

ARTIGO ORIGINAL

Impacto Clínico de Anticorpos Anti-HLA Específicos Pré-Formados Contra Doador no Transplante Renal

Renata Barretto Lins Gabriel¹, Alexandre de Holanda Cavalcanti Pinto¹, Frederico Castelo Branco Cavalcanti¹

Setor de Transplante Renal - Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco ¹

RESUMO

Fundamentos: A rejeição humoral (RMA) afeta 20 a 30% dos transplantados renais, resultando em redução da sobrevida do enxerto. Ensaios com metodologia Luminex permitiram a detecção de anticorpos Anti-HLA em títulos muito baixos e com relevância clínica controversa. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de anticorpos, pré-formados contra moléculas HLA do Doador (DSA), detectados por Luminex, na incidência de Rejeição aguda, RMA, taxa de filtração glomerular (TFG) e na sobrevida do paciente e do enxerto.

Método: Análise de 164 pacientes transplantados de outubro de 2016 à outubro de 2017, estratificados em 2 grupos: 136 sem DSAs e 28 com DSAs pré-formados, de até 5000 MFI.

Resultados: Não houve diferença, entre os 2 grupos, na incidência de Rejeição Aguda em 3 e 6 meses, independente do mecanismo aloimune, bem como, na sobrevida do enxerto e do paciente, com $p=0,543$ e $p=0,381$, respectivamente. A TFG média ao final de 6 meses, foi maior nos pacientes com DSA pré-transplante, com clearance de 79 e 62,5ml/min/1,73m², respectivamente ($p<0,05$). A presença do DSA não constituiu risco para perda do enxerto em até 6 meses do transplante, com p de 0,999. Valores de MFI dos DSAs pré-formados, não foram bons preditores de perda do enxerto (AUC 0,497, $p=0,976$).

Conclusão: DAS pré-transplante contra antígenos HLA Classe I e/ou Classe II, detectado pela metodologia Luminex, em valores inferiores a 5000 MFI, não teve impacto na incidência de RMA, independente do mecanismo aloimune, tampouco nas sobrevidas do paciente e do enxerto renal, nos primeiros 6 meses de transplante.

Palavras-chave: Transplante Renal. Rejeição Mediada por Anticorpo. DAS. Luminex single antigen bead assay. Anticorpos Anti HLA.

INTRODUÇÃO

O Transplante Renal é o tratamento de escolha para a grande maioria dos pacientes portadores de Doença Renal Terminal, com expressivo incremento na qualidade e expectativa de vida, além de superior custo efetividade em relação à diálise crônica^{1,2}. No entanto, essa terapêutica consegue atender, apenas, 10% da demanda na maior parte dos países³.

No Brasil, a incidência de pacientes mantidos em diálise crônica vem crescendo em torno de 8% ao ano. Estima-se que, aproximadamente, 122.000 pacientes

estejam sendo mantidos em hemodiálise, com uma necessidade de 11.445 transplantes de rim por ano, segundo dados da ABTO (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos)⁴.

A necessidade de infraestrutura e de equipes altamente especializadas para a realização dos transplantes, a insuficiente disponibilidade de doadores de órgãos e o crescente número de pacientes em terapia dialítica, resultam em um progressivo desequilíbrio entre a oferta e a demanda, com conseqüente aumento no número de

Autor Correspondente:

Renata Barretto Lins Gabriel.

Endereço: Av. Agamenon Magalhães N° 4760

CEP 52010-075 - Recife - PE

E-mail: renata_blg@hotmail.com

pacientes em lista aguardando um transplante renal.

A realização de transplantes com receptores de maior risco imunológico, bem como transplantes de doadores expandidos, são estratégias primordiais para o aumento do número de transplantes, com consequente expansão do programa de Transplante Renal no Brasil e no mundo.

A barreira imunológica conferida pelas moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigens*) é o principal fator limitante para o sucesso do transplante renal⁵. Os testes utilizados para detecção desses anticorpos dirigidos contra moléculas HLA vêm evoluindo e são responsáveis pela maior sobrevida e menores taxas de rejeição aguda vistas atualmente⁶.

