Pracovní setkáni prutokové cytometrie

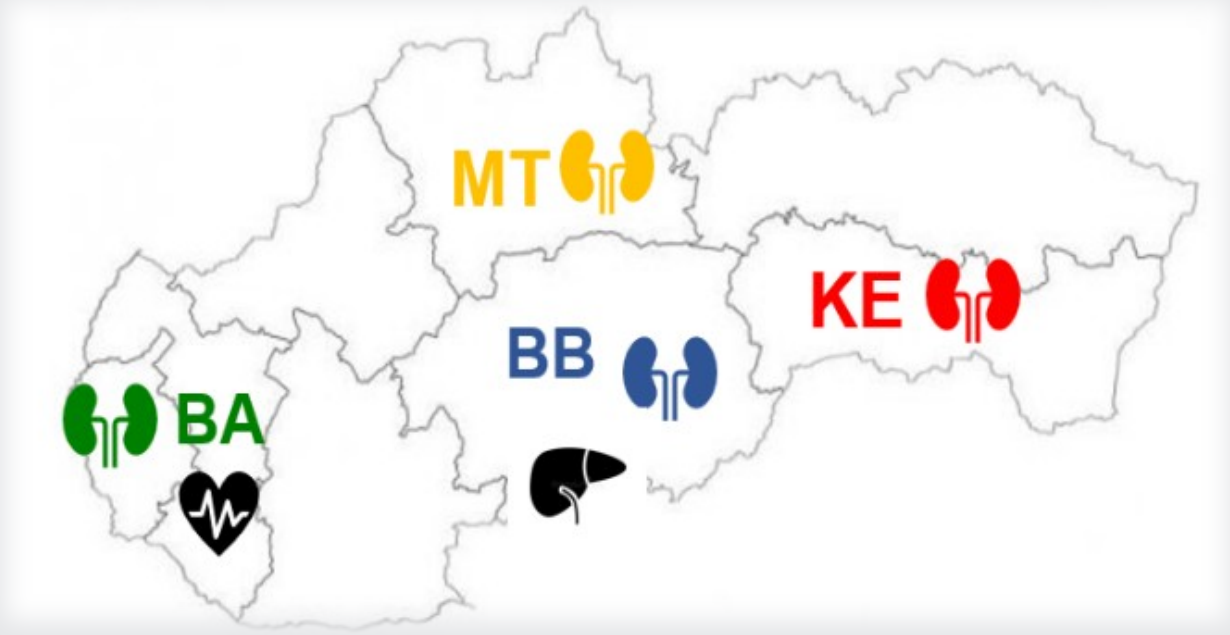
04.-06.10 2026, Hotel Lanterna, Velké Karlovice

Optimalizácia a štandardizácia cross-match testu metódou prietokovej cytometrie (FCXM) - protokol Halifax

