

出國報告 (出國類別：進修)

器官移植配對檢驗及移植術後組織抗原免疫評估之新檢驗技術

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院/檢驗醫學部

姓名職稱：高義順/院聘醫事檢驗師

派赴國家：美國/加州大學舊金山分校

出國期間：105年09月01日至105年10月31日

報告日期：105年12月28日

摘要 (200-300 字)

高義順醫檢師於 2016 年 09 月 01 日至 2016 年 10 月 31 日至加州大學舊金山分校附設醫學中心外科部之免疫及移植實驗室 (The Immunogenetics and Transplantation Laboratory, ITL)，主要目的為學習使用流式細胞儀進行器官移植配對檢驗 (Flow Crossmatch)。美國加州大學舊金山分校免疫及移植實驗室提供異體移植專門檢驗診斷業務，為美國 ASHI 外部品管測試計畫的國家級參考實驗室，NIH Immune Tolerance Network 的核心實驗室，同時也是北加州器官勸募中心之合約實驗室，一年大約有 300-500 件緊急器官移植檢驗配對案例。同時也具有 CAP(美國病理家協會)認證。本次進修之內容除了學習流式細胞儀淋巴球交叉配對檢驗外，也利用工作之餘的時間，向該實驗室之資深醫事檢驗師及醫學主任請教關於 HLA 分型及 HLA 抗體鑑定之相關知識。本次進修主要收穫為：(1)學習如何使用流式細胞儀進行淋巴球交叉配對實驗及相關方法建立；(2)HLA 抗體鑑定報告判讀；(3) 與國外器官移植實驗室進行經驗分享和資訊交流。回國後，將會把學習到的知識應用在本院器官移植配對檢驗工作及檢驗方法和流程之改善。

目次

壹、進修目的.....	1
貳、進修過程.....	1
參、進修心得.....	5
肆、建議事項.....	6
伍、附錄.....	7

壹、進修目的

- 一、學習使用流式細胞儀進行淋巴球交叉配對實驗與方法建立 (Flow Crossmatch)
- 二、人類白血球抗原 (Human Leukocyte Antigen, HLA)之抗體鑑定報告初步判讀
- 三、器官移植實驗室經驗分享與資訊交流

貳、進修過程

進修日期	進修內容	指導人員
2016.09.01 至 2016.09.09	臨床實驗室安全衛生訓練、實驗室新進人員基本訓練	Kong, Denice (Lab Manager)
2016.09.12 至 2016.09.19	流式細胞儀進行淋巴球交叉配對相關實驗之標準操作程序閱讀 (文件閱讀)；移植案例請教與經驗交流	Lai, Jack (Group Leader)
2016.09.20 至 2016.10.07	實際操作流式細胞儀進行淋巴球交叉配對實驗	Lai, Jack (Group Leader)
2016.10.10 至 2016.10.19	學習如何進行淋巴球交叉配對之前置處理，以排除特定干擾 (Pronase Treatment)	Lai, Jack (Group Leader)
2016.10.21 至 2016.10.28	學習如何規劃淋巴球交叉實驗之品管驗證計畫； 學習 HLA 抗體之報告初步判讀	Cunniffe, Kelly (Supervisor) Buenaventura, Owen (Group Leader)

一、流式細胞儀進行淋巴球交叉配對實驗 (Flow Crossmatch)

