сбъдне. Ако вероятността за сбъдване на събитието е p, то тогава шансът може да се изчисли по формулата: odds = p/(1-p).

При сравняване на две групи по отношение на възникване на дадено събитие, отношението на шансовете ще даде възможност да се оцени с колко се увеличава или намалява шансът събитието да се наблюдава в едната група в сравнение с другата. Може да се изчисли по формулата:

Odds ratio = (p_1/(1-p_1))/(p_2/(1-p_2)), където

p1 и p2 са вероятностите за възникване на събитието в двете групи.

4.3.7. Ниво на значимост – приетото критично ниво на значимост е $\alpha = 0,05$. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато p стойността (p-value) е по-малка от α.

За обработка на данните от проучването е използван специализираният статистически пакет SPSS версия 16.0.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от първа група

Бяха събрани следните данни за реципиентите: пол и възраст, диагноза; съпътстващи заболявания; продължителност на диализно лечение; данни за сенсибилизиращи събития: ***класически*** – кръвопреливане, бременност и трансплантация, и ***некласически*** – вирусни инфекции (хепатит В, хепатит С, ковид-19); поставени ваксини, хирургични интервенции и тумори; резултати, получени от анализ на техния алоантителен статус. Критерий за включване са пациенти с бъбречна недостатъчност от регистъра на чакащи БТ за целевия период от време. Изключени от проучването са тези, за които липсват пълните данни или са трансплантирани през този период, или са починали. Отделните рискови фактори – класически и некласически, бяха анализирани като база, при която са получени съответните алоантителни статуси. Считаме, че това допринася за по-голямата пълнота на разработката, защото корелацията между класическите рискови фактори е известна причина за имунна сенсибилизация срещу несъвместими HLA антигени и се мониторира рутинно при пациенти с ХБН, включени в листата на чакащи БТ, с помощта на тестове, определящи панел-реактивни антитела (PRA).

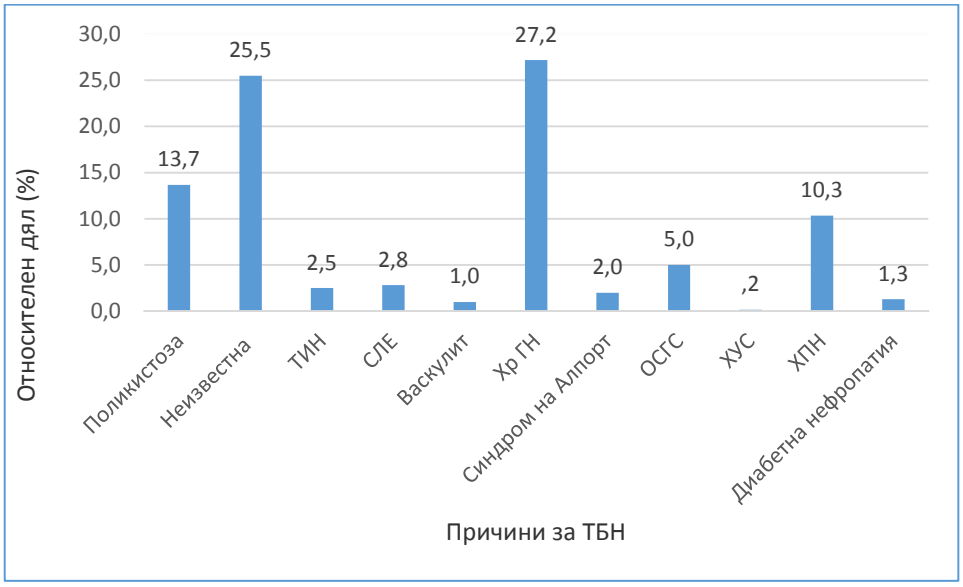
В **първа група** пациенти преобладават мъжете (табл. 4), като съотношението мъже:жени е 1,5:1. Към момента на регистрация 588 (98,5%) провеждат диализа три пъти седмично, а останалите 12 (1,5%) са в преддиализна фаза.

В повечето случаи причината, довела до развитието на ХБН, е неясна (n = 168; 25,5%). Сред тези с известна основна причина (фигура 3), най-честите състояния са хроничен гломерулонефрит (ХрГН) (n = 175; 27,2%), хроничен пиелонефрит (ХПН) (n = 74; 10,3%), фокална сегмент-

на гломерулна склероза (n = 30; 5,0%), поликистозна бъбречна болест (n = 82; 13,7%).

Таблица 4. *Описателна статистика на пациентите от група I*

Пол	**N**	**%**
Мъже	359	59,8
Жени	241	40,2
Общо	600	100,0



Съкр. – ТБН, терминална бъбречна недостатъчност; ТИН, тубулоинтерстициален нефрит; СЛЕ, системен лупус еритематозус; ХрГН, хроничен гломерулонефрит, биопсично доказан; ОСГС, огнищно-сегментна гломерулна склероза; ХУС, хемолитично-уремичен синдром; ХПН, хроничен пиелонефрит

Фигура 3. *Основни причини за ТБН в изследваната популация*

Със съпътстващи заболявания (затлъстяване, артериална хипертония, периферна съдова болест, неврологични усложнения и др.) са 228 (38%) от пациентите в групата.

От класическите сенсибилизиращи събития на кръвопреливане са подложени 317 пациенти (53,8%). Броят кръвопреливания разделихме на три подгрупи: с 1 (n = 118; 36,2%), до 5 (n = 145; 45,7%) и над 5 (n = 54; 17,1%). Осемдесет и седем (14,5%) от пациентите са имали предходни

трансплантации, от които с една са 76 (12,6%), а 11 (1,9%) са с две. В нашата група 165 жени от 241 (68,5%) са имали поне едно забременяване, като най-висок е процентът на жените с две забременявания – 41,3% (табл. 5).

Таблица 5. *Описателна статистика (честотни разпределения) на класически сенсибилизиращи събития*

Характеристики	**N**	**Процент**
Кръвопреливане		
Да	317	53,8
Не	272	46,2
Брой кръвопреливания		
1	118	37,2
До 5	145	45,7
Над 5	54	17,1
Трансплантации		
Да	87	14,5
Не	513	85,5
Брой трансплантации		
1	82	94,3
2	5	5,7
Бременност		
Да	165	68,5
Не	76	31,5

Спрямо разгледаните от нас некласическите сенсибилизиращи (табл. 6) събития установихме, че преболедувалите хепатит са 66 (11,0%); ковид-19 са 120 (20%), а на 143 (23,8%) са приложени ваксини (противогрипна, срещу ковид-19 и срещу хепатит В) през периода на наблюдение. Подложени на хирургични интервеции са 115 (19,1%), а с тумори са били 14 или 2,3%.

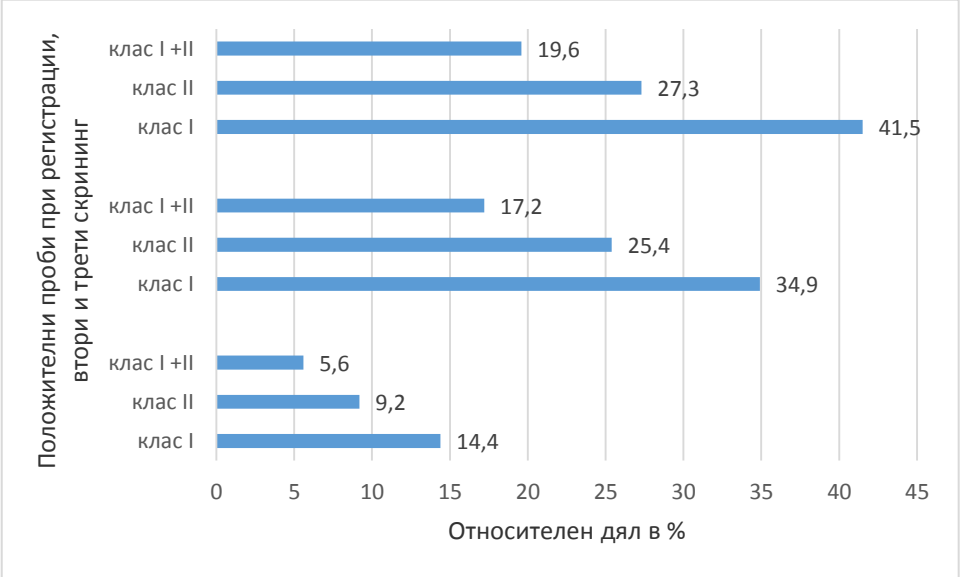
Таблица 6. *Описателна статистика (честотни разпределения) на некласически сенсибилизиращи събития*

Характеристики	**N**	**Процент**
Хепатитни вируси		
Да	66	11,0
Не	534	89,0
Преболедували ковид-19		
Да	120	20,0
Не	480	80,0
Ваксини		
Да	143	23,8
Не	457	76,2
Хирургични интервенции		
Да	115	19,1
Не	485	80,9
Тумори		
Да	14	2,3
Не	586	97,7

Според медицинския стандарт за „Имунологична подготовка при трансплантация на органи, тъкани и клетки“ е необходимо при регистрация на пациенти, нуждаещи се от БТ, както и по време на изчакването в регистъра, да се провеждат регулярни скринингови тестове за алоантитела.

При анализа на данните от алоантителния статус установихме, че при регистрация за HLA клас I антитела са отрицателни 489 пациенти (85,6%) от изследваната група, а положителни са 82 пациенти (14,4%). За HLA клас II антитела отрицателни са 514 пациенти (90,8%), а положителни са 52 пациенти (9,2%). Положителни и за двата класа са 32 пациенти (5,59%).

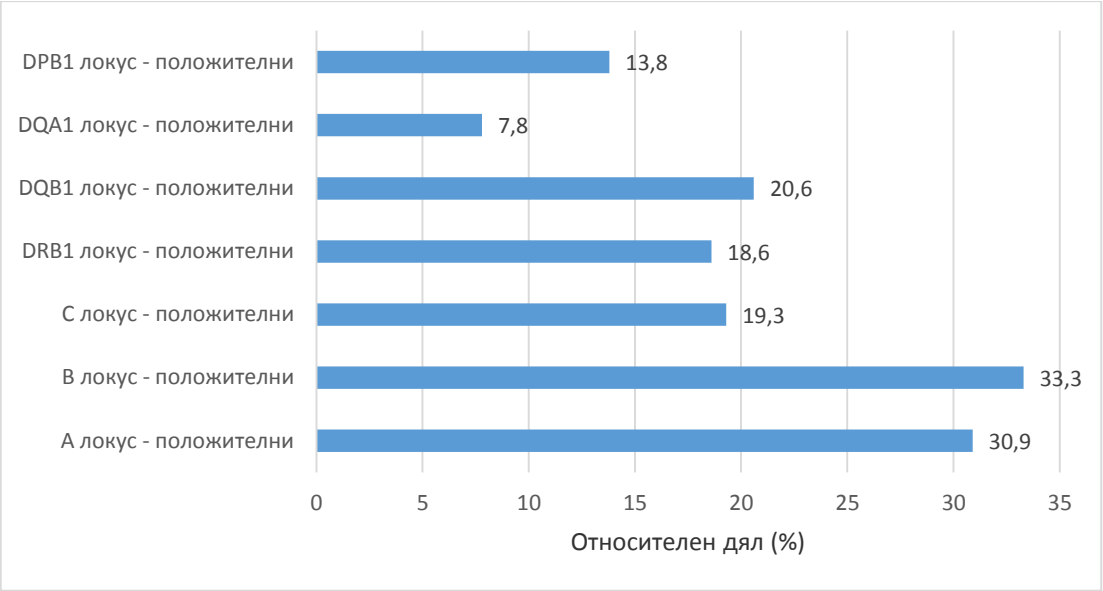
В настоящото проучване изследвахме разпределението на HLA клас I антитела при регистрация и трикратно в рамките на 1 година, през четири месеца чрез два метода – CDC и Luminex. През първия скриниг чрез CDC броят на положителните за клас I е 44 (10,9%), а през следващите втори и трети скрининг с Luminex технология броят е 176 (34,9%) и 209 (41,5%), съответно. За клас II са проведени два Luminex скринингa със следните резултати: 128 (25,4%) и 138 (27,3%) (фигура 4).



Фигура 4. *Процент на положителните за алоантитела пациенти при регистрация, втори и трети скрининг за алоантитела клас I, клас II и едновременно положителни за клас I и клас II*

От клас I алоантителата преобладават B-локусни (33,3%), следвани от A-локусни (30,9%) и C-локусни (19,3%). От клас II алоантителата преобладават DQB1-локусни (20,6%), следвани от DRB1-локусни (18,6%), DPB1-локусни (13,8%) и DQA1-локусни (7,8%) (фигура 5).

Потърсихме връзка между демографските и разгледаните характеристики с наличните резултати от алоантителата по HLA класове (I и II) при регистрация, както и при проведените скрининги **(Приложение 1).**



Фигура 5. *Процентно разпределение на положителните резултати за алоантитела по HLA клас I и клас II локуси*

Ето какво се наблюдава при регистрация на пациентите:

Клас I: Делът на мъжете в групата на отрицателните е сигнификантно по-голям от този в групата на положителните ($p < 0,001$). В разпределението на съпътстващия коморбилитет не откриваме значима разлика между положителните и отрицателните за алоантитела ($p = 0,644$). Същото се отнася и за дела на пациентите, провеждащи диализа. Няма статистически значима разлика между тези на диализа и на тези без такава ($p = 0,776$). Очаквано, разпределението на кръвопреливаните пациенти е по-голямо в групата на положителните за алоантитела ($p < 0,001$). Между положителните и отрицателните не се открива сигнификантна разлика в разпределението при бременност ($p = 0,309$), носителство на хепатит ($p = 0,717$) и наличието на неопластичен процес ($p = 0,998$).

Клас II: Отново делът на мъжете е по-голям при отрицателните за алоантитела в сравнение с положителните ($p < 0,001$). В съпътстващия коморбилитет и разпределението на пациентите, провеждащи диализа, няма разлика между положителните и отрицателните ($p = 0,109$; $p =$

0,843). Делът на кръвопреливаните отново е сигнификантно по-голям в групата на положителните в сравнение с отрицателните (p = 0,005). За клас II при регистрация делът на бременните е значимо по-голям в групата на положителните за алоантитела (p = 0,036). В разпределението на пациентите със и без хепатит (p = 0,848), както и в разпределението на пациентите със и без неопластичен процес (p = 0,439) няма разлика между положителните и отрицателните.

Ето какво се наблюдава при първи скрининг на пациентите, извършен с CDC тест:

Клас I: В разпределението по пол (p = 0,496) в разпределението по съпътстващ коморбилитет (p = 0,951) и в дела на болните, провеждащи диализа, няма значима разлика между положителните и отрицателните за алоантитела. Делът на болните, които са кръвопреливани, отново е по-висок в групата на положителните (p = 0,001). Делът на бременните е по-висок в групата на положителните за алоантитела (p = 0,029). Носителите на хепатит са повече в групата на положителните (p < 0,001). Няма разлики в разпределението на болни със или без тумор между положителните и отрицателните (p = 0,527).

Какво се наблюдава при втори скрининг на пациентите:

Клас I: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните (p < 0,001). Няма разлики между положителни и отрицателни в разпределението на съпътстващ коморбидитет (p = 0,518), в дела на болните, провеждащи диализа (p = 0,345), при разпределението по бременност (p = 0,138) и в разпределението на пациентите с рак (p = 0,767). Делът на кръвопреливаните болни е по-висок в групата на положителните за алоантитела (p < 0,001). В този втори скриниг се вижда и че делът на пациентите с хепатит в положителната група е по-голям (p = 0,022).

Клас II: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните (p < 0,001). Няма значима разлика в разпределението на съпътстващ ко-

морбилитет (p = 0,791), болни на диализа (p = 0,623), бременни (p = 0,118) и пациенти с рак (p = 0,392) между положителните и отрицателните. Делът на кръвопреливаните пациенти е по-висок при положителните (p < 0,001), при тях и носителите на хепатит в сравнение с тези без хепатит са повече (p < 0,001).

Какво наблюдаваме при третия скрининг на пациентите:

Клас I: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните (p < 0,001). Няма разлики в разпределението на съпътстващ коморбидитет (p = 0,762), диализно болни (p = 0,682), бременни (p = 0,289), носители на хепатит (p = 0,129) и карциномно болните (p = 0,702) между положителните и отрицателните за алоантитела. Кръвопреливаните болни са сигнификантно повече в групата на положителните за алоантитела (p < 0,001).

Клас II: Делът на мъжете е по-голям в групата на отрицателните (p < 0,001). Няма значима разлика в разпределението на съпътстващ коморбилитет (p = 0,419), диализно болни (p = 0,557) и пациенти с рак (p = 0,715) между положителните и отрицателните. Делът на кръвопреливаните (p < 0,001), бременните (p = 0,034) и носителите на хепатит (p = 0,011) е по-голям в групата на положителните.

5.1.1. Характеристика на алоантителния статус HLA клас I – относителни дялове, изразени като процент

Антитела срещу А-локус се срещат при 77,5% от положителните проби за клас I при регистрация (n = 167), 70,0% при първи скрининг (n = 121), 76,0% при втори (n = 159) и 78,5% при трети скрининг (n = 171). При проследяване на пациентите, положителни за HLA-A локусни алоантитела, в рамките на една година не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности (таблица 7).

Таблица 7. HLA-A локусни алоантитела

Алоантитяло	**При регистрация N (%)**	**Първи скрининг N (%)**	**Втори скрининг N (%)**	**Трети скрининг N (%)**
A1	33 (23,8)	27 (30,0)	37 (20,0)	39 (18,7)
A2	51 (28,8)	36 (27,5)	50 (25,7)	53 (25,4)
A3	36 (28,8)	29 (35,0)	36 (18,9)	39 (18,7)
A23	49 (33,8)	32(32,5)	47 (24,0)	50 (23,9)
A24	48 (32,5)	32 (37,5)	47 (25,1)	49 (23,4)
A25	47 (27,5)	38 (30,0)	48 (25,1)	53 (24,9)
A26	39 (21,3)	34 (40,0)	42 (22,3)	46 (21,5)
A34	45 (25,0)	37 (40,0)	48 (24,6)	50 (23,9)
A66	61 (32,5)	49 (45,0)	61 (29,1)	66 (31,1)
A11	36 (25,0)	28 (32,5)	36 (18,3)	39 (18,2)
A29	38 (21,3)	33 (40,0)	41 (18,9)	44 (21,1)
A30	25 (17,5)	22 (32,5)	26 (14,3)	30 (14,4)
A31	35 (15,0)	32 (40,0)	37 (18,3)	40 (18,2)
A32	40 (25.0)	31 (25.0)	40 (21.7)	43 (20.1)
A33	42 (22.5)	36 (42.5)	44 (21.7)	46 (21.5)
A74	26 (16.3)	23 (30.0)	28 (14.3)	29 (13.9)
A68	44 (23.8)	37 (35.0)	45 (22.9)	51 (23.9)
A69	49 (26.3)	36 (40.0)	49 (25.7)	53 (24.9)
A36	28 (18.8)	23 (35.0)	29 (14.9)	32 (15.3)
A43	40 (23.8)	36 (40.0)	44 (21.7)	46 (21.5)
A80	40 (32.5)	32 (35.0)	41 (21.7)	45 (21.1)

Антитела срещу B-локус се срещат при 85,0% от положителните проби за клас I при регистрация (n = 181), 75,0% при първи скрининг (n = 127), 81,7% при втори (n = 172) и 82,3% (n = 184) при трети скрининг. При проследяване на пациентите, положителни за HLA-B локусни алоантитела при регистрация и в рамките на трите скрининга не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности (табл. 8).

Таблица 8. HLA-B локусни алоантитела

Алоантитяло	**При регист-рация N (%)**	**Първи скри-нинг N (%)**	**Втори скри-нинг N (%)**	**Трети скри-нинг N (%)**
B51	52 (40,0)	42 (40,0)	49 (25,1)	53 (24,4)
B52	42 (32,5)	31 (27,5)	39 (19,4)	44 (21,1)
B7	43 (27,5)	33 (35,0)	42 (23,4)	45 (21,5)
B8	46 (30,0)	34 (32,0)	44 (23,4)	46 (21,5)
B44	56 (33,8)	45 (45,0)	60 (30,3)	63 (29,7)
B45	51 (32,5)	42 (37,5)	53 (28,0)	56 (26,8)
B13	56 (38,8)	39 (32,5)	56 (29,1)	59 (27,8)
B64	26 (11,3)	24 (22,5)	26 (14,3)	27 (12,9)
B65	23 (11,3)	19 (12,5)	21 (11,4)	23 (11,0)
B62	37 (27,5)	29 (32,5)	38 (21,1)	40 (18,7)
B63	55 (37,5)	38 (42,5)	52 (29,1)	57 (27,3)
B75	41 (25,0)	31 (30,0)	42 (20,6)	45 (21,5)
B76	74 (42,5)	56 (40,0)	76 (36,0)	81 (36,4)
B77	45 (30,0)	34 (30,0)	42 (22,3)	47 (22,5)
B38	38 (27,5)	25 (22,5)	37 (20,6)	39 (18,7)
B39	26 (16,3)	20 (22,5)	26 (14,9)	27 (12,9)
B57	73 (48,8)	48 (30,0)	70 (36,6)	75 (35,4)
B58	55 (35,0)	41 (30,0)	53 (28,0)	60 (28,2)
B18	29 (17,5)	22 (17,5)	29 (15,4)	30 (14,4)
B49	56 (42,5)	37 (30,0)	52 (28,6)	57 (27,3)
B50	43 (32,5)	32 (35,0)	45 (25,1)	45 (21,5)
B54	41 (31,3)	29 (30,0)	41 (22,9)	43 (20,6)
B55	44 (32,5)	34 (32,5)	46 (25,7)	47 (22,5)
B56	50 (37,5)	37 (37,5)	52 (28,6)	54 (25,8)
B27	49 (35,0)	31 (25,0)	46 (25,1)	49 (23,4)
B35	35 (22,5)	25 (30,0)	34 (18,3)	38 (18,2)
B37	56 (30,4)	36 (20,0)	57 (29,1)	56 (26,4)
B60	50 (35,0)	35 (32,5)	48 (25,7)	50 (23,9)
B61	49 (33,8)	34 (32,5)	48 (25,7)	50 (23,9)
B41	37 (25,0)	29 (35,0)	39 (22,3)	39 (18,7)
B42	44 (30,0)	33 (35,0)	47 (26,9)	47 (22,5)
B46	39 (26,3)	34 (35,0)	40 (21,1)	41 (19,1)
B47	40 (30,0)	25 (25,0)	38 (20,6)	41 (19,6)
B48	50 (33,8)	34 (30,0)	50 (27,4)	50 (23,9)
B53	41 (28,8)	30 (30,0)	39 (20,6)	43 (20,6)
B59	45 (35,0)	33 (27,5)	45 (24,6)	46 (22,0)
B67	50 (28,8)	39 (32,5)	52 (29,1)	54 (25,8)
B71	38 (27,5)	30 (35,0)	38 (21,1)	39 (18,7)
B72	41 (28,8)	31(32,5)	41 (22,9)	44 (21,1)
B73	40 (25,0)	28 (27,5)	39 (20,6)	42 (20,1)
B78	38 (23,8)	27(30,0)	35 (17,1)	40 (19,1)
B81	44 (30,0)	32 (35,0)	42 (23,4)	44 (21,1)

Антитела срещу C-локусни антигени се срещат при 47,5% от положителните проби за клас I при регистрация (n = 99), 60,0% при първи скрининг (n = 83), 50,3% при втори (n = 103) и 48,3% (n = 108) при трети скрининг. При проследяване на пациентите, положителни за HLA-C локусни алоантитела, при регистрация и в рамките на трите скрининга не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности (табл. 9).

Таблица 9. HLA-C локусни алоантитела

Алоантитяло	**При регистрация N (%)**	**Първи скрининг N (%)**	**Втори скрининг N (%)**	**Трети скрининг N (%)**
Cw1	29 (13,8)	22 (17,5)	28 (14,3)	30 (13,4)
Cw2	24 (17,5)	20 (12,5)	28 (14,3)	30 (14,4)
Cw9	47 (25,0)	33 (30,0)	45 (22,9)	48 (23,0)
Cw10	36 (26,3)	30 (27,5)	36 (19,4)	37 (17,7)
Cw4	24 (13,8)	18 (17,5)	22 (11,4)	26 (12,4)
Cw5	25 (15,0)	19 (12,5)	22 (12,6)	27 (12,9)
Cw6	25 (16,3)	16 (15,0)	24 (12,0)	26 (12,4)
Cw7	35 (13,8)	25 (17,5)	32 (14,3)	36 (16,8)
Cw8	14 (12,5)	10 (10,0)	11 (6,3)	14 (6,7)
Cw12	31 (17,5)	21 (15,0)	26 (13,1)	30 (14,4)
Cw14	28 (15,0)	19 (15,0)	24 (11,4)	28 (12,9)
Cw15	17 (13,8)	17 (12,5)	18 (10,3)	19 (9,1)
Cw16	17 (10,0)	9 (5,0)	13 (7,4)	16 (7,7)
Cw17	47 (23,8)	34 (22,5)	45 (21,1)	51 (22,5)
Cw18	26 (13,8)	20 (12,5)	23 (10,9)	28 (13,4)

Антитела срещу DR-локус се срещат при 55,1% от положителните проби за клас II при регистрация (n = 94), 68,8% при втори (n = 97) и 69,6% при трети скрининг (n = 103). При проследяване на пациентите,

положителни за HLA-DR локусни алоантитела при регистрация и в рамките на два последователни скрининга, не се отчете сигнификантна промяна в процента положителни стойности за съответните специфичности (табл. 10).

Таблица 10. HLA-DR локусни алоантитела

Алоантитяло	**При регистрация N (%)**	**Втори скрининг N (%)**	**Трети скрининг N (%)**
DR1	21 (16,3)	23 (18,0)	24 (17,4)
DR15	24 (22,4)	24 (18,0)	26 (18,8)
DR16	24 (26,5)	23 (16,4)	27 (19,6)
DR17	15 (16,3)	14 (10,2)	17 (11,6)
DR18	16 (16,3)	14 (9,4)	17(10,9)
DR4	21 (20,4)	22 (16,4)	25 (18,1)
DR11	21 (18,4)	24 (18,0)	26 (18,8)
DR12	27 (20,4)	30 (22,7)	33 (23,2)
DR13	25 (18,4)	24 (17,2)	27 (19,6)
DR14	29 (20,4)	30 (23,4)	32 (23,2)
DR7	35 (26,5)	37 (27,3)	43 (29,0)
DR8	24 (20,4)	25 (18,7)	27 (18,1)
DR9	35 (22,4)	37 (25,8)	42 (29,7)
DR10	30 (24,5)	32 (23,4)	35 (25,4)
DR51	28 (18,4)	28 (19,5)	30 (21,0)
DR52	8 (12,5)	8 (6,3)	10 (7,3)
DR53	23 (20,4)	25 (19,5)	25 (17,4)

Антитела срещу DQB1-локус се срещат при 55,1% от положителните проби за клас II при регистрация (n = 106), 72,7% при втори (n = 108) и 74,6% при трети скрининг (n = 114). Наблюдава се повишение на относителния дял положителни за HLA-DQB1 локусни алоантитела при втори скрининг, спрямо стойностите при регистрация, като тази тенденция се запазва при третия скрининг (табл. 11).

***Таблица 11**. HLA-DQB1 локусни алоантитела*

Алоантитяло	**При регистрация N (%)**	**Втори скрининг N (%)**	**Трети скрининг N (%)**
DQ5	36 (16,3)	38 (25,8)	41 (28,3)
DQ6	44 (20,4)	44 (28,9)	47 (29,7)
DQ2	44 (24,5)	48 (33,6)	52 (34,8)
DQ7	37 (20,4)	37 (24,2)	41 (28,3)
DQ8	40 (18,4)	42 (28,1)	45 (30,4)
DQ9	28 (14,3)	30 (21,1)	32 (22,5)
DQ4	30 (24,5)	29 (21,9)	35 (24,6)

Антитела срещу DQA1 локус се срещат при 30,6% от положителните проби за клас II при регистрация (n = 40), 32,0% при втори (n = 41) и 31,2% (n = 46) при трети скрининг. Не се установи статистически значима разлика в процента положителни за HLA-DQA1 локусни алоантитела при регистрация и в двата скрининга за съответните специфичности (табл. 12).

***Таблица 12**. HLA-DQA1 локусни алоантитела*

Алоантитяло	**При регистрация N (%)**	**Втори скрининг N (%)**	**Трети скрининг N (%)**
DQA1*01:01	15 (12,2)	17 (13,3)	19 (12,3)
DQA1*02:01	13 (8,2)	13 (10,2)	16 (11,6)
DQA1*03:01	21 (12,2)	22 (17,2)	25 (16,7)
DQA1*04:01	6 (8,2)	6 (4,7)	9 (6,5)
DQA1*05:01	24 (18,4)	25 (19,5)	28 (19,6)
DQA1*06:01	15 (8,2)	15 (11,7)	18 (13,0)

Антитела срещу DPB1 локус се срещат при 30,6% от положителните проби за клас II при регистрация (n = 69), 49,2% при втори (n = 71) и 48,6% при трети скрининг (n = 73). И тук не се установи статистически

значима разлика в процента положителни за HLA-DPB1 локусни алоантитела при регистрация и в двата скрининга за съответните специфичности (табл. 13).

***Таблица 13**. HLA-DPB1 локусни алоантитела*

Алоантитяло	**При регистрация N (%)**	**Втори скрининг N (%)**	**Трети скрининг N (%)**
DPB1*01:01	45 (20,4)	44 (31,3)	47 (31,9)
DPB1*02:01	3 (0,0)	3 (2,3)	4 (2,2)
DPB1*03:01	22 (16,3)	24 (18,0)	25 (17,4)
DPB1*04:01	4 (2,0)	3 (2,3)	5 (3,6)
DPB1*04:02	1 (0,0)	1 (0,8)	1 (0,7)
DPB1*05:01	32 (16,3)	30 (21,9)	31 (21,7)
DPB1*06:01	26 (16,3)	26 (17,7)	28 (20,3)
DPB1*09:01	15 (10,2)	16 (12,5)	16 (11,6)
DPB1*10:01	19 (8,2)	20 (14,8)	19 (13,8)
DPB1*11:01	15 (8,2)	16 (12,5)	18 (13,0)
DPB1*13:01	27 (12,2)	27 (21,1)	29 (21,0)
DPB1*14:01	17 (10,2)	18 (13,3)	17 (12,3)
DPB1*15:01	12 (2,0)	12 (8,6)	13 (8,7)
DPB1*17:01	16 (10,2)	17 (13,3)	17 (12,3)
DPB1*18:01	8 (2,0)	8 (6,3)	9 (6,5)
DPB1*19:01	14 (10,2)	15 (11,7)	17 (12,3)
DPB1*20:01	17 (10,2)	18 (14,1)	19 (13,8)
DPB1*23:01	5 (2,0)	4 (2,3)	5 (3,6)
DPB1*28:01	6 (4,1)	6 (3,9)	9 (6,5)

5.1.2. Сенсибилизиращи събития

5.1.2.1. Бременност

Не се установи статистически значима връзка между бременността, като сенсибилизиращ фактор и образуването на антитела срещу A-, B-, C-, DQB1- и DPB1- локусни антигени в групата на положителните за алоантитела по тези локуси (p = 0,159; p = 0,344; p = 0,542; p = 0,141 и p = 0,107). 42,9% от жени (n = 69), имали поне едно забременяване, са развили антитела срещу A локусни антигени, 46,6 % срещу B-локус (n = 75), 23,6 % срещу C-локус (n = 38), 29,8% срещу DQB1 локус (n = 48) и 18,0% срещу DPB1 локус (n = 29).

Изненадващо се установява връзка между бременността и клас II антитела, и по-точно срещу DRB1 и DQA1. 28,6% (n = 46) от жените, имали поне една бременност, са развили антитела срещу DRB1, спрямо 10,7% при нераждали (p = 0,007) и 13,0% (n = 21) към DQA1, като този тип антитела липсват при жени, които не са забременявали (p = 0,004). Процентът на положителни резултати срещу тези два локуса (DRB и DQA1) е статистически значимо по-висок при забременявали спрямо незабременявали жени (табл. 14).

5.1.2.2. Кръвопреливане

Кръвопреливането, разгледано като самостоятелно сенсибилизиращо събитие, е довело до синтеза на алоантитела в по-голям процент срещу клас I – 38,6% срещу HLA-A локусни антигени (n = 120); 42,1% срещу HLA-B-локусни антигени (n = 131); 24,4% срещу HLA-C локусни антигени (n = 76) при пациенти, които са имали дори едно кръвопреливане. При клас II разпределението е, както следва: срещу HLA-DR (n = 76, 24,4%), DQB1 (n = 85, 27,3%), DQA1 (n = 33, 10,6%) и DPB1 (n = 59, 19%) локусни антигени, съответно. Установи се статистически значима връзка между кръвопреливането и синтеза на алоантитела срещу антигени от всички HLA локуси (p < 0,001) (табл. 15).

Таблица 14. *Сравнение на показателите – алоантитела и бременност*

HLA специфичност на антителата	**Резултат**		**Бременност**		**Общо**	**P**
			Да	**Не**		
A локус	Отрицателен	N	92	38	130	0,159
		%	57,1%	67,9%	59,9%	
	Положителен	N	69	18	87	
		%	42,9%	32,1%	40,1%	
B локус	Отрицателен	N	86	34	120	0,344
		%	53,4%	60,7%	55,3%	
	Положителен	N	75	22	97	
		%	46,6%	39,3%	44,7%	
C локус	Отрицателен	N	123	45	168	0,542
		%	76,4%	80,4%	77,4%	
	Положителен	N	38	11	49	
		%	23,6%	19,6%	22,6%	
DRB1 локус	Отрицателен	N	115	50	165	**0,007**
		%	71,4%	89,3%	76,0%	
	Положителен	N	46	6	52	
		%	28,6%	10,7%	24,0%	
DQB1 локус	Отрицателен	N	113	45	158	0,141
		%	70,2%	80,4%	72,8%	
	Положителен	N	48	11	59	
		%	29,8%	19,6%	27,2%	
DQA1 локус	Отрицателен	N	140	56	196	**0,004**
		%	87,0%	100,0%	90,3%	
	Положителен	N	21	0	21	
		%	13,0%	0,0%	9,7%	
DPB1 локус	Отрицателен	N	132	51	183	0,107
		%	82,0%	91,1%	84,3%	
	Положителен	N	29	5	34	
		%	18,0%	8,9%	15,7%	

Таблица 15. Сравнение на показателите – алоантитела и кръвопреливане

HLA специфич-ност на антитела	**Резултат**		**Кръвопреливане**		**Общо**	**p**
			Да	**Не**		
A локус	Отрицателен	N	191	213	404	< **0,001**
		%	61,4%	80,1%	70,0%	
	Положителен	N	120	53	173	
		%	38,6%	19,9%	30,0%	
B локус	Отрицателен	N	180	209	389	< **0,001**
		%	57,9%	78,6%	67,4%	
	Положителен	N	131	57	188	
		%	42,1%	21,4%	32,6%	
C локус	Отрицателен	N	235	235	470	< **0,001**
		%	75,6%	88,3%	81,5%	
	Положителен	N	76	31	107	
		%	24,4%	11,7%	18,5%	
DRB1 локус	Отрицателен	N	235	239	474	< **0,001**
		%	75,6%	89,8%	82,1%	
	Положителен	N	76	27	103	
		%	24,4%	10,2%	17,9%	
DQB1 локус	Отрицателен	N	226	237	463	< **0,001**
		%	72,7%	89,1%	80,2%	
	Положителен	N	85	29	114	
		%	27,3%	10,9%	19,8%	
DQA1 локус	Отрицателен	N	278	259	537	< **0,001**
		%	89,4%	97,4%	93,1%	
	Положителен	N	33	7	40	
		%	10,6%	2,6%	6,9%	
DPB1 локус	Отрицателен	N	252	248	500	< **0,001**
		%	81,0%	93,2%	86,7%	
	Положителен	N	59	18	77	
		%	19,0%	6,8%	13,3%	

Не се установи връзка между кръвопреливани пациентки, които са имали и регистрирана бременност, с наличните алоантитела при регистрация за клас I (p = 1,000) и клас II (p = 0,397); при първи скрининг за клас I (p = 0,193); при втори скрининг за клас I (p = 1,000) и клас II (p = 0,360); при трети скрининг за клас I (p = 0,825) и II (p = 0,361) (табл. 16).

Таблица 16. Връзка с бременност при пациентки с кръвопреливане

HLA специфичност на антитела	**Резултат**		**Бременност**		**Общо**	**P**
			Да	**Не**		
При регистрация – клас I	Отрицателен	N	62	18	80	1,000
		%	66,7%	66,7%	66,7%	
	Положителен	N	31	9	40	
		%	33,3%	33,3%	33,3%	
При регистрация – клас II	Отрицателен	N	72	23	95	0,397
		%	79,1%	88,5%	81,2%	
	Положителен	N	19	3	22	
		%	20,9%	11,5%	18,8%	
Първи скрининг – клас I	Отрицателен	N	52	14	66	0,193
		%	83,9%	100,0%	86,8%	
	Положителен	N	10	0	10	
		%	16,1%	0,0%	13,2%	
Втори скрининг – клас I	Отрицателен	N	38	12	50	1,000
		%	48,1%	48,0%	48,1%	
	Положителен	N	41	13	54	
		%	51,9%	52,0%	51,9%	
Втори скрининг – клас II	Отрицателен	N	45	17	62	0,360
		%	57,0%	68,0%	59,6%	
	Положителен	N	34	8	42	
		%	43,0%	32,0%	40,4%	
Трети скрининг – клас I	Отрицателен	N	38	11	49	0,825
		%	45,2%	42,3%	44,5%	
	Положителен	N	46	15	61	
		%	54,8%	57,7%	55,5%	
Трети скрининг – клас II	Отрицателен	N	48	18	66	0,361
		%	57,1%	69,2%	60,0%	
	Положителен	N	36	8	44	
		%	42,9%	30,8%	40,0%	

Таблица 17 показва връзката с пол (мъже и незабременявали жени) при пациенти с кръвопреливане. Установихме, че мъжете имат по-висок риск за сенсибилизация след кръвопреливане в сравнение с незабременявали жени (p = 0,002) за клас I при регистрация. Такава зависимост не се установи за клас II при регистрация, както и в последващите ги скринги.

Таблица 17. Връзката с пол (мъже и незабременявали жени) при пациенти с кръвопреливане

HLA специфичност на антитела	**Резултат**		**Пол (кръвопреливане)**		**Общо**	**P**
			Мъже	**Незабременявали жени**		
При регистрация – клас I	Отрицателен	N	153	18	171	**0,002**
		%	90,5%	66,7%	87,2%	
	Положителен	N	16	9	25	
		%	9,5%	33,3%	12,8%	
При регистрация – клас II	Отрицателен	N	156	23	179	0,409
		%	93,4%	88,5%	92,7%	
	Положителен	N	11	3	14	
		%	6,6%	11,5%	7,3%	
Първи скрининг – клас I	Отрицателен	N	98	14	112	0,372
		%	86,7%	100,0%	88,2%	
	Положителен	N	15	0	15	
		%	13,3%	0,0%	11,8%	
Втори скрининг – клас I	Отрицателен	N	104	12	116	0,074
		%	67,1%	48,0%	64,4%	
	Положителен	N	51	13	64	
		%	32,9%	52,0%	35,6%	
Втори скрининг – клас II	Отрицателен	N	121	17	138	0,309
		%	78,1%	68,0%	76,7%	
	Положителен	N	34	8	42	
		%	21,9%	32,0%	23,3%	
Трети скрининг – клас I	Отрицателен	N	84	11	95	0,206
		%	56,4%	42,3%	54,3%	
	Положителен	N	65	15	80	
		%	43,6%	57,7%	45,7%	
Трети скрининг – клас II	Отрицателен	N	108	18	126	0,813
		%	72,5%	69,2%	72,0%	
	Положителен	N	41	8	49	
		%	27,5%	30,8%	28,0%	

5.1.3. Сравнения на HLA клас I антитела при регистрация, при първи, втори и трети скрининг (McNemar Test)

За да видим дали има динамика в алоантителния статус на пациентите от регистъра на чакащи във времето, приложихме теста на McNemar, сравнявайки алоантителния статус при регистрация с резултатите от първи, втори и трети скрининг, както и първи спрямо втори и трети, така и втори спрямо трети скрининг.

При регистрация броят на положителните проби за клас I е бил 52 от 379 (13,7%), които при първия скрининг са станали 34, като само 9 пациенти са останали положителни и при регистрация и при първи скрининг (p = 0,038). При втория скрининг този брой е нараснал на 67 от 483 пациенти (13,9%), като тези, които са останали положителни, са 62 (p < 0,001). При третия скрининг положителните проби са 73 от 483 (15,1%) пациенти, като тези, които са останали положителни, са 66 (p < 0,001) (табл. 18).

Таблица 18. *Сравняване алоантителния статус при регистрация с резултатите от първи, втори и трети скрининг чрез McNemar тест*

Скрининг – HLA специфичност	**Резултат**	**Клас I при регистрация**		**Общо**	**P**
		Отрицателен	**Положителен**		
Първи скрининг – клас I	Отрицателен	302	43	345	**0,038**
	Положителен	25	9	34	
	Общо	327	52	379	
Втори скрининг – клас I	Отрицателен	316	5	321	**< 0,001**
	Положителен	100	62	162	
	Общо	416	67	483	
Трети скрининг – клас I	Отрицателен	283	7	290	**< 0,001**
	Положителен	127	66	193	
	Общо	410	73	483	

Сравнявайки втори и трети скрининг спрямо първи се установи, че броят на положителните проби за клас I при втори скрининг от 125 е нараснал на 139 при третия спрямо първи скрининг (p < 0,001) (табл. 19), 31 (9,04%) са останали положителни от втория скрининг, а при третия техният брой е 28 (8,21%) (p < 0,001).