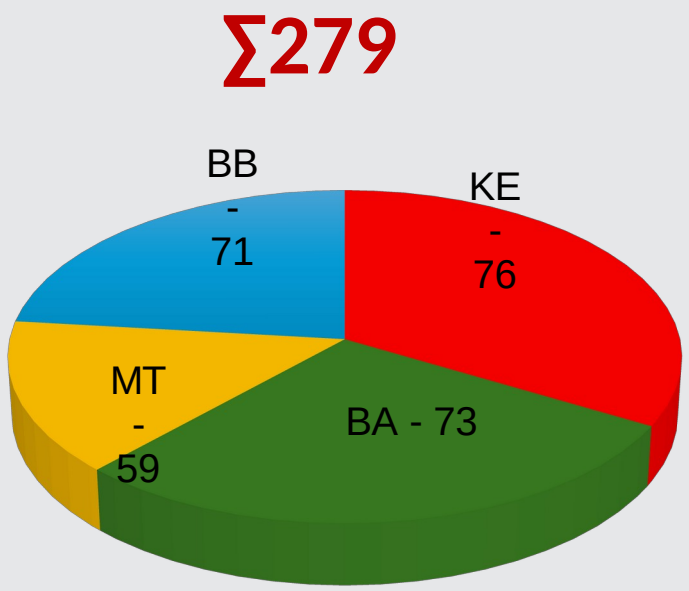
Ševcová D., Petríková I.,

OLM - Pododdelenie klinickej imunológie a alergológie, UNLP Košice

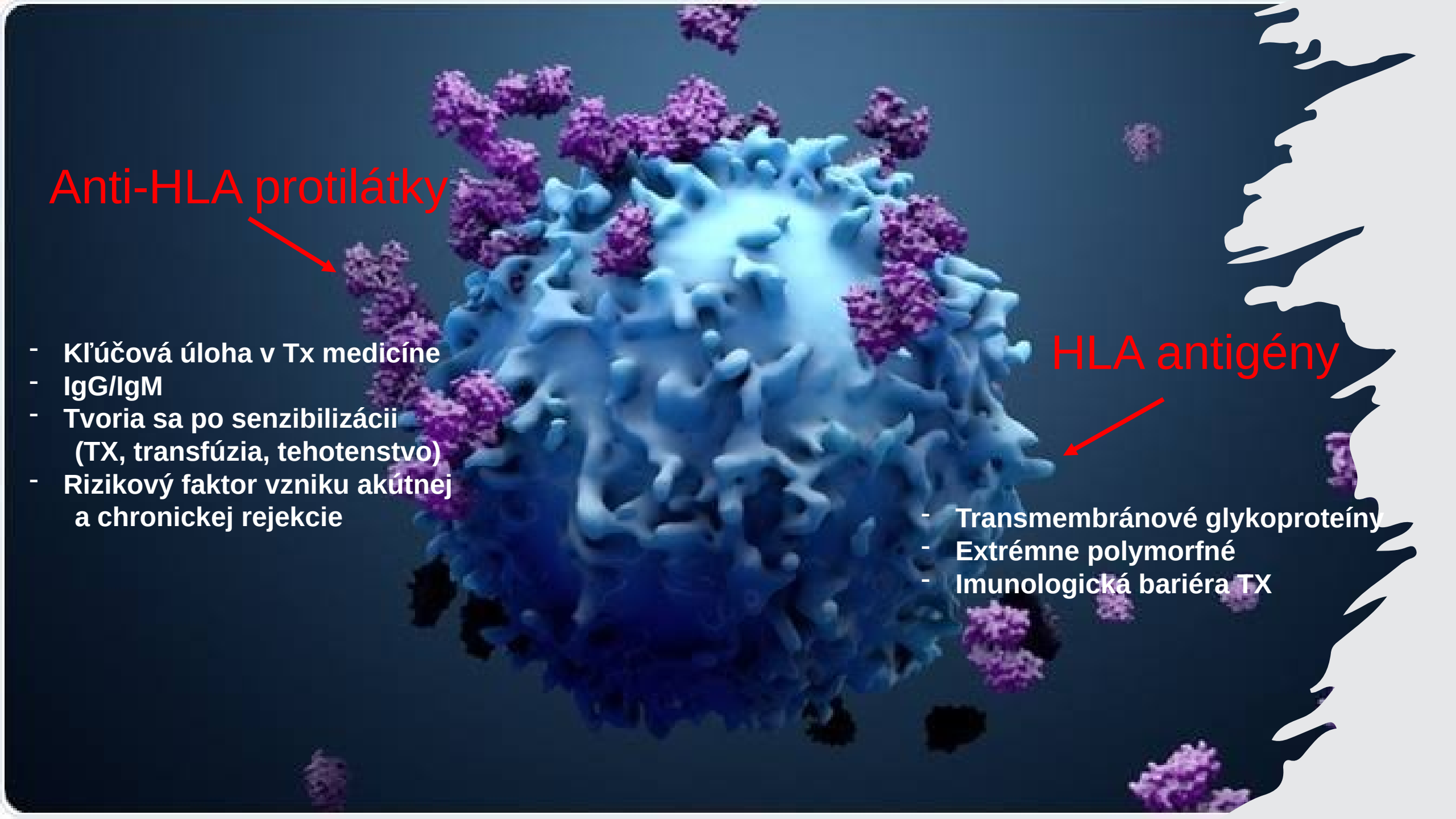
Transplantačné centrá SR



Počet pacientov na WL podľa TC



Zdroj údajov: TISS



Anti-HLA protilátky

- Kľúčová úloha v Tx medicíne
- IgG/IgM
- Tvoria sa po senzibilizácii (TX, transfúzia, tehotenstvo)
- Rizikový faktor vzniku akútnej a chronickej rejekcie

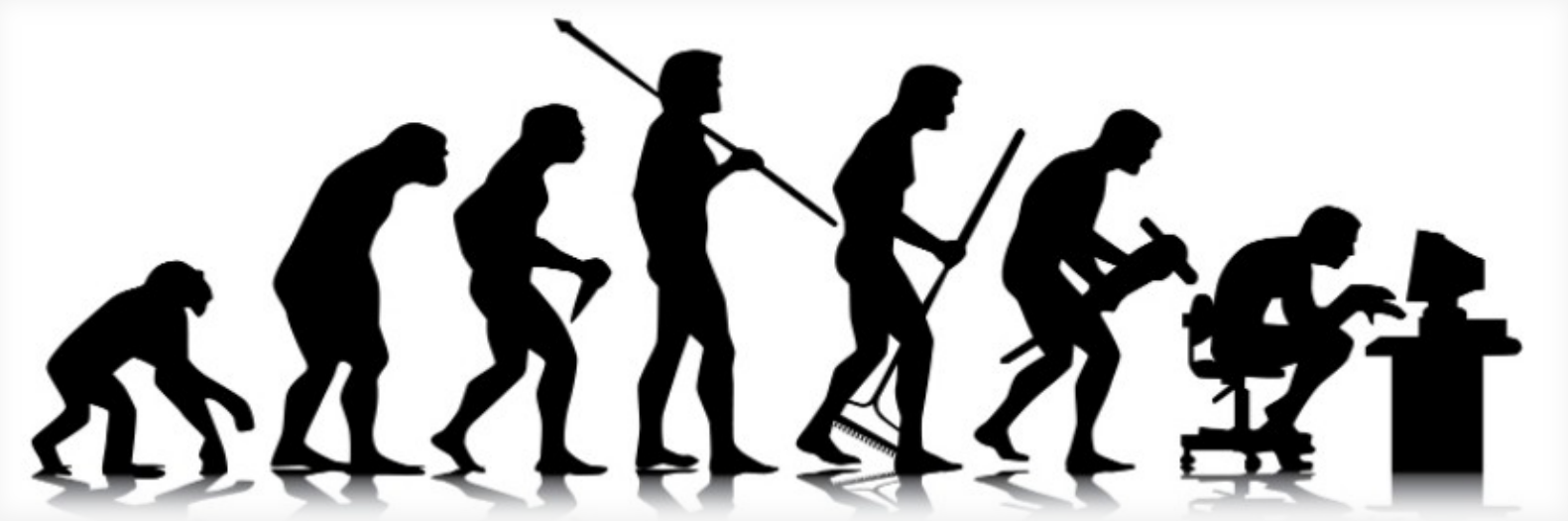
HLA antigény

- Transmembránové glykoproteíny
- Extrémne polymorfné
- Imunologická bariéra TX

Monitorovanie anti-HLA protilátok



- ✓ PREVENTÍVNE
  - stanovenie senzibilizácie pacientov na WL
  - senzibilizácia *áno/nie*
- ✓ ALOKAČNÉ
  - definovanie imunologického rizika
  - preformované DSA *áno/nie*
- ✓ DIAGNOSTICKÉ
  - po Tx
  - AMR *prítomná/neprítomná*
- ✓ MONITOROVACIE
  - po liečbe
  - liečba *účinná/neúčinná*



Detekcia aloprotilátok

Bunkové metódy — Cell based assay

Metódy na princípe pevnej fázy — Solid phase assay

***In silico* metódy**

CDC-XM

FC-XM

ELISA

Luminex

vXM

Epitop XM

- antigén nešpecifické
- natívny HLA Ag

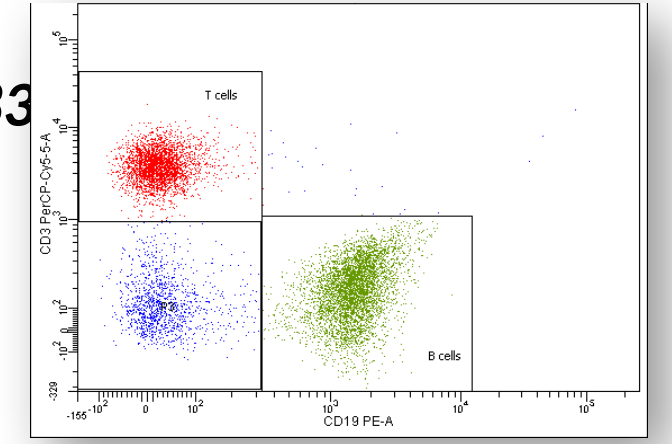
nevyhnutné bunky darcu

- antigén špecifické
- purifikovaný/rekombinantný Ag

bunky darcu nie sú potrebné

high.res. HLA typizácia
Luminex
PC
software

Flow cytometric crossmatch - FCXM (Garovoy et al.,1983



Výhody

- vysoká senzitivita

- stanovuje nízkotitrové protilátky, ako aj protilátky nezávislé od komplementu **(IgG2, IgG4)**

- umožňuje súčasnú identifikáciu protilátok reagujúcich s T ly (anti-HLA I. trieda) alebo B ly (anti-HLA II. triedy) bez potreby ich predchádzajúcej separácie

- možnosť použiť zmrazené lymfocyty darcu

- schopnosť detegovať protilátky proti natívny antigénom darcu – jasná klinická korelácia



Obmedzenia

- antigén nešpecifická metóda

- riziko falošnej pozitivity (7-16%)