(一) 實驗目的：

利用流式細胞儀之高敏感度，偵測器官移植受贈者血清和捐贈者細胞之排斥情況

(二) 實驗方法及操作流程

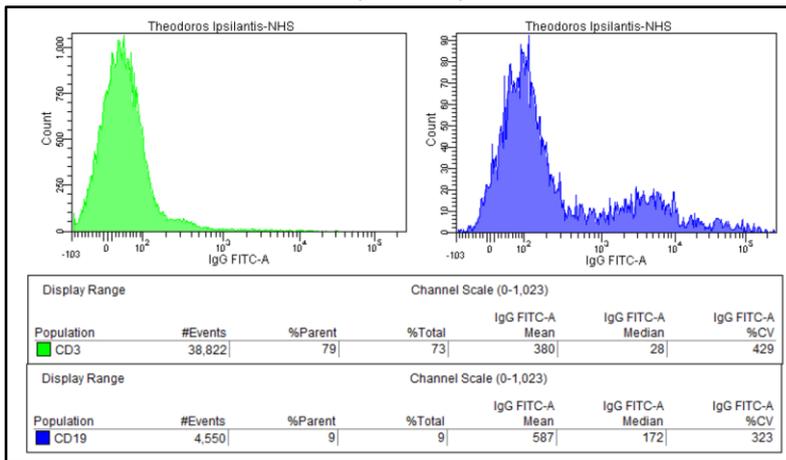
1. 取 4 管 ACD 採血管之 buffy coat 於 14 mL 試管中，使用 EasySep™ 試劑套組分離淋巴球細胞。注意：需使用 PBS 緩衝液不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ，最後使用 4% FBS RPMI 回溶淋巴球細胞。
2. 實驗之控制組：
PBS 緩衝液 (背景值)，正常人類血清 (陰性控制組)，陽性控制組，病人血清
3. 實驗前將所有待測血清 (含控制組)在 13000 轉之離心條件下離心 5 分鐘 (去除干擾物)
4. 進行細胞計數，調整細胞濃度至每個反應孔內含有 $1 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 之淋巴球細胞
5. 使用 96 well 孔盤進行實驗，加入定量之淋巴球細胞，以 2000 轉離心 3 分鐘，去除上清液，之後將實驗組之血清加入孔盤中，使淋巴球細胞和血清於室溫進行反應，時間 20 分鐘。
6. 細胞和血清反應 20 分鐘後，使用 2% FBS FACS 洗滌用緩衝液清洗三次，洗去細

胞上面非特異性結合之雜質。

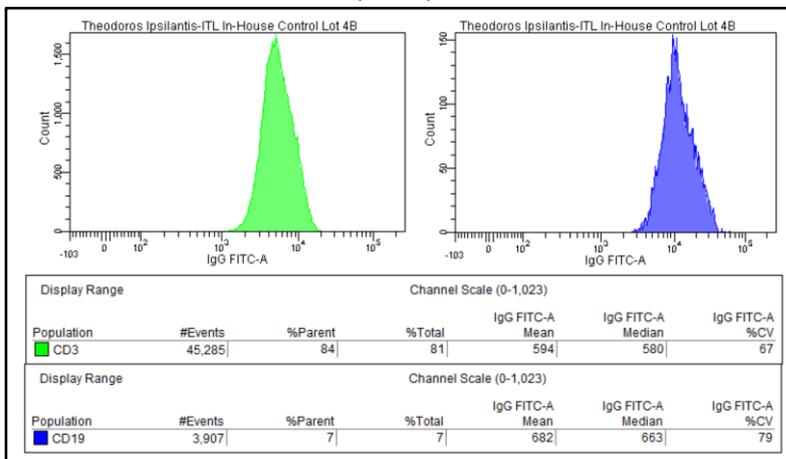
7. 在清洗步驟結束後，加入螢光抗體進行染色(IgG-FITC 10 uL, CD3-PerCP 10uL, CD19-PE 10 uL)，於 4 度 C 下避光反應 20 分鐘。
8. 螢光抗體反應 20 分鐘後，使用 2% FBS FACS 洗滌用緩衝液清洗二次，洗去細胞上面多餘之螢光抗體。
使用 FACS 洗滌用緩衝液回溶細胞，並使用流式細胞儀測定實驗結果。

(三) 實驗結果：

1. 淋巴球交叉配對陰性 (不排斥)：



2. 淋巴球交叉配對陽性 (排斥)：



(四) 使用 Pronase 進行前處理，去除影響交叉配對干擾之實驗：

1. 目的：

因 B 淋巴球細胞表面有許多 Fc 受器 (Fc Receptor)，可能影響淋巴球交叉配對實驗之結果。使用 Pronase 處理，可使 Fc 受器造成的影響和干擾下降，進而使交叉配對實驗結果更為準確。

