

# Dopad IVDR direktivy do imunogenetiky orgánových transplantací

František Mrázek

*HLA laboratoř, Ústav imunologie FN a LF UP Olomouc*

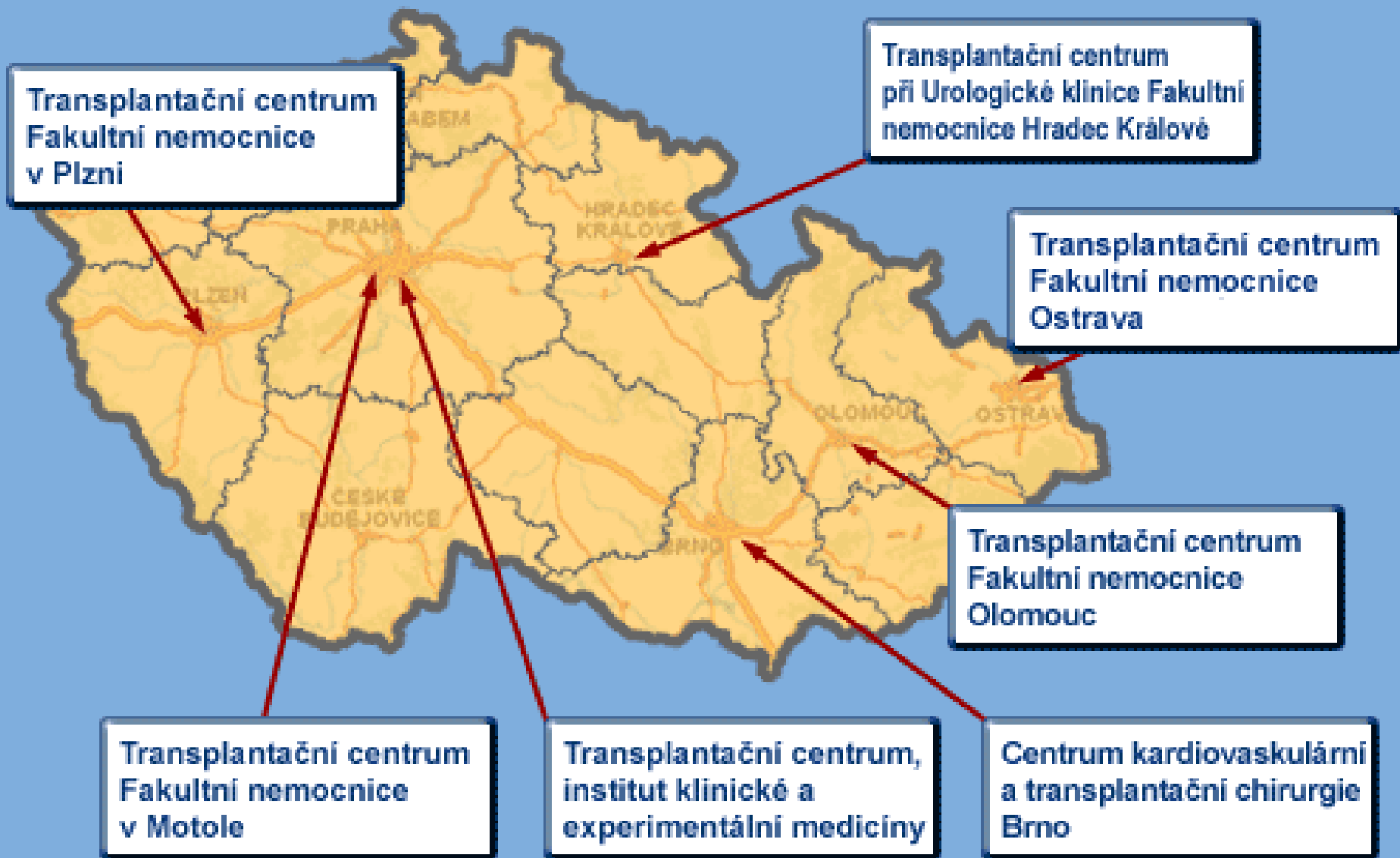


FAKULTNÍ NEMOCNICE  
OLOMOUC

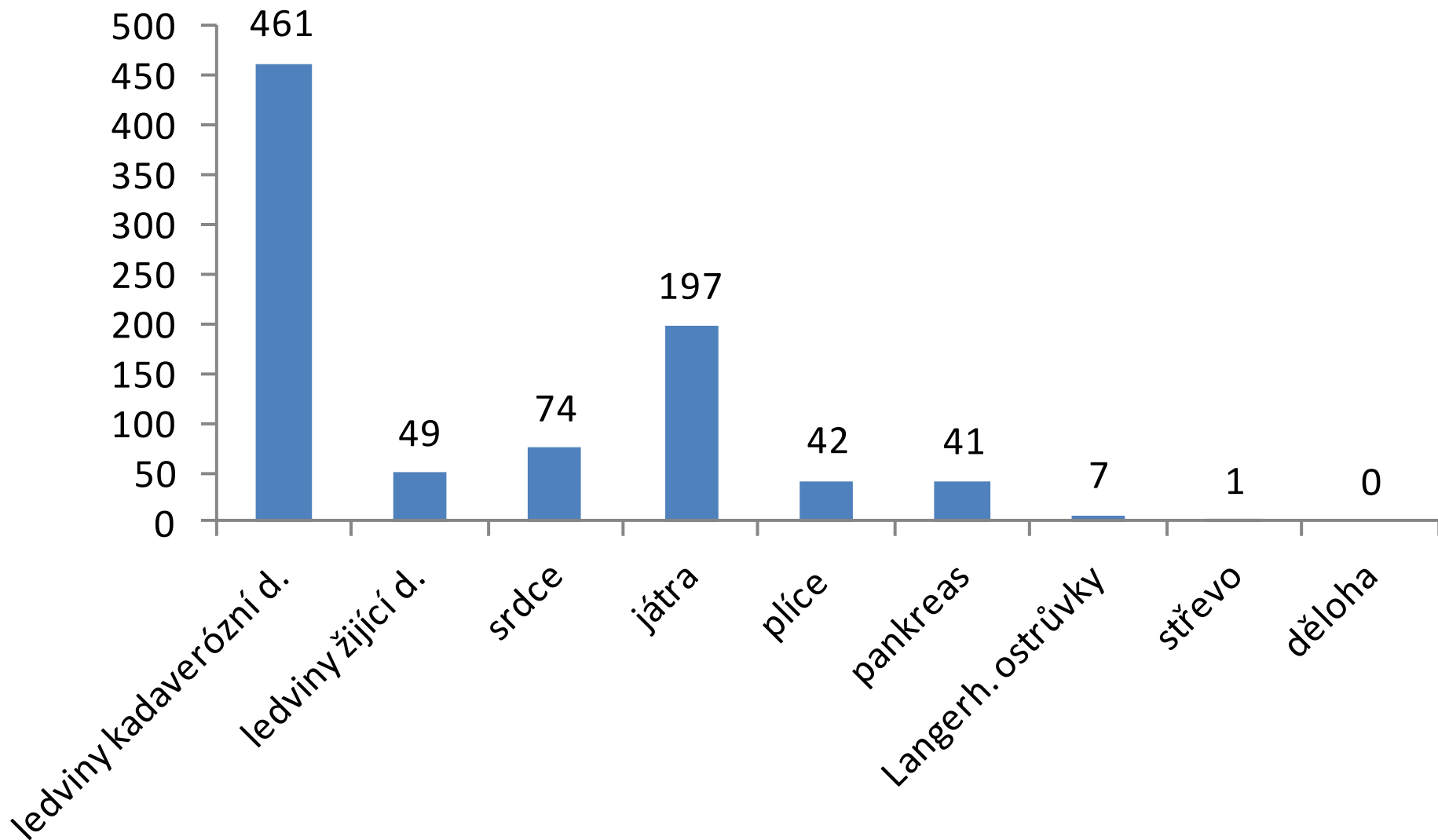


Lékařská  
fakulta

# Transplantace orgánů v ČR - centra



# Transplantace orgánů v ČR za rok 2019

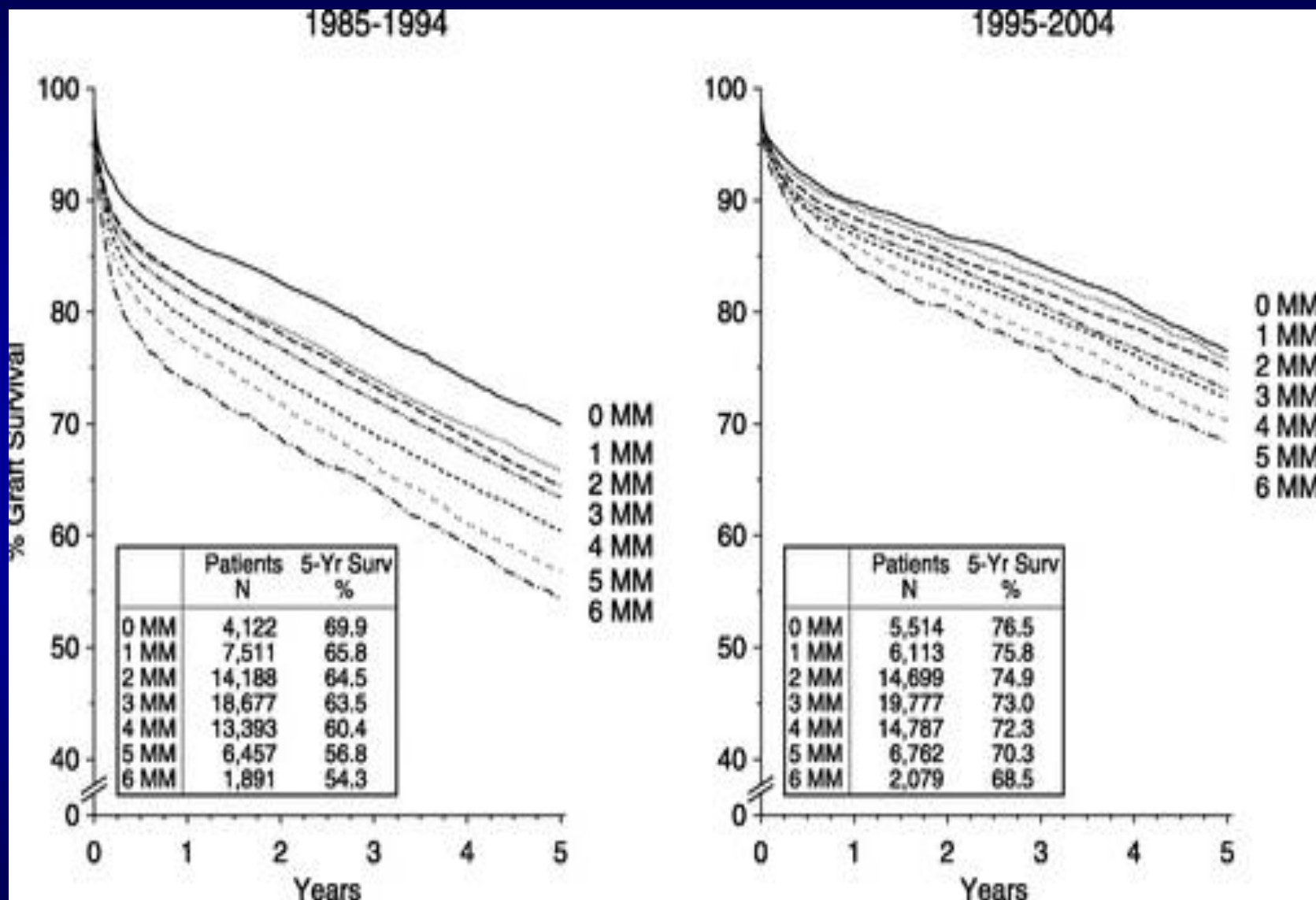


Zdroj: Koordinační středisko transplantací

## **Základní přístupy imunogenetického vyšetření :**

- 1) Zajištění shody mezi dárce a příjemcem štěpu v histokompatibilních antigenech (HLA)**
- 2) Diagnostika alogenních (zejména anti-HLA) protilátek  
- *screening, identifikace, cross-match***

# HLA antigeny & transplante ledvin



# HLA typizace pomocí qRT-PCR

SureTyper™ (CE-IVD) Session

Session Tools Reports Manage Help