- absencia štandardného postupu

- časová náročnosť

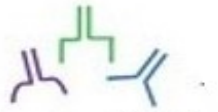
3-color FC XM



Sérum príjemcu

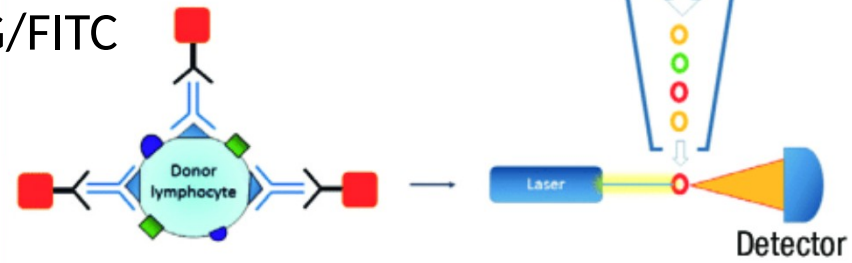


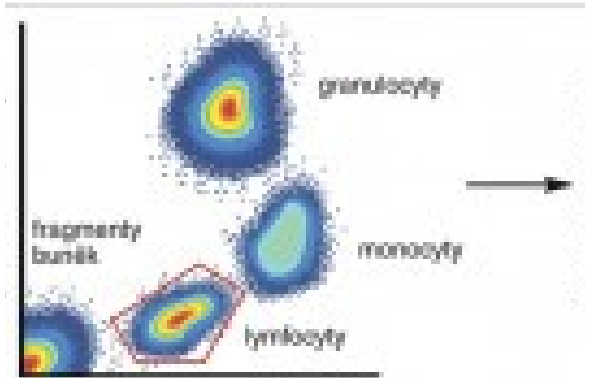
Lymfocyty darcu

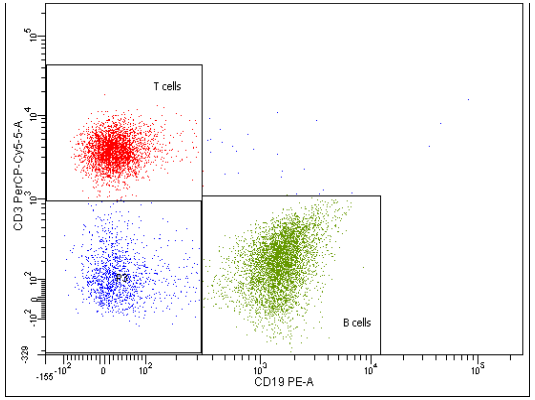




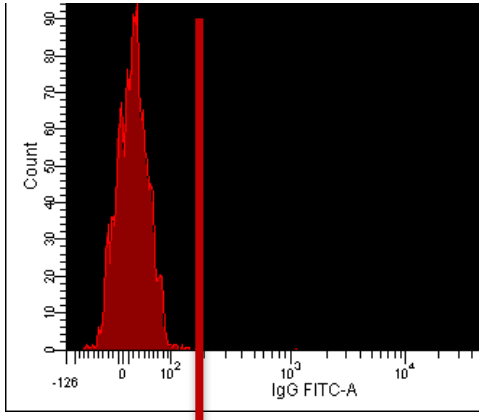
IgG/FITC

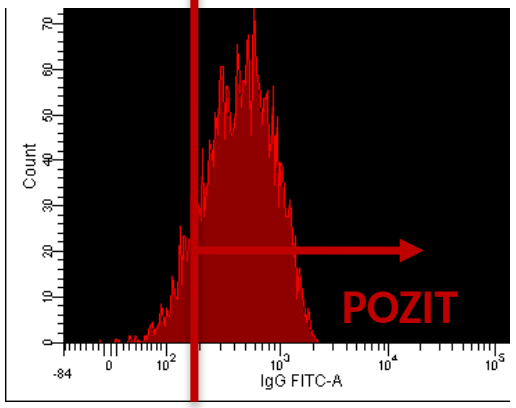




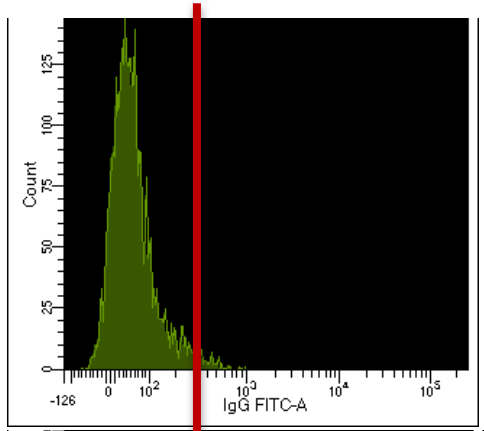


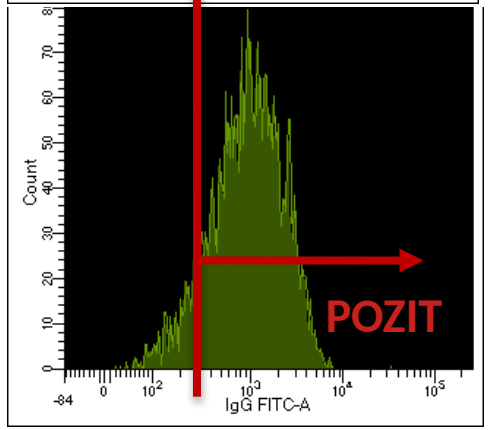
T-cells



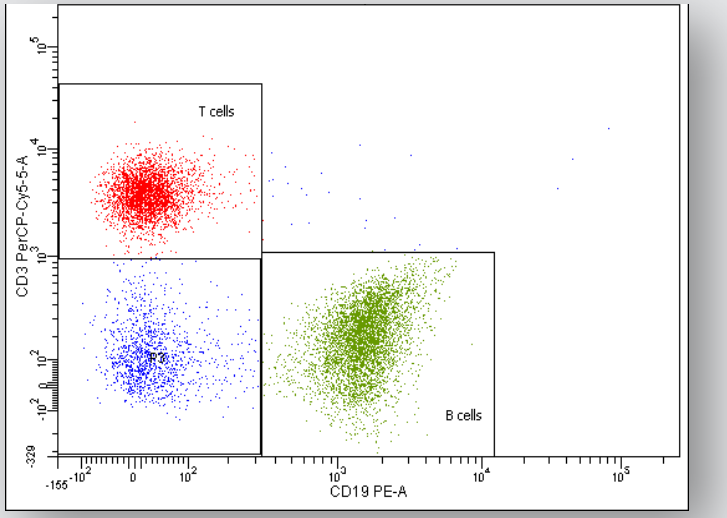


B-cells





FCXM protokol (Garovoy et al.,1983)



1. Izolácia lymfocytov – gradientová centrifugácia 45 min
2. Inkubácia **2,5x10^5** darcovských Ly (30ul) + sérum príjemcu 30ul **(4°C)** 30 min
3. Premytie 3x (500xg/5 min) 20 min
4. Inkubácia s MoAB **CD3-PerCP/CD19-PE /IgG-FITC (4°C)** 30 min
5. Premytie 2x (500xg/5 min) 20 min

Čas potrebný na prípravu cca 2,5hod



Prof. Dr. Robert S. Liwski, PhD.