Таблица 19. *Сравняване на алоантителния статус при първи скрининг с резултатите от втори и трети скрининг чрез McNemar тест*

Скрининг HLA специфичност	**Резултат**	**Първи скрининг – Клас I**		**Общо**	**P**
		Отрицателен	**Положителен**		
Втори скрининг – клас I	Отрицателен	212	6	218	**< 0,001**
	Положителен	94	31	125	
	Общо	306	37	343	
Трети скрининг – клас I	Отрицателен	194	8	202	**< 0,001**
	Положителен	111	28	139	
	Общо	305	36	341	

Съпоставяйки клас I положителни от трети спрямо втори скрининг виждаме отново разлика (p = 0,006) в посока на повече положителни проби (160 от 442 – 36,1%) при втори спрямо трети скрининг, където броят на положителните резултати е 143 (32,4%) (табл. 20).

Таблица 20. *Сравняване на алоантителния статус при втори скрининг с резултатите от трети скрининг чрез McNemar тест*

Скрининг – HLA специфичност	**Резултат**	**Втори скрининг – Клас I**		**Общо**	**P**
		Отрицателен	**Положителен**		
Трети скрининг – клас I	Отрицателен	244	17	261	**0,006**
	Положителен	38	143	181	
	Общо	282	160	442	

5.1.4. Сравнения на клас II при регистрация, при втори и трети скрининг (McNemar Test)

При регистрация броят на положителните проби за клас II е бил 39 от 480 (8,13%), като 29 са останали положителни от периода на регистрация до втори скрининг (p < 0,001) и 34 до третия скрининг, при който положителните проби са 46 от 479 (9,6%) (p < 0,001) (таблица 21).

Таблица 21. *Сравняване алоантителния статус при регистрация с резултатите от втори и трети скрининг чрез McNemar тест*

Скрининг HLA специфичност	**Резултат**	**Клас II при регистрация**		**Общо**	**P**
		Отрицателен	**Положителен**		
Втори скрининг – клас II	Отрицателен	356	10	366	**< 0,001**
	Положителен	85	29	114	
	Общо	441	39	480	
Трети скрининг – клас II	Отрицателен	345	12	357	**< 0,001**
	Положителен	88	34	122	
	Общо	433	46	479	

Съпоставяйки трети спрямо втори скрининг за клас II не се установи статистически значима разлика (p = 0,761) (табл. 22).

Таблица 22. *Сравняване на алоантителния статус при втори скрининг с резултатите от трети скрининг чрез McNemar тест*

Скрининг HLA специфичност	**Резултат**	**Втори скрининг – Клас II**		**Общо**	**P**
		Отрицателен	**Положителен**		
Трети скрининг – клас II	Отрицателен	302	20	322	0,761
	Положителен	23	98	121	
	Общо	325	118	443	

5.2. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от втора група

Втората група от 208 пациенти от регистъра на чакащи бъбречна трансплантация според алоантителния им статус, проследяван във времето, беше разделена на две подгрупи: **IIa – реципиенти, положителни за анти-HLA антитела, и IIb – отрицателни за алоантитела.** Потърсихме връзка между възрастта в двете подгрупи (позитивни и негативни за алоантитела) пациенти (табл. 23), но не се установи статистически значима възрастова разлика (p = 0,924).

Таблица 23. *Сравнителен анализ на възрастта между позитивни и негативни за алоантитела пациенти*

Група	N	Възраст				t	df	p
		Mean	SD	Min	Max			
Позитивни	109	48,66	10,86	26	71	0,095	206	0,924
Негативни	99	48,81	11,43	14	72			

В група IIa не се установиха статистически значими разлики в разпределението по класове алоантитела и пол (p = 0,174), както и връзка между класовете алоантитела и възрастта (p = 0,585) (табл. 24 и 25).

Таблица 24. *Разпределение по HLA класове алоантитела и връзка с пола*

HLA	Мъже		Жени		Общо		p
	N	%	N	%	N	%	
CLASS I	10	26	26	37	36	33	0,174
CLASS II	10	26	9	13	19	17	
CLASS I+II	18	47	36	51	54	50	
Общо	38	100	71	100	109	100	

***Таблица 25**. Връзка между HLA класа алоантитела и възрастта*

HLA	**N**	**Възраст**				**F**	**dfs**	**p**
		Mean	**SD**	**Min**	**Max**			
CLASS I	36	47,53	10,01	26,00	62,00	0,539	2;106	0,585
CLASS II	19	50,74	11,12	28,00	68,00			
CLASS I+II	54	48,69	11,39	27,00	71,00			

Разпределението на пациентите по основното заболяване, довело до хронична бъбречна недостатъчност (ХБН), не показва значимо различие между положителните и отрицателните за алоантитела групи (табл. 26). Изключение правят пациентите с диабетна нефропатия, които са значимо повече в антитяло-негативната група ($p < 0,05$).

***Таблица 26.** Разпределение на основните заболявания, довели до ХБН, в двете групи пациенти*

Основно заболяване	**Позитивни**		**Негативни**		**Общо**		**p**
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	
Хроничен гломерулонефрит	18	16,7	27	27,3	45	21,7	ns
Хроничен пиелонефрит	11	10,2	8	8,1	19	9,2	ns
Автозомно-доминантна бъбречна поликистоза	11	10,2	10	10,1	21	10,1	ns
Диабетна нефропатия	3	2,8	10	10,1	13	6,3	**< 0,05**
Други	57	52,8	42	42,4	99	47,8	ns
АИЗ	8	7,4	2	2,0	10	4,8	ns
Общо	108	100,0	99	100,0	207	100,0	ns

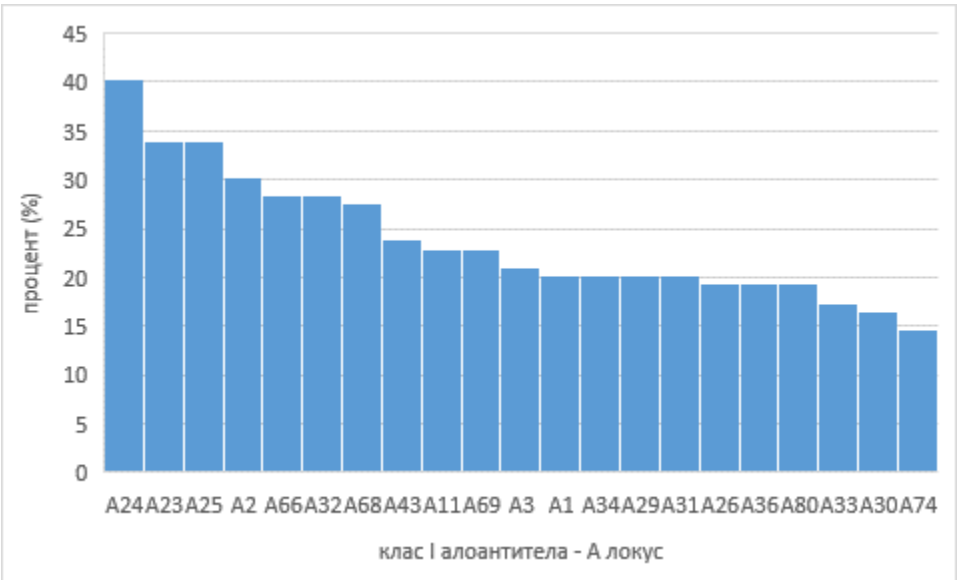
В таблица 27 е представено разпределението на основните сенсибилизиращи събития (кръвопреливания, бременности, предходни трансплантации), както и на други фактори, които могат да допринесат за алоимунен отговор.

Таблица 27. *Сенсибилизиращи събития в двете групи пациенти*

Сенсибилизиращи събития	**Позитивни група IIa**		**Негативни група IIb**		**Общо**	
	N	%	N	%	N	%
Не	1	0,9	0	0,0	1	0,5
Кръвопреливане	**14**	**12,8**	**39**	**39,4**	**53**	**25,5**
Бременност	**7**	**6,4**	**15**	**15,2**	**22**	**10,6**
Хроничен хепатит В (ХрХВ)	4	3,7	0	0,0	4	1,9
Хроничен хепатит С (ХРХС)	6	5,5	0	0,0	6	2,9
Ваксина	0	0,0	4	4,0	4	1,9
Тумор	1	0,9	0	0,0	1	0,5
Предходна трансплантация	**3**	**2,8**	0	0,0	3	1,4
Операция	2	1,8	0	0,0	2	1,0
Кръвопреливане + предходна трансплантация	**11**	**10,1**	**0**	**0,0**	**11**	**5,3**
Кръвопреливане + бременност + предходна трансплантация + експлантация	**2**	**1,8**	**0**	**0,0**	**2**	**1,0**
Кръвопреливане + бременност	**9**	**8,3**	**17**	**17,2**	**26**	**12,5**
Бременност + предходна трансплантация	3	2,8	0	0,0	3	1,4
Бременност + тумор + операция	2	1,8	0	0,0	2	1,0
Кръвопреливане + бременност + ХРХС	2	1,8	1	1,0	3	1,4
Кръвопреливане + бременност + ХРХС + предходна трансплантация	1	0,9	0	0,0	1	0,5
Кръвопреливане + бременност + операция	3	2,8	0	0,0	3	1,4
Кръвопреливане+ХрХВ+операция	5	4,6	0	0,0	5	2,4
Кръвопреливане + предходна трансплантация + експлантация	7	6,4	0	0,0	7	3,4
Бременност + ваксина + операция	3	2,8	0	0,0	3	1,4
Кръвопреливане + ваксина	**2**	**1,8**	**11**	**11,1**	**13**	**6,3**
Бременност + ваксина	3	2,8	2	2,0	5	2,4
Кръвопреливане + бременност + ваксина	0	0,0	7	7,1	7	3,4
Кръвопреливане + тумор	2	1,8	2	2,0	4	1,9
Кръвопреливане + ХрХВ	4	3,7	0	0,0	4	1,9
Кръвопреливане + ХрХВ + тумор	0	0,0	1	1,0	1	0,5
Бременност + ХрХВ	9	8,3	0	0,0	9	4,3
Кръвопреливане + ХРХС	3	2,8	0	0,0	3	1,4
Общо	109	100,0	99	100,0	208	100,0

Кръвопреливането е най-често срещащото се самостоятелно сенсибилизиращо събитие в двете групи (n = 53; 25,5%), следвано от бременностите (n = 22; 10,6%). Най-честите комбинации от сенсибилизиращи събития са, на първо място, кръвопреливане и бременност (n = 26; 12,5%), следвани от кръвопреливане и ваксина (n = 13; 6,3%). Предходни трансплантации като сенсибилизиращо събитие, самостоятелно (n = 11; 10,1%) или в комбинация с други такива, се наблюдават само при антитяло-положителните реципиенти (n = 109).

Разпределението на антителата срещу отделните HLA-A, B, C, DR, DQ и DP локусни специфичности при положителните случаи от втора група (IIa) е представено в Приложение 4. Прави впечатление, че честотите на антителата срещу различните HLA-A локусни антигени (фигура 6) варират от 14,7 (A74) до 40,4% (A24), като най-често откриваните (> 30%) антителни специфичности са към A24 (40,4%), следвани от A23 и A25 (33,9%) и на трето място – срещу A2 (30,3%).



Фигура 6. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-A локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIa (n = 109)*

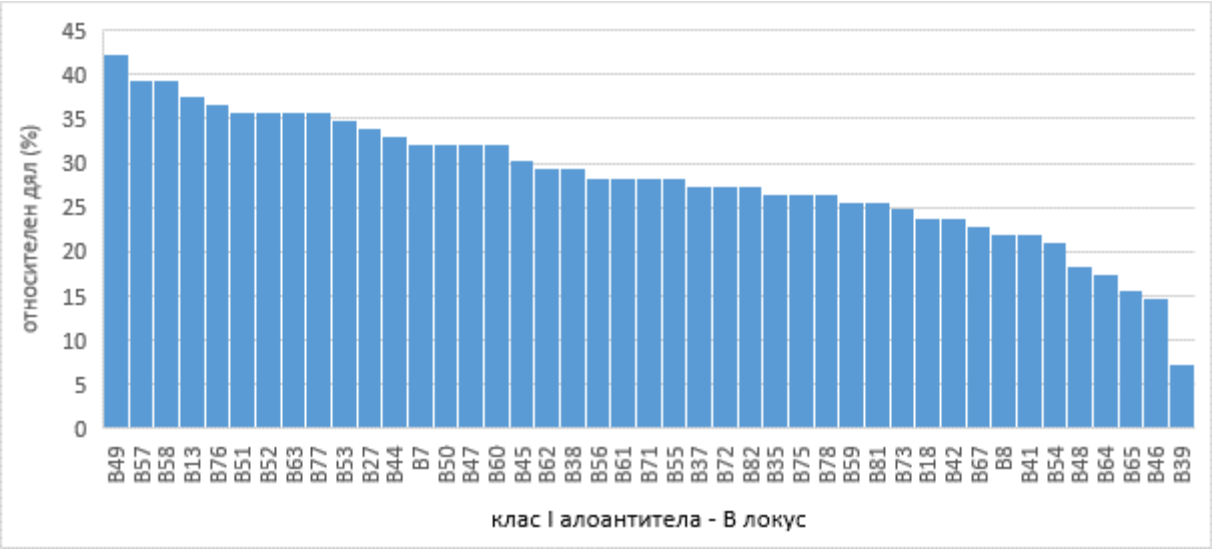
За целите на статистическите анализи в настоящото проучване MFI са приравнени към “score” стойности (от 1 до 8), необходими за

оценка на силата/количеството на антителата, както следва: < 500 = 1; 501-999 = 2; 1000-1500 = 3; 1501-2999 = 4; 3000-4999 = 5; 5000-9999 = 6 (силно положителни); ≥ 10 000 = 8 (много силно положителни). Нашите анализи показват, че най-силен е имунният отговор не към най-често срещаните алоантела срещу HLA-A локусни антигени HLA-A24, A25, а към HLA-A2 (фигура 7, Приложение 4), израз на който е по-големият относителен дял на високи "score" стойности на антителата срещу този антиген (6 при 11,9% и 8 при 4,6%). Докато при антителата срещу HLA-A24, които са най-честите, силата на реакция е по-слаба, с преобладаване на "score" стойности от 3 до 5 при 28,5% от случаите.



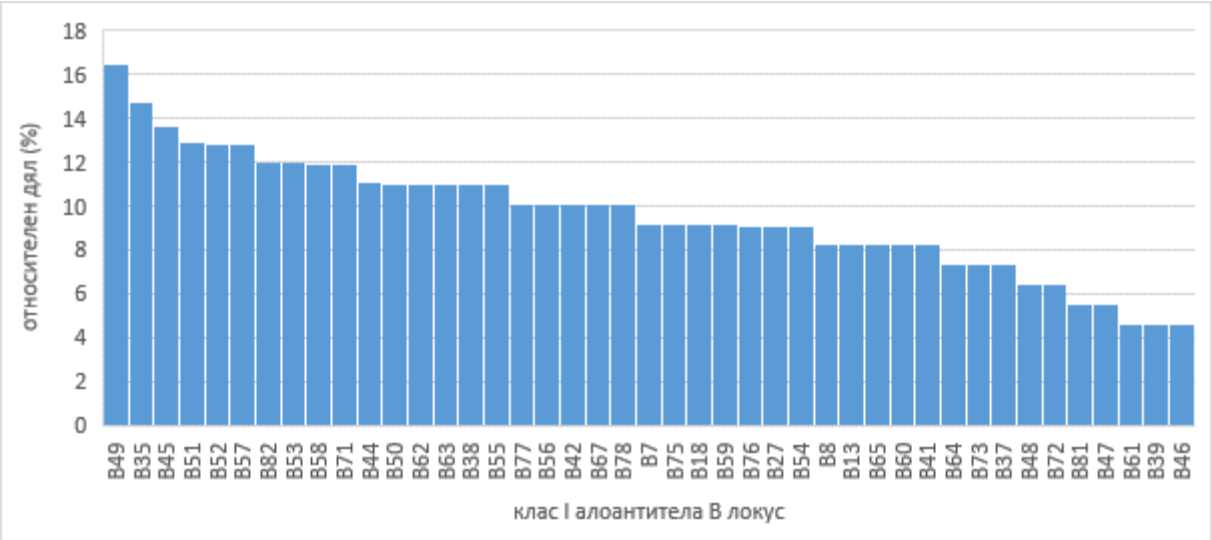
Фигура 7. *Процентно разпределение на алоантителата срещу HLA-A локусни специфичности със „score" стойности 6 и 8*

Разпределението на честотите на антителата срещу различните HLA-B локусни антигени (вж. Приложение 4) варират от 7,3% (B39) до 42,2% (B49), като най-често откриваните (>30%) антителни специфичности са към HLA-B49 (42,2%); B57 и B58 (39,4%); B76 (36,7%), B13 (37,6%), B51, B52 и B77 (35,8%); B53 (34,9%); B27 (33,9%); B44 (33%); B7, B47 и B62 (32,1%) (фигура 8).



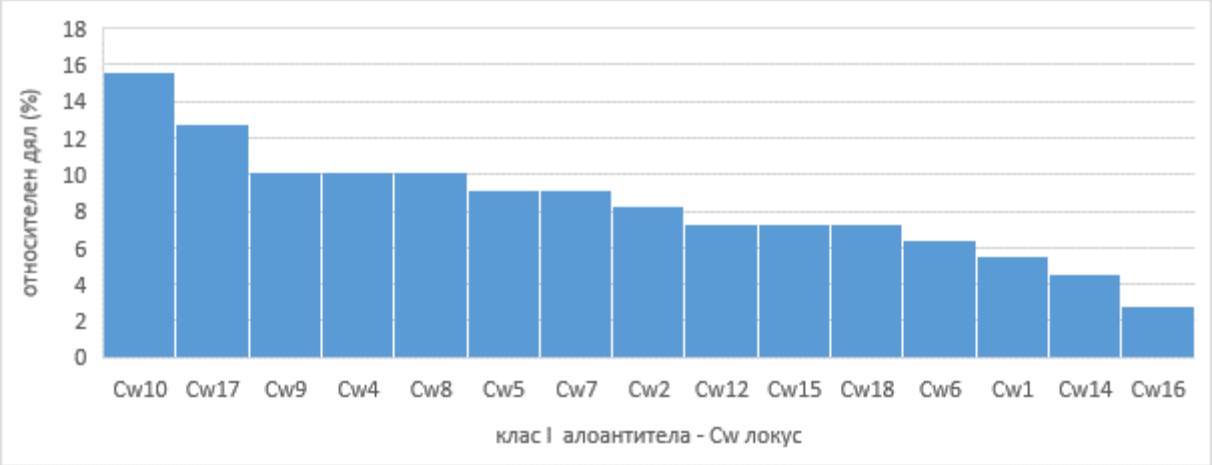
Фигура 8. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-B локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIа (n = 109)*

Силата на антителата варира, като най-разпространеното антитяло срещу HLA-B49 (42,2%) е и най-силно позитивиращото се, следвано по сила на реакции от B35 и B45, чиято честота на откриване е под 30% (фигура 9, Приложение 2).



Фигура 9. *Процентно разпределение на алоантитела срещу HLA-B локусни специфичности със „score" стойности 6 и 8*

Антителата към HLA-C локусните антигени (Приложение 2) варират от 2,8% (Cw16) до 15,6% (Cw10) (фигура 10). Тези антитела се откриват доста по-рядко в сравнение с тези към другите два HLA клас I локуси (A и B). Те са най-често насочени срещу HLA-C*03:04 (Cw10 - 15,6%), следвани от Cw17 (12,8%) и Cw9, 4 и 8 (10,1%).

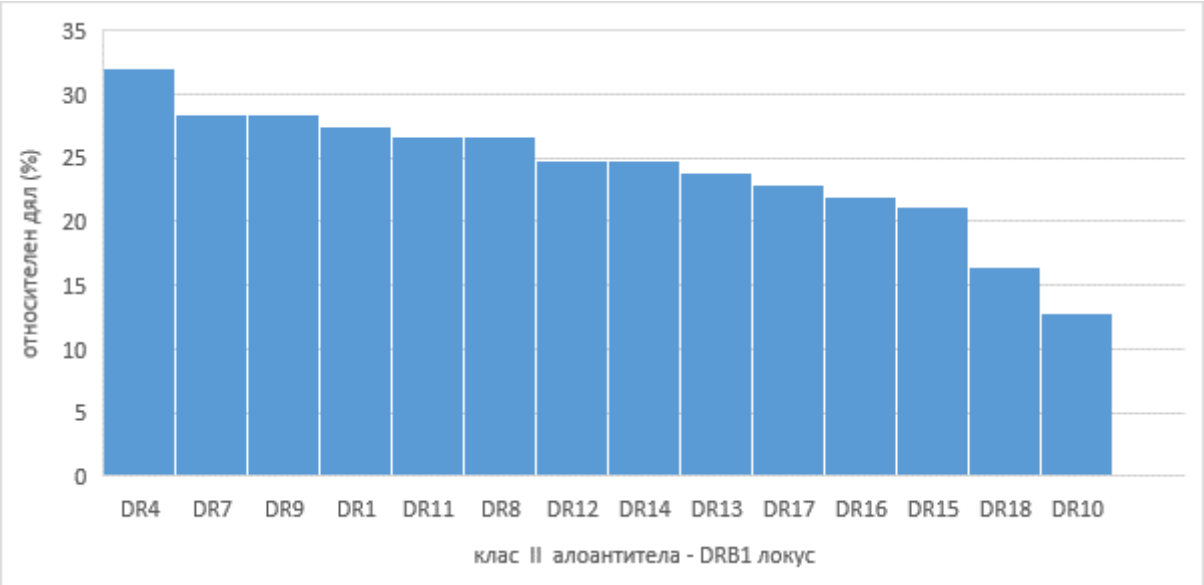


Фигура 10. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-C локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIa (n = 109)*

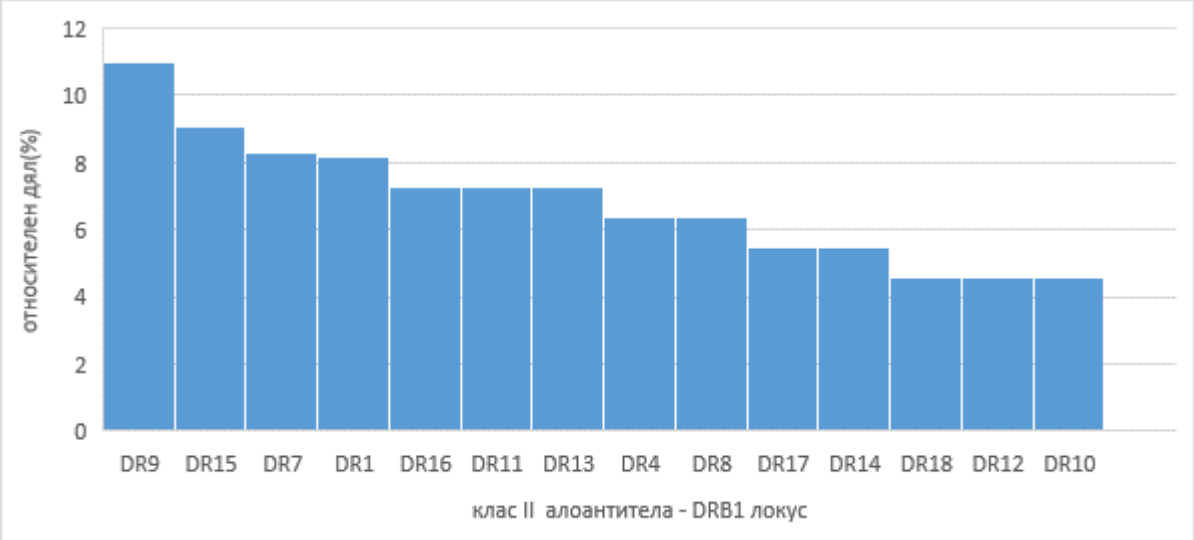
Силата на антителата варира, Cw9 е най-силно позитивиращото се антитяло, следвано от Cw10 и Cw17 и Cw18. Сред анти-HLA-Cw антителата преобладават по-ниските "score" стойности, което се приема като маркер за слаба имунна реактивност.

Антителата срещу HLA клас II са определяни като специфични за HLA-DR (DRB1), DQB1, DQA1 и DPB1. HLA-DR локусните антитела (Приложение 2) варират от 12,8% (DR10) до 32,1% (DR4) (фигура 11). Най-често се откриват тези срещу HLA-DR4 (32,1%), DR7 и DR9 (28,4%).

Силата на антителата варира, DR9 показва най-високи стойности (score 8), следвано от DR15 и DR7, чиято честота на откриване е по-ниска (21,1% и 28,4%, съответно) (фигура 12, Приложение 2). DR4, което е най-честото антитяло има по-малък „score".



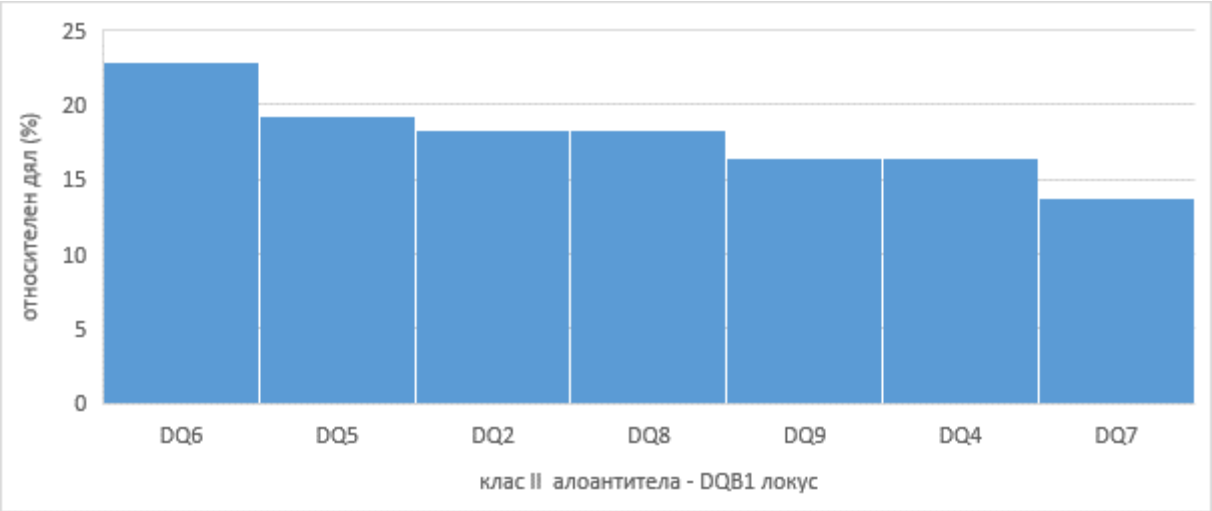
Фигура 11. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-DR локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIа (n = 109)*



Фигура 12. *Процентно разпределение на алоантитела срещу HLA-DR локусни специфичности по "score" стойности 6 и 8*

От HLA-DQ локусните антитела (фигура 13, Приложение 2) се откриват насочени срещу алфа (A) и бета (B) веригата на DQ антигените поради значимия полиморфизъм и на двете вериги. По отношение на HLA-DQB1 алореактивността най-чести са антителата срещу HLA-DQB1*03 алели (48.6%), представени като HLA-DQ7, DQ8 и DQ9 серо-

логични специфичности, като от тях най-голям е делът на DQ8 (фигура 15). Най-често срещаното антитяло е срещу DQ6 (22,9%), следвано от DQ5 (19,3%) и DQ2 (18,3%).

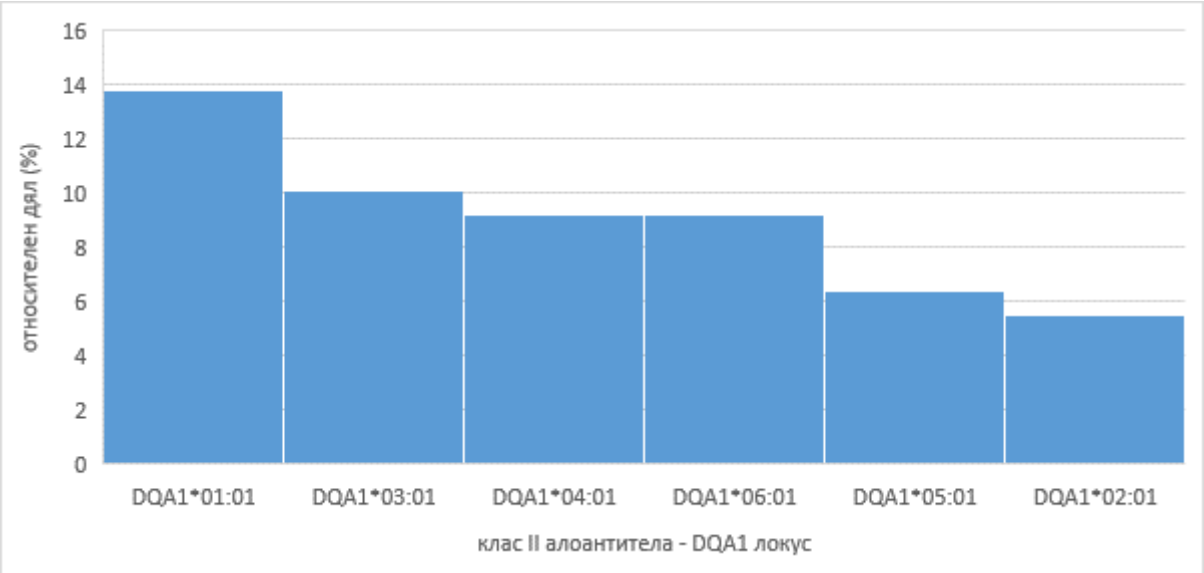


Фигура 13. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-DQB1 локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIа (n = 109)*

Трябва да се отбележи, че според силата на свързване с антигена с най-висок процент силно положителни реакции (score 6 и 8) са антителата срещу DQ6 и DQ5, без значими вариации на антителата срещу останалите DQ специфичности (Приложение 2).

Анализът на антителата срещу DQA1 веригата се базира на алореактивността към HLA-DQA1 алелни специфичности, за някои от които серологичните анализи все още не са дефинирани (https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/). Най-често се откриват антитела срещу DQA1*01 алелната група, включваща HLADQA*01:01 (13,8%), *01:02, *01:03 и *01:04 алел (фигура 14, Приложение 4). Най-рядко се откриват антитела срещу DQA1*03:03 и DQA1*05:03 (0,9%) алелите. Не сме открили антитела към DQA1*05:05 алела.

В силата на свързване не се наблюдават значими вариации (Приложение 2).



Фигура 14. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-DQA1 локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIa (n = 109)*

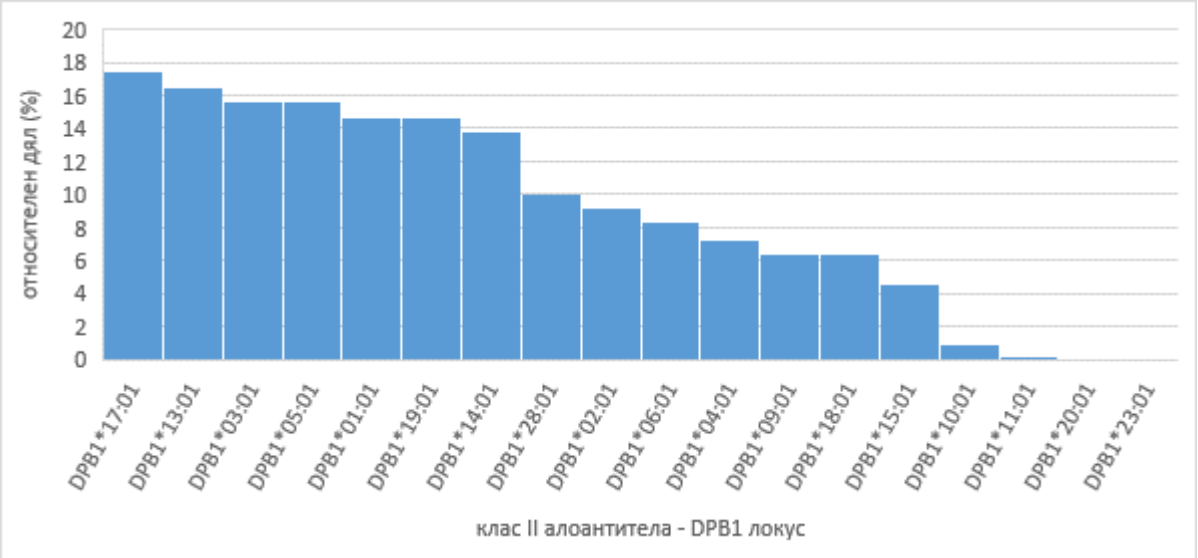
Анализът на HLA-DPB1 специфичните антитела (фигура 15, Приложение 3) показа, че най-често се срещат антитела срещу HLA-DPB1*17 (17,4%), DPB1*13 (16,5%), DPB1*03 (15,6%) и DPB1*05 (15,6%) алелни групи (фигура 15), представени в използваните от нас китове за специфичност съответно чрез DPB1*17:01, DPB1*13:01, DPB1*03:01 и DPB1*05:01 алел. Най-рядко се откриват антитела срещу DPB1*10 (0,9%) и DPB1*11 (0,2%), а при изследваните от нас реципиенти не са установени такива срещу DPB1*20:01 и DPB1*23:01 алелите.

Сред HLA-DP антителата не се установява силно позитивна реактивност – „score” 8 (Приложение 2).

5.3. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от трета група

При третата група от случайно подбрани неродствени клинично здрави индивиди (контролна група) бяха оценени честотите на различните HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 алелни групи/антигени в българска популация и шансовете за наличие на антитела към тях при пациентите с

положителен алоантителен статус. С този анализ се опитваме да прогнозираме вероятността за антидонорна реактивност при сенсибилизираните реципиенти от листата на чакащите БТ.



Фигура 15. *Разпределение на алоантитела срещу HLA-DPB11 локусни специфичности в низходящ ред според процента положителни проби в група IIa (n = 109)*

Резултатите показаха, че шансовете за наличие на повечето HLA специфичности в контролната група са по-ниски **(↓)**, но за някои се увеличава **(↑)** в сравнение с антителните им аналози в групата на пациентите (Приложение 3). При сравняване на двете групи по отношение на възникване на дадено събитие, отношението на шансовете дава възможност да се оцени с колко се увеличава или намалява шансът събитието да се наблюдава в едната в сравнение с другата група. Представяме и анализираме резултатите за някои от най-честите алоантителни HLA специфичности при пациентите. Прави впечатление, че вероятността за носителство на **HLA-A2** в контролната група е 30%, което означава, че останалите 70% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A2 в контролната група да е 0,432. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела

срещу HLA-A2 в серумите на тези пациентите е също 30%, т.е. в 70% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A2) в пациенската група е също 0,432. В конкретния пример отношението на шансовете е почти 1 (0,993), показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с най-голяма вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-A2) в контролната група е много нисък – 0,71% (табл. 28). Вероятността за носителство на **HLA-A24** в контролната група е 13%, което означава, че останалите 77% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A24 в контролната група да е 0,149. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-A24, което е най-често срещаното в серумите на тези пациентите, е 40%, т.е. в 60% от пациентите ще липсва, и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A24) в пациенската група е 0,678. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете се оцени, че отношението е почти 0,220, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 22% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-A24) в контролната група е 77,96% (табл. 28). Антителата срещу **HLA-A23** и **A25** се откриват с еднаква вероятност в пациентската група – 33,9%, а изчисленият шанс и за двете антителни специфичности е 0,513. Докато вероятностите (3,9% за HLA-A23 и 1,7% за HLA-A25) и шансовете (0,041 и 0,018) за двата антигена при здравите са различни. Отношението на шансовете за A23 е 0,080, показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 8,0% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. За HLA-A25 изчисленото отношение е 0,034, т.е. 3,4% вероятност за несъвместим по донор по този антиген. Изменението на шанса за HLA-23 и HLA-25 в контролната група намалява и е съответно 92,04% и 96,59%.

Таблица 28. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-A антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)*

A*	Вероятност за антигени в контрол-ната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентска та група	Отношение на шансовете (контро-ли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
1	0,130	0,202	0,149	0,253	0,590	**41,02↓**
2	0,302	0,303	0,432	0,435	0,993	**0,71↓**
3	0,080	0,211	0,087	0,267	0,326	**67,44↓**
11	0,069	0,229	0,074	0,297	0,248	**75,20↓**
23	0,039	0,339	0,041	0,513	0,080	**92,04↓**
24	0,130	0,404	0,149	0,678	0,220	**77,96↓**
25	0,017	0,339	0,018	0,513	0,034	**96,59↓**
26	0,054	0,193	0,057	0,239	0,238	**76,18↓**
29	0,012	0,202	0,012	0,253	0,049	**95,12↓**
30	0,017	0,165	0,018	0,198	0,089	**91,14↓**
31	0,032	0,202	0,033	0,253	0,130	**86,98↓**
32	0,047	0,284	0,049	0,397	0,123	**87,68↓**
33	0,022	0,174	0,023	0,211	0,107	**89,27↓**
36	0,005	0,193	0,005	0,239	0,021	**97,94↓**
43	0,003	0,239	0,003	0,314	0,008	**99,20↓**
66	0,003	0,284	0,003	0,397	0,006	**99,37↓**
68	0,025	0,275	0,025	0,379	0,066	**93,38↓**
69	0,012	0,229	0,012	0,297	0,042	**95,81↓**
80	0,003	0,193	0,003	0,239	0,010	**98,95↓**

Вероятността за носителство на **HLA-B49** в контролната група е 2,5%, което означава, че останалите 97,5% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-B49 в контролната група да е 0,025. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-B49 в серумите на тези пациентите е най-голяма – 42,2%, т.е. в 57,8% от пациентите ще липсват и тогава изчисленият шанс за това антитяло (B49) в пациенската група е 0,730. При сравняване на двете групи по отношението на шансовете, отношението за B49 е почти 0,034, показващо, че реципиенти с антитела

срещу тази специфичност са с 3,4% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-B49) в контролната група е 96,56% (табл. 29). Вероятностите за наличието (35,8%) и за липсата (64,2%) на антитела към **HLA-B51** и **HLA-B52** при алосенсибилизираните пациентите (група IIb), както и шансът (0,558) са еднакви, Вероятността за носителство на HLA-B51 в контролната група е 15,4%, а шансът – 0,183, докато за HLA-B52 са съответно 3,4% вероятност и 0,036 шанс. Отношението на шансовете за HLA-B51 е 0,327, показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 32,7% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор, докато за HLA-B52 това отношение е 0,064, показващо вероятност от 6,4% за несъвместим по този антиген донор за реципиентите с антитела срещу HLA-B52. Изменението на шанса за наличие на HLA-B51 и -B52 в контролната група е съответно 67,26% и 93,63% (табл. 29, Приложение 3).

Вероятността за носителство на **HLA-Cw4** в контролната група е 16,8%, което означава, че останалите 83,2% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-Cw4 в контролната група да е 0,202. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-Cw4 в серумите на тези пациентите е 10,1%, т.е. при 89,9% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (Cw4) в пациенската група ще е 0,112. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете отношението за Cw4 е 0,557, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 55,7% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-Cw4) в контролната група се увеличава – 44,32% (табл. 30).

Таблица 29. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-B антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)*

B*	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
7	0,047	0,321	0,049	0,473	0,103	**89,66↓**
8	0,052	0,220	0,054	0,282	0,193	**80,75↓**
13	0,017	0,376	0,018	0,603	0,029	**97,10↓**
18	0,088	0,239	0,097	0,314	0,308	**69,20↓**
27	0,047	0,339	0,049	0,513	0,095	**90,47↓**
35	0,150	0,266	0,176	0,362	0,485	**51,50↓**
37	0,007	0,275	0,007	0,379	0,020	**98,03↓**
38	0,029	0,294	0,030	0,416	0,073	**92,73↓**
39	0,022	0,073	0,023	0,079	0,287	**71,30↓**
41	0,015	0,220	0,015	0,282	0,053	**94,71↓**
44	0,088	0,330	0,097	0,493	0,196	**80,36↓**
45	0,003	0,303	0,003	0,435	0,006	**99,42↓**
47	0,010	0,321	0,010	0,473	0,021	**97,91↓**
49	0,025	0,422	0,025	0,730	0,034	**96,56↓**
50	0,022	0,321	0,023	0,473	0,048	**95,22↓**
51	0,154	0,358	0,183	0,558	0,327	**67,26↓**
52	0,034	0,358	0,036	0,558	0,064	**93,63↓**
53	0,012	0,349	0,012	0,536	0,023	**97,68↓**
55	0,015	0,284	0,015	0,397	0,038	**96,24↓**
56	0,005	0,284	0,005	0,397	0,012	**98,76↓**
57	0,034	0,394	0,036	0,650	0,055	**94,54↓**
58	0,012	0,394	0,012	0,650	0,019	**98,08↓**

Вероятността за носителство на **HLA-Cw17** в контролната група е 1,6%, което означава, че останалите 98,4% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-Cw17 в контролната група да е 0,016. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-Cw17 в серумите на тези пациентите е 12,8%, т.е. при 87,2% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (Cw17) в пациенската група ще е 0,147.

