

# HLA antibodies : detection and clinical relevance

## Citation for published version (APA):

Billen, E. V. A. (2011). *HLA antibodies : detection and clinical relevance*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110608eb>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20110608eb](https://doi.org/10.26481/dis.20110608eb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary



## Summary

The immune system protects the individual against pathogens and consists of different types of cells that mediate an immune response that is either non-specific innate or antigen-specific acquired. The latter, also known as the adaptive immune response, is triggered when antigen-receptors on lymphocytes recognize antigen presented in the context of MHC molecules. HLA molecules are highly polymorphic and as a consequence, they are able to bind a variety of antigens and present them to the immune system. The response that follows is cellular or humoral. Cellular responses occur when T-cells recognize foreign antigens presented by an HLA molecule on APC's. The humoral immune response is initiated by B-cells and leads to the production of antibodies against the foreign antigen.

As discussed in **Chapter 1** the recognition of donor-HLA molecules by the recipient's immune system generates an immune response that in renal transplantation, may lead to allograft rejection. The relevance of compatibility for ABO and HLA in rejection has been known for decades. Most of the immunosuppressive reagents used nowadays target the cellular rejection response; humoral rejection however is still a matter of concern. In this thesis, we focus our attention on the humoral or antibody-mediated immune response in renal transplantation. Already before transplantation contact with foreign HLA molecules through blood transfusion or pregnancy may lead to the development of HLA antibodies. It is obvious that transplantation itself is a major trigger for antibody formation. There is abundant evidence that preformed HLA antibodies have a deleterious effect on renal graft outcome as reflected by increased rejection rates and lower graft survival in sensitized recipients. Several immunological procedures in the field of histocompatibility are in use to detect the presence of HLA antibodies, thereby decreasing the rejection rate and increasing graft survival. Some of these procedures are screening for HLA antibodies before transplantation, matching the HLA antigens of recipient and final donor and performance of different cross-matches before the donor-kidney is transplanted. There is a high correlation between the degree of HLA matching and sensitization. Antibodies produced after renal transplantation constitute a risk factor for acute and chronic rejection. A poor HLA match decreases the chances of finding a second cross-match-negative donor and prolongs the waiting time for re-transplantation. Preformed cytotoxic donor-specific HLA antibodies cause hyperacute rejection, leading to loss of graft function within minutes to hours after reperfusion. CDC-crossmatches of patient sera and donor cells to identify donor-specific antibodies, are routinely performed before transplantation and hyperacute rejection has thus become a rare event in renal transplantation. To prevent positive pretransplant crossmatches, all sera from recipients on the waiting list are tested for the presence and specificity of HLA antibodies. The specificities detected in the serum are considered non-acceptable mismatches.

Our understanding of sensitization in renal patients, the clinical relevance of HLA antibodies and the available antibody detection and crossmatching techniques have evolved considerably during the last 40 years. In **Chapter 2**, the different techniques for antibody detection that have been used over the years are described, with special emphasis on the recently introduced bead-based antibody detection technology. This Luminex Single antigen technique uses beads coated with purified HLA molecules, as its target for antibody detection. It is shown to be more sensitive and specific in detecting HLA antibodies than the CDC and ELISA assays. Interpretation has become an important factor in discriminating clinically relevant from clinically non-relevant antibodies. The cut-off point for positivity of the Luminex Single antigen assay has to be defined by its user and for that reason may differ considerably between laboratories. To clarify how the results of the assay compare to those of the CDC assay, we have tested 103 HLA typing sera with well-known CDC specificities and CDC reaction strength in the Luminex Single antigen class I and II assay. For each serum the main CDC specificity and, if present, the extra specificities, were categorized according to their MFI value. Altogether 99% of all class I CDC specificities had an MFI value of 4000 or more, as did 93% of all class II CDC specificities when tested with the Luminex Single antigen assay. Based on the results, it was decided in our centre, that the cut-off point for positivity of the Luminex Single antigen assay would be 4000 MFI for clinical transplant purposes. With this cut-off point all specificities detected by CDC are covered and considered as non-acceptable antigens for a transplant recipient.

