

出國報告（出國類別：進修）

# HLA 單一抗原抗體檢驗結果分析評估與 器官移植虛擬配對檢驗新技術

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：林志璞

派赴國家：美國

出國期間：113 年 5 月 6 日至 113 年 8 月 2 日

報告日期：113 年 8 月 29 日

## 摘要：

本院檢驗醫學部輸血暨移植檢驗組林志璞醫事檢驗師於 2024 年 05 月 06 日至 2024 年 08 月 02 日期間於美國加州大學舊金山分校之免疫移植實驗室(UCSF-ITL)進修，主要目的為學習 HLA 單一抗原抗體檢驗之自動化檢驗流程、DTT、Pronase 檢體前處理與干擾物之去除、報告分析與鑑定流程、受贈者之抗體移植史建立與分析，以及器官移植虛擬配對技術分析和次世代定序 HLA Typing 檢驗建立、確效與實行。UCSF-ITL 為提供異體器官與骨髓移植相關檢驗之實驗室，包含移植術前與術後相關血清學檢驗、基因定序檢驗，也擁有獨立實驗室進行與人類白血球抗原相關之疾病研究，同時也注重並執行臨床移植檢驗方法的創新與美國移植相關工作人員和實驗室主管之教育訓練計畫。本次進修除前述依進修計畫書訂定的主要內容外，也與實驗室資深醫檢師及主管學習移植檢驗相關的品管項目執行、特殊病例的分析與判讀，並分享目前國內移植檢驗相關的經驗與資訊交流。

目次：

一、 進修目的.....	1
二、 進修時程表.....	2
三、 進修過程.....	3
四、 心得與建議事項.....	36
五、 附錄.....	40
六、 進修過程圖像紀錄.....	48
七、 參考文獻	

## 一、進修目的

- (一) 人類白血球單一抗原抗體檢驗(Single Antigen Flow PRA、SAB)之自動化流程、QC 標準設立、報告結果分析、複雜抗體分析鑑定(多重抗體叢集、CREGs)、常見具有重要與不重要臨床意義之抗體分析與受贈者抗體移植史檔案(Patient Antibody Profile)建立。
- (二) DTT 之檢體前處理步驟、相關試劑之確效、QC 標準的設立與結果判讀，以及如何處理具有高背景值而造成有偽陰性結果的檢體，包含原管檢體測試、Adsorb Out 試劑使用時機與預期結果。
- (三) HLA typing 次世代定序(Next Generation Sequencing)方法的建立、不同廠商之試劑確效與比較、QC 標準的設定、檢驗結果分析與判讀、新分型序列的通報以及如何解決次世代定序方法之異常實驗結果。
- (四) Real-time PCR 方法進行緊急器官移植 HLA typing 的流程與方法、QC 確效。
- (五) UCSF-ITL 如何建立實體交叉配對(Practical Crossmatch, PXM, FCXM)與虛擬交叉配對(Virtual Crossmatch, VXM)之檢驗流程、使用不同交叉配對方法的時機以及相關自動化儀器與 Pronase 的使用。
- (六) 應用於腎臟移植之 Endothelial Cell Crossmatch 見習以及其所代表的臨床意義。
- (七) 器官移植實驗室之經驗分享與交流。

## 二、進修時程表

時間	課程內容	臨床指導教師	報告分析專家
2024/05/02~05/13	實驗室安全衛生課程、DTT 檢體前處理步驟、HLA 抗體鑑定與篩檢檢驗的實作見習與操作(鑑定：One Lambda LabScreen SAB、篩檢：Immucor PRA ID)。	Hugo Perez (Lab Technician) Jessica Ma (C.H.T.) Airica Fae Bustos (C.H.T.)	Young Cho (Lab Supervisor, C.H.S.) Denice Kong (Lab Manager, C.H.S.)
2024/05/14~05/31	HLA 抗體鑑定結果分析、複雜案例鑑定練習與討論、抗體分析原則與概念相關課程等。	Fatima Gonzalez (Specialist, C.L.S.) AJ Cajulao (C.H.T.)	Owen Buenaventura (Specialist, C.H.S.) Jack Lai (Specialist, C.H.S.)
2024/06/03~06/08	HLA NGS Typing 實作流程見習(CareDx AlloSeqTx)。	Donna Dela Cruz (C.H.T.) Chami Vang (C.H.T.)	Nancy Lee (Specialist, C.H.S.)
2024/06/10~06/28	HLA NGS Typing 檢驗結果分析、家庭族譜分析、KIR 報告分析、特殊案例討論。	Charlyn Dames (Specialist, C.H.S.) Donna Dela Cruz (C.H.T.)	Nancy Lee (Specialist, C.H.S.) Denice Kong (Lab Manager, C.H.S.)
2024/07/01~07/05	Real-time HLA typing 實作見習與結果分析(兩種試劑：One Lambda LinkSeq、CareDX QTYPE)。	Jair Jossimar Soto (C.H.T.) Donna Dela Cruz (C.H.T.)	Nancy Lee (Specialist, C.H.S.)
2024/07/08~07/19	交叉配對檢驗實作見習, 包含 FCXM、Endothelial cell XM)與 Pronase treatment 和緊急待命檢體執行流程。	Jair Jossimar Soto (C.H.T.) Kenneth Plamenco (C.H.T.) Donna Dela Cruz (C.H.T.)	Young Cho (Lab Supervisor, C.H.S.) Jack Lai (Specialist, C.H.S.)
2024/07/19~08/02	虛擬交叉配對實作練習、HLA 抗體與交叉配對和移植流程的關係專門課程、實驗室之研究計畫介紹結業報告撰寫、能力試驗。	Owen Buenaventura (Specialist, C.H.S.) Jack Lai (Specialist, C.H.S.)	Dr. Rajalingam Raja (Professor, Lab Director) Thea Dela Cruz (Lab Supervisor, C.H.S.) (ASHI Inspector)

\*C.H.T.: Clinical Histocompatibility Technologist, C.H.S.: Clinical Histocompatibility Specialist, C.L.S.: Clinical Laboratory Scientist

### 三、進修過程

#### (一) 人類白血球單一抗原抗體檢驗(SAB)與人類白血球抗體篩檢(PRA)相關內容：

##### 1. 自動化檢驗流程介紹：

- (1) 人類白血球抗體篩檢：UCSF-ITL 目前所使用的 HLA 抗體篩檢試劑為 Immucor 廠商出產之產品 LIFECODES Class I and II ID，其原理為使用表面有塗布特定組合抗原之塑膠微珠和受贈者血清反應，並在清洗後加入帶有螢光之二級抗體，反應過後經過清洗以 Luminex FlexMap 3D(LM3D)儀器進行訊號分析，並利用 Immucor 廠商之分析程式 Match It!進行結果分析。雖然本試劑本身具有分析特定常見抗體強度的功能，但 UCSF 實驗室目前報告只發送陽性百分比(PRA Positive Percentage)。本項檢驗在 UCSF 實驗室已使用自動化機械手臂系統 PerkinElmer JANUS Automated Workstation System 完成幾乎所有步驟，包含檢體與塑膠微珠的反應、清洗步驟、試劑反應等，僅需等待反應完成後將上樣盤拿至 LM3D 儀器進行訊號分析。因 PRA 方法靈敏度不足、無法得知特定 HLA 抗體型別，已漸漸於美國淘汰，目前檢體量約為一週 20~30 支，每日均必須進行分析前一日收集之檢體。
- (2) 人類白血球單一抗原抗體檢驗：UCSF-ITL 目前所使用之 HLA 單一抗原抗體分析試劑為 One Lambda 廠商出產之產品 LabScreen Single Antigen Beads Class I and II，其原理為使用表面有塗布特定單一抗原的塑膠微珠和受贈者的血清反應，並在清洗之後加入帶有螢光之二級抗體，反應過後經過清洗以 Luminex FlexMap 3D 儀器進行訊號分析，並利用 One Lambda 廠商之分析程式 Fusion 進行結果分析。本項檢驗在 UCSF 實驗室已使用自動化機械手臂系統 One Lambda LabXpress 完成所有步驟，包含檢體與塑膠微珠的反應、清洗步驟、試劑反應以及訊號判讀，LM3D 儀器可與自動化系統連結，達成除了要將檢體分裝至 96 孔盤的步驟外，本身是全自動化的檢驗。SAB 目前是美國主流追蹤抗體變化的檢驗方法，UCSF 實驗室之檢體量約為每週 400~600 支，每日均必須檢驗完成前一日收集之檢體，並在三天內分析完成，以符合實驗室設定的 turn-around time(TAT)，也有必須當天分析完成的緊急待命檢體。

##### 2. QC 標準的設立

- (1) QC 檢體來源：抗體篩檢或鑑定檢驗所使用的 QC 來源有二，一種為試劑商所提供之品管液(陽性與陰性標準液)，作為確效檢驗結果是否可信；另一種為實驗室本身泡製之陽性品管液，其來源可以為胎盤萃取之抗體血清、具有特異性抗體

的受贈者血清、具有同儕實驗室標準答案的 CAP 檢體。因胎盤萃取之抗體本身僅含有 IgG 形式之抗體，作為此實驗之品管液可避免 IgM 的干擾外，也可以偵測二級抗體 Anti-Human IgG 的有效性。

- (2) QC 檢體目標設定：實驗室本身泡製的品管液其目的在於追蹤每次檢驗結果的穩定度，對於 HLA Class I 必須要有 Bw4 特異性抗體的結果，Class II 必須要有 DR52 特異性抗體的結果，且每日追蹤其組成的抗體之 MFI 值是否個別落在可接受範圍內，以 L-J chart 進行圖像統計追蹤。
- (3) QC 檢體使用方式及確效：QC 檢體會進行分裝冷凍，經過 4 倍稀釋後使用，每天均從-80 度冰箱取出新的分裝小管使用，以避免 4 度冰箱保存時強度會衰退。在稀釋新批號之品管液時，會進行確效，以同一批號之試劑進行新舊品管液平行測試，其抗體強度需與原批號差異小於 10%才可以允收新批號。

### 3. 報告結果分析流程

- (1) Immucor PRA 之報告結果分析流程
  - (1.1) 確認陰性與陽性品管液結果是否合格。
  - (1.2) 逐筆檢查每一支檢體之 beads control CON1、CON2、CON3 是否落於可接受範圍內，若不合格必須檢查是否影響檢驗結果並通知主管或重新執行檢驗。
  - (1.3) 確認 MFI 值與儀器認定的陰性、陽性分界線是否合理，因分界線會作為計算 PRA%的基礎。
  - (1.4) 檢查每一筆檢體的結果沒問題後，檢查 SAB 的結果做為對照(開立 PRA 一定會開立 SAB 檢驗)，兩者結果相符合後才發送報告至檢驗中繼軟體 HistoTrac。
  - (1.5) 比對 HLA Typing 的結果與抗體篩檢報告的結果是否相符，若無 Typing 結果，會查詢是否因為檢體尚未完成檢驗、或已於其他醫學中心執行 Typing，若已於其他醫學中心執行檢驗會通知對方醫院需告知 HLA Typing 檢驗結果，必須等到有 HLA Typing 結果之後才會分析並發送報告。
  - (1.6) 執行檢驗之醫檢師完成檢驗後，交由第二位醫檢師分析報告，最後則交由具 Specialist(Designee)資格之醫檢師發送報告。
- (2) One Lambda SAB 之報告分析流程
  - (2.1) 確認陰性與陽性品管液結果是否合格、合理，陰性品管液為設定 baseline 之重要依據。陰性品管液的反應背景值不應該距離系統內建的 Default Value 太多，在 MFI 值的呈現上才會反應出不失真的真實情況。陽性品管液則檢查是否結果具有實驗室訂定的抗體特異性(Class I: Bw4;Class II:

DR52)，並檢查 MFI 值是否落於可接受範圍內。

- (2.2) 在 Fusion 軟體中，逐筆檢查每一支檢體的 Beads Count 是否合格，目前設定之標準為至少每個微珠均須收到 50 顆，若有的微珠沒有，必須檢查沒收到目標值的微珠是否其表面黏附的抗體為常見具臨床意義的抗體，若是，則該檢體必須重新進行檢驗；若無，則通知實驗室主管(Specialist 或 Supervisor)決定是否需重新進行檢驗或繼續分析。
- (2.3) 逐筆檢查每一支檢體的 PC 與 NC controls 是否符合允收標準，PC bead MFI 需大於 5000；NC bead MFI 須小於 1500；PC/NC 比值需大於等於 5。若有任一指標未達到標準，需進一步進行原因分析，並通知實驗室主管或檢驗專家決定是否需重新進行檢驗。

指標	失敗可能原因	應對策略與方法
PC Bead MFI>5000	1. 實驗操作不當、反應不完全。 2. 受贈者本身檢體之因素造成。 3. DTT 檢體前處理操作不當、無效。	1. 重新檢驗或以手工法進行檢驗。 2. 確認歷史檢體紀錄。 3. 若同一檢體只有任一 Class 有 PC 訊號過低狀況，可能為實驗操作不當或反應不完全，重新檢驗；若兩 Class 均 PC 訊號過低，可能為 DTT 反應失敗造成偽陰性，需重新執行 DTT 血清前處理。
NC Bead MFI<1500	1. 實驗操作不當，清洗不完全。 2. 受贈者本身檢體具有高背景值。	1. 重新以手工法進行檢驗。 2. 使用 Adsorb Out 試劑去除干擾，以及確認歷史檢體紀錄。
PC/NC Ratio>5	通常為反應具有高背景值造成。	使用 Adsorb Out 試劑去除干擾。

- (2.4) 以 Fusion 軟體進行單一抗原抗體檢驗結果的分析步驟：
- i. 檢查 Fusion 軟體切分的抗體強度欄位是否正確，以 UCSF 實驗室的標準為例：Strong Antibodies(Specificities) MFI>8500；Moderate MFI 2000~8499；Low MFI 1000~1999。以上在軟體內也個別對應 8X、6X、4X 的 MFI 訊號強度切線。
  - ii. 檢查整張 Histogram 的反應性，是完全陰性、Non-specific binding、或是具有陽性的訊號。
  - iii. 並非單純利用 MFI 值進行抗體分配，MFI 並非總是作為陽性反應的判斷標準，而是要觀察是否有抗體叢集，才能找出真正臨床有意義的抗體 [Ref 1-2]，例如：CREGs、Allele-specific。

- iv. 匯入受贈者之 HLA Typing 型別，並利用受贈者 HLA 抗原作為陰性的訊號分界線，避免將自體抗原對應的抗體分配到陽性抗體欄位。(比對 HLA Typing 的結果與抗體篩檢報告的結果是否相符，若無 Typing 結果，會查詢是否因為檢體尚未完成檢驗、或已於其他醫學中心執行 Typing，若已於其他醫學中心執行檢驗會通知對方醫院需告知 HLA Typing 檢驗結果，必須等到有 HLA Typing 結果之後才會分析並發送報告。)
- v. 仔細檢查 CREGs、Bw4、Bw6、Low MFI Clustering，必要時必須額外輸入陽性抗體，因軟體本身不會自動標註如 Bw4、Bw6 抗體。
- vi. 檢查同一病人歷史檢體的紀錄，Antibody Profile 應相似，若有劇烈的變化，必須檢查致敏史，並通知實驗室 Specialist 或主管進行審核。
- vii. 檢查病人血型資訊、等待移植器官、捐贈者病歷號、移植前或移植後檢體、生理性別、病人病歷號等是否正確，列印報告並交由第二位醫檢師審核發送報告。

(2.5) 執行檢驗之醫檢師完成檢驗後，交由第一位與做檢驗不同的醫檢師分析報告，分析完成後不論陰性報告、陽性報告皆必須交由實驗室 Specialist 或主管審核後發送報告，以符合美國遺傳學學會認證的規範，同時若 Calculate PRA>80%的檢體，必須將報告交給實驗室 Director 進行最後的報告審核。

#### 4. 抗體之鑑定與分析規則、複雜抗體分析、常見不具重要意義抗體之圖形分析

- (1) CREG：HLA 抗體在大多數情況下會有 CREG 群聚的反應，除了抗體的反應標的會聚集在非自體抗原的部分 Beads 外，在通報陽性反應抗體時一定要檢查是否有 CREG，因為這代表著受贈者本身的抗體雖然並不複雜，但是會以同一 CREG 族群內共有的一個以上 HLA 抗原作為標的，例如：一種抗體可以結合 A2 A68 A69 B57 B58 擁有共同的抗原決定位(public epitopes)。這也要小心若移植後有對應到的捐贈者抗原，不能只看單一微珠的反應，因在 SAB 的結果中看似反應 MFI 相對沒有太高，但實際上是因為被許多不同的抗原微珠稀釋了反應結果的強度，其免疫反應有可能會增強造成急性排斥反應[Ref 3][附錄-1]。
- (2) Allele-specific Antibody：在抗體分析的過程中，有些情況下會發現受贈者血清中所帶有的抗體和 SAB 試劑的反應結果會有反應不完全的狀態，例如：B27 抗原在試劑中有帶有兩種 Allele 不同的微珠，分別為 B\*27:05 與 B\*27:08；並且在反應的結果會發現受贈者血清只對一種微珠有反應，那此種抗體即是 Allele-specific antibody。在發送報告時，必須特別註明是哪一種 Allele 以及 MFI 值是多少，而不是發送血清學的抗原，因發送血清學的抗原可能會使受贈者的配對難

度增加，增加等待時間，因此必須提醒臨床端，同時交由實驗室主管決定是否通報此抗體陽性報告。

- (3) Clustering Patterns：若受贈者血清的抗體組成比較複雜，就必須檢查 SAB 檢驗結果 Histogram 中抗體的分群種類，並且再依照不同 MFI 強度進行抗體強度的登錄。通常抗體的強度在不同 CREG 之間會有所分別，因此圖形會有明顯的 MFI 強度跳躍、分群，例如：若一受贈者血清中同時含有 Anti-DQ3 CREG、Anti-DR1 CREG 的抗體，因為這兩種抗原的致敏強度不同、構型不同、抗體結合的位置也不同，在 MFI 值上會有區別，雖然 MFI 值並不能直接代表抗體的強度，但可以參考相對的程度不同而區分出不同 Clustering，這是分析報告時分辨不同抗體的技巧。
- (4) Bw4、Bw6 Reactive Antibody：在分辨具有 Bw4 或 Bw6 特異性的抗體時，除了在 SAB 的 Histogram 中兩者的抗原族群會分開以外，還有以下指標是作為分辨此兩種抗體的必要條件，此兩種抗體是反應性極強的抗體，在 UCSF 實驗室即使 MFI 小於 1000，也必須通報為陽性抗體，參考以下表格。

CREG	Antigens	Comment
Bw4	B*27:05, B49, B38, B53	Usually with A23, A24, A25, A32
Bw6	B*27:08, B50, B39, B35	