При сравняване на двете групи по отношение на шансовете за Cw17 той е 0,108, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 10,8% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA- Cw17 в контролната група намалява – 89,20% (табл. 30, Приложение 3).

Таблица 30. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-Cw антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)*

Cw	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/ пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
1	0,070	0,055	0,076	0,058	0,770	**23,03↑**
2	0,102	0,083	0,113	0,091	0,800	**19,96↑**
4	0,168	0,101	0,202	0,112	0,557	**44,32↑**
5	0,032	0,092	0,033	0,101	0,322	**67,79↓**
6	0,090	0,064	0,099	0,068	0,693	**30,69↑**
7	0,219	0,092	0,280	0,101	0,362	**63,82↑**
8	0,027	0,101	0,028	0,112	0,250	**75,02↓**
12	0,121	0,073	0,138	0,079	0,572	**42,85↑**
14	0,031	0,046	0,032	0,048	0,670	**32,99↓**
15	0,039	0,073	0,041	0,079	0,517	**48,33↓**
16	0,023	0,028	0,024	0,029	0,832	**16,82↓**
17	0,016	0,128	0,016	0,147	0,108	**89,20↓**

Вероятността за носителство на **HLA-DR4** в контролната група е 8,6%, което означава, че останалите 91,4% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DR4 в контролната група ще е 0,094. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR4 в серумите на тези пациентите е 32,1%, т.е. в 67,9% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR4) в пациенската група ще е 0,473. Отношението на шансовете за DR4 е 0,199, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 19,9% вероятност

да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DR4 в контролната група намалява – 80,15% (табл. 31, Приложение 3). Вероятността за носителство на **HLA-DR11** в контролната група е най-голяма – 20,3%, а останалите 79,7% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA- DR11 в контролната група ще е 0,255. В групата на положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR11 е 26,6%, т.е. в 73,4% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR11) в пациенската група е 0,362. Отношението на шансовете между двете групи за DR11 е 0,705, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност имат 70,5% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA- DR11) в контролната група намалява – 29,54% (табл. 31).

Таблица 31. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-DR антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)*

DRB 1*	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/ пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
1	0,103	0,275	0,115	0,379	0,302	**69,76↓**
4	0,086	0,321	0,094	0,473	0,199	**80,15↓**
7	0,069	0,284	0,074	0,397	0,186	**81,43↓**
8	0,027	0,266	0,028	0,362	0,077	**92,34↓**
9	0,005	0,284	0,005	0,397	0,012	**98,76↓**
10	0,015	0,128	0,015	0,147	0,102	**89,84↓**
11	0,203	0,266	0,255	0,362	0,705	**29,54↓**
12	0,007	0,248	0,007	0,330	0,023	**97,74↓**
13	0,110	0,239	0,124	0,314	0,395	**60,53↓**
14	0,061	0,248	0,065	0,330	0,198	**80,20↓**
15	0,064	0,211	0,068	0,267	0,254	**74,56↓**
16	0,157	0,220	0,186	0,282	0,660	**34,02↓**

Вероятността за носителство на **HLA-DQ3** в контролната група е 38,6%, т.е. останалите 61,4% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ3 в контролната група ще е 0,627. В групата на положителните за алоантитела (група IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ3 в серумите на тези пациентите е 16,2%, т.е. в 83,8% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ3) в пациенската група ще е 0,193. Отношението на шансовете за DQ3 е 0,308, показващо, че реципиенти с антитела срещу тези специфичности имат 30,8% вероятност за несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DQ3 в контролната група се увеличава – 69,18% (табл. 32, Приложение 3). Вероятността за носителство на HLA-DQ6 в контролната група е 12,1%, а останалите 87,9% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ6 в контролната група ще е 0,137. В групата на положителните за алоантитела вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ6 е най-голяма – 22,9%, т.е. в 77,1% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ6) в пациентската група ще е 0,297. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете за DQ6 той е 0,461, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 46,1% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DQ6 в контролната група намалява с 53,87% (табл. 32).

5.4. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от четвъртата група

Четвърта група включва 197 трупни донори (през периода 31.01.2008–09.05.2023 г.), от които преобладават мъжете (n = 114) със запазена бъбречна функция. Донорите бяха типизирани по HLA системата, чрез молекулярно биологични методи и съпоставени с алоантителния статус на пациенти от втора група.

Таблица 32. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-DQB1 антигени в контролната (n = 204) и антитела в пациентската група (n = 109)*

DQB 1*	Вероятност за антигени в контролната група	Вероятност за антитела в пациентската група	Шанс за антигени в контролната група	Шанс за антитела в пациентската група	Отношение на шансовете (контроли/ пациенти)	Изменение на шанса за наличие на антигени в контролната група (%)
2	0,145	0,183	0,169	0,224	0,754	**24,59↓**
3	0,386	0,162	0,627	0,193	0,308	**69,18↑**
4	0,024	0,165	0,025	0,198	0,125	**87,50↓**
5	0,325	0,193	0,482	0,239	0,496	**50,40↑**
6	0,121	0,229	0,137	0,297	0,461	**53,87↓**

Оценени бяха честотите на различните HLA-A, -B, DRB1, DQB1 антигени в групата на трупните донори и шансовете за наличие на антитела към тях при пациентите с положителен алоантителен статус (IIa). HLA-C антигени и насочените срещу тях алоантитела не са включени в анализа, защото трупните донори според действащите стандарти и политики не са типизирани по HLA-C локус.

Резултатите показаха, че шансовете за наличие на повечето HLA специфичности в донорната група намаляват **(↓)**, но за някои са по-високи **(↑)** в сравнение с антителните им аналози в групата на пациентите (табл. 32-35). Прави впечатление, че вероятността за носителство на HLA-A2 в донорската група е 50,5%, което означава, че останалите 49,5% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A2 в донорската група да е 1,020. В групата на положителните за алоантитела вероятността да се открият антитела срещу HLA-A2 е 30,3%, т.е. в 69,7% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A2) в пациенската група е 0,435. Оценката на шанса събитието да се наблюдава в едната в сравнение с другата група, т.е. отношението на шансовете в конкретния пример е 0,426, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 42,6% вероятност

да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-A2 в донорската група се увеличава – 57,35% (табл. 32). Вероятността за носителство на HLA-A1 при донорите е 26,05%, т.е. 73,95% са с вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A1 в групата на донорите да е 0,351. Сред положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-A1 е 20,2%, означаващо, че при останалите 79,8% те ще липсват, а изчисленият шанс за това антитяло в пациентската група ще е 0,253. Отношението на шансовете между двете групи е 0,721, което показва, че реципиенти с HLA-A1 антитела са с 72,1% вероятност да срещнат донор, несъвместим по този антиген. Изменението на шанса за наличие на HLA-A1 в донорската група се увеличава – 27,92%. Вероятността за носителство на HLA-A24 в донорната група е 25,5%, което означава, че останалите 74,5% са с вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-A24 в тази група да е 0,342. При положителните за алоантитела вероятността да се открият антитела срещу HLA-A24, което е едно от най-често срещаните в серумите на тези пациенти, е 40,4%, т.е. в 59,6% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (A24) в пациенската група е 0,678. При съпоставяне на шансовете на двете групи се получи отношение 0,504, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 50,4% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-A24 в групата на донорите намалява – 49,56% (табл. 33).

Вероятността за носителство на HLA-B49 в донорската група е 9,0%, което означава, че останалите 93,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-B49 в тази група е 0,099.

Таблица 33. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-A антигени в донорната (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)*

Показател	Вероятност за антигени в донорската група	Вероятност за антитела в групата на реципиентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиентската група	Отношение на шансовете (Донори/реципиенти	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
A1	0,260	0,202	0,351	0,253	0,721	**27,92**↑
A2	0,505	0,303	1,020	0,435	0,426	**57,35**↑
A3	0,185	0,211	0,227	0,267	0,850	**14,98**↓
A23	0,070	0,339	0,075	0,513	0,146	**85,38**↓
A24	0,255	0,404	0,342	0,678	0,504	**49,56**↓
A25	0,040	0,339	0,042	0,513	0,082	**91,81**↓
A26	0,065	0,193	0,070	0,239	0,293	**70,71**↓
A66	0,015	0,284	0,015	0,397	0,038	**96,22**↓
A11	0,115	0,229	0,130	0,297	0,438	**56,23**↓
A29	0,015	0,202	0,015	0,253	0,059	**94,07**↓
A30	0,075	0,165	0,081	0,198	0,409	**59,09**↓
A31	0,055	0,202	0,058	0,253	0,229	**77,08**↓
A32	0,110	0,284	0,124	0,397	0,312	**68,77**↓
A33	0,040	0,174	0,042	0,211	0,199	**80,09**↓
A68	0,045	0,275	0,047	0,379	0,124	**87,60**↓
A69	0,000	0,229	0,000	0,297	0,000	**100.0**↓
A36	0,000	0,193	0,000	0,239	0,000	**100.0**↓
A43	0,000	0,239	0,000	0,314	0,000	**100.0**↓
A80	0,000	0,193	0,000	0,239	0,000	**100.0**↓

При положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-B49 в серумите им е най-голяма – 42,2%, т.е. в 57,8% от пациентите ще липсват и тогава изчисленият шанс за това антитяло (B49) в пациенската група ще е 0,730. При сравняване на двете групи отношението на шансовете за B49 е 0,136, показващо, че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 13,6% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-B49 в донорската група намалява – 86,44% (табл. 34).

Вероятността за носителство на HLA-B35 сред донорите е най-голям – 31,0%, което означава, че останалите 69,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-B35 в донорната група да е 0,449. В групата на положителните за алоантитела пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-B35 е 26,6%, а да липсват е 73,4% и тогава изчисленият шанс за това антитяло (B35) в пациенската група е 0,362. Отношението на шансовете за B35 е 0,806, или реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 80,6% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-B35 в донорската група се увеличава – 19,38% (табл. 34).

Вероятностите за наличието (35,8%) и за липсата (64,2%) на антитела към HLA-B51 и HLA-B52, както и шансът за тези антитела (0,558) при алосенсибилизираните пациенти са еднакви. Вероятността за носителството на HLA-B51 при донорите е второ по честота – 30,5%, т.е. 69,5% няма да го носят, а изчисленият шанс е 0,439, докато за HLA-B52 са съответно 4,0% вероятност и 0,042 шанс. Отношението на шансовете за HLA-B51 е 0,787, или 78,7% от реципиентите с антитела към тази специфичност има вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Докато за HLA-B52 това отношение е 0,075, показващо в сравнение с HLA-B51 почти десетократно по-малка вероятност (7,5%) за несъвместим по HLA-B52 донор за реципиентите с антитела срещу този антиген. Изменението на шанса за наличие на HLA-B51 и -B52 в донорската група е съответно 21,33% и 92,47% (табл. 34).

Вероятността за носителството на HLA-B18 в групата на донорите е трето по честота – 21,0%, т.е. 79,0% има вероятност да са отрицателни за този антиген, а изчисленият шанс е 0,266. Вероятността да се открият антитела срещу HLA-B18 сред положителните пациенти е 23,9%, а да липсват е 76,1% и изчисленият шанс за това антитяло е 0,314. Отношението на шансовете е 0,847, което показва, че 84,7% от положителните за това антитяло (B18) пациенти имат вероятност за несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-B18 в донорската група намалява – 15,29%.

Таблица 34. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-B антигени в донорската (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)*

Показател	Вероятност за антигени в донорската група	Вероятност за антитела в групата на реципиентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиентската група	Отношение на шансовете (Донори/реципиенти	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
B51	0,305	0,358	0,439	0,558	0,787	21,33↓
B52	0,040	0,358	0,042	0,558	0,075	92,47↓
B7	0,080	0,321	0,087	0,473	0,184	81,61↓
B8	0,125	0,220	0,143	0,282	0,507	49,29↓
B44	0,170	0,330	0,205	0,493	0,416	58,42↓
B45	0,010	0,303	0,010	0,435	0,023	97,7↓
B13	0,075	0,376	0,081	0,603	0,134	86,57↓
B38	0,065	0,294	0,070	0,416	0,168	83,17↓
B39	0,030	0,073	0,031	0,079	0,392	60,76↓
B57	0,035	0,394	0,036	0,650	0,055	94,46↓
B58	0,005	0,394	0,005	0,650	0,008	99,23↓
B18	0,210	0,239	0,266	0,314	0,847	15,29↓
B49	0,090	0,422	0,099	0,730	0,136	86,44↓
B50	0,005	0,321	0,005	0,473	0,011	98,94↓
B55	0,035	0,284	0,036	0,397	0,091	90,93↓
B56	0,010	0,284	0,010	0,397	0,025	97,48↓
B27	0,040	0,339	0,042	0,513	0,082	91,81↓
B35	0,310	0,266	0,449	0,362	0,806	19,38↑
B37	0,005	0,275	0,005	0,379	0,013	98,68↓
B41	0,030	0,220	0,031	0,282	0,110	89,01↓
B47	0,000	0,321	0,000	0,473	0,000	100.0↓
B53	0,010	0,349	0,010	0,536	0,019	98,13↓

Вероятността за носителство на HLA-DR4 в донорската група е 16,0%, което означава, че останалите 84,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DR4 в контролната група е 0,190. В групата на алосенсибилизираните пациенти вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR4 в серумите им е голяма – 32,1%, т.е. в

67,9% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR4) в пациенската група е 0,473. Отношението на шансовете за DR4 е 0,402, показващо че реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 40,2% вероятност да имат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DR4 в донорската група намалява – 59,83% (таблица 34). Вероятността за носителство на HLA-DR11 в донорската група е 46,5%, което означава, че останалите 53,5% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DR11 в тази група е 0,869. В групата на положителните за алоантитела пациенти, вероятността да се открият антитела срещу HLA-DR11 в серумите им е 26,6%, т.е. в 73,4% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DR11) в пациенската група е 0,362. При сравняване на двете групи по отношение на шансовете за DR11, отношението е 0,417, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност имат 41,7% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DR11 в донорската група се увеличава – 58,34% (табл. 35).

Вероятността за носителство на HLA-DQ3 в донорската група е 60,0%, което означава, че останалите 40,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ3 в донорската група е 1,500. В групата на положителните за алоантитела (IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ3 в серумите на тези пациентите е 16,2%, т.е. в 83,8% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ3) в пациенската група ще е 0,193. Отношението на шансовете за DQ3 е 0,129, показващо, че реципиенти с антитела срещу тези специфичности са с 12,9% вероятност за несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на HLA-DQ3 в донорската група се увеличава – 87,13% (табл. 35).

***Таблица 35**. Анализ на шансовете за наличие на HLA-DR антигени в донорната (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)*

Показа-тел	Вероятност за антигени в донорс-ката група	Вероятност за антитела в групата на реципи-ентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиент-ската група	Отношение на шансо-вете (Доно-ри/реципи-енти	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
DR1	0,155	0,275	0,183	0,379	0,483	**51,72**↓
DR15	0,170	0,211	0,205	0,267	0,768	**23,22**↓
DR16	0,275	0,220	0,379	0,282	0,744	**25,59**↑
DR4	0,160	0,321	0,190	0,473	0,402	**59,83**↓
DR11	0,465	0,266	0,869	0,362	0,417	**58,34**↑
DR12	0,010	0,248	0,010	0,330	0,030	**96,97**↓
DR13	0,165	0,239	0,198	0,314	0,631	**36,94**↓
DR14	0,105	0,248	0,117	0,330	0,355	**64,55**↓
DR7	0,120	0,284	0,136	0,397	0,343	**65,74**↓
DR8	0,040	0,266	0,042	0,362	0,116	**88,4**↓
DR9	0,010	0,284	0,010	0,397	0,025	**97,48**↓
DR10	0,030	0,128	0,031	0,147	0,211	**78,91**↓

Вероятността за носителство на HLA-DQ6 в донорската група е 30,0%, което означава, че останалите 70,0% има вероятност да не носят този антиген и изчисленият шанс за HLA-DQ6 в донорската група да е 0,429. В групата на положителните за алоантитела пациенти (IIa) вероятността да се открият антитела срещу HLA-DQ6 в серумите им е 22,9%, т.е. в 77,1% от пациентите ще липсва и тогава изчисленият шанс за това антитяло (DQ6) в пациенската група ще е 0,297. При сравняване на шансовете на двете групи за DQ6 отношението е 0,692, т.е. реципиенти с антитела срещу тази специфичност са с 69,2% вероятност да срещнат несъвместим по този антиген донор. Изменението на шанса за наличие на този антиген (HLA-DQ6) в донорната група се увеличава – 30,77% (табл. 36).

Таблица 36. *Анализ на шансовете за наличие на HLA-DQB1 антигени в донорска (n = 197) и антитела в пациентската група (n = 109)*

Показа-тел	Вероятност за антигени в донорс-ката група	Вероятност за антитела в групата на реципи-ентите	Шанс за антигени в донорската група	Шанс за антитела в реципиент-ската група	Отношение на шансо-вете (Доно-ри/реципи-енти	Изменение на шанса за наличие на антигени в донорската група (%)
DQ 5	0,525	0,193	1,105	0,239	0,216	**78,40**↑
DQ 6	0,300	0,229	0,429	0,297	0,692	**30,77**↑
DQ 2	0,275	0,183	0,379	0,224	0,591	**40,90**↑
DQ 3	0,600	0,162	1,500	0,193	0,129	**87,13**↑
DQ 4	0,040	0,165	0,042	0,198	0, 212	**79,79**↓

5.5. Обобщение на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на изследваните пациенти от пета група

Тази група се състои от 746 реципиенти и 257 донори (155 живи и 102 трупни), между които е извършен проспективен и/или ретроспективен кросмач. Обобщени и анализирани са резултатите от 913 FCXM, извършени в периода януари 2010 г.-декември 2017 г., от които 755 с актуални и 158 с исторически серуми.

Анализите на данните от проспективни и ретроспективни кросмач реакции показаха, че при пациенти с наличие на преформирани антитела срещу несъвместимите донорни HLA клас I антигени в 79,3% очакваният T(+)/B(+) кросмач се потвърждава с резултатите от актуалния, реално проведен кросмач. В два от случаите (6,89%) Т-клетъчният кросмач е положителен, но В-клетъчният е отрицателен. При 3 (10,3%) пациенти с HLA клас I DSA Т-клетъчният кросмач е отрицателен, но В-клетъчният е положителен. При наличие на HLA клас II антидонорни антитела кросмач реактивността, както се очакваше, е само срещу В-клетките – T(-)/B(+) кросмач.

По отношение на пациентите, при които не са открити алоантитела при скринингите или имат не-DSA при 97,42% от тях, резултатите от

кросмача са отрицателни. Установихме обаче някои изключения – серумите на 19 (2,58%) от изследваните 737 пациенти показаха положителни резултати, несъответстващи на алоантителния профил, въз основа на който се очакваше отрицателен кросмач. Оформиха се три комбинации от актуална кросмач реактивност: 3 (0,41%) пациенти имат Т-клетъчен(+)/В-клетъчен(+); 5 (0,68%) са с Т(+)/В(-) и 11 (1,5%) демонстрират Т(-)/В(+) FCXM.

За изясняване на тези находки извършихме допълнителни изследваия и анализи, включващи типизиране по HLA-C, DP, DQA локуси, типизиране на алелно ниво и допълнително тестване на серумите за антитела към тези локуси и/или алели.

В групата с неочакван Т(+)/В(+) кросмач при един от пациентите с нула несъвместимост по HLA-A, -B, -DR, -DQ алелните групи допълнителните изследвания показаха наличие донор-специфични антитела срещу HLA-DP локуса (HLA-DP*05). В допълнение се установи и несъвместимост по HLA-B35 алелите, но алел-специфични антитела не можеха да се докажат поради липса на алелната специфичност на пациента в кита за специфициране на алоантителата. При втория пациент с многократни кръвопреливания, но отрицателен за алоантитела до момента на реалния кросмач, впоследствие в проспективния серум бяха доказани DSA към несъвместимия HLA-B18 антиген с много нисък MFI = 624. Третият пациент е върнат на диализа след трансплантация от жив родствен донор и при рутинните скринги има установени не-DSA от HLA клас I и II към потенциалния трупен донор, с който е извършен FCXM. Кросмачът с исторически серуми, в който е установена недонор-специфична алореактивност, показа отрицателни резултати, докато този с пресен серум беше положителен. Съпоставянето на HLA формулите на донора и реципиента ни дадоха основание да предположим, че може да

се касае за алел-специфични антидонорни антитела, неоткрити в предходните изследвания.

В групата на реципиентите с неочаквани Т(-)/В(+) кросмач резултати, при 9/11 не са установени алоантитела, а при двама са намерени не-DSA при предходните изследвания. При 9 пациента е направен и автокросмач, като при 6 от тях той е Т(-)/В(+), а при трима – Т(-)/В(-). При един от реципиентите кросмач резултатите са Т(-)/В(+) с трима трупни донори, а автокросмач тестовете показват същата реактивност (табл. 37).

Таблица 37. *Резултати от кросмач и автокросмач тестове с трима трупни донори при реципиентка с отрицателен алоантителен статус*

Донор	**Кросмач**		**Автокросмач**	
	Т-клетъчен	***В-клетъчен***	***Т-клетъчен***	***В-клетъчен***
Д1	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.	(+) пол.
Д2	(-) отр.	(+) пол.	–	–
Д3	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.	(+) пол.

Тази пациентка е трансплантирана успешно от последния донор. Резултатите от последващите скрининги на реципиентите от тази група не показват наличие на алоантитела или на DSA към несъвместимите антигени на донорите, с които са имали положителен кросмач.

При две пациентки с Т(-)/В(+) резултат, без наличие на DSA от клас II не е правен автокросмач, но те са диагностицирани с лупусна нефропатия и с голяма вероятност може да се приеме, че се касае за автореактивност. При трима от пациентите с Т(-)/В(+) кросмач автокросмач реакцията е отрицателна, липсват и DSA от клас II алоантитела.

Третата група е от реципиенти, показали Т(+)/В(-) резултати от кросмач теста. Всички са имали сенсибилизиращи събития: бременности (n = 1), кръвопреливания (n = 1) или и двете (n = 3). Трима са били положителни за преформирани недонор-специфични антитела, един е бил

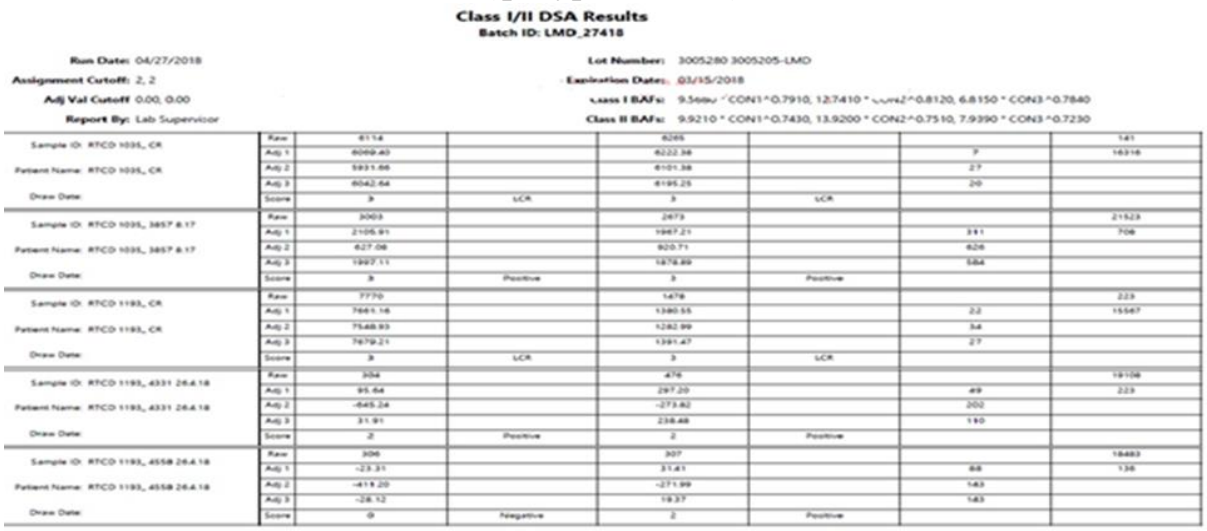
отрицателен за алоантитела при рутинните скринингти, а при един HLA типизирането, изследването за алоантитела и кросмач реакцията са извършени едновременно при регистрирането на реципиента. За подпомагане на клиничната интерпретация на резултатите при пациентката с отрицателен алоантителен статус бе направен автокросмач. Резултатите показаха негативен както Т-, така и В-клетъчен автокросмач. Поради това положителният Т-клетъчен кросмач беше интерпретиран най-вероятно в резултат на донор-специфична алореактивност, доказана впоследствие с откриването на DSA в пресния серум срещу несъвместимия HLA-B56 с MFI = 1549 (табл. 38). При останалите пациенти от тази група също бяха доказани в актуалния серум антитела към несъвместими HLA клас I антигени (при двама срещу HLA-B и при двама към HLA-A), като MFI не надвишава 2000.

Таблица 38. *HLA типизиране, кросмач и HLA антителен профил при пациентка с Т(+)/В(-) кросмач*

HLA Типизиране **Реципиент**: HLA-A*02,*24; B*18,*58; DRB1*08,*11; DQB1*03,*04 **Донор**: HLA-A*02,*32; B*35**,*56**; DRB1*08,*11; DQB1*03,*04	
Сенсибилизиращи събития Бременности – 4 Кръвопреливания – 5, в периода между последния скрининг и кросмача	
Флоуцитометричен кросмач	
Т-клетъчен	FI = 2.4 (Положителен)
В-клетъчен	FI = 1.23 (Отрицателен)
Автокросмач	
Т-клетъчен	FI = 1.1 (Отрицателен)
В-клетъчен	FI = 1.3 (Отрицателен)
Алоантителен ататус (пресен серум)	
HLA клас I	B7, 42, **56**, 81
HLA клас II	Отрицателни (-)

За целта на проучването беше въведен и верифициран метод за Luminex DSA кросмач за определяне на донор-специфични антитела.

За верифициране на метода използвахме силно положителни серуми от участието ни във Външна Оценка на Качеството (ВОК) за определяне на алоантитела (Eurotransplant) с познати HLA клас I и клас II специфичности, както и отрицателни за антитела серуми (отрицателни контроли от китове за детекция на HLA антитела). За източник на HLA антигени използвахме клетки на донори с HLA специфичности, съответстващи на тези на антитела (фигура 16 и 17).

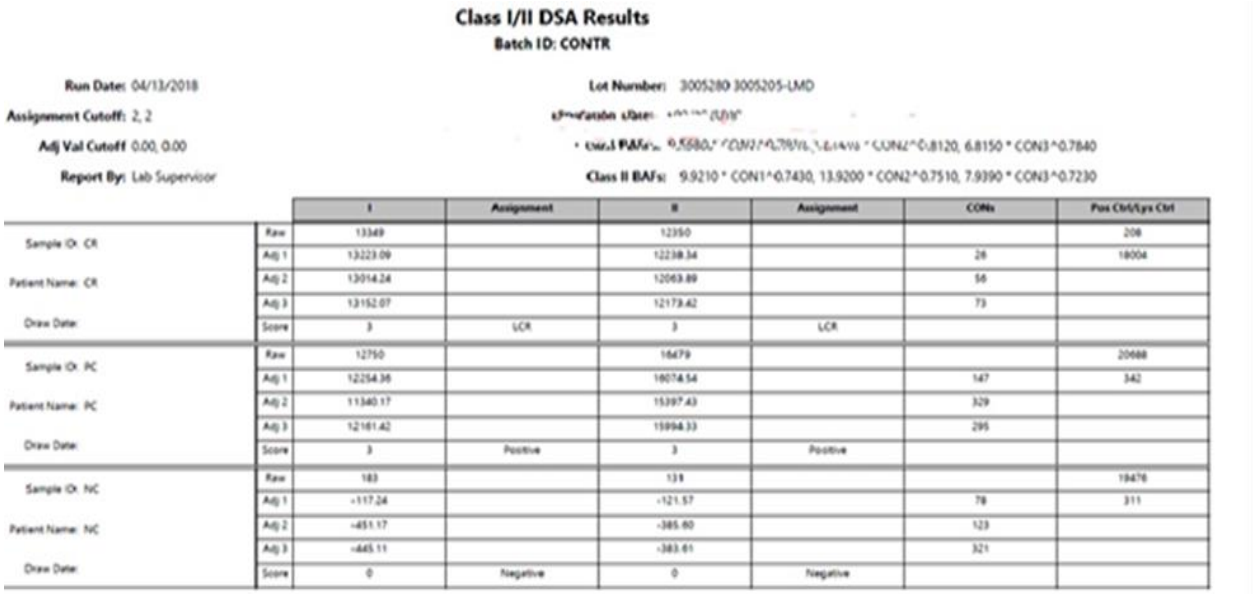


Class I/II DSA Results
Batch ID: LMD_27418

Run Date: 04/27/2018 **Lot Number:** 3005280 3005205-LMD
Assignment Cutoff: 2, 2 **Expiration Date:** 03/15/2018
Adj Val Cutoff 0.00, 0.00 **Class I BAFs:** 9.5680 * CON1^0.7910, 12.7410 * CON2^0.8120, 6.8150 * CON3^0.7840
Report By: Lab Supervisor **Class II BAFs:** 9.9210 * CON1^0.7430, 13.9200 * CON2^0.7510, 7.9390 * CON3^0.7230

Sample ID: RTCD 1035_ CR	Raw	6114		6265			141
	Adj 1	6099.40		6222.38		7	14316
Patient Name: RTCD 1035_ CR	Adj 2	5931.66		6101.38		27	
	Adj 3	6042.64		6195.25		20	
Draw Date:	Score	3	LCR	3	LCR		
Sample ID: RTCD 1035_ 3857 8.17	Raw	3003		2673			21523
	Adj 1	2105.91		1967.21		341	706
Patient Name: RTCD 1035_ 3857 8.17	Adj 2	627.08		920.71		626	
	Adj 3	1997.11		1878.89		584	
Draw Date:	Score	3	Positive	3	Positive		
Sample ID: RTCD 1193_ CR	Raw	7770		1478			223
	Adj 1	7661.16		1340.55		22	15567
Patient Name: RTCD 1193_ CR	Adj 2	7548.93		1282.99		34	
	Adj 3	7679.21		1391.47		27	
Draw Date:	Score	3	LCR	3	LCR		
Sample ID: RTCD 1193_ 4331 26.4.18	Raw	304		476			19106
	Adj 1	95.64		297.20		49	223
Patient Name: RTCD 1193_ 4331 26.4.18	Adj 2	-645.24		-273.62		202	
	Adj 3	31.91		238.48		110	
Draw Date:	Score	2	Positive	2	Positive		
Sample ID: RTCD 1193_ 4558 26.4.18	Raw	306		307			18483
	Adj 1	-23.31		31.41		88	136
Patient Name: RTCD 1193_ 4558 26.4.18	Adj 2	-419.20		-271.99		143	
	Adj 3	-28.12		18.37		143	
Draw Date:	Score	0	Negative	2	Positive		

Фигура 16. *Резултати от микросферов кросмач тест (Luminex кросмач) за контрол на лизата (CR), положителна (PC) и отрицателна (NC) контроли*



Class I/II DSA Results
Batch ID: CONTR

Run Date: 04/13/2018 **Lot Number:** 3005280 3005205-LMD
Assignment Cutoff: 2, 2 **Expiration Date:** 03/15/2018
Adj Val Cutoff 0.00, 0.00 **Class I BAFs:** 9.5680 * CON1^0.7910, 12.7410 * CON2^0.8120, 6.8150 * CON3^0.7840
Report By: Lab Supervisor **Class II BAFs:** 9.9210 * CON1^0.7430, 13.9200 * CON2^0.7510, 7.9390 * CON3^0.7230

		I	Assignment	II	Assignment	CONs	Pos Ctrl/Lys Ctrl
Sample ID: CR	Raw	13349		12350			208
	Adj 1	13223.09		12238.34		28	18004
Patient Name: CR	Adj 2	13014.24		12063.89		56	
	Adj 3	13152.07		12173.62		73	
Draw Date:	Score	3	LCR	3	LCR		
Sample ID: PC	Raw	12750		16479			20688
	Adj 1	12254.36		16074.54		147	342
Patient Name: PC	Adj 2	11340.17		15397.43		329	
	Adj 3	12161.42		15994.33		295	
Draw Date:	Score	3	Positive	3	Positive		
Sample ID: NC	Raw	183		139			18476
	Adj 1	-117.24		-121.57		78	311
Patient Name: NC	Adj 2	-451.17		-385.60		123	
	Adj 3	-445.11		-383.61		321	
Draw Date:	Score	0	Negative	0	Negative		

Фигура 17. *Резултати на пациенти от микросферов кросмач тест (Luminex кросмач)*

За оценка на специфичността и чувствителността на кита извършихме Luminex кросмач тест със серуми на положителни за алоантитела реципиенти с определени HLA клас I или клас II антителни специфичности чрез микросферови методи с единични антигени (табл. 39).

Таблица 39. *Съпоставяне на резултатите от Luminex DSA кросмач с алоантителния профил на реципиента (Несъответстващите донорни антигени и DSA са в удебелен шрифт)*

HLA на донора (D)	**Антителен статус на реципиента (R)**	**Luminex DSA кросмач**	
		HLA клас I	**HLA клас II**
D1: HLA-A*03,*24; B*39,*40; DRB1*04,*11; DQB*03.	**R1**: Отрицателен за HLA-клас I и II	(-) отрицателен Score 1	(+) положителен Score 2 (фалшиво-положителен?)
D2: HLA-A***02**,***30**; B*13,***44**, DRB1*07,*16; DQB*02,*05.	**R2**: HLA – клас I (+) положителен A1,**2**,3,11,24,26,29,**30**,31,33,34,36,43,66,68,80; B**44**,45,57,58,76,82; R2: HLA-клас II (-) отрицателен	(+) положителен Score 3	(+) положителен Score 2 (фалшиво-положителен?)
D3: HLA-A*02,*30; B*13,*44, DRB1*07,***16**; DQB*02,***05**.	**R3**: HLA-клас I (-) отрицателен **R3**: HLA-клас II (+) положителен HLA-DR1,3,**7**,8,9,10,12,13,14,15,**16**; 51; DQ**5**,6, DQA, DP	(-) отрицателен Score 1	(+) положителен Score 2 (MFI = 1360)
D4: HLA-A*24,*32; B*18,*35, DRB1***11**,***16**; DQB***03**,*05.	**R4**: HLA-клас I (-) отрицателен **R4**: HLA-клас II (+) положителен HLA-DR103,3,4,7,8,9,**11,**12,13,14,15,**16**; DR52,53; DQ2,6,**8(3),9(3)**; DQA,DPB	(-) отрицателен Score 1	(+) положителен Score 3 (MFI = 5160)

При наличие на антитела срещу HLA клас I или II несъвместимите антигени на донора Luminex кросмачът е положителен (score = 2-3), като

реакциите са по-силни при наличие на DSA срещу повече от един несъвместим антиген, предимно от клас I, вкл. и такива от кръстосано реагиращи групи (CREG) – донор/реципиентните двойки D2/R2 (клас I); D3/R3 и D4/R4 (клас II). Получихме слабоположителни резултати (score = 2) за HLA клас II донор-специфична реактивност при серум с липсващи HLA клас II антитела (D1/R1; D2/R2) (табл. 39).

Клиничното приложение беше оценено чрез сравняване на резултатите от LumXm и FCXM, проведени на 44 двойки донор/реципиент, разпределени в четири групи според резултата от FCXM (табл. 40).

***Таблица 40**. Разпределение на пациентите по групи*

Група	**FCXM**		**DSA**		**Автокросмач**	
	Т-клетъчен	В-клетъчен	Клас I	Клас II	Т-клетъчен	В-клетъчен
1	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.		
2a	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.	(+) пол.		
2b	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.	(-) отр.	(-) отр.	(+) пол.
3	(+) пол.	(-) отр.	(+) пол.	(-) отр.		
4	(+) пол.	(+) пол.	(+) пол.	(+) пол.		

В таблица 41 представяме и обсъждаме някои от резултатите от това изследване. При пациенти 14, 15, 16, 17 резултатите от двата кросмач теста са съпоставими – положителен В-клетъчен FCXM, съответстващ на положителен Luminex HLA клас II DSA (пациент 15/група 2a); отрицателен Luminex HLA клас II DSA (пациенти 14, 16/група 2b) при положителен В-клетъчен FCXM, но липса на антидонорна реактивност и положителен автокросмач; отрицателен Luminex HLA клас II DSA (пациент 17/група 1) при липса на детектабилни анти-HLA антитела и на данни за сенсибилизации. При пациент 12 от група 2b, с неочаквано Т(-)/В(+) FCXM, но негативен за алоантитела при рутинните скрининги и с Т(-)/В(+) автокросмач, изненадващо за нас микросферовият кросмач по-

каза слаба HLA клас II реактивност (аналогична на позитивен Luminex B-клетъчен кросмач, според инструкциите на производителя).

Таблица 41. *Съпоставяне на резултатите от Luminex DSA кросмач и FCXM при реципиенти с неочаквани резултати от актуалния в сравнение с виртуалния FCXM*

Пациент №	**Luminex DSA кросмач**		**FCXM**		**Антитела/други данни**
	HLA клас I	**HLA клас II**	**T-клетъчен**	**B-клетъчен**	
Пациент 17 (група 1)	Отрица-телен	Отрица-телен	Отрица-телен	Отрица-телен	Отрицателна за ало-антитела, без данни за сенсибилизации
Пациент 15 (група 2a)	Отрица-телен	Положи-телен	Отрица-телен	Положи-телен	DSA (HLA-DR4,16)
Пациент 14 (група 2b)	Отрица-телен	Отрица-телен	Отрица-телен	Положи-телен	DSA отрицателен, АвтоXM T(-)/B(+)
Пациент 16 (група 2b)	Отрица-телен	Отрица-телен	Отрица-телен	Положи-телен	DSA отрицателен; АвтоXM T(-)/B(+); възпалителен процес
Пациент 10 (група 2b)	Отрица-телен	Положи-телен	Отрица-телен	Положи-телен	Без данни за сенсибилизации, Авто-XM T(-)/B(-)
Пациент 12 (група 2b)	Отрица-телен	Положи-телен	Отрицате-лен	Положи-телен	DSA отрицателен, Luminex DSA, АвтоXM T(-)/B(+)
Пациент 1 (група 3)	Отрица-телен	Положи-телен	Положи-телен	Отрицате-лен	Алел-специфични DSA (HLA-B35)
Пациент 3 (група 3)	Отрица-телен	Положи-телен	Положи-телен	Отрицате-лен	Нискотитърни DSA (HLA-B56)
Пациент 4 (група 3)	Отрица-телен	Отрица-телен	Положи-телен	Отрицате-лен	Нискотитърни DSA (HLA-A2)

В опит да обясним тези нелогични резултати, извършихме Luminex автокросмач при този пациент с T(-)/B(+) FCXM. Luminex DSA

тестът показа анти-HLA клас II автореактивност. При пациенти 1 и 3 (група 3) резултатите от микросферовия кросмач вместо очаквано HLA клас I положителни, съответстващо на DSA профила от микросферови тестовете, бяха отрицателни. Неочаквано и необяснимо в контекста на алоантителните специфичности на реципиенти 1 и 3 и FCXM резултатите, Luminex кросмачът показа слабоположителни резултати за HLA клас II DSA (съответстващи на позитивен B-клетъчен кросмач, по инструкции от производителя). При пациент 4 (група 3) положителният T-клетъчен FCXM, обяснен от нас с наличието на нискотитърни DSA, не беше потвърден от Luminex теста.

Въз основа на нашия анализ установихме, че при всички случаи на положителен виртуален T-клетъчен кросмач са открити HLA клас I DSA, т.е. положителната предиктивна стойност (PPV) е 100%, докато отрицателната предиктивна стойност (PNV) е 93,54%. Предиктивните стойности за B-клетъчния кросмач са по-ниски – PNV = 88,68%, PPV = 71,05%.

6. ОБСЪЖДАНЕ

В служебния регистър на ИАМН към декември 2023 г. има 787 реципиенти, чакащи бъбречна трансплантация. В световен мащаб се използват две основни стратегии за оценка на имунологичния риск преди бъбречна трансплантация:

1. Оценка на несъвместимост по HLA между донор и реципиент, което позволява в известна степен да се предскаже дали реципиентът ще синтезира de novo DSA в следтрансплантационния период;
2. Откриване и идентифициране на преформирани DSA в реципиента, които могат да доведат до тежка AMR и впоследствие – до загуба на присадка.

В контекста на посоченото като първа стъпка в настоящото проучване направихме детайлен анализ на демографските, клиничните и имунологичните характеристики на пациентите, включени в регистъра на чакащите за БТ (n = 600).

6.1. Демографски характеристики

Средната възраст на пациентите в нашия регистър е 48,66 ± 10,86 години (от 20 до 72 години). Възрастовият профил на пациентите в различните регистри варира. Данните на Евротрансплант за 2023 г. показват, че в регистъра на чакащите БТ преобладават пациенти между 16- и 56-годишна възраст (https://www.eurotransplant.org/statistics/ statistics-library/), докато във Великобритания повечето регистрирани са между 50 до 64 години [205]. Няколко проучвания върху възрастовия диапазон в регистрите на различни страни показват сходни на нашите резултати – за Унгария се съобщава средна възраст от 47 години [258], за Полша – 50,62 ± 20,64, от които 35% под 50 години [259] и за Турция – 53 ± 13 г.

[260]. Възрастта и времето на диализа увеличават риска от натрупване на сенсибилизиращи фактори, а оттам – за образуване на алоантитела.

