

Die Verträglichkeitsprobe zum Ausschluss Spender-spezifischer anti-HLA Antikörper:

Essentiell für das Organüberleben –
*aber im Ergebnis durch Störfaktoren
manipulierbar*

Gerald Schlaf,
Stabsstelle HLA-Labor am Universitätsklinikum Halle/Saale

Wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation:

Negatives Ergebnis der Verträglichkeitsprobe (Crossmatch/CM)

- aufgrund seiner Relevanz berücksichtigt im Deutschen Transplantationsgesetz (§16)

- umgesetzt durch die Richtlinien der BÄK (RiLiBÄK), Abschnitt 4.3. (Vorschrift eines **lymphozytären** Kreuztestes)

Historisch entsprechend den Richtlinien der BÄK (RiLiBÄK) vom 28.02.2003 gefordert:

Ausschluss **zytotoxischer** Spender-spezifischer Antikörper durch eine Kreuzprobe (Cross-Match)

→ keine weitere methodische Spezifizierung aufgeführt

Durch Eurotransplant (ET) und die aktuelle RiLiBÄK (Inkrafttreten am 08.12.2010) als obligatorisch festgelegtes Standardverfahren:

Complement-Dependent-Cytotoxicity CrossMatch

CDC-CM Assay

= Lymphozytotoxizitätstest (LZT)

Verträglichkeitsprobe/Crossmatch (CM) – rechtliche Grundlage

Durch Eurotransplant (ET) und die aktuelle RiLiBÄK (Inkrafttreten am 08.12.2010) als obligatorisch festgelegtes Standardverfahren:



Complement-Dependent-Cytotoxicity CrossMatch

CDC-CM Assay

= Lymphozytotoxizitätstest (LZT)

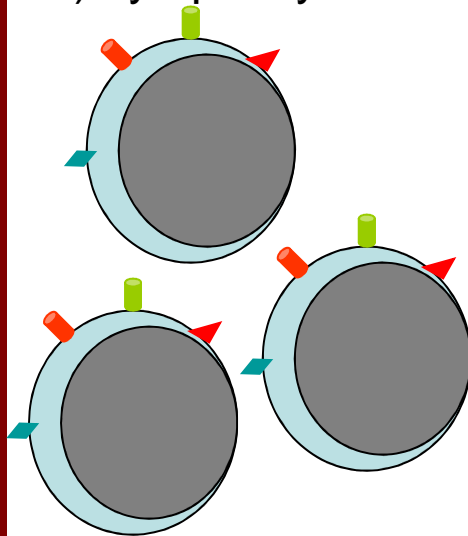
„Die lymphozytäre Kreuzprobe (Cross-Match) wird mittels LCT mit einer Serumprobe des Patienten und ungetrennten mononukleären Zellpopulationen aus peripherem Blut, Lymphknoten oder Milzzellen des Organspenders durchgeführt.“

Complement-**D**ependent-**C**ytotoxicity **C**ross**M**atch
CDC-CM Assay
= **L**ymphozytotoxizitätstest (**LZT**)

- funktioneller Test, technische Durchführung der Phänotypisierung (serologische Typisierung der HLA-Merkmale) sehr ähnlich
- Unterschied: unbekannte Komponente sind nicht die HLA-Merkmale auf den zu typisierenden Zellen mittels Testseren bekannter Spezifität(en), sondern.....
-unbekannte Komponente sind die **Antikörperspezifitäten im Empfängerserum**, die **nicht gegen HLA-Merkmale des Spenders gerichtet** sein dürfen  sonst: akute Rejektionsgefahr !!! 

CDC-Crossmatch = funktioneller Nachweis von HLA-Antikörper-spezifitäten im Serum eines Rezipienten gegen HLA-Merkmale auf isolierten Lymphozyten des prospektiven Spenders

