

IMPORTANCE CLINIQUE DES ANTICORPS HLA ET NON HLA EN ALLOTRANSPLANTATION RÉNALE

par

S. SUMITRAN*

RAPPEL HISTORIQUE

La sensibilisation du receveur d'allogreffe aux antigènes HLA à la suite a) de transfusions sanguines [1], b) de grossesses multiples [2] ou c) de greffons antérieurs rejetés [3] est l'un des problèmes les plus critiques en transplantation d'organes. C'est en 1966 que l'on prit conscience de ce phénomène lorsque Kissmeyer-Nielsen et al. décrivent chez des multipares, deux cas de rejet hyperaigu de greffe cadavérique rénale qui pouvaient être attribués à des taux très élevés d'alloanticorps induits par de multiples transfusions [4]. Par la suite, la pratique de la réaction de cross-match fut introduite afin d'éviter ce problème. En conséquence de cela, on refusa de greffer les patients qui avaient un cross-match positif à quelque période que ce fut avant la transplantation.

À cette fin, les sérums de tous les patients inscrits sur une liste d'attente furent régulièrement prélevés et testés pour la présence d'anticorps lymphocytotoxiques. À cette époque, on pensait que la plupart, si ce n'est tous les anticorps cytotoxiques, étaient HLA spécifiques. Les réactions de cross-match furent effectuées avec tous les sérums historiques et récents chaque fois qu'un greffon ABO compatible était disponible. La transplantation était contre-indiquée lorsque n'importe lequel de ces sérums donnait une réaction positive en présence des lymphocytes du donneur potentiel.

De plus, l'importance de l'intensité de la réaction fut également discutée. Seules, les cellules T expriment les antigènes HLA de classe I tandis que les cellules B expriment à la fois les antigènes de classe I et de classe II. Les anticorps dirigés contre les cellules T furent les seuls dont l'importance fut clairement établie [5-6].

* Division of Clinical Immunology F-79, Karolinska Institute, Huddinge University Hospital, 5-141 86 Huddinge, Suède.

L'importance d'une réaction positive contre les seuls lymphocytes B du donneur a été discutée. En effet, les anticorps de classe II pourraient ne pas être directement néfastes à une allogreffe étant donné que les cellules endothéliales, premières cellules cibles des anticorps, n'expriment pas de façon constitutive les antigènes HLA de classe II.

À cette époque, il fut aussi clairement établi que les lymphocytes B étaient plus sensibles aux anticorps de classe I que les cellules T et qu'ils pouvaient également être réactifs à une grande variété d'anticorps tels les auto-anticorps, les anticorps RF-like, etc. [7-10]. Jusqu'à il y a peu de temps, la grande majorité des cross-match était effectuée par le test de microcytotoxicité en utilisant le sérum des patients prélevés le jour de la transplantation et les cellules spléniques ou les lymphocytes périphériques du donneur comme cibles en présence du complément. Cross et al. [11] ont décrit la présence d'anticorps cytotoxiques auto-réactifs décelés par la réaction de cross-match (à 4 °C et 22 °C). On peut penser que la présence de ces anticorps n'avait probablement aucune importance pour le devenir d'une greffe faite dans ces conditions. Ces anticorps réagissent habituellement avec les cellules B et beaucoup moins fréquemment avec les cellules T. De plus, il fut démontré que ces auto-anticorps étaient habituellement des IgM et il fut suggéré que leur présence (en l'absence de caractérisation spécifique) dans le sérum servant à la réaction de cross-match ne contre-indiquait pas la transplantation contrairement aux anticorps de type IgG [12].

Il fut également démontré que malgré une réaction de cross-match négative, utilisant le test standard de cytotoxicité complément dépendant, de nombreux patients avaient des greffons non fonctionnels ou des pertes précoces du greffon [13]. Pour cette raison, plusieurs techniques de cross-match sensibilisées furent décrites parmi lesquelles la méthode de cytométrie de flux (FACS) [14]. Qui plus est, la spécificité exacte des anticorps entraînant la positivité d'une réaction de cross-match n'est pas définie. Ainsi, dans de nombreuses études, les auteurs ont considéré que l'anticorps était HLA spécifique sans aucune donnée pour étayer cette hypothèse.