**Sample ID — 25691 | Patient ID — 25691 YY, XX** [View Report](#)

Tray 1 — Plate TR051907-FIF

**RESULTS**

TEST	GENOTYPE	PHENOTYPE	TEST	GENOTYPE	PHENOTYPE
HLA-A	A*24 A*32	A24 A32	HLA-DRB1 auto	DRB1*01 DRB1*16	DR1 DR16
HLA-B	B*07 B*15	B7 B62	HLA-DRB345	DRB5*02	DR51
Bw		Bw6 Bw6			

[Test Info](#) Catalog # 3332C | Kit Lot # K3949 | Kit Name: LinkS<sub>eq</sub> HLA ABDR | [Report Info](#)  
[Alleles Info](#) Database Version: [IMGT/HLA database release version 3.39.0 - Jan 2020](#) | Considered Rare Allele If Labeled: **d, e, f or u**

One Lambda SureTyper™ 6.1.5 Copyright © 2010-2020

SureTyper Test Result Details

Hide Rare Alleles Hide Negative Assays Hide P Groups Separate P Groups

**TEST RESULT FOR HLA-A**

Genotype — **A\*24 A\*32** | Phenotype — **A24 A32**

*This is a clean test result.*

ALLELE GROUP	ALLELES	P GROUP	ANTIGEN
A*24	A* 24:19e	-	A9