По отношение на разпределението по пол, мъжете преобладават в регистрите на чакащите БТ [258, 259, 260, 261, 262], каквито са и нашите данни. Освен това делът на мъжете в българския регистър е 59,8%, съответстващо на данните за Евротрансплант, където 61% от пациентите са мъже, и на ERA-EDTA (European Renal Association –European Dialysis and Transplant Association) регистъра (40% жени) [261]. Обсъждат се различни причини за по-малкия дял на жените в регистрите на чакащи БТ – от социално-икономически до биологични фактори. Melk et al. [261, 263] подчертават, че социално-икономическите фактори (здравно осигуряване, семейно положение, финанси, образование и др.) са водещи за САЩ, но не и за европейски страни като напр. Франция и Шотландия, в които има универсално здравно осигуряване, но са докладвани подобни различия между двата пола при чакащите БТ [264, 265]. От биологичните фактори се обсъждат по-бавната прогресия на ХБН, по-малка честота на ТБН и по-малък риск от започване на диализа при жените в сравнение с мъжете с хронично бъбречно заболяване [261, 266].

6.2. Клинични характеристики

Що се касае до рисковите фактори за ТБН, като водещи причини се съобщават диабетна нефропатия, хипертония и гломерулонефрит. Анализ на пациентите от листата на чакащите БТ на Медицински факултет на Университета в Анкара, Турция, определя хипертонията (28,4%), диабетната нефропатия (21,2%) и гломерулонефритът (15,3%) за най-честите причини за ТБН, а при 12% причината е неизвестна [260]. Проучване върху 300 пациенти в списъка на чакащите БТ в Полша посочва като причина за ТБН хипертония и хроничен гломерулонефрит при 29% и диабетна нефропатия при 25% [259]. Авторите подчертават, че диабетната нефропатия като рисков фактор за ТБН в САЩ е с почти два пъти

по-голяма честота (43,2%) [267] в сравнение с Полша. Трябва да се има предвид, че освен основна причина за ТБН, диабетът носи риск от други усложнения, включително сърдечно-съдови [268]. Интересно е да отбележим, че за разлика от посочените данни, диабетът като причина за бъбречно заболяването се наблюдава доста по-рядко в нашето проучване. При нас делът на пациентите с хроничен гломерулонефрит (27,2%) е съпоставим с този за Полша [259] и малко по-висок от данните за Европа (приблизително 20%). Тези разлики в причините, довели до ТБН, може да се дължат на факта, че при нас процесът на диагностициране се забавя, което е и основната причина за високия процент недиагностицирани причини за ТБН (25,5%).

Нашето проучване демонстрира също така и че хипертонията, диабетът и сърдечно-съдовите заболявания са най-честите съпътстващи заболявания при пациентите в листата на чакащите БТ, което съответства на данните от други анализи [260]. Трябва да отбележим, че пациентите с тумори в българския регистър на чакащите БТ са много малко – 2,4% (14/586). В достъпната ни литература данните за неоплазии сред чакащите бъбречна трансплантация са оскъдни. Нашите резултати корелират с проучване в Италия върху 1184 пациенти, изключени от листата на чакащите по клинични причини, при които се установява 2,2% обща честота на рак [269]. Две по-скорошни проучвания в Полша съобщават за единични случаи на пациенти с история за неоплазии сред чакащите БТ в сравнение с болните на диализа, но анализът им е върху много малък брой пациенти от регистъра [270, 271]. Тази относително ниска честота може да се свърже с критериите за включване в регистрите, касаещи изключване на основни патологии, като неопластични заболявания. Уместно е да се отбележи, че честотата на злокачествени заболявания постепенно се увеличава в общата популация, което се наблюдава и при кандидатите за бъбречна трансплантация [272].

Средното време на чакане за пациентите е приблизително 8 години (91,6 месеца). В Турция то е около 5 години, в Канада – 2,1 години, в САЩ по-малко от 2 години [204]. Установеното за нашите пациенти по-дълго време на изчакване е свързано и с по-малкия брой трупни донори в България, както и с високия процент сенсибилизирани реципиенти (средно 32,5%). Анализ на времето за изчакване за трансплантация в Обединеното кралство показа, че то се увеличава с нарастване на нивата на сенсибилизация. За несенсибилизирани пациенти, регистрирани между юли 1998 г. и декември 2005 г., средното време на изчакване за трансплантация е 788 ± 26 дни, нараства на 1696 ± 213 дни за пациенти с ПРА от 61% до 84%, а за силно сенсибилизирани пациенти е най-продължително – 2232 ± 773 дни [273]. Sapir-Pichhadze et al. [206] провеждат проучване върху 161 308 пациенти, чакащи за БТ, резултатите от което предполагат, че ПРА са независим предиктор и на смъртност при кандидатите за БТ в списъка на чакащите. Използваните от тях рискови модели за анализ показват, че тази връзка е независима от времето на диализата или тежестта на коморбидното заболяване. Авторите обсъждат предполагаеми механизми, чрез които анти-HLA антителата създават нарастващ риск от смъртност при сенсибилизирани пациенти [206].

Генерираните от настоящото проучване данни за демографския и клиничния профил на чакащите за БТ у нас може да се използват при разработване на здравни политики, касаещи най-уязвимите и рискови пациенти в регистъра. Това ще допринесе до намаляване на заболяемостта и смъртността на пациентите в регистъра, и ще подпомогне медицинските специалисти в областта на бъбречната трансплантация.

6.3. Имунологични характеристики

6.3.1. Алоимунен статус, сенсибилизиращи събития

Като следваща стъпка анализирахме и характеризирахме имунния профил на чакащите бъбречна трансплантация пациенти чрез определя-

не на ***алоимунния им статус***. Известно е, че наличните анти-HLA антитела преди трансплантация са независим предиктор за загуба на присадката и може да повлияят изхода от трансплантацията, като това зависи и от силата им. Ето защо алореактивният статус на реципиента е основен показател за определяне на имунологичния риск при бъбречна трансплантация. За да оценим алоимунния профил и т.нар. „серологична памет" на пациентите от регистъра, анализирахме изследваните чрез Luminex технологията HLA антитела в серумите им. Нашият анализ от периодичните скринингови показа, че най-голям е делът на пациентите с антитела срещу HLA клас I антигените (средно 38,2%), следвани от тези към клас II (26,35%), а най-малко са пациентите с антитела срещу двата класа (18,4%). Данните за разпределението на алоантителата според HLA класовете варират при реципиентите в различните листи на чакащите БТ и зависят от анализираните извадки и методи за изследване. Например, на базата на микросферови флоуцитометрични (FlowPRA) тестове Can и сътр. [274] установяват при един от рутинните скринингови, че 31% и 35% от изследваните 140 реципиенти са положителни съответно за клас I и II антитела, а 19% имат антитела срещу двата класа антигени. Допълнително, над 50% от пациентите в анализираната от тези автори извадка са перманентно отрицателни за хуморална алореактивност, докато 22% от пациентите са перманентно положителни за HLA клас I и 15% за клас II антитела. Нашите резултати от рутинните скринингови показват, че около 60,0% от изследваните в рутинните скринингови пациенти остават отрицателни за HLA антитела. като делът на перманентно положителните е средно 13,2% за клас I и 9,5% за клас II антитела. Наблюдаваните различия между нашите данни и тези на посочените автори може да се дължат на различни извадки, брой скринингови и микросферови технологии за детекция на алоантитела (FlowPRA vs. Luminex). Други изследователи в ретроспективно проучване на 163 пациенти от листата им

на чакащи БТ откриват чрез Luminex технологията наличие на HLA антитела в 36,20% от изследваните, но разпределението им по класове не е анализирано [275].

Логична следваща стъпка бе оценка на алоантителния статус в зависимост от данните за ***сенсибилизиращи събития***. При този анализ са взети в съображение както класическите сенсибилизиращи събития (преливане на кръвни продукти, бременности/аборти, предходни трансплантации), така и други фактори, които могат да повлияят/допринесат за алосенсибилизация. От класическите сенсибилизиращи събития, свързани с положителни ПРА, установихме, че най-силен имунизиращ фактор е предходна трансплантация като самостоятелно събитие или в комбинация с други, следвана от бременност и кръвопреливане. Сходни са резултатите и от други проучвания [203, 276], посочващи предходна трансплантация за най-честата причина за алосенсибилизация, последвана от бременност и кръвопреливане. Нараства броят на пациентите, които се връщат на диализа след загуба на присадката. Съществуват доказателства, че повторната трансплантация намалява смъртността с до 45% [247]. Пациентите, които се връщат на диализа след неуспешна БТ, често развиват антитела, което намалява шанса им за провеждане на втора трансплантация, която обикновено е от трупен донор. Включените в проучването ни пациенти, върнати на диализа след загуба на присадката, не са провели нефректомия на алографта. По литературни данни извършването ѝ води до алосенсибилизация и образуване на донор-специфични антитела, чието клинично значение може да бъде подценено или надценено поради променливото им персистиране във времето [247]. Проучване на Lucisano et al. [247] доказва, че трансплантационната нефректомия, независимо кога е извършена, води до дългосрочно образуване на донор-специфични и недонорни антитела, които нарастват във времето, в сравнение с пациенти, които не са подложени на нефрек-

томия на трансплантата. Според друго проучване на същия автор [221] поддържането с ниска доза такролимус предотвратява развитието на алосенсибилизация и може потенциално да увеличи шансовете за повторна трансплантация с HLA съвместим бъбрек.

Относно класическите сенсибилизиращи събития при разглеждане на показателя ***бременност*** делът на жените със забременявания е по-голям сред положителните за алоантитела пациенти, като за клас I антителата разликата е значима при CDC скрининга. Макар и недостигащ статистическа сигнификантност, броят на забременявалите жени, положителни за антитела срещу HLA-A (69 vs. 18), -B (75 vs. 22) и -C (38 vs. 11) локусните антигени, е по-голям от този на незабременявалите, но трябва да се има предвид, че специфицирането е извършено с микросферови SAB тестове. По отношение на реактивността срещу HLA клас II специфичности, разликата между забременявали и незабременявали пациентки е статистически значима за антитела срещу DRB1 (p = 0,007) и DQA1 (p = 0,004) и несигнификантна, но с по-голям брой при жени с бременности (48 vs. 11) за DQB1. По време на бременността жената е изложена на сенсибилизация с HLA антигените на нейния партньор, водещо до продуциране на антитела при 15-30% от бременните срещу унаследените от фетуса несъвместими HLA бащини антигени [277, 278, 279]. Често срещана находка е значителното намаляване [280, 281] на тези антитела след раждането, като едно проучване предполага дори пълното им изчистване скоро след раждането [282]. Други автори предоставят доказателства, че ниско ниво на алореактивност може да продължи десетилетия след бременността [283, 284]. В подкрепа на тези съобщения и на предишни наши данни [285] са и резултатите от настоящото проучване за персистирането на алоантитела при забременявали жени от регистъра, без анамнеза за други сенсибилизиращи събития. В този контекст трябва да се подчертае, че сенсибилизацията в резултат на бре-

менност може да бъде проблем, когато жената е в листата на чакащите БТ [286], и това е една от основните причини за персистиращи HLA антитела в серумите на алоимунизираните потенциални реципиентки. По време на бременност жената може да е развила алоимунен отговор срещу HLA на бащата, който не се открива при регулярния алоантителен скрининг. Това потенциално прави партньора и/или техните деца неподходящи донори за майката поради риска от отхвърляне или кратък живот на присадката. От друга страна, по време на нормална бременност възниква двупосочна регулация по такъв начин, че имунната система на майката толерира наследените бащини антигени (IPA), експресирани от плода, а развиващата се фетална имунна система толерира неунаследените майчини антигени (NIMA) [287, 288]. Алотолерансът в резултат на бременност в последните години се обсъжда като опция, която да се има предвид при избора на донор при трансплантация на хемопоетични стволови клетки.

Нашите резултати показват, че ***кръвопреливането*** е най-честото сенсибилизиращо събитие, но самостоятелно не винаги индуцира синтез на алоантитела. Този сенсибилизиращ фактор се установява над 2,5 пъти по-често при антитяло-негативните в сравнение с антитяло-позитивните пациенти с хемотрансфузия. Известни различия се наблюдават в индуцирането на антителен отговор срещу различните HLA локуси. Най-голям е процентът на индуцираните от кръвопреливане антитела срещу B-локусни (42,1%) и A-локусни (38,6%) антигени, около 25,0% срещу HLA-C, DRB1 и DQB1, 19,0% към HLA-DPB1, а най-малък – срещу HLA-DQA1 (10,6%). Според годишен доклад на United States Renal Data System пациенти с хемотрансфузии са с 2,38 пъти по-голяма вероятност за генериране на панел-реактивни антитела > 80%, в сравнение с тези, които никога не са трансфузирани с кръвни продукти [289]. При анализ на резултатите за пациентите от регистъра установихме, че делът на хе-

мотрансфузираните е сигнификантно по-голям в групата на положителните в сравнение с отрицателните за клас I ($p < 0,001$) и клас II ($p = 0,005$) алоантитела, което е в подкрепа на посочените данни. Според Gadde et al. [202] многократното преливане на кръв/кръвни продукти води до по-голям риск от сенсибилизация, докато еднократното кръвопреливане, като самостоятелно сенсибилизиращо събитие, не е статистически значимо ($p = 0,244$). В нашето проучване 37,2% от кръвопреливаните пациенти с положителен алоантителен статус имат анамнеза за еднократна хемотрансфузия, 45,7% са с до 5 и 17,1% с над 5 кръвопреливания, като последните са и по-дълго време на хемодиализа. Наблюдаваната разлика с проучването на Gadde et al. може да бъде резултат от различен брой пациенти само с едно кръвопреливане, но може да се дължи и на прилаганите кръвни продукти (напр. обезлевкоцитен еритроцитен концентрат в малко количество), както и на непълни данни от анамнезата. Важният извод, който може да направим, е, че преливането на кръв или кръвни продукти е практически единственото събитие, предизвикващо сенсибилизация, което може да бъде контролирано и съответно предотвратимо. Следователно важно е да се избягва, освен ако не е абсолютно необходимо.

Относителният дял на мъжете е по-голям при отрицателните за алоантитела в сравнение с положителните ($p < 0.001$). В нашето проучване жените имат по-висока ПРА позитивност, както се вижда и в други проучвания [202], което е очаквано, като се има предвид излагането им на чужди HLA през бременността. От друга страна, бременностите при пациентки в списъка на чакащите могат да настъпят само спорадично, което не обяснява наблюдаваното увеличаване на забременявалите жени с ПРА в хода на рутинните скринінги. Тази разлика по-скоро би могла да се обясни с бустериране от неспецифични стимулиращи събития на имунизации от предходна бременност.

Известно е, че проинфламаторни събития като ваксинации, хирургични интервенции, вирусни инфекции и др. могат да индуцират ресинтез на анти-HLA антитела, които не са били откривани при пациенти с анамнестични данни за алосенсибилизация. Ето защо беше потърсена връзка между некласически имунизиращи събития и съответните алоантителни статуси. Считаме, че това допринася за по-голямата пълнота на разработката, защото не само класическите рискови фактори като известна причина за имунна сенсибилизация срещу HLA антигени, могат да се отразят върху алоимунния профил на пациентите в листата на чакащите БТ.

През последните години интензивно се дискутира ролята на различни инфекции в генерирането на алоимунен отговор, но данните за този ефект са противоречиви. Много от съобщенията за развитието на HLA антитела след вирусни инфекции описват изолирани случаи, но големи контролирани и проспективни проучвания по темата липсват. Връзката между вирусните инфекции и последващия синтез на HLA антитела може да зависи от вида на патогена, независимо дали се касае за активна инфекция, или ваксинация, както и от дефиницията за положителни HLA антитела [290]. D'Orsogna et al. [291] описват различните механизми, чрез които излагането на патогени може да засили имунния отговор към алогенни HLA антигени. По-голямата част от данните за образуването на HLA антитела при вирусна инфекция или при ваксинация са в подкрепа на активиране на паметови В-клетки, с резултат разширяване на спектъра и увеличаване силата на HLA антителата. Вероятно инфекциите и ваксинациите могат да предизвикат анамнестичен В-клетъчен отговор при пресенсибилизирани индивиди, но способността на инфекциите да предизвикват de novo ало-HLA-специфичен антителен синтез все още е дискусионна и изисква допълнителни изследвания.

Добре известно е, че пациентите на хемодиализа са изложени на повишен риск от заразяване с вирусни инфекции, което се дължи основно на нарушения им клетъчен имунитет. Сред този контингент болни най-разпространените вирусни инфекции са хепатит В и хепатит С. Въвеждането на програми за ваксиниране и строгите мерки за контрол на инфекциите успяха да ограничат разпространението на хепатитните инфекции в диализните центрове, но вирусни огнища продължават да възникват периодично и нивата на разпространение остават неприемливо високи. Анализът на 322 бази данни (795 623 случая) показва 7,32% общо разпространение на HBV инфекция сред пациенти на хемодиализа, като за Европа то е 7,07% [292]. В нашата група делът на положителните за HBsAg е по-голям – 11,1% от 600 чакащи БТ и е съпоставим с този за Турция (13,3%) [293].

Разпространението на HCV инфекцията също варира значително сред пациентите на ХД от различни географски региони [294]. В Европа то е по-ниско на север (Англия – 2%, Швеция – 8,8%) и по-високо на юг (Испания – 25% , Италия – 27%, Турция – 30%) [295]. Докладваната анти-HCV серопозитивност при пациенти на ХД за Румъния е 14,43%, докато за Молдова и Босна и Херцеговина е 40% [296]. Някои колективи докладват за сигнификантна асоциация между HCV-позитивен статус и наличието на HLA клас I реактивност [297] или нивото на алоантителата [298, 299]. За разлика от тези автори Özdemir и сътр. [300] не намират ефект на HCV инфекцията върху алосенсибилизацията при пациенти на хемодиализа. Öcal et al. провеждат ретроспективно кохортно проучване на данни от инфектирани с вируса на хепатит С диализиращи се пациенти, които са получили лечение с интерферон преди БТ, правейки преоценка на нивата на ПРА клас I и II с цел прогнозиране на устойчив вирусен отговор [201]. Поддържането на вирусен отговор не корелира с положителността на ПРА клас I, но корелира с ПРА клас II. Изводът, който

Öcal et al. Правят, е, че активирането на клетъчния имунитет може да доведе до изчистване на инфекцията с вируса на хепатит С, но и до синтез на високи нива на ПРА клас II.

В контекста на изложеното оценихме като независими прогностични фактори наличието на HBsAg и anti-HCV антителата при пациенти, очакващи БТ, и алоантителния им отговор. Установихме, че в хода на регулярното изследване на алоантителния статус носителите на хепатит са повече в групата на положителните за HLA клас I и/или клас II алоантитела. Тези данни са основание да предположим, че хепатитните вирусни инфекции може да се свържат с повишена вероятност от алоимунна реактивност/реактивация при пациентите в регистъра на чакащите БТ.

6.3.2. HLA специфичности на алоантителата

От съществено значение за коректна оценка на имунологичния риск при трансплантация е определянето на ***HLA специфичностите на алоантителата***, даващи информация за неприемливите несъвместимости. При проследяване на пациентите, положителни за HLA-A локусни алоантитела, в рамките на една година се установи, че те се срещат средно в 75,6% от положителните проби за клас I. Най-честите антителни специфичности (между 40% и 25%) в низходящ ред са HLA-A24, -A66, -A23 и -A25, -A2 и -A80. Относителният дял на положителните за HLA-B локусни алоантитела при регистрация и в рамките на трите скрининга е средно 81% от положителните проби за клас I. Най-често установяваните антитела (между 40% и 30%) в низходящ ред са срещу HLA-B49, -B57 и -B58, -B13, -B76, -B51, -B52 и -B77, -B53, -B27, -B44, -B63, -B7, -B47 и -B62. От положителните за HLA-C локусни алоантитела виждаме, че те се срещат средно в 51,5% от положителните проби за клас I, като най-честото антитяло е срещу Cw9 (25,2%), следвано от Cw10 (22,7%) и Cw17 (22,4%). Антитела срещу HLA-DR локус се сре-

щат при средно 64,5% от положителните през анализирания период проби за клас II и най-често срещаните (между 32% и 26%) са към HLA-DR4, -DR7, -DR9 и -DR10. Антитела срещу DQB1 локус се срещат средно при 67,4% от положителните проби за клас II, като най-честите (между 30% и 20%) DQ специфичности са DQ2, DQ6 и DQ5. Относителният дял на антитела срещу DQA1 и DPB1 през анализирания период е съответно 31,2% и 42,8%. От тях най-често срещани към DQA1 (между 15% и 20%) са DQA1*05:01, DQA1*03:01 и DQA1*01:01, а към DPB1 (между 15% и 25%) – DPB1*01:01, DPB1*05:01 и DPB1*17:01.

Уместно да се отбележи проучване в Турция, Башкент, което установява, че A2, A68, A23, B49, B37, B7, DR7, DR14, DR11, DQ9, DQ8 и DQ2 са най-често срещаните анти-HLA антитела с MFI>2000 [301]. Видно е, че някои от антителните специфичности са с най-висока честота и в българския регистър (A2, A23, B49, B7, DR7, DQ2). Нашите анализи показват, че най-честите антитела не винаги са с най-силна реактивност (най-голям "score" или MFI). Сред HLA-A локусните антитела най-силна е реактивността не на най-често срещаното алоантитяло HLA-A24, а на HLA-A2, което се установява с по-малка честота. Подобни са данните за HLA-DR антителата – антителата към DR9 показват най-високи стойности на положителни реакции ("score" = 8), а DR4, което е най-честото антитяло е с най-ниски стойности („score" = 4). Докато сред HLA-B и DQ локусните антитела най-разпространените антитела са с най-висок процент силно положителни реакции – съответно HLA-B49 и DQ6, DQ5. Анти-HLA-Cw антителата са с най-ниските "score" стойности, което се приема като маркер за слаба имунна реактивност. Исторически, HLA-C антителата не са смятани за важен фактор за антитяло-медиирано отхвърляне (AMR), но понастоящем ролята им в хуморалната сенсибилизация е призната [302]. Една причина може да се свърже със слабата експресия на тези молекули върху клетъчната повърхност [303]. Независимо

от това, днес е установено, че HLA-C локусни антигени могат да индуцират антителен отговор, подобен на индуцирания от другите, рутинно изследвани локуси [304]. Клиничното значение на анти-HLA-C антителата при бъбречна трансплантация все още е неясно. Има съобщения за положителен флоуцитометричен кросмач в резултат на HLA-C DSA [305], както и за асоциацията им с AMR [306, 307]. Ето защо днес все повече трансплантационни центрове вземат в съображение наличието на преформирани HLA-C антитела за оценка на имунологичния риск и типизиране на донора по HLA-C (https://etrl.org/InformationAM.aspx).

Въпреки че първоначално вниманието беше фокусирано върху антителата срещу HLA-DR, все повече се приема, че HLA-DQ и HLA-DP антителата също са важни [308, 309, 310]. През последните години се появиха публикации за връзката на HLA-DQ несъвместимостта не само с риска за развитие на de novo DSA, но и с риск от отхвърляне на присадката (включително ABMR и Т-клетъчно-медиирано отхвърляне) [210]. Kosmoliaptsis et al. [209] доказват, че повече от 50% от пациенти, трансплантирани с несъвместимост по HLA-DQ, се превръщат в силно сенсибилизирани при връщането им в листата на чакащи БТ. Този феномен не е така силно изразен при други HLA локусни несъвместимости. Според проучване, проведено от Tambur et al. [207] тези антитела са най-често срещу донорните HLA-DQ антигени, водещи до повишена сенсибилизация, измерена чрез ПРА. Част от тези пациенти са клинично подходящи за ретрансплантация, но при някои от тях ПРА са повишени [208], както отчитаме и ние при нашите пациенти.

Според проучване на Seitz et al. [215] освен съществуващите предтрансплантационно антитела срещу DQ, трябва да се отчете и влиянието на HLA-DP DSA, които според авторите са високорискови за хронично антитяло-медиирано отхвърляне. Първичното място на алоразпознаване е донорният ендотел, където експресията на HLA-DR обикновено е по-

висока, но в резултат от възпалителни промени, вероятно индуцирани от интерферон-γ, нараства експресията на HLA-DQ и DP антигени. HLA-DP антигенът, също както и DQ, се състои от хетеродимер от 2 пептидни вериги – DPα и DPβ, кодирани от съответно полиморфни DPA1 и DPB1 гени. Проведените популационни генетични изследвания доказаха силна неравновесна връзка между DPA1 и DPB1 [216]. HLA-DP антителата все още не се прилагат при дефиниране на неприемливи антигени за определяне на съвместимост между донор и реципиент при органна трансплантация, тъй като се считаше, че те не повлияват изхода от трансплантацията. Но в литературата постоянно се увеличават данните за ролята на DP антителата, които могат да доведат до увреждане и ранна загуба на присадката от ABMR, което ги прави директно патогенни. Френско проучване, проведено от Daniëls et al. [218], съобщава за 26 пациенти с DP DSA и повишен риск от положителен FCXM, ABMR и загуба на присадка в сравнение с несенсибилизирани. Този риск е съизмерим с риска при реципиентите с DSA срещу локус HLA-A, HLA-B, HLA-DR и HLA-DQ. В ретроспективно проучване, проведено от Daniëls et al. [219] с 13 сенсибилизирани пациенти с предшестващи DP DSA, 6 от тях са имали ABMR, като трима са загубили присадките. При тези пациенти HLA-DP антителата с MFI под 10 000 са дали отрицателен CDC кросмач, най-вероятно резултат от по-ниските нива на експресия на HLA-DP антигени в сравнение с други HLA антигени. Изолирани HLA-DP DSA са редки, но представляват значителен риск за AMR. Дискусионен остава въпросът дали DP DSA са директно патогенни, или са маркер за повишена имунореактивност.

Въвеждането на твърдофазови анализи за откриване на HLA антитела и на лесно достъпни методи за молекулярно-генетично типизиране доведе до преоценка както на ролята на HLA-DP антителата при бъбреч-

на трансплантация, така и до използването им при определяне на неприемливи антигени [215].

Известно е, че HLA специфичните антитела са насочени към специфичен епитоп върху HLA молекулата, съставени от триплети (еплети). Еплетът играе ключова роля в това как антителата реагират с HLA молекулата. Алоимунната реактивност често е резултат от образуване на антитела, които разпознават не само имунизиращите антигени, но и множество други HLA антигени. Напр. антитяло, насочено срещу донорен HLA-B57 антиген, може да разпознае с голяма вероятност не само B57, но също така и A2, A23, A24, A68, A69, и B58 (които са част от същата кръстосано реагираща група като B57 – CREG2C). Разглеждайки нашите резултати, виждаме, че някои от най-честите алоантителни специфичности споделят общи епитопи – напр. HLA-A2, A23, A24, B57, B58, и са категоризирани в обща кръстосано реагираща група – CREG2C, което може отчасти да обясни по-голямата им честота.

В хода на скринингите наблюдавахме малки разлики в процентите на HLA специфичностите. Една от причините за това може би се дължи на факта, че с течение на времето промените в реактивността на алелите (MFI) може да е резултат от промяна на субкласовете IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), резултат от повишаване на афинитета или развитие на de novo антитела [229]. В свое проучване Cornaby et al. [236] установяват, че за HLA клас I сферите показват свръхреактивност срещу A*29:01, A*29:02 и B*15:12 (B76). Докато клас II сферите, които показват според авторите фалшива реактивност, са срещу DRB3*02:02 (DR52), DPA1*02:01-DPB1*01:01,DPA1*02.02-DPB1*05:01,DQA1*05:05-DQB1*03:01, DRB1*04:01 и DRB1*04:03. Някои от посочените антителни специфичности се установяват във висок процент сред положителните серуми в нашите извадки, но за момента нямаме обективни доказателства, че това е свързано с фалшива реактивност на сферите. Shih et al.

[242] демонстрират, че реактивността на HLA клас II антитяло (DQβ06:03/DQα01:03) може да бъде повлияна от полиморфни пептиди, получени от HLA клас I протеини, свързани към HLA клас II пептид-свързващо място. Тези HLA клас I пептид-специфични епитопи са имуногенни и клинично значими. Преформирани или de novo DSA, насочени към HLA-DQ, а именно DQβ06:03/DQα01:03, са свързани с лоша прогноза при БТ. За отбелязване е, че в нашето проучване антителата към DQ6 и DQA1*01:01 са едни от най-често срещаните DQB1 и DQA1 антителни специфичности.

6.3.3. Динамика на алоимунната реактивност

Алоимунитетът е динамичен процес и като такъв алоимунният профил на отделен пациент може да се промени с времето. HLA антителата може да присъстват при регистрирането в списъка на чакащите или да се открият по време на престоя на пациентите в листата на чакащите в резултат на класически имунизационни събития, но и поради повишаване на преди това неоткриваеми имунизации от неспецифични провъзпалителни събития, като ваксинации и инфекции [311, 312, 313, 314]. Текущият алоимунен статус на реципиента е съществен за оценка на имунологичния риск преди трансплантацията, което изисква да се следят и регистрират промени в него чрез анализ на анти-HLA антителата на регулярни интервали. Има малко проучвания за това как алоимунните отговори се променят с времето при пациенти в списъка на чакащите за трансплантация. Липсата на познания в тази област също беше подчертана в публикация на специалисти от Американското дружество за тъканна съвместимост и имуногенетика (ASHI) и Американското дружество по трансплантация, обединени в работна група „Сенсибилизиране при трансплантация: Оценка на риска“ (STAR) [315]. За да видим дали във времето има динамика в алоантителния статус на пациентите от българския регистър на чакащите бъбречна трансплантация, сравнихме ало-

антителния им профил при регистрация с резултатите от първи, втори и трети скрининг, както и между отделните скринингии. Това, което установяваме, е динамика, която може да бъде резултат от различната диагностична стойност на използваните техники за определяне на алоантитела. При първия скрининг е приложен лимфоцитотоксичен метод, използван проспективно като скринингов тест за откриване на преформирани цитотоксични антитела при пациенти, чакащи трансплантация. За съставянето на клетъчния панел са подбрани донори с възможно най-голямо разнообразие от HLA специфичности, характерни за нашата популация. Антитялото в серума трябва да бъде в достатъчно количество, за да може комплементът да се свърже здраво с Fc рецептора му, да се активира и да лизира клетъчната мембрана. При нискотитърни антитела тази връзка може да не се осъществи и антитялото да бъде пропуснато. Оценяването на процента мъртви клетки показва, че клетката експресира поне един HLA антиген, към който в серума на пациента има антитяло. Процентът ПРА на даден пациент съответства на неговата сенсибилизация. И точно тук идва недостатъкът на теста, защото, ако серумната проба, съдържаща антитяло срещу HLA-A1, се тества върху три различни по състав клетъчни панела, в които в съответния панел клетките на нито един, на половината или на всички донори експресират HLA-A1, отчетените ПРА ще бъдат правилно интерпретирани като 0%, 50% и 100%, съответно, но няма да отразяват реалния алоантителен статус на пациента. Затова клетъчните панели трябва по възможност да се съставят така, че да могат да се дефинират по-точно HLA специфичностите на антителата, което ще даде ценна информация за алоантителния статус на пациента, и от тук прогнозиране шанса му за трансплантация. Не трябва да се забравя и фактът, че всички тестове, базирани на клетки, като източник на антигени, са обект на фалшивоположителни резултати, причинени от автоантитела и не-HLA антитела, както и фалшивоотрицател-

ни резултати, когато антитялото е с много нисък титър, но е клинично значимо. С разработването и внедряването в рутинната практика на твърдофазовите тестове, при които чувствителността и специфичността са значително подобрени, стана възможно по-точно и обективно определяне на алоимунния статус на пациента. В последните години анализът на алоантителата с микросферови флуориметрични (Luminex) методи с единични антигени (SAB) се използва успешно за определяне на неприемливи за реципиента несъвместими антигени на потенциален донор. Предмет на дискусия остава клиничното значение на MFI в SAB анализите. Въпреки че няма консенсус относно клинично значимо MFI, повечето лаборатории считат MFI ≤ 1000 за приемлива cut-off стойност за оценка риска преди трансплантация. Проучване, проведено от Schinstock et al. [234], счита MFI ≤ 2000 като отрицателен за техния център за БТ. Също така отбелязват, че най-много центрове за БТ използват MFI под 1000 за отрицателен при пациенти, които не са имали сенсибилизиращи събития. В друго проучване Gombos et al. [235] определят клинично значима стойност на MFI ≤ 3000 за клас I и ≤ 5000 за клас II DSAs. STAR работната група счита, че MFI между 1000 и 1500 може да се приеме като оптимална cut-off стойност за определяне на DSA и я препоръчва за унифициране на резултатите между различните центрове [315]. За нашия трансплантационен център е приет MFI ≤ 1500 за несенсибилизирани и ≤ 1000 за сенсибилизирани. Прагът на MFI, използван за определяне на несъвместими антигени, може да бъде по-висок, за да се увеличи достъпът до органи, особено за кандидатите за сърце и бял дроб, поради липсата на възможности за живи донори и факта, че трансплантациите на сърце и бял дроб са животоспасяващи.

Но с новите технологии се появиха нови проблеми, свързани с прикачените върху микросферите HLA антигени. В резултат от процесите на денатуриране [233], епитопи върху HLA молекулата (“cryptic”,

скрити епитопи) могат да станат достъпни и да се свържат със серума на пациента (фалшиво положителни реакции). При настъпилите конформационнни промени при изолиране на HLA протеините, някои антигенни епитопи могат да бъдат загубени (фалшивоотрицателни реакции). Предварителната киселинна обработка на пробите с iBaed разрешава проблеми, свързани с определянето на HLA клас I антитела срещу денатурирани антигени [230]. Друго ограничение на SAB анализа е „прозона“ ефект. В повечето случаи е резултат от наличието на висока концентрация на антитялото (излишък), но може да бъде резултат от наличието на блокиращи антитела или неспецифични инхибитори, които присъстват в серума и пречат за откриване на специфично антитяло [207]. Има множество обяснения за ефекта на прозона, включително насищане на микросферите, пространствена пречка от комплементния комплекс и наличието на IgM HLA-специфични антитела. Интерференцията на комплемента включва ковалентното му свързване и натрупване на C4 и C3 върху имунния комплекс, предотвратявайки по този начин свързването на детекционното анти-IgG антитяло с IgG алоантитялото. Един от възможните начини за отстраняването на проблема е използването на EDTA, която инхибира формирането на комплекса C1qrs и по този начин предотвратява активирането на комплемента [224]. Третирането на пробите с дитиотреитол води до разрушаване на пентамерната структурата на IgM и дисулфидните връзки в молекулите на комплемента, като по този начин намалява прозоновия ефект. Според някои автори предварителната обработка на серума с EDTA е най-ефикасният метод за елиминиране на прозоновия ефект [223], но това не винаги елиминира пълното въздействие на инхибирането, особено когато титрите на антителата са високи [225].

„Споделени епитопи“ е друго ограничение в SAB тестването, което може да доведе до неправилно определени ниски стойности на MFI.

Когато редица антигени споделят един и същ епитоп, антитялото се разпределя в епитоп-позитивните антигенни сфери, което води до намалени флуоресцентни сигнали, докато антителата, насочени към уникален, специфичен епитоп, генерират специфичен флуоресцентен сигнал [232]. Напълно възможно е при „споделени епитопи" да има DSA с MFI < 1000. Ето защо STAR групата акцентира върху необходимостта от познаването на споделените епитопи за правилната интерпретация на SAB анализите [315].

Най-честото приложение на Luminex анализите е идентифицирането на неприемливи HLA антигени, които трябва да се избягват при БТ, но това не означава непременно, че всички други HLA антигени биха били съвместими за пациента. Основните предимства на Luminex метода са висока специфичност и чувствителност, полуколичествено определяне (MFI), възможност за мултиплексен анализ и автоматизация. HLA формулата на пациента трябва да се има предвид при определяне на граничната стойност на MFI при наличие на висок фон. HLA типът на донора се използва за определяне на донор-специфични антитела. При силно сенсибилизираните пациенти е необходимо типизиране с висока разграничителна способност на реципиент и донор за точно дефиниране алелните специфичности на някои антитела. Мониторинг на алоимунния статус чрез използване на съвременните SAB технологии в комбинация с разширено HLA типизиране значително подобряват способността ни да предсказваме имунологичния риск, свързан с бъбречна трансплантация за индивидуална двойка донор-реципиент [316, 317, 318].

6.3.4. Вероятност за несъвместими донори

Процентът на панел-реактивни антитела, т.е. процентът HLA антигени, реагиращи със серума на пациента, представлява т. нар. „трансплантационен индекс" на пациента. Висок %PRA (> 80%) предполага, че кросмач реакцията на реципиента ще бъде положителна с 4 от 5 донора.

Така, колкото по-висока е стойността на PRA, толкова по-голяма е вероятността от положителен кросмач със случайни донори и толкова по-малка е вероятността да се осъществи трансплантация. Поради това че процентът ПРА зависи от състава на панела от HLA специфичности, срещу които се тестват серумите, той не винаги отразява честотата на даден антиген в донорната популация. За преодоляване на този проблем са въведени т.нар. калкулирани PRA (cPRA). Този подход е разработен и внедрен в САЩ [319], а по-късно приет и от други центрове, като UNOS, UK, Eurotransplant. Изчисляването на cPRA се базира на калкулиране на реакционната честота на неприемливите несъвместимости за даден пациент спрямо панел от много голям брой трупни донори за съответната страна или трансплантационен център. Така cPRA предоставят цифрово измерение на шанса за даден пациент да се намери съвместим трупен донор. Изчисляването на cPRA значително се улесни с въвеждане в рутинната практика на микросферовите методи и особено на тестовете с единични антигени. Ето защо в настоящото проучване ние направихме опит да оценим ***вероятностите за несъвместими донори*** по определени HLA антигени, като съпоставихме разпределението на HLA специфичностите в контролна група от здрави индивиди [320, 321] и група от трупни донори с тези на алоантителата при пациентите. Резултатите показаха, че шансовете за наличие на повечето HLA специфичности в контролната и донорската група са по-ниски, но за някои са увеличени в сравнение с антителните им аналози в групата на пациентите. Прави впечатление, че изчислените вероятности за несъвместим донор за пациентите при някои антителни специфичности са различни за контролната и донорската група поради различната честота на HLA антигените в двете групи. Например пациенти с антитела срещу HLA-A2 са с най-голяма вероятност (99%) да имат несъвместим по този антиген донор от контролната група, докато за донорската група вероятността е 42,6%. Освен

това пациенти с антитела, които се откриват с еднаква вероятност при пациентите (напр. срещу HLA-B51 и B52), имат различен шанс за несъвместим донор (78,7% за B51 и десетократно по-малък – 7,5%, за B52) от донорската група. Данните за здравите индивиди показват почти същия шанс за HLA-B52 (6,4%), но по-малка вероятност за HLA-B51 (32,7%) в сравнение с донорите, докато вероятността за донори, несъвместими по HLA-B57, за пациенти с антитела към тази специфичност е еднаква (5,5%) за донорската и контролната група. Според Tambur et al., ако се вземат в съображение и антигените, споделящи общи епитопи с HLA-B57, cPRA UNOS, калкулаторът ще генерира до 75% несъвместими по HLA-B57 потенциални донори, при два пъти по-висока честота (7%) на антигена в донорската им популация в сравнение с нашата (3,5%) [207]. Трябва да се отбележи, че cPRA се влияят от наличието на антитяло и характеристиките на HLA в групата донори. Антителата срещу HLA антигени с високо разпространение имат много по-голямо влияние върху cPRA. Например наличието на ниско ниво на антитяло само срещу A2 ще определи за този индивид cPRA от 48%, докато пациентът може да има много високо количество антитяло срещу B39 и да има cPRA само 5% [322]. Нашите данни за вероятностите за несъвместим донор са в унисон с констатациите на споменатите автори за cPRA.

Резултатите от настоящото проучване могат да намерят приложение в рутинната практика и да послужат като първа стъпка за въвеждане на cPRA и за нашите пациенти. Такъв подход е особено важен при силно сенсибилизираните реципиенти и ще повиши възможностите им за трансплантация.

Уместно е да отбележим, че шансът силно сенсибилизираните пациенти да бъдат трансплантирани може да се увеличи и чрез добавяне на приемливи антигени (т.е. антигени, срещу които индивидът никога не е имал синтезирани антитела) към неговия HLA фенотип, като по този на-

чин се създава „разширен“ HLA фенотип, въз основа на което да се проведе търсене на съвместим донор [255].

6.4. Кросмач реакция

6.4.1. FCXM

Още през 1969 г., Patel и Terasaki доказват, че свръхострата реакция на отхвърляне на алоприсадката може да бъде причинена от наличието на преформирани DSA и оттогава претрансплантационният кросмач става задължително изискване при бъбречна трансплантация, а положителен цитотоксичен кросмач абсолютно противопоказание за трансплантация. Днес свръхострото отхвърляне е рядко настъпващо състояние след въвеждането на предтрансплантационен FCXM, който позволява откриване на ниско титърни и на нефиксиращи комплемента DSA. Най-важният технологичен напредък, позволяващ актуалният кросмач да бъде потенциално заменен с виртуален кросмач, е разработването на високоспецифични и сензитивни микросферови тестове за детекция и специфициране на HLA антитела. Така на базата на алоантителния профил на пациента спрямо несъвместимите HLA антигени на донора днес много трансплантационни центрове извършват виртуален кросмач (V-XM) за бърза оценка на имунологичната съвместимост с цел ускоряване и опростяване на претрансплантационния подбор.