Human Immunology 79 (2018) 28–38

Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Rapid optimized flow cytometric crossmatch (FCXM) assays: The Halifax and Halifaster protocols

Robert S. Liwski[a,*], Anna L. Greenshields[a], David M. Conrad[a], Cathi Murphey[b], Robert A. Bray[c], Jorge Neumann[d], Howard M. Gebel[c]

[a] Department of Pathology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 1V8, Canada
[b] Southwest Immunodiagnostics Inc., San Antonio, TX 78229, USA
[c] Department of Pathology, Emory University Hospital, Atlanta, GA 30322, USA
[d] Laboratory of Transplantation Immunology, Santa Casa Hospital, Porto Alegre, Brazil

Optimalizácia a štandardizácia FCXM

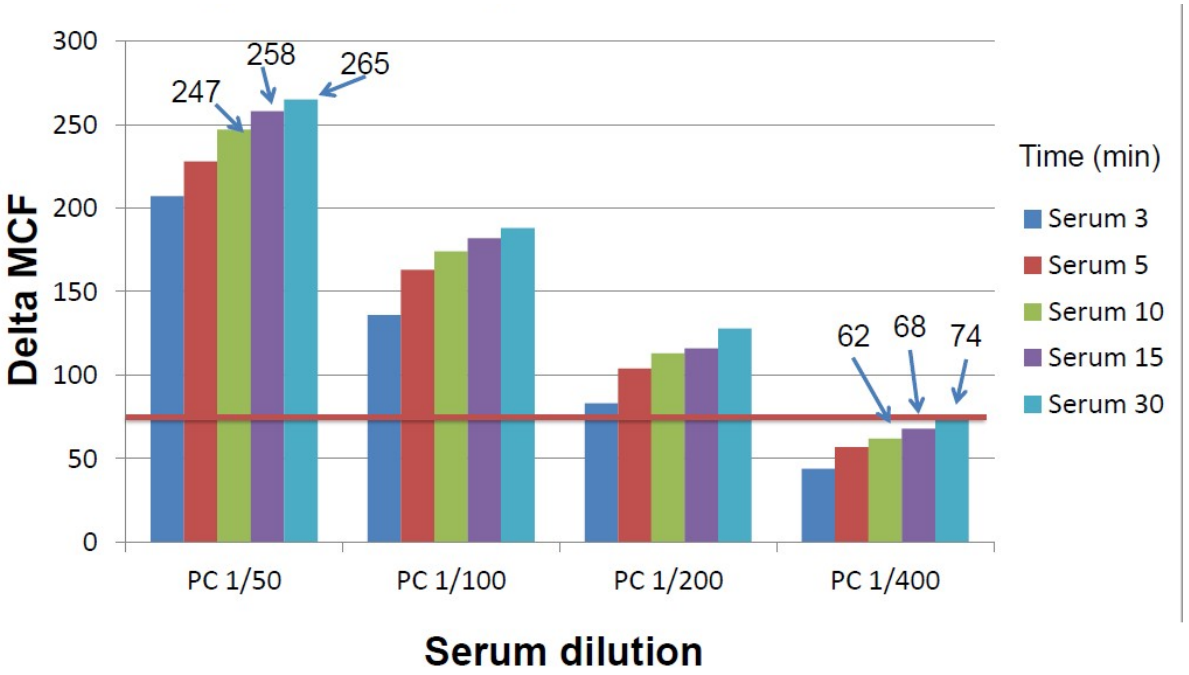
Cieľ - zredukovať čas potrebný na prípravu vzoriek bez ovplyvnenia kvality a senzitivity FCXM testu
- medzilaboratórna štandardizácia FCXM

Otestovať vplyv :

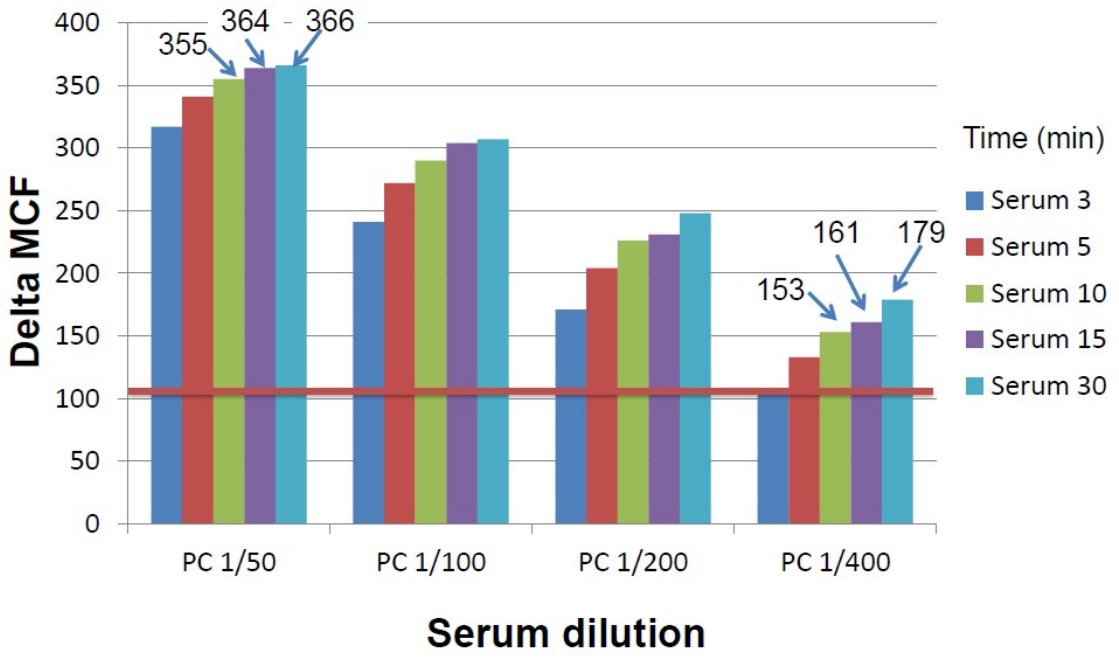
- času inkubácie bunky+sérum
- času inkubácie s MoAB
- inkubačnej teploty
- počtu buniek v suspenzii
- pomeru buniek ku séru
- spôsobu izolácie Ly

Vplyv času inkubácie sérum + bunky (3-30min)