5 common 612 rare	A* 24:02:01:01-24:02:01:02L, 24:07:01:01, 24:20:01:01, A* 24:02:01:03e-24:02:01:67e, 24:02:02d, 24:02:03Qe-24:02:135e, 24:07:01:02e-24:07:03e, 24:13:01d, 24:13:02e, 24:20:01:02e-24:21e, 24:76e	24:02P 24:07P 24:13P 24:20P 24:21P	<b>A24</b>
	A* 24:04d, 24:06d, 24:27e-24:28e, 24:37d, 24:43d, 24:58d, 24:78e	-	
	A* 24:23d	-	A2403
	A* 24:11Nd, 24:40Ne, 24:45Ne, 24:48Ne, 24:60Ne	-	Null
	A* 24:26d, 24:74e, 24:79e, 24:135e, 24:142e, 24:144e, 24:150e, 24:153e-24:154e, 24:172e, 24:225e-24:226e, 24:231e, 24:249e-24:251e, 24:263e-24:271e, 24:313e-24:314e, 24:347e, 24:352e-24:354e, 24:383e, 24:385e, 24:400e-24:402e, 24:417e-24:419e, 24:422e-24:423e, 24:431e, 24:436e-24:438e, 24:442e-24:443e, 24:451e, 24:454e-24:455e, 24:457e, 24:460e, 24:462e-24:466e, 24:469e-24:470e, 24:473Qe-24:474e, 24:476e-24:477e, 24:479Qe	24:02P 24:07P 24:26P 24:74P 24:135P 24:142P 24:172P 24:225P 24:226P 24:26P	-