In **Chapter 3**, the clinical relevance of preformed DSA detected by the Luminex Single antigen assay, is studied in a group of highly sensitized recipients transplanted in the AM program. Recipients with a sensitization of 85% or more panelreactive antibodies (PRA) are highly sensitized (HS) and have a lower chance of receiving a kidney donor. For this type of recipients, desensitization protocols have been designed with the intention to remove their HLA antibodies in order to increase their probability of finding a crossmatch-negative donor. Within Eurotransplant (ET) a special program was developed, the Acceptable Mismatch (AM) program, to facilitate renal transplantation in HS recipients. For highly sensitized recipients (current or historical sensitization 85% PRA or more), acceptable HLA mismatches, i.e. antigens to which the recipients had never made antibodies, are determined. The patients are entered on a special waiting list that gives them priority to blood-group-compatible donors that are HLA-A, -B and -DR matched with their own HLA antigens, including the AM antigens. Up till now, the standard technique for the determination of the AM antigens was based on the CDC technique, the same assay in which the pre-transplant crossmatch was performed. From 34 AM patients, 27 were transplanted with 1-5 mismatches and 7 with 0 mismatches, for all 34 patients the pre-transplant and peak sera were retested with LSA. From the mismatched patients 13 proved to possess pre-transplant DSA detected by Luminex Single antigen assay, while 14 did not. No DSA were found in the 0 mismatched group as expected. Comparison of the DSA-positive and DSA-negative

patients in the mismatched group revealed a trend towards earlier and more frequent rejection episodes in DSA positive patients ( $P=0.08$ ). No detrimental effect of DSA on graft survival was observed. This single centre study showed that in the AM program, DDA detected by LSA and not by less sensitive methods, may be related to acute rejection episodes but are not detrimental to long-term graft outcome. These findings question the indiscriminate use of more sensitive screening techniques for the allocation of organs, more specifically the interpretation of the findings.

**Chapter 4** describes the prevalence, time of appearance, and HLA class of DSA in a consecutive group of patients transplanted between 1995 and 1999. All 140 renal recipients had no pre-transplant DSA, at least one year of renal function and an extensive follow-up period of up to 14 years. Multiple serum samples ( $n=1107$ ) of all patients were tested for “de novo” DSA with the Luminex Single antigen assay. The presence of DSA after transplantation and before graft failure was shown in 224 serum samples of 35 recipients. In 17 patients DSA were shown that were present only for a short period of time and did not reappear, so-called “transient” DSA. Median fluorescence values (MFI) in the Single antigen assay differed considerably for persistent and transient DSA, the median values being 12.000 and 3.000 respectively. In multivariate analysis the presence of class II DSA after the first year post-transplant proved to be the only independent risk factor for graft failure ( $OR=3.2$ ). For transient DSA patients no difference was found between class I and II positivity, both had the same risk of graft failure as DSA negative recipients. From this study, we concluded that class II DSA positivity was predictive of graft failure if appearing after the first year post-transplant. The presence of “transient” DSA did not affect graft failure. Persistent DSA was shown to have four times higher MFI values; nevertheless many DSA positive patients had grafts with stable function.

In **Chapter 5** the appearance of DSA was analyzed in relation to patient and graft characteristics in a group of patients who lost their graft at different time points after transplantation. Pre- and post-transplant sera of 56 CDC-negative first transplant patients were screened for HLA class I and II DSA by the Luminex Single antigen assay. Three out of 56 patients proved DSA positive before transplantation. 81% of the remaining 53 patients became DSA class I and/or II positive; 16% before and 84% after transplantectomy. Class I antibodies were produced in 84% and class II in 77% of the recipients. Based on the time of transplantectomy the recipients were divided into 3 groups: those who lost their graft (1) within one month, (2) between one and six months and (3) after more than six months. The groups proved to be significantly different for HLA class II mismatch and acute rejection. All recipients in group 2 were DSA positive. Median time of DSA appearance was four months after transplantectomy. Logistic regression analysis showed that DSA positivity for class I was related to higher donor age and donor type (non-heart-beating), class II to higher donor age and class II mismatch. Donor-directed HLA antibodies after transplantation

were demonstrated in 81% of first transplant recipients. The majority of the antibodies were found after transplantectomy. These findings should be taken into consideration in allocating organs of marginal donors, such as older or non-heart-beating kidneys.