T - FCXM



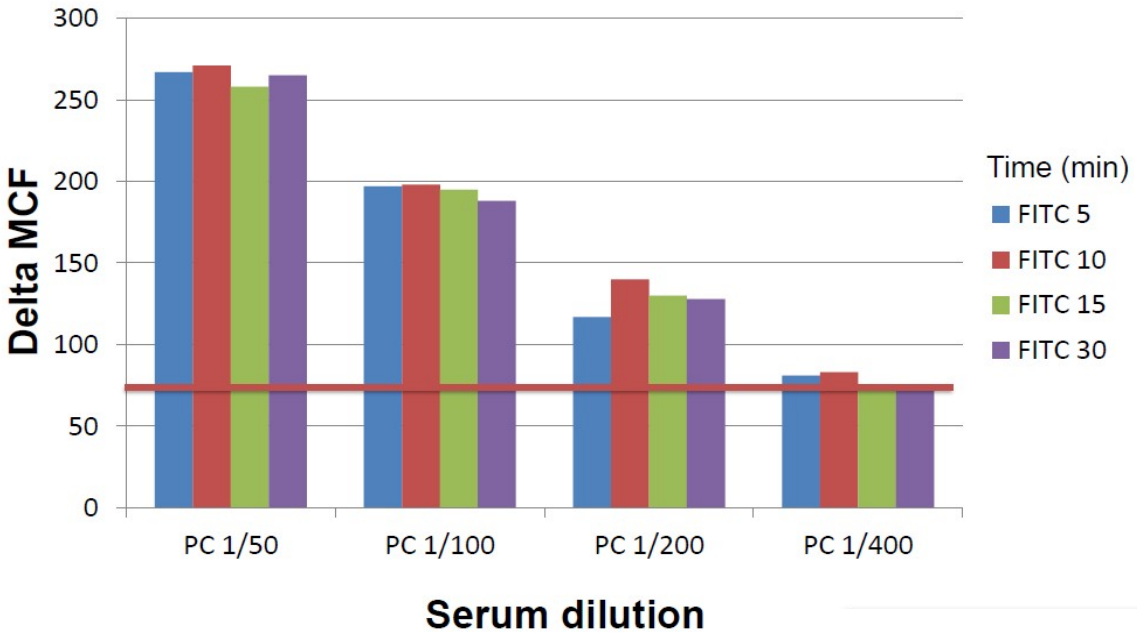
B - FCXM



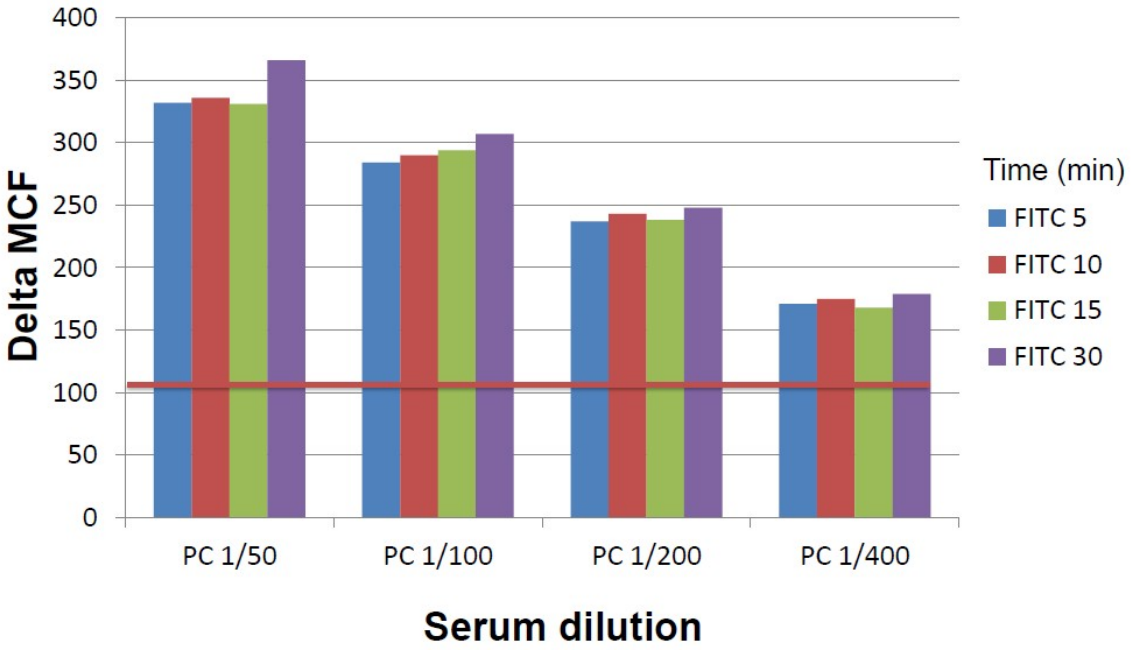
Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

Vplyv času inkubácie s Mo Ab (5-30min)

T - FCXM



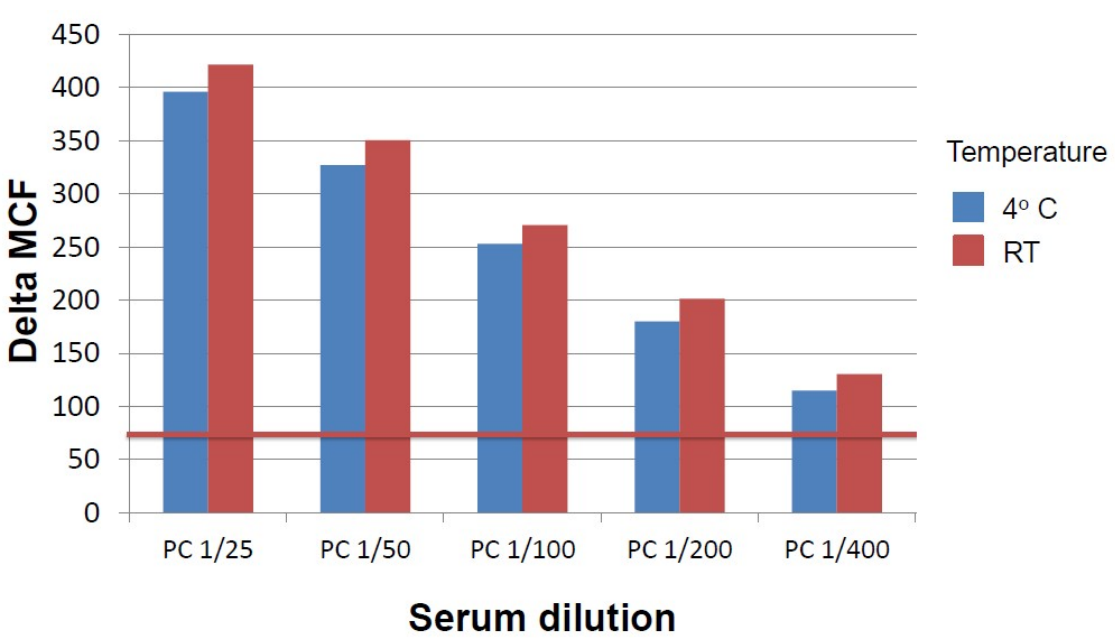
B - FCXM



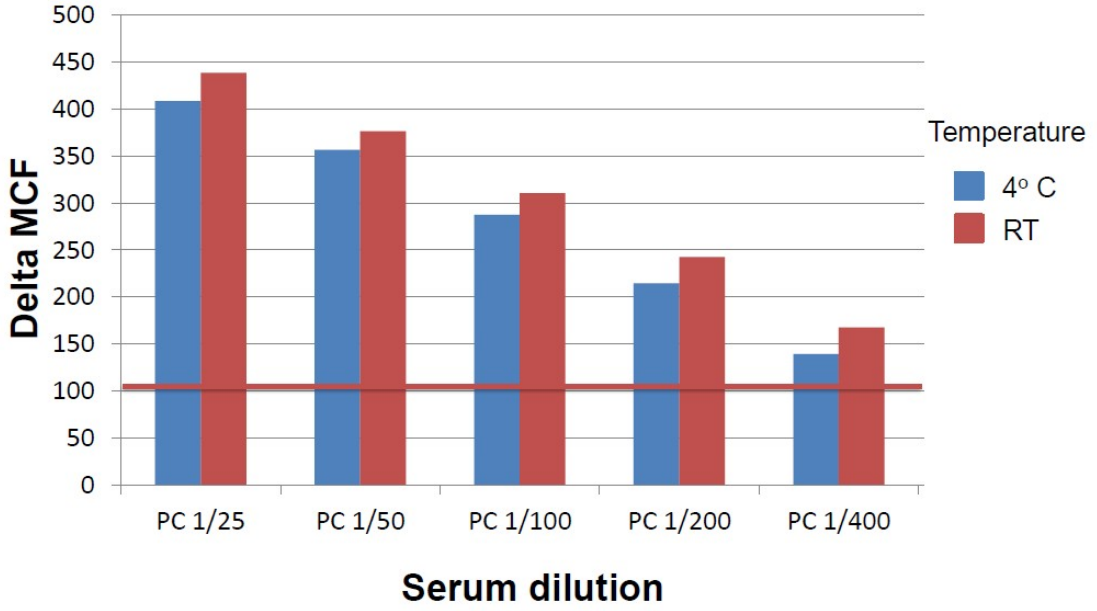
Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