SureTyper Tray Viewer

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

Test — HLA-A

Group 1 — (21)

Allele 1 —

Assay 1 — (45)

Group 2 —

Allele 2 —

Assay 2 —

[Reset](#)

Recognition Sites  
5' 97M-101C  
3' 142I-145R

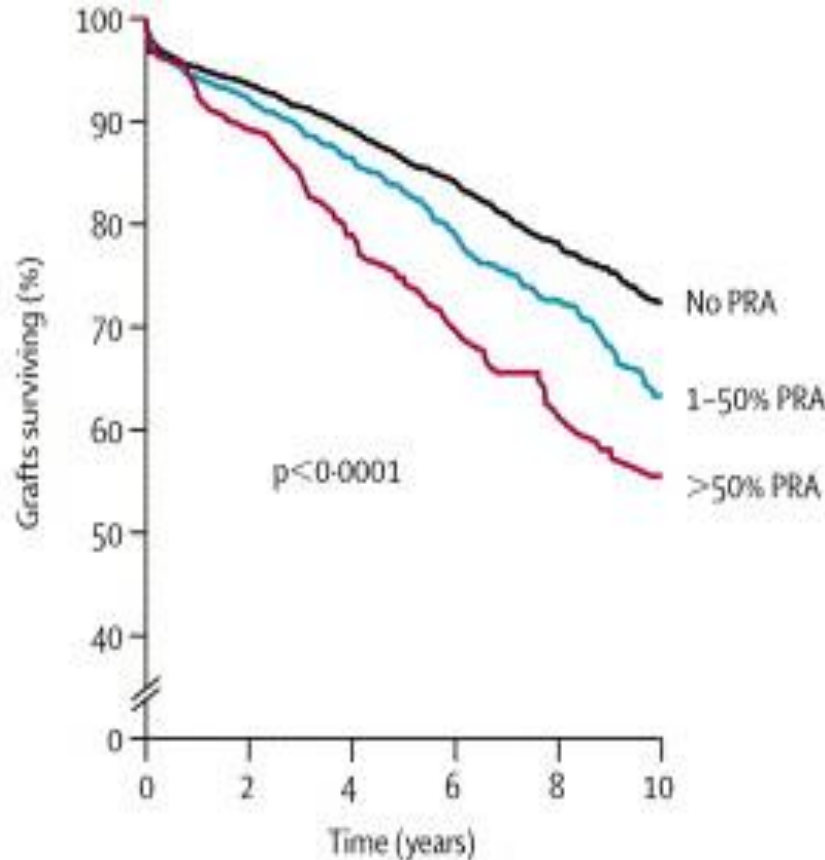
SureTyper Well Viewer

Test **Assay LSA-012.1 — Positive**

Well A18 [Force Call](#)

Recognition Sites  
5' 97M-101C  
3' 142I-145R

# HLA aloimmunizace & transplantace ledvin



Number of  
transplants

No PRA	3001	2495	1929	1418	989	687
1-50% PRA	803	647	514	362	249	158
>50% PRA	244	192	149	111	84	65

PRA – „Panel Reactive Antibodies“

Podíl (%) panelových dárců, proti kterým má pacient protilátky

cPRA – „calculated PRA“

Odhad podílu (%) jedinců v populaci, proti kterým má pacient protilátky  
(dle profilu anti-HLA protilátek)

DSA – „donor-specific antibodies“

protilátky proti HLA antigenům konkrétního dárce

# Vyšetření anti-HLA protilátek před transplantací

## **Screening** – vyšetření HLA protilátek

- ✓ před zařazením na čekací listinu (WL)
- ✓ pravidelně na WL (každé 3 měsíce)
- ✓ po každé potenciální HLA imunizaci (krevní transfúze, transplantace, gravidita)

## **Křížová zkouška** – vyšetření DSA (donor-specific antibodies)

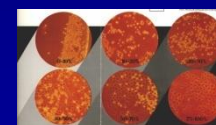
- ✓ těsně před transplantací
- ✓ inkubace séra příjemce s lymfocyty dárce (slezina, lymfat. uzlina)