- (5) Standalone Antibody：在 SAB 的反應圖形中，只有單一微珠或單一血清型、分生型抗體有 MFI 大於 5000 的訊號(MFI 依各實驗室訂定之)，就定義為 Standalone antibody。此種抗體大部分在臨床上沒有很顯著的影響，根據 UCSF 實驗室長久的檢驗經驗，此種抗體常是僅具有分生型特異性(Allele-specific)、獨有抗原決定位(Private epitopes)的抗體，並且在找尋捐贈者配對時，也很容易因其單純的特異性而避開。需要注意的是必須檢查 Standalone antibody 其結合目標的 HLA Loci，不同 Locus 所會產生交叉配對陽性結果的 MFI 值有所不同，其臨床意義與嚴重性也有所不同，因此此種抗體的報告會附加 MFI 值作為參考，例如：Anti-B27:08 [MFI:7500]。
- (6) IvIG、Thymoglobulin Interference：對於移植後要持續追蹤體內抗體狀態的受贈者若有施打 IgG 型態的抗體藥物，必須注意這些藥物會讓 SAB 或 PRA 等檢驗產生偽陽性的結果。其圖形特徵為幾乎所有的微珠都會與血清有反應，造成普遍所有微珠的 MFI 值會有介於大概 1000~3000 的陽性反應，叫做 Pan-Reactive Pattern。這種狀態必須檢查受贈者的致敏史與用藥歷史紀錄，若確定為藥物影響不應該

發送陽性報告，而是於備註欄位說明有潛在受到藥物影響檢驗結果的可能性，建議過了藥物影響時間後再次採檢並檢驗。

- (7) Non-specific binding (NSB)：極大部分看似弱陽性的反應其實是非特異性的結合，臨床上不具有顯著意義，其分辨的方法為 SAB 圖形本身並沒有形成特定 Clusters、仔細檢查受贈者的抗原分佈會散佈於 SAB Histogram 各處，沒有明顯群聚於圖形右側的現象(越往右側表示 MFI 值訊號越低、越靠近左側表示 MFI 值訊號越高)；並且觀察 Histogram 圖形會有普遍每個微珠都有 MFI 值介於 0~1000 之間反應，形成一個平滑的漸弱曲線，而不是高高低低看似有叢集的反應。
- (8) Pan-Single Locus Clustering Pattern：屬於非特異性結合的一種抗體，其特徵在於受贈者血清中會具有對抗特別某一種 Locus 的非特異性抗體，通常 MFI 值不會太高，看起來很像陽性叢集反應，但受贈者本身的抗原也會包含在其中，是不具有臨床意義的抗體反應，最常見的例子是 Pan-Cw Locus、Pan-DR、DP Locus Patterns。
- (9) Non-Specific Binding of Non-sensitized Male Serum：根據 UCSF 實驗室的研究成果與實驗數據，本身沒有致敏史的成年男性其血清會有一定百分比與 SAB 試劑之特定微珠有非特異性結合反應，MFI 值通常不高，可以和真正陽性反應明顯區分，具最高比例的分形舉例如下：

HLA Class	MFI:1000~4000	MFI>4000
Class I	B76(3.6%), B44(2.8%), A25(2.6%)	B76(2.4%), B45(1.9%), B82(1.6%)
Class II	DQ7(1.7%), DP1(1.5%), DR18(1.2%)	DQ7(1.2%), DQ9(0.8%), DQ8(0.8%)

- (10) Significant Weak MFI Reactions：通常 MFI 小於 1000 的反應視為陰性反應，但有以下抗體特異性的叢集反應時，必須注意此種抗體在臨床上具有顯著意義，往往在接觸到相對應抗原時，免疫反應會快速且嚴重，例如：A2, A11, Bw4, Bw6 等。
- (11) B46, B73 Cw-Specificity：B46 與 B73 目前在美國根據 NMDP 專家會議內容，已不發送 Bw6 對應血清型，根據相關文獻指出，B46 與 B73 在其血清型的特性上有與 Cw 相同的 Epitopes，在分類上接近於 HLA-C locus 之 C1 群組[Ref 4-5]。

## 5. 受贈者抗體移植史檔案(Antibody Profile)建立

- (1) UCSF 實驗室的報告分類方法：主要分為四個部分
  - (1.1) To be audited：cPRA>80%的受贈者報告會經過實驗室 Director 審核，其目的在於登錄 Unacceptable Antigens 時必須考量臨床狀況，其是否真的需要

避免幾乎全部的抗原型別，會影響受贈者配到對應之器官機率下降、權益也會受損。

- (1.2) To be filed：具有陽性 SAB 結果的受贈者報告會整理至特定資料夾，並保存於病歷室。因美國使用 SAB 檢驗追蹤移植前受贈者之抗體變化，會特別留下歷程紀錄供以後有需要時能夠快速查看，內容包含 Histogram 圖檔與所有經手過此報告醫檢師的簽名。
- (1.3) To be scanned：陰性 SAB 結果的受贈者報告為響應無紙化，會將報告掃描存檔於機構內部之雲端硬碟，供有需要時可由電腦查看，因本身沒有 Histogram 圖檔若需看完整報告需要登入分析軟體查看。
- (1.4) To be sent：院外代檢的報告，會經由快遞公司掛號送出紙本報告存檔。
- (2) 受贈者抗體移植史檔案之紀錄要點與內容：
  - (2.1) 移植狀態：會確認此受贈者狀態是移植前或移植後，在抗體報告的呈現上會有所不同，同時所要登錄至器官配對系統的內容也有差異。移植前主要追蹤受贈者本身是否已含有 Pre-formed Antibodies，以及是否要登錄 Unacceptable Antigens，這是把關受贈者避免急性移植排斥風險的第一個關卡；移植後則主要目的是追蹤受贈者在移植後是否產生“新的捐贈者特異性抗體” De Novo Donor-Specific Antibodies(DSA)，根據文獻顯示在移植後產生的 de novo DSA 免疫性很強，必須及時做減敏處理處理以保障移植器官與受贈者的安全性。同時，在移植後的受贈者報告內容中，就必須涵蓋捐贈者之 HLA 型別(若經過多次移植，所有的捐贈者分型皆會列出)，做為比對新增抗體是否具有對抗捐贈者器官特異性(Donor-Specific)的用途[Ref 6]。
  - (2.2) HLA 分型結果登錄：所有的報告皆必須包含受贈者 HLA 分型結果，若 HLA 分型結果尚未完成，會於備註加註 HLA Typing Pending，待分型報告完成之後再發送抗體報告，因分型報告對於抗體的登錄與分析具有重要的確認功能。
  - (2.3) 首次血清檢體：確認是否為初次執行 SAB 或 PRA 檢驗的檢體，若為初次檢驗之檢體，會於備註加註 1<sup>st</sup> Serum，表示此受贈者根據實驗室指引的規定，必須要進行第二次的檢驗確認抗體結果是否正確、易變動與不易變動等等特性，才能夠進行器官移植。
  - (2.4) 受贈者致敏史與用藥確認：會確認受贈者之性別，若為女性會標註是否懷孕；輸血史，若 14 天內有輸血必須兩個星期後採檢再驗確認抗體變動；

用藥史，若有使用 IvIG、具細胞毒性藥物如 Rituximab、Anti-Thymoglobulin 或抗排斥藥物等，要注意是否對檢驗結果會產生影響；移植史，若曾經接受過移植，必須標註捐贈者 HLA 分型，以及是否曾經產生過 DSA。

- (2.5) 歷史檢驗比對：每一位受贈者的抗體報告都必須檢查其歷史檢驗結果，除了可以確認檢體是否沒有採檢錯誤之外(Delta Check,  $\Delta$  Check)，也可以確認受贈者體內的抗體是否有劇烈變化，在交叉配對的策略上可能改變。
- (2.6) 器官移植登錄中心-器官共享聯合網(United Network for Organ Sharing, UNOS) 之 Unacceptable Antigens：抗體檢驗是陽性的受贈者報告會依據其抗體型別與強度選擇登錄至配對系統中，如此就不會配對到本身 Pre-formed Antibodies 對應到的捐贈者抗原，可以避免排斥反應產生的風險、也可以避免消耗過多的時間在執行交叉配對檢驗於不相合的受贈者與捐贈者。
- (2.7) Calculate PRA(cPRA)之計算：cPRA 的概念為利用一個地區或國家人口其 HLA 型別各分型的佔比與連結(Linkage)統計，來去計算當一受贈者血清中含有某些 HLA 抗體時，其對抗到這一地區捐贈者的型別的百分比，能夠預測排到適合器官的機率與難度。cPRA 會因為人種組成的不同而有所變化，在計算時應分別考慮到不同國家與地區的資料庫，才能更貼切的呈現真實的百分比數值。美國的器官移植登錄中心有資料庫會進行 cPRA 的計算，據以預測配對難度，因此實驗室在通報 Unacceptable Antigens 時，該如何依臨床受贈者的狀況做取舍就相當重要。
- (2.8) Zero Antigen Mismatch (0 Ag MM)之計算：除了 cPRA 以外，報告還會附註另一個移植配對機率的預測值，0 Ag MM，意義為“無抗原不匹配”機率或“完美匹配”機率，此數值會根據受贈者本身之 HLA Typing 與移植資料庫中的一地區或一國家人口的 HLA Typing 結果分佈以及 ABO/Rh 血型檢驗結果進行匹配，並給予找到完美匹配捐贈者的機率，以%為單位，分為 Local 以及 National 兩種數值。
- (2.9) 移植後的抗體追蹤檢驗之 DSA 的報告登錄目前主要僅針對最近一次移植的器官 HLA 型別做 DSA 登錄，若受贈者本身為 re-listed 受贈者，會將曾經產生的 DSA 型別直接標註於 UA 欄位中。
- (2.10) 實體或虛擬交叉配對試驗紀錄：在每位受贈者做完兩次 SAB 檢驗後，實驗室之 Specialists 或主管會根據檢驗報告的陰性陽性、抗體穩定性來決定此受贈者是否有符合做虛擬交叉配對檢驗的條件，分別於報告加註 PXM(Physical Crossmatch)或者 VXM(Virtual Crossmatch)。

- (2.11) 報告發送：最後再次確認所有資訊正確後，由檢驗中繼系統發送報告至醫院的報告系統，可供臨床端與受贈者查詢檢驗結果。
- (3) 受贈者抗體報告的呈現：UCSF 實驗室之報告本身經由 HistoTrac 中繼軟體進行編輯，並整理出重點資料呈現，於[附錄-2]標示之。

## (二) 二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT)之檢體前處理相關內容

1. DTT 前處理步驟的目的：在檢驗 HLA 抗體時，因臨床中有意義的抗體以 IgG 形式為主，故目前檢驗 HLA 抗體的方法不論是 PRA 或 SAB，使用的二級抗體均為帶有螢光的 Anti-Human IgG，而因 SAB 檢驗結果之計算方法為使用每一次檢驗中 NC value 作為分母，並將有訊號的微珠反應數值與 NC value 做比率的計算，因此去除血清中的干擾物以真實反映檢驗數值就顯得相當重要。DTT 具有破壞 IgM 抗體聚合物(臨床無意義的冷型抗體干擾)以及 C1 聚合物(補體干擾)之間雙硫鍵的效果，因血清中 IgM 抗體以及 C1q 補體聚合物常會干擾微珠與 IgG 抗體的反應，而造成偽陰性或是訊號假性偏低的結果，使得受贈者也許會因為錯誤的檢驗數值而曝露於急性排斥的風險中 [Ref 7-8]。
2. DTT 試劑的配製步驟與保存：
  - (1) 秤量相對應於 0.05 mole(7.7125g)分子量的 DTT 粉末，溶於 40mL PBS 中，使用攪拌子攪拌至少 10 分鐘，並將體積補至 50mL，攪拌均勻後，完成配製 1M 的 DTT 溶液。
  - (2) 加入 950mL 的 PBS 溶液至 50mL 1M DTT 溶液，進行 20 倍稀釋，使最終 DTT 溶液的莫耳濃度為 0.05M (50mM)。
  - (3) 確認 DTT 溶液攪拌均勻後，將 DTT 溶液分裝於數個 50mL 離心管中，並於離心管標註溶液名稱、濃度、試劑批號、配製日期、配製人員以及保存期限。
  - (4) DTT 試劑的保存條件：分裝好之 50mM DTT Working solution 保存於-20°C冷凍櫃，保存期限至多 6 個月，可依據實驗室之確效流程與數據延長至多至 1 年。
3. DTT 檢體前處理與檢驗前處理之操作程序：
  - (1) 由-20°C冰箱取出已分裝好的含 30 $\mu$ L 50mM DTT 之微量離心管，並置於室溫解凍。
  - (2) 採完檢體之黃頭或紅頭血清管置於離心機以 3000rpm(約 2300g)室溫離心 10 分鐘。
  - (3) 每一支黃頭血清管檢體都會分裝為 2~3 管小管，供後續檢驗使用，分別為未含有任何處理之血清(Bulk) 1 管供保存或需重新檢驗之用途、經 DTT 處理的血清 1~2 管，供進行 PRA 或 SAB 檢驗用途。
  - (4) 核對檢體資訊，並將檢體標示貼紙。
  - (5) 以滴管將血清管中的血清取出至 Bulk 管子，並以 Pipettman 吸取 270 $\mu$ L 血清至裝有 30 $\mu$ L DTT 的微量小管中，Vortex 以混合均勻。
  - (6) 混合均勻微量小管會放置於 37°C溫浴箱內的水浴槽中，靜置反應 30 分鐘，切記

水浴槽之水面應超過微量小管中的液面高度，以確保反應完全。

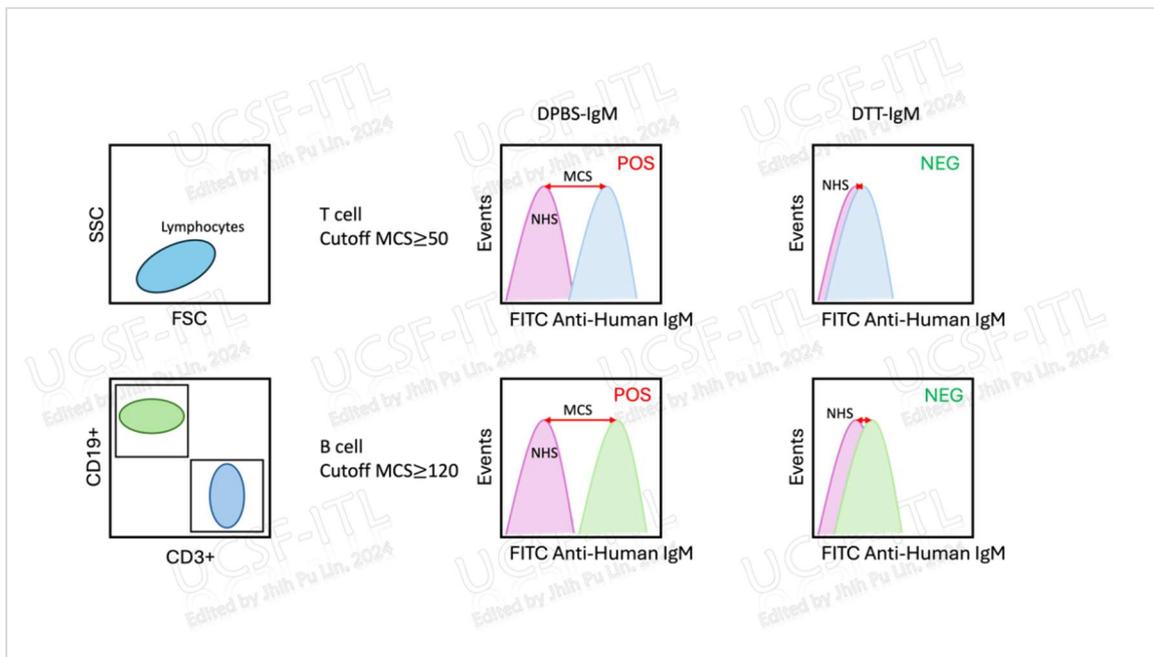
- (7) 溫浴反應完成後，將檢體放至-20°C冰箱保存，欲於反應完成後直接進行檢驗，也必須將含有 DTT 處理的檢體至少冷凍一次，並確保完全結凍。
- (8) 欲執行檢驗前，將 DTT 處理過後的血清由冷凍庫取出，並靜置至完全解凍。
- (9) 將檢體放置於高速離心機以 13000rpm(20000g)在 4°C進行離心 20 分鐘。
- (10) 吸去液體表面之油脂、雜質等，取下層檢體進行後續檢驗。

#### 4. DTT 溶液之確效：

- (1) 原理：利用流式細胞儀交叉配對檢驗(FCXM)的原理，使用 PBS 或配置完成的 DTT 溶液分別與含有 Rat Anti-Human CD52 (IgM)之血清進行反應，反應完成後將 NHS、血清與純化過後的周邊血淋巴球在室溫進行孵育，並且利用 Anti-CD3、Anti-CD19、FITC-anti-human IgM 抗體對細胞與抗體複合物進行染色，若 Rat anti-human IgM 有成功被 DTT 去除，反應的結果與 NHS 控制組的結果 MCS 應小於實驗室訂定之閾值；反之，PBS 之反應控制組與 NHS 控制組的 MCS 應大於實驗室訂定之閾值，而得到陽性之結果。
- (2) 試劑準備：
  - (2.1) PerCP 螢光抗 CD3 抗原抗體/PerCP-anti-CD3 (BD #340663)
  - (2.2) PE 螢光抗 CD19 抗原抗體/PE-anti-CD19 (BD #340720)
  - (2.3) FITC 螢光抗小鼠 IgM 抗體/FITC-anti-rat IgM (BD Pharmingen #553887)
  - (2.4) 二硫蘇糖醇/DTT powder (Sigma #D0632-10G)
  - (2.5) 抗人類 CD52 IgM 抗體/Rat anti-human CD52 IgM (BIO-RAD #MCA349R)
  - (2.6) 正常人類血清/Normal human serum (Sigma #SI-H6914)
  - (2.7) 緩衝液/DPBS (Gibco #14190235-6)
  - (2.8) 胎牛血清/Fetal Bovine Serum (Gibco #10437028)
- (3) 操作步驟：
  - (3.1) 新批號的 Rat anti-human CD52 IgM 必須進行 titration，依照 1:1600、1:3200、1:6400、1:12800 的稀釋倍數進行序列稀釋，並進行 FCXM 檢驗，依照 titration 的結果使用最佳稀釋倍數進行下列步驟，以避免 Hook effect 的影響。
  - (3.2) 依照項目 2.3 的處理步驟使用 rat anti-human CD52 IgM 分別與新配製好的 DTT 試劑或 DPBS 進行反應，體積為 9:1，rat anti-human CD52 IgM 90 $\mu$ L+DPBS or 50mM DTT 10 $\mu$ L，以下分別簡稱為 DPBS-IgM、DTT-IgM。
  - (3.3) 使用淋巴球分離試劑純化周邊血淋巴球後，將適量淋巴球分別與 BKG(DPBS)、NHS、In-house PC、DPBS-IgM、DTT-IgM 在室溫進行孵育 20