Ainsi, en dépit d'une meilleure compréhension du rôle d'une réaction de cross-match positive dans la prédiction du devenir d'un greffon, de nombreuses questions restent encore sans réponse et des controverses demeurent. Malgré l'introduction de la procédure de cross-match, les pertes de fonctions précoces de greffon et les épisodes de rejet aigu restent relativement fréquents. Ces complications pourraient être rapportées à un état d'immunisation décelable avant la transplantation par des techniques plus sensibles. De plus, l'éradication des rejets hyperaigus par les techniques conventionnelles de cross-match basées sur la lymphocytotoxicité, fut responsable d'un désintérêt de nombreux centres au développement de méthodes spécifiques plus sensibles.

Nous avons rapporté l'association d'allo-anticorps spécifiques des antigènes HLA de classe I et d'un rejet aigu précoce après greffe rénale. Nos résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

- les allo-anticorps de faible cytotoxicité ne réagissant qu'avec les lymphocytes B ont souvent une spécificité HLA de classe I et leur présence est associée à une diminution de la survie du transplant [15] ;
- les anticorps HLA de classe I non cytotoxiques mis en évidence uniquement par cytométrie de flux, sont associés avec des épisodes de rejet aigu [16] ;

- la méthode de microlymphocytotoxicité est peu sensible et présente une forte proportion de réactions faussement positives alors que la cytométrie de flux est plus précise et plus fiable. C'est pourquoi l'inclusion de test de spécificité des anticorps réagissant avec le donneur est essentielle à la réalisation de transplantation chez des patients ayant de fausses réactions positives de cross-match dues à des anticorps non HLA ;
- il n'a pas été possible de montrer que des anticorps HLA de classe II dirigés contre le donneur soient associés à un risque accru de rejet précoce du greffon ni à une diminution de sa survie à un an ;
- les anticorps délétères pour la greffe peuvent être de classe IgM, IgG1-4 ou IgA [17] ;
- les cross-match en cytométrie de flux ont amélioré la survie des greffons d'environ 10 p. 100 pendant la première année et ont diminué la fréquence des épisodes de rejet aigu chez les patients à « haut risque » à cause d'une immunisation HLA. Il est également important de mentionner que les méthodes de lymphocytotoxicité ont une sensibilité et une spécificité faible car elles ne décèlent que les classes d'immunoglobulines fixant le complément. Les techniques utilisant le FACS sont plus sensibles (40X) et peuvent être utilisées pour mettre en évidence toutes les classes d'immunoglobulines. Nous nous sommes aperçus qu'il n'était pas rare que les sérums ne contiennent que des allo-anticorps ne fixant pas le complément.

IMPORTANCE CLINIQUE DE LA MISE EN ÉVIDENCE D'ANTICORPS ANTI-HLA SPÉCIFIQUES CHEZ DES PATIENTS ALLO-IMMUNISÉS EN ATTENTE D'UNE TRANSPLANTATION D'ORGANES

Nos données montrent que par l'utilisation des techniques de FACS (qui tout en permettant d'obtenir moins de faux positifs et moins de faux négatifs ne sont cependant pas encore parfaites), il est possible de diminuer la fréquence des rejets aigus de plus 50 p. 100 chez les patients sensibilisés. Pour cette raison nous avons plus récemment concentré nos efforts sur la mise au point de nouvelles méthodes fiables, rapides et de coût acceptable pour la détermination plus fine, avant transplantation, d'anticorps anti HLA spécifiques de classe I et II. Cela devrait permettre une diminution supplémentaire des rejets aigus de 50 p. 100 environ à moins de 25 p. 100 (tableau I), et avoir un très grand impact sur les coûts et la qualité de vie des patients. Les tests de détection d'anticorps anti HLA ayant une importance clinique ont toujours, par le passé, été difficiles à réaliser, pas toujours fiables et, ce qui est plus important, inutilisables en situation d'urgence.