2. 實驗前，先進行淋巴球細胞計數。取 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 細胞至 1 mL 離心管。
3. 將離心管以 2500 xg 之離心力離心 2 分鐘，去除上清液後，以 PBS 緩衝液不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 進行清洗步驟二次
4. 準備 1 mL 之 Pronase，加入含有細胞之離心管中，於 37 度 C 反應 30 分鐘
5. 反應完成後，加入 100 uL 之 DNase 至離心管中，均勻混合後以 2500 xg 之離心力離心 2 分鐘，去除上清液。
6. 使用 10% FCS/FBS RPMI-1640 溶液清洗細胞二次，並使用 2% FCS/FBS FACS 洗滌緩衝液回溶細胞。
7. 再次進行細胞計數，並使用 2500 xg 之離心力離心 2 分鐘，去除上清液。
8. 加入符合細胞數量比例之 Anti-CD20 (Murine) 抗體以阻抗 CD20 抗原，加入抗體後於室溫反應 20 分鐘。
9. 使用 2% FCS/FBS FACS 洗滌緩衝液清洗細胞，去除非特異性結合之雜質。
10. 最後使用 2% FCS/FBS FACS 洗滌緩衝液回溶細胞。
11. 本實驗處理完成之細胞僅能在 4°C 的環境下保存 12 小時，需盡快進行交叉配對實驗。

二、人類白血球抗原(HLA)之抗體鑑定報告初步判讀

(一) HLA 抗體鑑定目的及原理：

HLA 抗體的存在會造成移植排斥，移植前後抗體的存在與否都會影響移植的成功率。LABScreen Single Antigen 方法使用流式細胞測量的技術來偵測 HLA 抗體，監控移植後病人及移植前 HLA 抗體移除策略及療效追蹤。LABScreen 是利用於微珠上面塗佈純化之 HLA 抗原，以偵測人類血清中是否含有 HLA 抗體。病人的血清檢體首先與 LABScreen 微珠混合培養，任何血清裡的 HLA 抗體會與微珠上的抗原結合，並用 R-Phycoerythrin (PE) 結合 goat anti-human IgG 標示之。LABScan100 流式細胞儀能偵測每個微珠其 PE 散發出來的螢光，即時收集每個帶有不同抗原的微珠所發出的螢光訊號，再以 Fusion 軟體分析病人血清中的 HLA 抗體。

(二) HLA 抗體鑑定報告判讀基本原則

1. 由實驗室主管 (Medical Director) 訂出檢驗結果之標準，將結果分成強陽性、陽性、弱陽性以及陰性，並設定其數值區間。
2. 比較病人過去 HLA 抗體鑑定報告和本次報告之異同，判斷哪些 HLA 抗體為穩定出現之抗體。
3. 排除對抗自體抗原之 HLA 抗體。
4. 詳細檢視每一筆螢光訊號之數值，排除或納入可能之 HLA 抗體。
5. 需特別注意，細菌感染可能造成 HLA 抗體鑑定結果為陽性。

(三) HLA 抗體鑑定常見之非特異性結果 『此段為專業領域，僅以英文表示』

1. MFI value <2000-3000
2. Male (Usually but not always)
3. No previous transplantation history
4. Not Clustered (beads, probes)
5. Class I (Lot 009) : Cw1, Cw12, Cw15
6. Class II (Lot 011) : DP1, DP5, DP6, DP11 ; DR16, DR14, DR52, DP19, or DP10 ; DR4, DR16, DR52, DP10