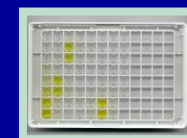
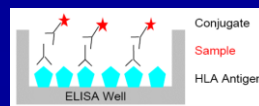
# Vyšetření anti-HLA protilátek

- volba **laboratorní metody** ovlivňuje možnosti určení spektra klinicky potenciálně významných protilátek

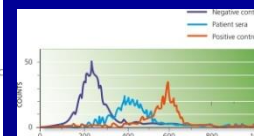
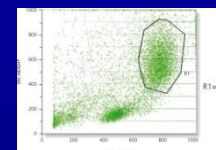
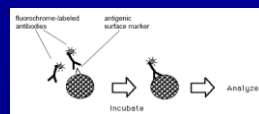
- ✓ mikrolymfocytotoxický test  
(alo- x autoAb, IgG x IgM, PRA)



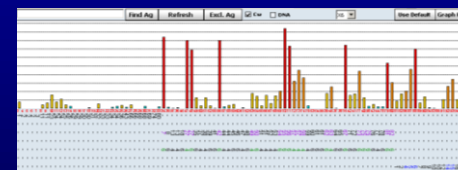
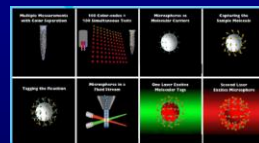
- ✓ **ELISA**  
(IgG, Ab bez vazby na C')



- ✓ průtoková cytometrie  
(IgG, Ab bez vazby na C')



- ✓ Luminex  
(IgG, Ab bez vazby na C')



- **Předpověď rizika rejekce štěpu a individualizaci její profylaxe**
- **Monitorace protilátek po transplantaci – dg. humorální rejekce**

# Mikrolymfocytotoxický test, CDC

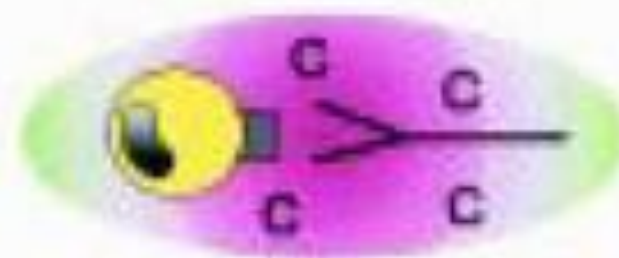
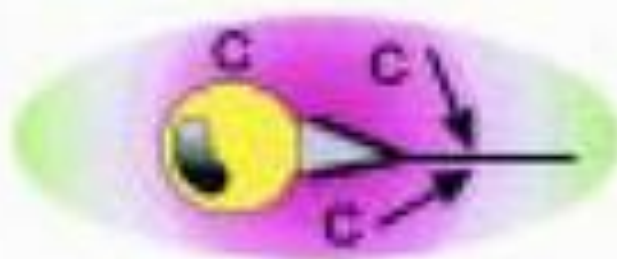
HLA antisérum  
+ suspenze  
lymfocytů