分鐘。

- (3.4) 以含有 2%FBS 之 DPBS 溶液清洗淋巴球，共 4 次。
  - (3.5) 配置 antibodies cocktail master mix，每個反應需要 10 $\mu$ L anti-CD3+10 $\mu$ L anti-CD19+10 $\mu$ L FITC-anti-rat IgM，配置完成後依序加入不同血清反應過後的淋巴球中，並在 4 $^{\circ}$ C 孵育 20 分鐘。
  - (3.6) 以含有 2%FBS 之 DPBS 溶液清洗淋巴球，共 2 次。
  - (3.7) 使用 DPBS 緩衝液重新懸浮清洗完成的淋巴球，並以流式細胞儀依照 FCXM 的上樣模板進行螢光強度的分析。
- (4) 結果判讀：
- (4.1) 確認 NHS 反應的控制組其 Median Fluorescence Intensity 結果落在實驗室設立之可接受範圍內。
  - (4.2) DPBS-IgM 作為陽性控制組，本控制組之檢驗結果其 MCS 應大於等於實驗室為 FCXM 檢驗所設定的陽性閾值。
  - (4.3) DTT-IgM 之檢驗結果其 MCS 應小於實驗室為 FCXM 檢驗所設定的陽性閾值，代表新配製的 DTT 試劑確實可以排除 IgM 的影響。
  - (4.4) 結果之示意圖如下(MCS 與螢光強度會因為不同實驗室使用不同廠牌之儀器、試劑、確效標準而有所不同)



### (三) HLA Typing 次世代定序(Next-Generation Sequencing, NGS)

#### 1. 使用之儀器與試劑：

- (1) CareDX AlloSeq Tx 17x：此 DNA library 試劑目前已通過 CE-IVD 認證，其優點為反應過程中不使用 long-range PCR，而是使用 Hybride-Capture 技術，可以縮短反應時間、降低複製錯誤率、增加定序範圍覆蓋的深度；手工操作部分提早 Indexing，每 24 支檢體只要操作一個微量試管，取代以前必須同時操作多達一整盤 96 wells 以上的工作，可以降低人為的操作失誤機會、也不需讓自動化儀器耗費長時間進行移液作業；定序範圍包含 HLA-A, B, C, DRB1, DRB345, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 以及 MIC-A, MIC-B 等基因，免去還要額外使用擴充試劑的困擾。
- (2) MiSeq 次世代定序儀：內建使用 illumina 次世代定序技術之儀器，優點為體積小，各邊長不大於 70 公分，且內建操作系統與螢幕，上機時無需外接電腦；其最長讀取片段可至 300bps 比起前代 iSeq 100 只能最多讀取 150bps；其輸出資訊量也至多達到 15Gb。
- (3) Invitrogen Qubit 3：Qubit DNA 定量確認方式是 NGS 分析上機前不可或缺的步驟(亦可以使用 real-time PCR 做定量，但耗時較久)，在確認 DNA 量符合上機標準後，再開始進行分析，可以避免加入 DNA 的量不準確而造成 NGS 分析結果不佳、以及 flow-cell 的浪費。
- (4) PerkinElmer JANUS Automated Workstation：為自動化手臂工作平台，能夠操作移液、震盪、加熱、清洗、純化等功能。

#### 2. NGS HLA Typing 方法的建立與確效：

- (1) 測試檢體：實驗室病人檢體 50 支；外部檢體 20 支(包含標準品、同儕實驗室檢品或能力試驗等具有標準答案之檢體)。
- (2) 允收標準：實驗室病人檢體分析結果必須和當前實驗室使用之解析度最高的 HLA Typing 方法之可報告範圍達到 95%結果一致(如：Sanger sequencing，HLA-A\*02:01:XX)；外部檢體分析結果必須 100%與標準答案之前三個 fields 相同(如：HLA-A\*02:01:01:XX)，以確保報告之可信度。
- (3) 人員訓練：確保每一位檢驗執行人員與分析人員有足夠時間學習檢驗執行步驟、報告分析方法與報告發送規範。
- (4) 人員考試：每一位檢驗執行人員均須通過 5 支未知檢體的考試，始能執行相關檢驗與分析。

#### 3. 檢驗流程概要：

- (1) Library Indexing、Tagmentation：一個 batch 進行 23 支未知檢體加上 1 支陽性控制

組，總共 24 支。先分別於 96 孔盤加入檢體(至少 100ng/sample)，進行 DNA 片段化與加上 adaptor 序列，使用之技術為 bead-linked transposome，並於純化後進行 DNA 放大與各別將不同檢體加上 indexing 序列。

- (2) Pooling、Size selection：因為已經為不同檢體加上不同排列組合之 indexing sequence，此步驟將檢體集成一管，並經由磁珠篩選適合片段長度之 DNA。
- (3) Hybrid-Capture：進行 probes 雜交反應，將有 biotin 結合之 primer 與目標序列雜交(HLA 序列)。接著加入表面有 coating Streptavidin 的磁珠抓取已有被標記的目標序列，並使用 heated wash 洗去未結合的其他序列與非特異性結合的 DNA 片段，並進行純化步驟。
- (4) Post Enrichment PCR：將純化完的產物再次進行放大反應。
- (5) Sequencing：利用 Qubit 系統測定 DNA 濃度，並且將 DNA 稀釋至適合的濃度，以本檢驗試劑之最低需求與 UCSF 規定為例，最終加入上樣盤中的 DNA 質量為 12pM、600 $\mu$ L(24 支檢體)。將 DNA 以鹼性溶液 denature，並於完成反應後加入緩衝液稀釋至適合濃度，使用 MiSeq 儀器進行定序反應，定序反應約需 17~24 小時。
- (6) Machine daily wash：將上樣盤換為清潔用的 Rack，並在每個清洗槽內加入 0.5% Tween 20，於 Line wash 清洗槽內加入以 HPLC H<sub>2</sub>O 稀釋之次氯酸鈉(reagent grade)，清空廢液桶後開始進行儀器清洗。
- (7) Data Analysis：定序反應完成後，匯出定序結果資料(FASTQ)，並使用分析軟體 AlloSeq Assign 進行 HLA Typing 結果分析。

#### 4. QC 指標的設定：

- (1) Cluster Density between 500~1200 (K/mm<sup>2</sup>)：cluster density 可以解釋為在一個範圍內 DNA clusters 的密度。數值太低表示 DNA 加在 flow-cell 中的量不夠，造成 clusters 的密度過低，檢驗結果的 Coverage 不夠，雖然定序結果的訊號會很乾淨，但是定序結果會沒有足夠的 reads 數，可能會造成 phase 不完整、雜訊過度影響結果；數值太高表示在 flow-cell 中 clusters 密度太高，會造成 DNA 沒有足夠空間分佈在 flow-cell 中進行橋接複製也對於分辨訊號效率和準確度會有影響，Passing filter 降低，使得結果可信度下降。
- (2) %Base $\geq$ Q30  $\geq$  75%：Q30 表示對一個 nucleotide 讀取結果的準確率達到 99.9%，在 UCSF 規定一次定序的結果其達到 Q30 以上的 bases 比例要大於 75%。
- (3) Passing Filter  $\geq$  80%：表示在 flow-cell 中有形成穩定 pattern 的區域比例要大於 80%，可以代表 library 的品質是否良好、以及定序過程中的訊號是否穩定。

- (4) Allele imbalance 目前不作為 QC 指標之一，若是以 Hybrid-capture 方法或是一些不需要太多複製步驟的方法或許可以設定為指標，但是目前主流的方法 Long-range PCR NGS 還是會有 alleles 極度不平衡甚至出現 drop out 的情形，因此必須要以另外購買的分析軟體、SSP 方法的輔助來解決 ambiguities 以及 drop-out 的分析難題。

## 5. 結果分析：

- (1) 開啟 AlloSeq Assign 軟體，並匯入 FASTQ files，等待軟體進行自動分析。
- (2) 確認所有 QC 指標均合格，若有指標不通過，必須詢問實驗室 Specialist 或主管分析結果是否可以信，再繼續分析報告。
- (3) 個別確認每一檢體中各個 Loci 之 Exons 區域的 Coverage depth 均有達標，並逐一檢查是否有 noise 影響結果。
- (4) 若有 noise 影響結果，必須進行檢體序列與資料庫序列 alignment，看是否是因為受到其他 Loci 序列影響、或相似序列影響造成 Ambiguous 結果。
- (5) 檢查 assign 的分型是否屬於 Common 型別，若是 Intermediate 或 Rare 型別，必須備註於報告當中；並檢查不同 loci 之間 linkage 是否正確，以及找到決定性序列將 Common 型別可能性刪除(rule out)，以確認報告正確性。
- (6) 目前 UCSF-ITL 會檢查以下四種 linkage 以確認報告正確性：
  - (6.1) HLA-B locus 與 HLA-C locus linkage。
  - (6.2) HLA-DQB1 與 HLA-DRB1 linkage。
  - (6.3) HLA-DQA1 與 HLA-DQB1 linkage。
  - (6.4) HLA-DRB1 與 HLA-DRB345 linkage。
- (7) 若有 ambiguity 情況出現且無法刪除至唯一可能性時，會發送 P group 或 G group typing，同一個 P group 會有相同的 Binding domain；同一個 G group 不只有相同 binding domain、其 exons 也會有相同的核苷酸序列，若大於 1 個以上答案且不屬於同一個 P、G group，會重新執行檢驗看是否可以解決 Breaking Phase 造成的 ambiguity 問題，若檢體本身品質因素無法解決時，會發送 1<sup>st</sup>-field 分型，並加上 NMDP 編碼。
- (8) 若發現是 database 中沒有見過的新分型，或是實驗室目前還沒發表過的分型，報告會以下方式表示，依實驗室與臨床制定的政策不同，選擇不同報告格式。若是資料庫中沒見過的新分型，會將序列與受贈者資訊去連結化，上傳至 IMGT/HLA database 與試劑供應商之平台，供之後進行資料庫更新時命名參考。
  - (8.1) 僅發送新分型對應之 1<sup>st</sup>-field Generic typing 與 Serologic Equivalent，

A\*02:01:XX→A2，並以備註方式標示為新分型，這個適用在發現新的核苷酸變異位點是在 binding domain 的序列中而且會改變氨基酸的狀況，因為會影響到 generic typing 2<sup>nd</sup>-field 的命名，因此只發送 1<sup>st</sup>-field 報告。

- (8.2) 僅發送新分型對應之 2-field Generic Typing，A\*02:01:XX→A\*02:01，並以備註方式標示為新分型，這個適用在發現新的核苷酸變異位點是在所有的 HLA coding sequence 當中，卻沒有對 binding domain 的氨基酸造成影響的情況，其僅影響到 3<sup>rd</sup>-field 的數字分型。
- (8.3) 發送新分型對應之 1<sup>st</sup>-field Generic Typing，後面改成 NEW 表示之，A\*02:01:XX→A\*02:NEW，並以備註方式標示為新分型，這個可以適用在所有的情况當中。
- (8.4) 發送新分型對應之 P 或 G group，A\*02:01:XX→A\*02:01 P，並以備註方式標註為新分型，這個適用在變異位點不會對 binding domain 造成氨基酸序列上的改變的狀況。
- (9) 同型合子(Homozygous)分型之表示方法：隨著檢驗技術的進步，HLA generic typing 的解析度增加、也有能力分辨出基因本身是同型合子、或是基因缺失、或是表現問題造成血清學的表现上是同型合子的狀態，例如 A2 homozygous、A2 A2Null 在血清學的特性上一樣，都是只有 A2 抗原，但是在基因型的層面上，這兩者序列有所不同，不應視為一樣的狀況。因此在 Serological Equivalent 欄位會以以下方法表示，可以依據血清型的表示方法得知基因上可能有所不同。
  - (9.1) 若是 Homozygous、血清型相同，標示為 A2 A2，表示兩個 alleles 都會正常轉譯出相同血清型的抗原。
  - (9.2) 若是有無對應到血清型的型別，標示為 A2 A-，表示一個 allele 轉譯出 A2 抗原、另一個 allele 轉譯出未有對應血清型的抗原，必須參考分生型。
  - (9.3) 若是基因缺陷造成無抗原表現，標示為 A2 A Null，表示一個 allele 轉譯出 A2 抗原、另一個 allele 沒有轉譯出可表現於細胞表面的抗原。
- (10) 列印出最終報告，並交由實驗室 Specialist 或 Supervisor 覆核後發送報告。
- (11) 骨髓移植根據認證規範必須至少進行兩次 HLA Typing 檢驗，且必須是不同採檢時間的檢體以確認結果的正確性，且其中一次必須要是 High Resolution 的檢驗。

## 6. 報告格式(依據 ASHI、IPD-IMGT/HLA、WHO Nomenclature 之規定)

- (1) 器官移植 HLA Typing 報告：HLA-A、B、C、DRB1、DQB1 發送分生型 1<sup>st</sup>-field 報告、以及對應之血清型報告；DRB345 發送分生型 2-fields 報告、以及對應的血清型報告；DPA1、DQA1 發送分生型 2-fields 報告；DPB1 發送 2-fields 分生型

報告以及選擇最常見的分生型報告(如果有 ambiguity)在 Serologic equivalent 欄位 (DP 沒有對應血清型)[附錄-3]。

- (2) 骨髓移植 HLA Typing 報告：所有 Loci 發送分生型 3-fields 報告，並且會附上 DPB1 之 TCE-group 結果報告[附錄-3]。
- (3) Disease-related HLA typing：如 B27(僵直性脊椎炎), B58:01(AHS 過敏症候群), B15:02(CBZ 過敏症候群), Celiac Disease(麩質敏感性腸病)等等臨床有特別指示的報告，會僅發送需要的 Locus 結果報告，並加上此型別為” Present” 或” Absent” 之備註，以提醒臨床醫師。(即使只發送單一 Locus 報告，檢體也會進行全部 Loci 的定序，使檢驗流程單純化，縮短 TAT 與減少人員能力試驗的複雜度，並在之後有需要其他 Loci 報告時，也不需要重新執行檢驗。)
- (4) Mismatch 與 Match 報告：若器官移植或骨髓移植的捐贈者與受贈者在送檢時有標註為某受贈者之” Potential Donors” ，在系統登錄檢體後會有關係連結，必須填寫並發送額外的報告欄位標示 mismatch 或 match 分數，依器官、骨髓移植配對報告以及檢驗醫令所需要的解析度會有所不同：
  - (4.1) 器官移植 Mismatch score：依照 A, B, C, DR, DQ 的 antigen level(血清型) Serologic Equivalent 給予不相合的分數，其目的在於避免受贈者產生對抗捐贈者器官的抗體，所以是以 “Antigens Mismatch” 作為報告項目，總分最高 10/10 分、完全相合為 0/10 分，完全不相合為 10/10 分。若是開立中低解析度的醫令，會以血清型作為配對標準；高解析度 HLA Typing 的醫令，則會使用 P group 作為配對標準。
  - (4.2) 骨髓移植 Match score：依照 A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 的 generic level(分生基因型) P group 給予相合的分數，其目的在於尋找最多與受贈者 HLA 型別相似的捐贈者，因此以 “Alleles Match” 作為報告項目，總分最高 12/12 分，完全相合 12/12 分，完全不相合為 0/12 分。並且骨髓移植分數具有方向性，若是 homozygous 配對 heterozygous 的情況，會在數字後加上 R(Reject, Host→Graft)、GH(Graft→Host)，例如捐贈者為 A\*02:01, 11:01; B\*15:02, 27:04; C\*03:03, 03:03; DPB1\*01:01P, 05:01P; 受贈者為 A\*02:01, 11:01; B\*27:04, 27:04; C\*03:03, 07:02; DPB1\*02:01P, 03:01P，以受贈者報告來說，其分數為 A:2, B:1R, C:1GH, DPB1:0, 4/8 分，依據臨床醫師根據受贈者狀態尋找合適的捐贈者。
  - (4.3) 不表現的 alleles 例如 Null 的型別，在進行配對時視為不存在 alleles。
  - (4.4) 若結果報告為 G group 也是以 P group 等級作為配對標準。

Loci	Generic Typing (骨髓移植)	Generic Typing (器官移植)	Sero. Equivalent (器官移植)	P, G group
A	3-fields	1-fields	Yes, A" xx"	如果有無法解決的 ambiguity 發生：發送 P group (為同一群組)；不同群組，發送 1 <sup>st</sup> -field+NMDP 報告；基因型有 Null 的型別，發送 G group，並將對應血清型改為 NULL。
B	3-fields	1-fields	Yes, B" xx" , Bw4/6	
C	3-fields	1-fields	Yes, Cw" xx"	
DRB1	3-fields	1-fields	Yes, DR" xx"	
DRB345	3-fields	2-fields	Yes, DRw" xx"	
DQA1	3-fields	2-fields	N/A, DQA1 "xx:xx"	
DQB1	3-fields	1-fields	Yes, DQ" xx"	
DPA1	3-fields	2-fields	N/A, DPA1 "xx:xx"	
DPB1	3-fields	2-fields	N/A, DPB1 "xx:xx"	

## 7. 常用之 HLA 基因資料庫網站，目前均有持續更新：

- (1) Basic Local Alignment Search Tool(BLAST), National Center for Biotechnology Information：提供序列查找之功能，並且有新發現之序列可上傳至資料庫。
- (2) IMGT/HLA Database, Immuno Polymorphism Database(IPD)：提供近期更新之新型別與序列資料，並且具有 Alignment 功能。
- (3) HLA Nomenclature：可以查找 P group 與 G group 之群體。
- (4) National Marrow Donor Program (NMDP)：可以查詢 Allele NMDP codes 之相關資訊，有美國地區調查的 Allele Frequencies Haplotype，並且可以查詢或申請新的 NMDP code(MAC Service UI)。

## 8. P group, G group：

- (1) P group：一個將不同 HLA generic typing 型別以蛋白質序列進行分組的方法，若一群組其 Exon 2, 3(Class I)或 Exon 2(Class II)的蛋白質序列相同，會被分類在同一個 P group，表示方法為 HLA generic typing 之 4-digits 加上 P，例如：A\*24:02P。
- (2) G group：一個將不同 HLA generic typing 型別以核苷酸序列進行分組的方法，若一群組其 Exon 2, 3(Class I)或 Exon 2(Class II)的核苷酸序列相同，會被分類在同一個 G group，表示方法為 HLA generic typing 之 6-digits 加上 G，例如：A\*24:02:01G。
- (3) 若發送 P group 報告，會加上如下備註，以提醒臨床醫師報告所代表的意思，因 HLA 相關報告表示方法多樣：The alleles in HLA-X\*XX:XX P group encode identical protein sequences in the antigen recognition site and thus they are considered to be functionally identical。

## 9. DPB1 TCE-group Assignment :

- (1) TCE 為 T-Cell Epitopes 之縮寫，DPB1 之抗原可以依照其表現出的 epitopes(抗原決定位)、cross-reactivity patterns 以及蛋白質序列所表現出的免疫原性(Immunogenicity)分為不同群組，表示方法為 TCE-group 1~3，Group 1 有最強的免疫原性，Group 3 則最弱。
- (2) 根據許多相關文獻顯示，若無血緣相關的骨髓移植案例(unrelated-donor HSCT)中捐贈者與受贈者含有不同的 TCE groups，對於移植後的排斥狀況會較為嚴重，相比於相同 TCE groups 配對的狀態[Ref 9-10]。
- (3) TCE-group 日益越顯得重要，美國鼓勵實驗室發送 TCE-group 報告，並且如本院檢驗醫學部有參加之 CAP 認證，也開始將 TCE-group 列為 HLA Typing 考試的教育題，此 TCE-group 能夠在 IMGT 網站查詢，提供配對時作為參考。