A introdução da metodologia Luminex para a detecção de anticorpos anti-HLA, teve um enorme impacto no processo de tomada de decisão em relação à seleção de doadores para pacientes sensibilizados, uma vez que são os testes de maior sensibilidade e especificidade para detecção desses anticorpos^{7,8}. No entanto, ao mesmo tempo que permitiu a detecção de anticorpos anti-HLA em títulos muito baixos, adicionou complexidade a equação de risco imunológico: como aumentar a segurança e sobrevida dos transplantes renais sem restringir ainda mais o acesso dos pacientes a essa terapia?

Estudos mostram que a presença de DSAs pré-formados, detectados por *Luminex Single Antigen Bead Assays* (Luminex SAB)⁹, foram associados a um risco de 55% de RMA, com uma sobrevida de aloenxerto censurada por óbito de 20% em 5 anos após o transplante, mostrando que, apesar de todos os avanços no desenvolvimento de regimes imunossuppressores eficazes no transplante renal, a disfunção crônica do aloenxerto continua sendo um grande problema e a RMA contribui para o desenvolvimento dessa entidade¹⁰. Ao mesmo tempo, a

ausência desses DSAs foi associada a um baixo risco de RMA clínica e subclínica precoce¹¹. Dessa forma, presume-se a utilidade do Luminex como ferramenta adicional de avaliação de risco pré-transplante e na alocação de órgãos, no entanto, a quantificação dos DSAs em MFI ainda é incerto quanto ao valor preditivo positivo para rejeição aguda mediada por anticorpos¹².

Definir qual valor de MFI para um DSA é aceitável (“*Acceptable Mismatches*”) com segurança para o receptor, atingindo o equilíbrio entre adesão máxima de pacientes candidatos ao transplante renal e mantendo uma segurança aceitável na incidência de rejeição e consequente melhor sobrevida do enxerto, representa o grande desafio de todos os serviços transplantadores. As limitações dos testes imunológicos disponíveis, as diferenças de resultados nos diferentes estudos ao longo dos anos, a possibilidade de que possa existir “*cut offs*” diferentes de MFI para diferentes desfechos clínicos, são algumas das dificuldades a serem superadas.

Baseado nessa estratificação de risco, a equipe de transplante renal do Real Hospital Português (RHP), a partir de 2016, expandiu seus critérios de elegibilidade, passando a realizar transplantes de risco imunológico maior, em receptores com DSAs de até 5000 MFI em soro histórico ou atual.

O objetivo deste estudo observacional, unicêntrico, prospectivo histórico, realizado no RHP foi avaliar o impacto de DSAs pré-formados contra moléculas HLA, detectados por Luminex-SAB, na incidência de Rejeição aguda, RMA aguda, sobrevida do paciente e do enxerto, e na função do enxerto renal de pacientes transplantados com prova cruzada negativa por CDC, baseado nos novos critérios de elegibilidade imunológica do Real Hospital Português. Esse estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do RHP.

MÉTODOS

Realizamos um estudo de Coorte, prospectivo histórico, de centro único com pacientes transplantados renais, de doadores falecidos e/ou vivos, na Unidade de Transplante Renal do Real Hospital Português (RHP), Recife-PE, durante o período de outubro de 2016 até outubro de 2017, mediante resultado negativo da prova cruzada do soro do receptor contra linfócitos totais do doador (Microlinfotoxicidade Dependente de Complemento - CDC-AGH).

Os critérios de inclusão foram a disponibilidade dos resultados de PRAc (Reatividade contra Painel calculado) para antígenos HLA classe I e II pré-transplante do receptor, tipagens HLA do receptor e doador, e seguimento ambulatorial por no mínimo de seis meses, salvo exceção de morte ou perda do enxerto. Foram excluídos os pacientes hipersensibilizados (PRAc \geq 80%) e priorizados para transplante renal pela portaria exclusiva da Secretaria de Saúde de Pernambuco, mas que não tinham DSA em soro histórico ou atual.