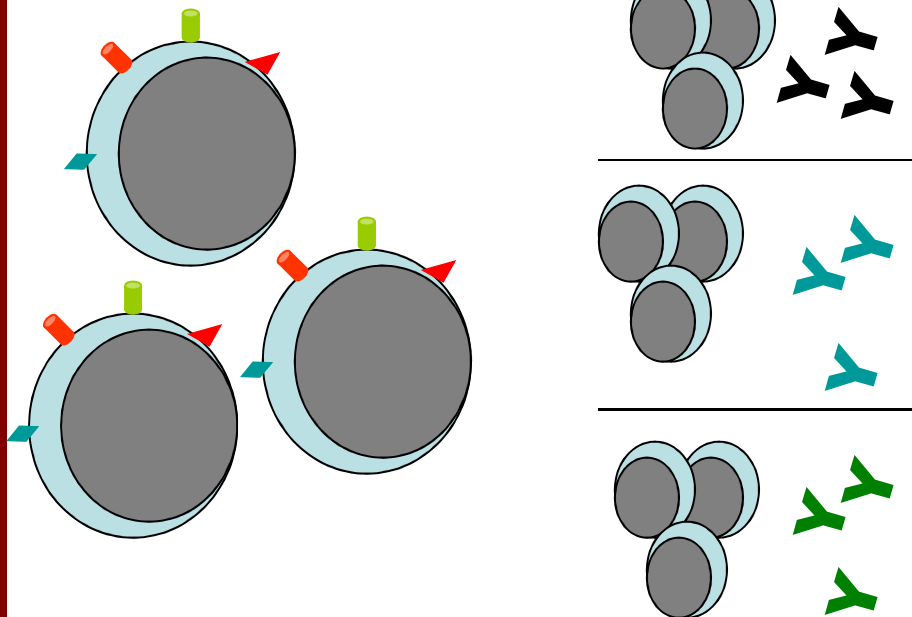
1) Lymphozyten isolieren



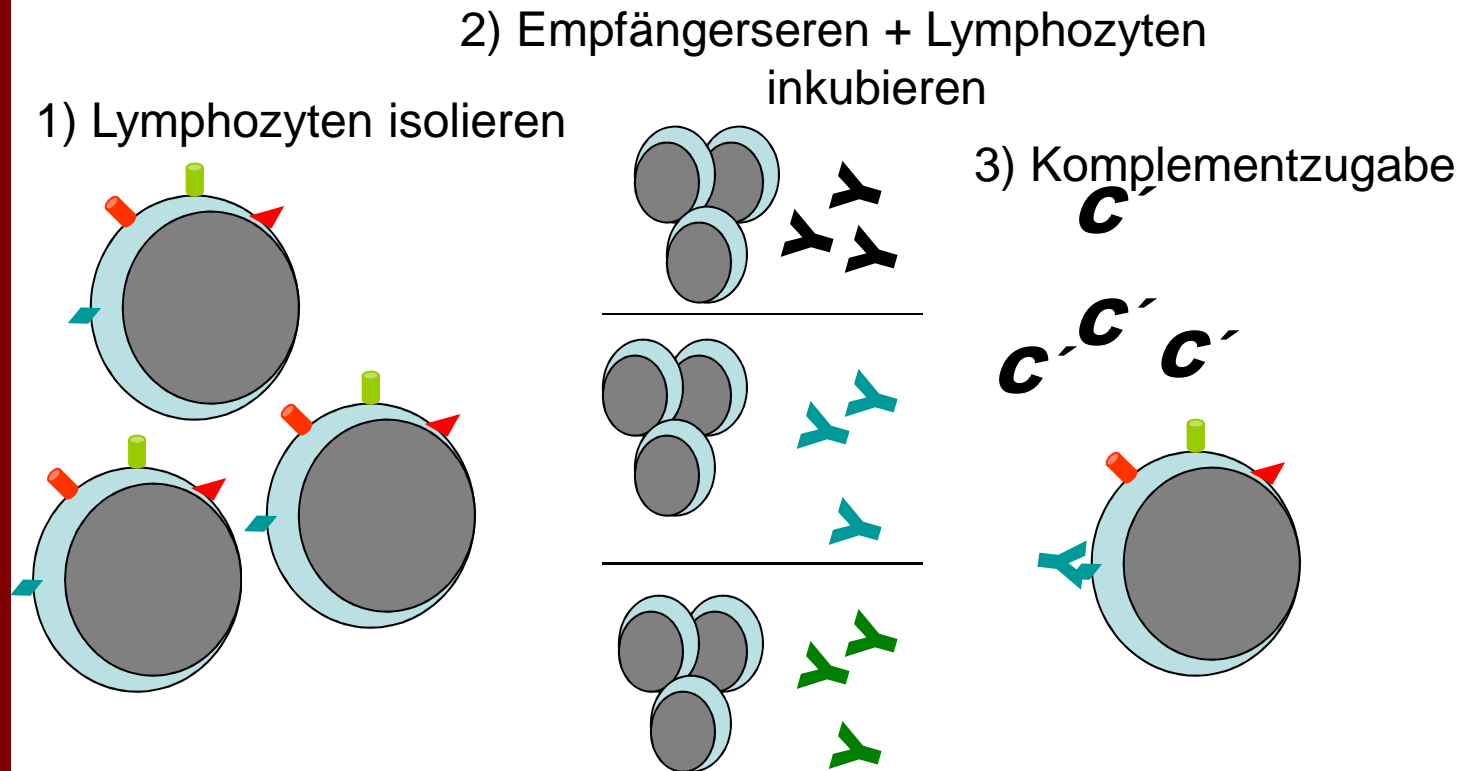
CDC-Crossmatch = funktioneller Nachweis von HLA-Antikörperspezifitäten im Serum eines Rezipienten gegen HLA-Merkmale auf isolierten Lymphozyten des prospektiven Spenders

