

Luminex를 이용한 이식면역검사

가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 진단검사의학과

이혜영 · 오은지

Luminex-based Immunoassay for Organ Transplantation

Hyeyoung Lee, M.D. and Eun-Jee Oh, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Development of luminex-based solid phase assays enables advanced measurement of HLA antibody with sensitivity, specificity, and increasing knowledge of unacceptable antigens. In this review, we described the principle of the luminex-based assay and its current applications for organ transplantation including C1q assay, calculated panel reactive antibody, and virtual cross-matching. We also discussed the technical aspects and limitations for clinical utilization. The variables related to measurement of HLA antibody specificities and their clinical relevance remain unclear, therefore the interpretation of results requires comprehensive knowledge and clinical information in critical cases.

Key Words: Transplantation, Luminex, HLA antibody, Multiplex bead immunoassay**중심 단어:** 이식, 루미넥스, HLA 항체, 다중비드 면역측정법

서론

장기이식 환자에서 HLA (human leukocyte antigen) 형별시험과 HLA 항체검사는 이식의 예후판정과 거부반응 발생 예측 및 면역억제제 조절을 위해 중요하다. 신장이식 실패의 주요기전인 항체 매개성 거부반응의 진단과 치료를 위해서는 공여자 특이 HLA 항체(donor-specific HLA antibodies, DSA)의 적절한 검출과 해석이 요구된다(1-3). Luminex를 이용한 solid-phase assay (SPA)는 DNA probes 나 추출 또는 재조합 된 HLA 항원을 다중형광비드에 부착

하여 검체와 반응시킨 후 luminex 장비를 이용하여 HLA 형별과 HLA 항체를 검출하는 방법이다. 이러한 다중비드 면역측정법(multiplex bead immunoassay)은 검출 민감도와 특이도가 높고 상품화된 시약을 이용할 수 있는 장점이 있어, 최근 다양한 적용 보고와 함께 사용이 증가하고 있다. 본 논문에서는 luminex를 이용한 이식면역검사의 원리와 종류, 임상적 적용 및 결과해석 시 고려해야 할 점에 대해 다루고자 한다.

1. 검사 원리

Luminex 장비를 이용한 다중비드 면역측정법의 원리는 luminex 장비 내 2개의 레이저를 사용하여 비드와 검체 반응을 각각 검출하는 것으로서 유세포분석기 원리를 이용한다. Red laser (633 nm)를 이용하여 형광강도수준 (fluorescence intensity level)이 다른 100여 가지의 polystyrene microsphere beads를 구분하고, 각각의 비드에는 DNA 염기서열이나 항원 등의 다른 표적물질들이 부착 가

Received June 19, 2015

Revised June 20, 2015

Accepted June 20, 2015

Corresponding author: Eun-Jee Oh

Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital,
College of Medicine, The Catholic University of Korea, 222
Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea
Tel: 82-2-2258-1641, Fax: 82-2-2258-1719
E-mail: ejoh@catholic.ac.kr

능하다. 검체 내 항원, 항체, DNA, 효소 등의 측정을 위해 상보적인 결합이 가능한 항체, 항원, DNA probe 등이 부착된 luminex beads와 검체를 반응시키고 PE (phycoerythrin) 형광물질이 결합된 2차 항체를 이용하여 검출 후 PE 형광 시그널을 green laser (532 nm)를 이용하여 측정한다. Luminex 비드를 사용한 SPA는 적은 양의 검체(혈청 50 μ L 이하)로 최대 100여 가지의 검사를 동시에 시행할 수 있으며, 민감도가 높고, median fluorescence intensity (MFI) 값으로 반정량 분석이 가능하며, 각 회사에서 제공하는 개별의 고유 프로그램을 통해 검사 결과를 분석한다.

2. HLA 형별검사

Luminex를 이용한 HLA 형별검사의 원리는 MHC (Major Histocompatibility Complex) class I의 exon 2, 3, MHC class II의 exon 2 부위를 group specific primer로 증폭시킨 후 luminex 비드에 부착된 sequence specific oligonucleotide probe와의 반응을 검출하여 HLA 형별을 결정하는 PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide) 방법이다(4). PCR 증폭에 사용되는 primer에 biotin이 부착되어 있고, probe와 증폭된 DNA의 hybridization 후 Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) conjugate와 반응시킨 후 luminex에서 검출한다. 현재 출시되는 luminex 키트는 일부 HLA 유전자의 경우 고해상도 결과까지 보고 가능한 저해상도-중등도 해상도 검사이며, 적은 양의 DNA를 사용하여 대량 검체 검사가 가능한 장점이 있어 검사실에서의 사용이 증가하고 있다.