Objetivos do Estudo

O objetivo primário foi avaliar a incidência de Rejeição Aguda do Enxerto e RMA nos primeiros três e seis meses de transplante. Secundariamente, analisamos a Sobrevida do Enxerto, Sobrevida do Paciente e a análise da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) ao final do sexto mês de transplante.

Grupos de Estudo

Foram realizados 176 transplantes renais em nosso serviço nesse período de outubro de 2016 a outubro de 2017. Seis pacientes evoluíram com óbito no pós-operatório imediato por complicações

cirúrgicas, sendo excluídos do trabalho. Dos 170 pacientes, 6 foram excluídos por terem sido transplantados pelo protocolo do Hipersensibilizado, recebendo imunossupressão padrão do protocolo, mesmo não tendo DSA.

Dessa forma, 164 pacientes foram incluídos, sendo o Grupo 1 composto por 136 receptores sem DSA pré-formado, independente do PRAc (Grupo Sem DSA - Controle), e o Grupo 2 formado por 28 pacientes com PRA diferente de zero e com DSA (Grupo com DSA \geq 1500 MFI e $<$ 5000 MFI).

O Grupo 1 utilizou terapia de indução com Thymoglobulina 3mg/kg e terapia de manutenção com inibidor de calcineurina (Tacrolimos), inibidor da mTOR (Sirolimos ou Everolimos) e prednisona. Já o Grupo 2, recebeu indução com Thymoglobulina 6mg/kg dividido em 3 doses (dias alternados) associado a terapia de manutenção com inibidor da calcineurina (Tacrolimos), micofenolato de sódio e prednisona. Mudanças, quanto a terapêutica de manutenção, ocorreram de acordo com julgamento do médico assistente, em decorrência efeitos colaterais das drogas utilizadas ou falha terapêutica, porém, analisados por intenção de tratamento.

Reatividade Contra Painel (PRA)

O Painel calculado (PRAc) é obtido pela frequência das especificidades HLA-A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 contra as quais são detectados anticorpos no Luminex SAB Classe I e II, com reação apresentando MFI \geq 1500. Essa frequência é verificada em um “pool” de doadores falecidos tipificados, em nosso Laboratório de Histocompatibilidade. Nos casos de LABScreen® Mixed negativo, o PRAc foi considerado 0% (Grupo 1 - Controle).

Definição de Rejeição Aguda do Enxerto

Consideramos rejeição aguda todo processo inflamatório secundário à ativação aloimune e classificado segundo “score” de Banff, comprovado por biopsia, nos primeiros 3 meses.

Diagnóstico de Rejeição Mediada por Anticorpos

O diagnóstico de RMA é baseado na Classificação de Banff (2017), que contempla a presença de DSAs, associada à histologia compatível. A evidência de interação do DSA com o endotélio do aloenxerto, sendo em nosso caso, representado pela presença de C4d, seja por imunofluorescência (IF) em congelados frescos ou por imunohistoquímica (IHC) em tecido embebido em parafina (16), não era condição imprescindível para o diagnóstico.

Detecção de Anticorpos Anti-HLA (DSA)

O soro atual dos pacientes foi testado pelo kit de *screening* para detecção de Anticorpos Anti-HLA utilizando o kit comercial LABScreen® Mixed (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) e também pelo kit comercial LABScreen® Single Antigen (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) para classe I e II, em plataforma Luminex®, com a finalidade de determinar a especificidade dos anticorpos detectados no soro.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos dados, considerando um p -valor $<0,05$. As variáveis categóricas foram expressas por meio de suas frequências e porcentagens, para análise de associação entre elas,

utilizou-se o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, considerando significativo o p -valor $<0,05$. Para avaliar a diferença da distribuição dos dados numéricos entre os grupos, utilizou-se a Anova, para dados paramétricos e o teste de Kruskal Wallis para os dados não-paramétricos. Para avaliar a diferença da distribuição dos dados entre os dois grupos, utilizou-se o teste t de Student para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os dados não-paramétricos, considerando significativo o p -valor $<0,05$. Na análise das sobrevidas do paciente e do enxerto foi utilizada a curva de sobrevida de Kaplan-Meier e o teste de log-rank para a análise de diferença de sobrevida entre os grupos, considerando significativo o p -valor $<0,05$. Para avaliação da taxa de filtração glomerular, estimamos o clearance de creatinina a partir da fórmula CKD-EPI e utilizamos o box plot para representação gráfica da comparação entre os grupos. Na análise dos fatores de risco para perda do enxerto foi realizada a análise multivariada de Cox e admitimos um $p < 0,05$ como significativo. No nosso trabalho o Software utilizado foi R-project 3.4.2.