pozitivní reakce

negativní reakce



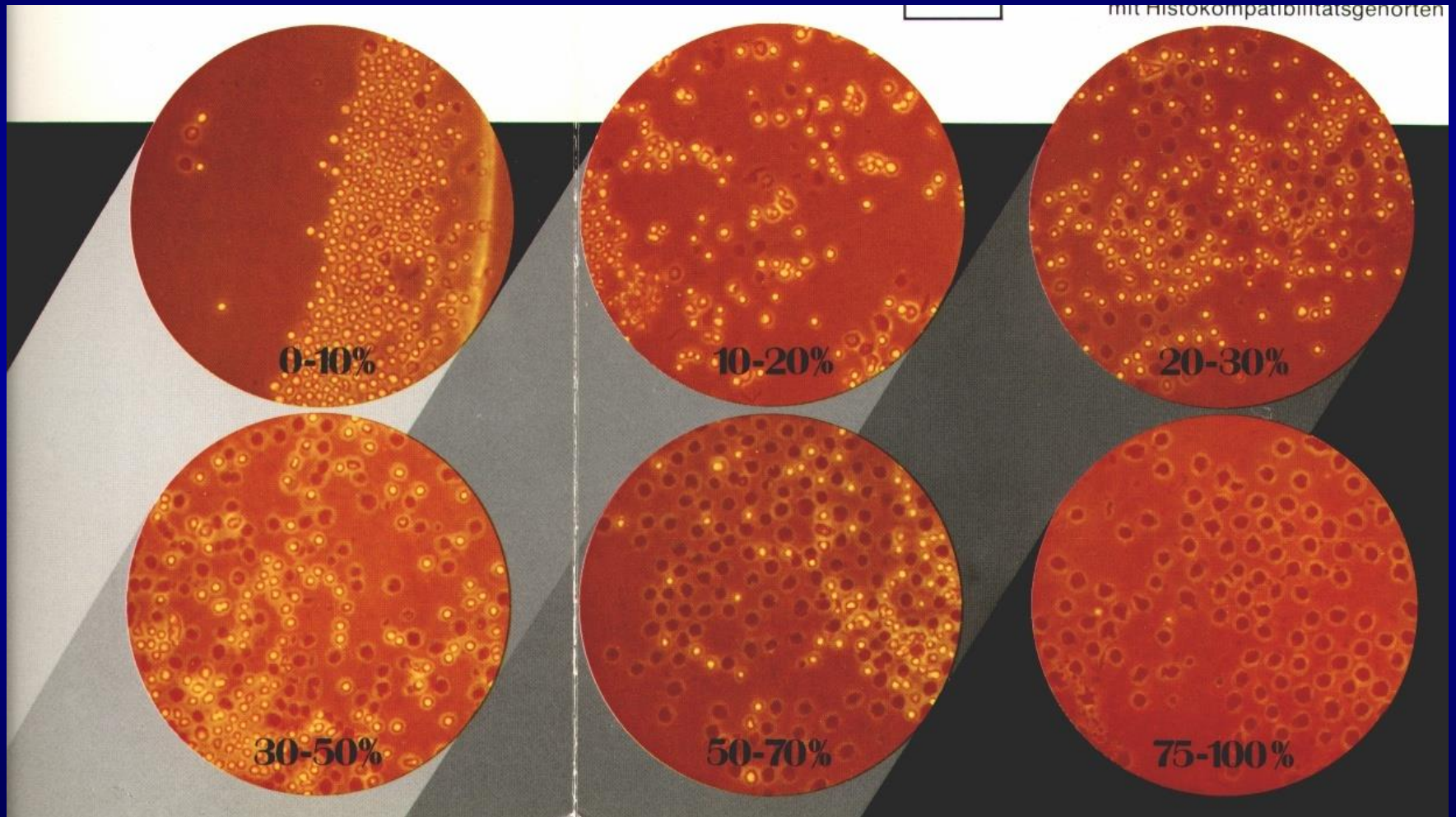
lýza závislá  
na  
komplementu



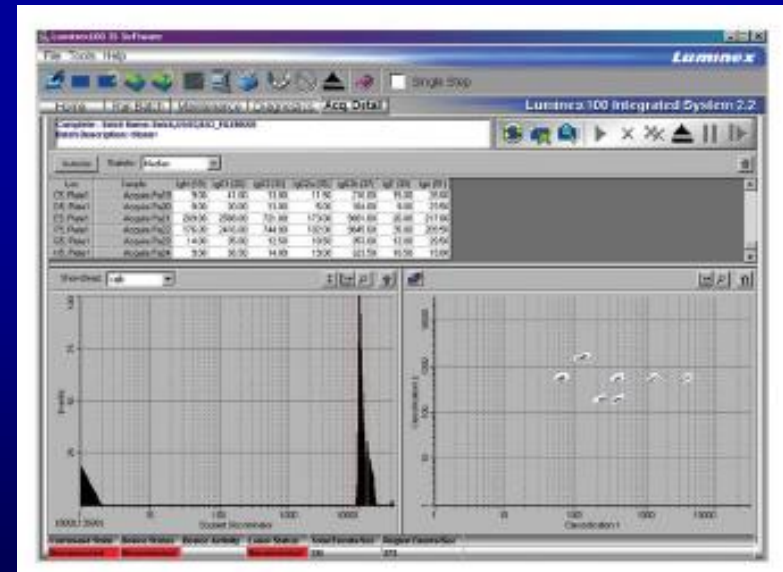