2) Empfängerseren + Lymphozyten
inkubieren

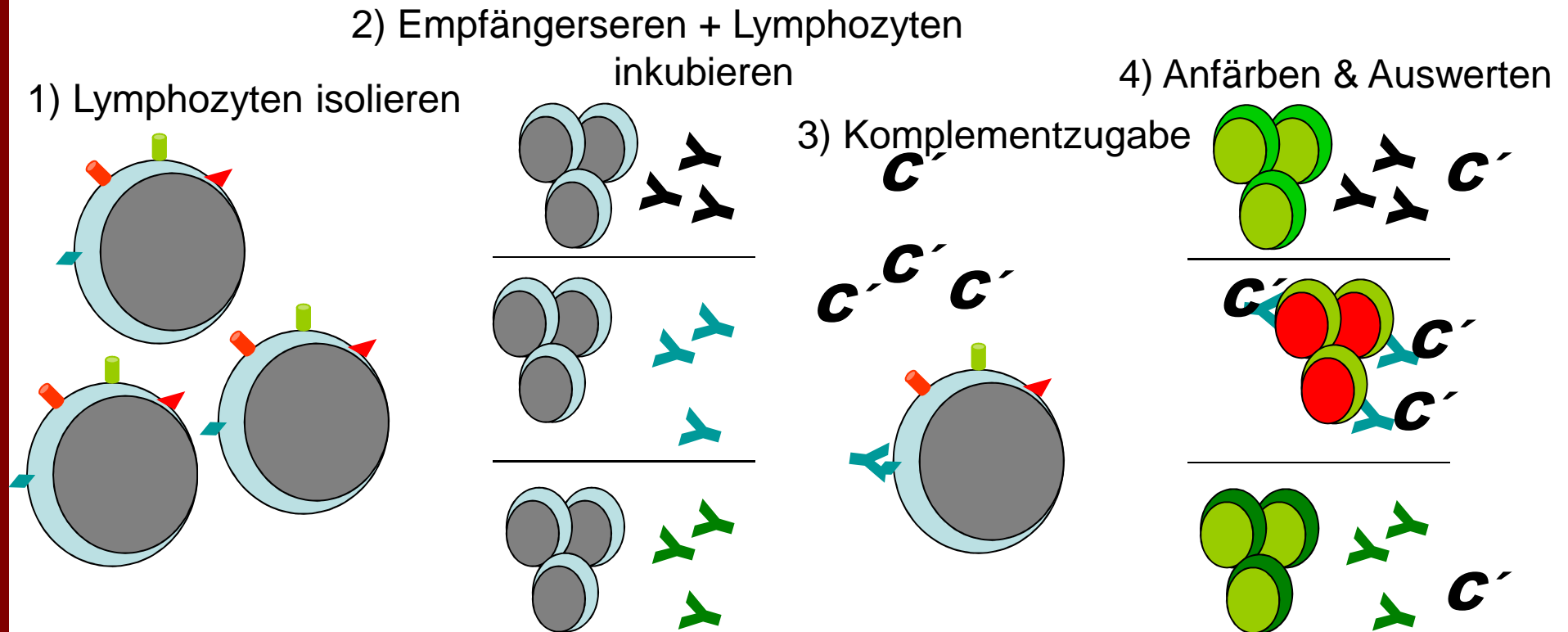
1) Lymphozyten isolieren



CDC-Crossmatch = funktioneller Nachweis von HLA-Antikörperspezifitäten im Serum eines Rezipienten gegen HLA-Merkmale auf isolierten Lymphozyten des prospektiven Spenders



CDC-Crossmatch = funktioneller Nachweis von HLA-Antikörperspezifitäten im Serum eines Rezipienten gegen HLA-Merkmale auf isolierten Lymphozyten des prospektiven Spenders



Auswertung über 2-Farbfluoreszenz: **EtBr** versus **Acridinorange**

Anzahl der toten (roten) Lymphozyten pro Napf	Bedeutung und Score	NIH-
0-10%	negativ	1 (∅)
10-20%	fraglich	2 (+)
20-40%	schwach positiv	4 (++)
40-80%	positiv	6 (++++)
80-100%	stark positiv	8 (+++++)

CDC-Verträglichkeitsprobe/Crossmatch (CM) – Charakteristika

- funktioneller Test mit relativ guter Routinetauglichkeit
- zeitliche Limitierung (2,5 – 3 Std.)
- entwickelt in den 60er Jahren von Paul Terasaki

CDC-Verträglichkeitsprobe/Crossmatch (CM) – Charakteristika

- funktioneller Test mit relativ guter Routinetauglichkeit
- zeitliche Limitierung (2,5 – 3 Std.)
- entwickelt in den 60er Jahren von Paul Terasaki
- allerdings auch durch gravierende Nachteile charakterisiert
- entspricht somit nicht aktuellen immunologischen Erkenntnissen und modernen diagnostischen Anforderungen

Funktioneller Assay (Vitalitätsassay), dessen Ergebnisinterpretierbarkeit stark von initialer Zellvitalität abhängt:

- schwache Reaktionen nicht detektierbar vor dem Hintergrund vieler letaler Zellen
- verlässliche Resultate nur bei Zellvitalitäten $\geq 90\%$
- sehr frisches Material erforderlich (i.d.R nicht älter als 48 h bei RT-Lagerung)
- Ergebnis stark beeinflusst durch kontaminierende Zellen (Granulozyten & Blasten); Blastenausschüttung in peripheres Blut z.B. nach starkem Blutverlust des Spenders

Funktioneller Assay (Vitalitätsassay), dessen Ergebnisinterpretierbarkeit stark von initialer Zellvitalität abhängt:

- extrem breite Grauzone zwischen negativem und positivem Resultat
- geringe Sensitivität: 5- bis 10-fach geringer als ELISA-basierende Alternativen
- funktioneller Test: somit sind grundsätzlich nur sogenannte zytotoxische, d.h. Komplement-aktivierende AK-Isotypen nachweisbar (IgM, IgG1, IgG3, ~~IgG2~~, ~~IgG4~~)

Funktioneller Assay (Vitalitätsassay), dessen Ergebnisinterpretierbarkeit stark von initialer Zellvitalität abhängt:

- Zellvitalität / Zellzustand in der CDC-Verträglichkeitsprobe abhängig von Erkrankungen / pharmazeutischen Behandlungen der Empfänger
- durch Erkrankung bedingte oder pharmazeutisch bedingte Artefakte führen zu falsch positiven Ergebnissen des CDC-CM

Funktioneller Assay (Vitalitätsassay), dessen Ergebnisinterpretierbarkeit stark von initialer Zellvitalität abhängt:

- Zellvitalität / Zellzustand in der CDC-Verträglichkeitsprobe abhängig von Erkrankungen / pharmazeutischen Behandlungen der Empfänger
- durch Erkrankung bedingte oder pharmazeutisch bedingte Artefakte führen zu falsch positiven Ergebnissen des CDC-CM → Vorstellung von 3 Patientengruppen