RESULTADOS

Quanto ao perfil demográfico (Tabela 1), observamos uma maior incidência de infecções por citomegalovírus, número de eventos sensibilizadores e tempo em hemodiálise prévio ao transplante, nos pacientes do Grupo 2 (Com DSA), quando comparados aos receptores do Grupo 1 (Sem DSA). Não observamos diferença estatística entre os grupos em relação a incidência ou tempo em DGF.

Tabela 1: Perfil demográfico dos Grupos 1 e 2

| Variáveis | G1 sem DSA (n=136) | G2 com DSA (n=28) | p-valor |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|---------|
| Idade | | | |
| Média±DP (Mín - Máx) | 47 ± 13,8 (16 - 79) | 48,4 ± 12,7 (23 - 71) | 0,739 |
| T. TRS (meses) | | | |
| Média±DP (Mín - Máx) | 49,5 ± 46,4 (0 - 288) | 73,7 ± 49,6 (13 - 192) | 0,001 |
| Sensibilização | | | 0,018 |
| Gestação | 27 (19%) | 13 (44,4%) | |
| Hemotransfusões | 32 (22,5%) | 13 (48,1%) | |
| Transplantes Pr | 6 (4,2%) | 3 (11,1%) | |
| T.DGF (dias) | | | |
| Média±DP (Mín - Máx) | 9,3 ± 9,8 (0 - 43) | 8 ± 7 (0 - 22) | 0,831 |
| DGF | 105 (73,9%) | 21 (74,1%) | 0,989 |
| Tratamento para CMV | 31 (21,8%) | 17 (63%) | <0,001 |
| Classificação Doador | | | |
| DCS | 128 (81%) | 26 (92,6%) | 0,307 |
| DCE | 4 (15,5%) | 0 (0%) | |
| Doador Vivo | 4 (3,5%) | 2 (7,4%) | |

DP= Desvio Padrão; T = Tempo; Pr = Prévio

A incidência de Rejeição Aguda do Enxerto nos primeiros 3 meses, bem como RMA nos primeiros 3 e 6 meses, entre os dois grupos, não foi diferente entre os pacientes com e sem DSA (Tabela 2). Da mesma forma, a sobrevida do enxerto (Figura 1) e do paciente (Figura 2) entre os dois grupos, não mostrou relevância estatística, com $p=0,543$ e $p=0,381$, respectivamente.

Tabela 2: Incidência de Rejeição entre os grupos com e sem DSA pré-transplante renal

| Variáveis | G1 sem DSA (n=136) | G2 com DSA (n=28) | p-valor |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|---------|
| RMA 3 meses | | | 0,999 |
| Não | 136 (100%) | 27 (96,4%) | |
| Sim | 0 (0%) | 1 (0%) | |
| RMA 6 meses | | | 0,999 |
| Não | 136 (100%) | 27 (96,4%) | |
| Sim | 0 (0%) | 1 (0%) | |
| Rejeição Aguda (3 meses) | | | 0,325 |
| Não | 121 (89,4%) | 22 (81,5%) | |
| Sim | 15 (10,6%) | 6 (18,5%) | |

Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida do enxerto (Grupos:1 e 2)