三、器官移植實驗室經驗分享與資訊交流

(一) 有關 HLA IgM 抗體及非特異性干擾：

1. HLA 抗體鑑定和淋巴球交叉配對實驗中，最有效去除非特異性 IgM 抗體干擾之方法為「Dithiothreitol Treatment」
2. 進行 HLA 抗體鑑定或篩檢前，應使用 Dithiothreitol 處理病人血清。
3. IgM 抗體通常為自體抗體或冷型抗體，於臨床上較無太大意義。
4. 美國醫師和臨床實驗室普遍不考慮 IgM，就算受贈者體內有 IgM 也不予理會，因為在美國一般不將 IgM 視為有意義的抗體。就算忽略 IgM，移植器官的存活率仍舊能維持。重要的是 Anti-HLA IgG 抗體。
5. 在進行 HLA 抗體篩檢或鑑定前，如果病人有對乳膠製品過敏之病史，應該考慮使用 Adsorb Out beads (製造商：One Lambda)處理病人血清。Adsorb Out beads 可處理病人血清中一些非特異性的雜質。
6. IgM 抗體會影響目前我們所使用的 HLA 抗體鑑定系統，主要是因為偵測抗體之微珠上的 HLA 抗原，其純度和密度都相對一般細胞來得高，IgM 可能會阻擋抗原結合位，進而造成實驗結果的偽陰性。然而流式細胞儀法進行交叉配對不會受其影響，主要是因為是使用新鮮之淋巴球活細胞，細胞表面有許多不同的抗原，不單單只有 HLA 抗原，所以受 IgM 抗體的影響較小。
7. 為何美國的實驗室選擇使用 Dithiothreitol 而不是使用加熱的方式來處理 IgM 抗體干擾？ 答：(1) 加熱容易使實驗的背景值上升，不利實驗室區分陰性和陽性結果，使抗體鑑定困難。(2) 溫度較難進行品質管理，而 Dithiothreitol 是化學物質，只要確保濃度正確即可。

(二) 進行任何淋巴球細胞相關的實驗前，應進行細胞計數以確保實驗之一致性。

(三) 目前本院進行之淋巴球交叉配對實驗 (CDC Lymphocyte Crossmatch)，若病人血清中存在 IgG、IgM 之 HLA 抗體或 non-HLA 抗體，都有可能導致其結果為陽性。

(四) 本院之 HLA 抗體篩檢實驗 Flow PRA，實驗應帶入陰性控制組微珠以協助判斷結果。Flow PRA 之結果可能受到 IgM 抗體或 anti-latex 抗體干擾。

(五) 美國實驗室進行淋巴球交叉配對實驗 (CDC Lymphocyte Crossmatch)之 AHG (Anti-Human Globulin) phase 只針對 T 淋巴球細胞，B 細胞較為脆弱，故不進行 AHG phase。AHG 可增加測得 Bw4 CREG 抗體的敏感度。