Initialement, nous avons utilisé, pour bloquer la réaction cytotoxique, des anticorps monoclonaux murins dirigés contre les antigènes HLA humains de classe I ou de classe II afin de mettre en évidence la présence d'anticorps HLA spécifiques dans les sérums utilisés pour le cross-match. Malheureusement, cette méthode a de nombreuses limites [15]. Nous avons donc mis au point une nouvelle méthode d'absorption spécifique qui permet la mise en évidence d'anticorps anti HLA spécifiques. Elle utilise des antigènes solubles HLA de classe I et II provenant d'un pool de lymphocytes spléniques et de thrombocytes [18]. Les préparations d'anti-

TABLEAU I. — PRINCIPALES MÉTHODES DE DÉTECTION DES ANTICORPS HLA

MÉTHODE	ANTICORPS DÉCELÉS	COMMENTAIRES
Absorption sur plaquettes	HLA de classe I uniquement	Pas spécifique Peu fiables dans le sérum avec des mélanges d'anticorps Nécessité d'un pool important de plaquettes Peut absorber des complexes immuns Impossible dans des situations cliniques de transplantation cadavérique
Traitement par l'acide	HLA de classe I uniquement	Bon marché, rapide et spécifique réalisable en transplantation d'organes cadavériques
Méthode de blocage utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes HLA de classe I et de classe II	HLA de classe I et II et non HLA	Spécifique, mais peut ne pas bloquer les allo-anticorps dirigés contre des déterminants polymorphes Nécessité de diluer les sérums coûteuse Long temps d'incubation Pas utilisable en situation clinique d'urgence
Méthode d'inhibition utilisant des antigènes solubles purifiés HLA de classe I et de classe II	HLA de classe I et II et non HLA	Spécifique et rapide Préparation fastidieuse des antigènes HLA Peut être utilisée en ELISA en complément de l'analyse du panel
Méthode d'absorption utilisant des microbilles recouvertes de molécules solubles HLA de classe I ou de classe II	HLA de classe I et II et non HLA	Très spécifique et rapide Ne nécessite pas de cellules vivantes Facile à adapter aux situations cliniques d'urgence Complément idéal de l'analyse du panel

gènes HLA solubles peuvent, dans la plupart des cas, être utilisées dans les situations d'urgence, l'absorption des anticorps se faisant en 45 minutes environ. Cette méthode a également des limitations et deux désavantages principaux [18].

Plus récemment nous avons utilisé des antigènes HLA solubles, pour définir la spécificité des anticorps anti HLA, en recouvrant des microbilles magnétiques par ces antigènes. Cette méthode nécessite donc l'utilisation de billes magnétiques recouverte

d'antigènes anti HLA solubles qui sont ajoutés au sérum du patient. Les allo-anticorps anti HLA qui s'y fixent peuvent être secondairement détectés par l'utilisation d'anticorps fluorescent. Cette méthode est particulièrement intéressante par son coût étant donné que ces billes peuvent être recyclées [19]. L'ensemble de la procédure ne prend que 45 minutes et peut donc être facilement utilisée pour réaliser des cross match en situation d'urgence. De plus, les problèmes rencontrés lors de l'utilisation d'antigènes HLA purifiés solubles sont surmontés par l'utilisation des méthodes des microbilles magnétiques. Il est possible d'effectuer environ 900 tests avec les antigènes HLA extraits de 80 à 100 échantillons de thrombocytes périmés.

Nous avons également décrit une nouvelle méthode pour la purification des antigènes anti-HLA solubles provenant d'un pool de lymphocytes ou de plaquettes [19]. Dans nos travaux les plus récents nous avons montré que l'utilisation de microbilles magnétiques recouvertes d'antigènes solubles de classe I ou II, spécifiques du donneur, révélait la présence d'anticorps anti-HLA réactifs chez un nombre de patients significativement plus grands que lorsque l'on utilise soit l'absorption sur plaquette, soit le blocage de la cytotoxicité par des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes HLA. La mise en évidence d'anticorps HLA spécifiques par cette méthode est très fortement corrélée avec le taux de rejet aigu et la perte précoce des greffons ($p < 0,001$) [20].