## 10. KIR typing assignment :

- (1) KIR 的種類對於 NK cell 活化的活躍程度有其相關性，若本身是有血液腫瘤疾病的骨髓受贈者，或是對器官移植有急性免疫反應疑慮的受贈者，在尋找適合的捐贈者時會加做 KIR genotyping[Ref 11-13]，目前 UCSF 在進行 Perfect match (12/12) 的骨髓移植配對時，會加做 KIR Typing。
- (2) 目前 UCSF-ITL 以 SSP 方法進行 KIR Genotyping，因其結果與 HLA Typing 具有相關性，在發送 KIR 報告時，會同時與 HLA Typing 報告一起發送。
- (3) 若僅單獨開立 HLA Typing 則會直接發送報告，若有開立 KIR Genotyping 檢驗，因其報告欄位必須填寫相對應的 HLA Ligands，因此會等待 HLA Typing 報告完成後，再一起發送報告。

## 11. 不同 HLA NGS Typing 方法的基本原理與比較：

- (1) Long-Range PCR: 先分別進行目標 HLA 基因的長片段複製(包含 exons 與 introns)，接著進行片段化以及加上分辨不同檢體的 index 序列、flow-cell 黏附的 adaptor 序列，將產物進行純化並且 pooling 所有檢體之後，進行片段 size selection，完成 library 的製備。使用適當的定量方法定量之後，以定序儀開始進行定序，並且等待結果完成後分析報告。
- (2) Hybrid-Capture: 先進行 whole genome 片段化，並且加上分辨不同檢體的 index 序列、flow-cell 黏附的 adaptor 序列，將產物進行純化並且 pooling 所有檢體之後，進行片段 size selection 以及使用特定黏附在 HLA 基因的 probes 篩選 HLA 基因，經過放大基因序列的反應之後，將產物進行純化完成 library 的製備。使用適當的定量方法定量之後，以定序儀開始進行定序，並且等待結果完成後分析報告。

- (3) Oxford Nanopore：此方法不需進行 genome 的片段化，而是利用奈米孔洞的技術在特定儀器內直接進行目標 HLA 基因的定序。在 HLA 基因片段經過放大在端點加上 adaptor 以及 motor 蛋白之後，於 nanopore 技術之定序儀進行分析，此方法的 flow-cell 上面佈滿奈米孔洞，一個孔洞只讓一股序列通過，並進行定序，在定序的過程中同時進行結果分析，當有足夠信心的 reads 可以分析出 HLA 分型結果時，即可停止定序反應。

	Long-Range Seq.	Hybrid-Capture Seq.	Nanopore Seq.
優點	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 可個別調整不同 locus 所使用的 DNA 的量，可調整的地方較多。</li> <li>2. 提早複製目標基因序列，避免不必要基因的無效複製。</li> <li>3. 幾乎以 PCR-based 方法完成 library 製備，上手難度較低。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 提早進行基因片段化、標記與複製，可以避免 locus 太多而提高移液出錯率。</li> <li>2. 使用微珠進行目標基因篩選，以及全基因片段化複製，避免 allele imbalance。</li> <li>3. 無長片段複製，降低複製出錯機率。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 反應時間快速，最快 3 個小時能夠有分析結果，可以在定序的過程軟體同時進行分析。</li> <li>2. 沒有冗長的 library 製作步驟，且上手門檻低。</li> <li>3. 可進行長片段定序，也可直接進行 native DNA 定序，避免複製錯誤的影響。</li> </ol>
缺點	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 長片段 PCR 需耗時較久，約 6~8 小時，且出錯機率會上升，可能有較多雜訊。</li> <li>2. 若檢體本身品質不佳，會有無效複製的狀況出現。</li> <li>3. 要多次測量並稀釋 DNA 濃度，以避免 allele imbalance 狀況發生。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 較多的手工操作項目，醫檢師必須花時間訓練。</li> <li>2. 一開始所有的檢體即 pooling 在一起，若後面步驟失敗了需要全部檢體重新執行。</li> <li>3. Hybrid 步驟對時間及溫度較嚴格，與 r-SSO 方法一樣。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 定序結果 output 較低，一次僅能執行一支檢體。</li> <li>2. 支援的試劑商選擇少，以 HLA typing 來說目前僅 2 家。</li> <li>3. 檢體需求高，且因為 reads depth 不夠多造成結果容易有 ambiguity。</li> </ol>
NGS 技術	Illumina cluster amp.	Illumina cluster amp.	Oxford Nanopore
試劑廠商範例	One Lambda AllType GenDX NGSgo MX Omixon HoloType HLA	CareDX AlloSeq	GenDX NGS-Turbo Omixon NanoTYPE

#### (四) Real-time PCR HLA Typing

1. **使用之儀器與試劑：**UCSF-ITL 目前使用 Real-time PCR 方法執行緊急大體器官捐贈者的 HLA typing 檢驗，為了確認檢驗結果正確，UCSF 實驗室是使用兩套不同廠牌之 Real-time PCR 試劑同時進行檢驗，並確認兩者結果是否相同後發出血清學報告。為了避免報告的錯誤，之前是使用一個 Real-time PCR 方法加上 r-SSO 方法做檢驗結果的確認，在報告兩者一致後才發送報告；現在則改為若兩套不同廠牌之 Real-time PCR 試劑有結果上的不一致時，會等待 NGS 方法做完確認後才發送最終報告。改為都使用 real-time 方法可大幅縮短檢驗報告時間，由原本的 5.5 小時(real-time PCR+r-SSO)縮短為 3 小時(兩套 real-time PCR)。

(1) **使用試劑：**One Lambda LinkSeq ABCDRDQB1 384 Kit 以及 CareDX Olerup QTYPE Typing Kit，均為 384 孔盤的設計，檢體前處理與 DNA 萃取時間約 40 分鐘、手工操作時間 20 分鐘、上機檢驗時間約 1 個小時，分析報告與結果確認時間約 30 分鐘，最快在 3 小時內可發送血清學檢驗結果。

(2) **使用儀器：**

(2.1) **即時熱循環核酸酶鏈反應儀：**Applied Biosystem QuantStudio Pro System，支援 384 孔盤上機以及至少 5 個不同螢光訊號偵測 channels；以下使用的兩家不同產品有的同時使用至少 4 種不同的螢光物質，因此儀器必須支援 4 個以上的螢光偵測 channels。

(2.2) **自動化核酸萃取儀器：**QIAGEN EZ1 Advanced XL，使用不需拆封的分離式卡夾，可以避免打開試劑包裝或分裝試劑時造成污染的可能性，一次可同時萃取最多 14 支檢體，且耗時短僅需 20 分鐘即可完成核酸萃取。

(2.3) **分光光度計：**Thermo Scientific Nanodrop One。

(3) **報告發送範圍：**發送中低解析度(1<sup>st</sup>-filed 以及血清型)之報告，包含 HLA-A, B, C, DRB1, DRB345, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1，共 11 個 Loci。

2. **Real-time PCR HLA Typing 實驗原理與步驟：**

(1) **LinkSeq Kit 檢驗原理：**藉由不同具有辨認 HLA 特異性序列的引子(primers)分別在不同的反應槽中與目標序列進行放大反應，並在目標序列進行複製時，其反應中含有 SYBR green 螢光物質會嵌合至雙股 DNA 中，因而放出螢光訊號受到機器偵測，配合 melting temperature 的步驟，可以更準確的辨認反應呈現的陽性反應為真。在 PCR 放大反應完成後，經由軟體計算不同陽性訊號 wells 的組合而得出檢體的 HLA 分型。每個反應槽中含有 Internal Control 的引子組與目標基因序列的引子組，彼此是競爭反應。

- (2) QTYPE Kit 檢驗原理：藉由不同具有辨認 HLA 特異性序列帶有螢光物質的引子 (primers) 分別在不同的反應槽中與目標序列進行雜交反應 (hybridize)，並在目標序列進行複製時因為引子的螢光物質與會與引子另一端的猝熄 (Quencher) 分離，因而放出螢光訊號受到機器偵測 (TaqMan 原理)。在 PCR 放大反應完成後，經由軟體計算不同陽性訊號 wells 的組合而得出檢體的 HLA 分型。此方法目前使用四種螢光，FAM 作為偵測 HLA Class I 的螢光物質、O560 作為偵測 HLA Class II 的螢光物質、R610 作為每個反應槽中 Internal Control 的訊號以及 Q670 作為 Passive Reference dye。
- (3) 檢驗流程：
- (3.1) 收檢確認：確認檢體包裝完整、內容物正確 (一次大體器官捐贈會收到 19 支 ACD 管檢體以及 1 支紅頭血清管檢體)，ACD 檢體作為萃取 DNA 與之後進行 FCXM 用途；血清管僅作為保存用途，供後續需做額外確認檢驗用途。
- (3.2) DNA 萃取：使用 QIAGEN EZ1 Advanced XL 儀器自動化萃取 DNA，依捐贈者 Buffy coat 的濃度使用全血萃取 4~5 管 DNA，萃取完成後將檢體集合並以 Nanodrop 測定濃度，並保存一管 (1.5 mL) 全血以及一管 DNA 於 -80°C 冷凍櫃，依據實驗室認證條文規範至少保存 10 年。
- (3.3) 試劑配置：依照試劑說明書配置相關試劑，並先將反應盤離心一分鐘以確保反應盤中所有試劑均沉降至底部。之後以電動 12 爪自動分注器將試劑依序加入 384 孔盤中，使用專用封膜覆蓋反應盤後，以桌上型迷你離心機離心兩分鐘確保試劑沉降至底部。
- (3.4) Real-time PCR 反應：將反應盤放入儀器中進行即時定量熱循環反應，LinkSeq 試劑約需 80 分鐘、QTYPE 試劑約需 60 分鐘完成反應。
- (3.5) 結果分析與品管指標檢查：反應完成後，先依序檢查兩試劑廠牌各別之品管指標是否有通過，之後依序檢查每一個 Locus 的檢驗結果是否正常、不同 Loci 之間的 Linkage 是否常見且合理、並選取最有可能之檢驗結果在 Final Assignment 欄位中，最後檢查兩組不同試劑的檢驗結果是否互相符合。若結果有超過一組以上沒有辦法分辨的 Common alleles，檢查血清型是否有差異，若無，則可以依普通流程發送血清型報告；若有，則檢查兩組不同試劑的結果是否可以刪除其他可能性至唯一結果，若沒有辦法刪除其他可能性至唯一結果，則執行 NGS 方法進行結果確認。
- (3.6) 報告發送與 UNet 結果上傳：確認兩不同試劑之檢驗結果一致後，先於醫

院系統發送最終檢驗報告，並將結果登錄至 UNet 器官共享聯合網。

### 3. QC 指標的設定：

#### (1) LinkSeq Kit：

- (1.1) 確認實驗過程是否有污染：No Template Control(NTC)反應槽沒有任何螢光訊號。
- (1.2) 確認實驗反應有效：每個反應槽的 Internal control 都有複製產物，除非有目標基因陽性反應。
- (1.3) 確認實驗反應產物大小正確：反應的產物必須要落在預測的峰值範圍內才會被計算為陽性結果，否則可能是非特異性結合的產物，視結果為陰性。

#### (2) QTYPE Kit：

- (2.1) 確認實驗過程是否有污染：No Template Control(NTC)反應槽沒有陽性螢光訊號。
- (2.2) 確認實驗反應有效：每個反應槽的 Internal control 都有複製產物，除非有目標基因陽性反應。
- (2.3) 確認實驗反應有效複製出目標片段：Positive Control Well 共有三組，必須至少要有一組呈陽性反應。

## (五) 虛擬交叉配對(Virtual Crossmatch, VXM)

- 1. 概念：**虛擬移植交叉配對方法，使用血清型或高解析度之 HLA 分型結果(2-fields)，配合 HLA 單一抗原抗體鑑定結果，輔以相關軟體(如 HLA-Matchmaker 或 One Lambda Fusion 軟體)做移植前的 HLA 分型與抗體建檔調查。可以依照 HLA 抗原決定位(epitopes)、Cross-reactive group(CREG)等多重因素進行分析模擬交叉配對之結果。VXM 除了能夠克服實體交叉配對檢驗耗時較長，與需要取得實際檢體的缺點外，對於高致敏的受贈者 (Highly Sensitized Patients)也具有比實體交叉配對能夠更精確判斷 HLA 抗原和抗體間反應的輔助優勢。目前 2024 年美國法規規定執行虛擬交叉配對的執行者必須要是通過 ASHI 認證之實驗室主管，虛擬交叉配對主要目的在於利用完善的受贈者抗體追蹤策略去減短冗長的實體交叉配對檢驗步驟、省略檢體即時的運送以及避免超級性或急性排斥反應的發生。
- 2. 虛擬交叉配對流程：**實驗室必須先取得受贈者與捐贈者 HLA Typing 結果，並且受贈者有在實驗室完成至少 2 次 HLA 抗體鑑定檢驗以確認受贈者 Antibody profile 的穩定度、抗體強度分級等資訊，在完成第二次抗體鑑定檢驗後，若資格符合，則可以在 3 個月內進行虛擬交叉配對檢驗。相關實體與虛擬交叉配對流程規範詳如[附錄-4]。進行虛擬交叉配對時，需特別注意有抗體的受贈者其 CREG 群組是否有可能對應到捐贈者抗原，若受贈者本身無抗體，移植無立即排斥風險；若有的話必須依照抗體的 MFI 做移植排斥風險上的評估，或者轉介使用實體交叉配對試驗進行移植排斥風險的評估。目前結果報告的風險等級有以下：
  - (1) Low risk：**虛擬交叉配對結果為 Compatible，可直接進行移植手術，並於手術之後補做實體交叉配對檢驗(Retrospective)；受贈者抗體鑑定報告為陰性或無對應到捐贈者抗原型別的抗體，且先前未曾產生對應到捐贈者抗原型別的抗體。
  - (2) Moderate risk：**虛擬交叉配對結果為 Compatible，可直接進行移植手術，並於手術之後補做實體交叉配對檢驗，但須注意受贈者狀況並於手術過後適時使用 IVIG 等抗排斥藥物；受贈者抗體鑑定報告為陽性，且有對應到捐贈者抗原型別，但其抗體無叢集反應、抗體之 MFI 小於 5000、抗體強度無法導致實體交叉配對有陽性結果。
  - (3) High risk：**虛擬交叉配對結果為 Incompatible，不建議進行移植手術，也不需執行實體交叉配對檢驗，需繼續等待合適捐贈者，除非基於受贈者臨床狀況危急，才執行實體交叉配對檢驗評估是否有機會配合藥物的使用進行移植手術；受贈者抗體鑑定報告為陽性，且有對應到受贈者抗原型別，其抗體有叢集反應且 MFI 大於 8000、抗體強度會明顯導致實體交叉配對是陽性結果。

相關的分析流程詳如[附錄-5]。

### 3. 符合虛擬交叉配對條件之受贈者：

- (1) 必須至少完成 2 次 HLA 抗體鑑定，且移植日期與最後一次抗體檢驗日期不超過 3 個月。
- (2) HLA 抗體鑑定結果必須是陰性或是具有相對穩定不變動的陽性歷史檢驗結果。
- (3) 移植前兩個月未發生以下致敏事件：輸血、器官或骨髓移植、懷孕、使用免疫排斥等藥物、細菌感染必須使用抗生素、以及其他可能會產生 HLA 抗體之致敏事件。
- (4) 對於腎臟受贈者來說，所有 MFI>1000(Moderate~Strong)的抗體都有登錄於 Unacceptable Antigens，以確保受贈者配對到的捐贈者型別不會是抗體對應到的型別，若有為了增加配對機率而選擇性刪除少數微弱強度的抗體時，進行虛擬配對交叉試驗時必須特別註明，並通知實驗室主管進行報告審查。
- (5) 心臟與肺臟受贈者為了提高配對的機會，目前沒有實行 Unacceptable Antigens 的登錄，因此在執行虛擬交叉配對時必須仔細檢查受贈者的抗體鑑定報告與捐贈者的 HLA 型別。

### 4. 虛擬交叉配對的規範與原則：

- (1) 虛擬交叉配對因為是使用受贈者完整的抗體移植史檔案(Antibody Profile)配上捐贈者的 HLA Typing 報告進行配對結果的預測，因此完整的抗體檢驗報告對虛擬交叉配對十分重要，除了參考最近 2 次的抗體報告以外，也會檢查受贈者在欲進行移植手術時間點前所有的曾經是陽性結果的抗體鑑定報告，以避免受贈者因為免疫的記憶反應而引發急性排斥反應。
- (2) 虛擬交叉配對檢驗仰賴檢驗執行者長久的檢驗與工作經驗、相關的配對標準也與實驗室制定的目標政策有關。因此實驗室主管在此項檢驗與結果的判定規則制定上作為最為重要的角色，在美國是必須通過美國組織相容性與遺傳學協會(ASHI)的訓練、面試與筆試、認證、政府衛生機構的認證與擁有實際在移植免疫領域工作經驗紀錄的門檻。依照實驗室要到達的目標，是想要增加受贈者取得適合器官的機會因此降低抗體強度的門檻；或是想要達到更長久的器官移植與宿主存活率而更加嚴謹的避免有陽性反應的抗體，都與實驗室主管以及員工共同開會討論的實驗室目標、以及政府機構和領域專家想要達到的目標有關。
- (3) 本進修報告所說明與提及之相關規範，是 UCSF 實驗室目前的使用的流程與規則，在臺灣若也想朝這個目標前進，我們也必須自己制定一個合適的政策與目標。

## 5. 虛擬交叉配對(Virtual XM)、流式細胞儀交叉配對(Flow XM)之比較：

### (1) VXM、PXM 之目的與優缺點比較：

	Flow XM (Physical)	Virtual XM
Purpose 目的	Donor-specific antibody affinity	Immunological risk assessment
Pros. 優點	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 模擬抗體與細胞之間真實的結合狀態，臨床上說服力高。</li> <li>2. 結果可以反應出 Public epitope binding、CREGs 的狀態，如 Bw4/6 以及一些有 clusters 的抗體群體。</li> <li>3. 非常複雜的抗體也能夠得到相對應、直觀的檢驗結果。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 有目前交叉配對檢驗方法中最高的 Sensitivity。</li> <li>2. 耗時短，不需即時取得捐贈者細胞檢體與受贈者血清，且捐贈者的細胞檢體具有時效問題。</li> <li>3. 可以觀察 epitope 與 allele-specific 層面的反應，目前 CDC 與 FCXM 無法得知如此詳細的訊息。</li> </ol>
Cons. 缺點	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HLA-C, DQ, DP 的反應因其特性會被忽視。</li> <li>2. 較常有偽陽性、偽陰性的狀況出現，如 T cell HIV 病患、B cell autoimmune disease 病患的偽陽性、太弱的抗體群組造成的偽陰性。</li> <li>3. 以靈敏度設定而言，不同實驗室需要藉由實證的檢驗結果進行調整。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 仰賴 SAB 檢驗結果，SAB 檢驗的定期追蹤以及結果的分析是關鍵。</li> <li>2. 需要仰賴專家的專業知識與培養。</li> <li>3. 必須定期追蹤受贈者 SAB 檢驗結果，且若有致敏史必須重新評估配對結果。</li> <li>4. 受贈者抗體太過複雜的情況下，虛擬交叉配對檢驗結果可能會失真。</li> </ol>