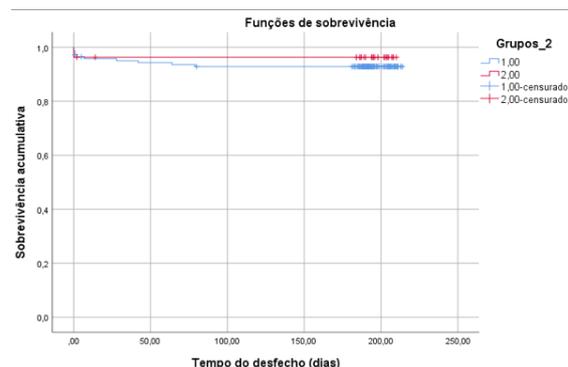
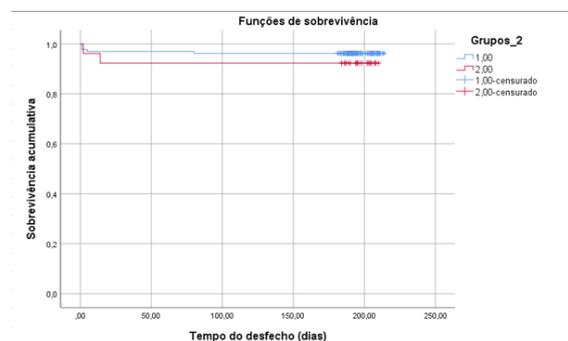


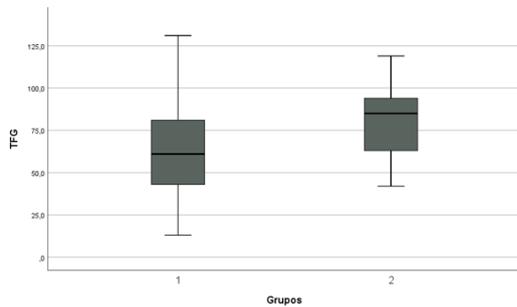
Figura 2. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida do paciente (grupos:1 e 2)



A TFG média ao final de 6 meses de transplante, foi significativamente maior nos pacientes com DSA pré-transplante, quando comparado aos pacientes sem DSA, com médias clearance de creatinina estimados em 79 e 62,5ml/min/1,73m², respectivamente (Figura 3).

Na análise multivariada de Cox, a presença do DSA pré-formado não constituiu risco para perda do enxerto em até 6 meses do transplante, com p de 0,999. Adicionalmente, em análise por Curva ROC, os valores de MFI dos DSAs pré-formados no Grupo 2 (Com DSA), não foram bons preditores de perda do enxerto (AUC 0,497, $p=0,976$).

Figura 3. Boxplot - Avaliação da TFG com seis meses (Grupos: 1 e 2)



| Estatísticas | Grupo | |
|--------------|-------|------|
| | 1 | 2 |
| Média | 62,5 | 79,0 |
| Mediana | 61,0 | 85,0 |

Legenda: Grupo 1: Sem DSA pré-formado; Grupo 2: Com DSA pré-formado

DISCUSSÃO

Em 1969, Patel e Terasaki demonstraram a eficácia na detecção dos anticorpos anti-HLA pela técnica de CDC, mostrando de forma irrefutável que a presença de Anticorpos Específicos contra o Doador (DSA, Donor Specific Antibodies), pré-formados, dirigidos contra moléculas HLA incompatíveis entre receptor e doador resultava em rejeição hiperaguda com perda precoce do enxerto renal, criando o conceito de “transplantabilidade”. Desde então, o CDC se tornou o método padrão para alocação de enxertos, sendo utilizado até hoje⁷.

A metodologia Luminex, por sua vez, consiste na identificação de anticorpos anti-HLA, por meio da ligação desses em antígenos HLA aderidos à microesferas de poliestireno (beads), o que possibilita a identificação dos anticorpos em títulos muito baixos, com capacidade de identificação em nível alélico. São, portanto, os testes de maior sensibilidade e especificidade para detecção desses anticorpos⁷, e a melhor ferramenta para determinar o risco imunológico através da definição do “acceptable mismatch”¹²⁻¹⁵, o

que ampliou de forma expressiva o conceito de “risco imunológico” no transplante renal.