Nous avons montré que le traitement des lymphocytes par un tampon acide (pH) pouvait faire disparaître sélectivement des molécules fonctionnelles HLA de classe I pendant une période de temps courte. Les lymphocytes sont mis en présence d'une solution acide pendant 5 à 6 mn on observe alors une réduction importante de l'antigénicité HLA de classe I. Le sérum des patients contenant des anticorps anti-HLA de classe I multi-spécifiques ne réagissent pas avec les cellules traitées par l'acide, indiquant ainsi qu'ils ne contiennent que des anticorps anti-HLA de classe I. C'est à bon escient que cette méthode peut être adoptée pour rechercher la présence d'anticorps réactifs anti-HLA de classe I dans la situation d'urgence d'une transplantation d'organe cadavérique, à condition que le sérum ne contienne que des anticorps anti-HLA de classe I [21].

L'analyse des sérums de patients insuffisants rénaux constitue la majeure partie de la charge de travail d'un laboratoire d'immunologie clinique de transplantation. Actuellement, l'établissement d'un panel pour la recherche d'allosensibilisation utilise une méthode qui est fastidieuse, longue et est associée à un taux élevé de réactions faussement négatives ou faussement positives. Pour cette raison, l'un des sujets les plus habituellement discutés lors des « workshops » sur la réaction de cross-match est celui de la mise au point de nouvelles méthodes, plus commodes et plus spécifiques, pour déterminer les spécificités HLA d'anticorps réagissant contre le panel (PRA). Les techniques d'ELISA ainsi que la cytométrie de flux, utilisant des microbilles non autofluorescentes couplées avec des antigènes de classe I et de classe II, sont disponibles pour étudier contre le panel le sérum des patients attendant une transplantation [22-24]. La première publication concernant l'efficacité des méthodes ELISA pour la détermination des anticorps anti HLA fut publiée par Kao et al. [25]. Il purifia des antigènes HLA à partir d'un pool de plaquettes et coupla les antigènes directement sur les plaques ELISA. Cette méthode semble avoir à la fois une grande sensibilité et une grande spécificité ainsi que nous avons pu le confirmer. Il existe aussi, dans le commerce, des kits tel que le PRA-STAT, un test de type ELISA qui permet la détection d'anticorps vis-à-vis d'un panel, qui sont d'utilisation usuelle dans de nombreux laboratoires de transplantation.

IMPORTANCE CLINIQUE DES ANTICORPS NON HLA (SPÉCIFIQUES DES CELLULES ENDOTHÉLIALES) COMME CAUSE DU REJET D'ALLOGREFFE

La présence, dans les sérums de prétransplantation, d'anticorps ne réagissant pas avec les lymphocytes a été rapportée en transplantation rénale [26]. Des antigènes présents sur les cellules de l'endothélium vasculaire (VEC), mais qui ne sont pas exprimés sur les lymphocytes ont été mis évidence [27]. La majorité des patients qui ont des anticorps réagissant avec les cellules endothéliales ont également des anticorps dirigés contre les monocytes ; la spécificité exacte de tels anticorps reste à élucider. On a incriminé ces anticorps dans la survenue d'épisodes réversibles ou irréversibles de rejet précoce observée lors de transplantations d'organes génétiquement HLA identique. Par définition, de tels anticorps devraient être spécifiques d'antigènes non HLA. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'importance de ces anticorps. En effet, leur effet délétère est parfois démontré [26], alors qu'ailleurs il est prétendu qu'ils n'ont aucun effet sur la survie du greffon [28].