Vplyv inkubačnej teploty (4°c vs RT)

T - FCXM



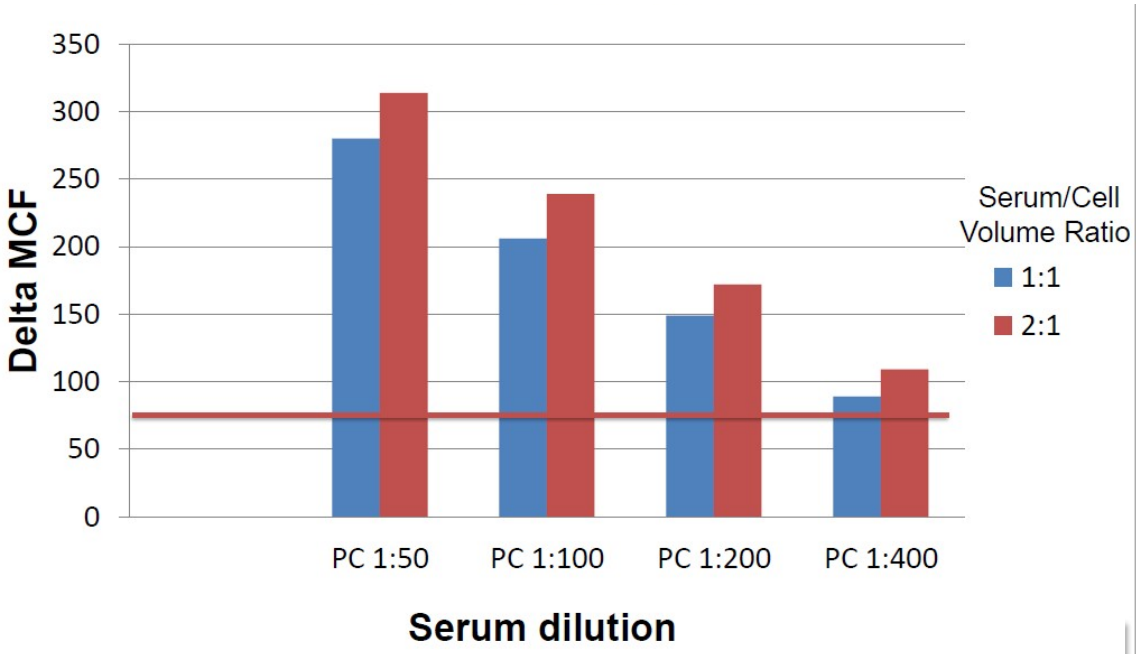
B - FCXM



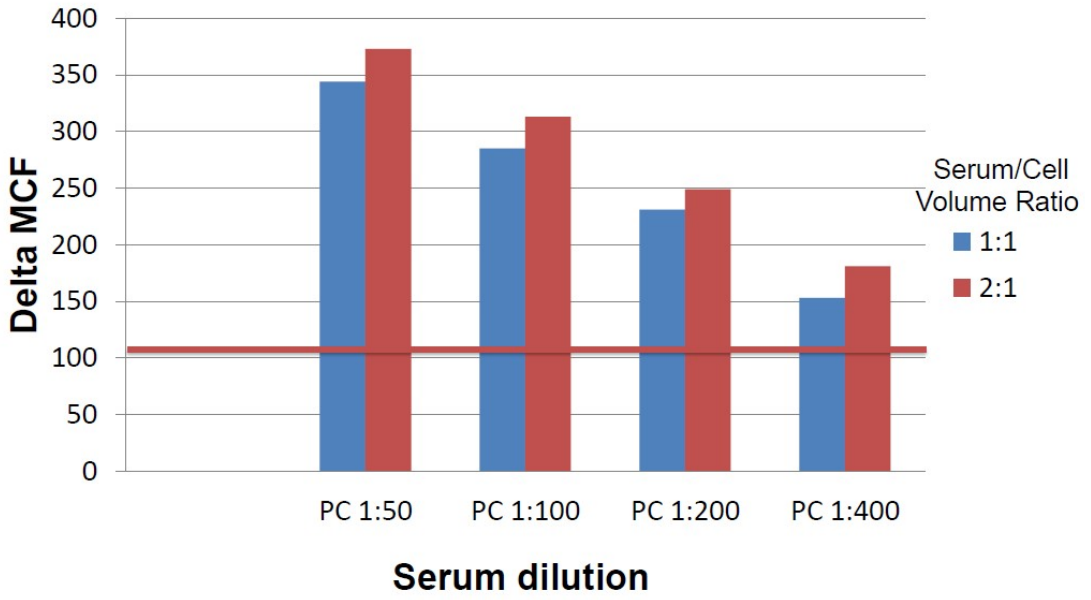
Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