Нашите анализите показаха, че при 97,42% от пациентите с отрицателен алоантителен статус или наличие на не-DSA резултатите от кросмача са отрицателни. При 79,3% от пациентите с преформирани антитела срещу несъвместимите донорни HLA клас I антигени очакваният T(+)/B(+) кросмач се потвърждава с резултатите от актуалния кросмач. В останалите случаи с наличие на DSA се установява при 6,89% T(+)/B(-) и при 10,3% T(-)/B(+) кросмач. Тези резултати са логични, като се има предвид, че HLA клас I експресията е по-силна върху B-клетките в сравнение с T- клетките при живи донори, но при трупни донори варира и

зависи от източника на клетки (периферна кръв, слезка или лимфен възел) [323, 324]. На практика, ако сумираме тези данни, ще получим 96,49% съпадения от предполагаемия с реалния кросмач. При наличие само на HLA клас II антидонорни антитела, реактивността както се очакваше е само срещу В-клетките – Т(-)/В(+) кросмач. В настоящото проучване 2,58% от кросмач реакциите показаха положителни резултати, несъответстващи на алоантителния профил, въз основа на който V-XM би следвало да се оцени като отрицателен. Оформиха се три комбинации от актуална кросмач реактивност: положителен Т- и В-клетъчен; отрицателен Т- и положителен В-клетъчен; положителен Т- и отрицателен В-клетъчен кросмач. За изясняване на тези находки извършихме допълнителни изследвания и анализи, включващи типизиране по HLA-C, DP, DQA локуси, типизиране на алелно ниво и допълнително тестване на серумите за антитела към тези локуси и/или алели.

В групата с неочакван Т(+)/В(+) кросмач интерес представлява един от пациентите с нула несъвместимост по HLA-A, B, DR, DQ алелните групи. Причината за тази реактивност може да се свърже с наличие на алоантитела срещу алелни несъвместимости. Макар че положителен кросмач в резултат на алел-специфични антидонорни антитела се наблюдава по-рядко [325], тези алоантитела могат да бъдат клинично значими [326]. При нашия пациент чрез NGS типизиране се установи несъвместимост по HLA-B35 алелите, но алел-специфични антитела не можаха да се докажат, вероятно поради липса на несъвместимия алел в SAB теста. Допълнителните изследвания показаха наличие на донор-специфични антитела срещу HLA-DP локуса (HLA-DP*05). Положителен В-клетъчен кросмач поради HLA-DP DSA съобщават и други автори [327, 328] при липса на несъвместимост по останалите изследвани локуси [329]. HLA-DP типизирането не се извършва рутинно при бъбречна трансплантация поради ниската експресия на тези протеини върху бъб-

речния ендотел и слабата им имуногенност [330]. Преоценката на значението на тези антитела в последните години показа, че HLA-DP DSA при положителен B-клетъчен FCXM са също толкова релевантни за антитяло-медиирано отхвърляне, като тези срещу HLA-A, B, DR или DQ [331] и трябва да се вземат в съображение при оценка на съвместимостта. Ето защо при наличие на HLA-DP антитела резултатът от кросмача не може да се предвиди, ако донорът не е типизиран по този локус. При друг пациент от тази група с отрицателен алоантителен статус до момента на кросмач изследването, впоследствие в актуалния серум бяха доказани DSA с много нисък MFI = 624 към несъвместимия HLA-B18 антиген. Липсата на детектабилни алоантитела преди извършване на кросмач реакцията, независимо от многократните хемотрансфузии при този пациент, би могла да се дължи на реално липсващи такива, но не могат да се изключат и фалшиво негативни резултати. Съгласно политиката ни отрицателни серуми на реципиенти от регистъра на чакащите БТ не се съхраняват дългосрочно. Поради това не беше възможно да се направят допълнителни изследвания за прозонен ефект, интерфериране на комплемента и др. за изясняване на причината за посочените резултати.

Втората група реципиенти се характеризира с неочаквано T(-)/B(+) проспективен кросмач. Обикновено такива необичайни резултати могат да се наблюдават при автоимунни болести поради свързване на автоантитела или имунни комплекси към Fc рецепторите, които се експресират по-силно върху B-клетките [332]. Поради факта че положителен кросмач в резултат на автоантитела не е противопоказание за трансплантация, с извършването на автокросмач в тези случаи може да се установи или отхвърли автореактивност. Автокросмач тестът позволи да се отхвърли алореактивност и една от пациентките в тази група да бъде успешно трансплантирана. В групата с положителен автокросмач трябва да се отбележи пациент с прекарана вирусна инфекция (грип) около месец преди

изследването, което може да бъде причина за положителния В-клетъчен кросмач и автокросмач. Доказано е, че адювантна ваксина срещу грип H1N1 е свързана с развитието на алоантитела [250, 251]. При трима от пациентите с Т(-)/В(+) кросмач не можахме да докажем автореактивност, като при една от пациентките автокросмачът беше отрицателен с трима трупни донори. За съжаление, причините за тези резултати не можаха да бъдат изяснени. При две пациентки с лупусна нефропатия, при които не е правен автокросмач, може да се предположи, че Т(-)/В(+) кросмач се дължи на автоантитела.

Третата група е от реципиенти с неочакван Т(+)/В(-) кросмач, за който се приема че най-вероятно се дължи на не-HLA антитела. Нашите резултати обаче показаха наличие на донор-специфични антитела в пресния серум срещу HLA клас I антигени (към В-локусни при трима и А-локусни при двама реципиенти). Подобни са резултатите на Putheti et al. [333] от анализа на 3073 клинични FCXM теста, според които почти 10% от Т(+) FCXM тестове са отрицателни за В-клетъчна реактивност. Авторите доказват, че IgG антитела срещу HLA-A, -B и/или -C локусни антигени са свързани с Т(+)/В(-) резултат. Като потенциални фактори, допринасящи за изненадващия Т(+)/В(-) FCXM резултат, те посочват различната експресия на HLA върху Т- и В-лимфоцитите и/или диференцирано свързване на антителата към Т- и В-клетките, както и контролните серуми, които се използват за квалифициране на кросмача като положителен или отрицателен. Според нас тази реактивност е необичайна, като се има предвид, че HLA клас I антигените се експресират посилно върху В-клетките. Друго обяснение може да бъде повишаване на фона поради свързване на детекционното антитяло с повърхностните имуноглобулини върху В-клетките, водещо до негативни стойностите за В-клетъчния кросмач. За повишаване чувствителността и специфичността на В-клетъчния флоуцитометричен кросмач се препоръчва [334] и все

по-често се прилага обработка на клетките с проназа, което сигнификантно намалява експресията на капа-леките вериги и Fc рецепторите (CD32b) върху В-клетките [335]. Това обаче удължава технологичното време за извършване на теста и не винаги е обосновано при трансплантация от трупен донор. Трябва да се отбележи също, че такова третиране може да доведе до погрешни резултати като фалшивоотрицателен флоуцитометричен кросмач, поради редукция на експресията главно на HLA клас I молекули [336] или фалшивоположителен Т-клетъчен FCXM, в резултат на разкриване на скрити епитопи и разпознаването им от специфични автоантитела [337]. Нашите резултати потвърждават, че неочаквано положителен Т- при отрицателен В-клетъчен кросмач може да се дължи на алоантителна реактивност, особено при пациенти с анамнестични данни за сенсибилизиращи събития, което се съобщава и от други автори [338, 339]. За подпомагане на клиничната интерпретация на такива находки би могло да се направи автокросмач, както при един от нашите реципиенти, с което да се изключи Т-клетъчна автореактивност.

При кросмач теста донорните лимфоцити са източник на донорни антигени и при положителен резултат се предполага, че у пациента присъстват циркулиращи алоантитела с потенциала да се свържат с несъвместимите антигени на трансплантирания бъбрек, да активират комплемента и да доведат до свръхостро или акселерирано отхвърляне. Както е известно, Т-клетките експресират HLA клас I, а В- клетките и двата класа. Положителният резултат за Т-клетки предполага вероятност за наличие на антитела срещу HLA клас I и е абсолютна контраиндикация за трансплантация, особено ако тестът е CDC. Положителният резултат за В-клетки предполага вероятност за наличие на антитела, както срещу HLA клас I, така и срещу клас II. Когато има резултат, отрицателен за Т-клетки и положителен за В-клетки, се предполага наличието само на

клас II реактивност. Рядко не-HLA антителата водят до положителен резултат. Mishra et al. [252, 254] представят случай на пациент с положителен SAB клас I и отрицателен CDC и FCXM. Фалшивоположителни или високи титри на алоантитела могат да бъдат докладвани поради наличието на антитела срещу денатурирани HLA антигени в твърдофазовите тестове. Schinstock et al. предлагат начин, по който тези антитела да бъдат определени, а именно чрез третиране на серума на реципиента с киселина. SAB остава положителен и титрите нарастват, тогава определеното като донор-специфично антитяло е към денатуриран HLA антиген и според класификацията на риска от антитяло-медиирано отхвърляне въз основа на комбинация от SAB и FCXM рискът за развитие на AMR ще бъде „нисък“ [253].

Нашите данни показват, че резултатите от кросмач реакцията могат да бъдат предсказани в голяма степен на базата на рутинния претрансплантационен алоантителен скрининг и определяне на неприемливите HLA несъвместимости. Независимо от това в рутинната практика могат да се наблюдават неочаквани и необясними положителни резултати от FCXM, причините за които трябва да бъдат изяснени и внимателно интерпретирани при всеки пациент. Те може да се припишат на донор-специфични HLA антитела, които установихме в почти половината от случаите в нашето проучване. Наличието на автоантитела също трябва да се изключи, което сме направили чрез автокросмач при нашите пациенти. Трябва да се отбележи, че някои от причините за неочаквано положителни резултати от кросмача остават под въпрос, поради това че не винаги могат да бъдат изяснени [340]. В доста трансплантационни центрове, включително и според нашата политика, позитивен FCXM (T и/или B) е противопоказание за трансплантация. Клиничното значение на такава непредвидимата положителна кросмач реактивност трябва да бъде обсъдено с клиницистите с оглед по-пълна оценка на имунологич-

ния риск, обективен и ефективен подбор на най-подходящите донор/реципиентни двойки и оптимизиране на следтрансплантационните резултати.

6.4.2. Микросферова технология за оценка на кросмач реактивността (LumXm)

Стратегията за кръстосано съвпадение трябва да дефинира имунологичния риск чрез разграничаване на увреждащите присадката антитела. Въпреки че флоуцитометричният кросмач е по-чувствителен, автоматизиран и полуколичествен, фалшивите положителни резултати са често срещани за този клетъчно-базиран ХМ анализ. Технологията Luminex революционизира откриване на анти-HLA антитела. Логично бе разработването на микросферова технология/китове за оценка и на кросмач реактивността (LumXm, Luminex DSA). LumXm се състои в елуиране на HLA молекули от лимфоцити на донора и свързването им с флуоресцентно маркирани сфери, които се инкубират със серума на реципиента. HLA DSA се откриват с помощта на второ флуоресцентно маркирано антитяло.

Поради несъответстващи на алоантителния статус резултати от FCXM, една от задачите на настоящото проучване бе да се определят ползите от използването на LumXm в алгоритъм за бъбречна трансплантация. В съответствие с това въведохме микросферов кросмач тест и оценихме възможностите му за откриване на донор-специфична HLA реактивност. Резултатите от LumXm бяха съпоставени с тези от SAB тестовете за алоантитела, както и от FCXM. Нашите предварителни данни показват, че резултатите от LumXM са съпоставими с тези от алоантителата и FCXM при по-високи титри на антителата. Според Guillaume et al. [341], въпреки че LumXm може да открие клас I DSA (анти-A и анти-B) с MFI до 2300, анализът има „сива зона“ за MFI до 4000 с чувствителност от 54% и специфичност от 100%. По отношение на клас II DSA

LumXm може да открие анти-DRB1 реактивност с MFI до 1300, чувствителност 93% и специфичност 99%. Нашата констатация за отрицателен LumXm при индивиди с положителни HLA клас I DSA с нисък титър (нисък MFI) и положителен Т-клетъчен FCXM е в съответствие с данните на Guillame et al. [341].

Нашите данни показват, че при пациенти с T(-)/B(+) FCXM и T(-)/B(-) авто-FCXM, но отрицателни за DSA, с този тест се потвърждава липсата на донор-специфична реактивност. Тестът е обективен, до известна степен автоматизиран, не изисква витални клетки, извършването му е в рамките на 3-4 часа (съпоставимо с времето за изработването на FCXM), но независимо от тези предимства има и някои ограничения. Едно от тях са наблюдаваните от нас фалшивоположителни HLA клас II DSA реакции, които са слаби (с по-малък "score"). Освен това установихме липса на HLA клас I реактивност при наличие на нискотитърни DSA от SAB тестването, но положителен Т-клетъчен кросмач. Трябва да отбележим, че сме използвали замразени донорни далачни лимфоцити, а не замразени лизати, което също може да окаже влияние върху реактивността. Данните от литературата за възможностите и приложимостта на Luminex DSA теста в пре- и следтрансплантационния период са противоречиви. Billen et al. [343] установяват, че чувствителността на LumXm е 96% за HLA клас I и 65% за HLA клас II, а специфичността му е 100% за HLA клас I и 97% за HLA клас II. Според тях HLA клас I LumXm се оказва по-чувствителен от FCXM. Тези автори отбелязват, че тестът открива HLA-DR антителата, но детекцията на HLA-DQ и DP антителни специфичности е съмнителна или липсва. Chowdhry et al. [344] също установяват, че LumXm е отрицателен при наличие само на HLA-DQ DSA антитела или HLA-DQ в комбинация с HLA клас I или с други клас II специфичности. В допълнение, с LumXm теста освен HLA-DQ и DP не могат да се открият антитела срещу HLA-C локусните антигени. Guillaume

et al. изказват предположението, че HLA-C, -DP и -DQ антигените не се улавят ефективно от LumXm сферите и следователно антитела срещу антигени, принадлежащи към тези локуси, не се откриват [341].

Редица автори [343, 344, 345] съобщават, че фалшивоположителна за HLA клас II DSA реактивност се наблюдава често при LumXM технологията, каквато установихме и ние. За да се изключи неспецифичен положителен резултат, дължащ се на не-HLA антитела, Guillaume et al. [341] препоръчват авто-LumXm. В опит да си обясним неочакваната слаба HLA клас II реактивност в микросферовия кросмач при негативен за алоантитела пациент, но с T(-)/B(+) FCXM и T(-)/B(+) авто-FCXM, ние също извършихме Luminex клас II автокросмач, който показа положителен резултат. Фалшивоположителните резултати могат да се обяснят с неспецифично свързване на не-HLA антитела и други серумни протеини (при инфекции, автоимунни болести, IVIg) към епитопи на таргетните микросфери или на моноклоналните антитела, с които се улавят HLA антигените, което да доведе до висока фоновата флуоресценция, като има различия в зависимост от партидата на кита [345].

В ретроспективно проучване при пациенти със сърдечна трансплантация Chaidaroglou et al. [346] установяват добра съпоставимост между SAB и FCXM, но не и между тях и LumXM, както и ниска възпроизводимост на микросферовия кросмач тест. След изключване на случаите с положителен Luminex автокросмач и фалшивоположителни DSA, Gillaume et al. намират корелация между резултатите от LumXm клас I с тези от SAB анализа за 83% от комбинациите реципиент-донор и за над 97% при тези за клас II [341]. Нашите данни са в подкрепа на констатациите, че LumXm показва някои несъответствия с резултатите от SAB анализа, особено за антитела с нисък MFI. Установените от нас съответствия/несъответствия между LumXm, SAB и FCXM тестовете са съпоставими с тези на Ameur et al. [245]. Това, което със сигурност може

да се каже, е, че LumXm не може да се използва самостоятелно като тест, а е необходимо да се комбинира с други техники – SAB тест и FCXM. Считаме също за необходимо изработване на собствени критерии за дефиниране на положителни и отрицателни резултати от този тест.

В светлината на описаните наблюдения нашите резултати при Luminex кросмач теста са в съответствие с литературните данни и могат да бъдат обяснени. Независимо от ограниченията, LumXM може да даде полезна допълнителна информация за оценка на съвместимостта при живи донори за бъбречна трансплантация, но трябва да се интерпретира внимателно, заедно с алоантителния профил от SAB тестовете, класа на алоантителата, резултатите от FCXM и клиничния статус на реципиента, а не самостоятелно. Поради това че не изисква живи клетки, той може да намери приложение за оценка на хуморалния алоимунния отговор и при трансплантирани пациенти, особено в случаите, когато имуносупресивната терапия може да интерферира с FCXM теста. Поради ограничените ни данни и недостатъчен опит с Luminex кросмач теста считаме, че все още не е уместно да бъде включен в прогностичния ни модел за оценка на тъканната съвместимост.

6.4.3. Виртуален кросмач

Около 32,5% от пациентите в регистъра за чакащи БТ са сенсибилизирани, т.е. имат преформирани HLA антитела. В последните години широко клинично приложение намира виртуалният кросмач, позволяващ оценка на имунологичната съвместимост на базата на алоантителния профил на реципиента и HLA антигените на донора. Реално V-XM се използва за оценка на риска преди трансплантация. До момента няма консенсус относно целта на V-XM, дали оценката на риска включва прогнозиране на резултатите от реален кросмач или изхода от трансплантацията [256]. За несесибилизирани пациенти, които нямат сенсиби-

лизиращи събития, като кръвопреливане, бременност и предходна трансплантация, нямат алоантитела, кросмач реакцията, проведена с всеки донор, би следвало да бъде отрицателна и за двата класа. Такъв сценарий е приложим за по-голямата част от пациентите в списъка на чакащите. За тези, които имат антитела, доказани чрез SAB анализ, рискът варира в зависимост от граничните стойностите на MFI, определящи дали антитялото е приемливо, или неприемливо, или за прогнозиране на резултати от FCXM или CDCXM.

Norin et al. [238] демонстрират изключително ефективен метод, който използват за прогнозиране на резултат от кросмач, прилагайки еплетния анализ и SAB MFI данните (Eplet/SAB calculation). Постигната е почти 100% корелация с ECXM резултатите при граница от 11 000 MFI, получена от сумиране на еплет положителните SABs, а не от микросферите, реагирали само с донорните HLA. В съображение се взема „феноменът на споделен еплет“, водещ до недостатъчно представяне на силата на антитялото или пълна липса на специфичност, поради свързване на антитялото към конкуриращи се таргети/еплети върху множество антигенни сфери, ефективно „разреждайки“ полученото MFI [239]. Сумирайки MFI на всички потенциални положителни донорни еплети с останалите положително реагирали сфери и ако стойността на MFI е над 11 000, Norin et al. прогнозират положителен кросмач и антигените, експресиращи еплета, стават неприемливи. Ако MFI стойността е под 11 000, антигените, експресиращи еплета, няма да бъдат неприемливи, а реалният кросмач вероятно ще бъде отрицателен.

В проучване, проведено от Peräsaari et al. [246], са сравнени V-XM с различни методи за провеждане на реален кросмач. От 83 кросмача най-добра корелация се наблюдава при FCXM (83%). С LumXm и CDCXM нивата на откриване на DSA са съответно 71% и 66%. С FCXM най-добрата корелация е постигната с гранични стойности на MFI 1000 и

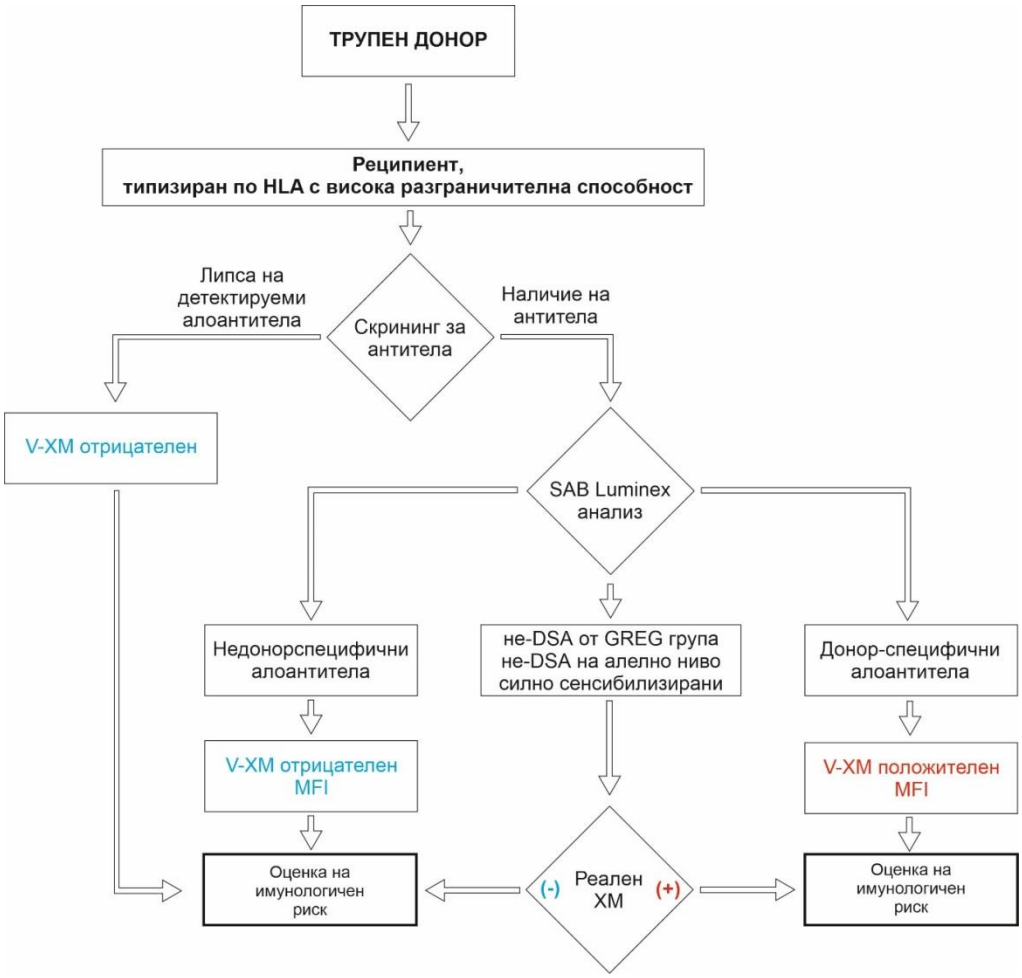
5000, за CDCXM най-добрата точност е постигната с гранична стойност на MFI 5000, докато за LumXM най-оптималната е от 10 000 MFI.

Едно от ограниченията на виртуалния кросмач са HLA антителата от клас II, тъй като техните таргети се формират от алфа- и бета-вериги, кодирани от различни гени. Друго ограничение на виртуалния кросмач е биологичното естеството на кросмача и непредсказуемостта на донорния материал. Има широка вариация в експресията на HLA между донорите. Освен това се наблюдават значителни вариации между различните клетъчни източници (кръв, далак, лимфен възел). Промяната в нивата на експресия на HLA има пряко въздействие върху реактивността на FCXM. Техниката за скрининг на антитела може да бъде стандартизирана, но плътността на HLA върху прицелните клетки не може. Следователно винаги ще има несигурност, освен ако нивата на експресия на HLA не бъдат оценени по време на провеждане на теста. Единствено методите, при които донорните антигени се улавят върху сфера, позволяват стандартизиране на количеството HLA на донора [246].

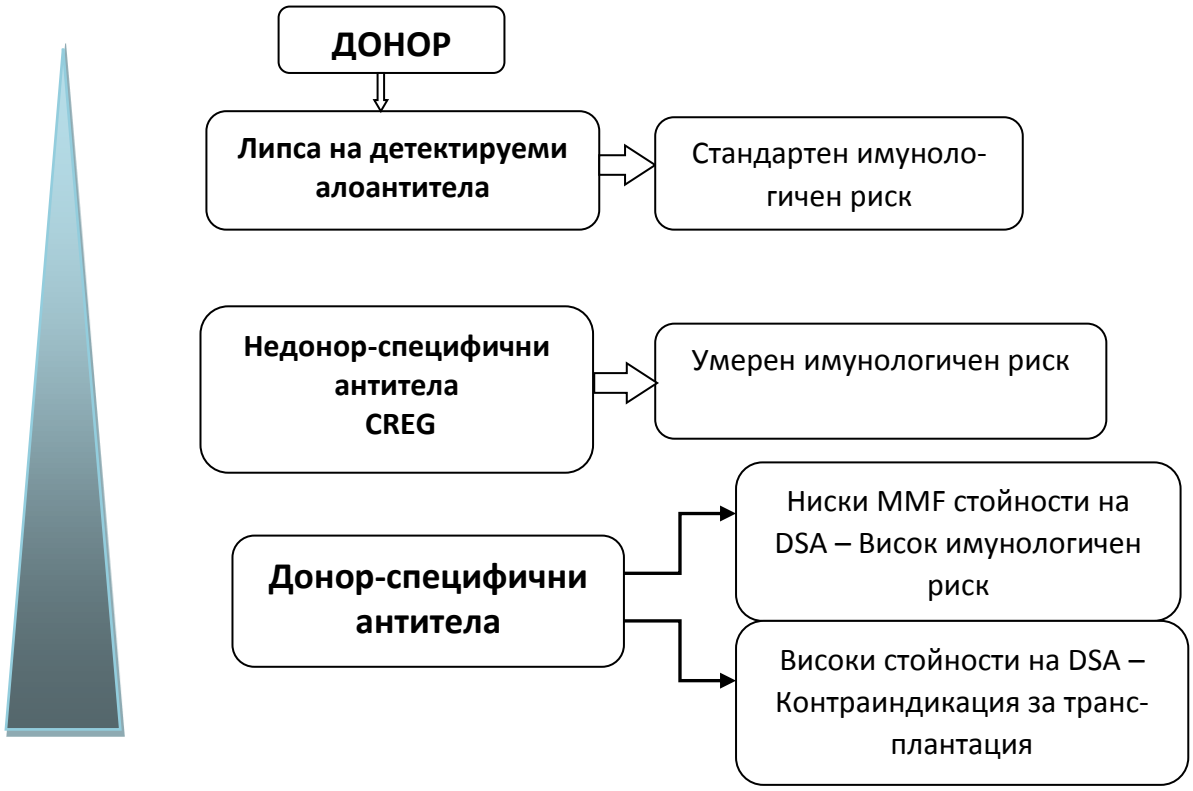
Виртуалният кросмач е приложим по време на търсене на съвместими за конкретен донор реципиенти чрез определяне на несъвместими или съвместими антигени. В литературата нараства броят на статии за успехите на няколко трансплантационни центъра за провеждане на трансплантации въз основа само на резултатите от V-XM преди трансплантация [257]. На базата на тези данни част от центровете предлагат рутинно приложение на V-XM, поне в краткосрочен план за донорите от кавказки произход – при условие че е извършено HLA типизиране с висока разграничителна способност на трупните донори, а реален кросмач да се провежда само при силно сенсибилизирани реципиенти. Вероятно V-XM ще се използва все по-често в бъдеще, особено за мъже, чакащи за първа БТ, без IgG анти-HLA антитела и при липса на данни за скорошни сенсибилизиращи събития.

Виртуалният кросмач е разширение на традиционния, разчитайки на внимателно интерпретиран тест за HLA антитела, заедно с точна оценка на донорните HLA антигени. Кросмачът в реално време все още ще бъде необходим и използван.

В резултат на настоящото проучване разработихме алгоритъм (фигура 18, Приложение 4) за определяне на алоимунната реактивност на реципиентите, чакащи бъбречна трансплантация, с цел предсказване с най-голяма вероятност на резултатите от кросмач теста (V-XM), който да намери приложение за оценка на имунологичния риск въз основа на алоантителния статус при реципиенти за бъбречна трансплантация (фигура 19).



Фигура 18. *Алгоритъм за определяне на алоимунната реактивност на реципиентите, чакащи бъбречна трансплантация*



Фигура 19. *Оценка на имунологичния риск въз основа на алоантителния статус при реципиенти*

7. ОБОБЩЕНИЕ

Откриването на DSA преди/след трансплантация е критично условие за прогнозиране на краткосрочна и дългосрочна преживяемост на присадката, а така също и критерий за диагностициране на антитяломедиирано отхвърляне след трансплантация. Използването на чувствителните и специфични SAB методи позволява откриването на антитела, насочени специфично към HLA антигени на донора. Регулярното мониториране на алоантителния статус на реципиента, докато е в листата на чакащите, позволява те да бъдат актуализирани поне три пъти годишно, което от своя страна е предпоставка за извършването на V-XM и избор на подходящ трупен донор, а при живи донори да се избере подходящият, с който да се извърши реален XM и впоследствие трансплантация.

Определянето на донор-специфични антитела се базира на HLA типа на донора и резултатите от микросферовите (Luminex) анализи. Но SAB анализите не могат напълно да изключат наличието на HLA DSA, поради това че не всички HLA алели/епитопи са представени в тези тестове. В допълнение, нашите анализи показват, че най-честите антитела не винаги са с най-силна реактивност (най-голям “score” или MFI). Най-ниските “score” стойности за анти-HLA-Cw антителата може да се свържат с по-слабата имуногенност на тези антигени. Трябва да се вземат в съображение и споделените еплети/епитопи като причина за тези различки, което може да бъде обект на последващи анализи. Поради това вероятността за наличието на HLA антитела, които могат да не бъдат открити, трябва да се има предвид. При силно сенсибилизираните пациенти е необходимо типизиране с висока разделителна способност на реципиент и донор за точно дефиниране на алелните специфичности на някои антитела. Мониторинг на алоимунния статус чрез използване на съвременните SAB технологии, в комбинация с разширено HLA типизиране, зна-

чително подобри способността ни да предсказваме имунологичния риск, свързан с бъбречна трансплантация за индивидуална двойка донор-реципиент.

В настоящото проучване направихме опит да оценим вероятностите за HLA несъвместими донори за алосенсибилизираните пациенти, като съпоставихме разпределението на HLA специфичностите в контролна група от здрави индивиди и група от трупни донори с тези на алоантителата към съответните HLA антигени. Прави впечатление, че изчислените вероятности за несъвместим донор за пациентите при някои антителни специфичности са различни за контролната и донорската група, поради различната честота на HLA антигените в двете кохорти. Резултатите от този анализ могат да намерят приложение в рутинната ни практика и да послужат като първа стъпка за въвеждане на т.нар. калкулирани ПРА (cPRA) и за нашите пациенти. Оценката на процента на донорите, чиито органи биха били несъвместими за съответния потенциален реципиент, е особено важна при силно сенсибилизираните реципиенти и ще повиши възможностите им за трансплантация.

Чрез скрининг и идентификация на HLA антитела преди трансплантация можем да предвидим до голяма степен резултата от кросмача (VXM), в подкрепа на което са и нашите данни. Независимо от това, в рутинната ни практика наблюдавахме неочаквани и необясними резултати от FCXM. Някои от тях се дължаха на DSA, неоткрити в периодичните скрининги, вероятно поради de novo синтез или реактивация на паметови В-клетки, но част от причините не можаха да бъдат изяснени. Освен това използването на донорни клетки като мишена, при които има интраиндивидуална вариация в експресията на HLA и значителна вариация в нивата на експресия на HLA между различни индивиди, също може да оказва влияние върху чувствителността на кросмача в зависимост от донорските фактори. Следователно винаги ще има известна несигур-

ност в предсказването на кросмача, поради което много добре трябва да се дефинират случаите, при които се взема в съображение само виртуалният кросмач, и тези, при които трябва да се извърши реален кросмач. Друга опция е използването на твърдофазови DSA тестове (LumXM), което ни мотивира да въведем и оценим възможностите за рутинно приложение на този вид кросмач. Независимо че установихме някои ограничения, считаме, че LumXM може да даде полезна допълнителна информация за оценка на съвместимостта при живи донори за бъбречна трансплантация, но трябва да се интерпретира внимателно заедно с алоантителния профил от SAB тестовете, класа на алоантителата, резултатите от FCXM и клиничния статус на реципиента, а не самостоятелно.

В допълнение, съпоставянето на данните от Luminex-SAB анализа с FCXM показа много високо съвпадение между реалния и виртуалния кросмач. Тъй като виртуалният XM сравнява неприемливите антигени за реципиента (антигени срещу които са открити антитела в неговите серумни проби) с HLA формулата на потенциалния донор чрез виртуално съпоставяне, точен актуализиран имунологичен профил на потенциалния реципиент е задължително необходим. Отрицателна V-XM при пациент без известна анамнеза за сенсибилизация и регулярно изследван за алоантитела може да се счита за подходяща за трансплантация от трупен донор, без да е необходимо провеждането на реален кросмач. Въпреки това при пациенти с анамнеза за възможна сенсибилизация FCXM е задължителен преди трансплантация. Резултатът от V-XM също зависи от времето на скрининга за DSA и може да варира в зависимост от това коя проба серум е използвана за тестване. Това е от значение за пациенти с анамнеза за сенсибилизиращи събития, тъй като профилът на DSA може да се промени с времето, както стана ясно от проведеното проучване. Потенциално положителен V-XM може да възникне поради наличието на антитела срещу HLA-C, DQα и DP антигени. Въпреки че точното

имунологично значение на тези антигени и съответните им антитела все още е неясно, невключването им в скрининга, както и при HLA типизиране на донори и реципиенти, може да доведе до изненадващо положителен реален кросмач. Следователно за V-XM трябва да се вземат предвид всички предишни резултатите, когато има такива, както и историята на сенсибилизация на пациента. Тестовете, направени непосредствено преди трансплантацията, са най-надеждни и представляват най-новото състояние на DSA.

Днес се опитваме да прогнозираме имунологичния риск и резултата от трансплантацията с различен брой анализи, измерващи и оценяващи HLA имунизацията. Идентифицирането на подтипа на антитялото, свързването на комплемента, афинитета и титъра в индивидуална проба е възможно, но засега не винаги е рентабилно. Напредъкът в тази област е белязан от появата на следващо поколение SAB анализи и нарастващ акцент върху епитоп-базирания анализ. Прилагането на V-XM, съчетано с разумното извършване на реален кросмач, се очертава като новия, по-успешен път за преодоляване на клинично значими реакции на реакции на отхвърляне при трансплантация.

8. ИЗВОДИ

1. В служебния регистър на чакащите БТ в ИАМН средната възраст е 49 г., преобладават мъжете, а хипертонията, диабетът и сърдечно-съдовите заболявания са най-честите съпътстващи заболявания.

2. В служебния регистър на ИАМН има средно 32% сенсибилизирани потенциални реципиенти за бъбречна трансплантация. Най-голям е делът на пациентите с антитела срещу HLA клас I антигените, следвани от тези към клас II, а най-малко са пациентите с антитела срещу двата класа.

3. Основните фактори, повлияващи продукцията на HLA антитела, са предшестващи трансплантации, бременност и кръвопреливане, но некласически сенсибилизиращи събития също могат да се отразят на алоимунния статус.

4. Установената динамика в алоантителния статус на пациентите, чакащи БТ, във времето най-вероятно е резултат от различната диагностична стойност на използваните техники за определяне на HLA антитела.

5. Честотата на дефинираните най-чести алоантителни специфичности към HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DQA1, -DPB1 и DPA1 не винаги е свързана с количеството (MFI) на антителата.

6. Съпоставянето на честотите на различните HLA-A, B, DRB1, DQB1 антигени в групата на здравите индивиди и трупните донори с наличието на антитела към тях при пациентите с положителен алоантителен статус позволи да се оцени шансът сенсибилизиран пациент да може да бъде трансплантиран със съвместим донор. Шансът за някои антителни специфичности е различен за контролната и донорската група, което се дължи на различната честота на HLA специфичностите между двете групи.

7. Въведеният в проучването твърдофазов микросферов метод за откриване на донор-специфични антитела (LumXm) показа, че резултатите от него са съпоставими с тези от алоантителата и флоуцитометричния кросмач при по-високи титри на антителата, но според нас не може да се използва самостоятелно като тест за оценка на риска.

8. Резултатите от кросмач реакцията могат да бъдат предсказани на базата на рутинния претрансплантационен алоантителен скрининг и определяне на неприемливите HLA несъвместимости в 97,42% при пациентитите с отрицателен алоантителен статус и в 96,49% при тези с анти-HLA антитела. Независимо от това, в рутинната практика могат да се наблюдават неочаквани и необясними резултати от FCXM, причините за които трябва да бъдат изяснени и внимателно интерпретирани при всеки пациент.

9. Виртуалният кросмач е приложим по време на търсене на съвместими за конкретен донор реципиенти, чрез определяне на несъвместимите или съвместими антигени, при условие че е извършено HLA типизиране с висока разделителна способност на реципиентите в служебния регистър и на трупните донори, а реален кросмач да се провежда само при сенсибилизирани реципиенти.

9. ПРИНОСИ

1. Характеризиран е демографският и клиничният профил на чакащите за БТ у нас. Данните може да се използват при разработване на здравни политики, касаещи най-уязвимите и рискови пациенти в регистъра.

2. Направена е комплексна характеристика на алосенсибилизационния профил на пациентите в регистъра на чакащите БТ в България, като за първи път са анализирани антителата срещу HLA-DQA1,-DPA1 и -DPB1. Допълнени и обогатени са данните от предходни анализи.

3. За първи път у нас е проследена динамиката на алоантителата на пациентите от регистъра за БТ в хода на рутинните скрининги.

4. За първи път у нас е оценена вероятността алосенсибилизирани потенциални реципиенти за БТ да бъдат трансплантирани със съвместим донор. Това е първа стъпка в разработването на програма за определяне на калкулирани ПРА и за пациентите от нашия регистър, с което ще се даде по-голям шанс за БТ на силно сенсибилизираните пациенти.

5. За първи път у нас е въведен микросферов метод за кросмач реакция (Luminex ХМ) и са оценени възможностите за приложението му в рутинната практика при оценка на имунологичния риск за реципиента.

6. За първи път е направен анализ на съответствието между резултатите от реален FCXM и алоимунен профил на потенциалните реципиенти. Получените данни са залегнали в разработването на алгоритъм за извършване на V-ХМ и/или реален ХМ за претрансплантационна оценка на индивидуалния риска.

10. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Сравнения на демографските и други показатели

КЛАС I ПРИ РЕГИСТРАЦИЯ

Показател			Клас I при регистрация		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	324	21	345	**< 0,001**
		%	66,3%	25,6%	60,4%	
	Жени	N	165	61	226	
		%	33,7%	74,4%	39,6%	
Съпътстващи за-болявания	Да	N	186	29	215	0,644
		%	38,0%	35,4%	37,7%	
	Не	N	303	53	356	
		%	62,0%	64,6%	62,3%	
Диализа	Да	N	479	81	560	0,776
		%	98,4%	98,8%	98,4%	
	Не	N	8	1	9	
		%	1,6%	1,2%	1,6%	
Кръвопреливане	Да	N	237	60	297	**< 0,001**
		%	49,0%	75,9%	52,8%	
	Не	N	247	19	266	
		%	51,0%	24,1%	47,2%	
Бременност	Да	N	116	46	162	0,309
		%	72,5%	79,3%	74,3%	
	Не	N	44	12	56	
		%	27,5%	20,7%	25,7%	
Хепатит ±	Да	N	42	8	50	0,717
		%	8,6%	9,9%	8,8%	
	Не	N	444	73	517	
		%	91,4%	90,1%	91,2%	
Тумор	Да	N	12	2	14	0,998
		%	2,5%	2,5%	2,5%	
	Не	N	475	79	554	
		%	97,5%	97,5%	97,5%	

КЛАС II ПРИ РЕГИСТРАЦИЯ

Показател			Клас II при регистрация		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	327	16	343	**< 0,001**
		%	63,6%	30,8%	60,6%	
	Жени	N	187	36	223	
		%	36,4%	69,2%	39,4%	
Съпътстващи за-болявания	Да	N	189	25	214	0,109
		%	36,8%	48,1%	37,8%	
	Не	N	325	27	352	
		%	63,2%	51,9%	62,2%	
Диализа	Да	N	504	51	555	0,843
		%	98,4%	98,1%	98,4%	
	Не	N	8	1	9	
		%	1,6%	1,9%	1,6%	
Кръвопреливане	Да	N	257	35	292	**0,005**
		%	50,5%	71,4%	52,3%	
	Не	N	252	14	266	
		%	49,5%	28,6%	47,7%	
Бременност	Да	N	129	31	160	**0,036**
		%	71,7%	88,6%	74,4%	
	Не	N	51	4	55	
		%	28,3%	11,4%	25,6%	
Хепатит ±	Да	N	45	5	50	0,848
		%	8,8%	9,6%	8,9%	
	Не	N	465	47	512	
		%	91,2%	90,4%	91,1%	
Тумор	Да	N	11	2	13	0,439
		%	2,2%	3,8%	2,3%	
	Не	N	500	50	550	
		%	97,8%	96,2%	97,7%	

Първи скрининг – КЛАС I

Показател			Първи скрининг – Клас I		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	215	24	239	0,496
		%	59,9%	54,5%	59,3%	
	Жени	N	144	20	164	
		%	40,1%	45,5%	40,7%	
Съпътстващи забо-лявания	Да	N	137	17	154	0,951
		%	38,2%	38,6%	38,2%	
	Не	N	222	27	249	
		%	61,8%	61,4%	61,8%	
Диализа	Да	N	355	42	397	0,205
		%	99,4%	97,7%	99,3%	
	Не	N	2	1	3	
		%	,6%	2,3%	,8%	
Кръвопреливане	Да	N	172	30	202	**0,001**
		%	48,6%	76,9%	51,4%	
	Не	N	182	9	191	
		%	51,4%	23,1%	48,6%	
Бременност	Да	N	100	13	113	**0,029**
		%	72,5%	100,0%	74,8%	
	Не	N	38	0	38	
		%	27,5%	0,0%	25,2%	
Хепатит ±	Да	N	37	13	50	**< 0,001**
		%	10,3%	29,5%	12,4%	
	Не	N	322	31	353	
		%	89,7%	70,5%	87,6%	
Тумор	Да	N	10	2	12	0,527
		%	2,8%	4,5%	3,0%	
	Не	N	345	42	387	
		%	97,2%	95,5%	97,0%	

Втори скрининг – КЛАС I

Показател			Втори скрининг – Клас **I**		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	219	85	304	**< 0,001**
		%	66,8%	48,3%	60,3%	
	Жени	N	109	91	200	
		%	33,2%	51,7%	39,7%	
Съпътстващи забо-лявания	Да	N	119	69	188	0,518
		%	36,3%	39,2%	37,3%	
	Не	N	209	107	316	
		%	63,7%	60,8%	62,7%	
Диализа	Да	N	321	174	495	0,345
		%	98,5%	99,4%	98,8%	
	Не	N	5	1	6	
		%	1,5%	,6%	1,2%	
Кръвопреливане	Да	N	157	114	271	**< 0,001**
		%	47,9%	68,3%	54,7%	
	Не	N	171	53	224	
		%	52,1%	31,7%	45,3%	
Бременност	Да	N	71	64	135	0,138
		%	68,3%	78,0%	72,6%	
	Не	N	33	18	51	
		%	31,7%	22,0%	27,4%	
Хепатит +/-	Да	N	27	26	53	**0,022**
		%	8,3%	14,9%	10,6%	
	Не	N	300	149	449	
		%	91,7%	85,1%	89,4%	
Тумор	Да	N	8	5	13	0,767
		%	2,4%	2,9%	2,6%	
	Не	N	319	168	487	
		%	97,6%	97,1%	97,4%	

Втори скрининг – КЛАС II

Показател			Втори скрининг – Клас **II**		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	244	60	304	**< 0,001**
		%	64,9%	46,9%	60,3%	
	Жени	N	132	68	200	
		%	35,1%	53,1%	39,7%	
Съпътстващи за-болявания	Да	N	139	49	188	0,791
		%	37,0%	38,3%	37,3%	
	Не	N	237	79	316	
		%	63,0%	61,7%	62,7%	
Диализа	Да	N	369	126	495	0,623
		%	98,7%	99,2%	98,8%	
	Не	N	5	1	6	
		%	1,3%	,8%	1,2%	
Кръвопреливане	Да	N	186	85	271	**< 0,001**
		%	49,7%	70,2%	54,7%	
	Не	N	188	36	224	
		%	50,3%	29,8%	45,3%	
Бременност	Да	N	87	48	135	0,118
		%	69,0%	80,0%	72,6%	
	Не	N	39	12	51	
		%	31,0%	20,0%	27,4%	
Хепатит +/-	Да	N	29	24	53	**< 0,001**
		%	7,8%	18,8%	10,6%	
	Не	N	345	104	449	
		%	92,2%	81,3%	89,4%	
Тумор	Да	N	11	2	13	0,392
		%	3,0%	1,6%	2,6%	
	Не	N	361	126	487	
		%	97,0%	98,4%	97,4%	

Трети скрининг – КЛАС I

Показател			Трети скрининг клас I		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	192	102	294	**< 0,001**
		%	65,1%	48,8%	58,3%	
	Жени	N	103	107	210	
		%	34,9%	51,2%	41,7%	
Съпътстващи забо-лявания	Да	N	109	80	189	0,762
		%	36,9%	38,3%	37,5%	
	Не	N	186	129	315	
		%	63,1%	61,7%	62,5%	
Диализа	Да	N	289	206	495	0,682
		%	98,6%	99,0%	98,8%	
	Не	N	4	2	6	
		%	1,4%	1,0%	1,2%	
Кръвопреливане	Да	N	138	135	273	**< 0,001**
		%	46,8%	67,5%	55,2%	
	Не	N	157	65	222	
		%	53,2%	32,5%	44,8%	
Бременност	Да	N	67	75	142	0,289
		%	69,8%	76,5%	73,2%	
	Не	N	29	23	52	
		%	30,2%	23,5%	26,8%	
Хепатит +/-	Да	N	27	28	55	0,129
		%	9,2%	13,5%	11,0%	
	Не	N	266	179	445	
		%	90,8%	86,5%	89,0%	
Тумор	Да	N	7	6	13	0,702
		%	2,4%	2,9%	2,6%	
	Не	N	288	199	487	
		%	97,6%	97,1%	97,4%	

Трети скрининг – КЛАС II

Показател			Трети скрининг клас **II**		Общо	p
			Отрицателен	Положителен		
Пол	Мъже	N	231	64	295	**0,001**
		%	62,9%	46,4%	58,4%	
	Жени	N	136	74	210	
		%	37,1%	53,6%	41,6%	
Съпътстващи забо-лявания	Да	N	142	48	190	0,419
		%	38,7%	34,8%	37,6%	
	Не	N	225	90	315	
		%	61,3%	65,2%	62,4%	
Диализа	Да	N	360	136	496	0,557
		%	98,6%	99,3%	98,8%	
	Не	N	5	1	6	
		%	1,4%	,7%	1,2%	
Кръвопреливане	Да	N	178	95	273	**< 0,001**
		%	48,6%	73,1%	55,0%	
	Не	N	188	35	223	
		%	51,4%	26,9%	45,0%	
Бременност	Да	N	89	53	142	**0,034**
		%	68,5%	82,8%	73,2%	
	Не	N	41	11	52	
		%	31,5%	17,2%	26,8%	
Хепатит ±	Да	N	32	23	55	**0,011**
		%	8,8%	16,8%	11,0%	
	Не	N	332	114	446	
		%	91,2%	83,2%	89,0%	
Тумор	Да	N	10	3	13	0,715
		%	2,8%	2,2%	2,6%	
	Не	N	353	135	488	
		%	97,2%	97,8%	97,4%	

Приложение 2. Разпределение на резултата при отделните антитела на изследваните пациенти от втора група (IIа)

Резултат	A1	A2	A3	A23	A24	A2403	A25
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	0 (0,0)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	0 (0,0)
2	2 (1,8)	7 (6,4)	3 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	4 (3,7)
3	5 (4,6)	1 (0,9)	3 (2,8)	9 (8,3)	11 (10,1)	8 (7,3)	8 (7,3)
4	3 (2,8)	3 (2,8)	4 (3,7)	5 (4,6)	7 (6,4)	7 (6,4)	7 (6,4)
5	6 (5,5)	3 (2,8)	2 (1,8)	6 (5,5)	9 (8,3)	4 (3,7)	6 (5,5)
6	6 (5,5)	13 (11,9)	8 (7,3)	7 (6,4)	8 (7,3)	4 (3,7)	9 (8,3)
8	0 (0,0)	5 (4,6)	2 (1,8)	6 (5,5)	4 (3,7)	0 (0,0)	3 (2,8)
Общо позитивни	22 (20,2)	33 (30,3)	23 (21,1)	37 (33,9)	44 (40,4)	27 (24,8)	37 (33,9)
Не	87 (79,8)	76 (69,7)	86 (78,9)	72 (66,1)	65 (59,6)	82 (75,2)	72 (66,1)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	A26	A34	A66	A11	A29	A30	A31
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	0 (0,0)	1 (0,9)
2	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	6 (5,5)	4 (3,7)	4 (3,7)	4 (3,7)
3	8 (7,3)	2 (1,8)	9 (8,3)	2 (1,8)	4 (3,7)	4 (3,7)	6 (5,5)
4	1 (0,9)	4 (3,7)	2 (1,8)	2 (1,8)	4 (3,7)	4 (3,7)	5 (4,6)
5	4 (3,7)	3 (2,8)	5 (4,6)	4 (3,7)	2 (1,8)	4 (3,7)	2 (1,8)
6	4 (3,7)	9 (8,3)	9 (8,3)	7 (6,4)	4 (3,7)	2 (1,8)	3 (2,8)
8	2 (1,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)
Общо позитивни	21 (19,3)	22 (20,2)	31 (28,4)	25 (22,9)	22 (20,2)	18 (16,5)	22 (20,2)
Не	88 (80,7)	87 (79,8)	78 (71,6)	84 (77,1)	87 (79,8)	91 (83,5)	87 (79,8)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	A32	A33	A74	A68	A69	A36	A43	A80
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)
2	4 (3,7)	2 (1,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	3 (2,8)	6 (5,5)
3	6 (5,5)	5 (4,6)	3 (2,8)	7 (6,4)	4 (3,7)	3 (2,8)	8 (7,3)	4 (3,7)
4	3 (2,8)	3 (2,8)	4 (3,7)	3 (2,8)	2 (1,8)	4 (3,7)	2 (1,8)	1 (0,9)
5	8 (7,3)	2 (1,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	7 (6,4)	2 (1,8)	5 (4,6)	3 (2,8)
6	7 (6,4)	5 (4,6)	4 (3,7)	9 (8,3)	6 (5,5)	7 (6,4)	6 (5,5)	5 (4,6)
8	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	4 (3,7)	3 (2,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)
Общо позитивни	31 (28,4)	19 (17,4)	16 (14,7)	30 (27,5)	25 (22,9)	21 (19,3)	26 (23,9)	21 (19,3)
Не	78 (71,6)	90 (82,6)	93 (85,3)	79 (72,5)	84 (77,1)	88 (80,7)	83 (76,1)	88 (80,7)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	B51	B5102	B5103	B52	B7	B703	B8	B44
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
2	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (5,5)	1 (0,9)	6 (5,5)	6 (5,5)
3	9 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (10,1)	7 (6,4)	4 (3,7)	6 (5,5)	8 (7,3)
4	6 (5,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (3,7)	2 (1,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	4 (3,7)
5	5 (4,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (6,4)	8 (7,3)	3 (2,8)	1 (0,9)	6 (5,5)
6	11 (10,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (6,4)	7 (6,4)	3 (2,8)	6 (5,5)	9 (8,3)
8	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (6,4)	2 (1,8)	0 (0,0)	3 (2,8)	3 (2,8)
Общо позитивни	39 (35,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	39 (35,8)	35 (32,1)	14 (12,8)	24 (22)	36 (33)
Не	70 (64,2)	109 (100)	109 (100)	70 (64,2)	74 (67,9)	95 (87,2)	85 (78)	73 (67)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	B45	B13	B64	B65/1402	B62/1501	B63/15:16	B75	B76/1512
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	4 (3,7)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	1 (0,9)
2	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	3 (2,8)	5 (4,6)
3	10 (9,2)	10 (9,2)	5 (4,6)	2 (1,8)	8 (7,3)	7 (6,4)	6 (5,5)	11 (10,1)
4	3 (2,8)	7 (6,4)	3 (2,8)	2 (1,8)	6 (5,5)	9 (8,3)	2 (1,8)	7 (6,4)
5	4 (3,7)	8 (7,3)	1 (0,9)	1 (0,9)	4 (3,7)	9 (8,3)	7 (6,4)	6 (5,5)
6	8 (7,3)	5 (4,6)	6 (5,5)	6 (5,5)	7 (6,4)	7 (6,4)	3 (2,8)	8 (7,3)
8	5 (4,6)	4 (3,7)	2 (1,8)	3 (2,8)	5 (4,6)	5 (4,6)	7 (6,4)	2 (1,8)
Общо позитивни	33 (30,3)	41 (37,6)	19 (17,4)	17 (15,6)	32 (29,4)	39 (35,8)	29 (26,6)	40 (36,7)
Не	76 (69,7)	68 (62,4)	90 (82,6)	92 (84,4)	77 (70,6)	70 (64,2)	80 (73,4)	69 (63,3)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	B77	B38	B39	B3901	B3902	B57	B58	B18
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)	3 (2,8)	2 (1,8)	1 (0,9)
2	6 (5,5)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	2 (1,8)	2 (1,8)	5 (4,6)
3	5 (4,6)	7 (6,4)	2 (1,8)	7 (6,4)	0 (0,0)	8 (7,3)	12 (11)	2 (1,8)
4	6 (5,5)	5 (4,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (3,7)	7 (6,4)	4 (3,7)
5	10 (9,2)	5 (4,6)	0 (0,0)	3 (2,8)	1 (0,9)	12 (11)	7 (6,4)	4 (3,7)
6	5 (4,6)	10 (9,2)	4 (3,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	7 (6,4)	7 (6,4)	7 (6,4)
8	6 (5,5)	2 (1,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)	7 (6,4)	6 (5,5)	3 (2,8)
Общо позитивни	39 (35,8)	32 (29,4)	8 (7,3)	16 (14,7)	1 (0,9)	43 (39,4)	43 (39,4)	26 (23,9)
Не	70 (64,2)	77 (70,6)	101 (92,7)	93 (85,3)	108 (99,1)	66 (60,6)	66 (60,6)	83 (76,1)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	B49	B50	B4005	B54	B55	B56	B27	B2708
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	2 (1,8)	1 (0,9)	0 (0,0)	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)
2	2 (1,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	5 (4,6)	4 (3,7)	6 (5,5)	1 (0,9)	0 (0,0)
3	9 (8,3)	8 (7,3)	0 (0,0)	2 (1,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	7 (6,4)	6 (5,5)
4	7 (6,4)	4 (3,7)	0 (0,0)	1 (0,9)	2 (1,8)	3 (2,8)	7 (6,4)	2 (1,8)
5	8 (7,3)	8 (7,3)	0 (0,0)	3 (2,8)	7 (6,4)	7 (6,4)	11 (10,1)	9 (8,3)
6	11 (10,1)	5 (4,6)	0 (0,0)	8 (7,3)	7 (6,4)	6 (5,5)	8 (7,3)	6 (5,5)
8	7 (6,4)	7 (6,4)	0 (0,0)	2 (1,8)	5 (4,6)	5 (4,6)	2 (1,8)	0 (0,0)
Общо позитивни	46 (42,2)	35 (32,1)	0 (0,0)	23 (21,1)	31 (28,4)	31 (28,4)	37 (33,9)	25 (22,9)
Не	63 (57,8)	74 (67,9)	109 (100)	86 (78,9)	78 (71,6)	78 (71,6)	72 (66,1)	84 (77,1)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	B35	B37	B60	B61	B41	B42	B46	B47
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	3 (2,8)	0 (0,0)
2	5 (4,6)	4 (3,7)	4 (3,7)	5 (4,6)	2 (1,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	4 (3,7)
3	0 (0,0)	10 (9,2)	7 (6,4)	7 (6,4)	4 (3,7)	3 (2,8)	2 (1,8)	9 (8,3)
4	3 (2,8)	3 (2,8)	6 (5,5)	8 (7,3)	2 (1,8)	1 (0,9)	0 (0,0)	6 (5,5)
5	4 (3,7)	5 (4,6)	9 (8,3)	6 (5,5)	7 (6,4)	6 (5,5)	3 (2,8)	10 (9,2)
6	10 (9,2)	6 (5,5)	5 (4,6)	3 (2,8)	6 (5,5)	7 (6,4)	2 (1,8)	4 (3,7)
8	6 (5,5)	2 (1,8)	4 (3,7)	2 (1,8)	3 (2,8)	4 (3,7)	3 (2,8)	2 (1,8)
Общо позитивни	29 (26,6)	30 (27,5)	35 (32,1)	31 (28,4)	24 (22)	26 (23,9)	16 (14,7)	35 (32,1)
Не	80 (73,4)	79 (72,5)	74 (67,9)	78 (71,6)	85 (78)	83 (76,1)	93 (85,3)	74 (67,9)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	B48	B53	B59	B67	B71	B72	B73	B78	B81	B82
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	3 (2,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	2 (1,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	3 (2,8)	1 (0,9)
2	2 (1,8)	4 (3,7)	3 (2,8)	4 (3,7)	2 (1,8)	5 (4,6)	5 (4,6)	2 (1,8)	5 (4,6)	1 (0,9)
3	5 (4,6)	3 (2,8)	5 (4,6)	2 (1,8)	7 (6,4)	6 (5,5)	6 (5,5)	8 (7,3)	6 (5,5)	6 (5,5)
4	1 (0,9)	7 (6,4)	7 (6,4)	2 (1,8)	2 (1,8)	6 (5,5)	5 (4,6)	1 (0,9)	4 (3,7)	4 (3,7)
5	2 (1,8)	9 (8,3)	3 (2,8)	4 (3,7)	6 (5,5)	4 (3,7)	2 (1,8)	7 (6,4)	4 (3,7)	5 (4,6)
6	2 (1,8)	9 (8,3)	7 (6,4)	7 (6,4)	6 (5,5)	5 (4,6)	6 (5,5)	8 (7,3)	4 (3,7)	10 (9,2)
8	5 (4,6)	4 (3,7)	3 (2,8)	4 (3,7)	7 (6,4)	2 (1,8)	2 (1,8)	3 (2,8)	2 (1,8)	3 (2,8)
Общо позитивни	20 (18,3)	38 (34,9)	28 (25,7)	25 (22,9)	31 (28,4)	30 (27,5)	28 (25,7)	29 (26,6)	28 (25,7)	30 (27,5)
Не	89 (81,7)	71 (65,1)	81 (74,3)	84 (77,1)	78 (71,6)	79 (72,5)	81 (74,3)	80 (73,4)	81 (74,3)	79 (72,5)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	Cw1	Cw2	Cw9	Cw10	Cw4	Cw5	Cw6
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	0 (0,0)
2	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)
3	0 (0,0)	2 (1,8)	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)
4	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	4 (3,7)	4 (3,7)	2 (1,8)	2 (1,8)
5	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	3 (2,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	3 (2,8)
6	1 (0,9)	1 (0,9)	3 (2,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)
8	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)
Общо позитивни	6 (5,5)	9 (8,3)	11 (10,1)	17 (15,6)	11 (10,1)	10 (9,2)	7 (6,4)
Не	103 (94,5)	100 (91,7)	98 (89,9)	92 (84,4)	98 (89,9)	99 (90,8)	102 (93,6)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	Cw7	Cw8	Cw12	Cw14	Cw15	Cw16	Cw17	Cw18
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)
2	3 (2,8)	3 (2,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)
3	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)	2 (1,8)	1 (0,9)
4	2 (1,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	2 (1,8)	1 (0,9)
5	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	3 (2,8)	1 (0,9)
6	3 (2,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)	3 (2,8)	3 (2,8)
8	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	10 (9,2)	11 (10,1)	8 (7,3)	5 (4,6)	8 (7,3)	3 (2,8)	14 (12,8)	8 (7,3)
Не	99 (90,8)	98 (89,9)	101 (92,7)	104 (95,4)	101 (92,7)	106 (97,2)	95 (87,2)	101 (92,7)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DR1	DR103	DR15	DR16	DR17	DR18
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	3 (2,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	0 (0,0)
2	4 (3,7)	4 (3,7)	3 (2,8)	1 (0,9)	5 (4,6)	3 (2,8)
3	9 (8,3)	2 (1,8)	5 (4,6)	4 (3,7)	6 (5,5)	4 (3,7)
4	3 (2,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	6 (5,5)	2 (1,8)	1 (0,9)
5	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	5 (4,6)	5 (4,6)
6	8 (7,3)	3 (2,8)	8 (7,3)	6 (5,5)	6 (5,5)	5 (4,6)
8	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	30 (27,5)	17 (15,6)	23 (21,1)	24 (22)	25 (22,9)	18 (16,5)
Не	79 (72,5)	92 (84,4)	86 (78,9)	85 (78)	84 (77,1)	91 (83,5)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DR4	DR11	DR12	DR13	DR14	DR140..	DR1404
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	4 (3,7)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
2	2 (1,8)	4 (3,7)	5 (4,6)	5 (4,6)	5 (4,6)	1 (0,9)	2 (1,8)
3	8 (7,3)	8 (7,3)	6 (5,5)	6 (5,5)	5 (4,6)	3 (2,8)	4 (3,7)
4	5 (4,6)	4 (3,7)	7 (6,4)	3 (2,8)	4 (3,7)	0 (0,0)	1 (0,9)
5	9 (8,3)	3 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	6 (5,5)	0 (0,0)	2 (1,8)
6	6 (5,5)	7 (6,4)	5 (4,6)	8 (7,3)	5 (4,6)	0 (0,0)	3 (2,8)
8	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	35 (32,1)	29 (26,6)	27 (24,8)	26 (23,9)	27 (24,8)	4 (3,7)	12 (11)
Не	74 (67,9)	80 (73,4)	82 (75,2)	83 (76,1)	82 (75,2)	105 (96,3)	97 (89)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DR7	DR8	DR9	DR10	DR51	DR52	DR53
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	4 (3,7)	4 (3,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)
2	6 (5,5)	4 (3,7)	6 (5,5)	4 (3,7)	4 (3,7)	3 (2,8)	4 (3,7)
3	7 (6,4)	5 (4,6)	8 (7,3)	3 (2,8)	4 (3,7)	6 (5,5)	3 (2,8)
4	5 (4,6)	6 (5,5)	2 (1,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	4 (3,7)	1 (0,9)
5	0 (0,0)	3 (2,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	4 (3,7)	4 (3,7)	2 (1,8)
6	9 (8,3)	6 (5,5)	11 (10,1)	4 (3,7)	9 (8,3)	4 (3,7)	5 (4,6)
8	0 (0,0)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	31 (28,4)	29 (26,6)	31 (28,4)	14 (12,8)	27 (24,8)	24 (22)	16 (14,7)
Не	78 (71,6)	80 (73,4)	78 (71,6)	95 (87,2)	82 (75,2)	85 (78)	93 (85,3)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DQ 5	DQ 6	DQ 2	DQ 7	DQ 8	DQ 9	DQ 4
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	3 (2,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)
2	1 (0,9)	7 (6,4)	3 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	0 (0,0)	1 (0,9)
3	7 (6,4)	3 (2,8)	4 (3,7)	0 (0,0)	2 (1,8)	5 (4,6)	2 (1,8)
4	1 (0,9)	1 (0,9)	4 (3,7)	3 (2,8)	5 (4,6)	2 (1,8)	3 (2,8)
5	1 (0,9)	3 (2,8)	4 (3,7)	1 (0,9)	2 (1,8)	5 (4,6)	5 (4,6)
6	7 (6,4)	7 (6,4)	4 (3,7)	7 (6,4)	6 (5,5)	3 (2,8)	5 (4,6)
8	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)
Общо позитивни	21 (19,3)	25 (22,9)	20 (18,3)	15 (13,8)	20 (18,3)	18 (16,5)	18 (16,5)
Не	88 (80,7)	84 (77,1)	89 (81,7)	94 (86,2)	89 (81,7)	91 (83,5)	91 (83,5)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DQA1*01: 01	DQA1*01: 02	DQA1*01: 03	DQA1*01: 04	DQA1*02: 01	DQA1*03: 01	DQA1*03: 02
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	2 (1,8)	0 (0,0)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2	1 (0,9)	4 (3,7)	1 (0,9)	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
3	3 (2,8)	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)
4	0 0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)
5	2 (1,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	4 (3,7)
6	7 (6,4)	7 (6,4)	6 (5,5)	6 (5,5)	3 (2,8)	6 (5,5)	4 (3,7)
8	0 0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	15 (13,8)	17 (15,6)	13 (11,9)	14 (12,8)	6 (5,5)	11 (10,1)	9 (8,3)
Не	94 (86,2)	92 (84,4)	96 (88,1)	95 (87,2)	103 (94,5)	98 (89,9)	100 (91,7)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DQA1*03:03	DQA1*04:01	DQA1*05:01	DQA1*05:03	DQA1*05:05	DQA1*06:01	DPB1*01:01	DPB1*02:01
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)
2	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	3 (2,8)	2 (1,8)
3	0 (0,0)	1 (0,9)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)
4	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)	0 (0,0)
5	1 (0,9)	4 (3,7)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)	3 (2,8)	3 (2,8)
6	0 (0,0)	4 (3,7)	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (4,6)	7 (6,4)	4 (3,7)
8	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	1 (0,9)	10 (9,2)	7 (6,4)	1 (0,9)	0 (0,0)	10 (9,2)	16 (14,7)	10 (9,2)
Не	108 (99,1)	99 (90,8)	102 (93,6)	108 (99,1)	0 (0,0)	99 (90,8)	93 (85,3)	99 (90,8)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DPB1*03:01	DPB1*04:01	DPB1*04:02	DPB1*05:01	DPB1*06:01	DPB1*09:01	DPB1*10:01	DPB1*11:01
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,9)
2	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	3 (2,8)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)	1 (0,9)
3	5 (4,6)	0 (0,0)	1 (0,9)	2 (1,8)	3 (2,8)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)
4	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0,0)	1 (0,9)
5	3 (2,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	5 (4,6)	3 (2,8)	1 (0,9)	1 (0,9)	2 (1,8)
6	5 (4,6)	3 (2,8)	2 (1,8)	5 (4,6)	2 (1,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	4 (3,7)
8	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	17 (15,6)	8 (7,3)	7 (6,4)	17 (15,6)	9 (8,3)	7 (6,4)	1 (0,9)	10 (9,2)
Не	92 (84,4)	101 (92,7)	102 (93,6)	92 (84,4)	100 (91,7)	102 (93,6)	108 (99,1)	99 (90,8)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Резултат	DPB1*13:01	DPB1*14:01	DPB1*15:01	DPB1*17:01	DPB1*18:01	DPB1*19:01	DPB1*20:01	DPB1*23:01	DPB1*28:01
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
1	1 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2	5 (4,6)	4 (3,7)	0 (0,0)	5 (4,6)	2 (1,8)	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)
3	2 (1,8)	4 (3,7)	0 (0,0)	4 (3,7)	1 (0,9)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,8)
4	2 (1,8)	1 (0,9)	2 (1,8)	2 (1,8)	0 (0,0)	2 (1,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (3,7)
5	2 (1,8)	2 (1,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	1 (0,9)	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
6	6 (5,5)	4 (3,7)	2 (1,8)	5 (4,6)	3 (2,8)	3 (2,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,8)
8	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Общо позитивни	18 (16,5)	15 (13,8)	5 (4,6)	19 (17,4)	7 (6,4)	16 (14,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	11 (10,1)
Не	91 (83,5)	94 (86,2)	104 (95,4)	90 (82,6)	102 (93,6)	93 (85,3)	109 (100)	109 (100)	98 (89,9)
Общо изследвани	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)	109 (100)

Приложение 3. Изследване на връзката с HLA при пациентите от група IIа

Biserial correlation R_b (p)

Анти-тела	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*
A1	0,006 (0,951)	0,021 (0,832)	0,008 (0,937)	0,175 (0,068)	-0,037 (0,702)	-0,056 (0,565)	-0,067 (0,489)	0,065 (0,502)
A2	0,130 (0,176)	0,026 (0,790)	-0,008 (0,933)	-0,16 (0,097)	0,101 (0,297)	0,171 (0,077)	0,056 (0,56)	0,225 (0,019)
A3	0,039 (0,686)	0,078 (0,418)	-0,102 (0,291)	-0,064 (0,512)	0,067 (0,492)	0,067 (0,488)	-0,071 (0,465)	0,132 (0,174)
A23	0,004 (0,971)	0,046 (0,634)	-0,132 (0,172)	-0,043 (0,659)	-0,061 (0,53)	0,005 (0,959)	-0,032 (0,742)	0,116 (0,233)
A24	-0,140 (0,145)	-0,010 (0,921)	-0,115 (0,234)	-0,012 (0,901)	-0,035 (0,716)	-0,015 (0,877)	0,059 (0,541)	0,084 (0,386)
A2403	-0,048 (0,617)	-0,031 (0,748)	0,023 (0,814)	0,124 (0,198)	-0,082 (0,396)	-0,029 (0,764)	0,03 (0,757)	0,012 (0,901)
A25	-0,04 (0,683)	0,008 (0,935)	-0,196 (0,041)	-0,282 (0,003)	-0,048 (0,623)	0,076 (0,434)	-0,049 (0,61)	0,116 (0,233)
A26	-0,042 (0,664)	-0,001 (0,991)	-0,077 (0,429)	-0,076 (0,432)	-0,081 (0,402)	0,108 (0,264)	-0,147 (0,127)	0,03 (0,758)
A34	0,046 (0,637)	-0,016 (0,873)	0,002 (0,986)	0,065 (0,501)	-0,073 (0,449)	-0,035 (0,718)	-0,005 (0,958)	0,09 (0,352)
A66	-0,006 (0,948)	-0,097 (0,315)	-0,079 (0,413)	-0,05 (0,604)	-0,028 (0,769)	0,059 (0,545)	-0,099 (0,306)	0,012 (0,9)
A11	0,130 (0,177)	0,030 (0,757)	-0,105 (0,277)	-0,087 (0,368)	-0,057 (0,557)	0,029 (0,765)	-0,098 (0,312)	0,029 (0,768)
A29	-0,136 (0,160)	-0,013 (0,894)	-0,102 (0,291)	0,053 (0,585)	0,020 (0,837)	-0,041 (0,673)	-0,026 (0,79)	0,056 (0,567)
A30	-0,002 (0,986)	-0,006 (0,951)	-0,068 (0,483)	-0,047 (0,631)	0,168 (0,081)	0,07 (0,471)	-0,007 (0,946)	0,078 (0,421)
A31	0,052 (0,589)	-0,079 (0,416)	0,027 (0,781)	-0,025 (0,799)	0,072 (0,459)	0,067 (0,494)	0,016 (0,873)	0,09 (0,352)
A32	-0,054 (0,581)	-0,062 (0,525)	-0,128 (0,185)	-0,225 (0,019)	-0,001 (0,993)	0,016 (0,868)	0,085 (0,382)	0,167 (0,084)
A33	0,090 (0,350)	-0,025 (0,795)	0,072 (0,460)	-0,006 (0,954)	0,012 (0,902)	0,165 (0,087)	0,054 (0,578)	0,196 (0,042)
A74	0,044 (0,649)	-0,099 (0,304)	-0,010 (0,916)	-0,014 (0,885)	0,091 (0,346)	0,150 (0,120)	0,074 (0,441)	0,141 (0,146)
A68	0,045 (0,645)	-0,122 (0,206)	-0,009 (0,925)	-0,063 (0,517)	-0,006 (0,947)	0,068 (0,482)	0,053 (0,586)	0,02 (0,837)
A69	0,084 (0,386)	-0,009 (0,923)	-0,022 (0,824)	-0,147 (0,126)	-0,012 (0,899)	0,109 (0,261)	0,06 (0,537)	0,128 (0,186)
A36	0,107 (0,270)	0,075 (0,439)	-0,117 (0,224)	-0,014 (0,887)	-0,028 (0,770)	-0,028 (0,773)	-0,021 (0,827)	0,039 (0,686)
A43	-0,033 (0,732)	-0,051 (0,601)	-0,027 (0,780)	-0,025 (0,794)	-0,084 (0,384)	0,143 (0,139)	-0,023 (0,81)	0,119 (0,222)
A80	0,046 (0,637)	-0,026 (0,788)	-0,018 (0,855)	0,055 (0,571)	0,114 (0,238)	0,041 (0,67)	0 (0,998)	0,012 (0,9)

Анти-тела	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*
B51	-0,017 (0,857)	-0,082 (0,396)	-0,208 (0,03)	-0,354 (0)	0,024 (0,803)	0,008 (0,933)	0,029 (0,762)	0,056 (0,563)
B52	0,021 (0,825)	-0,099 (0,304)	-0,103 (0,286)	-0,232 (0,015)	0,059 (0,543)	0,093 (0,336)	0,047 (0,63)	0,115 (0,238)
B7	0,160 (0,096)	0,055 (0,571)	0,002 (0,984)	0,132 (0,17)	-0,019 (0,844)	0,064 (0,514)	0,047 (0,627)	0,057 (0,557)
B703	0,162 (0,093)	0,095 (0,326)	-0,049 (0,609)	0,105 (0,276)	-0,024 (0,802)	-0,046 (0,634)	-0,058 (0,55)	0,024 (0,809)
B8	0,146 (0,129)	-0,029 (0,763)	0,014 (0,883)	0,107 (0,27)	-0,004 (0,970)	-0,071 (0,466)	0,145 (0,131)	-0,013 (0,893)
B44	0,182 (0,058)	-0,067 (0,491)	-0,101 (0,297)	-0,14 (0,147)	-0,067 (0,491)	0,055 (0,575)	0,06 (0,535)	0,109 (0,262)
B45	0,183 (0,057)	0,016 (0,871)	0,009 (0,928)	-0,003 (0,976)	0,010 (0,916)	0,04 (0,679)	-0,016 (0,871)	-0,018 (0,852)
B13	0,028 (0,772)	-0,146 (0,130)	-0,195 (0,043)	-0,052 (0,592)	-0,086 (0,376)	0,006 (0,948)	-0,116 (0,23)	0,027 (0,781)
B64	0,315 (0,001)	0,012 (0,905)	0,021 (0,826)	-0,023 (0,813)	0,072 (0,455)	0,039 (0,689)	0,141 (0,143)	0,123 (0,206)
B65/1402	0,350 (0,000)	-0,014 (0,882)	0,083 (0,388)	0,066 (0,492)	0,016 (0,871)	-0,016 (0,866)	0,113 (0,243)	0,070 (0,470)
B62/1501	0,076 (0,430)	0,067 (0,488)	0,008 (0,937)	-0,022 (0,821)	0,082 (0,394)	0,039 (0,69)	-0,121 (0,212)	-0,011 (0,912)
B63/15:16	0,025 (0,795)	-0,061 (0,531)	-0,138 (0,153)	-0,300 (0,001)	0,046 (0,635)	0,098 (0,311)	0,029 (0,762)	0,115 (0,238)
B75	0,285 (0,003)	0,167 (0,083)	0,058 (0,547)	-0,061 (0,532)	0,105 (0,276)	0,143 (0,138)	0,058 (0,551)	0,075 (0,439)
B76/1512	0,217 (0,023)	0,200 (0,037)	-0,053 (0,582)	-0,019 (0,844)	-0,018 (0,852)	0,02 (0,839)	-0,095 (0,325)	-0,038 (0,695)
B77	0,031 (0,751)	-0,068 (0,481)	-0,021 (0,827)	-0,249 (0,009)	0,102 (0,290)	0,134 (0,168)	0,081 (0,402)	0,187 (0,052)
B38	0,121 (0,210)	-0,069 (0,475)	-0,050 (0,607)	-0,150 (0,120)	-0,082 (0,397)	0,007 (0,941)	0,098 (0,313)	0,051 (0,604)
B39	0,037 (0,705)	-0,056 (0,560)	-0,050 (0,603)	-0,006 (0,947)	-0,034 (0,727)	-0,068 (0,484)	-0,061 (0,531)	-0,051 (0,597)
B3901	0,335 (0,000)	0,069 (0,477)	0,109 (0,258)	0,118 (0,222)	-0,020 (0,833)	-0,019 (0,845)	0,098 (0,311)	0,062 (0,524)
B3902	-0,053 (0,587)	0,037 (0,703)	-0,088 (0,361)	-0,03 (0,756)	-0,061 (0,531)	0,058 (0,548)	-0,021 (0,831)	0,037 (0,702)
B57	-0,02 (0,837)	-0,020 (0,837)	-0,222 (0,020)	-0,337 (0)	0,062 (0,525)	0,014 (0,882)	-0,021 (0,826)	0,084 (0,386)
B58	0,045 (0,639)	0,003 (0,973)	-0,164 (0,088)	-0,283 (0,003)	0,023 (0,81)	-0,02 (0,837)	-0,021 (0,826)	0,027 (0,78)
B18	0,206 (0,031)	-0,077 (0,424)	0,051 (0,597)	-0,043 (0,66)	0,091 (0,345)	0,064 (0,508)	0,113 (0,243)	0,119 (0,222)
B49	0,025 (0,795)	-0,113 (0,244)	-0,145 (0,134)	-0,279 (0,003)	0,047 (0,629)	0,082 (0,397)	0,051 (0,6)	0,119 (0,219)
B50	0,230 (0,016)	0,106 (0,273)	-0,016 (0,869)	0,016 (0,866)	-0,024 (0,808)	0,064 (0,514)	-0,024 (0,805)	0,057 (0,557)
B54	0,135 (0,162)	0,012 (0,898)	-0,088 (0,365)	-0,088 (0,365)	0,041 (0,671)	0,009 (0,93)	0,031 (0,751)	0,046 (0,634)
B55	0,165 (0,087)	-0,076 (0,429)	-0,160 (0,097)	-0,074 (0,445)	0,068 (0,48)	0,022 (0,825)	0,029 (0,761)	-0,003 (0,973)
B56	0,285 (0,003)	0,117 (0,225)	-0,176 (0,068)	-0,127 (0,19)	0,004 (0,969)	0,006 (0,954)	-0,081 (0,404)	0,012 (0,9)
B27	0,095 (0,324)	-0,097 (0,316)	-0,171 (0,076)	-0,065 (0,5)	-0,004 (0,969)	-0,031 (0,754)	-0,032 (0,742)	-0,032 (0,744)
B2708	0,181 (0,060)	0,031 (0,747)	0,049 (0,611)	0,128 (0,186)	-0,047 (0,628)	-0,011 (0,911)	-0,058 (0,547)	-0,004 (0,963)
B35	0,233 (0,015)	0,089 (0,360)	-0,098 (0,311)	-0,096 (0,322)	0,176 (0,067)	0,078 (0,421)	0,02 (0,834)	-0,035 (0,717)
B37	0,074 (0,442)	-0,067 (0,492)	-0,116 (0,230)	-0,118 (0,223)	0,026 (0,788)	0,02 (0,837)	0,164 (0,088)	0,114 (0,241)
B60	0,147 (0,128)	0,109 (0,258)	-0,160 (0,096)	0,06 (0,533)	0,048 (0,623)	0,027 (0,778)	-0,006 (0,949)	0,042 (0,664)

B61	0,143 (0,137)	0,069 (0,475)	-0,079 (0,413)	0,082 (0,394)	-0,015 (0,88)	-0,005 (0,958)	-0,044 (0,65)	-0,003 (0,973)
B41	0,224 (0,019)	0,023 (0,811)	-0,056 (0,562)	0,031 (0,746)	-0,044 (0,652)	-0,013 (0,895)	-0,014 (0,881)	0,004 (0,969)
B42	0,294 (0,002)	0,05 (0,605)	-0,114 (0,239)	0,023 (0,814)	-0,079 (0,412)	-0,082 (0,398)	0,016 (0,873)	-0,045 (0,642)
B46	-0,016 (0,868)	-0,036 (0,707)	-0,242 (0,011)	-0,125 (0,194)	0,003 (0,975)	-0,039 (0,685)	-0,066 (0,496)	-0,017 (0,863)
B47	0,037 (0,706)	-0,062 (0,519)	-0,112 (0,248)	0,016 (0,866)	-0,055 (0,572)	-0,034 (0,725)	-0,113 (0,244)	0,012 (0,899)
B48	0,190 (0,048)	0,023 (0,811)	-0,089 (0,360)	0,059 (0,541)	-0,095 (0,328)	-0,003 (0,974)	0,005 (0,96)	-0,051 (0,602)
B53	-0,029 (0,762)	-0,063 (0,516)	-0,116 (0,229)	-0,31 (0,001)	0,093 (0,335)	0,168 (0,082)	0,173 (0,073)	0,152 (0,117)
B59	0,146 (0,130)	-0,094 (0,333)	-0,095 (0,326)	-0,186 (0,053)	-0,094 (0,329)	-0,093 (0,338)	-0,013 (0,894)	0,02 (0,836)
B67	0,232 (0,015)	-0,002 (0,984)	-0,061 (0,527)	0,026 (0,788)	-0,052 (0,592)	-0,102 (0,292)	-0,019 (0,845)	-0,087 (0,368)
B71	0,326 (0,001)	0,145 (0,133)	0,022 (0,817)	0,019 (0,846)	0,027 (0,782)	0,038 (0,7)	0,029 (0,761)	-0,003 (0,973)
B72	0,180 (0,061)	0,078 (0,419)	-0,029 (0,764)	0,022 (0,822)	-0,011 (0,908)	-0,001 (0,988)	-0,003 (0,976)	-0,043 (0,662)
B73	0,190 (0,047)	-0,001 (0,989)	-0,032 (0,740)	0,142 (0,14)	-0,023 (0,812)	-0,104 (0,284)	-0,013 (0,894)	0,004 (0,966)
B78	0,189 (0,049)	0,043 (0,658)	-0,040 (0,679)	-0,118 (0,221)	0,115 (0,235)	0,051 (0,6)	0,039 (0,687)	-0,004 (0,97)
B81	0,241 (0,011)	0,041 (0,670)	-0,038 (0,698)	0,107 (0,269)	-0,023 (0,812)	-0,016 (0,869)	0,044 (0,65)	-0,028 (0,775)
B82	0,208 (0,030)	0,084 (0,385)	-0,175 (0,070)	-0,017 (0,863)	0,012 (0,900)	-0,012 (0,9)	-0,04 (0,68)	0,036 (0,715)