Dans notre propre série, nous avons pu observer, en étudiant les anticorps dans les phases pré- et post-transplantation rénale, une jeune fille de 10 ans non immunisée, qui rejeta de façon hyperaigue deux allogreffes rénales. Il est vraisemblable que ces rejets furent la conséquence d'une immunisation spécifique des cellules endothéliales [29]. Son troisième rein fut perdu dans la première semaine qui suivit la transplantation. Les études immunopathologiques des reins rejetés montrèrent l'existence de dépôts d'IgM sur l'endothélium des artères et dans quelques glomérules. Les anticorps trouvés chez cette patiente ne réagissaient pas avec les lymphocytes, les monocytes ou les kératinocytes. Il existait dans son sérum des anticorps de type IgM qui réagissaient de façon spécifique avec des cellules endothéliales cultivées. Ceci fut démontré par la fixation in vitro à des cellules endothéliales ainsi que par cytotoxicité complément dépendante de cellules endothéliales stimulées par l'IL-1 β . Une protéine cible de 97-110 kDa fut identifiée par Western blots à partir des membranes des cellules endothéliales. Des préparations d'antigènes endothéliaux furent effectuées à partir de plusieurs veines de cordons ombilicaux. Étant donné que quelques cultures cellulaires primaires seulement, mais aucune autre, réagissaient avec le sérum du patient, nous avons formulé l'hypothèse que le déterminant cible pouvait être polymorphe. Il découle de nos résultats que les molécules non HLA spécifiques des cellules endothéliales fonctionnent comme cible(s) lors des destructions hyperaiguës d'allogreffe rénale médiée par anticorps. Étant donné que la patiente n'était pas immunisée, nous pensons que ses anticorps (déjà mis en évidence un an avant la première transplantation) peuvent avoir été la conséquence d'une infection virale d'étiologie inconnue survenue chez cette patiente un an avant sa première transplantation. Nous avons observé chez trois autres patients des rejets aigus. Ces patients possédaient également des anticorps dirigés contre cet antigène de cellules endothéliales. Aucun de ces patients n'avait d'anticorps anti-HLA. De plus, dans une étude en cours, nous avons pu mettre en évidence des anticorps spécifiques des cellules endothéliales chez un grand nombre de receveurs d'allogreffe rénale présentant des problèmes immunologiques précoces en l'absence complète de toute réactivité humorale HLA spécifique.

MÉCANISMES DES LÉSIONS IMMUNOLOGIQUES MÉDIÉES PAR DES ANTICORPS

Dans le passé, l'importance et la contribution des anticorps dans le rejet des greffes a été sous estimée. Cependant, le développement de nouvelles méthodes pour la détermination de la spécificité des allo-anticorps nous a permis plus récemment, ainsi qu'à d'autres, de montrer l'importance d'une détermination et d'une discrimination correcte des allo-anticorps HLA spécifiques importants pour la clinique. L'intérêt de définir le rôle des anticorps en tant que tels, ainsi que leur rôle dans l'induction d'épisodes de rejet aigu est devenu croissant. Les anticorps humoraux peuvent entraîner des lésions tissulaires par eux-mêmes ou en collaboration avec des cellules inflammatoires/immunocompétentes. Ainsi que nous l'avons dit plus haut, le rejet hyperaigu survient chez des receveurs ayant des anticorps HLA préformés spécifiques du donneur de classe I. Le mécanisme des lésions tissulaires semble se faire directement, soit par des mécanismes de cytotoxicité dépendante du complément, soit par une activation des cellules endothéliales, dépendante du complément ou non, qui pourrait induire un état procoagulant générateur de thrombose. Il ne semble pas que la cytotoxicité directe médiée par le complément ait une importance cruciale dans le rejet hyperaigu étant donné que la plupart des endothéliums sont largement fournis en régulateurs du complément humain. Dans ces conditions, le mécanisme du rejet hyperaigu n'est pas entièrement clair. Il est cependant possible que des cellules endothéliales, lésées par l'ischémie ou la reperfusion, puissent devenir plus sensibles que des cellules normales. L'activation par les anticorps des cellules endothéliales pourrait également contribuer à un accroissement de l'extravasation de cellules immuno-compétentes allo-immunes qui faciliteraient le rejet précoce.

Des anticorps spécifiques du greffon pourraient aussi agir comme agonistes ou antagonistes pour des molécules biologiquement importantes présentes à la surface des cellules. Nous ne pensons pas que les anticorps anti HLA puissent avoir de tels effets, mais il est concevable que des anticorps d'autres spécificités puissent interférer avec les fonctions physiologiques des cellules endothéliales.

Les anticorps coopérant avec les cellules porteuses de récepteurs Fc pourraient induire des lésions des cellules cibles, phénomène connu sous le nom d'ADCC [30]. Il reste maintenant à déterminer si ce type de cytotoxicité contribue au rejet d'allogreffe rénale.