3. HLA 항체검사

Luminex를 이용한 HLA 항체검사는 HLA 항원이 부착

된 비드와 혈청 내 HLA 항체를 반응시키고, 전용 장비와 프로그램을 이용하여 HLA 항체를 검출하는 방법이다(5). Luminex 검사는 효소면역법이나 세포독성법을 이용한 HLA 항체검사에 비해 민감도와 특이도가 우수하며(6), 소량의 검체를 사용하고, 96 well microplate를 이용하여 검사할 수 있으므로 대량검사가 가능한 장점이 있다. 국내에는 두 제조사의 시약이 공급되고 있다(Tepnel/Lifecodes, Stamford, CT, USA and One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

비드에 결합된 표적항원에 따라 다음의 3가지 검사로 구분할 수 있다(Table 1). 1) class I 또는 class II pooled Ag 패널을 비드에 부착하여 환자 혈청 내 class I 또는 class II 항체 유무를 검출하는 HLA 항체 선별검사(pooled Ag bead, HLA antibody screen test), 2) 한 명의 HLA class I 또는 class II 항원을 한 개의 비드에 부착하여 이용하는 HLA 항체 동정검사(phenotype bead, HLA antibody identification test), 3) 재조합된 단일 항원이 부착된 단일 항원 비드(single antigen bead, SAB)를 이용하는 단일 항원 HLA 항체 동정검사(single antigen bead, HLA antibody specification). 이 중 단일 항원 HLA 항체검사는 정확한 항체 특이성 동정이 가능하므로, 항체특이성 결과를 이용하여 calculated panel reactive antibody (cPRA), virtual crossmatch 등에 적용 가능하다. 또한 HLA 유전자좌의 항원을 추출 및 재조합 하여 사용하므로 HLA-DQ, HLA-DQA, HLA-DPA, HLA-DPB, MICA 항체도 검출 가능하다. 특히 HLA-DQ 항체는 신장이식 환자의 33~90%에서 검출되고(7,8), de novo DSA의 주요원인으로서 이식손상과 관련이 있다는 보고가 있으므로(9), 최근 HLA-DQ 형별 검사와 함께 임상적 예후 판정을 위한 중요한 이식면역검사로 대두되고 있다.

Luminex를 이용한 HLA 항체검사 키트는 정성검사로

Table 1. Characteristics of three beads for luminex-based HLA antibody tests

	Pooled antigen bead	Single patient phenotype (identification) bead	Single antigen bead
Clinical utility	Screening	Identification of antigen specificity, % PRA	Identification of allele specificity
Relative antigen density	Low	Intermediate	High
Antigen composition per bead	Class I or II phenotype of several individuals	Class I or II phenotype of one individual	Single allelic HLA antigen
Resolution	—	+	+++
Result	Positive/negative	Identification % PRA	Identification Unacceptable antigen % cPRA/ C1q binding

Abbreviations: PRA, panel reactive antibody; cPRA, calculated panel reactive antibody; HLA, human leukocyte antigen.

허가되었으나, MFI 결과값을 이용한 HLA 항체의 반정량 결과를 항체 역가의 모니터링과 치료 효과 판정에 이용할 수 있다는 보고들이 있다(1-8,10). 그러나 이식 후 급성 거부반응이나 이식 실패를 예측할 수 있는 MFI 값 기준에 대해서는 1,500~10,000 MFI 등으로 보고자 마다 범위가 다양하므로(11-15), MFI의 정량적 모니터링은 임상정보와 함께 고려되어야 하며, MFI 값에 영향을 줄 수 있는 시약과 검사방법 차이에 대한 평가와 표준화가 선행되어야 할 것이다.