參、進修心得：

- (一) 美國加州大學舊金山分校免疫及移植實驗室 (The Immunogenetics and Transplantation Laboratory of UCSF, UCSF-ITL)提供異體移植專門檢驗診斷業務，包括骨髓血液幹細胞移植及腎臟、肝臟、心臟、肺臟、小腸及角膜移植的檢驗服務，為美國ASHI 外部品管測試計畫的國家級參考實驗室，NIH Immune Tolerance Network 的核心實驗室，同時也是北加州器官勸募中心之合約實驗室，具有 CAP(美國病理家協會)認證及 ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics)認證。一年大約有 300-500 件緊急器官移植檢驗配對病例，12,000 件 HLA 抗體鑑定檢驗。該實驗室為北加州舊金山灣區著名的移植實驗室，由於是器官勸募中心之合約實驗室，每年有很多特殊移植案例，適合本院進行交流與學習。
- (二) 本次進修之實驗室，人員編制十分完整，其組織架構值得參考。實驗室主任 (Director)有兩位，一位主任負責進行醫學專業之判斷，另一位主任負責所有實驗室的行政和管理，行政團隊有三位全職專員處理實驗室一切行政事務。臨床實驗室第一線運作上，有實驗室經理以及 supervisor 各一位，負責實驗技術細節上的決策、報告審閱、品質管理和實驗室認證評鑑。14 位具有組織相容醫事檢驗師執照之醫檢師進行所有移植檢驗實驗以及 24 小時待命業務，2 位助理員和 4 位實習生 (Trainee)協助處理實驗上的各項雜務。在臨床研究方面，有 2 位博士後研究員進行實驗室病例數據分析以及研究相關之實驗。
- (三) UCSF-ITL 的所有病人血清及 DNA 皆無限期保存於-80°C 冰櫃；捐贈者之淋巴球細胞經分離後，使用液態氮進行儲存。同時使用專業的移植實驗室軟體 (HistoTrac)記錄所有檢體的儲存位置，以利檢體之及時追溯及尋找。
在 HLA 分型和 HLA 抗體鑑定檢驗上，皆使用最高解析度之方法進行檢測。HLA 分型包含了 HLA-A、B、C、DRB1、DQA/B、DPA/B、DRB345，HLA 抗體鑑定精確至發送 allele-specific 報告。使用最高解析度之方法進行 HLA 分型及 HLA 抗體鑑定之目的在於進行目前最新之交叉配對方法：電子交叉 (Virtual Crossmatch)。電子交叉主要根據病人 HLA 分型及 HLA 抗體鑑定報告之結果，做器官移植前之交叉配對，移植前無需進行交叉配對實驗，以節省外科移植團隊等待實驗之時間，更有效率地讓器官迅速移植至受贈者。雖然電子交叉配對非常方便迅速，但是仍存在一定程度之風險，所以 UCSF-ITL 目前持續使用流式細胞儀交叉配對實驗 (Flow Crossmatch)以進行器官移植後的回溯性交叉配對 (Retro-Crossmatch)，以實際的交叉配對實驗再次確認捐贈者之器官和受贈者的免疫系統是否會產生排斥反應。

(四) 加州大學舊金山分校免疫及移植實驗室和臺大醫院檢驗醫學部移植檢驗實驗室之比較表

移植實驗室	加州大學舊金山分校免疫及移植實驗室	臺大醫院檢驗醫學部移植檢驗實驗室
業務範圍	北加州舊金山灣區	臺大醫院器官移植病例
人員編制	主任 2 人 行政人員 3 人 實驗室經理 1 人 Supervisor 1 人 醫檢師 14 人 助理員 2 人 訓練生 4 人 博士級研究員 2 人 共 29 人	醫師 1 人 組長 1 人 報告審查 1 人 醫檢師 4 人 共 7 人
HLA 抗體檢驗	LabScreen SingleAg	FlowPRA, LabScreen SingleAg
HLA 分型檢驗	LabType SSO HD (中高解析), Sequence Base Typing, NGS	LabType SSO
淋巴球交叉配對實驗	Flow Crossmatch, AHG-CDC Crossmatch	CDC Crossmatch
全自動設備	LabXpress 2 臺 一臺用於 HLA 分型 一臺用於 HLA 抗體鑑定	無
資訊系統	HistoTrac (移植專用資訊系統)	Lab Information System (LIS)