L'alloactivation peut survenir directement lors de la reconnaissance, par les cellules T de l'hôte, de complexes allopeptide-MHC allogénique présent sur des cellules professionnelles présentatrices de l'antigène qui migrent vers les organes lymphoïdes régionaux et induisent l'alloactivation. Cependant, une activation indirecte, c'est-à-dire contre les protéines provenant des cellules du donneur présentées, après captation et modification, par les cellules de l'hôte présentatrices de l'antigène, peut aussi être observée. La capture des protéines étrangères est facilitée par la présence d'anticorps circulants. Ainsi, des anticorps HLA préformés, spécifiques du donneur, peuvent faciliter l'alloimmunité indirecte HLA spécifique.

Finalement, la liaison anticorps sur les cellules cibles du greffon peut entraîner le recrutement dans ce greffon de cellules inflammatoires, porteuses du récepteur Fc, contribuant de cette façon à l'inflammation aiguë comme on l'observe dans l'hypersensibilité retardée.

Il est également possible que des anticorps non cytotoxiques puissent avoir un rôle régulateur, étant donné que l'on peut obtenir, par les anticorps spécifiques du MHC, une inhibition efférente des lymphocytes T cytotoxiques. Seuls certains isotypes des anticorps se fixent au complément, et seuls certains isotypes Ig se fixent efficacement aux récepteurs Fc. L'importance respective des anticorps du donneur, réactifs de différentes classes d'immunoglobulines, dans la potentialisation ou l'inhibition de l'allo-immunité cellulaire est actuellement mal comprise.

SIGNIFICATION

Ce n'est que par une recherche permanente d'une meilleure définition et d'une évaluation correcte de la spécificité des anticorps réactifs du donneur que l'on parviendra à améliorer notre connaissance des anticorps potentiellement délétères pour les allogreffes. Cette information, cliniquement fondamentale, peut être obtenue avant la transplantation. Il est ainsi maintenant possible d'identifier les combinaisons donneur/receveur qui impliquent un risque de complications immunologiques précoces après transplantation. Une meilleure allocation de l'organe d'un donneur précis devrait entraîner une diminution des complications précoces, réduire les coûts de la transplantation, tels les hospitalisations, les traitements onéreux à base d'anticorps monoclonaux et de plasmaphères et, par dessus tout, améliorer la qualité de vie des patients transplantés. La détermination du rôle direct possiblement jouée par les anticorps dans le déclenchement des réactions de rejet aigu, et pas uniquement comme marqueur d'une sensibilisation cellulaire concomitante, devrait conduire à l'utilisation de nouveaux protocoles thérapeutiques en transplantation. De cette manière, l'adjonction aux procédures de cross-match courantes de tests apportant une spécificité supplémentaire sera un pas en avant dans l'amélioration de la survie des allogreffes. Les données de telles études auront une signification à la fois clinique et théorique.

BIBLIOGRAPHIE

1. DAUSSET J. Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood transfusion. *Vox Sang*, 1954, **4**, 190.
2. PAYNE R, ROLFS MR. Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest*, 1958, **37**, 1756.
3. WALFORD RL, CARTER PK, ANDERSON RE. Leukocyte antibodies following skin homografting in the human. *Transplant Bull*, 1964, **29**, 106.
4. KISSMEYER-NIELSEN F, OLSEN S, PETERSEN VP et al. Hyperacute rejection of kidney allografts associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, 1966, **2**, 662-665.
5. CARDELLA CJ, FALK JA, NICHOLSON MJ et al: Successful renal transplantation in patients with T cell reactivity to donor. *Lancet*, 1982, **2**, 1240-1243.
6. FULLER TC, FORBES JB, DELMONICO FL. Renal transplantation with a positive historical donor cross-match. *Transplant Proc*, 1985, **17**, 113-114.
7. MORRIS PJ, OLIVER DO, WILLIAMS K et al. Renal transplantation and a positive serological cross-match, 1977, **1**, 1288-1291.
8. D'APICE AJ, TAIT BD. Improved survival and function of renal transplants with positive B cell cross-match. *Transplantation*, 1979, **27**, 324-328.
9. COXE-GILLILAND R, CROSS DE. Warm B-cell antibodies and DRw matching : their influence on transplant outcome at a single center. *Transplant Proc*, 1981, **13**, 945-948.
10. LINDHOLM A. *Transplant Proc*, 1986, **18**, 23.