이식 전 DSA 양성 또는 DSA 음성/high PRA (panel reactive antibody) 양성환자에서 그렇지 않은 환자에 비해 이식예후가 좋지 않다는 보고가 있고(11,16-19), 이식 후 de novo DSA가 3.8~68개월 사이에 6~38%의 빈도로 검출되며, 이는 급성거부반응과 관련 있는 불량예후인자로 간주되지만, 적절한 검사기기와 간격에 대한 보고는 연구자마다 다양하다. 신장이식 이전과 이후에 시행하는 HLA 또는 non-HLA 항체검사와 관련된 최근의 권장지침에 대한 요약은 다음과 같다(20).

<신장이식 전 항체검사>

- 동정된 항체 특이성과 교차시험 결과에 따라 환자의 위험 그룹을 분류한다.
- 환자의 과거 병력(출산, 수혈, 과거 이식력)을 고려하여 양성 결과를 해석한다.
- 보체 의존성 세포독성 검사에서 DSA가 검출, 보체 의존성 세포독성 교차시험이 양성인 경우, 항체 매개성 거부반응이나 이식 실패와 강한 연관성이 있으므로 이식은 금지되어야 한다.
- SAB를 이용한 항체검사에서 모든 HLA class I과 class II 유전자좌에 대한 항체가 음성인 경우, 교차 시험 없이 신장이식을 시행 할 수 있다.
- 비록 정확한 양성기준치는 정해지지 않았지만, DSA가 luminex 항체검사에서만 검출된 경우는 신이식의 절대적 금기가 아니고, 상대적 위험요인이다.
- 고감작된 환자는 신장교환이식이나 탈감작 요법을 고려할 수 있다.
- ABO 혈액형 불일치의 경우, 항체 역가를 감소시키고 이식이 가능하다.
- 이식 전 non-HLA 항체검사의 역할은 명확하지 않다.

<신장이식 후 항체검사>

- 신기능(혈청 크레아티닌, 요단백)과 조직검사를 모니터링한다.

- 이식 후 DSA 검사는 지속 시행되어야 한다.
- 이식 전 DSA가 이식 후 지속되거나 항체 역가가 증가하는 경우는 불량한 예후와 관련이 있다.
- 이식 후 de novo DSA 발생은 불량한 예후와 관련이 있다.
- 대부분의 de novo DSA는 HLA class II 항체이다.
- 조직 검사로 항체 매개성 손상과 C4d 유무를 확인해야 한다.
- HLA 항체검사와 조직검사의 시기는 위험도에 따라 다르게 결정한다.
 - 고위험군(이식 전 탈감작 치료를 받았거나 DSA 양성/교차시험 음성인 환자군): 이식 첫 3개월 내에 DSA 검사와 조직검사를 시행한다.
 - 중등도 위험군(DSA 양성 과거력이 있으나 현재는 음성인 환자군): 이식 후 1개월 이내 DSA 검사를 시행하고, DSA 양성이면 조직검사를 시행한다.
 - 저위험군(감작력이 없고 첫 번째 이식을 받은 환자군): 이식 후 3~12개월 사이에 DSA 검사를 시행하고, DSA 양성이면 조직검사를 시행한다.
- 면역 억제제의 중단과 프로토콜 조직검사의 역할은 불명확하다.
- 이식 후 non-HLA 항체검사의 장점은 불명확하다.

4. Luminex를 이용한 검사결과에 영향을 주는 기술적 요인

Luminex를 이용한 HLA 항체검사는 여러 기술적인 요인에 의해 MFI 값이 영향을 받을 수 있으므로 결과 해석에 유의해야 한다. SAB에 부착된 HLA 항원의 양은 제조사에 따라 다르고, 동일한 키트 내에서도 각 비드마다 다르기 때문에, 측정된 HLA 항체의 MFI 값에 영향을 줄 수 있다(20). 또한 정맥주사용 면역글로불린(IV immunoglobulin)을 투여 받는 환자나 염증, 감염을 동반한 환자에서 비특이적 물질에 의해 HLA 항체가 위양성으로 검출될 수 있다(21). 이러한 비특이적 결합이 있는 경우에는 음성 대조(negative control) 물질의 MFI 값도 함께 증가하기 때문에(21), 결과 해석 시 음성 대조 물질의 결과를 유의해서 관찰해야 한다. 반대로 고역가의 HLA 항체를 가진 환자에서 C1 면역복합체 침착이 유발되어 비드에 결합하거나(22,23), 면역글로불린 M (IgM)을 포함한 기타 혈청 물질이 항체 대신 비드에 결합하여 위음성 결과를 초래 할 수도 있다(24-26). 이런 전지대 반응(prozone effect)에 의한 위음성이 의심될 경우 검체를 희석하거나 EDTA/dithiothreitol 또는 열처리를 통해 문제를 해결할 수 있다(20,22,27). 비드 내에 있는 각 항원들은 공통의 항원결정부위(epitope)를