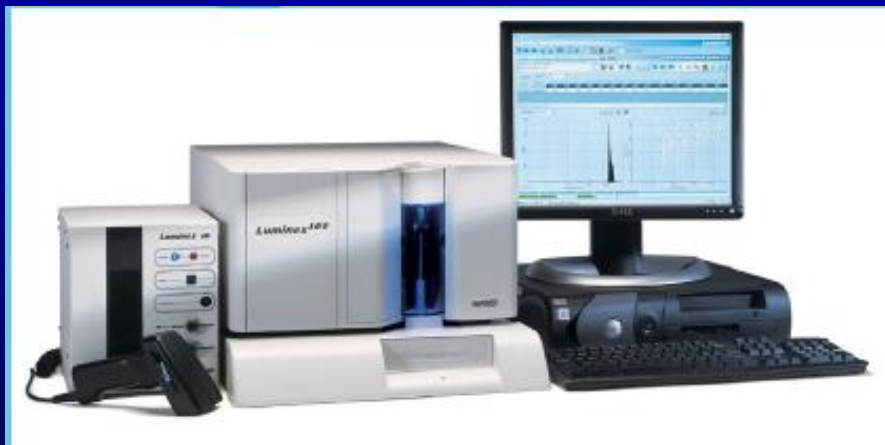
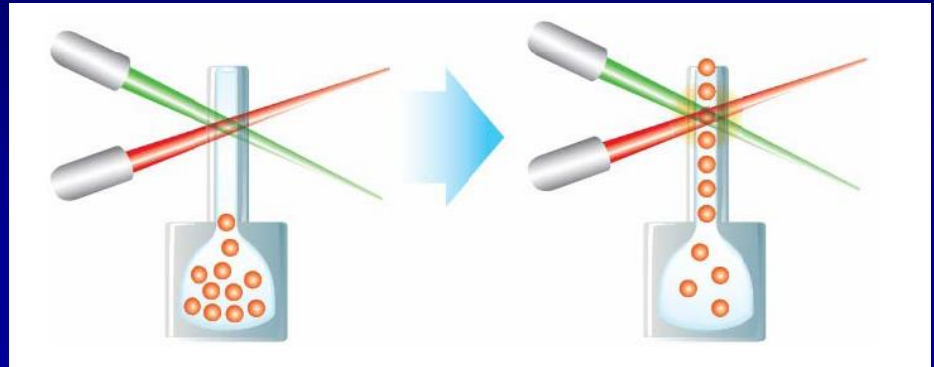
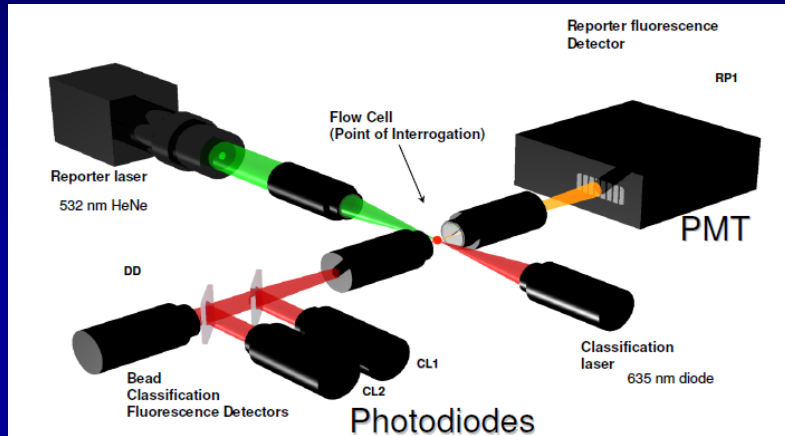
barvení vitálním  
barvivem  
(mikroskop)