Nossos dados corroboram com resultados de estudos prévios e mostram que o DSA pré-formado pode não ser um eficiente preditor de RMA aguda, mas um biomarcador de menor sobrevida e disfunção do enxerto^{16,17}. Os fenótipos clínicos de rejeição mediada por anticorpos são determinados pelas características complexas dos DSAs, incluindo classes de HLA, especificidade, subclasses de IgG e capacidade de ligação ao complemento, fora as características intrínsecas do endotélio que varia de acordo com a genética de cada indivíduo. Mediante tantas variáveis, o desafio é tentar estabelecer um “cut off” de nível de DSA aceitável, visando ampliar os números de receptores elegíveis sem incremento no risco de rejeição humoral aguda. Foi nesse contexto que, em 2016, o serviço de Transplante Renal do Real Hospital Português definiu como critério para “acceptable mismatch”, DSAs com valores até 5000 MFI para classe 1 e/ou 2 em soro histórico ou atual, ampliando o número de receptores elegíveis e ajudando na luta social de reduzir o número de doentes renais crônicos em diálise na região.

A definição da relevância clínica do DSA detectada pelo Luminex é importante, uma vez que estes ensaios são cada vez mais utilizados para avaliação de risco pré-transplante e alocação de órgãos^{9,12,18}. Devido às variações nos valores de MFI atribuídos aos “Acceptable Mismatches”, diferentes centros transplantadores reportam um amplo espectro de efeitos clínicos resultantes da presença de DSAs pré-formados, que variam de RMA clínica aguda a nenhum impacto prejudicial óbvio. Isso pode ser explicado pelo fato de que a ligação in vitro nas microesferas não significam que possam ocorrer in vivo no receptor, durante o processo de produção as

moléculas de HLA podem ter sido desnaturadas, expondo novos epítomos que não estão presentes em moléculas HLA adequadamente configuradas do doador. Além disso, o DSA detectado pode ser direcionado contra epítomos das moléculas HLA, que são acessíveis na “beads”, mas não in vivo e, portanto, provavelmente não são determinantes antigênicos relevantes. Outra limitação técnica de ensaios de esferas em fase sólida é também quando da presença de altos títulos de DSA, “efeito Prozona”, com saturação das ligações nas beads e leitura errada do MFI resultando em um falso negativo.

Outra questão importante que deve ser ponderada em relação a presença do DSA pré-formado como deletério para o transplante é a sua patogênese¹⁶. Fatores intrínsecos do endotélio entram como reguladores, tanto podendo impedir o DSA de desenvolver uma RMA clínica¹¹, como deflagrar uma ativação aloimune mediante contato com DSA, estimulando fatores de crescimento endotelial vascular e fibroblastos, resultando no fenótipo clínico de rejeição crônica encontrada em muitas biopsias com disfunção tardia do enxerto^{16,19,20}. Ainda quanto a patogênese do DSA, as células da imunidade inata, neutrófilos, macrófagos e células natural Killer, podem se ligar a porção Fc do DSA, e por esse mecanismo, deflagrar uma RMA²¹. Portanto, a via de ativação do complemento não é a única forma de um anticorpo iniciar o processo inflamatório que levará ao processo de rejeição humoral. Por conta disso, o C4d torna-se uma “pegada imunológica” e não um preditor obrigatório para RMA, sendo esse o motivo do C4d não ser considerado um critério obrigatório para diagnóstico de RMA.

Em nossa população de pacientes, o número, a classe, a força cumulativa de

DSA pré-formado em níveis inferiores a 5000MFI, bem como tipo e/ou número de eventos sensibilizadores (dados não mostrados), não foram preditivos para a ocorrência de RMA aguda e/ou perda do enxerto, mostrando segurança na realização de transplantes em pacientes com maior risco imunológico. No entanto, sabemos que a sobrevida do enxerto, a longo prazo, é reduzida pela presença do DSA pré-formado e, apesar de nem todos os DSAs detectados pelo Luminex serem preditores de RMA e não possuem poder quantitativo, maiores valores de MFI estão relacionados com pior sobrevida e disfunção do enxerto a longo prazo^{11,15,22,23}.

Existem duas limitações inerentes ao nosso estudo que valem ser pontuadas. Primeiramente, o fato de o serviço não realizar biopsias protocolares, pode resultar em uma subnotificação das rejeições subclínicas e crônica. Em segundo lugar, a análise de desfechos tardios (após 6 meses) não fez parte do escopo desse estudo.