공유하고 있기 때문에 혈청 내 HLA 항체가 여러 비드에 분산되어 결합하면 실제보다 낮은 MFI 값을 보일 수도 있다(28). 환자가 가진 HLA 항체가 비드의 해당 HLA 항원 뿐만 아니라 교차반응군(Cross reactive group, CREG)에 속한 항원과 결합하는 경우 MFI 값이 낮게 측정 될 수 있다. 따라서 결과 해석시 CREG 항원에 대한 항체의 가능성을 염두에 두고 판독해야 한다. 감각력이 없는 신장 이식 대기자들에서 특정 HLA 항체들이 검출된다는 보고가 있는데, 이는 비드의 항원과 HLA 항체가 결합하는 과정에서 단백질의 삼차원적 구조적 변화로 인해(29-31) 정상적으로 관찰되지 않는 neoepitopes 항원결정기가 노출되어 발생하는 위양성 결과로 알려져 있으며(32-35), 이 항체들은 ‘natural’ HLA 항체로 분류되었다(33,34). ‘Natural’ HLA 항체는 흔하지 않은 HLA 항원에 대한 항체들로 이루어졌고(33) 1,000~5,000 사이의 낮은 MFI 값을 보이는 것이 특징이나(21), MFI 5,000 이상인 환자에서도 약 25%에서 관찰된다는 보고가 있으므로(32), 검사 결과 해석 시 염두에 둘 필요가 있다. 이러한 natural HLA 항체들의 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았지만 바이러스, 박테리아 항원에 대한 항체로서 발생한 것으로 예상되고 있으며(29), 임상적인 의미에 대한 추가연구가 필요하다(36,37). 마지막으로, luminex를 이용한 SPA는 제품 번호(lot to lot) 간 비드 구성에 차이가 있을 수 있으므로 환자의 임상적인 경과에 따른 HLA 항체의 MFI 값의 변화를 관찰할 시 염두에 두어야 한다(38-40). 따라서, Luminex 방법의 HLA 항체검사 결과의 정확한 해석을 위해서는 환자의 감각력 정보와 함께 다른 검사결과(교차시험, luminex-screen)와의 비교가 필요하다.

신장이식에서 HLA 또는 non-HLA 항체검사 방법과 관련된 최근의 권장지침에 대한 요약은 다음과 같다(20).

- 보체의존성 세포독성 교차시험은 초급성 거부반응을 일으킬 수 있는 항체를 검출한다.
- 유세포 분석법을 이용한 교차시험은 림프구에 결합하는 항체를 검출한다.
- SPA는 microtiter plate (ELISA) 또는 polystyrene bead에 결합된 항원을 유세포 분석기나 luminex로 검사하는 방법을 포함한다.
- 검사 예민도를 비교하면, Luminex > ELISA/유세포 분석 > 보체의존성 세포독성 순이다.
- Cw, DQA, DPA, DPB를 포함한 HLA 모든 유전자좌에 대한 항체를 검사하기 위한 이식 전 검사에 SPA를 사용한다.
- 세포 기반 검사(보체의존성 세포독성, 유세포 분석법을 이용한 교차시험)와 SPA를 함께 실행하여 두 검사

법의 상관성을 비교하거나 양성 교차시험 결과를 예측한다.

- Luminex 방법에서는 검사결과와 임상적 해석에 영향을 줄 수 있는 기술적인 측면(예, 비드에 부착된 항원 양의 차이나 항원의 변성)을 고려해야 한다.
- 비드를 이용한 검사는 정성 또는 반정량 검사이다.
- 검사실 간 검사방법과 양성 결정값에 차이가 있다.