Vplyv pomeru buniek ku séru

T - FCXM



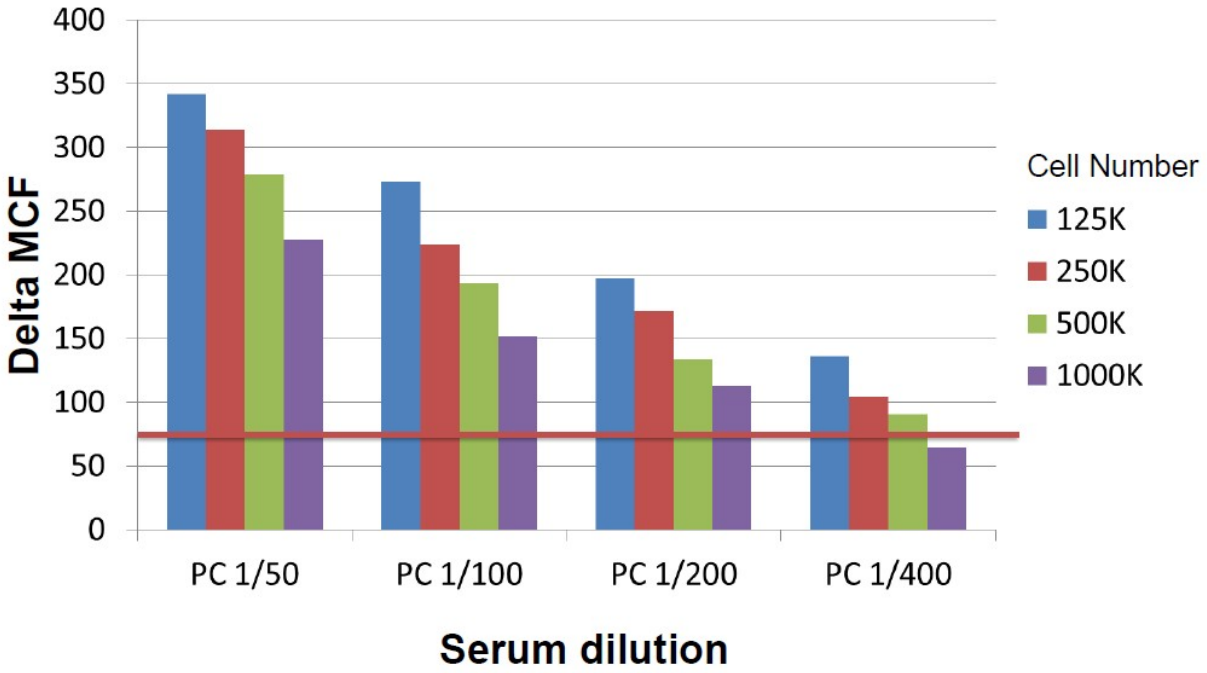
B - FCXM



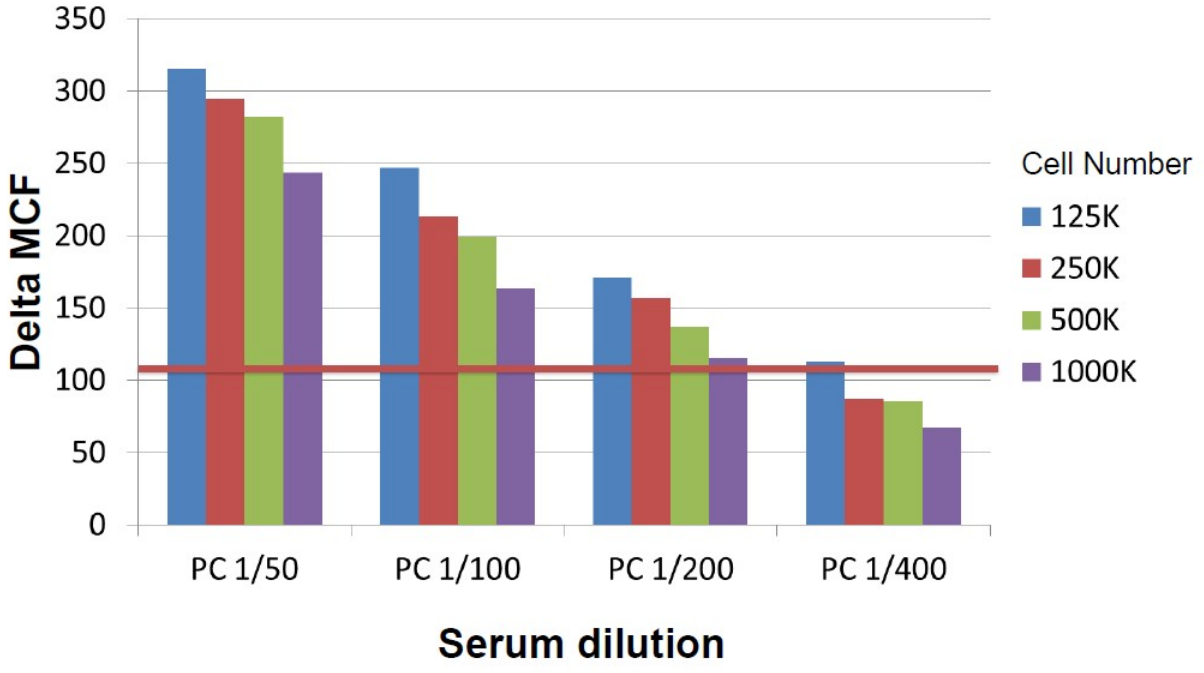
Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

Vplyv počtu buniek v suspenzii

T - FCXM



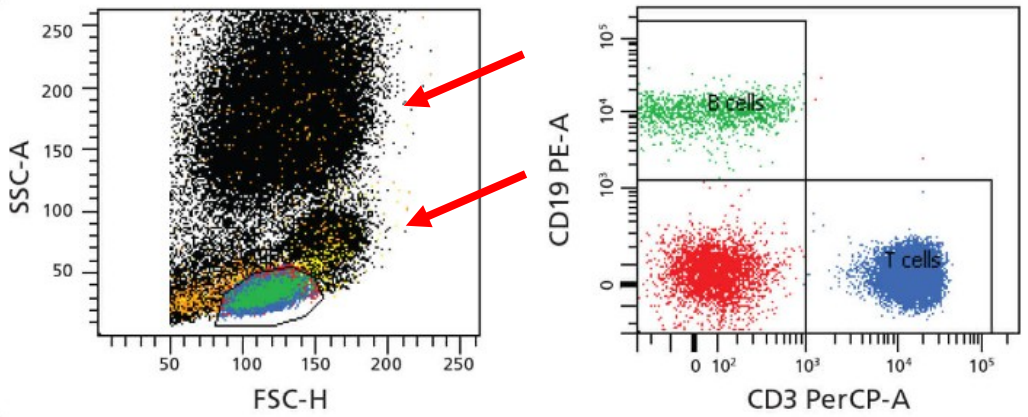
B - FCXM



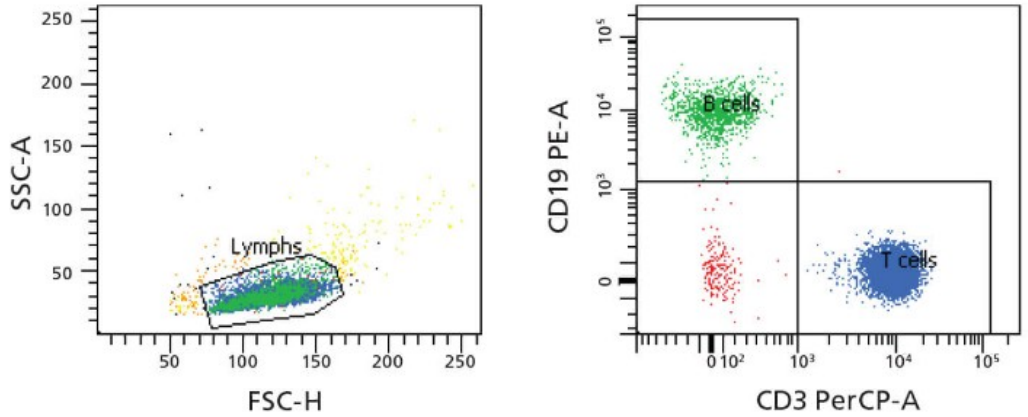
Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