The major advantage of the Luminex Single antigen assay is that it allows accurate evaluation of sera containing complex mixtures of antibodies. Class I and class II antibodies are clearly discriminated. Furthermore, antibodies directed against HLA-DRB3, 4, 5, HLA-DQ and HLA-DP are discriminated from reactivity against HLA-DR, which was difficult or even impossible using the former standard techniques. HLA-DP is considered a target for the humoral immune response in clinical transplantation. In **Chapter 6**, the incidence, time of development and epitope-specificity of HLA-DP antibodies in renal patients are examined, Pre- and post-transplant sera of 338 patients were screened for HLA-DP antibodies using the Luminex Single antigen assay. Patients with DP antibodies, their partners and/or kidney donors were HLA-DP typed by SSO. Potential epitopes were mapped by comparing the amino acid sequences of HLA-DP hypervariable regions (HVR) A-F of recipient, partner and/or donor. Specificities in the sera were aligned to deduce the HVR motif responsible for the antibodies. DP antibodies were detected in 48 out of 338 patients (14%). Before transplantation, 23% (10 females and one male) was found positive, 77% after transplantation (30 after the first, 7 after the second graft). Specificities were never restricted to individual mismatched antigens; broad HLA-DP sensitization was found as a rule. A single HVR mismatch was present in 80% of the DSA and in 79% of the non-DSA. Our findings confirm that HLA-DP antibodies are specific for epitopes shared by different HLA-DP antigens, indicating that only a restricted number of mismatched epitopes are recognized by the recipient's immune system. These results suggest that matching for immunogenic HLA-DP epitopes for renal transplantation is possibly more relevant than classical matching at the allelic level.

**Chapter 7** reports on the Luminex Crossmatch and compares the results obtained with those from flow-cytometric crossmatches. In Luminex bead-based screening assays, color-coded microspheres coated with HLA antigens are used to identify both complement-binding and non-complement-binding HLA class I and II antibodies in recipient sera. Many laboratories rely on all specificities detected and use that information for allocation of donor organs. A donor-specific (DS) crossmatch in the Luminex technique is therefore desirable. The Luminex DS crossmatch (LumXm), in which the actual donor-HLA antigens are coated onto specific capture beads, was tested for 88 pre- and post-transplant sera of 18 recipients. The results were compared to previously published flow cytometric crossmatch (FCXm) results for the same donor-recipient combinations. All sera were also examined by the Luminex Single antigen (SA) assays. Class I LumXm detected 24/27 T-cell positive FCXm (89%) and class II 15/22 B-cell positive FCXm (68%). Sensitivity of LumXm for class I and II was 89% and 68% respectively, specificity 98% and 97%. Discrepant LumXm results were obtained in 13

sera of 9 patients (15%). In general, based on LSA testing, FCXm showed false positive results for class I, LumXm gave false negative and positive results for class II. The LumXm test was proven not to react with recipient sera containing DQ antibodies only, also DP detection was insufficient. The validity of the LumXm has been shown for class I, but its value for class II is uncertain. HLA-DR is most probably correctly identified, -DQ and -DP are not.

In **Chapter 8**, the clinical significance of the Luminex Crossmatch is evaluated over a 4-year period in a group of renal recipients, transplanted on the basis of a negative CDC crossmatch. The clinical significance of the presence of donor-specific anti-HLA antibodies prior to renal transplantation detected solely by solid-phase techniques remains unclear. A group of 165 patients transplanted between 1997 and 2001, with a negative CDC crossmatch, was tested. 32/165 recipients proved to have a positive LumXm. Sixteen were positive for class I, 15 for class II, one was both class I and II positive and 133 recipients were negative. Acute rejection-free survival for all recipients was 77%, there was no difference in acute rejection-free survival between LumXm-positive and -negative recipients. Overall graft survival after a median follow-up time of 8 years was 56%. Recipients with a positive class I LumXm had worse long-term graft survival ( $P=0.006$ ), 5-year graft survival was 41% vs. 70% in negative patients, and 10-year graft survival was 27% vs. 56%. Positivity for class II LumXm was not a significant risk factor for graft failure ( $P=0.7$ ), however, as stated in chapter 7, the value of the class II crossmatch is questionable. In conclusion pre-transplant donor-specific anti-HLA antibodies detected by the LumXm, had no impact on acute rejection episodes. A positive class I LumXm resulted in worse long-term graft survival.