5. Luminex를 이용한 HLA 항체검사의 확대 적용

1) C1q assay

C1q 검사는 luminex의 SAB를 환자 혈청과 반응시킬 때 정제된 C1q 보체를 첨가하여 반응시키고, 형광이 부착된 항 C1q 항체와 반응시켜 HLA 항체 중 C1q가 결합하는 ‘complement-fixing’ HLA 항체를 검출하는 검사법이다(29,41). C1q+DSA+ 환자군에서 C1q-DNA+인 대조군에 비해 C4d 양성, 항체 매개성 거부반응, 신소실 등의 불량한 예후와 관련이 있고(42,43), MFI 역가와 C1q 반응은 관련이 없다는 보고가 있다(44). 그러나, C1q+ 항체는 IgG1/3의 아형인 고역가의 HLA 항체에서 검출된다는 보고들도 있으므로(13-15,43,45), C1q 검사의 임상적 적용에 대한 추가연구가 필요하다.

2) Calculated PRA (cPRA)

SAB를 이용한 HLA 항체검사의 도입으로 정확한 항체 특이성 동정이 가능해짐에 따라, 동정된 항체특이성 결과를 이용하여 cPRA 결과를 얻을 수 있다. cPRA는 특정 인종, 국가 등 집단의 HLA 항원 빈도를 이용하여, 동정된 항체와 반응이 예상되는 항원의 빈도를 산출하는 것이다(46). 미국장기이식관리 기구인 United Network for Organ Sharing (UNOS)에서는 cPRA 80% 이상을 보이는 환자를 고위험군으로 간주하고 있으나, 국내에서는 일부 검사실에서 자체 개발하여 사용 중에 있고(46), 국내 장기이식관리센터에서는 cPRA의 도입과 적용을 검토 중에 있다. cPRA는 이식 전 환자의 감각 정도를 간접적으로 알 수 있는 객관적 지표이므로, 향후 장기 이식분야에 유용하게 쓰일 것으로 생각된다.

3) Virtual crossmatch

Virtual crossmatch는 SAB를 이용한 HLA 항체검사에서의 동정된 항체 특이성 결과를 이용하여 unacceptable HLA antigen을 결정하고 제공자의 HLA 형별 결과와 대조하여, 실제 교차시험을 시행하지 않고 결과를 예측하는 가상의 교차시험 방법이다. 이식 대기자에서 검출된 HLA 항체가

결합 가능한 HLA 항원을 가진 제공자를 virtual cross-match를 통해 미리 배제할 수 있으므로, 이식 제공자 선택에 이용되거나(21), high-PRA (>85%) 환자에서 탈감작 치료 후 DSA 항체가 음성 전환 또는 역가가 감소됨을 확인하고 이식을 시행하는데 이용될 수 있다(47,48). 그러나, HLA 항체검사에서 검출되지 않는 항체에 의한 교차시험 양성성이 있을 수 있고, 교차시험 음성인 낮은 역가의 HLA 항체 검출로 인해 이식의 기회가 줄어들 수 있으므로(49,50), 올바른 임상적 적용을 위한 HLA 항체특이성 검사방법의 표준화와 MFI cut-off 설정이 필요하다.

6. 표준화 및 정도관리

Luminex를 이용한 HLA 항체검사는 결과 해석에 중요한 MFI 값의 기준치가 검사실 간 다르게 설정될 수 있고, 각 검사실마다 프로토콜에 차이가 있을 수 있다(28,51,52). 최근 국내 5개 병원을 대상으로, 동일 로트 제품을 사용하고 동일한 프로토콜로 시행한 검사실 간 비교 연구에서는(53), HLA class I과 class II 항체 검출에 대한 일치율이 각각 96.0%, 97.2%였고, MFI 값은 0.947~0.991 (HLA class I 항체), 0.992~0.997 (HLA class II 항체)의 높은 상관성을 보였다. MFI 값의 정밀도 평가에서는 1,000 미만의 MFI 값에서 그 이상의 MFI 값들보다 높은 변이계수 값을 보였다. 향후 여러 제조사에서 제조된 제품을 통한 검사실 간 비교 연구가 필요할 것으로 예상되며, 임상적으로 유용한 cut-off의 공유 및 정확한 결과 해석을 위해 검사실 간 표준화와 지속적인 외부 정도관리가 필요할 것이다.