Анти-тела	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*
Cw1	0,117 (0,225)	-0,025 (0,795)	-0,002 (0,983)	-0,011 (0,911)	-0,061 (0,529)	0,01 (0,919)	0,021 (0,831)	0,032 (0,74)
Cw2	-0,148 (0,125)	-0,091 (0,344)	-0,204 (0,034)	0,058 (0,549)	-0,038 (0,696)	-0,027 (0,782)	-0,095 (0,327)	-0,011 (0,914)
Cw9	0,185 (0,054)	0,000 (1,000)	-0,034 (0,722)	-0,048 (0,622)	0,106 (0,271)	0,06 (0,536)	0,093 (0,337)	0,106 (0,273)
Cw10	0,169 (0,080)	0,014 (0,884)	-0,120 (0,213)	-0,169 (0,08)	0,079 (0,416)	0,003 (0,972)	0,113 (0,243)	0,109 (0,263)
Cw4	-0,065 (0,500)	0,029 (0,763)	-0,242 (0,011)	-0,072 (0,455)	-0,004 (0,967)	-0,027 (0,779)	-0,045 (0,645)	0,037 (0,703)
Cw5	-0,06 (0,535)	-0,036 (0,714)	-0,238 (0,013)	-0,003 (0,976)	-0,013 (0,894)	-0,114 (0,239)	-0,154 (0,109)	-0,094 (0,331)
Cw6	-0,129 (0,182)	0,063 (0,517)	-0,272 (0,004)	0,005 (0,96)	0,030 (0,757)	-0,066 (0,498)	-0,158 (0,101)	0,016 (0,869)
Cw7	-0,094 (0,332)	-0,175 (0,068)	0,107 (0,269)	0,085 (0,379)	0,037 (0,699)	-0,006 (0,948)	0,19 (0,048)	0,002 (0,982)
Cw8	0,135 (0,161)	-0,022 (0,818)	-0,127 (0,187)	-0,119 (0,22)	0,037 (0,699)	-0,003 (0,972)	0,038 (0,696)	0,083 (0,391)
Cw12	0,125 (0,195)	-0,056 (0,56)	-0,009 (0,924)	0,016 (0,872)	0,086 (0,375)	-0,087 (0,373)	0,035 (0,72)	0,002 (0,984)
Cw14	0,266 (0,005)	-0,032 (0,742)	0,027 (0,783)	0,002 (0,985)	0,081 (0,405)	0,042 (0,67)	0,072 (0,46)	0,018 (0,852)
Cw15	-0,014 (0,882)	-0,047 (0,631)	-0,128 (0,185)	0,056 (0,56)	0,038 (0,695)	-0,105 (0,28)	-0,061 (0,531)	0,029 (0,768)
Cw16	-0,076 (0,434)	-0,172 (0,073)	0,031 (0,746)	-0,028 (0,775)	-0,055 (0,569)	-0,118 (0,225)	-0,036 (0,708)	-0,105 (0,278)
Cw17	-0,061 (0,526)	0,001 (0,995)	-0,185 (0,054)	0,005 (0,961)	0,081 (0,401)	0,033 (0,738)	0,066 (0,496)	0,169 (0,08)
Cw18	-0,021 (0,827)	0,084 (0,383)	-0,286 (0,003)	-0,006 (0,947)	-0,114 (0,240)	-0,123 (0,204)	-0,092 (0,34)	0,029 (0,768)

Анти-тела	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*
DR1	0,025 (0,798)	-0,009 (0,929)	-0,177 (0,065)	-0,019 (0,848)	0,142 (0,139)	0,036 (0,71)	-0,059 (0,546)	0,051 (0,599)
DR103	0,164 (0,089)	0,091 (0,346)	0,074 (0,447)	0,037 (0,702)	0,176 (0,067)	0,109 (0,261)	0,113 (0,243)	0,09 (0,357)
DR15	0,094 (0,333)	0,088 (0,360)	-0,118 (0,221)	0,023 (0,813)	0,041 (0,671)	-0,05 (0,605)	-0,010 (0,919)	-0,039 (0,688)
DR16	-0,044 (0,648)	-0,002 (0,986)	-0,112 (0,245)	0,004 (0,969)	-0,004 (0,970)	-0,007 (0,942)	0,045 (0,639)	0,054 (0,577)
DR17	0,075 (0,436)	-0,168 (0,081)	0,089 (0,358)	0,211 (0,027)	-0,007 (0,939)	-0,228 (0,018)	0,060 (0,537)	-0,104 (0,284)
DR18	0,072 (0,455)	-0,152 (0,114)	0,096 (0,322)	0,201 (0,036)	-0,051 (0,601)	-0,234 (0,015)	0,016 (0,871)	-0,110 (0,259)
DR4	-0,133 (0,169)	-0,284 (0,003)	-0,073 (0,448)	-0,07 (0,472)	0,119 (0,218)	0,094 (0,331)	0,012 (0,905)	0,087 (0,370)
DR11	0,073 (0,454)	-0,193 (0,044)	0,085 (0,378)	0,138 (0,152)	-0,041 (0,676)	-0,194 (0,045)	0,077 (0,429)	-0,067 (0,492)
DR12	-0,108 (0,263)	-0,141 (0,143)	-0,190 (0,048)	-0,062 (0,522)	0,005 (0,963)	-0,129 (0,182)	-0,008 (0,931)	-0,101 (0,298)
DR13	0,011 (0,913)	-0,09 (0,355)	-0,058 (0,551)	-0,012 (0,903)	0,033 (0,735)	-0,200 (0,038)	0,016 (0,873)	-0,143 (0,139)
DR14	0,112 (0,247)	-0,128 (0,184)	-0,096 (0,321)	0,033 (0,733)	-0,048 (0,617)	-0,168 (0,082)	-0,008 (0,931)	-0,101 (0,298)
DR140..	0,162 (0,092)	-0,085 (0,382)	0,052 (0,590)	0,013 (0,893)	-0,101 (0,297)	-0,124 (0,202)	-0,086 (0,374)	-0,110 (0,258)
DR1404	-0,002 (0,981)	-0,179 (0,063)	0,073 (0,449)	0,162 (0,092)	-0,062 (0,521)	-0,223 (0,020)	-0,023 (0,814)	-0,131 (0,176)
DR7	0,031 (0,748)	-0,096 (0,321)	-0,017 (0,860)	0,070 (0,471)	0,197 (0,040)	0,080 (0,410)	0,250 (0,009)	0,151 (0,118)
DR8	0,028 (0,770)	-0,213 (0,026)	-0,027 (0,784)	0,060 (0,535)	0,002 (0,985)	-0,280 (0,003)	0,020 (0,834)	-0,177 (0,066)
DR9	0,000 (0,997)	-0,073 (0,451)	-0,135 (0,163)	0,008 (0,935)	0,031 (0,745)	-0,053 (0,586)	-0,081 (0,404)	-0,019 (0,847)
DR10	-0,051 (0,600)	-0,084 (0,383)	-0,108 (0,263)	-0,079 (0,417)	0,001 (0,996)	0,054 (0,578)	-0,182 (0,059)	-0,018 (0,852)
DR51	0,013 (0,892)	-0,059 (0,545)	-0,023 (0,815)	-0,073 (0,448)	0,139 (0,148)	0,049 (0,617)	0,011 (0,912)	0,012 (0,901)
DR52	-0,014 (0,883)	-0,218 (0,023)	0,070 (0,467)	0,130 (0,177)	0,006 (0,947)	-0,082 (0,397)	0,025 (0,793)	0,004 (0,969)
DR53	0,099 (0,304)	0,037 (0,705)	-0,044 (0,651)	-0,040 (0,683)	0,109 (0,260)	0,123 (0,204)	0,028 (0,775)	0,141 (0,146)
DQ 5	-0,026 (0,786)	-0,109 (0,261)	-0,102 (0,290)	-0,066 (0,497)	0,030 (0,760)	-0,172 (0,076)	-0,231 (0,016)	-0,394 (0.000)
DQ 6	0,042 (0,667)	-0,035 (0,717)	-0,104 (0,283)	-0,062 (0,524)	-0,027 (0,779)	-0,308 (0,001)	-0,177 (0,066)	-0,436 (0.000)
DQ 2	-0,028 (0,776)	-0,151 (0,118)	-0,058 (0,550)	0,051 (0,601)	0,099 (0,306)	-0,028 (0,773)	0,090 (0,349)	-0,015 (0,880)
DQ 7	0,122 (0,207)	-0,115 (0,233)	0,133 (0,167)	0,032 (0,741)	0,098 (0,309)	-0,036 (0,713)	0,226 (0,018)	0,013 (0,894)
DQ 8	0,103 (0,286)	-0,165 (0,086)	0,064 (0,510)	-0,034 (0,725)	0,196 (0,042)	0,090 (0,355)	0,155 (0,108)	-0,051 (0,602)
DQ 9	0,13 (0,179)	-0,161 (0,095)	0,080 (0,410)	0,037 (0,700)	0,151 (0,117)	0,064 (0,513)	0,127 (0,187)	-0,072 (0,459)
DQ 4	-0,018 (0,849)	-0,087 (0,370)	0,017 (0,860)	0,040 (0,683)	0,173 (0,071)	-0,008 (0,938)	-0,051 (0,597)	-0,203 (0,035)

Антите-ла	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1*	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DQB1*
DQA1*01:01	0,052 (0,590)	-0,039 (0,690)	-0,043 (0,656)	-0,023 (0,814)	0,002 (0,985)	-0,140 (0,148)	-0,158 (0,101)	-0,25 (0,009)
DQA1*01:02	0,022 (0,822)	-0,103 (0,287)	-0,027 (0,784)	-0,010 (0,915)	0,021 (0,825)	-0,149 (0,124)	-0,184 (0,056)	-0,353 (0.000)
DQA1*01:03	-0,042 (0,662)	-0,045 (0,640)	-0,036 (0,709)	0,024 (0,805)	0,018 (0,850)	-0,183 (0,057)	-0,156 (0,106)	-0,331 (0.000)
DQA1*01:04	0,005 (0,959)	-0,015 (0,879)	-0,087 (0,369)	-0,020 (0,838)	-0,049 (0,611)	-0,154 (0,112)	-0,182 (0,059)	-0,289 (0,002)
DQA1*02:01	-0,019 (0,844)	-0,016 (0,868)	-0,065 (0,504)	0,122 (0,206)	0,085 (0,380)	-0,032 (0,741)	-0,125 (0,197)	-0,273 (0,004)
DQA1*03:01	0,005 (0,956)	-0,115 (0,233)	0,031 (0,750)	0,020 (0,834)	0,086 (0,375)	0,036 (0,709)	-0,017 (0,86)	-0,102 (0,295)
DQA1*03:02	0,029 (0,761)	-0,106 (0,271)	0,030 (0,757)	0,079 (0,415)	0,030 (0,756)	0,104 (0,285)	0,056 (0,565)	0,015 (0,879)
DQA1*03:03	-0,034 (0,726)	-0,001 (0,992)	-0,120 (0,216)	-0,262 (0,006)	-0,082 (0,394)	-0,118 (0,225)	-0,108 (0,266)	-0,182 (0,059)
DQA1*04:01	-0,072 (0,455)	-0,100 (0,301)	-0,071 (0,465)	-0,037 (0,702)	0,052 (0,592)	-0,181 (0,061)	-0,126 (0,192)	-0,263 (0,006)
DQA1*05:01	0,179 (0,063)	-0,009 (0,926)	0,136 (0,158)	0,132 (0,171)	0,039 (0,691)	0,032 (0,742)	0,112 (0,244)	0,158 (0,102)
DQA1*05:03	-0,043 (0,655)	0,048 (0,621)	-0,076 (0,434)	0,064 (0,505)	-0,061 (0,531)	-0,193 (0,045)	-0,021 (0,831)	-0,109 (0,262)
DQA1*06:01	-0,075 (0,436)	-0,147 (0,128)	0,020 (0,836)	-0,031 (0,746)	0,109 (0,257)	-0,106 (0,275)	0,075 (0,438)	-0,094 (0,331)
DPB1*01:01	-0,119 (0,218)	-0,129 (0,183)	-0,064 (0,508)	-0,095 (0,325)	0,150 (0,120)	-0,067 (0,494)	-0,019 (0,844)	-0,135 (0,164)
DPB1*02:01	-0,057 (0,557)	-0,107 (0,267)	0,004 (0,971)	-0,046 (0,638)	0,081 (0,404)	-0,064 (0,507)	-0,011 (0,909)	-0,094 (0,331)
DPB1*03:01	-0,056 (0,560)	-0,009 (0,928)	0,010 (0,921)	-0,026 (0,787)	0,182 (0,058)	-0,023 (0,813)	-0,07 (0,471)	0,013 (0,897)
DPB1*04:01	-0,025 (0,800)	-0,152 (0,115)	0,114 (0,237)	-0,082 (0,397)	0,062 (0,523)	0,061 (0,533)	0,098 (0,31)	0,029 (0,768)
DPB1*04:02	-0,042 (0,666)	0,018 (0,849)	-0,119 (0,219)	-0,075 (0,436)	0,055 (0,567)	-0,115 (0,237)	0,011 (0,908)	-0,069 (0,476)
DPB1*05:01	-0,003 (0,978)	-0,089 (0,360)	0,034 (0,724)	-0,037 (0,699)	0,170 (0,076)	0,017 (0,865)	-0,047 (0,628)	0,013 (0,897)
DPB1*06:01	-0,145 (0,133)	0,004 (0,964)	-0,022 (0,821)	-0,058 (0,548)	0,174 (0,071)	-0,044 (0,649)	-0,035 (0,722)	-0,036 (0,712)
DPB1*09:01	-0,038 (0,693)	0,099 (0,308)	-0,014 (0,882)	-0,039 (0,69)	0,098 (0,311)	-0,027 (0,784)	-0,023 (0,815)	0,073 (0,453)
DPB1*10:01	-0,043 (0,655)	0,015 (0,875)	0,049 (0,612)	-0,047 (0,625)	0,136 (0,160)	0,033 (0,732)	0,240 (0,012)	0,110 (0,256)
DPB1*11:01	0,023 (0,812)	-0,157 (0,102)	0,059 (0,541)	-0,054 (0,576)	0,066 (0,494)	0,019 (0,848)	-0,040 (0,682)	0,026 (0,786)
DPB1*13:01	-0,073 (0,448)	-0,097 (0,318)	-0,023 (0,813)	-0,071 (0,464)	0,112 (0,247)	-0,053 (0,587)	-0,029 (0,766)	-0,034 (0,724)
DPB1*14:01	-0,061 (0,527)	0,054 (0,574)	-0,045 (0,643)	-0,013 (0,891)	0,147 (0,128)	-0,043 (0,660)	-0,062 (0,522)	-0,007 (0,940)
DPB1*15:01	-0,010 (0,921)	-0,106 (0,272)	0,095 (0,326)	-0,112 (0,247)	-0,059 (0,545)	-0,004 (0,964)	0,111 (0,250)	0,052 (0,597)
DPB1*17:01	-0,080 (0,406)	-0,024 (0,806)	-0,035 (0,716)	-0,032 (0,745)	0,176 (0,067)	-0,031 (0,753)	-0,099 (0,306)	-0,043 (0,661)
DPB1*18:01	-0,049 (0,612)	-0,081 (0,404)	0,022 (0,819)	-0,025 (0,795)	-0,029 (0,762)	-0,105 (0,279)	-0,090 (0,351)	-0,126 (0,193)
DPB1*19:01	-0,076 (0,430)	-0,035 (0,718)	-0,051 (0,601)	-0,023 (0,81)	0,079 (0,412)	-0,019 (0,845)	-0,089 (0,356)	-0,056 (0,564)

Приложение 4. Алгоритъм за оценка на риск от имунологично отхвърляне на присадката

Реципиент

I. Демографски, клинични и други фактори (неимунологични): хрониодиализа, пред диализа, време на чакане в листата, възраст, първична причина за ХБН, опасения от неспазване на имуносупресивното лечение, съпътстващи заболявания; повишен риск от развитие на инфекции;

II. Имунологични фактори

1. Оценка по HLA системата:

HLA типизиране по HLA-A, -B, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1 -NGS

2. Скрининг за алоантитела клас I и II.

При положителен резултат, определяне на специфичности (HLA-A, B, C, DQA1, DQB1, DPA1 и DPB1) чрез SAB анализ.

3. Определяне на неприемливите антигени – индивидуална оценка на HLA антигени, които са неприемливи, като се вземе предвид:

a. Анамнеза за сенсибилизация – кръвопреливане; бременност (възраст на най-малкото дете); предишни трансплантации (HLA на донора).
b. HLA специфичности на алоантителата – сила и стабилност във времето (намаляващи или нарастващи)
c. Други антигени, които са в една CREG група

4. Оценка на алоантителния статус на пациента на всеки 4 месеца, както и 14 дни след сенсибилизиращо събитие

Донор

I. Кръвна група

II. HLA типизиране по HLA-A, -B, -C, -DQA1, -DQB1, -DPA1 и -DPB1

III. Търсене на съвместим реципиент

Определяне на имунологичния риск:

I. Контраиндикация за трансплантация от този донор:

Високи стойности на DSA HLA IgG антитела, присъстващи в серума на потенциалния реципиент, показващи положителен VXM и реален FCXM. Висок риск от свръхостро отхвърляне.

II. Висок имунологичен риск:

Наличие на DSA HLA IgG антитела с по-ниски MFI стойности, присъстващи в серума на реципиента и даващи положителен VXM и реален FCXM. Повишен риск от антитяло-медиирана реакция на отхвърляне. Може да е уместно провеждане на десенсибилизираща терапия преди трансплантация.

III. Умерен имунологичен риск:

Наличие на не-DSA HLA IgG антитела, антитела към CREG специфичности, присъстващи в серума на реципиента и даващи отрицателен VXM и положителен реален FCXM. Риск от антитяло медиирана реакция на отхвърляне

IV. Стандартен имунологичен риск:

Липса на DSA HLA IgG антитела в серум от реципиента с давност не по-голяма от 3 месеца и даващи отрицателен VXM и реален FCXM. Пациентът има най-нисък риск за развитие на AMR на отхвърляне. Въпреки това пациентът може да развие антитяло-медиирано отхвърляне. Остава рискът от de novo синтез на алоантитела и/или рестимулиране на паметови B-клетки, ако пациентът е имал сенсибилизиращо събитие.

11. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Simonsen M. Biological incompatibility in kidney transplantation in dogs. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. 1953;32:1-84.
2. Dempster WJ. Kidney homotransplantion. British Journal of Surgery. 1953;40:447.
3. Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. Journal of Anatomy. 1943;77:299-310.
4. Merrill JP, Murray JE, Harrison JE et al. Successful homotransplantations of the human kidney between identical twins. JAMA: J Am Med Assoc. 1956;160:277-282.
5. Van Rood JJ, Van Leeuwen A. Leukocyte grouping. A method and its application. J Clin Invest. 1963;42:1382.
6. Terasaki PI, Mickey MR, Kreisler M. Presensitization and kidney transplant failures. Postgrad Med J. 1971;47:89.
7. Barnardo MC, Harmer AW, Shaw OJ et al. Detection of HLA-specific IgG antibodies using single recombinant HLA alleles. Transplantation. 2000; 70: 531.
8. Pei R, Lee JH, Shih NJ et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. Transplantation. 2003;75:43.
9. Clark BD, Leong S-W. Crossmatch prediction of highly sensitized patients. In: Terasaki PI, Cecka JM, eds. Clinical transplants 1992. Los Angeles, CA, UCLA Tissue Typing Laboratory, 1992, 435.
10. Takemoto S, Terasaki PI. HLA compatibility can be predicted by matching only three residues with outward oriented sidechains. Transplant Proc. 1996; 28: 1264.
11. Duquesnoy RJ, Marrari M. HLAMatchmaker: 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.
12. Duquesnoy RJ, Marrari M. HLAMatchmaker: A Molecularly Based Algorithm for Histocompatibility Determination. V. Eplet Matching for HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP. Hum Immunol. 2007 January; 68(1): 12-25
13. IMGT/HLA Database. Available from: http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/
14. Horton R, Wilming L, Rand V et al. Gene map of the extended human MHC. Nature Reviews. Genetics. 2004;5:889-899.
15. Prugnolle F, Manica A, Charpentier M et al. Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. Current Biology. 2005;15:1022-1027.
16. Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Nature. 1975;256:50-52.
17. Наумова Е, Иванова М. Главен комплекс на тъканна съвместимост – факти, хипотези, приложение в медицината. София, Лице. 2006.
18. Marino J, Paster J, Benichou G. Allorecognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. Front Immunol. 2016 Dec 14;7:582. doi: 10.3389/fimmu.2016.00582.
19. Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. Am J Transplant. 2010 Jan;10(1):26-9. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02927.x. Epub 2009 Dec 2.

20. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL et al. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. Am J Transplant. 2011 Apr;11(4):719-24. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03340.x. Epub 2010 Nov 29.

21. El-Awar N, Jucaud V, Nguyen A. HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined. J Immunol Res. 2017;2017:3406230. doi: 10.1155/2017/3406230. Epub 2017 May 24.

22. Duquesnoy RJ. Epitope-based human leukocyte antigen matching for transplantation. Curr Opin Organ Transplant, 2014; 19(4), 418-419.

23. Duquesnoy RJ., HLA epitope based matching for transplantation. Transplant Immunology. 2014; 31(1), 1-6.

24. Wiebe C, Pochinco D, Blydt-Hansen TD et al. Class II HLA epitope matching-a strategy to minimize de novo donor-specific antibody development and improve outcomes. Am J Transplant, 2013; 13(12), 3114-3122.

25. Opelz G. Döhler, B. Association of HLA mismatch with death with a functioning graft after kidney transplantation: A collaborative transplant study report. Am J Transplant. 2012, 12, 3031-3038.

26. Opelz G, Wujciak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. Rev Immunogenet. 1999;1(3):334-42.

27. Willicombe M, Brookes P, Sergeant R et al. De novo dq donor-specific antibodies are associated with a significant risk of antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. Transplantation 2012;94:172-177. doi:10.1097/TP.0b013e3182543950.

28. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. Transplantation 2013;95:410-417. doi:10.1097/TP.0b013e31827d62e3.

29. Mickey R. Donor pool sizes for HLA matching. Transfusion. 1989 May;29(4):285-6. doi: 10.1046/j.1537-2995.1989.29489242790.x.

30. Duquesnoy RJ, Marrari M. HLAMatchmaker: Eplet-Based HLA Class II Matching for Transplantation: Design of a Repertoire of Interlocus Eplets Shared between HLA-DR, -DQ and –DP Alleles. OBM Transplantation. 2020, 4(1). doi:10.21926/obm.transplant.2001099.

31. Johnston TD, Thacker LR, Jeon H et al. Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time. Clin Transplant. 2004; 18(Suppl 12):28-32. doi: 10.1111/j.1399-0012.2004.00214.x.

32. Ferrer F, Mota A, Alves R et al. Renal transplantation with expanded criteria donors: the experience of one Portuguese center. Transplant Proc. 2009 Apr;41(3):791-3. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.02.044.

33. Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, Gentil-Govantes MA et al. Influence of donor specific HLA antibodies detected by Luminex in kidney graft survival: a multivariate analysis. Hum Immunol. 2013 May;74(5):545-9. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.010. Epub 2013 Jan 29.

34. Giblin L, O'Kelly P, Little D et al. A comparison of long-term graft survival rates between the first and second donor kidney transplanted – the effect of a longer cold

ischaemic time for the second kidney. Am J Transplant. 2005 May;5(5):1071-5. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.00798.x.

35. Lum EL, Homkrailas P, Abdalla B et al. Cold Ischemia Time, Kidney Donor Profile Index, and Kidney Transplant Outcomes: A Cohort Study. Kidney Med. 2022 Nov 13;5(1):100570. doi: 10.1016/j.xkme.2022.100570.
36. Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R et al. Risk factors for slow graft function after kidney transplants: A multivariate analysis. Clin Transplant, 2002; 16: 425-29.
37. Wang CJ, Tuffaha A, Phadnis MA et asl. Association of Slow Graft Function with Long-Term Outcomes in Kidney Transplant Recipients. Ann Transplant. 2018 Apr 3;23:224-231. doi: 10.12659/AOT.907397.
38. Peruzzi L, Deaglio S. Rejection markers in kidney transplantation: do new technologies help children?. Pediatr Nephrol. 2023;38, 2939-2955. https://doi.org/10.1007/s00467-022-05872-z.
39. Rusai K, Dworak J, Potemkina A et al. Donor-specific HLA antibodies and graft function in kidney-transplanted children - the Vienna cohort. Pediatr Transplant. 2016 Jun;20(4):507-14. doi: 10.1111/petr.12707. Epub 2016 Apr 19.
40. Matthew EJ, Rebellato LM, Haisch CE et al. Terasaki, Paul I.1. Impact of IgM and IgG3 Anti-HLA Alloantibodies in Primary Renal Allograft Recipients. Transplantation. 97(5):p 494-501, March 15, 2014. | DOI: 10.1097/01.TP.0000441362.11232.48.
41. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. Nature Reviews. Immunology. 2005;5:793-806.
42. van Bergen J, Thompson A, Haasnoot GW et al. KIR-ligand mismatches are associated with reduced long-term graft survival in HLA-compatible kidney transplantation. Am J Transplant. 2011;11:1959-1964.
43. Rajalingam R, Gebel HM. KIR-HLA mismatching in human renal allograft transplantation: emergence of a new concept. Am J Transplant. 2011;11:1771-1772.
44. Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF et al. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. Transplantation. 2007;84:1527-1533.
45. Vampa ML, Norman PJ, Burnapp L et al. Natural killer-cell activity after human renal transplantation in relation to killer immunoglobulin-like receptors and human leukocyte antigen mismatch. Transplantation. 2003;76:1220-1228.
46. Bordron A, Revelen R, D'Arbonneau F, et al. Functional heterogeneity of anti-endothelial cell antibodies. Clin Experim Immunol. 2001; 124:492-501.
47. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. Transplantation. 2001;71:886-892.
48. Tanaka M, Zwierzchoniewska M, Mokhtari GK et al. Progression of alloresponse and tissue-specific immunity during graft coronary artery disease. Am J Transplant. 2005;5:1286-1296.
49. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. J Clin Investigat. 2007;117:3498-3506.

50. Goers TA, Ramachandran S, Aloush A et al. De novo production of K-alpha1 tubulin-specific antibodies: role in chronic lung allograft rejection. J Immunol. 2008;180:4487-4494.

51. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. New England J Med. 2005;352:558-569.

52. Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. Am J Transplant. 2005;5:383-393.

53. Pearl MH, Grotts J, Rossetti M et al. Cytokine profiles associated with angiotensin II type 1 receptor antibodies. Kidney Int Rep. 2019;4:541-550.

54. Taniguchi M, Rebellato LM, Cai Jet al. Higher risk of kidney graft failure in the presence of antiangiotensin II type-1 receptor antibodies. Am J Transplant. 2013;13:2577-2589.

55. Malheiro J, Tafulo S, Dias L, et al. Deleterious effect of anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies detected pretransplant on kidney graft outcomes is both proper and synergistic with donor-specific anti-HLA antibodies [e-pub ahead of print]. Nephrology (Carlton). https://doi.org/10.1111/nep. 13239. Accessed December 17, 2018.

56.Naemi FM, Carter V, Kirby JA et al. Anti-donor HLA class I antibodies:pathways to endothelial cell activation and cellmediated allograft rejection. Transplantation. 2013;96:258-266.

57. Lion J, Taflin C, Cross AR et al. HLA class II antibody activation of endothelial cells promotes Th17 and disrupts regulatory T lymphocyte expansion. Am J Transplant. 2016;16: 1408-1420.

58. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. Kidney Int. 2016; 90: 280-88.

59. Cardinal H, Dieude M, Hebert MJ. The Emerging Importance of Non-HLA Autoantibodies in Kidney Transplant Complications. J Am Soc Nephrol. 2017; 28: 400-06.

60. Philogene MC, Bagnasco S, Kraus ES et al. Anti-Angiotensin II Type 1 Receptor and Anti-Endothelial Cell Antibodies: A CrossSectional Analysis of Pathological Findings in Allograft Biopsies. Transplantation. 2017; 101: 608-15.

61. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A et al. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. Human Immunology. 2002;63:30-39.

62. Baranwal AK, Mehra NK. Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related A (MICA) Molecules: Relevance in Solid Organ Transplantation. Frontiers in immunology. 2017, 8, art.182.

63. Zou Y, Stastny P, Susal C et al. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. N Engl J Med (2007) 357:1293-300. doi:10.1056/NEJMoa067160.

64. Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E et al. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. J Immunol. 2001;166:973-981.

65. Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity. Nature Reviews Immunology. 2007;7:942-953.

66. Paludan C, Schmid D, Landthaler M et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. Science. 2005;307:593-596.

67. Christian Münz. Antigen processing for MHC class II presentation via autophagy. Frontiers in immunology. 2012, 3, art. 9.

68. Ackerman AL, Giodini A, Cresswell P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. Immunity. 2006;25:607-617.

69. Li XC, Rothstein DM, Sayegh MH. Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments. Immunol Rev. 2009;229:271-293.

70. Yeung MY, McGrath M, Najafian N. The emerging role of the TIM molecules in transplantation. Am J Transplant. 2012, 2011;11:2019.

71. Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. Nat Immunol. 2005 May; 6(5):447-54.

72. Schroppel B, Kruger B, Walsh L et al. Tubular expression of KIM-1 does not predict delayed function after transplantation. J Am Soc Nephrol. Mar; 21(3): 536-42.

73. Nijboer WN, Schuurs TA, Damman J et al. Kidney injury molecule-1 is an early noninvasive indicator for donor brain death-induced injury prior to kidney transplantation. Am J Transplant. 2009 Aug; 9(8):1752-9.

74. Van Timmeren MM, Vaidya VS, van Ree RM et al. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. Transplantation. 2007 Dec 27; 84(12):1625-30.

75. Szeto CC, Kwan BC, Lai KB et al. Urinary expression of kidney injury markers in renal transplant recipients. Clin J Am Soc Nephrol. Dec; 5(12):2329.

76. Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G et al. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. Transplantation. 2008 Dec 27; 86(12):1869-74.

77. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA et al. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. Am J Transplant. 2007 Jun; 7(6):1661-5.

78. Kerem A, Behdad A, Graham L et al. Relative roles of Th1 and Th17 effector cells in allograft rejection. Current Opinion in Organ Transplantation 2009, 14:23-29.

79. Byung Ha Chung, Chul Woo Yang, Mi-La Cho. Clinical significance of Th17 cells in kidney transplantation. Korean J Intern Med. 2018;33:860-866.

80. Kuchroo VK, Awasthi A. Emerging new roles of Th17 cells. Eur J Immunol. 2012;42:2211-2214.

81. Chung BH, Oh HJ, Piao SG et al. Higher infiltration by Th17 cells compared with regulatory T cells is associated with severe acute T-cell-mediated graft rejection. Exp Mol Med. 2011;43:630-637.

82. Chung BH, Kim KW, Kim BM et al. Increase of Th17 cell phenotype in kidney transplant recipients with chronic allograft dysfunction. PLoS One. 2015;10:e0145258.

83. Youssra Haouami et al.The role of IL-23/IL-17 axis in human kidney allograft rejection. J Leukoc Biol. 2018;1-11.

84. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. Nature Reviews. Immunology. 2008;8:34-47.

85. Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y et al. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. J Experim Med. 2009;206:2779-2793.

86. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. An Rev Immunol. 2007;25:21-50.

87. Stites E, Le Quintrec M, Thurman JM. The Complement System and Antibody-Mediated Transplant Rejection. J Immunol. 2015; 195:5525-5531.

88. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. Transplantation. 2013;95: 410-417.

89. Cravedi P, Heeger PS. Complement as a multifaceted modulator of kidney transplant injury. J Clin Invest. 2014;124: 2348-2354.

90. Haas M, Sis B, Racusen LC et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibodyassociated arterial lesions. Am. J. Transplant. 2014;14: 272-283.

91. Blume O, Yost S, Kaplan B. Antibody-Mediated Rejection: Pathogenesis, Prevention, Treatment, and Outcomes. J Transplant. 2012,Vol. Art. ID 201754, 7.

92. Jackson AM, Sigdel TK, Delville M et al. Endothelial cell antibodies associated with novel targets and increased rejection. J Am Soc Nephrol. 2015;26: 1161-1171.

93. Eikmans M, Waanders MM, Roelen DL et al. Differential effect of pretransplant blood transfusions on immune effector and regulatory compartments in HLA-sensitized and nonsensitized recipients. Transplantation. 2010;90(11), 1192-1199.

94. Einecke G, Sis B, Reeve J et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. Am J Transplant. 2009; 9: 2520-2531.

95. Duquesnoy RJ, Mostecki J, Hariharan J et al. Structurally based epitope analysis of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) antibody specificity patterns. Human Immunology. 2008;69(12), 826-832.

96. Zhang M, Lu F-M, Qu L-X et al. Serum major-histocompatibility-complex class Irelated chain a antibody detection for the evaluation of graft dysfunction in renal allograft recipients. Chin Med J. 2011; 124(14), 2127-2131.

97. Everly MJ, Everly JJ, Arend L J et al. Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. Am J Transplant. 2009; 9(5), 1063-1071.

98. Everly MJ, Terasaki PI. Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. Human Immunol, 2009; 70(8), 655-659.

99. Otten HG, Verhaar MC, Borst HP et al. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. Am J Transplant. 2012; 12: 1618-1623.

100. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. Am J Transplant. 2011;11: 2132-2143.

101. Tait BD, S€usal C, Gebel HM et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. Transplantation. 2013;95: 19-47.

102. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M et al. Detection of C3dbinding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. J Am Soc Nephrol. 2015; 26: 457-467.

103. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. J Am Soc Nephrol. 2015. DOI: 10.1681/ASN.2014111120.

104. Yell M, Muth BL, Kaufman DB et al. C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. Transplantation, 2015;99: 1151-1155.

105. Locke JE, Magro CM, Singer AL et al. The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2009;9: 231-235.

106. Kocak B, Arpali E, Demiralp E et al. Eculizumab for salvage treatment of refractory antibody-mediated rejection in kidney transplant patients: case reports. Transplant Proc. 2013;45: 1022-1025.

107. Orandi BJ, Zachary AA, Dagher NN et al. Eculizumab and splenectomy as salvage therapy for severe antibodymediated rejection after HLA-incompatible kidney transplantation. Transplantation, 2014;98: 857-863.

108. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ et al. Positive crossmatch kidney transplant recipients treated with eculizumab: outcomes beyond 1 year. Am J Transplant. 2015;15: 1293-1302.

109. Marks WH. C10- 001 Study Group. Safety and efficacy of eculizumab in the prevention of antibody- mediated rejection in living- donor kidney transplant recipients requiring desensitization therapy: A randomized trial. Am J Transplant. 2019;19:2876-2888.

110. Cazarote HB et al. Complement-fixing donor-specific anti-HLA antibodies and kidney allograft failure. Transplant Immunol. 2018. https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.03.002.

111. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. New En J Med. 1969;280:735-739.

112. Williams GM. Clinical aspects of allograft rejection. Transplantation Proceedings. 1974;6 (4 Suppl. 1):71-77.

113. Sellares J et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibodymediated rejection and nonadherence. Am J Transplant. 2012;12(2):388-399.

114. Wan SS et al. The treatment of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: An updated systematic review and meta-analysis. Transplantation. 2018;102(4):557-568.

115. Morozumi K et al. Reviewing the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. Nephrology. 2016;21(Suppl 1):4-8.

116. Racusen LC, Solez K, Colvin RB et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int. 1999; 55:713-23.

117. Haas M, Loupy A, Lefaucheur C et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibodymediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. Am J Transplant. 2018;18: 293-307.

118. Bruneval P, Angelini A, Miller D et al. The XIIIth Banff Conference on Allograft Pathology: the Banff 2015 heart meeting report: improving antibody-mediated

rejection diagnostics: strengths, unmet needs, and future directions. Am J Transplant. 2017;17:42-53.

119. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. Lancet. 2013;381:313-9.

120. Orandi BJ et al. Presentation and outcomes of C4d-negative antibodymediated rejection after kidney transplantation. Am J Transplant. 2016;16(1):213-220.

121. Smith RN, Kawai T, Boskovic S et al. Chronic antibody mediated rejection of renal allografts: pathological, serological and immunologic features in nonhuman primates. Am J Transplant. 2006;6:1790-8.

122. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). Am J Transplant. 2011; 11:56-65.

123. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection. Trends Mol Med. 2015;21:319-29.

124. Lefaucheur C, Viglietti D, Hidalgo LG et al. Complement-activating anti-HLA antibodies in kidney transplantation: allograft gene expression profiling and response to treatment. J Am Soc Nephrol. 2018;29:620-35.

125. Sarwal M, Chua M-S, Kambham N et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. N Engl J Med. 2003;349: 125-38.

126. Khatri P, Roedder S, Kimura N et al. A common rejection module (CRM) for acute rejection across multiple organs identifies novel therapeutics for organ transplantation. J Exp Med. 2013;210:2205-21.

127. Tait BD, Süsal C, Gebel HM et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. Transplantation. 2013;95:19-47.

128. Viglietti D, Loupy A, Vernerey D et al. Value of donor-specific anti-HLA antibody monitoring and characterization for risk stratification of kidney allograft loss. J Am Soc Nephrol. 2017;28:702-15

129. Viglietti D, Loupy A, Aubert O et al. Dynamic prognostic score to predict kidney allograft survival in patients with antibody-mediated rejection. J Am Soc Nephrol. 2018;29:606-19.

130. Bailly E, Anglicheau D, Blancho G et al. Prognostic value of the persistence of C1q-binding anti-HLA antibodies in acute antibody-mediated rejection in kidney transplantation. Transplantation. 2018; 102:688-98.

131. Ramon DS, Huang Y, Zhao L et al. Use of complement binding assays to assess the efficacy of antibody mediated rejection therapy and prediction of graft survival in kidney transplantation. Hum Immunol. 2017;78:57-63.

132. Viglietti D, Bouatou Y, Kheav VD et al.The New England Journal of Medicine Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts Complement-binding anti-HLA antibodies are independent predictors of response to treatment in kidney recipients with antibody-mediated rejection. Kidney International. (2018) 94, 773-787.

133. Loupy A, Lefaucheur C. Antibodymediated rejection of solid-organ allografts. New En J Med. 2018;379(12):1150-1160.

134. Adebiyi OO et al. Clinical significance of pretransplant donor-specific antibodies in the setting of negative cell-based flow cytometry crossmatching in kidney transplant recipients. Am J Transplant. 2016;16(12):3458-3467.

135. Haas M et al. The Banff 2017 kidney meeting report: Revised diagnostic criteria for chronic References Perioperative Care for Organ Transplant Recipient 22 active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. Am J Transplant. 2018;18(2):293-307.

136. Garg N et al. Defining the phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: Advances in diagnosis of antibody injury. Transplant Rev. 2017;31(4):257-267.

137. Hasegawa J et al. Clinical and pathological features of plasma cell-rich acute rejection after kidney transplantation. Transplantation. 2018;102(5):853-859.

138. Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. Clin J Am Soc Nephrol. 2018;13(1):182-192.

139. Bharat A, Mohanakumar T. Immune responses to tissue-restricted nonmajor histocompatibility complex antigens in allograft rejection. J Immunol Res. 2017;2017:6312514.

140. Nevins TE, Nickerson PW, Dew MA. Understanding medication nonadherence after kidney transplant. J Am Soc Nephrol. 2017;28(8):2290-2301.

141. Gloor JM et al. Baseline donorspecific antibody levels and outcomes in positive crossmatch kidney transplantation. Am J Transplant. 2010;10(3):582-589.

142. Viglietti D et al. Dynamic prognostic score to predict kidney allograft survival in patients with antibody-mediated rejection. J Am Soc Nephrol. 2018;29(2):606-619.

143. Recombinant Human C1 Inhibitor for the Treatment of Early AntibodyMediated Rejection in Renal Transplantation, 2009. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01035593. Accessed October 17, 2017.

144. Sautenet B, Blancho G, Büchler M et al. One-year results of the effects of rituximab on acute antibody-mediated rejection in renal transplantation: RITUX ERAH, a multicenter double-blind randomized placebo-controlled trial. Transplantation. 100: 391-399, 2016.

145. Yamamoto T et al. De novo anti-HLA DSA characteristics and subclinical antibody-mediated kidney allograft injury. Transplantation. 2016;100(10):2194-2202.

146. Li L, Khatri P, Sigdel TK et al. A peripheral blood diagnostic test for acute rejection in renal transplantation. Am J Transplant 2012;12:2710-8.

147. Roedder S, Sigdel T, Salomonis N et al. The kSORT assay to detect renal transplant patients at high risk for acute rejection: results of the multicenter AART study. PLoS Med. 2014;11(11):e1001759.

148. Anglicheau D, Naesens M, Essig M et al. Establishing biomarkers in transplant medicine: a critical review of current approaches. Transplantation. 2016;100:2024-38.

149. Agbor-Enoh S, Jackson AM, Tunc I et al. Late manifestation of alloantibody associated injury and clinical pulmonary antibody-mediated rejection: evidence from cell-free DNA analysis. J Heart Lung Transplant. 2018;37:925-32.

150. Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts. J Am Soc Nephrol. 2017; 28:2221-32.

151. Karahan GE, Claas FH, Heidt S. Detecting the humoral alloimmune response: we need more than serum antibody screening. Transplantation. 2015;99:908-15.

152. Lúcia M, Luque S, Crespo E et al. Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. Kidney Int. 2015;88:874-87.

153. Vallabhajosyula P, Korutla L, Habertheuer A et al. Tissue-specific exosome biomarkers for noninvasively monitoring immunologic rejection of transplanted tissue. J Clin Invest. 2017;127:1375-91.

154. Malheiro J, Tafulo S, Dias Let al. Determining donor-specific antibody C1q-binding ability improves the prediction of antibodymediated rejection in human leucocyte antigen-incompatible kidney transplantation. Transpl Int. 2017;30: 347-359.

155. Ramon DS, Huang Y, Zhao L et al. Use of complement binding assays to assess the efficacy of antibody mediated rejection therapy and prediction of graft survival in kidney transplantation. Hum Immunol. 2017; 78: 57-63.

156. Fichtner A, Su¨sal C, Ho¨cker B et al. Association of C1q-fixing DSA with late graft failure in pediatric renal transplant recipients. Pediatr Nephrol. 2016; 31: 1157-1166.

157. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S et al. Non-complement-binding de novo donorspecific anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. J Am Soc Nephrol. 2016;27: 615-625.

158. Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KMet al. Assessing antibody strength: Comparison of MFI, C1q, and titer information. Am J Transplant. 2015;15: 2421-2430.

159. Ma J, Patel A, Tinckam K. Donor-specific antibody monitoring: Where is the beef? Adv Chronic Kidney Dis. 2016;23: 317-325.

160. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. J Am Soc Nephrol. 2015;26: 457-467.

161. Lefaucheur C, Viglietti D, Mangiola M et al. From humoral theory to performant risk stratification in kidney transplantation. J Immunol Res. 2017; 5201098.

162. Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. Kidney Int. 2016;89: 209-216.

163. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. J Am Soc Nephrol. 2015;26: 457-467.

164. Comoli P, Cioni M, Tagliamacco A et al. Acquisition of C3d-binding activity by de novo donor-specific HLA antibodies correlates with graft loss in nonsensitized pediatric kidney recipients. Am J Transplant. 2016, 16: 2106-2116.

165. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C et al. IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. J Am Soc Nephrol. 2016;27: 293-304,

166. McCaughan Jennifer A, Tinckam Kathryn J. Donor specific HLA antibodies & allograft injury: mechanisms, methods of detection, manifestations and management. Transplant International. 2018; 31: 1059-1070.

167. Tait BD, Susal C, Gebel HM et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. Transplantation. 2013.

168. BRIEF COMMUNICATION. Allocation to highly sensitized patients based on acceptable mismatches results in low rejection rates comparable to nonsensitized patients. Am J Transplant. 2019;19:2926-2933.

169. Heidt S, Witvliet MD, Haasnoot GW et al. The 25th anniversary of the Eurotransplant Acceptable Mismatch program for highly sensitized patients. Transpl Immunol. 2015; 33: 51.

170. Heidt S, Claas FHJ. Transplantation in highly sensitized patients: challenges and recommendations. Expert Rev Clin Immunol. 2018;14(8):673- 679.

171. Heidt S, Haasnoot GW, Claas FHJ. How the definition of acceptable antigens and epitope analysis can facilitate transplantation of highly sensitized patients with excellent long- term graft survival. Curr Opin Organ Transplant. 2018;23(4):493-499.

172. Heidt S, Haasnoot GW, van der Linden-van Oevelen MJH, Claas FHJ. Highly Sensitized Patients Are Well Served by Receiving a Compatible Organ Offer Based on Acceptable Mismatches. Front Immunol. 2021 Jun 25;12:687254. doi: 10.3389/fimmu.2021.687254.

173. Manook M, Koeser L, Ahmed Z et al. Post-listing survival for highly sensitised patients on the UK kidney transplant waiting list: a matched cohort analysis. Lancet. 2017; 389: 727.

174. Tambur AR, Campbell P, Claas FH et al. Sensitization in transplantation: Transplant International. 2018; 31: 1059-1070 1069 ª 2018 Steunstichting ESOT DSA: methods, manifestations and management assessment of risk (STAR) 2017 working group meeting report. Am J Transplant. 2018; 18: 1604.

175. Heidt S, Haasnoot GW, Claas FHJ. How the definition of acceptable antigens and epitope analysis can facilitate transplantation of highly sensitized patients with excellent long-term graft survival. Curr Opin Organ Transplant. 2018, 23(00).

176. Porrett PM. Biologic mechanisms and clinical consequences of pregnancy alloimmunization. Am J Transplant. 2018; 18:1059-1067.

177. van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. Nature. 1958;181(4625):1735-1736.

178. Hönger G, Fornaro I, Granado C et al. Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. Am J Transplant. 2013;13(3):746-753.

179. Masson E, Vidal Ch, Deschamps M et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. Hum Immunol. 2013;74:946-951.

180. Kussel L, Herkner H, Wahrmann M et al. Longitudinal assessment of HLA and MIC-A antibodies in uneventful pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia or gestational diabetes. Sci Rep. 2017;7(1):13524.

181. Lee J, Romero R, Xu Y et al. Maternal HLA panel-reactive antibodies in early gestation positively correlate with chronic chorioamnionitis: evidence in support of the chronic nature of maternal anti-fetal rejection. Am J Rep Immunol. 2011;66:510-526.

182. van Kampen CA, Versteeg-van der Voort Maarschalk MF, LangerakLangerak J, Roelen DL, Claas FHJ Kinetics of the pregnancyinduced humoral and cellular

immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. Human Immunol. 2002;63:452-458.

183. Colovai AI, Ajaimy M, Kamal LG et al. Increased access to transplantation of highly sensitized patients under the new kidney allocation system. A single center experience. Hum Immunol. 2017;78(3):257-262.

184. Hickey MJ, Zheng Y, Valenzuela N et al. New priorities: analysis of the New Kidney Allocation System on UCLA patients transplanted from the deceased donor waitlist. Hum Immunol. 017;78(1):41-48.

185. Stewart DE, Kucheryavaya AY, Klassen DK et al. Changes in Deceased Donor Kidney Transplantation One Year after KAS Implementation. Am J Transplant. 2016;16(6):1834-1847.

186. Heidt S, Haasnoot GW, van Rood JJ et al. Kidney allocation based on proven acceptable antigens results in superior graft survival in highly sensitized patients. Kidney Int. 2018;93(2):491-500.

187. Ferrari P, Weimar W, Johnson RJ et al. Kidney paired donation: principles, protocols and programs. Nephrol Dial Transplant. 2015;30(8):1276-1285.

188. de Klerk M, Keizer KM, Claas FH et al. The Dutch national living donor kidney exchange program. Am J Transplant. 2005;5 (9):2302-2305.

189. Bray RA, Nolen JD, Larsen C et al. Transplanting the highly sensitized patient: the emory algorithm. Am J Transplant. 2006;6 (10):2307-2315.

190. Holscher CM, Jackson K, Chow EKH et al. Kidney exchange match rates in a large multicenter clearinghouse. Am J Transplant. 2018;18(6):1510-1517.

191. Kamburova EG, Wisse BW, Joosten I et al. Differential effects of donor-specific HLA antibodies in living- versus deceased-donor transplantation. Am J Transplant. 2018 Feb 21. doi: 10.1111/ajt.14709.

192. Jordan SC, Lorant T, Choi J et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. N Engl J Med. 2017;377(5):442-453.

193. Wehmeier C, Ho¨ nger G, Cun H et al. Donor specificity but not broadness of sensitization is associated with antibody-mediated rejection and graft loss in renal allograft recipients. Am J Transplant. 2017; 17:2092-2102.

194. Rezapour S, Yarmohammadi A, Tavakkoli M. One-year survival rate of renal transplant: factors influencing the outcome. Transplant Research and Risk Management. 2017;9:49-56 https://doi.org/10.2147/TRRM.S150080

195. Ghelichi-Ghojogh M, Mohammadizadeh F, Jafari F et al. The global survival rate of graft and patient in kidney transplantation of children: a systematic review and meta-analysis. BMC Pediatr. 2022 Aug 24;22(1):503. doi: 10.1186/s12887-022-03545-2.

196. Beviá-Romero Á, Quereda-Flores F, Díaz-Carnicero J et al. Kidney Transplant: Survival Analysis and Prognostic Factors after 10 Years of Follow-Up. Mathematics 2023;11(7): 1640. https://doi.org/10.3390/math11071640.

197. Park Y, Ko EJ, Chung BH et al. Kidney transplantation in highly sensitized recipients. Kidney Res Clin Pract. 2021 Sep;40(3):355-370. doi: 10.23876/j.krcp.21.012. Epub 2021 Jun 25.

198. Nakamura, Tsukasa, Takayuki Shirouzu, Katsuya Nakata, Norio Yoshimura, and Hidetaka Ushigome. The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies

Analysis Goes to the Next Stage. Int J Molecul Sci. 2019;20(18): 4544. https://doi.org/10.3390/ijms20184544.

199. Roufosse C, Becker JU, Rabant M et al. Proposed Definitions of Antibody-Mediated Rejection for Use as a Clinical Trial Endpoint in Kidney Transplantation. Transpl Int. 2022 May 20;35:10140. doi: 10.3389/ti.2022.10140.
200. Schwarz C, Morel A, Matignon M et al. Hepatitis B Virus Reactivation in Kidney Transplant Recipients Treated With Belatacept. Kidney Int Rep. 2023 May 16;8(8):1531-1541. doi: 10.1016/j.ekir.2023.05.005.
201. Öcal S, Harmancı Ö, Korkmaz M et al. Panel reactive antibodies in predicting hepatitis C virus treatment outcome in kidney transplant candidates. Exp Clin Transplant. 2015 Apr;13 Suppl 1:193-6.
202. Gadde, Ashwini B.; Mahapatra, Amit; Tiwari, Assem1; Sethi, Sidharth Kumar; Jha, Pranaw Kumar; Jain, Manish; Yadav, Dinesh; Bansal, Dinesh; Bansal, Shyam B,*. Use of Panel Reactive Antibodies for Immunological Risk Stratification and Its Correlation with Antecedent Events in Live Donor Kidney Transplant: A Prospective Single-Center Study. Indian J Transplant. 2021;15(1):39-44. DOI: 10.4103/ijot.ijot_55_20.
203. López Del Moral C, Wu K, Naik M et al. The natural history of de novo donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. Front Med (Lausanne). 2022 Sep 16;9:943502. doi: 10.3389/fmed.2022.943502.
204. Sahin GK, Usta S, Erdogmus S et al. Characteristics and Sensitization Risk Factors in Kidney Transplant Wait List Candidates: Panel Reactive Antibodies Status Is Crucial for Successful Kidney Allocation Systems in Turkey. Exp Clin Transplant. 2023 Mar;21(3):229-235. doi: 10.6002/ect.2020.0304. Epub 2021 Feb 17.
205. UK Renal Registry. UK Renal Registry 21st Annual Report: data to 31/12/2017. Bristol, UK. 2019. https://www.renalreg.org/ publications-reports
206. Sapir-Pichhadze R, Tinckam KJ, Laupacis A et al. Immune Sensitization and Mortality in Wait-Listed Kidney Transplant Candidates. J Am Soc Nephrol. 2016 Feb;27(2):570-8. doi: 10.1681/ASN.2014090894. Epub 2015 Jun 8.
207. Tambur AR, Kosmoliaptsis V, Claas FHJ et al. Significance of HLA-DQ in kidney transplantation: time to reevaluate human leukocyte antigen-matching priorities to improve transplant outcomes? An expert review and recommendations. Kidney Int. 2021 Nov;100(5):1012-1022. doi: 10.1016/j.kint.2021.06.026. Epub 2021 Jul 8.
208. Schrezenmeier E, Lehner LJ, Merkel M et al. What happens after graft loss? A large, long-term, single-center observation. Transpl Int. 2021 Apr;34(4):732-742. doi: 10.1111/tri.13834. Epub 2021 Feb 19.
209. Kosmoliaptsis V, Gjorgjimajkoska O, Sharples LD et al. Impact of donor mismatches at individual HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ loci on the development of HLA-specific antibodies in patients listed for repeat renal transplantation, Kidney International. 2014;86(5), 1039-1048. https://doi.org/10.1038/ki.2014.106.
210. Senev A, Coemans M, Lerut E et al. Eplet Mismatch Load and De Novo Occurrence of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies, Rejection, and Graft Failure after Kidney Transplantation: An Observational Cohort Study. JASN. 2020;31(9):2193-2204. DOI: 10.1681/ASN.2020010019.
211. Lee H, Eum SH, Ko EJ et al. Impact of Low-Level Donor-Specific Anti-HLA Antibody on Posttransplant Clinical Outcomes in Kidney Transplant Recipients. Ann

Lab Med. 2023 Jul 1;43(4):364-374. doi: 10.3343/alm.2023.43.4.364. Epub 2023 Feb 24.

212. Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. Clin J Am Soc Nephrol 2018;13:182-92.

213. Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. Clin J Am Soc Nephrol 2018;13:182-92.

214. Alvares M, Anwar S, Hashmi SK et al. Development of a calculated panel reactive antibody calculator for the United Arab Emirates: a proof of concept study Scientifc Reports. 2023;13:8468 https://doi.org/10.1038/s41598-023-34860-y.

215. Seitz A, Mounsey K, Hughes P et al. Isolated Pre-existing HLA-DP Donor-Specific Antibodies are Associated With Poorer Outcomes in Renal Transplantation. Kidney Int Rep. 2022 Aug 3;7(10):2251-2263. doi: 10.1016/j.ekir.2022.07.014.

216. Hurley CK, Baxter-Lowe LA, Begovich AB et al. The extent of HLA class II allele level disparity in unrelated bone marrow transplantation: analysis of 1259 National Marrow Donor Program donor-recipient pairs. Bone Marrow Transpl. 2000;25:385-393. https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1702161.

217. Cross AR, Lion J, Poussin K et al. HLA-DQ alloantibodies directly activate the endothelium and compromise differentiation of FoxP3 (high) regulatory T lymphocytes. Kidney Int. 2019;96:689-698. https://doi.org/ 10.1016/j.kint. 2019.04.023.

218. Bachelet T, Martinez C, Del Bello A et al. Deleterious impact of donor-specific anti-HLA antibodies toward HLA-Cw and HLA-DP in kidney transplantation. Transplantation. 2016;100: 159-166. https://doi.org/10.1097/tp.0000000000000821.

219. Daniëls L, Claas FHJ, Kramer CSM et al. The role of HLA-DP mismatches and donor specific HLA-DP antibodies in kidney transplantation: a case series. Transpl Immunol. 2021 Apr;65:101287. doi: 10.1016/j.trim.2020.101287. Epub 2020 Mar 16.

220. Battle RK, Henderson L, Phelan PJ et al. A case report-Two manufacturers SAB testing kits can reveal different HLA antibody profiles-Identifying prozone and denatured antigen. HLA. 2020 Jul;96(1):76-82. doi: 10.1111/tan.13913. Epub 2020 May 12.

221. Lucisano G, Brookes P, Santos-Nunez E et al. Allosensitization after transplant failure: the role of graft nephrectomy and immunosuppression - a retrospective study. Transpl Int. 2019 Sep;32(9):949-959. doi: 10.1111/tri.13442. Epub 2019 Apr 26.

223. Kim HS, Choi AR, Yang M et al. EDTA Treatment for Overcoming the Prozone Effect and for Predicting C1q Binding in HLA Antibody Testing. Ann Lab Med. 2019 Nov;39(6):572-576. doi: 10.3343/alm.2019.39.6.572.

224. Schwaiger E, Wahrmann M, Bond Get al. Complement component C3 activation: the leading cause of the prozone phenomenon affecting HLA antibody detection on single-antigen beads. Transplantation. 2014;97:1279-85.

225. Tambur AR, Schinstock C. Clinical utility of serial serum dilutions for HLA antibody interpretation. HLA. 2022 Nov;100(5):457-468. doi: 10.1111/tan.14781. Epub 2022 Aug 29.

226. Karahan GE, de Vaal Y, Bakker K et al. Comparison of different luminex single antigen bead kits for memory B cell-derived HLA antibody detection. HLA. 2021 Sep;98(3):200-206. doi: 10.1111/tan.14356. Epub 2021 Jul 16.

227. Park Y, Kim H-S. Meaning of HLA Antibodies Frequently Detected by Single Antigen Bead Assay. Transplantation. 2017;101(5S-3):p S39, May DOI: 10.1097/01.tp.0000520355.70691.06.

228. Wittenbrink N, Herrmann S, Blazquez-Navarro A et al. A novel approach reveals that HLA class 1 single antigen bead-signatures provide a means of high-accuracy pre-transplant risk assessment of acute cellular rejection in renal transplantation. BMC Immunol. 2019;20, 11. https://doi.org/10.1186/s12865-019-0291-2.

229. Gu Y, Koh RWK, Lai ML et al. Defining the structural basis for human leukocyte antigen reactivity in clinical transplantation. Sci Rep. 2020;10, 18397. https://doi.org/10.1038/s41598-020-75355-4.

230. Mishra VC, Raina V. Enhancing Precision of the Single-antigen Bead (SAB) Assay: Considerations and Challenges. J Clin Transl Pathol. Published online: Dec 7, 2023. doi: 10.14218/JCTP.2023.00045.

231. Tiwari KA, Handoo A, Choudhary M et al. Prospective multi-centric study to analyze pre-transplant compatibility algorithm for live-related donor kidney transplant in Indian setting: the "Delhi approach"! Transpl Immunol. 2021;69:101487. doi:10.1016/j. trim.2021.101487.

232. Mishra VC, Chandra D, Anthwal A et al. Positive singleantigen bead assay with negative flow crossmatch in a renal transplant-A case report. Indian J Transplant. 2022;16(4):425-427. doi:10.4103/ijot. ijot_73_21.

233. Chowdhry M, Agrawal S, Thakur Y et al. Implication of a positive virtual crossmatch with negative flow crossmatch: A mind-boggler. Asian J Transfus Sci. 2020 Jan-Jun;14(1):79-82. doi: 10.4103/ajts.AJTS_159_18. Epub 2020 Jul 24.

234. Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting Anti-HLA Antibody Testing Data: A Practical Guide for Physicians. Transplantation 2016;100(8):1619-1628. doi:10.1097/TP.0000000000001203.

235. Gombos P, Opelz G, Scherer S et al. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. Am J Transplant. 2013;13(8):2075-2082. doi:10.1111/ajt.12332.

236. Cornaby C, Weimer ET. Utilizing principal component analysis in the identification of clinically relevant changes in patient HLA single antigen bead solid phase testing patterns. PLoS One. 2023 Oct 26;18(10):e0288743. doi: 10.1371/journal.pone.0288743.

237. Gutiérrez-Larrañaga M, Riesco L, Guiral S et al. Detection of antibodies to denatured human leucocyte antigen molecules by single antigen Luminex. HLA. 2021 Jan;97(1):52-59. doi: 10.1111/tan.14098. Epub 2020 Nov 15.

238. Norin AJ, Das B, Mondragon-Escorpizo MO et al. Determination of unacceptable antigens by summation of anti-HLA eplet antibody strength (MFI) based on single antigen bead assays: Excellent correlation with negative cell based cross matches. Hum Immunol. 2022 Jun;83(6):482-493. doi: 10.1016/j.humimm.2022.04.004. Epub 2022 Apr 22.

239. Garcia-Sanchez C, Usenko CY, Herrera ND et al. The shared epitope phenomenon-A potential impediment to virtual crossmatch accuracy. Clin Transplant. 2020 Aug;34(8):e13906. doi: 10.1111/ctr.13906. Epub 2020 Jun 14.

240. Jung K, Nam M, Hong YJ et al. Removal of Non-specific Reactions of LABScreen Single Antigen Class II Assay by Fetal Bovine Serum Treatment. Ann Clin Lab Sci. 2019 Sep;49(5):678-681.

241. Devriese M, Usureau C, Lion J et al. Assessing the allogenic realness of the Cw1/12/15 pattern occurring in the LABScreen single antigen assay. HLA. 2023; 102: 157-167.

242. Shih NR, Nong T, Murphey C et al. HLA class I peptide polymorphisms contribute to class II DQβ0603:DQα0103 antibody specificity. Nat Commun. 2024;15, 609 https://doi.org/10.1038/s41467-024-44912-0.

243. Park Y, Ko EJ, Chung BH et al. Kidney transplantation in highly sensitized recipients. Kidney Res Clin Pract. 2021 Sep;40(3):355-370. doi: 10.23876/j.krcp.21.012. Epub 2021 Jun 25.

244. Pandey P, Pande A, Mishra S et al. Significance of Luminex-crossmatch assay and its mean fluorescence intensity - a retrospective observation in 380 renal transplant cases. Pol Przegl Chir. 2022 Apr 30;94(2):38-48. doi: 10.5604/01.3001.0015.6985.

245. Ameur RF, Berkani LM, Belaid Bet al. Luminex Crossmatch in kidney transplantation. Scand J Immunol. 2023 Jul;98(1):e13279. doi: 10.1111/sji.13279. Epub 2023 May 14.

246. Peräsaari JP, Jaatinen T, Merenmies J. Donor-specific HLA antibodies in predicting crossmatch outcome: Comparison of three different laboratory techniques. Transpl Immunol. 2018 Feb;46:23-28. doi: 10.1016/j.trim.2017.11.002. Epub 2017 Nov 20.

247. Bhaskaran MC, Heidt S, Muthukumar T. Principles of Virtual Crossmatch Testing for Kidney Transplantation. Kidney Int Rep. 2022 Mar 15;7(6):1179-1188. doi: 10.1016/j.ekir.2022.03.006.

248. Lucisano G, Brookes P, Santos-Nunez E et al. Allosensitization after transplant failure: the role of graft nephrectomy and immunosuppression - a retrospective study. Transpl Int. 2019 Sep;32(9):949-959. doi: 10.1111/tri.13442. Epub 2019 Apr 26.

249. Yankova Positive flow cytometry crossmatch in kidney recipients initially negative for donor specific antibodies

250. Brakemeier S, Schweiger B, Lachmann N et al. Immune response to an adjuvanted influenza A H1N1 vaccine (Pandemrix(®)) in renal transplant recipients. Nephrol Dial Transplant. 2012 Jan;27(1):423-8. doi: 10.1093/ndt/gfr278. Epub 2011 May 25.

251. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. Am J Transplant. 2011 Aug;11(8):1727-33. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03604.x. Epub 2011 Jun 14.

252. Mishra VC, Dinesh C, Archana A et al. Positive Single-Antigen Bead Assay with Negative Flow Crossmatch in a Renal Transplant – A Case Report. Indian J Transplant. Oct-Dec 2022;16(4):p 425-427. DOI: 10.4103/ijot.ijot_73_21.

253. Schinstock CA, Gandhi MJ, Stegall MD. Interpreting Anti-HLA Antibody Testing Data: A Practical Guide for Physicians. Transplantation. 2016 Aug;100(8):1619-28. doi: 10.1097/TP.0000000000001203.

254. Chowdhry M, Agrawal S, Thakur Y et al. Implication of a positive virtual crossmatch with negative flow crossmatch: A mind-boggler. Asian J Transfus Sci. 2020 Jan-Jun;14(1):79-82. doi: 10.4103/ajts.AJTS_159_18. Epub 2020 Jul 24.

255. Bhaskaran MC, Heidt S, Muthukumar T. Principles of Virtual Crossmatch Testing for Kidney Transplantation. Kidney Int Rep. 2022 Mar 15;7(6):1179-1188. doi: 10.1016/j.ekir.2022.03.006.

256. Pinelli DF, Tambur AR. Virtual crossmatching for deceased donor transplantation: one size does not fit all. Kidney Int. 2020 Apr;97(4):659-662. doi: 10.1016/j.kint.2020.02.001.

257. Rohan VS, Pilch N, Moussa O et al. Virtual Crossmatching in Kidney Transplantation: The Wait Is Over. J Am Coll Surg. 2020 Apr;230(4):373-379. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2019.12.031. Epub 2020 Feb 5.

258. Barth A, Szőllősi GJ, Nemes B. Factors Affecting Access to the Kidney Transplant Waiting List in Eastern Hungary. Transplant Proc. 2021 Jun;53(5):1418-1422. doi: 10.1016/j.transproceed.2021.01.044.

259. Malyszko J, Dryl-Rydzynska T, Wojciech Marcinkowski W et al. Comorbidities on kidney transplantation waiting list relative to the status of the potential recipient. Arch Med Sci. 2018 Jun; 14(4): 941–944. doi: 10.5114/aoms.2016.60337

260. Gizem Kumru Sahin, Sura Usta, Siyar Erdogmus, Damla Ors Sendogan, Sim Kutlay, Sehsuvar Erturk, Kenan Keven, Sule Sengul. Characteristics and Sensitization Risk Factors in Kidney Transplant Wait List Candidates: Panel Reactive Antibodies Status Is Crucial for Successful Kidney Allocation Systems in Turkey. Exp Clin Transplant. 2023 Mar;21(3):229-235.doi: 10.6002/ect.2020.0304. Epub 2021 Feb 17.

261. Melk A, Babitsch B, Borchert-Mörlins B et al. Equally interchangeable? How sex and gender affect transplantation. Transplantation. 2019;103(6):1094-1110. doi: 10.1097/TP.0000000000002655.

262. Fernandez-Prado R, Fernandez-Fernandez B, Ortiz A. Women and renal replacement therapy in Europe: lower incidence, equal access to transplantation, longer survival than men. Clin Kidney J. 2018;11:1-6.

263. Melk A, Schmidt BMW, Geyer S, Epping J. Sex disparities in dialysis initiation, access to waitlist, transplantation and transplant outcome bin German patients with renal disease—A population based analysis. PLoS ONE. 2020;15(11): e0241556. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241556

264. Couchoud C, Bayat S, Villar E et al. A new approach for measuring gender disparity in access to renaltransplantation waiting lists. Transplantation. 2012; 94:513-9. https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31825d156a.

265. Oniscu GC, Schalkwijk AA, Johnson RJ et al. Equity of access to renal transplant waiting list and renal transplantation in Scotland: cohort study. BMJ 2003; 327:1261. https://doi.org/10.1136/bmj.327.7426.1261.

266. Silbiger SR. Raging hormones: gender and renal disease. Kidney Int 2011; 79:382-4. https://doi.org/10.1038/ki.2010.474 .

267. Somnath Pal, US Pharm. 2016;41(8):6

268. Papaetis GS, Papakyriakou P, Panagiotou TN. Central obesity, type 2 diabetes and insulin: exploring a pathway full of thorns. Arch Med Sci. 2015; 11(3): 463-482. doi: 10.5114/aoms.2015.52350

269. Mosconi G, Centofanti F, Capelli I et al. Incidence and prevalence of cancer in kidney transplantation waiting list patients: an Italian experience. Int J Artif Organs. 2013 May 17;36(5):335-40. doi: 10.5301/ijao.5000203.

270. Pyrża M, Małyszko J, Żebrowski P et al. Malignancy Prevalence in Waitlisted Potential Kidney Transplant Recipients Is Very Low Relative to Patients After Kidney Transplantation. Transplant Proc. 2020 Oct;52(8):2264-2267. doi: 10.1016/j.transproceed.2020.01.119.

271. Pyrża M, Głogowski T, Wieliczko M et al. Malignancy Prevalence in the Dialyzed Population and in Waitlisted Potential Kidney Transplant Recipients. Transplant Proc. 2022 May;54(4):930-933. doi: 10.1016/j.transproceed.2022.01.025.

272. Ban TH, Park WY, Jin K et al. Changing pattern and safety of pretransplant malignancy in kidney transplant recipients. Kidney Res Clin Pract. 2019 Dec 31;38(4):509-516. doi: 10.23876/j.krcp.19.047.

273. Fuggle SV, Martin S. Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. Transplantation. 2008; 86(3):384-390, DOI: 10.1097/TP.0b013e31817c90f5.

274. Can Ö, Gökçe AM, Canbakan M et al. Evaluation of Pre-Transplant Panel Reactive Antibody Levels and Sensitization: A Single-Center Study. Ann Transplant. 2016; 21: 577-581.

275. Katalinić N, Starčević A, Mavrinac M, Balen S. Complement-dependent cytotoxicity and Luminex technology for human leucocyte antigen antibody detection in kidney transplant candidates exposed to different sensitizing events. Clin Kidney J. 2017;10(6):852-858. doi: 10.1093/ckj/sfx050.

276. Resse M, Paolillo R, Pellegrino Minucci B et al. Effect of Single Sensitization Event on Human Leukocyte Antigen Alloimmunization in Kidney Transplant Candidates: A Single-Center Experience. Exp Clin Transplant. 2018 Feb;16(1):44-49. doi: 10.6002/ect.2016.0292.

277. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte Antibodies in Sera from Pregnant Women. Nature. 1958; 181, 1735-1736.

278. Regan L, Braude PR, Hill DP. A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. Hum Reprod. 1991 Feb;6(2):294-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137325.

279. Densmore TL, Goodnough LT, Ali S et al. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. Transfusion. 1999 Jan;39(1):103-6. doi: 10.1046/j.1537-2995.1999.39199116901.x.

280. Payne, R. The development and persistence of leukoagglutinins in parous women. Blood. 1962;19, 411-424.

281. Nielsen HS, Witvliet MD, Steffensen R et al. The presence of HLA-antibodies in recurrent miscarriage patients is associated with a reduced chance of a live birth. J Reprod Immunol. 2010 Dec;87(1-2):67-73. doi: 10.1016/j.jri.2010.05.006. Erratum in: J Reprod Immunol. 2011 May;89(2):216.

282. Regan L, Braude PR, Hill DP. A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. Hum Reprod. 1991;6, 294-298.

283. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. Transfusion. 2009 Sep;49(9):1825-35. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02206.x.

284. Middelburg RA, Porcelijn L, Lardy N et al. Prevalence of leucocyte antibodies in the Dutch donor population. Vox Sang. 2011 Apr;100(3):327-35. doi: 10.1111/j.1423-0410.2010.01420.x.

285. Mihaylova A, Spassova P, Penkova K et al. Flowcytometry detects long-persisting pregnancy-induced anti-HLA antibodies in potential transplant recipients. C R Acad Bulg Sci. 2004, 57(11), 97-100.

286. Pollack MS, Trimarchi HM, Riley DJ et al. Shared cadaver donor-husband HLA class I mismatches as a risk factor for renal graft rejection in previously pregnant women. Hum Immunol. 1999;60(11):1150-5. doi: 10.1016/s0198-8859(99)00104-4.

287. Burlingham WJ, Benichou G. Bidirectional alloreactivity: A proposed microchimerism-based solution to the NIMA paradox. Chimerism. 2012;3:29-36.

288. Burt TD. Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: Implications for development and disease. Am J Reprod Immunol. 2013;69:346-358.

289. U.S. Renal Data System: USRDS 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End- Stage Renal Disease in the United States, Bethesda, MD, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2010.

290. Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: amatter of debate. Transpl Int. 2012;25:604-610.

291. D'Orsogna LJ, Van den Heuvel H, Van Kooten C et al. Infectious pathogens may trigger specific allo-HLA reactivity via multiple mechanisms. Immunogenetics. 2017; 69(8): 631-641.doi: 10.1007/s00251-017-0989-3.

292. Khalesi Z, Razizadeh MH, Javadi M et al. Global epidemiology of HBV infection among hemodialysis patients: A systematic review and meta-analysis. Microb Pathog. 2023;179:106080. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106080

293. Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S et al. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. Ren Fail. 2006;28:729-35.

294. Bernieh, B. Viral hepatitis in hemodialysis: An update. J Transl Int Med. 2015 Jun-Sep; 3(3): 93-105. doi: 10.1515/jtim-2015-0018.

295. Caragea DC, Mihailovici AR, Streba CT et al. Hepatitis C Infection in Hemodialysis Patients. Curr Health Sci J. 2018 Apr-Jun;44(2):107-112. doi:10.12865/CHSJ.44.02.02.

296. Timofte D, Dragos D, Balcangiu-Stroescu A-E et al. Infection with hepatitis C virus in hemodialysis patients: An overview of the diagnosis and prevention rules within a hemodialysis center (Review). Exp Ther Med . 2020 Jul;20(1):109-116. doi: 10.3892/etm.2020.8606.

297. Can Ö, Gökçe AM, Canbakan M et al. Evaluation of Pre-Transplant Panel Reactive Antibody Levels and Sensitization: A Single-Center Study. Ann Transplant, 2016; 21: 577-581.

298. Gentil MA, Rocha JL, Rodriguez-Algarra G et al. Impaired kidney transplant survival in patients with antibodies to hepatitis C virus. Nephrol Dial Transplant, 1999; 14: 2455-2460.

299. Forman JP, Tolkoff-Rubin N, Pascual M et al. Hepatitis C, acute humoral rejection, and renal allograft survival. J Am Soc Nephrol. 2004; 15: 3249-55.

300. Özdemir FN, Sezer S, Güz G et al. Is hepatitis C virus infection a risk fac- tor for panel-reactive anti body positivity? Transplant Int. 2000; (Suppl. 1): 31-33.

301. Baştürk B, Kantaroğlu B, Kavuzlu M et al. The Most Common HLA Alleles and Anti-HLA Antibodies to Know for Virtual Cross-Match. Exp Clin Transplant. 2016 Nov;14(Suppl 3):53-55.

302. Duquesnoy RJ, Marrari M. Detection of antibodies against HLA- Cepitopes in patients with rejected kidney transplants. Transpl Immunol. 2011; 24: 164-171.

303. McCutcheon JA, Gumperz J, Smith KD et al. Low HLA-C expres- sion at cell surfaces correlates with increased turnover of heavy chain mRNA. J Exp Med. 1995; 181: 2085-2095.

304. Falk K, Rotzschke O, Grahovac B et al. Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90: 12005-12009.

305. Bachelet T, Couzi L, Guidicelli G et al. Anti-Cw donor-specific alloantibodies can lead to positive flow cytometry crossmatch and irreversible acute antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2011; 11: 1543-1544.

306. Aubert O, Bories MC, Suberbielle C et al. Risk of antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with anti-HLA-C donor-specific antibodies. Am J Transplant. 2014 Jun;14(6):1439-45. doi: 10.1111/ajt.12709.

307. Bosch A, Llorente S, Eguia J et al. HLA-C antibodies are associated with irreversible rejection in kidney transplantation: Shared molecular eplets characterization. Hum Immunol. 2014 Apr;75(4):338-41. doi: 10.1016/j.humimm.2014.01.010.

308. Cross AR Lion J, Loiseau P et al. Donor Specific antibodies are not only directed against HLA-DR: minding your Ps and Qs. Hum Immunol. 2016;77:1092-1100. doi: 10.1016/j.humimm.2016.04.003

309. Senev A, Lerut E, Van Sandt V et al. Specificity, strength, and evolution of pretransplant donor-specific HLA antibodies determine outcome after kidney transplantation. Am J Transplant. 2019;19:3100-3113.DOI:https://doi.org/10.1111/ajt.15414.

310. Qiu J, Cai J, Terasaki PI et al. Detection of antibodies to HLA-DP in renal transplant recipients using single antigen beads. Transplantation. 2005;80:1511-1513. doi: 10.1097/01.tp.0000181384.49832.3a.

311. Akgul SU, Ciftci HS, Temurhan S et al. Association between HLA antibodies and different sensitization events in renal transplant candidates. Transplant Proc. 2017;49: 425-429,

312. Katerinis I, Hadaya K, Duquesnoy R et al. De novo anti-HLA antibody after pandemic H1N1 and seasonal influenza immunization in kidney transplant recipients. Am J Transplant. 2011;11: 1727-1733.

313. Locke JE, Zachary AA, Warren DS et al. Proinflammatory events are associated with significant increases in breadth and strength of HLA-specific antibody, Am. J. Transplant. 2009;9: 2136-2139.

314. Brakemeier S, Schweiger B, Lachmann N et al. Immune response to an adjuvanted influenza A H1N1 vaccine (Pandemrix(®)) in renal transplant recipients. Nephrol Dial Transplant. 2012;27:423-428.

315. Tambur AR, Bestard O, Campbell P et al. Sensitization in transplantation: Assessment of Risk 2022 Working Group Meeting Report. Am J Transplant. 2023 Jan;23(1):133-149. doi: 10.1016/j.ajt.2022.11.009.

316. Kamburova EG, Wisse BW, Joosten I et al. Differential effects of donor-specific HLA antibodies in living versus deceased donor transplant. Am J Transplant. 2018;18: 2274-2284.

317. Wehmeier C, Hönger G, Cun H et al. Donor specificity but not broadness of sensitization is associated with antibody-mediated rejection and graft loss in renal allograft recipients. Am J Transplant. 2017;17: 2092-2102,.

318. Amico P, Hirt-Minkowski P, Hönger G et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: A prospective study in 233 renal transplantations. 2011;24: 560-569.

319. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL et al. Calculated PRA: initial results show benefits for sensitized patients and a reduction in positive crossmatches. Am J Transplant. 2011 Apr;11(4):719-24. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03340.x. Epub 2010 Nov 29.

320. Ivanova M, Rozemuller E, Tyufekchiev N et al. HLA polymorphism in Bulgarians defined by high-resolution typing methods in comparison with other populations. Tissue Antigens. 2002, 60(6): 496-504.

321. Наумова Е, Иванова М. Главен комплекс на тъканната съвместимост – факти, хипотези, приложение в медицината. София, Лице, 2006.

322. Tambur AR, Schinstock C, Maguire C et al. Estimating alloantibody levels in highly sensitized renal allograft candidates: Using serial dilutions to demonstrate a treatment effect in clinical trials. Am J Transplantation, 2021;21(3), 1278-1284. https://doi.org/10.1111/ajt.16363.

323. Arnold ML, Ensminger S, Doxiadis I et al. Effect od donor cell type on complement-dependent cytotoxicity crossmatch outcome for patients immunized against HLA class-II antigens. Ezperimental and Clinical Transplantation. 2008;1: 1-6.

324. Ho S, Peiter C, Putnam K et al. Differential HLA expression on lymphocytes. Human Immunol. 2017; Suppl., 189, P176.

325. Baxter-Lowe LA, Cecka M, Kamoun M et al. Center-defined unacceptable HLA antigens facilitate transplants for sensitized patients in a multi-center kidney exchange program. Am J Transplant. 2014, 14, 1592-1598.

326. Lomago J, Jelenik L, Zern D et al. How did a patient who types for HLA-B*4403 develop antibodies that react with HLA-B*4402? Hum Immunol. 2010;71, 176-178.

327. Song SH, Park BG, Lee J et al. Successful kidney transplantation after desensitization in a patient with positive flow crossmatching and donor-specific anti-HLA-DP antibody: A Case report. Medicine (Baltimore). 2016, 95(32):e4521. doi: 10.1097/MD.0000000000004521.

328. Simmons DP, Kafetzi ML, Wood I et al. Antibodies against HLA-DP recognize broadly expressed epitopes. Hum Immunol. 2016, 77(12), 1128-1139.

329. Vaidya S, Hilson B, Sheldon S et al. DP reactive antibody in a zero mismatch renal transplant pair. Hum Immunol. 2007, 68(12), 947-949.

330. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM et al. Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. J Am Soc Nephrol. 2003, 14, 1336-1348.

331. Bachelet T, Martinez C, Del Bello A et al. Deleterious Impact of Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Toward HLA-Cw and HLA-DP in Kidney Transplantation. Transplantation. 2016 Jan;100(1):159-166.

332. Althaf MM, El Kossi M, Jin JK et al. Human leukocyte antigen typing and crossmatch: A comprehensive review. World J Transplant. 2017. 7(6), 339-348.

333. Putheti P, Sharma VK, Friedlander R et al. T-Cell-Positive, B-Cell-Negative Flow Cytometry Crossmatch: Frequency, HLA Locus Specificity, and Mechanisms Among 3073 Clinical Flow Cytometry Crossmatch Tests. Exp Clin Transplant. 2022 Feb;20(2):180-189. doi: 10.6002/ect.2021.0334.

334. Schiavo T, Montagner J, Keitel K et al. The Halifax flow Crossmatch Protocol Results According to the HLA Class and MFI of the DSA. BJT. 2023;26(01):e1223. https://doi.org/10.53855/ bjt.v26i1.500_ENG.

335. Apithy MJ, Desoutter J, Gicquel A, et al. Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results. HLA, 2017, 90(3), 157-164.

336. Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA et al. Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. Hum Immunol. 2011, 72(4), 330-336.

337. Szewczyk K, Barrios K, Magas D et al. Flow cytometry crossmatch reactivity with pronase-treated T cells induced by non-HLA autoantibodies in human immunodeficiency virus-infected patients. Hum Immunol. 2016, 77(6), 449-455.

338. Balgansuren G, Clark A, Crews GT et al. Unexpected T cell positive and B cell negative flow cytometry crossmatch in a kidney transplant patient. Human Immunology. 2012;73, (Suppl), 161,179-P.

339. Putheti P, Sharma VK, Friedlander R et al. T-Cell-Positive, B-Cell-Negative Flow Cytometry Crossmatch: Frequency, HLA Locus Specificity, and Mechanisms Among 3073 Clinical Flow Cytometry Crossmatch Tests. Exp Clin Transplant. 2022 Feb;20(2):180-189. doi: 10.6002/ect.2021.0334.

340. Morris AB, Sullivan HC, Krummey SM et al. Out with the old, in with the new: Virtual versus physical crossmatching in the modern era. HLA. 2019 Dec;94(6):471-481. doi: 10.1111/tan.13693.

341. Guillaume N, Mazouz H, Piot VC et al. Correlation between Luminex donor-specific crossmatches and levels of donor-specific antibodies in pretransplantation screening, Tissue Antigens. 2013;82 (1), 16-20. doi: 10.1111/tan.12128.

342. Billen EV, Christiaans MH, Van den Berg-Loonen EM. Clinical relevance of luminex donor specific crossmatches: data from 165 renal transplants. Tissue Antigens. 2009;74:205-212.

343. Chowdhry M, Makroo RN, Thakur Y, Sharma V, Singh M, Kumar M. The good, the bad, and the ugly of luminex donor-specific crossmatch. HLA. 2018, 91(6):501-506. doi: 10.1111/tan.13239.

344. Mishra MN, Lal V. Luminex crossmatch as a successful algorithm for post-transplant follow-up in developing nations – a study of 169 consecutive samples. J Kidney. 2016;2:2.

345. Chacko MP, Augustin A, David VG eet al. Nonspecific positivity on the luminex crossmatch assay for anti-human leukocyte anti- gen antibodies due to antibodies directed against the antibody coated beads. Indian J Nephrol. 2016;26(2):134-137.

346. Chaidaroglou A, Skoura A, Degiannis D. Comparative performance evaluation of a donor-specific bead-based crossmatch technique for the detection of donor-specific anti-HLA antibodies in heart transplantation. Transplant Proc. 2013;45(5):2005-2008.