### (2) 虛擬交叉配對(VXM)、實體交叉配對(PXM)結果之分析：

Virtual XM	Physical XM	Explanation
Pos.	Pos.	Concordant、檢驗結果一致
Pos.	Neg.	PXM 敏感度不夠、抗體型別為 HLA-C, DQ, DP
Neg.	Pos.	PXM 偽陽性、SAB 沒有包含相關抗體型別、Prozone effect of SAB
Neg.	Neg.	Concordant、檢驗結果一致

## 6. Pronase、Anti-CD20 chimeric Fab' mAb 的使用與緊急器官移植流程：

### (1) Pronase、Anti-CD20 抗體處理的原理與目的：

- (1.1) Pronase：流式細胞儀交叉配對檢驗常會因為受贈者血清中含有 non-specific immunoglobulin 而非特異性的與捐贈者 T 淋巴球表面 ligands、B 淋巴球表面的 Fc receptor 或其他 immunoglobulin 結合，也有可能因為捐贈者本身細胞表面黏附一些非特異性抗體造成 T 或 B 淋巴球之交叉配對檢驗結果呈現偽陽性，這會使得原本合適的受贈者因為受影響的交叉配對檢驗結果而失去移植的機會。Pronase 是由 *Streptomyces griseus* 所製造的 proteolytic enzyme(蛋白水解酶)，其具有可以降解蛋白質使之成為氨基酸的功用，並且是沒有辦法被血清停止反應的酵素。使用適當濃度的 Pronase 溶液可以降解淋巴球表面的非特異性抗體、尤其 B 淋巴球表面的 Fc receptor、 $\kappa$ -light chain、CD20 等 ligands，卻依然可以極大程度的保留細胞表面的 HLA 抗原，因此可以作為去除非特性結合干擾之試劑[Ref 14-15]。
- (1.2) Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody：Rituximab 是一種作用於人類 CD20 的人鼠嵌合單株抗體。由於 CD20 主要表現於 B 淋巴球細胞表面，因此可用來治療因 B 淋巴球過多所造成的疾病，包括淋巴瘤、慢性淋巴細胞白血病、移植排斥和某些自體免疫疾病。許多受贈者會使用 Rituximab 作為抗移植排斥藥物使用，但因為使用此藥物過後，B 淋巴球的補體毒殺實驗與流式細胞儀交叉配對檢驗結果會受影響因此呈現強偽陽性，若真正有 HLA 抗體反應也會被干擾遮蔽。因此若要避免此干擾臨床會使用 Pronase 與 Anti-CD20 chimeric Fab' mAb 將捐贈者 B 淋巴球表面之 CD20 降解以及最大程度進行遮蔽，以避免 B 淋巴球在與含有 Rituximab 血清作用時，Rituximab 會黏附於細胞表面而造成偽陽性結果[Ref 16]。
- (1.3) Pronase 的處理已經逐漸變為 FCXM 實驗的標準前處理步驟，而在 2018 年有文獻指出目前已有 Anti-Rituximab 抗體可以先處理受贈者血清，反應時間僅需 Pronase 處理的一半，在確定受贈者有使用 Rituximab 以及實驗室有足夠經費的狀態下，此處理可以縮短反應時間也可以減少細胞的消耗[Ref 17]。
- (1.4) 目前 Pronase 的處理還並未完全明瞭其原理，其不僅僅只作用於 B 淋巴球表面的 Fc receptor 上。根據文獻指出若僅單純使用抗體覆蓋 B 淋巴球表面的 Fc receptor 無法避免 B 淋巴球交叉試驗的偽陽性結果，顯示 Pronase 還具有降解其他會造成偽陽性結果的細胞表面受器或抗原。也是為何此方法

已使用超過 20 年現在依然是流式細胞儀交叉配對檢驗之必要的前處理步驟[Ref 18]。

(2) 試劑準備：

- (2.1) (10X)10 mg/mL Pronase solution (Sigma #P5147-1G)，-80°C保存 1 年。
- (2.2) 緩衝液/DPBS (Gibco #14190235-6)，4°C保存至供應商標示之保存期限。
- (2.3) 胎牛血清/FBS (Gibco #10437028)，4°C保存至供應商標示之保存期限。
- (2.4) RPMI-1640 細胞培養液(Lonza #12-702Q)，4°C保存至供應商標示之保存期限。
- (2.5) Anti-CD20 chimeric monoclonal antibody (Southern Biotech #9352-01)，4°C保存至供應商標示之保存期限。
- (2.6) DNase (Sigma #D4527-40KU)；於 40KU 的試劑粉末加入 15mL RPMI-1640 使粉末完全溶解後再分裝使用，配製完之濃度約為 2.5~2.7U/ $\mu$ L，-80°C保存 1 年。
- (2.7) Rituximab (Selleck Chemicals #A2009)；以 DPBS 緩衝液 1:50 稀釋後再分裝使用，-80°C保存 1 年、4°C保存 6 個月，此溶液作為陽性控制組。

(3) Pronase 試劑泡製：

- (3.1) 購買之 Pronase 試劑為 1g 之粉末包裝，將粉末全部溶於 90mL HPLC-H<sub>2</sub>O，並使用振盪器混合均勻，再加入 HPLC-H<sub>2</sub>O 至 100mL，配置濃度為 10mg/mL 之 10X Pronase 溶液。
- (3.2) 分裝成 110 $\mu$ L 容量數個小管(aliquot)，貼上標籤標示濃度、配製者、泡製日期、有效期限、批號等資訊，並保存於-80°C至多 1 年有效期限。
- (3.3) 取出一管 10X Pronase 溶液進行確效，完成確效並且允收之後，才能夠啟用新批號 Pronase 試劑。

(4) Pronase 與 Anti-CD20 mAb 處理步驟，整體耗時約 90 分鐘，Anti-CD20 mAb 處理是選擇性處理步驟，其目的是為了更加完全去除與覆蓋 B 淋巴球表面的 CD20，以最大程度去除干擾可能，若省略 Anti-CD20 步驟，整體耗時約 60 分鐘：

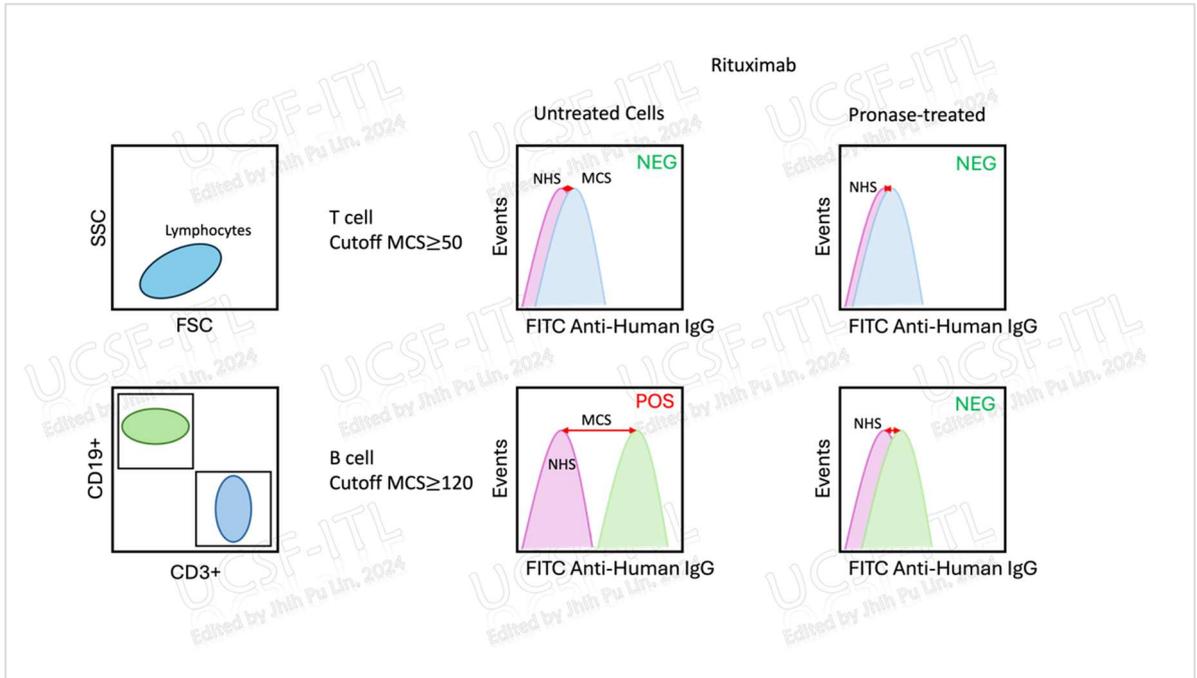
- (4.1) 對欲進行 Pronase 處理完成純化步驟的周邊血淋巴球進行細胞計數，取  $5 \times 10^6$  個淋巴球至 1.5mL 微量離心管內，並以 DPBS 清洗 2 次，以完全去除細胞培養液中的營養物質與 FBS。
- (4.2) 加入 900 $\mu$ L DPBS 重新懸浮淋巴球，並且加入 100 $\mu$ L 10X Pronase(最後反應濃度為 1 mg/mL)，震盪混合均勻後置於 37°C 孵育 30 分鐘。
- (4.3) 反應完成後加入 100 $\mu$ L RPMI-DNase(約 260U)，震盪混合均勻，以去除因 Pronase 處理而死亡破裂的淋巴球之 DNA。若混合均勻後依然看到如 DNA

的黏稠物質(slimy/viscous look)懸浮於溶液中，必須再加入同樣體積之 DNase 作用一次。

- (4.4) 將淋巴球離心沉降到底部後，以含 10%FBS-RPMI 細胞培養液清洗淋巴球共 2 次。
- (4.5) 重新懸浮淋巴球於 2%FBS-DPBS 溶液中，並再次進行細胞計數，以確認淋巴球的數量夠進行接下來的 FCXM 實驗。
- (4.6) [選擇性步驟]：(經過實驗室驗證確認此處理方式未進行後，依然可以達到相同結果，可以選擇性刪除此步驟)將淋巴球離心沉澱並去除上清液，每  $2.5 \times 10^5$  cells 需加入 10  $\mu$ L anti-CD20 chimeric mAb 以及三倍抗體體積的 2%FBS-DPBS，以遮蔽淋巴球表面的 CD20 抗原，置於室溫避光反應 20 分鐘。
- (4.7) [承(4.6)：選擇性]：以 1 mL 2%FBS-DPBS 清洗淋巴球 1 次，並重新懸浮淋巴球，完成 Pronase 與 anti-CD20 之前處理。
- (4.8) 處理完成之淋巴球置於 4°C 可以保存至多 12 小時。  
(以上所有細胞清洗用之試劑均須維持 4°C)
- (5) Pronase 試劑確效：
  - (5.1) 原理：利用 Rituximab(Anti-CD20)溶液與未經 Pronase 處理和經過 Pronase 處理的周邊血淋巴球進行反應，並利用流式細胞儀交叉配對檢驗原理觀察經過 Pronase 處理之淋巴球是否在 B 淋巴球結果得到陰性結果，以確認泡製之 Pronase 溶液具有降解細胞表面 Fc receptor 與 CD20 之功能。
  - (5.2) 使用隨機活體器官捐贈者之檢體 2 支進行確效，先依淋巴球分離試劑提供之步驟分離周邊血淋巴球，並進行細胞計數。
  - (5.3) 取適量細胞依照步驟(五)-6-(4)進行 Pronase 處理，處理完之細胞放置於 4°C 備用。
  - (5.4) 取適量細胞依照流式細胞儀交叉配對實驗之流程進行實驗，實驗必須包含未處理(Untreated)與 Pronase 處理之組別，以比較結果正確性，反應之血清需包含 BKG(DPBS)、NHS、In-house PC 與 Rituximab。
  - (5.5) 結果判讀：經 Pronase 處理之淋巴球因其表面之 Fc receptor 與 CD20 大部分均被降解，因此與 Rituximab 反應的結果 B 淋巴球結果應為陰性，T 淋巴球沒有 CD20 因此呈現陰性；未處理淋巴球之 Rituximab 結果 B 淋巴球應呈現陽性，因 CD20 仍然保留在 B 淋巴球表面，T 淋巴球結果呈現陰性。  
(MCS 與螢光強度會因為不同實驗室使用不同廠牌之儀器、試劑、確效標

準而有所不同)

- (5.6) [Anti-CD20 chimeric mAb]若需選擇性刪除此步驟，必須進行方法驗證允收通過後才能實施，取至少 20 位隨機捐贈者細胞(因 FCXM 結果易受捐贈者細胞狀態影響，故須確保測試足夠之捐贈者細胞以代表隨機採樣之狀態)同時進行含有與非含有此步驟之 Pronase 處理，並依照上列步驟進行方法驗證，兩者結果 100%相同後才能開始執行。



- (6) 緊急器官移植的交叉配對試驗流程：為了縮短實體交叉配對試驗的時間，UCSF-ITL 已於 6 年前取消敏感度與臨床共識性低的淋巴球毒殺檢驗(CDC)，改為僅執行敏感度與特異性皆較高的流式細胞儀交叉配對(FCXM)，同時引進自動化細胞分離儀器、更快速的臨床專用流式細胞儀，以減少操作時間。FCXM 之檢驗結果判讀與血清處理之流程圖如[附錄-6]。

- (6.1) 檢體登錄與前處理，耗時約 10 分鐘。
- (6.2) 使用 RoboSep 自動化細胞分離儀器分離 ACD 管中捐贈者周邊血淋巴球，反應時間約為手工操作方法的 1/2，若僅需分離一位捐贈者細胞，耗時 20 分鐘(手工法約需 40 分鐘)，使用 Orflo Moxi V 自動細胞計數儀計數細胞與紀錄細胞活性，共耗時約 20~30 分鐘。
- (6.3) 為了避免干擾物質影響實驗結果，使受贈者可能因為偽陽性結果失去器官移植的機會，所有緊急器官移植之交叉配對均執行 pronase 與 anti-CD20 抗

體之前處理，含清洗步驟耗時約 90 分鐘，實驗必須包含未處理(Untreated)與 Pronase 處理之組別，以比較結果正確性。

- (6.4) 使用 96 孔反應盤進行流式細胞儀交叉配對檢驗步驟，UCSF 作為外部品管參考實驗室，反應之控制組包含 BKG(DPBS)、NHS、In-house PC、1:4 In-house PC、W6/32 CI PC、WR18 CII PC、Rituximab，含血清與淋巴球室溫孵育、清洗步驟、螢光抗體反應，耗時約 60 分鐘。
- (6.5) 以 BD FACS Lyric Clinical Cell Analyzer 上機分析螢光訊號結果，此機型的流式細胞儀本身設計為臨床使用，分析速度較快、體積較小、並具有多功能盤式自動上樣平台且分析程式使用起來較直觀容易，耗時約 10 分鐘。
- (6.6) 報告核對與報告發送，耗時約 10 分鐘。
- (6.7) 總時長約 4~6 小時可以發送報告，FCXM 檢驗除了敏感度高之外，經由適當的前處理還能夠去除許多干擾、實驗步驟較單純，都是 CDC 無法達到的優點，若受贈者本身沒有 Preformed antibodies，甚至可以使用 VXM 就完成移植的評估，這在國土較大的地區、國家必須爭取器官保存與運送時間的前提下，具有強大的優勢。

## (六) 內皮細胞交叉配對試驗(Endothelial Cells Crossmatch, ECXM)

1. **概念：**對於抗體鑑定本身是陰性的受贈者、接受不同 HLA 型別捐贈器官的受贈者，在器官移植過後開始產生排斥反應，但經由 HLA 抗體鑑定檢驗確認並未產生對抗移植器官 HLA 型別的抗體時，可以使用內皮細胞或表皮細胞代替淋巴球進行流式細胞儀交叉試驗，以偵測受贈者之血清是否可能含有非 HLA 抗體(Non-HLA Antibody)而導致器官排斥反應，例如：MIC-A, MIC-B, Angiotensin II Type 1 receptor(AT1R)等抗原。此檢驗最常使用在腎臟移植與心臟移植發現有非 HLA 抗體排斥反應的受贈者。UCSF 移植實驗室使用四種人類內皮細胞株，分別與受贈者血清進行流式細胞儀交叉試驗，藉由此檢驗的結果可以推測受贈者體內是否含有非 HLA 特異性抗體而造成移植器官的受損[Ref 19-20]。
2. **ECXM 檢驗所使用的人類內皮細胞株：**
  - (1) Human Microvascular Endothelial Cell, HMEC-1 (Foreskin)
  - (2) Human Umbilical Vein Somatic Hybrid Endothelial Cell, EA.hy926 (Umbilical Vein)
  - (3) Human Umbilical Vein Endothelial Cell-Cord, HUV-EC (Umbilical Cord)
  - (4) Human Aorta hTERT-Immortalized Endothelial Cell, TeloHAEC (Aorta, Heart)
3. **檢驗流程：**
  - (1) 由液態氮儲存桶中取出相對應的四種細胞株，放置於 37°C 溫浴快速解凍、以維持細胞株之最大活性。
  - (2) 使用含 20%FBS 的細胞培養液(RPMI-1640)清洗細胞至少兩次，以去除 DMSO 以及死亡的細胞等物質，最後回溶於含 4%FBS 之 RPMI 細胞培養液。
  - (3) 以 Orflo Moxi V Cell Analyzer 自動化細胞計數儀分別計數四種細胞株，並測量細胞活性(Viability)。
  - (4) 在圓底 96 孔盤中依實驗需求畫好標線，並在每個反應槽中加入  $1 \times 10^5$  個內皮細胞，並分別加入 100 $\mu$ L 的 DPBS(BKG)、NHS(NC)、Class I PC 與受贈者血清在室溫進行孵育 30 分鐘，因內皮細胞不屬於抗原呈現細胞(Antigen presenting cells)因此陽性血清只使用 HLA Class I PC。
  - (5) 利用含 2%FBS-DPBS 清洗細胞、共 4 次。
  - (6) 在每個反應槽加入 IgG-FITC 50 $\mu$ L，震盪均勻後避光置於 4°C 孵育 30 分鐘。
  - (7) 利用含 2%FBS-DPBS 清洗細胞、共 2 次。
  - (8) 以含 0.1% Sodium Azide 之 DPBS 溶液重新懸浮細胞，並利用 BD Lyric 流式細胞儀進行螢光分析，使用 FSC, SSC 對內皮細胞進行 gating，並計算出 Median Fluorescence Intensity。

- (9) 利用 NHS 反應組別當作基準，計算各反應之螢光中位數偏移數值(MCS)，使用實驗室 T 淋巴球流式細胞儀交叉試驗之標準，MCS 大於 50 視為陽性。