## Samenvatting



## Samenvatting

Het immuunsysteem beschermt ons tegen pathogenen en is opgebouwd uit een netwerk van cellen, die betrokken zijn bij de niet-specifieke of bij de antigeen-specifieke immunerespons. De eerste is aangeboren, de tweede verworven. Deze laatste ook wel adaptieve immunerespons genoemd, wordt geactiveerd als antigenen in combinatie met MHC moleculen herkend worden door antigeen-receptoren op lymfocyten. HLA moleculen zijn buitengewoon polymorf en daardoor in staat een grote verscheidenheid aan antigenen aan zich te binden en aldus te presenteren aan het immuunsysteem. De immunerespons die daarop volgt, kan cellulair of humoraal zijn. Een cellulaire respons treedt op als lichaamsvreemde antigenen gepresenteerd worden aan T-cellen door HLA moleculen, die aanwezig zijn op APC's. De humorale respons wordt geïnitieerd door B-cellen en leidt tot de productie van antistoffen tegen het lichaamsvreemde antigeen.

In **Hoofdstuk 1** wordt besproken hoe, bij niertransplantatie, de herkenning van lichaamsvreemde donor-HLA moleculen door het immuunsysteem van de ontvanger een immunerespons opwekt, die kan leiden tot afstoting van de transplantaatnier. Het is al geruime tijd bekend dat compatibiliteit voor zowel ABO als voor HLA een belangrijke rol speelt bij het afstotingsproces na niertransplantatie. Het merendeel van de anti-afstotingsmedicatie na transplantatie is bedoeld om cellulaire afstoting te voorkomen, tegen humorale afstoting bestaat geen afdoende medicatie. Dit proefschrift gaat over de humorale of antistof-gemedieerde, immunerespons na niertransplantatie. Contact met lichaamsvreemde HLA moleculen, door bloedtransfusie of zwangerschap, kan leiden tot de ontwikkeling van HLA antilichamen. Maar met name transplantatie brengt vaak antistofvorming op gang. Er is een overvloed aan bewijs voorhanden, dat laat zien dat HLA antistoffen die al aanwezig zijn vóór de transplantatie, een negatief effect hebben op de overleving van het transplantaat; ontvangers met antistoffen hebben vaker afstotingsverschijnselen en hebben een lagere transplantaatoverleving. Weefseltyperingslaboratoria gebruiken een aantal immunologische procedures om HLA antistoffen vóór en na transplantatie op te sporen, en zo de kans op afstoting te voorkomen en de transplantaatoverleving te vergroten. Zulke procedures zijn bijvoorbeeld het onderzoeken van patiëntensera op HLA antistoffen vóór transplantatie, het matchen van de HLA antigenen van donor en ontvanger en het uitvoeren van verschillende kruisproeven tussen donor en ontvanger voordat de uiteindelijke transplantatie plaatsvindt. Er bestaat een duidelijke correlatie tussen de mate van HLA match van donor en ontvanger en de kans op vorming van HLA antistoffen na transplantatie. HLA antistoffen die gevormd worden na transplantatie, vormen een risico voor het optreden van acute en chronische afstoting. Een initiële geringe HLA match verhoogt de kans op de vorming van HLA antistoffen en verlaagt daarmee de kans op het vinden van een geschikte volgende donor. Het wordt moeilijker een kruisproef-negatieve donor te vinden en dat verlengt de wachttijd voor

retransplantatie. Cytotoxische donorspecifieke HLA antistoffen aanwezig vóór transplantatie kunnen leiden tot hyperacute afstoting en daaropvolgend verlies van transplantaatfunctie. Daarom worden CDC kruisproeven met patiëntensera en donorcellen uitgevoerd, voordat de transplantatie doorgang kan vinden. Om positieve kruisproeven te voorkomen, worden alle ontvangers op de wachtlijst getest op de aanwezigheid van HLA antistoffen. De HLA antigenen waartegen eventuele antistoffen zijn gericht worden geregistreerd als niet-acceptabele mismatches voor de patiënt.