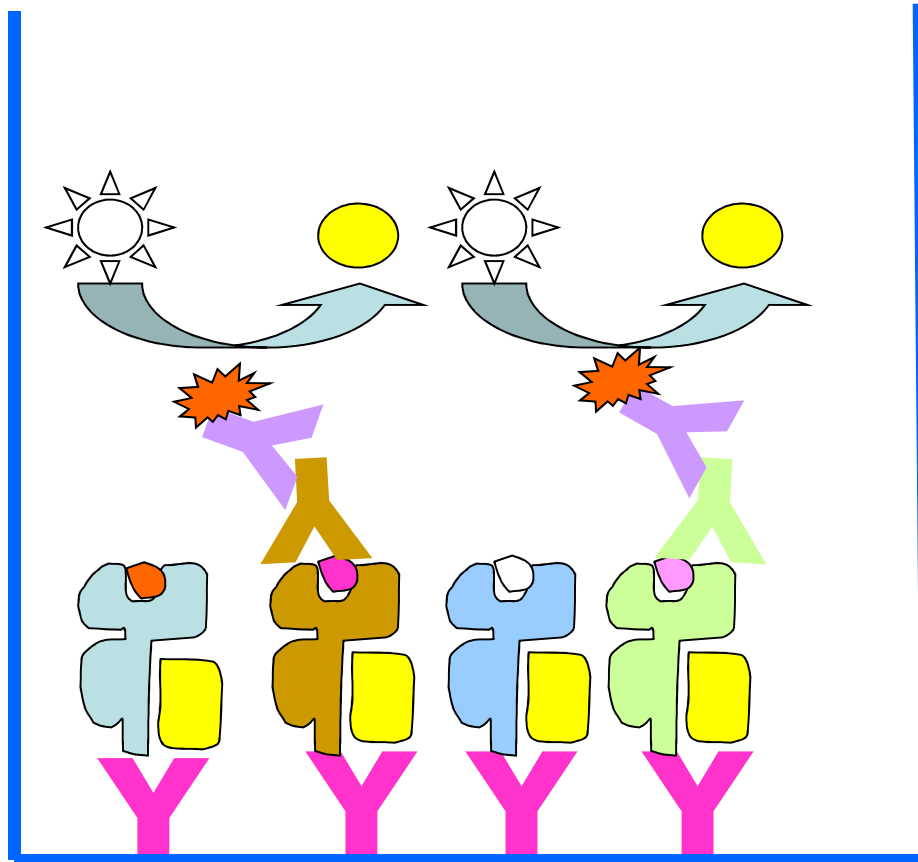
Welche methodischen Alternativen existieren, die unabhängig von dem Parameter „Zellvitalität“ ein Cross-Matching erlauben ?

Konsequenz aus Versagen des CDC / LZT unter bestimmten Bedingungen:

Einsatz einer alternativen Festphasen-basierenden Methode:

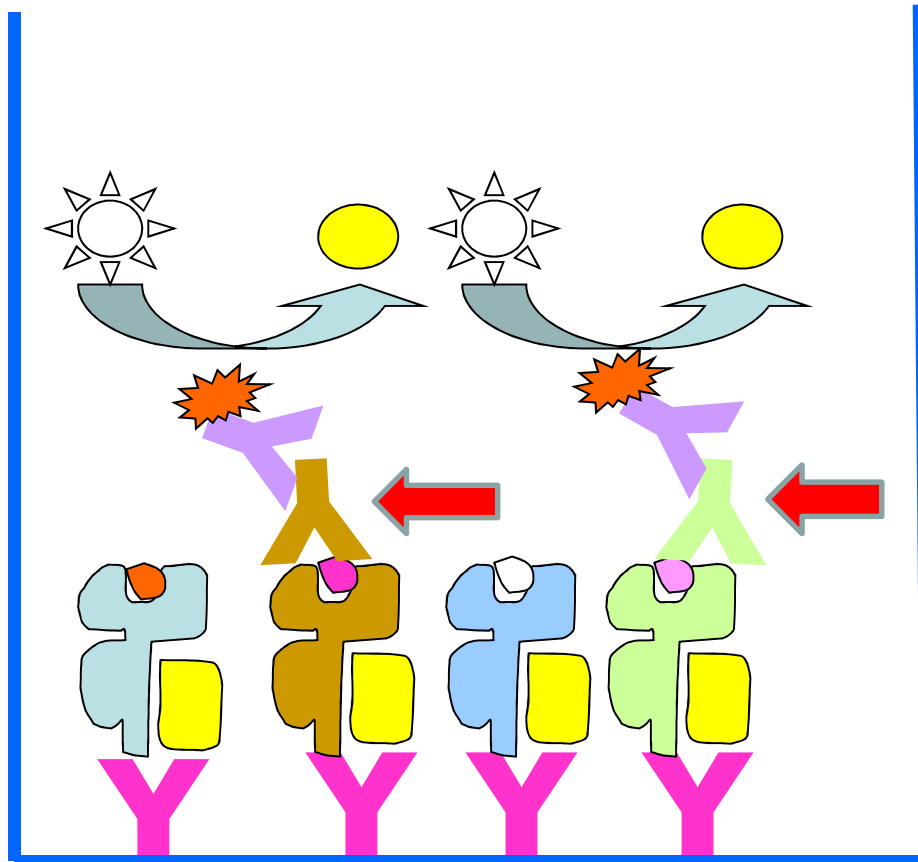
1. **AMS-ELISA** (**A**ntibody **M**onitoring **S**ystem) der Firma GTI/LifeCodes (heute Immucor), aus marketing-strategischen Gründen seit März 2013 nicht mehr produziert, bis Juli 2013 verwendet
2. **AbCross** (Crossmatch ELISA) der Firma Biotest (heute Bio-Rad), nach kompletter methodischer Umstellung seit Juli 2013 verwendet

Aufbau des AbCross & AMS-ELISA (Prinzip: Sandwich-ELISA)



- e) Substrat
- d) Enzym-konjugierter anti-human IgG/M-Ak (violett)
- c) Donor-spezifischer anti-HLA Klasse I- Ak der Rezipienten
- b) HLA Klasse I/II-Antigene aus lysiertem Donormaterial
- a) anti-HLA Klasse I/II-mAk, gegen monomorphes Epitop gerichtet