#### 4. 結果判讀：

- (1) 先檢查受贈者的 HLA antibody profile，確認是否有 HLA 抗體存在，若無，則繼續判讀內皮細胞交叉試驗結果；若有，則進一步檢查實驗用內皮細胞的 HLA Typing 資料，確認抗體型別是否有對應到內皮細胞的 HLA 抗原。
- (2) 若 HLA 抗體存在且有對應到內皮細胞的 HLA 抗原，檢查該抗體的 MFI 數值，若其數值無法造成流式細胞儀交叉試驗呈現陽性結果(通常小於 5000)，則可以忽略；若 MFI 數值足以造成陽性結果，則會於特定內皮細胞的結果欄位加上備註: The result of ECXM may be affected due to DSA in patient serum specifically targeting at HLA antigens which presenting on the surface of specific type of endothelial cells.
- (3) 結果報告 4 種內皮細胞分開判讀以及發送報告，只要其中一種內皮細胞是陽性結果，整體結果即視為陽性，表示受贈者體內有對抗內皮細胞表面非 HLA 抗原的抗體存在。

#### 四、心得與建議事項

- (一) SAB 目前已經是美國追蹤器官移植或骨髓移植受贈者體內 HLA 抗體變化的標準方法，在美國的器官共享聯合網(UNet, United Network for Organ Sharing)主要登錄項目有包含：
1. HLA Typing 結果：HLA-A, B, C, DRB1, DRB345, DQB1, DQA1, DPB1, DPA1 Loci，若是器官移植會標註血清型(Serological Equivalent)與分生型(至少 2-fields 含 NMDP 編碼的解析度，例如：A\*24:XX1)，雖然目前 DQA1 以及 DPA1 Locus 在 cPRA 不計分，但也已經作為可登錄項目。
  2. HLA Antibodies：若受贈者本身帶有 Pre-formed antibodies，會登錄於 UNet 之 Unacceptable Antigens 欄位，代表在進行系統媒合配對時，此受贈者不會配到抗體對應到該抗原的捐贈者，這是避免產生超急性或急性排斥的關卡之一。在實驗室分析抗體報告時，專家如何挑出具有臨床意義的抗體就十分重要，因為若閾值設定的太低，會讓受贈者的權益受損，除了增加等待時間之外，也會降低配到適合的器官機率。因此美國的器官移植檢驗實驗室必須要具有 ASHI 認證的實驗室主管作為與臨床端溝通的橋樑，如何應用專業與實驗室證據替受贈者尋求最大福祉是其主要目標。
  3. 移植感染風險相關之數據：如病毒抗原檢測、法定傳染病檢驗結果等。
- 以上幾點值得我們作為努力的方向，在利用流式細胞儀進行抗體鑑定的方法已問世逾 20 年，此方法已成為美國追蹤受贈者 HLA 抗體的標準方法，如何提升臺灣使用此檢驗的頻率相信是我們能夠努力的第一個方向，目前除了此方法健保未給付、受贈者必須自費檢驗外，我們主流還是使用 PRA 方法對於受贈者的幫助很有限，因為知道抗體陽性的百分比並無法實質幫助受贈者釐清其體內抗體詳細變化、也有可能讓受贈者錯過良好的移植機會。
- (二) 美國的移植檢驗實驗室主要量能放在追蹤受贈者體內抗體的變化，不論是移植前或移植後的抗體報告追蹤，均作詳細的紀錄。抗體的登錄與受贈者配對器官的機率是天秤的兩端，若抗體閾值設定太低，則配對器官機率會過低使受贈者福祉受損；若抗體閾值設定太高，則會使受贈者曝露於過高的免疫反應風險之中。本次進修經驗學習 UCSF-ITL 之抗體分級制度、抗體登錄與分析規則，相信在回國於醫院服務能夠提升移植檢驗方面的實驗流程優化、報告分析改善、異常結果的處理與檢驗諮詢能力的提升等各方面能力。
- (三) 美國目前的移植資料庫系統完善，這仰賴於政府在移植政策上的推動以及醫學中心之間高頻率的 cooperated 與共享資料庫。以美國目前的 UNet (UNOS 組織)系統為例，本系統就建置

了 cPRA 計算系統、0 Ag MM 計算系統、移植數據統計系統等，因以 HLA Typing 的資料庫來說，UNet 系統是最有能力也最能夠反映美國地區 HLA Typing 組成的資料庫，其內建機率的計算功能能夠讓民眾查詢本身獲得移植器官的機率，也可以幫助媒合捐贈者與受贈者配對。另外，此系統本身有可登錄受贈者因為本身有 Pre-formed Antibodies 而必須避開的 Unacceptable Antigens(UA)系統，PRA 方法因其本身並無法得知抗體型別而僅能得知抗體陽性百分比已漸漸被淘汰，藉由 UA 去避開不合適的捐贈者除了可以提升受贈者的生命安全、減少移植排斥的風險與器官的浪費、提升配對效率外，也能夠相對的提高檢驗量能。醫檢師不需多次耗費大量時間執行已漸漸無臨床重要性的實體 CDC 交叉配對試驗，而改以虛擬配對交叉試驗去評估風險，讓醫療機構有能夠有更多的量能去追蹤抗體陽性、移植風險較高的受贈者。

(四)目前美國許多實驗室的 HLA Typing 檢驗已開始發送 P group 及 G group 報告，而根據臺大醫院檢驗醫學部參加之 CAP 認證能力試驗，也在鼓勵實驗室發送 P group 或 G group 報告，取代遇到 ambiguity 時僅發送 1<sup>st</sup>-field 報告。以 HLA DP locus 為例，其分型並不像 HLA-A, B, C, DR, DQ 一般有 linkage 可以查詢與檢查報告之正確性，同時 DP 並沒有依據血清型特性登錄 Serological Equivalent。例如每發現一個新的型別數字就向後加，直到 2024 年 3 月 HLA Nomenclature 網站最近一次更新，DP 之 1<sup>st</sup>-field 編號已經達到 DPB1\*1606:01，但這卻沒有考慮新的分型其蛋白質結構上是否與已被發現的分型相似或相同，而造成發送報告上的困難，有 ambiguity 的結果更是讓醫檢師對於發送報告的正確性存在潛在的錯誤可能性。因此使用 P group 發送 DP 報告有其優點，實際上，以 DPB1\*1606:01 此型別為例，其 P group 分型屬於 DPB1\*01:01 P，表示 DPB1\*1606:01 其 Exon2 所轉譯出的 antigen binding domain 蛋白質序列與 DPB1\*01:01:01:01 相同，在血清學反應上具有相似性，在配對時也是利用 P group 進行配對(且本質上器官移植依然著重在血清學反應)。

(五)根據民國 110 年 2 月 9 日修訂之「特定醫療技術檢查檢驗醫療儀器施行或使用管理辦法」(以下簡稱特管法)第三十六條規定：「實驗室開發檢測項目，規定如附表四」內容並未包含因器官移植或骨髓移植之配對或抗體監控目的執行之基因檢測，因法規內容附件尚未完整使得 HLA NGS Typing 在臺灣目前推動的速度緩慢。即使市面上已經有許多試劑可供選擇，但因不屬於附表四中任何一項疾病檢驗內容，也無法經過程序取得醫療器材許可證(IVD)，使得依據法規規定，醫療院所無法使用 NGS 或 Real-time PCR 相關試劑進行 HLA Typing，這進一步影響到了 HLA 抗體鑑定的精準性以及後續 Virtual Crossmatch

的發展、更甚影響到了大體器官捐贈配對的急迫性，NGS 與 Real-time PCR HLA Typing 試劑目前陷入了若要符合法規、是無法使用的困境。目前臺灣已經有特管法規相關檢驗設立辦法，惟其檢驗所規範之內容若也能定期修訂與擴展，並納入移植相關專業的審查人員，相信能夠讓移植檢驗領域發展的更先進與全面。

(六)National Kidney Registration(NKR) Kidney Swap and Exchange：是美國的腎臟移植配對系統之一，其目的是作為不同活體捐贈者與受贈者之間的溝通橋樑，當有兩對腎臟配對如配對 A、配對 B 本身受贈者捐贈者不匹配時，可以藉由 NKR 系統進行媒合，進行捐贈者與受贈者配對的交換，以尋找合適的捐贈者，此系統目前 UCSF 最高紀錄為 70 對受贈者與捐贈者的連鎖配對媒合，大大提高了受贈者與活體捐贈者尋找合適配對的機會。此系統是 UCSF 大力推薦本院可以放重點優化的系統，使器官的捐贈配對不再停止於家人或親友之間、並讓受贈者有更多的配對機會，藉由與其他配對組合互相交換以尋找合適的捐贈者，可以大大的提升器官捐贈配對效率。

(七)為了減少檢驗偽陽性或偽陰性結果的發生，UCSF 移植實驗室對所有進行抗體檢驗的檢體都使用 DTT 進行處理，可以避免臨床較無意義的 IgM 抗體干擾實驗結果，也可以避免補體造成的干擾；若發現檢驗結果有過高的背景值，也可以使用 Adsorb out 試劑進行血清中雜質的吸收，幫助得到準確且背景值符合允收條件的檢驗結果。DTT 的血清處理是一個已經實行很久的血清前處理標準方法，但對於 DTT 試劑配製後的確效在臺灣卻較少被提及，以前使用補體淋巴球毒殺試驗方法(CDC)進行確效是個耗時且結果常受到補體當下作用的程度、反應時的溫度、細胞本身健康程度等諸多因素影響，目前 UCSF 移植實驗室使用流式細胞儀淋巴球交叉試驗方法(FCXM)確認實驗室自行配製的 DTT 溶液破壞 IgM 抗體的能力，具有檢驗結果受影響的因素較少、實驗步驟較單純、耗時較短的優點。根據許多實驗室認證的條文規範，實驗室自行配製的試劑必須經過確效後才能使用，並留存確效紀錄供以後有相關問題發生時，作為紀錄供查證並作為尋找問題發生原因的輔助資料。

(八)每個移植的機會都得來不易，經過 HLA 分型檢驗、抗體的篩檢、鑑定與追蹤，到最終的交叉配對檢驗，一旦交叉配對檢驗為陽性，受贈者就可能花了大量的時間卻等待不到移植的機會，因此在進行交叉配對檢驗時都必須非常小心偽陰性與偽陽性的干擾。在 UCSF 實驗室目前的規則，只要是移植前最終的交叉配對檢驗都必須進行 Pronase 處理，其目的是為了避免偽陽性結果，可能讓受贈者失去移植的機會；雖然降低與避免移植排

斥的風險非常重要，但以受贈者的角度來說，能夠使用適量抗排斥藥物使受贈者能夠有額外的 5 年至 20 年的器官餘命，遠比起因為當下長期無法配對到完美 HLA 型別相合的器官、或因為偽陽性而失去移植機會而使受贈者失去生命要來得重要。

(九)移植交叉配對檢驗對於擁有 preformed antibodies 的受贈者來說，是器官移植之前的重要關卡，其結果將會影響此受贈者是否能安全的獲得器官移植機會。在 UCSF 移植實驗室每位需進行實體交叉試驗的受贈者都必須同時執行兩個不同採檢日期的檢體，其目的在於可以確認臨床是否可能抽錯病患檢體、也可以確認此受贈者歷史檢體中有最高 cPRA 的檢體是否會有陽性結果，作為評估排斥風險的用途，同時也可以作為研究用檢體。因此，UCSF 實驗室的血清檢體儲存策略為 DTT 處理過的檢體保存 2 年，Bulk 檢體保存時間為無上限，這仰賴於實驗室有效率的檢體儲位系統以及特別設立的血清儲藏室空間。本院因移植檢驗組之空間較小，目前僅為符合 CAP 認證規定血清留存至少一年，若有更多儲存空間留存特殊檢體相信對於本院的研究、檢驗技術創新能夠有更長遠的幫助。

## 五、附錄

### (一)HLA CREG List(群體反應性群組表格)

<b>Cross-Reactive Groups (CREG) UCSF-ITL</b> 2024-08	
<b>CREG</b>	<b>HLA Specificities</b>
<b>A1</b>	<u>A1</u> , A3, A11, A29, A30, A31, A36, A80
<b>A2</b>	<u>A2</u> , A23(9), A24(9), A68(28), A69(28), B57(17), B58(17)
<b>A10</b>	A25(10), A26(10), A32, A33, A34(10), A43, A66(10), A74
<b>Bw4</b>	<u>Aw4</u> : <u>A23</u> , <u>A24</u> , <u>A25</u> , <u>A32</u> [I80]: B13, <u>B27:05</u> , B37, B44, B47 (short Bw4) [T80]: <u>B38</u> , <u>B49</u> , B51, B52, <u>B53</u> , B57, B58, B59, B63, B77 and <u>Aw4</u>
<b>B5</b>	B18, B35, B46, B49(21), B50(21), <u>B51(5)</u> , <u>B52(5)</u> , B53, B62(15), B63(15), B71(70), B72(70), B73, B75(15), B76(15), B77(15), B78
<b>Bw6</b>	B7, B8, B18, B22, <u>B27:08</u> , <u>B35</u> , <u>B39</u> , B3901, B3902, B40, B40:05, B41, B42, B45, B48, <u>B50</u> , B54, B55, B56, B60, B61, B62, B64, B65, B67, B71, B72, B75, B76, B78, B81, B82
<b>B7</b>	<u>B7</u> , B8, B13, B27, B41, B42, B47, B48, B54(22), B55(22), B56(22), B59, B60(40), B61(40), B67, B81, B82
<b>B8</b>	<u>B8</u> , B18, B38(16), B39(16), B59, B64(14), B65(14), B67
<b>B12</b>	B13, B37, B41, <u>B44(12)</u> , <u>B45(12)</u> , B47, B49(21), B50(21), B60(40), B61(40)
<b>C1</b>	<u>Cw1</u> , Cw7, Cw8, Cw9(3), Cw10(3), Cw12, Cw14, Cw16, <u>B46</u> , <u>B73</u>
<b>C2</b>	<u>Cw2</u> , Cw4, Cw5, Cw6, Cw15, Cw17, Cw18
<b>DR1</b>	DR1, DR10, DR103
<b>DR51</b>	DR51, DR15, DR16
<b>DR52</b>	DR52, DR11, DR12, DR13, DR14, DR17, DR18
<b>DR53</b>	DR53, DR4, DR7, DR9
<b>DQ1</b>	DQ5, DQ6
<b>DQ2</b>	DQ2
<b>DQ3</b>	DQ7, DQ8, DQ9
<b>DQ4</b>	DQ4
<b>DP1c</b>	DP2, DP3, DP4, DP6, DP9, DP10, DP11, DP14, DP17, DP18, DP20, DP28
<b>DP2c</b>	DP1, DP5, DP13, DP15, DP19, DP23

(二) UCSF 實驗室之 HLA 抗體報告格式參考圖與 DSA 趨勢圖範例



Lab Info: 000  
 Address: 000  
 Certificate: ASHI, CAP, etc.  
 Lab Director: 000

Patient Name: 000  
 DOB, Age, Gender: YYYY/MM/DD, M/F  
 Patient ID: 000  
 Category: Kidney, BMT, H/L, etc.  
 Report Date: YYYY/MM/DD  
 cPRA: \_\_%  
 0 Ag MM: \_\_%

Pre/Post Transplantation HLA Antibody Report

Patient HLA Typing:

	A	B	C	DRB1	DRB345	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Pt ID Name	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (oo:oo)	oo:oo	DQoo	oo:oo	oo:oo
	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (oo:oo)	oo:oo	DQoo	oo:oo	oo:oo

Donor HLA Typing:

	A	B	C	DRB1	DRB345	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
Donor ID Name	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (oo:oo)	oo:oo	DQoo	oo:oo	oo:oo
	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (oo:oo)	oo:oo	DQoo	oo:oo	oo:oo

Prior Allograft:

Date of Tx: YYYY/MM/DD Organ: Kidney, BMT, H/L, etc.

HLA type:

Aoo Aoo Boo Boo Cwoo Cwoo DRoo DRoo  
 DRwoo(oo:oo) DRwoo(oo:oo) DQAoo:oo  
 DQAoo:oo DQoo DQoo DPAoo:oo DPAoo:oo  
 DPBoo:oo DPBoo:oo

Antibody Test Results:

Sample Date: YYYY/MM/DD Test Date: YYYY/MM/DD

Test Description:

Class I Strong:

Moderate:

Weak:

Comments:

Unacceptable Antigens:

Class II Strong:

Moderate:

Weak:

Comments:

Unacceptable Antigens:

Most Recent Report:

Sample Date: YYYY/MM/DD Test Date: YYYY/MM/DD

Test Description:

Class I Strong:

Moderate:

Weak:

Comments:

Composite Antibodies:

Class II Strong:

Moderate:

Weak:

Comments:

Composite Antibodies:

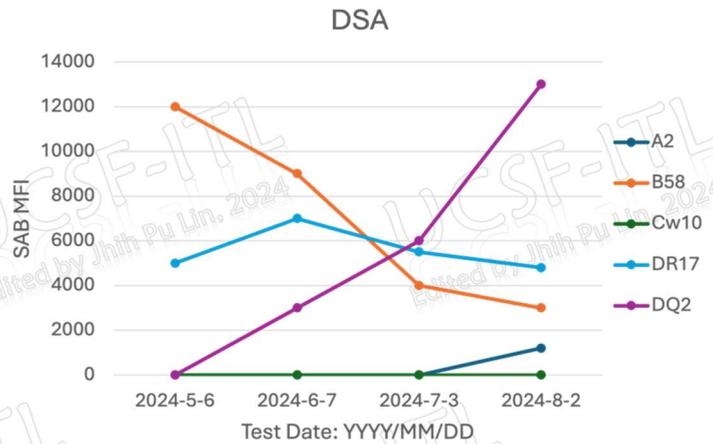


Lab Info: 000  
 Address: 000  
 Certificate: ASHI, CAP, etc.  
 Lab Director: 000

Patient Name: 000  
 DOB, Age, Gender: YYYY/MM/DD, M/F  
 Patient ID: 000  
 Category: Kidney, BMT, H/L, etc.  
 Report Date: YYYY/MM/DD  
 cPRA: \_\_%  
 0 Ag MM: \_\_%

### Pre/Post Transplantation HLA Antibody Report Donor-Specific Antigens and Antibodies

	Pre/Post	A2	B58	Cw10	DR17	DQ2
24/05/06	Pre	0	12000	0	5000	0
24/06/07	Pre	0	9000	0	7000	3000
24/07/03	Post	0	4000	0	5500	6000
24/08/02	Post	1200	3000	0	4800	13000



上圖圖表會自動帶出所有捐贈者與受贈者之 HLA Mismatch 型別，並記錄 DSA 的 MFI 強度供臨床參考。

在移植後第一次產生 de novo DSA 時，必須通知臨床端評估是否及時進行適當處置，以避免急性排斥風險。並且報告會新增以下備註，提醒臨床注意：The patient displays donor-specific HLA Class I/II antibodies, HLA-XX (MFI=XXX), against donor ID:XXX, Tx Date: YYYY/MM/DD, which indicates and increased risk of antibody-mediated rejection (AMR).