결 론

HLA형별과 HLA항체검사에 이용되는 Luminex-SPA는 민감도와 특이도가 높은 우수한 검사법이다. Luminex 항체검사의 MFI 결과값을 이용하여 HLA항체 역가의 모니터링이 가능하고, 항체특이성 결과를 이용하여 C1q assay, cPRA, virtual crossmatch 등에 적용 가능하므로 장기 이식 검사로서의 임상적 유용성은 더욱 증가할 것이다. 그러나, 결과에 영향을 줄 수 있는 여러 기술적 요인을 고려하고 환자의 임상정보와 다른 검사 결과와의 비교를 통한 적절한 결과 해석이 필요하며, 검사방법과 결과보고의 표준화 및 지속적인 외부정도관리가 요구된다.

감사의 글

이 논문은 가톨릭대학교 서울성모병원의 연구비 지원

을 받아 수행되었다.

REFERENCES

- 1) Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009;9:2520-31.
- 2) Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012;12:388-99.
- 3) Süsal C, Döhler B, Sadeghi M, Ovens J, Opelz G. HLA antibodies and the occurrence of early adverse events in the modern era of transplantation: a collaborative transplant study report. *Transplantation* 2009;87:1367-71.
- 4) Trajanoski D, Fidler SJ. HLA typing using bead-based methods. *Methods Mol Biol* 2012;882:47-65.
- 5) El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods. *Hum Immunol* 2005;66:989-97.
- 6) Colombo MB, Haworth SE, Poli F, Nocco A, Puglisi G, Innocente A, et al. Luminex technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:465-71.
- 7) Ozawa M, Rebellato LM, Terasaki PI, Tong A, Briley KP, Catrou P, et al. Longitudinal testing of 266 renal allograft patients for HLA and MICA antibodies: Greenville experience. *Clin Transpl* 2006;265-90.
- 8) DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, et al. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int* 2012;82:598-604.
- 9) Tagliamacco A, Cioni M, Comoli P, Ramondetta M, Brambilla C, Trivelli A, et al. DQ molecules are the principal stimulators of de novo donor-specific antibodies in nonsensitized pediatric recipients receiving a first kidney transplant. *Transpl Int* 2014;27:667-73.
- 10) Murphey CL, Bingaman AW. Histocompatibility considerations for kidney paired donor exchange programs. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17:427-32.
- 11) Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, González-Roncero FM, Acevedo-Calado MJ, Cabello-Chaves V, Gentil-Govantes MÁ, et al. Clinical relevance of HLA donor-specific antibodies detected by single antigen assay in kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1231-8.
- 12) Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict

- outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1398-406.
- 13) Freitas MC, Rebellato LM, Ozawa M, Nguyen A, Sasaki N, Everly M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes. *Transplantation* 2013;95: 1113-9.
- 14) Zeevi A, Lunz J, Feingold B, Shullo M, Bermudez C, Teuteberg J, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:98-105.
- 15) Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Pérez-Sáez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol* 2013;29:28-33.
- 16) Bray RA, Nolen JD, Larsen C, Pearson T, Newell KA, Kokko K, et al. Transplanting the highly sensitized patient: The emory algorithm. *Am J Transplant* 2006;6:2307-15.
- 17) Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2011;11:2132-43.
- 18) Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hené RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant* 2012;12:1618-23.
- 19) Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II. The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation* 2004;78:190-3.
- 20) Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95:19-47.
- 21) Konvalinka A, Tinkam K. Utility of HLA antibody testing in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* [in press 2015 Mar 24].
- 22) 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;92:510-5.
- 23) Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int J Immunogenet* 2013;40:171-7.
- 24) 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;87:813-20.
- 25) Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in non-alloimmunized males: pattern of HLA-Ia reactivity of anti-HLA-E-positive sera. *J Immunol* 2010;185:1935-48.
- 26) Ravindranath MH, Taniguchi M, Chen CW, Ozawa M, Kaneku H, El-Awar N, et al. HLA-E monoclonal antibodies recognize shared peptide sequences on classical HLA class Ia: relevance to human natural HLA antibodies. *Mol Immunol* 2010;47:1121-31.
- 27) Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immunol* 2009;70:496-501.
- 28) Tait BD, Hudson F, Brewin G, Cantwell L, Holdsworth R. Solid phase HLA antibody detection technology-challenges in interpretation. *Tissue Antigens* 2010;76:87-95.
- 29) Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönmeyer C. Luminex® and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus Med Hemother* 2013;40:182-9.
- 30) Cai J, Terasaki PI, Anderson N, Lachmann N, Schönmeyer C. Intact HLA not beta2m-free heavy chain-specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 2009;88:226-30.
- 31) Pereira S, Perkins S, Lee JH, Shumway W, LeFor W, Lopez-Cepero M, et al. Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *Hum Immunol* 2011;72: 492-8.
- 32) Gombos P, Opelz G, Scherer S, Morath C, Zeier M, Schemmer P, et al. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *Am J Transplant* 2013;13:2075-82.
- 33) Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008;86:1111-5.
- 34) El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro LE, Saji H, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 2009;70:844-53.
- 35) Poli F, Benazzi E, Innocente A, Nocco A, Cagni N, Gianatti A et al. Heart transplantation with donor-specific antibodies directed toward denatured HLA-A*02:01: a case report. *Hum Immunol* 2011;72:1045-8.