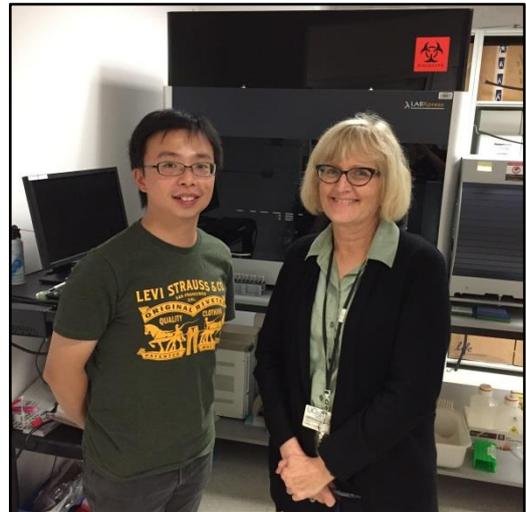
肆、建議事項：

- (一) 美國使用流式細胞儀進行交叉配對實驗 (Flow Crossmatch)已經有 20-30 年之歷史，Flow Crossmatch 之高敏感度，可有效地在器官移植前偵測出捐贈者器官和受贈者免疫系統之間的排斥反應，降低器官移植手術後產生排斥之風險。目前臺灣僅有彰化基督教醫院提供相關之檢驗服務。藉由本次進修所學習到的知識、技術和相關資訊，可望於本院建立流式細胞儀交叉配對實驗檢驗方法，進而提供比現行方法更高敏感度之交叉配對實驗，以協助臨床醫師進行術前的判斷和術後的評估。
- (二) 本次進修除了流式細胞儀交叉配對實驗外，也在經驗分享和資訊交流的過程中學習到很多美國 HLA 實驗室的相關知識、概念和流程。我們可以進一步將這些資訊與本院移植團隊分享，進行雙向溝通，訂出更有利於器官移植病人之政策和移植流程，提高本院器官移植之成功率。

伍、附錄

(一) 附件一：Dithiothreitol Treatment 試劑配製

(二) 附件二：流式細胞儀交叉配對實驗工作紀錄表



RO's copy

REVIEWED	<i>[Signature]</i>	3-22-97
REVIEWED	<i>[Signature]</i>	7-26-99
REVIEWED	<i>[Signature]</i>	1-31-01
REVIEWED	<i>[Signature]</i>	2-17-02

STOCK DTT SOLUTION

Reagents:

DTT or Cleland's Reagent (sigma DL-Dithiothreitol Sigma Grade Hygroscopic)

Preparation of Stock DTT Solution

Stock solution of DTT at 50 mM is used for treatment. MW of DTT = 154.3 grams.

1. Make 1 ml of 1 Molar DTT by:
 - a) weighing out 0.154 grams of DTT
 - b) dissolve in 1 ml of PBS

PBS (ice!!)
2. Next dilute the 1 Molar DTT solution with PBS for a final stock solution of DTT of 50 mM (1ml of 1 Molar DTT plus 19 ml of PBS = 20ml of 50 mM DTT solution.
3. The pH of the final 50 mM DTT solution should be between 7.0-7.5.
4. The final stock solution of DTT can be aliquoted and frozen at -20°C until ready to use. Aliquot in 50 ml in 1 ml bullet tubes. DTT can be stored frozen up to 6 months. It is recommended to use within 24 hours after thawing.

Make sure to fill out reagent label with date made, recommended storage, initials, lot # and expiration date

References:

Fotino M. DTT Modification of the Lymphocytotoxicity Assay. In: Zachary AA, Teresi GA, eds. The ASHI Laboratory Manual, NY, NY: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics 2nd edition 1990: 20.2 (321-324).

附件二：流式細胞儀交叉配對實驗工作紀錄表

IMMUNOGENETICS & TRANSPLANTATION LABORATORY,
UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO

FACSCanto II Flow Cytometry Crossmatch Plate Layout

Date/Time Started..	Technologist Initials..	FACSCanto II?.. <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> B..
---------------------	-------------------------	---

Plate Identifier: 20160920 FCXM P1 YSG ↓
e.g. 20120401 FCXM P1 CDO

Donor Name / H #	Volume per Well		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		A	BKG	NHS	POS									
		B	BKG	NHS	POS									
		C	BKG	NHS	POS									
		D	BKG	NHS	POS									
		E	BKG	NHS	POS									
		F	BKG	NHS	POS									
		G	BKG	NHS	POS									
		H	BKG	NHS	POS									

Reagent	Lot #	Comments
Class I Positive Control		
Class II Positive Control		
ITL Positive Control	4B	
Class I HLA Expression mAb		
Class II HLA Expression mAb		
FITC MESF Beads		
PE MESF Beads		