Onze kennis over de klinische relevantie van HLA antistoffen bij nierpatiënten en de methodes voor het opsporen ervan, hebben de laatste 40 jaar een duidelijke evolutie doorgemaakt. In **Hoofdstuk 2** worden de verschillende technieken, die gebruikt zijn of nog steeds gebruikt worden, beschreven. Speciale aandacht wordt besteed aan de recent geïntroduceerde Luminex techniek, waarbij beads met daaraan HLA moleculen gekoppeld, worden gebruikt om antistoffen aan te tonen. Deze techniek is gevoeliger en specifiekere dan de al langer in gebruik zijnde CDC en ELISA testen. De interpretatie van de Luminex resultaten is een belangrijke factor geworden bij het onderscheid tussen klinisch relevante en irrelevante antistoffen. Een probleem is het cut-off point voor positiviteit dat gedefinieerd moet worden door de gebruiker zelf, daardoor kan variëren van het ene laboratorium tot de andere. Om de resultaten verkregen met deze techniek te vergelijken met de resultaten verkregen met de CDC techniek, werden 103 cytotoxische HLA typeersera (uitvoerig bekend in CDC), getest door middel van Luminex SA. Voor elke serum werden de belangrijkste CDC specificiteiten gerangschikt op MFI waarde verkregen met SA. De MFI waarde van 99% van alle klasse I en 93% van de klasse II CDC specificiteiten was groter dan 4000. Daarom werd in ons transplantatiecentrum de cut-off voor positiviteit vastgelegd op 4000 MFI.

In **Hoofdstuk 3** wordt de klinische relevantie van donorspecifieke antistoffen voor transplantatie, die alleen aantoonbaar zijn met Luminex SA, onderzocht bij patiënten getransplanteerd in het AM programma. Binnen Eurotransplant werd het AM programma ontwikkeld om de transplantatiekans van deze hooggeïmmuniseerde patiënten te vergroten. Ontvangers met een huidige of historische PRA hoger dan 85% worden met hun zogenoemde acceptabele mismatches, dit zijn HLA antigenen waartegen de ontvanger nooit antistoffen heeft gevormd, op een speciale wachtlijst gezet. Wanneer een ABO compatibele donor, waarvan de HLA-A, -B en -DR antigenen overeenkomen met hun eigen en/of AM antigenen, beschikbaar is, krijgen de AM patiënten voorrang bij de allocatie van die donor. Tot nu toe was de CDC, die ook gebruikt wordt voor de pretransplantatie kruisproeven, de standaard techniek voor het bepalen van AM antigenen. Van de in totaal 34 patiënten getransplanteerd binnen het AM programma in Maastricht, werden er 27 getransplanteerd met 1 tot 5 en 7 met 0 mismatches. Het pretransplantatie serum en historisch pieks serum van deze patiënten werden hertest met Luminex SA. Van de 27 patiënten die getransplanteerd werden met 1-5 mismatches, werden bij 13 patiënten DSA gevonden en bij 14 niet.

Zoals verwacht werden er geen DSA gevonden bij de patiënten die getransplanteerd waren zonder mismatch. In de gemismatchte groep hadden de patiënten met DSA een trend tot vroegere en frequentere afstotingsverschijnselen ( $P=0.08$ ). DSA bleek echter geen nadelig effect te hebben op transplantatoeverleving. Uit deze studie blijkt dat bij patiënten in het AM programma, DSA gedetecteerd met Luminex SA en niet met minder gevoelige technieken, gerelateerd zouden kunnen zijn aan afstotingsverschijnselen, maar dat zij de lange termijn transplantatoeverleving niet beïnvloeden. Deze bevindingen stellen vraagtekens bij onbedachtzaam gebruik van gevoelige screeningsmethodes en de interpretatie ervan bij orgaanallocatie.