(三) UCSF 實驗室之 HLA Typing 報告格式參考圖



Lab Info: 000  
 Address: 000  
 Certificate: ASHI, CAP, etc.  
 Lab Director: 000

Patient Name: 000  
 DOB, Age, Gender: YYYY/MM/DD, M/F  
 Patient ID: 000  
 Category: Organ Tx, BMT, Disease  
 associate, PLT transfusion, etc.  
 Report Date: YYYY/MM/DD  
 cPRA: \_\_%  
 O Ag MM: \_\_%

HLA Typing Report

Patient HLA Generic Typing:

	A	B	C	DRB1	DRB345	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	TCE
Pt ID Name	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00
	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00

Patient HLA Serological Equivalent:

	A	B	C	DRB1	DRB345	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	TCE
Pt ID Name	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (00:00)	00:00	DQoo	00:00	00:00	00
	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (00:00)	00:00	DQoo	00:00	00:00	00

Donor HLA Generic Typing:

	A	B	C	DRB1	DRB345	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	TCE
Donor Name	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00
	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00:00	00

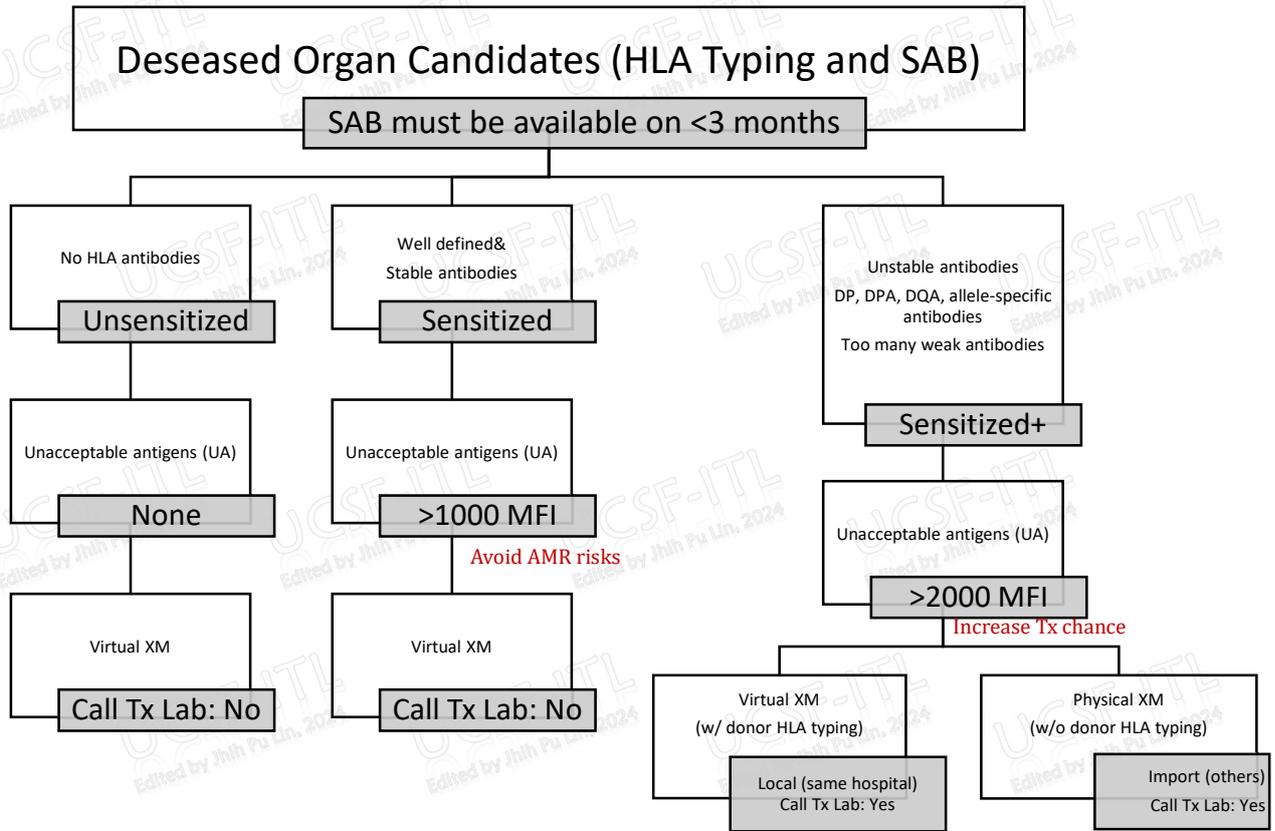
Donor HLA Serological Equivalent:

	A	B	C	DRB1	DRB345	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	TCE
Donor Name	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (00:00)	00:00	DQoo	00:00	00:00	00
	Aoo	Boo	Cwoo	DRoo	DRwoo (00:00)	00:00	DQoo	00:00	00:00	00

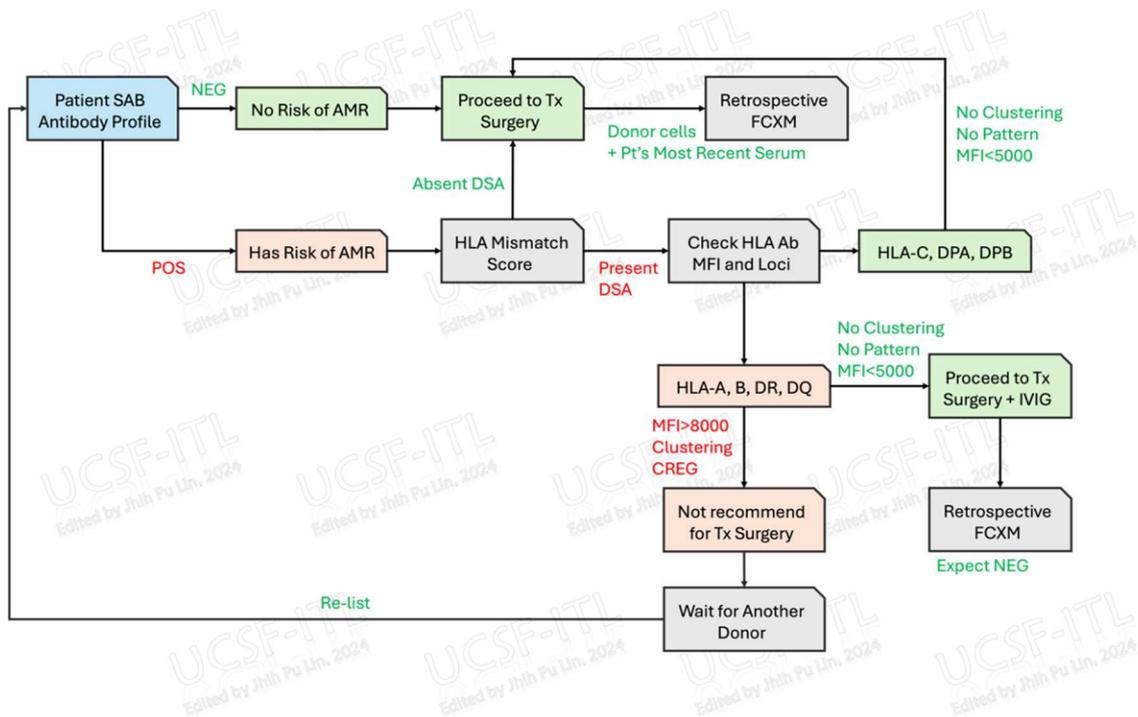
Match / Mismatch Score:    00    00    00    00    00    00    00    00    00

Comments:

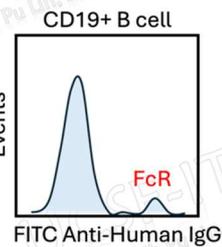
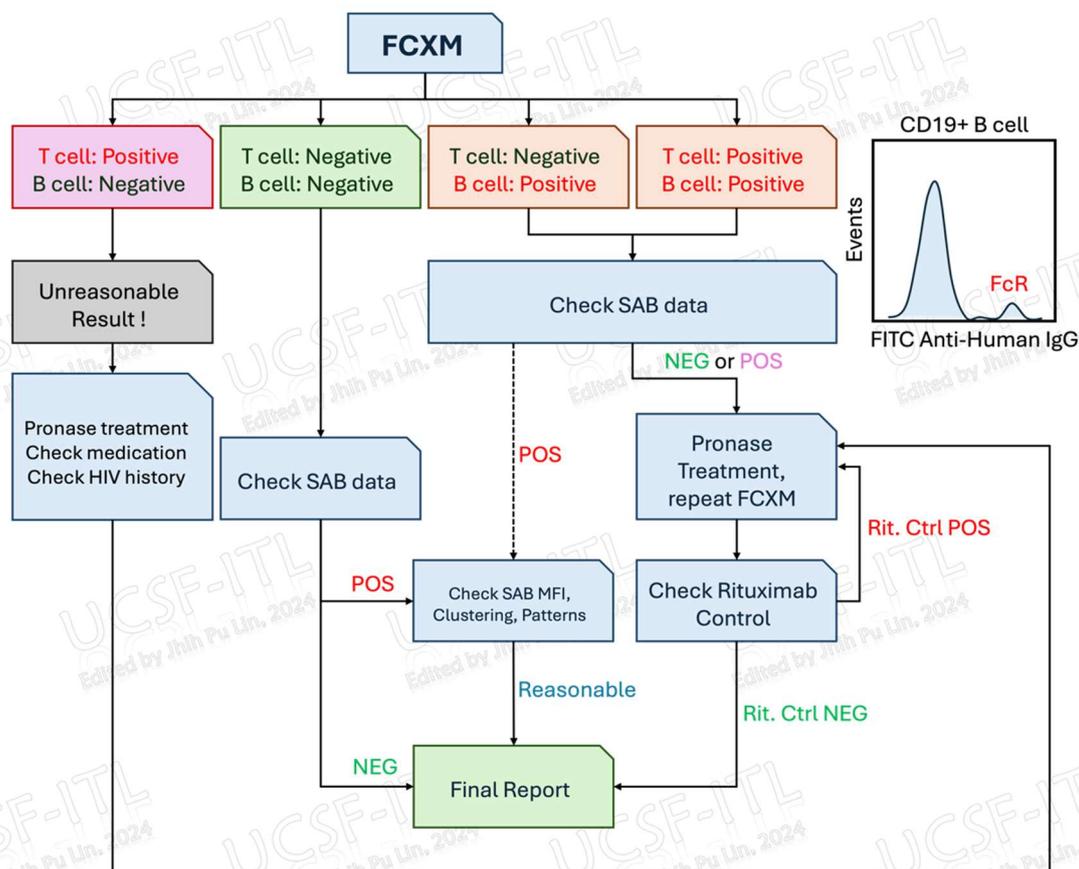
(四) 虛擬交叉配對與實體交叉配對之策略



(五) 虛擬交叉配對之分析流程圖



(六) 流式細胞儀交叉配對檢驗之結果判讀與血清處理流程圖

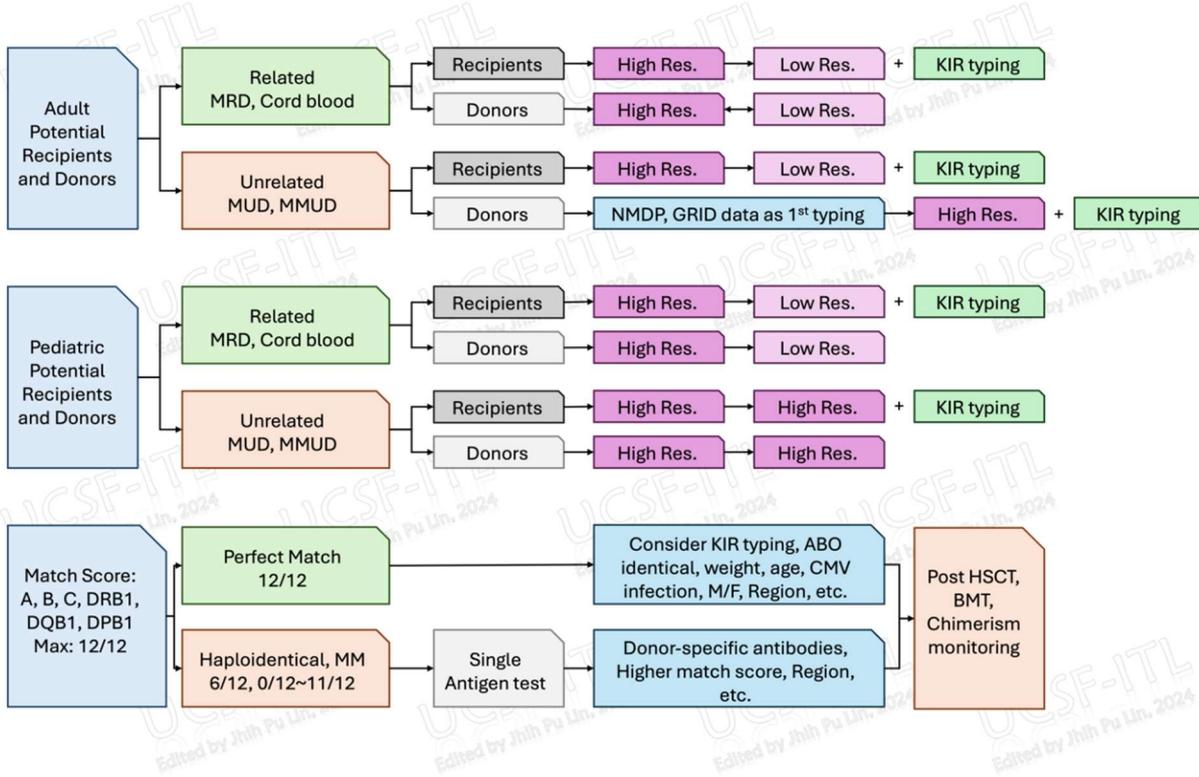


In some situation the T cells MCS will increase after Pronase treatment.  
Thus T pos./B neg. result can be accepted if the patient is HIV Positive.

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. doi:10.1016/j.humimm.2016.04.014

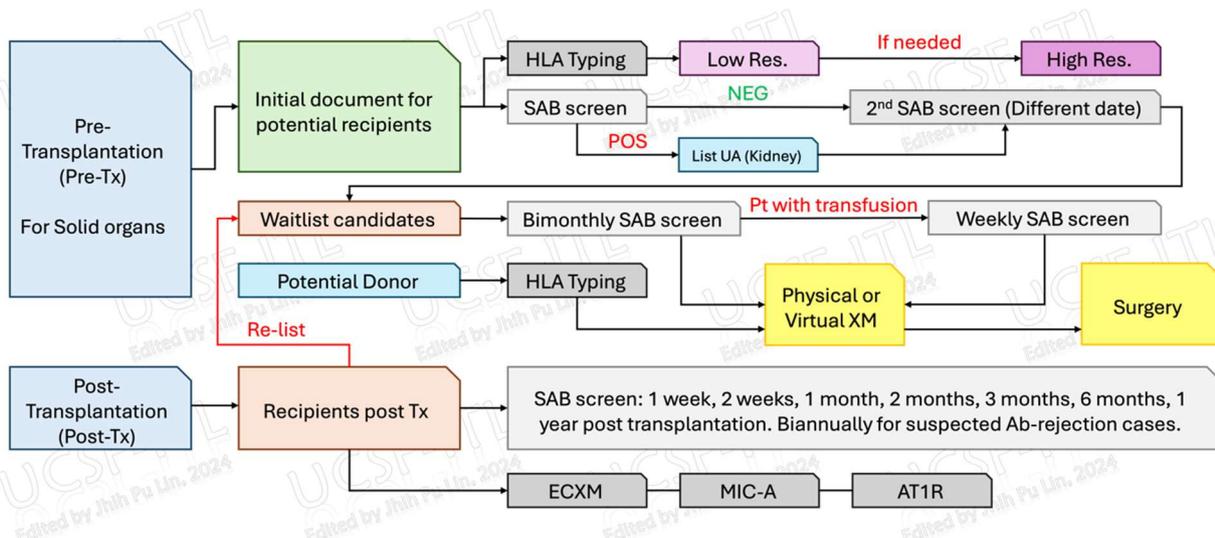
Apithy MJ, Desoutter J, Gicquel A, et al. Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results. *HLA.* 2017;90(3):157-164. doi:10.1111/tan.13073

(七)UCSF 骨髓移植之評估與檢驗流程

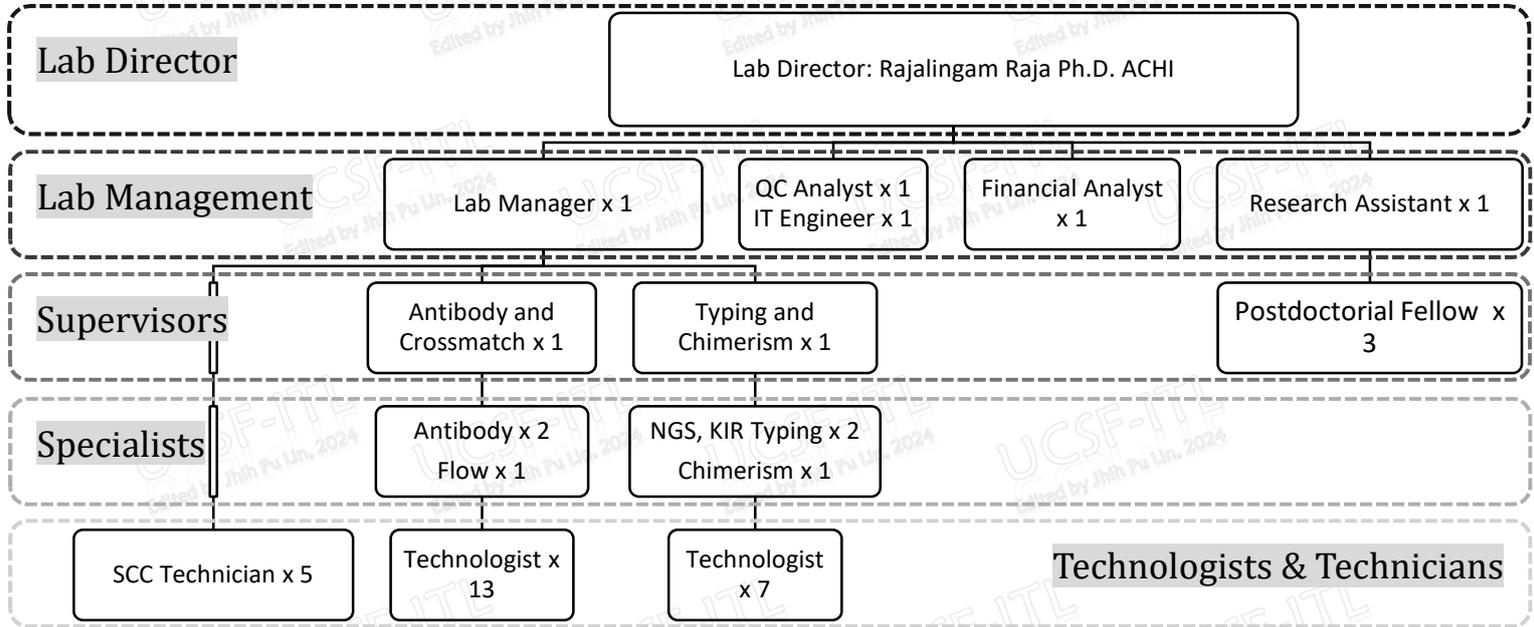


骨髓移植在 2024 年目前僅計算 A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 共六個 Loci，共計 match score 至多 12/12 分、最少 0/12 分。

(八)UCSF 器官移植之檢驗流程圖



(九)2024 年 UCSF-ITL 之人力配置圖、ASHI 移植檢驗人員資格規定、常規檢體量統計



Positions	Qualifications	Roles and Permission
Lab Director	Ph.D./Sc.D., 15 years experience	Goal setting, Virtual XM, lab management
Lab Manager	BS degree, 15 years experience	Lab management, Methods validation, HR hiring
Supervisor	BS degree, 10 years experience	Reports sign-off, HR management, QS control
Specialist	BS degree, 5 years experience	Data analysis, reports sign-off, QC matrix
Technologist	BS degree, 1 year experience	Tests execution, data analysis
Postdoc.	Ph.D./Sc.D. degree	Clinical research projects, new methods validation

\*Trainee takes 13 months and passes the exam to get qualification to execute histocompatibility tests.