CONCLUSÕES

Tentar encontrar preditores tão eficazes para os diferentes fenótipos de rejeição, seja ela aguda, crônica ou subclínica, se tornou um dos principais desafios da imunologia do transplante. O nosso estudo mostrou que ter DSA pré-transplante contra antígenos HLA Classe I e/ou Classe II, detectados pela metodologia Luminex, em valores inferiores a 5000 MFI, não teve impacto na incidência de rejeição aguda do enxerto, independente do mecanismo aloimune (celular ou humoral), tampouco nas sobrevidas do paciente e do enxerto renal, nos primeiros 6 meses de transplante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bakr MA, Denewar AA. Challenges for Renal Retransplant : *An Overview*. 2016;21–6.
2. Angeles L, Dis- K. Comparison of Mortality in all patients on Dialysis, Patient on Dialysis Awaiting transplantation, and recipients of a first. 1999;1725–30.
3. Schold JD, Buccini LD, Goldfarb DA, Flechner SM, Poggio ED. Article Association between Kidney Transplant Center Performance and the Survival Benefit of Transplantation Versus Dialysis. 2014;9(12):1773–80.
4. Transplantes RB De. Rbt (2010-2017). 2017.
5. Mehra N, Siddiqui J, Baranwal A, Goswami S, Kaur G. Clinical relevance of antibody development in renal. 2013;1283:30–42.
6. Filippone EJ, Farber JL. Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis*. 2015;1–11.
7. Rui Pei, Jar How Lee PIT. Single Human LeuKocyte Antigen Flow Cytometry Beads For Accurate Identification of Human Leukocyte Antigens Antibody Specificities. 2003;43–9.
8. Roelen DL, Doxiadis IIN, Claas FHJ. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies : a matter of debate. 2012;25:604–10.
9. Zecher D, Bach C, Preiss A, Staudner C, Utpatel K, Evert M, Analysis of Luminex-based Algorithms to Define Unacceptable HLA Antibodies in CDC-crossmatch Negative Kidney Transplant Recipients. 102, *Transplantation*. 2018. 969-977.
10. Lionaki S, Panagioteellis K, Iniotaki A, Boletis JN. Incidence and Clinical Significance of De Novo Donor Specific Antibodies after Kidney. *Transplantation*. 2013;2013.
11. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. *Transplantation*. 2009;87(11):1681–8.
12. Batal I, Zeevi A, Lunz JG, Aggarwal N, Shapiro R, Randhawa P, و. Antihuman leukocyte antigen-specific antibody strength determined by complement-dependent or solid-phase assays can predict positive donor-specific crossmatches. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(10):1534–40
13. Wu WK, Famure O, Li Y, Kim SJ. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation. *Kidney Int* 2015;88(4):851–8.
14. Roufosse C, et al. 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018;102(11):1795–814.
15. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, و. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. 2010;1398–406.
16. Zhang R. Donor-specific antibodies in kidney transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(1):182–92.
17. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thauinat O, Dubois V. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):615–25.
18. Buttigieg J, Ali H, Sharma A, Halawa A. Positive Luminex and negative flow cytometry in kidney transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2018. <https://academic.oup.com/ndt/advance-article/doi/10.1093/ndt/gfy349/5224803>
19. Hanson Q. The role of the Immunoglobulin G1 Fc N-glycan in FcγRIIIa affinity. 2014;
20. Manuscript A. NIH Public Access. 2013;12(2):313–21.
21. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell M, Mengel M, Einecke G. NK Cell Transcripts and NK Cells in Kidney Biopsies from Patients with Donor-Specific Antibodies : Evidence for NK Cell Involvement in Antibody-Mediated Rejection. 2010;1812–22.
22. Burns JM, Cornell LD, Perry DK, Pollinger HS, Gloor JM, Kremers WK. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(12):2684–94.
23. Hospitals A, Vihar S, Road DM, Hospitals A, Vihar S, Road DM و. The good, the bad and the ugly of luminex donor specific cross match.