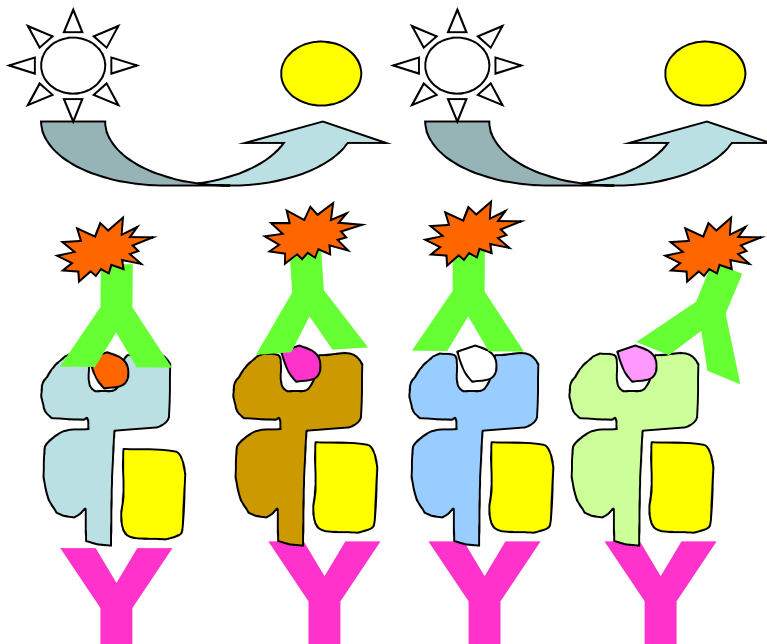
Aufbau des AbCross & AMS-ELISA (Prinzip: Sandwich-ELISA)



- e) Substrat
- d) Enzym-konjugierter anti-human IgG/M-Ak (violett)
- c) Donor-spezifischer anti-HLA Klasse I- Ak der Rezipienten
- b) HLA Klasse I/II-Antigene aus lysiertem Donormaterial
- a) anti-HLA Klasse I/II-mAk, gegen monomorphes Epitop gerichtet

Lysatkontrolle des AMS-ELISA (Positivkontrolle)

Substratreaktion mit signifikanter Extinktion nur bei
ausreichendem Donormaterial (lysierte HLA Moleküle)



d) Substrat

c) Lysatkontrolle, Enzym-
konjugierter mAk, gegen
monomorphes Epitop
gerichtet

b) HLA Klasse I/II-Antigene
aus lysiertem Donormaterial

a) anti-HLA Klasse I/II mAk, gegen
monomorphes Epitop gerichtet

Vergleich CDC-Crossmatch versus ELISA-Crossmatch (Zytostatikaapplikation)

Fallgruppe 1: Crossmatch nach Zytostatikaapplikation (β -Mercaptopurin)
bei HLA-haploidentischen Stammzellspenden

Patienten:	CDC-CM (Score):			ELISA-CM:	
	PBL	T Zell	B Zell	Klasse I	Klasse II
1	2	n.d.	n.d.	neg.	neg.
2	4	n.d.	n.d.	neg.	neg.
3	2	2	2	neg.	neg.
4	1/2	1/2	1/2	neg.	neg.
5	4	4	4	neg.	neg.
6	2	2	2	neg.	neg.
7	2/4	n.d.	n.d.	neg.	neg.

n.d.: nicht durchgeführt aufgrund sehr geringer Abnahmezellzahl durch
Behandlung mit Zytostatikum β -Mercaptopurin

Vergleich CDC-Crossmatch versus ELISA-Crossmatch (Therapeutische Antikörper)

Fallgruppe 2: Crossmatch nach Konditionierung mit therapeutischen AK

Patienten	CDC-CM			AMS-ELISA-CM	
	PBL	T Zell	B Zell	Klasse I	Klasse II
<u>Rituximab (anti-CD20):</u>					
• 1	2	1/2	6/8	neg.	neg.
• 2	2/4	1/2	8	neg.	neg.
• 3	2	1	6	neg.	neg.
• 4	2/4	1/2	6/8	neg.	neg.
• 5	4	2	8	neg.	neg.
• 6	4	2	8	neg.	neg.
• 7	2/4	1/2	8	neg.	neg.
• 8	2	1/2	6	neg.	neg.
• 9	4	2	6/8	neg.	neg.
<u>Basiliximab (anti-CD25):</u>					
• 9	2	2	4	neg.	neg.
• 10	2	2	4/6	neg.	neg.

21. Jahrestagung, Arbeitskreis Nierentransplantation der DGU;
Halle, den 22.11.2013

Vergleich CDC-Crossmatch versus ELISA-Crossmatch (Autoimmunerkrankungen) I

Vergleich der CDC- and ELISA-CM -basierenden Resultate einer 41-jährigen Rezipientin und ihrer 60-jährigen Mutter als prospektive Lebendnierenspenderin (HLA A-B-DR –Mismatch: 1-1-1):

Serum Sample	CDC-CM			AMS-ELISA-CM	
	PBL	T-cell	B-cell	Class I	Class II
05/2010	1	1	1	n.d.	n.d.
10/2010	2/4	1/2	4	neg.	neg.
01/2011	1	1	1	neg.	neg.

Korrespondierende Antikörper-Screening bzw. Spezifizierungsanalysen:

Serum Sample	Screening-ELISA		Luminex-Analyse	
	Class I	Class II	Class I	Class II
05/2010	neg.	neg.	n.d.	n.d.
07/2011	neg.	neg.	n.d.	n.d.
10/2010	neg.	neg.	neg.	neg.
01/2011	neg.	neg.	neg.	neg.

In Abhängigkeit von dem N-TX Zentrum: zwei oder drei Kreuzproben vor der Lebendnierenspende.