Sample types	Purposes	Frequencies and Cases	Turn-around time
Clot serum	SAB, Luminex PRA, FCXM	60~100 cases/day	5 days, STAT 3 days
ACD tubes	HLA Typing, chimerism, FCXM	15~25 cases/day	5 days, STAT 3 days
Buccal swab	HLA Typing	5~10 cases/day	5 days, STAT 3 days
Deceased donor ACD	STAT RT HLA Typing, FCXM	2~3 cases/day	Typing: 6 hrs FCXM: 6 hrs

## 六、 進修過程圖像紀錄

### (一) 抗體檢驗之自動化儀器與分析儀器

照片	內容說明
	<p>One Lambda LabXpress</p> <p>本機台為全自動進行 One lambda 產品之檢驗儀器，使用者僅需放入分配好檢體之 96 孔盤、所需之試劑以及緩衝液，即可交由電腦操作所有步驟。其功能包含移液手臂、熱循環儀、離心機、反應盤震盪、清洗、Luminex 3D 分析儀之自動上機等功能，可以減少人工操作的誤差。目前 UCSF-ITL 共有兩台，消化每日大於 100 支的抗體鑑定檢體。</p>
	<p>PerkinElmer JANUS</p> <p>本機台為客製化的全自動檢驗儀器，使用者僅需放入分配好檢體之 96 孔盤、所需之試劑以及緩衝液，即可交由電腦操作所有步驟。其功能可以經由電腦設定以符合不同實驗條件，目前 UCSF-ITL 使用此自動化平台進行 Immucor PRA 反應以及 CareDX NGS 檢驗之 Library 準備，其功能包含移液手臂、序列稀釋、熱循環儀、過濾清洗、磁座、反應盤震盪、避光室等客製化功能。目前實驗室擁有兩台執行 PRA 以及 NGS 檢驗。</p>

## (二)NGS HLA 分型檢驗之自動化儀器與分析儀器

照片	內容說明
 A photograph of an Illumina MiSeq sequencing system. It includes a white MiSeq instrument with a black front panel, a computer monitor displaying a software interface, a keyboard, and a mouse. A green sticky note with the letter 'D' is attached to the monitor. The instrument has a QR code and 'MiSeq' branding on its side.	<p>Illumina MiSeq 此為 Illumina MiSeq 次世代定序儀，目前 UCSF-ITL 共有五台以消化每日的 HLA Typing 檢體、Chimerism 檢體。</p>
 A photograph of a Qubit 3 Fluorometer, a handheld DNA quantification device. It is white with a black screen and a keypad. The device is labeled 'Qubit 3 Fluorometer' and 'Invitrogen'. A 'Qubit 3' label is also visible. Below the device, a 'QUBIT LOG' sheet is partially visible, with text including 'IMMUNOGENETICS & TRANSPLANTATION LAB' and 'UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO'.	<p>Qubit 定量儀 Qubit 定量依然是 NGS 檢驗的一個重要步驟(或是使用 real-time PCR 定量)，精確的 DNA 定量可以避免在進行次世代定序時 Clusters density、Q30、Passing filter 等參數產生異常結果的狀況，是個避免後續試劑浪費的重要步驟。</p>



#### DynaMag Magnetic Stand

此為 Thermo fisher 廠牌之磁座，作為手工進行 NGS library preparation 使用之磁座。



#### Thermo NanoDrop One

此為 Pre-PCR 實驗室使用之分光光度計，具有詳細 DNA 品質曲線紀錄的功能，維護容易、結果準確。



#### QIAGEN EZ1 Advanced XL

全自動核酸萃取儀，此萃取儀使用個別包裝設計且檢驗人員無需拆除包裝以避免污染的風險，且其所需時間一隻檢體僅需 20 分鐘，在執行緊急待命檢體時可有效爭取時間。

(三) 交叉配對檢驗所使用之自動化儀器與分析儀器

照片	內容說明
	<p>可調整式電動八爪分注器</p> <p>此電動八爪可因應不同孔數的反應盤而調整吸管尖間距，以符合不同情況下使用，如 UCSF-ITL 之緊急待命 HLA Typing 為使用 384 孔盤之 real-time PCR 反應、NGS 使用 48 孔盤、流式細胞儀交叉配對使用 96 孔盤，可以調整間距後方便檢驗人員操作。</p>



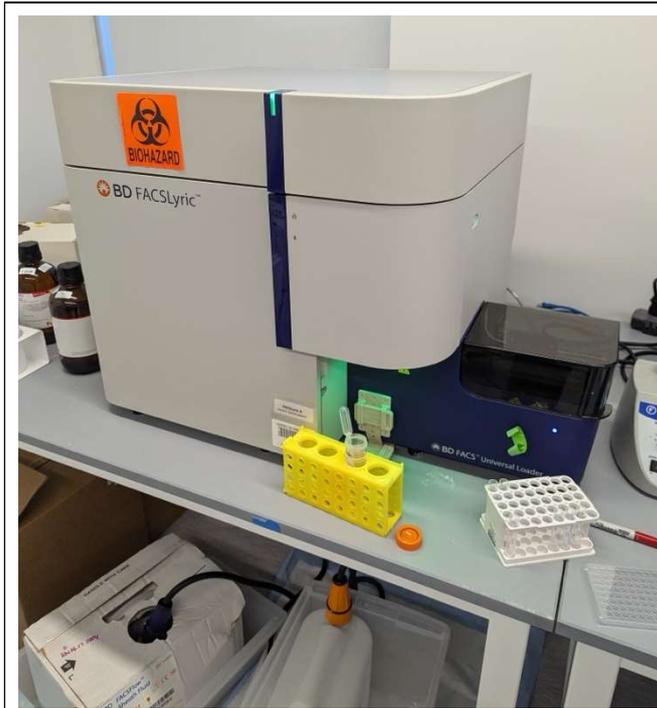
### RoboSep-S 全自動細胞分離儀器

此全自動細胞分離儀器配合 EasySep 之細胞分離試劑使用，將檢體與所需試劑放入之後即可全自動化分離周邊血淋巴球，且比起手工方法其操作時間僅 20 分鐘。此儀器本身還有零件共用的優點，儀器所適用的磁座與手工操作方法使用的磁座一樣，在萬一儀器發生故障時，能夠繼續將磁座取出以完成後續步驟。

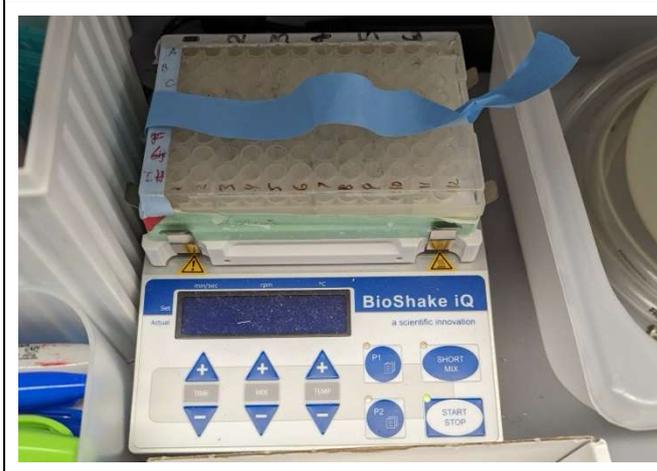


### Orflo Moxi V Cell Counter

全自動細胞計數儀器，此儀器使用 microfluid 技術可以在經過兩分鐘的染劑染色後，於 10 秒內計數細胞並提供結果，同時也有分辨活細胞與死亡細胞的功能，也能夠經由人工調整 gating 以避免有時候儀器出錯的狀況。此儀器可避免不同人員進行計數間的差異、比起使用流式細胞儀計數的時間也大大縮短。



**BD FACSLyric 流式細胞儀**  
 此機型為臨床特化之流式細胞儀，其軟體設計相較於研究用軟體 FACS Diva 較為簡單與直覺，體積也比起前一代系統 FACS Canto 減少約 1/3，同時配備新一代的 High-throughput(HTS)上樣系統可以大大縮短上樣時間，以節省緊急待命檢體的等待時間。其優點還有使用自動上樣針、可達到 35000 events/秒之上樣速度、使用符合臨床認證規範之軟體等優點。



**BioShake iQ 高速恆溫振盪器**  
 此振盪器具有恆溫功能並且提供各式 adaptor 供實驗室需求使用，在進行 FCXM 與 SAB 檢驗時，恆溫震盪對於提升檢驗的靈敏度有其幫助，目前此震盪步驟是 UCSF-ITL 執行抗體相關檢驗的必要步驟。

**(四) 實驗室主管、專家與 HLA 專門醫檢師合影**

照片	內容說明
----	------



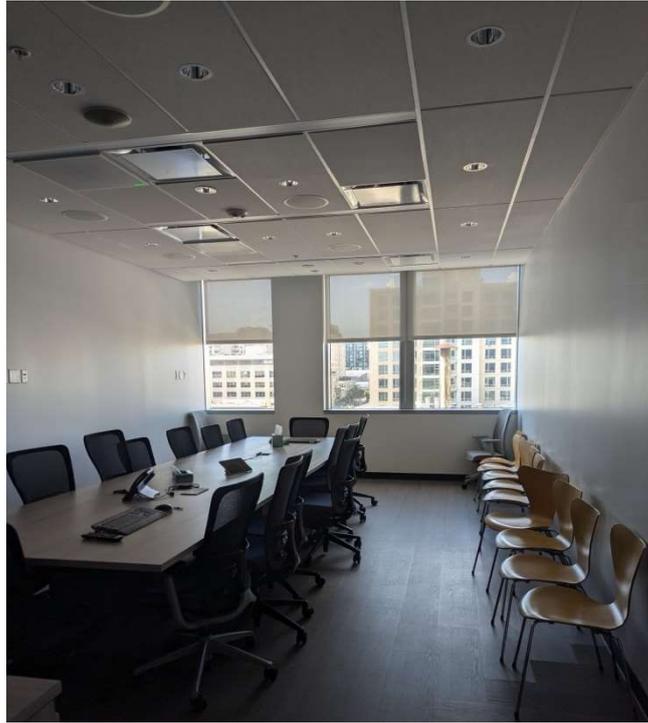
進修實驗室之成員包含主管、專家、醫檢師、研究員與檢體處理人員合照。



與實驗室負責人 Dr. Raja 合影。

(五) 實驗室之空間圖像紀錄

照片	內容說明
 <p>The photograph shows a modern lobby area. On the left, a blue wall features the UCSF logo in a stylized font. Below the logo, the text 'Immunogenetics &amp; Transplantation Laboratory' is displayed in a clean, sans-serif font. To the right of the text, a small sign reads '638 Send-Out Room'. In the foreground, a round white table holds a potted plant with white orchids and red flowers. Two beige leather chairs are positioned on either side of the table.</p>	<p>UCSF-ITL Lobby          因業務需求目前 UCSF-ITL 租下位於 1100 Van Ness Ave. 上的 Campus medical office building 共兩層，一層作為實驗室與辦公室用途、一層作為血清與核酸保存室。</p>
 <p>The photograph shows a long, brightly lit hallway. On the right side, there is a long wall of white lockers with silver handles. On the left side, there are glass-walled offices. The floor is made of light-colored wood. The hallway leads to a bright area at the end, possibly a window or an exit.</p>	<p>Administrative Office          行政辦公室，為實驗室主管群、行政人員以及 Client Service 人員的辦公室。</p>



### Conference Room

會議室，作為接待外賓、繼續教育訓練、主持會議與每個月例行品管會議、組會之場地。



### Break Room

員工休息室，提供咖啡、茶飲、飲水、食物儲存冰箱的休息室。同時聖誕節也會有特別舉辦活動增進員工之間情誼。



#### Data Analysis Room

HLA Typing 與 HLA 抗體相關的報告必須經由軟體分析、醫檢師分析、專家分析與審核後發出，此辦公室配有個人電腦供醫檢師分析報告使用。



#### Pre-PCR Preparation Room

PCR 前區之準備室，配備有有無塵衣、手套等個人防護設備，並且有特定檢體通道將配置好的反應盤送至 PCR 實驗室。



#### Pre-PCR Room

PCR 前區實驗室，配有四台自動化核酸萃取儀、三台分光光度計供備用使用，提供 DNA 萃取空間、PCR 反應盤與試劑配置等功能。



### PCR Room

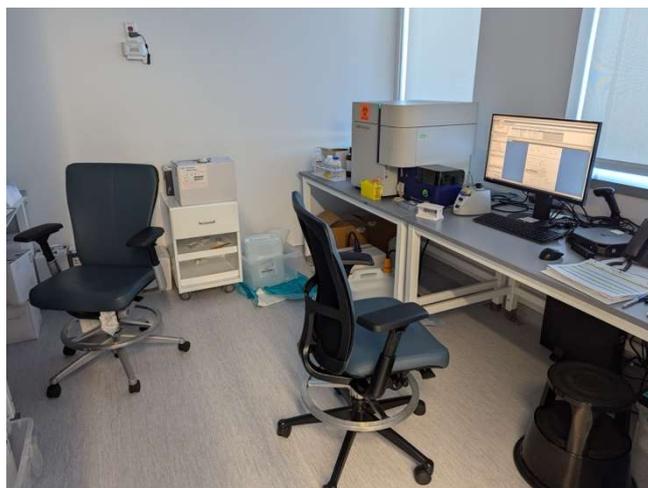
執行 PCR 反應之空間，配有多部熱循環儀供檢驗使用。



### Serology Room

血清處理實驗室，執行所有血清前處理、分裝、試劑配置、交叉配對試驗之空間，配有多種離心機以及化學操作櫃。

同時也有一部分是即時熱循環儀操作區，為了因應每天龐大的緊急 HLA Typing 待命檢體，配有四台即時熱循環儀。



### Flow Cytometry Room

流式細胞儀實驗室，配有兩台 BD FACSLytic 流式細胞儀，供流式細胞儀交叉配對檢驗、Chimerism、Lymphocyte Subsets 實驗與研究使用。



### Post PCR Room

執行 PCR 結束後的實驗步驟，共有 5 台 MiSeq 次世代定序儀、製膠系統、成像系統以及自動化手臂等儀器。



### Antibody Room

抗體鑑定檢驗實驗室，配有兩台 LabXpress、四台 Luminex 3D 以及其他自動化儀器，供消化每天大量的抗體鑑定檢體。



### Liquid Hydrogen Storage

美國因為地廣、不像臺灣都能及時快速的取得捐贈者細胞檢體，因此會凍存捐贈者細胞、內皮細胞以及例如淋巴結、脾臟組織供要進行交叉配對檢驗時使用。

## 七、 參考文獻

1. 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
2. Sullivan HC, Liwski RS, Bray RA, Gebel HM. The Road to HLA Antibody Evaluation: Do Not Rely on MFI. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1455-1461. doi:10.1111/ajt.14229
3. Gebel HM, Bray RA. HLA antibody detection with solid phase assays: great expectations or expectations too great?. *Am J Transplant*. 2014;14(9):1964-1975. doi:10.1111/ajt.12807
4. Parham, Peter et al. "The HLA-B\*73 antigen has a most unusual structure that defines a second lineage of HLA-B alleles." *Tissue antigens* 43 5 (1994): 302-13 .
5. Voorter CE, van der Vlies S, Kik M, van den Berg-Loonen EM. Unexpected Bw4 and Bw6 reactivity patterns in new alleles. *Tissue Antigens*. 2000 Oct;56(4):363-70. doi: 10.1034/j.1399-0039.2000.560409.x. PMID: 11098937.
6. 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;9:943502. Published 2022 Sep 16. doi:10.3389/fmed.2022.943502
7. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads-a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*. 2011;92(5):510-515. doi:10.1097/TP.0b013e31822872dd
8. Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, Chaudhry AN, Taylor CJ. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation*. 2009;87(6):813-820. doi:10.1097/TP.0b013e318199c581
9. Crocchiolo R, Zino E, Vago L, et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114(7):1437-1444. doi:10.1182/blood-2009-01-200378
10. Fleischhauer K. Selection of matched unrelated donors moving forward: from HLA allele counting to functional matching. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019;2019(1):532-538. doi:10.1182/hematology.2019000057
11. Pende D, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol*. 2019;10:1179. Published 2019 May 28. doi:10.3389/fimmu.2019.01179
12. Rajalingam R. The Impact of HLA Class I-Specific Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptors on Antibody-Dependent Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity and Organ Allograft Rejection. *Front Immunol*. 2016;7:585. Published 2016 Dec 19. doi:10.3389/fimmu.2016.00585
13. Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, et al. KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 2017;35(20):2268-2278. doi:10.1200/JCO.2016.70.7059

14. Apithy MJ, Desoutter J, Gicquel A, et al. Pronase treatment improves flow cytometry crossmatching results. *HLA*. 2017;90(3):157-164. doi:10.1111/tan.13073
15. Bearden CM, Agarwal A, Book BK, et al. Pronase treatment facilitates alloantibody flow cytometric and cytotoxic crossmatching in the presence of rituximab. *Hum Immunol*. 2004;65(8):803-809. doi:10.1016/j.humimm.2004.06.001
16. Sood P, Hariharan S. Anti-CD20 Blocker Rituximab in Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2018;102(1):44-58. doi:10.1097/TP.0000000000001849
17. Alheim M, Wennberg L, Wikström AC. Pronase independent flow cytometry crossmatching of rituximab treated patients. *Hum Immunol*. 2018;79(2):132-135. doi:10.1016/j.humimm.2017.11.006
18. Brown NK, Meade JR, Wang J, Marino SR. Reanalysis of the role of pronase treatment of B cells in the flow cytometric crossmatch assay: Fc receptor is not the primary target. *Hum Immunol*. 2017;78(11-12):704-709. doi:10.1016/j.humimm.2017.10.002
19. 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
20. Glotz D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. Endothelial cells as targets of allograft rejection. *Transplantation*. 2006;82(1 Suppl):S19-S21. doi:10.1097/01.tp.0000231348.55262.5a