11. CROSS DE, GREINER R, WHITTIER FC. Importance of the autocontrol crossmatch in human renal transplantation. *Transplantation*, 1976, **21**, 307-311.
12. IWAKI Y, LAU M, TERASAKI PI. Successful transplants across T warm positive cross-matches due to IgM antibodies. *Clin Transplant*, 1988, **2**, 81-84.
13. IWAKI Y, TERASAKI PI. Primary nonfunction in human cadaver kidney transplantation : evidence for hidden hyperacute rejection. *Clin Transplant*, 1987, **1**, 125-131.
14. GAROVOY MR, RHEINSCHEIDT MA, BIGOS M et al. Flow cytometry analysis: a high technology cross-match technique facilitating transplantation. *Transplant Proc*, 1983, **15**, 1939-1944.
15. SUMITRAN-KARUPPAN S, LINDHOLM A, MÖLLER E. Characterization and significance of donor-reactive B cell antibodies in current sera of kidney transplanted patients. *Transplantation*, 1990, **49**, 510-515.
16. SUMITRAN-KARUPPAN S, LINDHOLM A, MÖLLER E. Fewer acute rejection episodes and improved outcome in kidney transplanted patients with selection criteria based on crossmatching. *Transplantation*, 1992, **53**, 666-673.
17. SUMITRAN-KARUPPAN S, OHLMAN S, MÖLLER E. The occurrence of cytotoxic and non-complement fixing antibodies in the crossmatch serum of patients with early acute rejection episodes. *Transplantation*, 1992, **54**, 839-843.
18. SUMITRAN-KARUPPAN S, MÖLLER E. Specific inhibition of HLA class I and II antibodies by soluble antigens — a method for the identification of antibody specificity in sera from alloimmunized individuals. *Transplantation*, 1994, **58**, 713-719.
19. SUMITRAN-KARUPPAN S, MÖLLER E. The use of magnetic beads coated with soluble HLA class I or class II protein in antibody screening and for specificity determinations of donor-reactive antibodies. *Transplantation*, 1996, **61**, 1539-1545.
20. SUMITRAN-KARUPPAN S. The clinical importance of choosing the right assay for detection of HLA-specific donor-reactive antibodies. *Transplantation*, 1999, **68**, 502-509.
21. SUMITRAN-KARUPPAN S, MÖLLER E. Acid-treatment of lymphocytes selectively decreases the expression of HLA class I antigens : a method to confirm that a positive clinical crossmatch test was due to class I antibodies. *Transplant Immunol*, 1996, **4**, 163-168.
22. BRYAN CF, BAIER KA, FLORA-GINTER G et al. Detection of HLA IgG antibodies by two enzyme-linked immunoassays, solubilized HLA class I and PRA-STAT: comparison with the AHG PRA. *Transplantation*, 1995, **60**, 1588-1594.
23. ZACHARY AA, GRIFFIN J, LUCAS DP et al. Evaluation of HLA antibodies with the PRA-STAT test : an ELISA test using soluble HLA class I molecules. *Transplantation*, 1995, **60**, 1600-1606.
24. PEI R, WANG G, TARSITANI C et al. Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. *Human Immunol*, 1998, **59**, 313.
25. KAO KJ, SCORNIK JC, SMALL SJ. Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies-an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation*, 1993, **55**, 192-196.
26. CERILLI GJ, BRASILE L, GALOUZIS T et al. The significance of antimonocyte antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 1981, **32**, 495-497.
27. CERILLI J, BRASILE L, GALOUZIS T et al. The vascular endothelial cell antigen system. *Transplantation*, 1985, **39**, 286-289.
28. EVANS PR, TRICKETT LP, GOSNEY AR et al. Detection of kidney reactive alloantibodies at crossmatch in renal transplantation recipients. *Transplantation*, 1988, **46**, 844-852.
29. SUMITRAN-KARUPPAN S, TYDEN G, REINHOLT F et al. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant Immunol*, 1997, **5**, 321-327.
30. KIRBY JA, GIVAN AL, SHENTON BK et al. Renal allograft rejection. Possible involvement of antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. *Transplantation*, 1990, **50**, 225-229.