Vergleich CDC-Crossmatch versus ELISA-Crossmatch (Autoimmunerkrankungen) II

Vergleich der CDC- und ELISA- basierenden Crossmatchresultate einer 43-jährigen Rezipientin mit einem **komplett HLA-kompatiblen Kadavernierenspender (HLA A-B-DR –Mismatch: 0-0-0 & kompatible Cw und DQ):**

Serum Sample	CDC-CM *			ELISA-CM*	
	PBL	T-cell	B-cell	Class I	Class II
10/2009	6	6	8	neg.	neg. (hist. Serum)
10/2010	6/8	6	8	neg.	neg. (akt. Serum)

*prä-Transplantations Crossmatch unter Verwendung von zwei Seren

Korrespondierende Antikörper-Screening bzw. Spezifizierungsanalysen (Quartals-Screening):

Serum Sample	Screening–ELISA / DynaChip (#)		CDC-Zellplattenanalyse
	Class I	Class II	Class I / II
07/2009	neg. (#)	neg. (#)	n.d.
10/2009	neg. (#)	neg. (#)	pos. (68% PRA) [#]
01/2010	neg.	neg.	n.d.
04/2010	neg.	neg.	n.d.
07/2010	neg.	neg.	n.d.
10/2010	neg. (#)	neg. (#)	pos. (61% PRA) [#]

Falsch positive Resultate betreffen auch Antikörperscreening/Differenzierung mittels Zellplattenanalyse. [#]: Spezifizierung der Antikörper nicht möglich

Fazit:

- i) Der CDC-Crossmatch wird aufgrund **Artefakt-bedingter Positivität** bei Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises und diesbezüglich insbesondere durch Immunkomplexerkrankungen seiner Aufgabe, allo-spezifische anti-HLA Antikörper darzustellen, in keiner Weise gerecht.

Fazit:

- i) Der CDC-Crossmatch wird aufgrund **Artefakt-bedingter Positivität** bei Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises und diesbezüglich insbesondere durch Immunkomplexerkrankungen seiner Aufgabe, allo-spezifische anti-HLA Antikörper darzustellen, in keiner Weise gerecht.
- ii) Zusätzlich ist er zur Darstellung allo-spezifischer Antikörper bei Empfängerconditionierung mit therapeutischen Antikörpern ungeeignet (**falsch positive Ergebnisse aufgrund der Komplement-aktivierenden Effektorfunktion der verwendeten Antikörper**).

CDC-Crossmatch und i) Autoimmunerkrankungen und ii) therapeutische Antikörper

- i) Der CDC-Crossmatch wird aufgrund **Artefakt-bedingter Positivität** bei Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises und diesbezüglich insbesondere durch Immunkomplexerkrankungen seiner Aufgabe, allo-spezifische anti-HLA Antikörper darzustellen, in keiner Weise gerecht.
 - ii) Zusätzlich ist er zur Darstellung allo-spezifischer Antikörper bei Empfängerconditionierung mit therapeutischen Antikörpern ungeeignet (**falsch positive Ergebnisse aufgrund der Komplement-aktivierenden Effektorfunktion der therapeutisch verwendeten Antikörper**).
- entspricht somit nicht aktuellen immunologischen Erkenntnissen und modernen diagnostischen Anforderungen

Resultierende Frage:

Wie viele Patienten der Warteliste sind betroffen?

d.h. bei wie vielen Patienten verhindert eine falsch positive CDC-Verträglichkeitsprobe die Transplantation?

Resultierende Frage:

Wie viele Patienten der Warteliste sind betroffen?

d.h. bei wie vielen Patienten verhindert eine falsch positive CDC-Verträglichkeitsprobe die Transplantation?

Kein Problem für Lebendnierenspenden: In Absprache mit dem Transplantationszentrum wird CDC-CM durch ELISA-CM ersetzt!

Resultierende Frage:

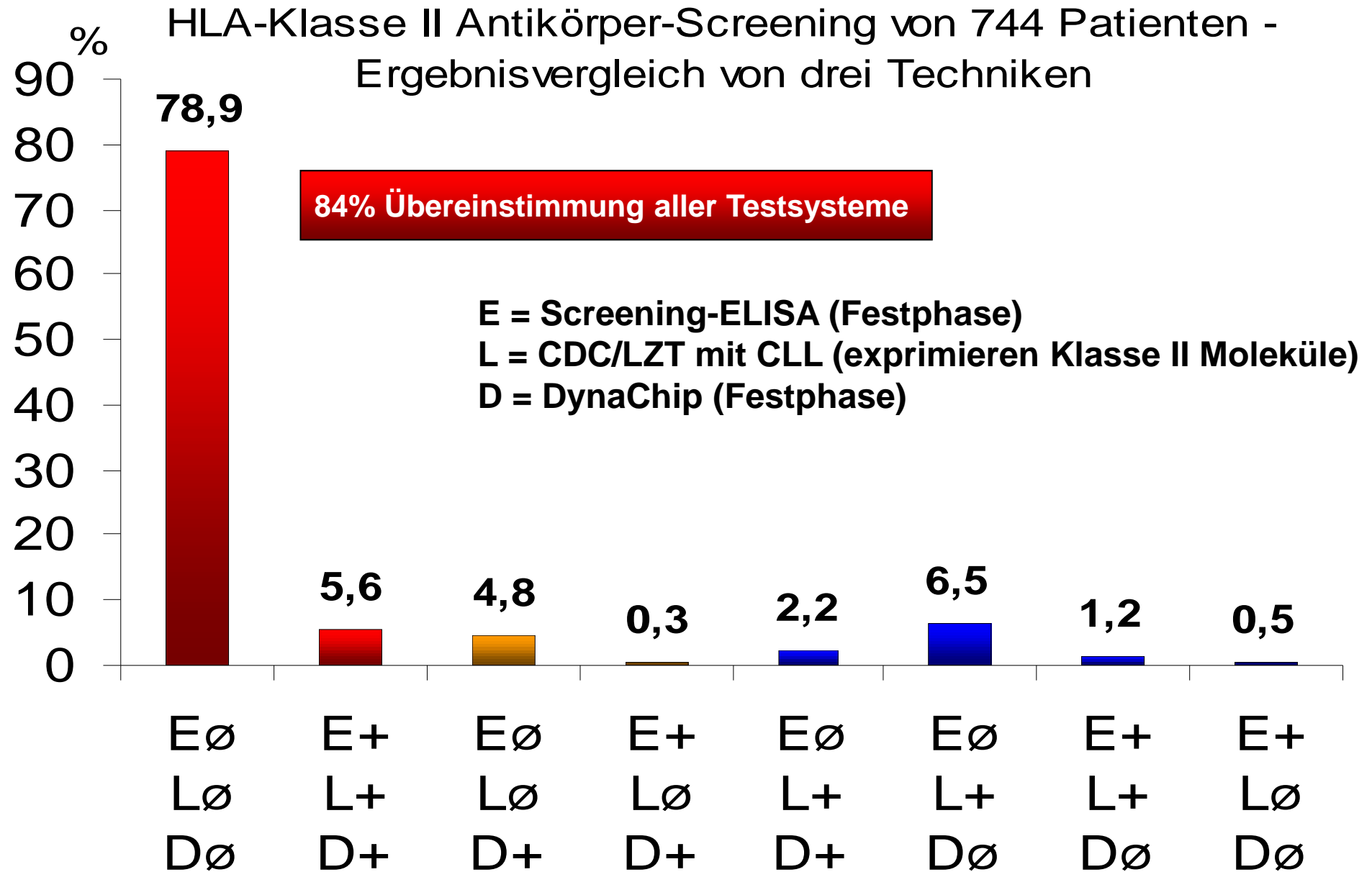
Wie viele Patienten der Warteliste sind betroffen?

d.h. bei wie vielen Patienten verhindert eine falsch positive CDC-Verträglichkeitsprobe die Transplantation?

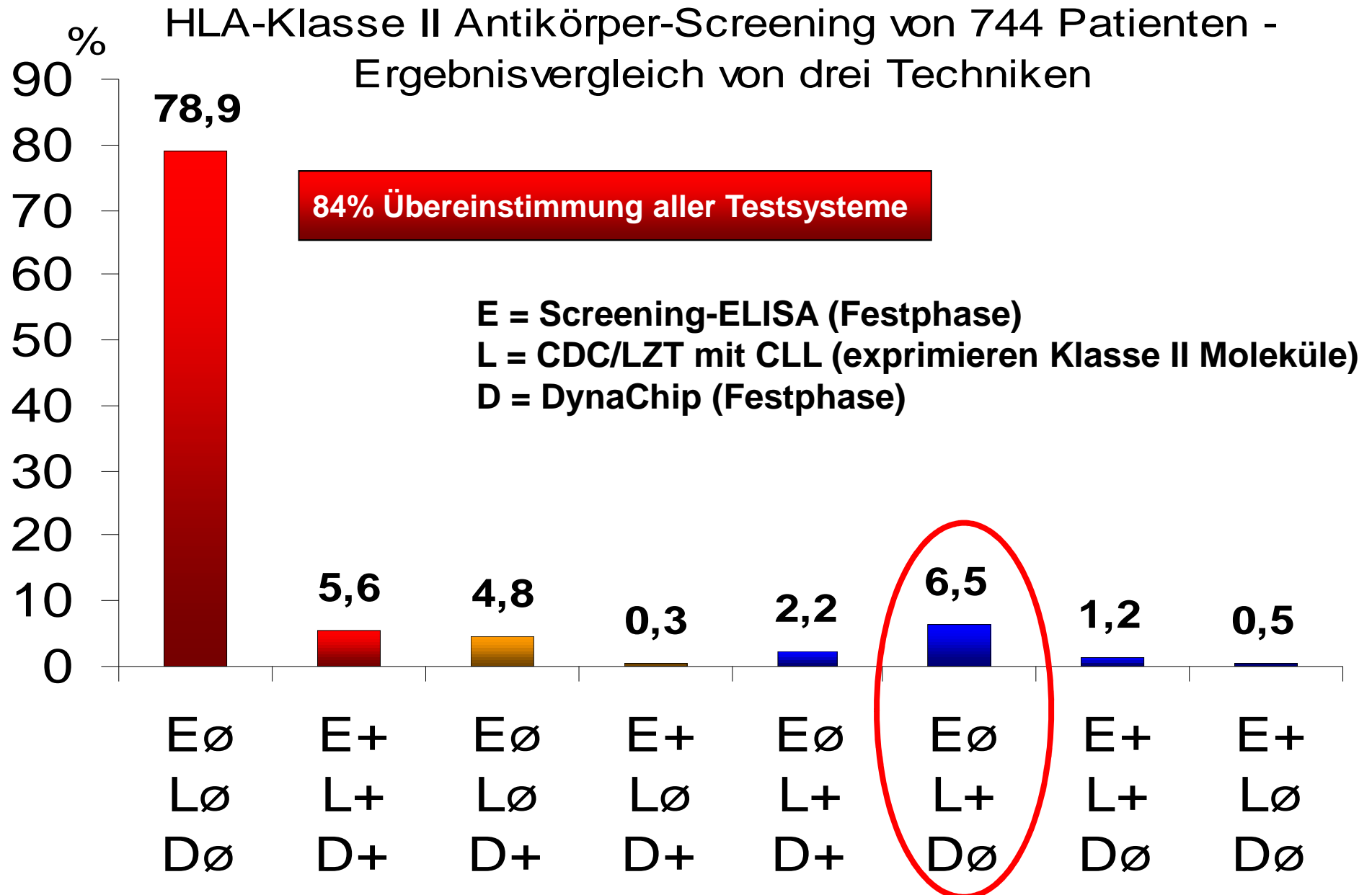
Kein Problem für Lebendnierenspenden: In Absprache mit dem Transplantationszentrum wird CDC-CM durch ELISA-CM ersetzt!