- 36) Goodridge JP, Burian A, Lee N, Geraghty DE. HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors. *J Immunol* 2013;191:3553-62.
- 37) Goodridge JP, Lee N, Burian A, Pyo CW, Tykodi SS, Warren EH, et al. HLA-F and MHC-I open conformers cooperate in a MHC-I antigen cross-presentation pathway. *J Immunol* 2013;191:1567-77.
- 38) Reed EF, Rao P, Zhang Z, Gebel H, Bray RA, Guleria I, et al. Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA. *Am J Transplant* 2013;13:1859-70.
- 39) Gandhi MJ, Carrick DM, Jenkins S, De Goey S, Ploeger NA, Wilson GA, et al. Lot-to-lot variability in HLA antibody screening using a multiplexed bead-based assay. *Transfusion* 2013;53:1940-7.
- 40) Friedlander R, Putheti P, Diaz E, Menon A, Ponce B, Muthukumar T, et al. On the detection of anti-HLA antibodies using single antigen bead Luminex assay: lot-to-lot variations in MFI. *Transplantation* 2013;96:e24-6.
- 41) Chin C, Chen G, Sequeria F, Berry G, Siehr S, Bernstein D, et al. Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:158-63.
- 42) Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 2013;369:1215-26.
- 43) Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 2012;16:12-7.
- 44) Llorente S, Boix F, Eguia J, López M, Bosch A, Martinez H, et al. C1q-fixing human leukocyte antigen assay in immunized renal patients: correlation between Luminex SAB-C1q and SAB-IgG. *Transplant Proc* 2012;44:2535-7.
- 45) Schaub S, Hönger G, Koller MT, Liwski R, Amico P. Determinants of C1q binding in the single antigen bead assay. *Transplantation* 2014;98:387-93.
- 46) Jang JY, Kim YJ, Kim Y, Park YJ, Han K, Oh EJ. Application of calculated panel reactive antibody using HLA frequencies in Koreans. *Ann Lab Med* 2012;32:66-72.
- 47) Süsal C, Opelz G, Morath C. Role and value of Luminex®-detected HLA antibodies before and after kidney transplantation. *Transfus Med Hemother*. 2013;40:190-5.
- 48) Morath C, Beimler J, Opelz G, Ovens J, Scherer S, Schmidt J, et al. An integrative approach for the transplantation of high-risk sensitized patients. *Transplantation* 2010;90:645-53.
- 49) Van den Berg-Loonen EM, Billen EV, Voorter CE, van Heurn LW, Claas FH, van Hooff JP, et al. Clinical relevance of pretransplant donor-directed antibodies detected by single antigen beads in highly sensitized renal transplant patients. *Transplantation* 2008;85:1086-90.
- 50) Süsal C, Ovens J, Mahmoud K, Döhler B, Scherer S, Ruhenstroth A, et al. No association of kidney graft loss with human leukocyte antigen antibodies detected exclusively by sensitive Luminex single-antigen testing: a Collaborative Transplant Study report. *Transplantation* 2011;91:883-7.
- 51) Cecka JM. Current methodologies for detecting sensitization to HLA antigens. *Curr Opin Organ Transplant* 2011;16:398-403.
- 52) Archdeacon P, Chan M, Neuland C, Velidedeoglu E, Meyer J, Tracy L, et al. Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 2011;11:896-906.
- 53) Oh EJ, Park H, Park KU, Kang ES, Kim HS, Song EY. Interlaboratory comparison of the results of lifecodes LSA class I and class II single antigen kits for human leukocyte antigen antibody detection. *Ann Lab Med* 2015;35:321-8.