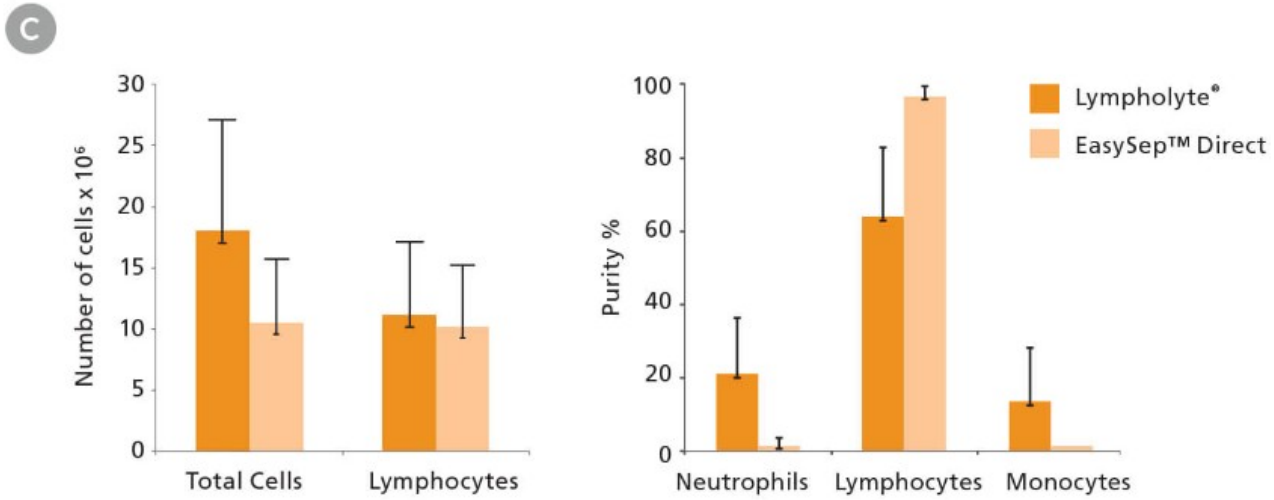
Vplyv izolačnej techniky (gradientová centrif. vs magnet. separácia)

Gradientová centrifugácia



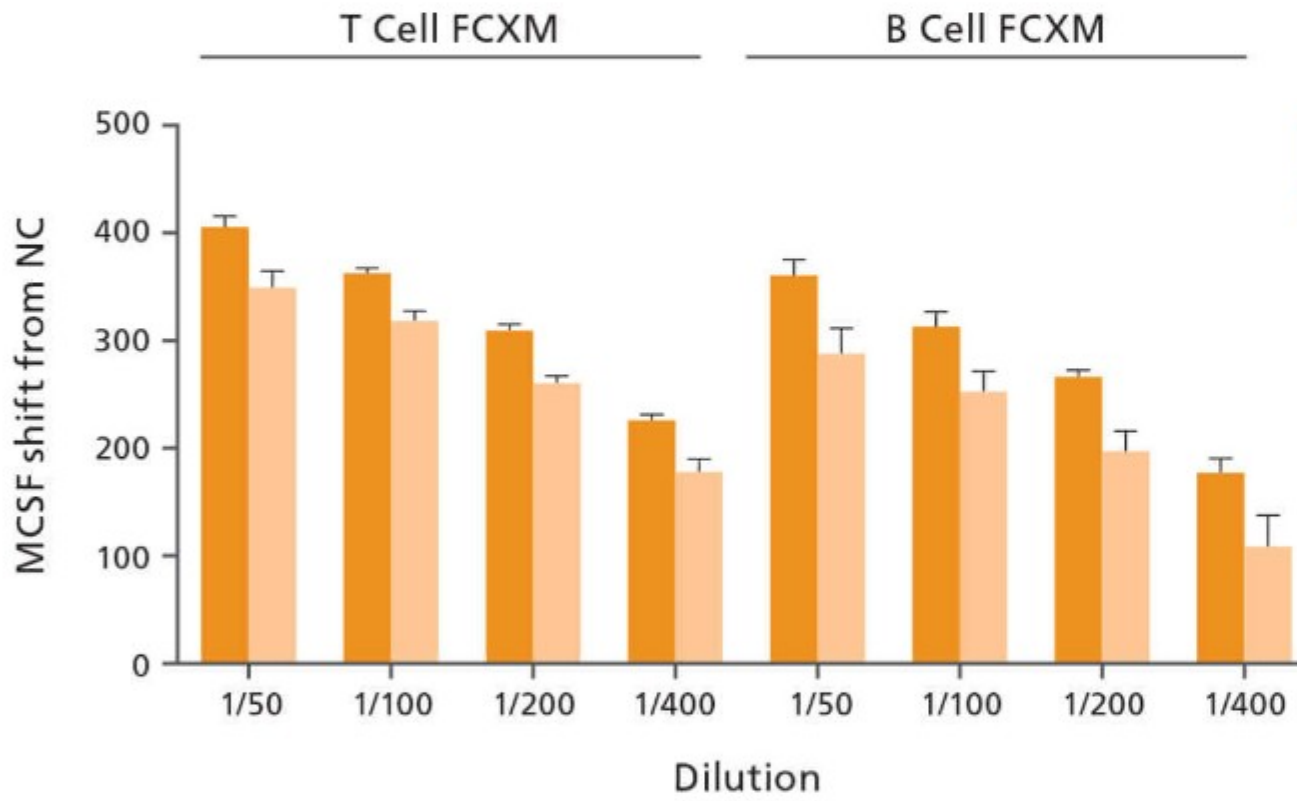
Magnetická separácia





Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

Vplyv izolačnej techniky (gradientová centrif. vs magnet. separácia)



Magnetická separácia

Gradientová centrifugácia

Liwski, Robert S et al. ,*Human immunology* vol. 79,1 (2018): 28-38.

Štandardný FCXM protokol (Garovoy et al.,1983)

Halifax/Halifaster FCXM protokol (Liwski et al., 2018)

1. Izolácia lymfocytov – gradientová centrifugácia	45 min
magnetická separácia	20 min
2. Inkubácia **5x10^5** darcovských Ly (30ul) + sérum príjemcu 30ul **(4°C)**	30 min
2,5x10^5 (25ul) 50ul **(RT)**	20 min
3. Premytie 3x (500xg/5 min)	20 min
(500xg/**1min**)	5 min
4. Inkubácia s MoAB **CD3-PerCP** (klon SK7)/**CD19-PE** (klon SJ25C1)/**IgG-FITC (4°C)**	30 min
(RT)	10 min
5. Premytie 2x (500xg/5 min)	20 min
(500xg/**1min**)	5 min
Čas potrebný na prípravu	**cca 3 hod**
	cca 1,5 hod

Take home messages



- Marginálny vplyv času inkubácie sérum+bunky nad 15 minút
- Zanedbateľný vplyv času inkubácie s IgG-FITC nad 5 minút
- Zvýšenie senzitivity FCXM testu vplyvom

  ↑ inkubačnej teploty

  ↑ pomer sérum : bunky (2:1)

  ↓ počtu buniek v suspenzii

  použitie magnetickej separácie na izoláciu lymfocytov
- Výborná medzilaboratórna reprodukovateľnosť protokolu Halifax (Liwski, R. S., et al. , Hum.Immunol. 73 (2022): 26)
- Vysoký stupeň korelácie s výsledkami vXM (Liwski, R. S et al. ,*Hum. immunol* vol. 79,1 (2028): 28-38.)

Take home messages



Implementácia protokolu Halifax v SR

- Lepšia alokácia orgánov
- Presnejšie definovanie imunologického rizika
- Lepšia reprodukovateľnosť výsledkov medzi HLA laboratóriami



Ďakujem za pozornosť