**Hoofdstuk 4** beschrijft het vóórkomen van DSA, het tijdstip van verschijnen en de HLA klasse ervan in een groep van 140 patiënten getransplanteerd in Maastricht tussen 1995 en 1999. De 140 ontvangers hadden geen HLA antistoffen vóór transplantatie, hun nier functioneerde tenminste 1 jaar en de follow-up tijd bedroeg tot 14 jaar. Meerdere sera ( $n=1107$ ) van de patiënten werden getest op de ontwikkeling van “de novo” (nieuwgevormde) DSA met behulp van Luminex SA. De aanwezigheid van DSA na transplantatie en voor transplantatiefalen werd aangetoond in 224 sera van 35 patiënten. In 17 van deze patiënten was het DSA slechts korte tijd aantoonbaar (“transient” DSA). De MFI values van transient DSA waren aanzienlijk lager (3000 MFI) dan die van persisterende DSA (12000 MFI). Multivariaat analyse toonde aan dat de aanwezigheid van klasse II DSA na het eerste jaar posttransplantatie, de enige onafhankelijke risicofactor was voor falen van het implantaat ( $OR=3.2$ ). Patiënten met transient klasse I of klasse II DSA hadden een risico op transplantatiefalen vergelijkbaar met dat van patiënten zonder DSA. Uit deze studie concludeerden wij, dat klasse II DSA, ontstaan of reeds aanwezig na het eerste jaar posttransplantatie, voorspellend zijn voor transplantatiefalen. De aanwezigheid van transient DSA had geen invloed op falen. De MFI waardes van persisterend DSA waren 4 maal hoger dan die van transient DSA, maar desondanks hadden veel patiënten een stabiele transplantaatfunctie in aanwezigheid van DSA.

In **Hoofdstuk 5** wordt het verschijnen van DSA geanalyseerd aan de hand van patiënten transplantaatkenmerken in een groep patiënten, die een transplantectomie ondergingen. Pre- en posttransplantatie sera van 56 patiënten, die een eerste nier ontvingen en geen CDC detecteerbare antistoffen hadden, werden opnieuw getest met Luminex SA. Drie van hen toonden DSA voor transplantatie, 43 patiënten ontwikkelden DSA na transplantatie. Van de 43 DSA positieve patiënten werden de DSA in 16% voor en in 84% na transplantectomie gevonden. Klasse I HLA antistoffen waren aanwezig in 84% en klasse II HLA antistoffen in 77%. De ontvangers werden onderverdeeld in 3 groepen op basis van het tijdstip waarop ze hun transplantectomie ondergingen: binnen 1 maand na transplantatie (1), tussen 1 en 6 maanden (2) en na meer dan 6 maanden (3). De 3 groepen verschilden significant wat betreft HLA klasse II mismatch en acute afstoting. Bij alle ontvangers in groep 2 werden DSA gevonden. DSA

verschenen gemiddeld vier maanden na transplantectomie. Uit logistische regressie analyse bleek dat positiviteit voor klasse I gerelateerd was aan hogere donorleeftijd en donortype (NHB), en positiviteit voor klasse II aan hogere donorleeftijd en klasse II mismatch. DSA na transplantatie werden gedetecteerd bij 81% van de ontvangers van een eerste nier. Het merendeel van de antistoffen werd pas aangetoond na transplantectomie. Met deze bevindingen zou rekening gehouden moeten worden bij de allocatie van nieren van marginale donoren, zoals oudere donoren en NHB donoren.

Het belangrijkste voordeel van Luminex SA is, dat het een nauwkeurige evaluatie toelaat van sera, die een complex mengsel van antistoffen bevatten. Klasse I en klasse II antistoffen kunnen duidelijk van elkaar onderscheiden worden. Zelfs antistoffen gericht tegen HLA-DRB3,4,5, HLA-DQ en HLA-DP kunnen onderscheiden worden van antistoffen gericht tegen HLA-DR, iets wat voorheen met de standaard technieken op zijn minst moeilijk zonet onmogelijk was. Ook HLA-DP is een mogelijk doelwit voor de humorale immuunrespons bij klinische transplantatie. In **Hoofdstuk 6** worden de incidentie, het tijdstip van verschijnen en de epitoopecificiteit van HLA-DP antistoffen bij nierpatiënten onderzocht. Pre- en posttransplantatie sera van 338 patiënten werden getest op de aanwezigheid van antistoffen gericht tegen HLA-DP met behulp van SA. Patiënten met DP antistoffen werden getypeerd voor HLA-DP met behulp van SSO, evenals hun partners en/of nierdonoren. De aminozuursequenties van de HVR A-F van HLA-DP van patiënt, partner en/of donor werden met elkaar vergeleken om potentiële epitopen voor antistofvorming te bepalen. De in sera gevonden HLA-DP specificiteiten werden vergeleken om de HVR verantwoordelijk voor de antistofvorming af te leiden. 48 van de 338 (14%) patiënten hadden DP antistoffen, 23% van de antistoffen werd gevonden voor transplantatie, 77% erna. De gevonden specificiteiten waren nooit uitsluitend gericht tegen de gemismatchte DP antigenen. 80% van de DSA en 79% van de NDSA werden veroorzaakt door 1 enkele HVR mismatch. Dit lijkt erop te wijzen dat slechts een beperkt aantal van de gemismatchte epitopen herkend worden door het immuunsysteem van de ontvanger. Deze resultaten tonen aan dat bij niertransplantatie, matchen voor immunogene HLA-DP epitopen, mogelijk relevanter is dan klassiek matchen op allel niveau.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de Luminex kruisproef en de resultaten ervan worden vergeleken met die verkregen met behulp van flow cytometrische kruisproeven. De Luminex techniek maakt gebruik van kleurgecodeerde microbeads met daarop HLA antigenen gehecht, om complement-bindende en niet-complement-bindende HLA klasse I en II antistoffen aan te tonen in patiëntensera. Veel laboratoria gebruiken deze techniek om sera te screenen en houden rekening met de verkregen informatie bij de allocatie van donornieren. Een kruisproef in dezelfde techniek is daarom wenselijk. De LumXm, waarbij de HLA antigenen van de donor aan beads gekoppeld worden, werd getest met behulp van 88 pre- en posttransplantatiesera van 18 patiënten. De