Allerdings erhebliches Problem für Organallokation nach Warteliste, da CDC-CM durch RiLiBÄK methodisch vorgeschrieben. Welcher Anteil der Warteliste betroffen?

Ineffizienz des CDC-Crossmatch bei Autoimmunerkrankungen - wie häufig?



Ineffizienz des CDC-Crossmatch bei Autoimmunerkrankungen - wie häufig?



Ineffizienz des CDC-Crossmatch bei Autoimmunerkrankungen - wie häufig?

Vergleichendes Quartalsscreening im Jahr 2009:

6,5 % der Wartelistenpatienten in Vergleichsstudie
waren.....

..... positiv in der Zellplattenanalyse (CDC-Verfahren)

.....negativ im Screening ELISA (Festphase)

.....negativ im DynaChip-Verfahren (Festphase)

Ineffizienz des CDC-Crossmatch bei Autoimmunerkrankungen - wie häufig?

Vergleichendes Quartalsscreening im Jahr 2009:

6,5 % der Wartelistenpatienten in Vergleichsstudie waren.....

..... **positiv in der Zellplattenanalyse (CDC-Verfahren)**

.....**negativ im Screening ELISA (Festphase)**

.....**negativ im DynaChip-Verfahren (Festphase)**

Recherche in den Dialyseeinrichtungen nach Patientenerkrankung an Krankheit des autoimmunen Formenkreises: **~ 70 % der beantworteten Patienten betroffen**

Ausblick:

Anteil von 6,5 % (im Jahr 2009) der Patienten auf der Warteliste, die aufgrund der Begleitumstände im CDC-CM immer positiv sind, wird ansteigen.

- Patienten werden trotz entsprechender Wartelistenpunkte kein Organ erhalten...
- Scheitern einer Organallokation auch unter besten medizinisch/immunologischen Voraussetzungen...

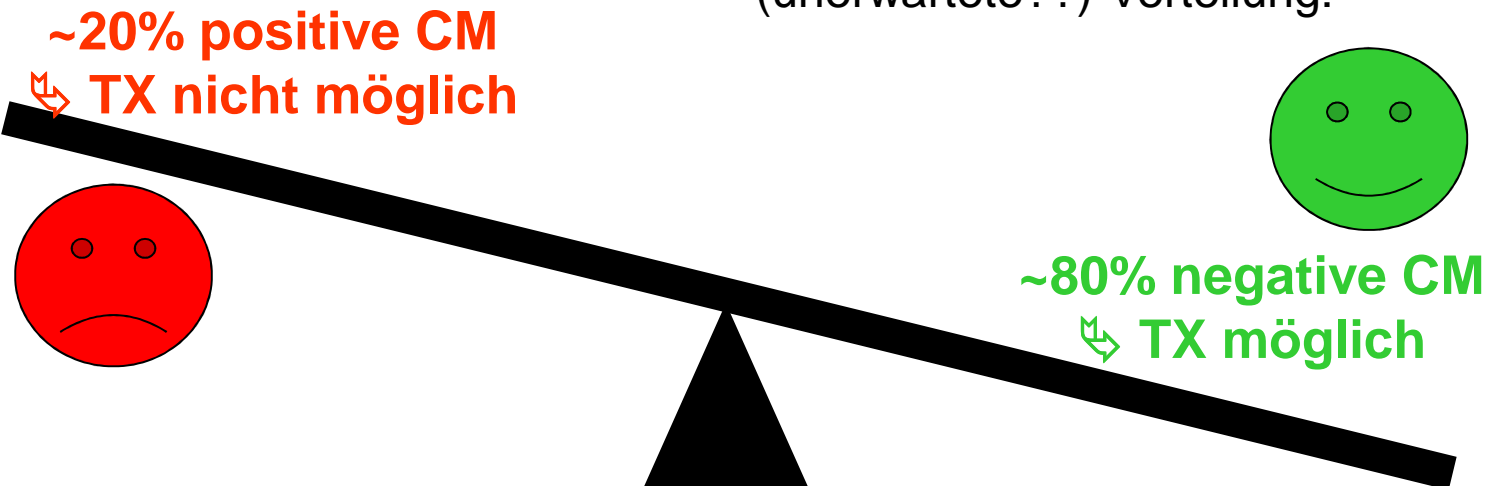
....., wenn nicht alternative Crossmatch-Verfahren erlaubt und flächendeckend etabliert werden.

Wiederholung nicht eindeutiger CDC-Crossmatch Ergebnisse mittels ELISA-Crossmatch:

Obwohl der AMS-ELISA.....

- i.nicht abhängig von der Zellvitalität ist,
- ii.sowohl zytotoxische als auch nicht-zytotoxische anti-HLA Antikörper erkennt,
- iii.mindestens fünffach sensitiver als der CDC-Kreuztest ist,
- iv.weil er allerdings durch eine erheblich höhere Spezifität (geringere Anfälligkeit für Störgrößen) gekennzeichnet ist

...als der konventionelle CDC-Kreuztest, ergibt sich folgende (unerwartete??) Verteilung:



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

21. Jahrestagung, Arbeitskreis Nierentransplantation der DGU;
Halle, den 22.11.2013