# Mikrolymfocytotoxický test, CDC



# TECHNOLOGIE LUMINEX



# Transplantace ledviny od zemřelého dárce

Urgentní výběr

**Dárce**



**Příjemce**

1. Imunogenetické vyšetření pacienta (čekatele):

*HLA typizace*

*Pravidelný screening anti-HLA protilátek*

2. Imunogenetické vyšetření kadaverózního dárce - statim

*HLA typizace*

3. Předběžný cross-match

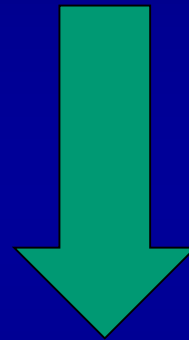
4. Virtuální cross-match

5. Finální cross-match (sérum pacienta s lymfocyty dárce)

- před vlastní transplantací

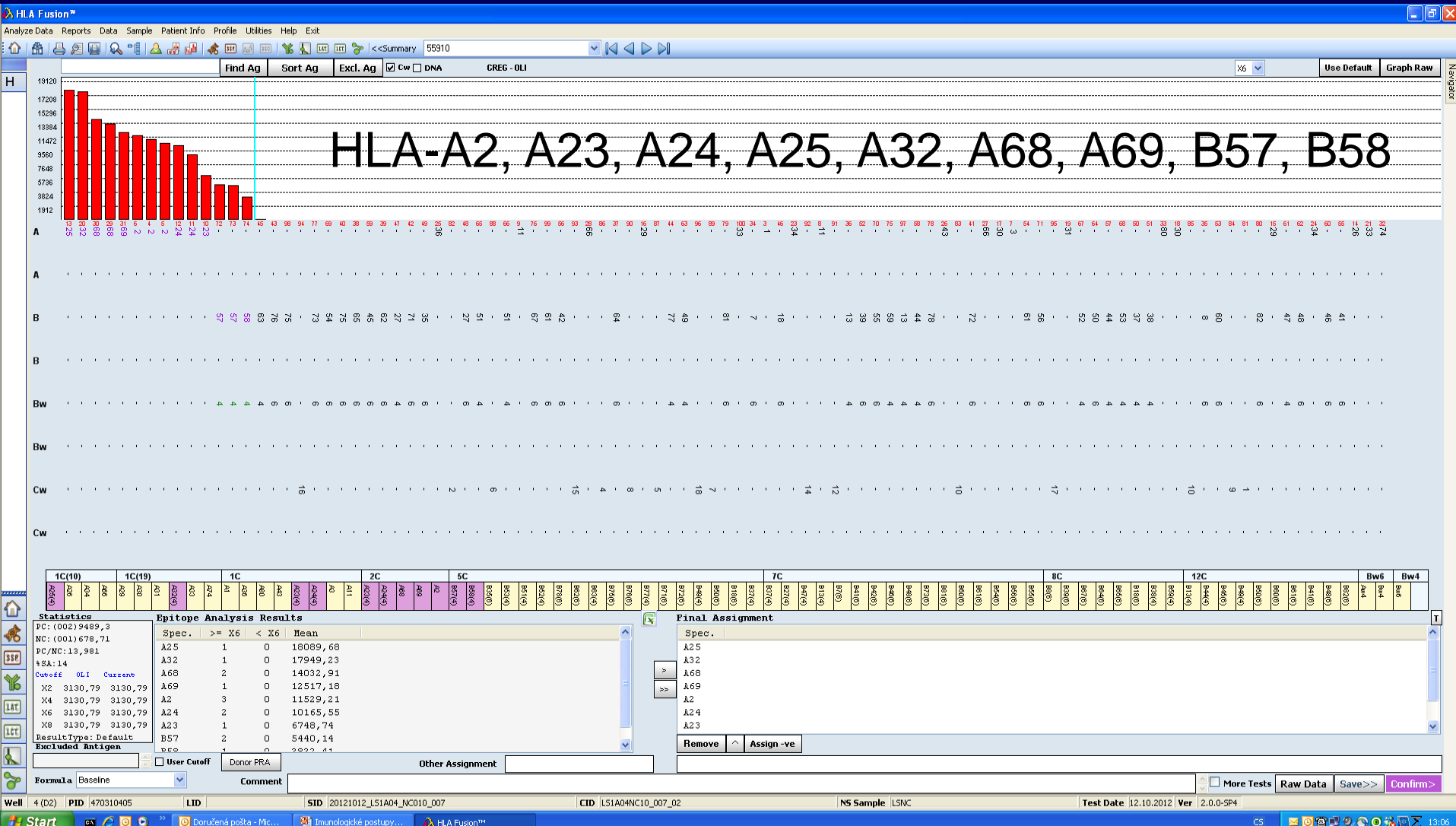
# Pravidelný screening anti-HLA protilátek u pacientů

*CDC (PRA) + Luminex (omezeně)*



*Luminex (plně) – cPRA + nepřípustné HLA antigeny*

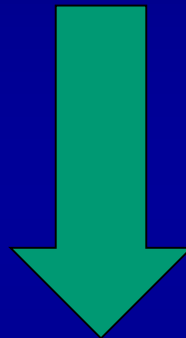
# Luminex – stanovení cPRA a „nepřípustných“ HLA antigenů pro virtuální cross-match



Pacient B.A.: cPRA = 78%

# HLA typizace kadaverozního dárce (statim)

HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1  
(PCR-SSP, RT-PCR)

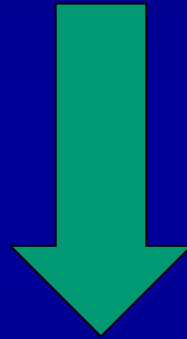


HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5,  
-DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1  
(RT-PCR, NGS - např. Oxford Nanopore)



# Předběžný cross-match

*Fyzický CDC cross-match lokálně  
(séra vybraných čekatelů versus lymfocyty dárce)*



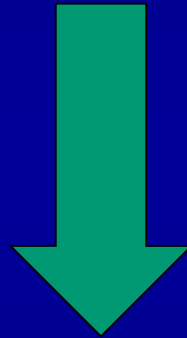
*Virtuální cross-match centrálně  
(nepřípustné HLA antigeny pacienta versus HLA typizace dárce)*

*Odpadá lokální virtuální cross-match !*

# Finální fyzický cross-match

*(čerstvé sérum příjemce versus lymfocyty dárce)*

CDC, (*FCXM - Flow Cytometry Cross-match*)



FCXM, (*CDC*)

# Závěry

- IVDR direktiva urychluje **změny v zajištění imunogenetického vyšetření** pro orgánové transplantace (cPRA, virtuální CM)
- centrální **virtuální crossmatch** - výrazné zjednodušení a urychlení alokace ledvin (i dalších orgánů)
- benefit pro pacienty, laboratoře a celý transplantační program, ale **vyšší náklady**, počáteční znevýhodnění aloimunizovaných čekatelů
- finální fyzický **FCXM** (Flow Cytometry Cross-match) – vyšší citlivost, lepší predikce úspěšné transplantace
- **doplnění infrastruktury** (přístrojové vybavení), infromatických nástrojů, zavedení (rozšíření) metodik – přechodné období

## Poděkování

### IKEM Praha

Antonij Slavčev

Matěj Röder

Šárka Valhová

a další

### FN Plzeň

Tomáš Vlas

### FN Olomouc

HLA laboratoř IMUNO FNOL

Transplantační centrum FNOL

III. Interní klinika FNOL - nefrologie