resultaten werden vergeleken met resultaten van flow cytometrische kruisproeven uitgevoerd met dezelfde patiëntensera en donorcellen. De sera werden eveneens getest met SA. Een positieve klasse I LumXm werd gevonden bij 24 van de 27 (89%) T-cel positieve FCXm en een positieve klasse II LumXm bij 15 van de 22 (68%) B-cel positieve FcXm. De sensitiviteit van de LumXm bedroeg 89% voor klasse I en 68% voor klasse II, de specificiteit voor klasse I was 98% en voor klasse II 97%. In 13 sera (15%) van 9 patiënten werd een discrepantie tussen de FCXm en LumXm resultaten gevonden. Wanneer de SA screeningsresultaten van de sera erbij betrokken werden, kon geconcludeerd worden dat de FcXm vals positieve resultaten opleverde voor klasse I en de LumXm vals negatieve en vals positieve resultaten voor klasse II. De LumXm toonde geen HLA-DQ antistoffen aan en ook de detectie van HLA-DP antistoffen was onvoldoende. Samenvattend waren de resultaten van de klasse I LumXm bevredigend, maar die van de klasse II LumXm twijfelachtig; antistoffen tegen HLA-DR werden aangetoond, antistoffen tegen HLA-DQ en -DP niet.

In **Hoofdstuk 8** wordt de klinische relevantie van de LumXm geëvalueerd in een groep nierpatiënten getransplanteerd met een negatieve CDC kruisproef over een periode van 4 jaar. De klinische betekenis van pretransplantatie DSA, die alleen aantoonbaar is met behulp van gevoelige solid-phase technieken is nog steeds onduidelijk. De pretransplantatiesera van 165 patiënten getransplanteerd op basis van een negatieve CDC kruisproef tussen 1997 en 2001, werden getest met de LumXm. 32 van de 165 patiënten hadden een positieve LumXm; 16 klasse I, 15 klasse II en een klasse I en II. 133 patiënten hadden een negatieve LumXm. Acute rejectie-vrije overleving in de hele groep was 77%, er was geen verschil tussen patiënten met een positieve of negatieve LumXm. De transplantaatoverleving bedroeg 56% na 8 jaar (mediaan). Patiënten met een positieve klasse I LumXm hadden een slechtere transplantaatoverleving ( $P=0.006$ ); de 5-jaars transplantaatoverleving in patiënten met een positieve klasse I LumXm bedroeg 41%, die in patiënten met een negatieve klasse II LumXm 70%. De 10-jaars transplantaatoverleving bedroeg 27 versus 56%. Een positieve klasse II LumXm leek geen risicofactor voor transplantaatfalen ( $P=0.7$ ), hierbij dient echter rekening gehouden te worden met het feit dat de waarde van de klasse II LumXm twijfelachtig is. DSA aanwezig voor transplantatie, en alleen aantoonbaar met LumXm, hebben geen invloed op afstoting. Een positieve klasse I LumXm resulteert in een slechtere lange termijn transplantaatoverleving.