



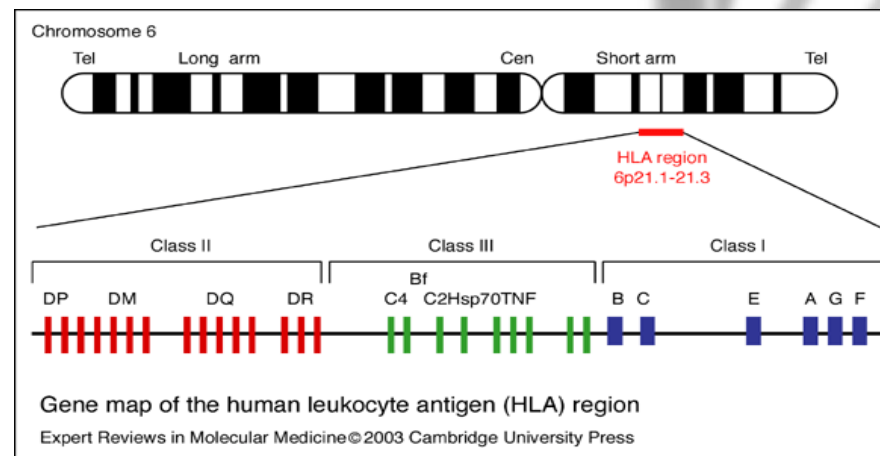
HLA-B27: molekulární marker Ankylozující spondylitidy

Peter Novota

16.2.2016, Praha

HLA-B

- součást MHC komplexu – HLA I. třídy (chromosom 6)
- úsek značně polymorfní
- antigeny se vyskytují na povrchu buněk
- podílí na imunitní reakci (prezentace antigenů)
- známé zejména jako transplantační antigeny



Asociace HLA-B27 s onemocněními

- **Ankylozující spondylitida – AS (asociace v 90-95%)**
- **Psoriatická artritida**
- **Reaktivní artritida**
- **Enteropatická artritida**
- **Uveitis acuta anterior**
- **Juvenilní idiopatická artritida**
- **Nediferencované spondyloarthropathie**
- **Lone aortic regurgitation**



Ankylosing spondylitis (AS)

- **nemoc postihuje cca 0,5 - 1 % populace**
- **pouze u 0,5% HLA-B27 pozitivních lidí se manifestuje AS**
- **asociace s HLA-B27 v 90 – 95% případů**
- **symptomy:** Primárně postihuje páteř (bolest zad, ztuhlost, omezení hybnosti).
Progrese onemocnění: postihuje klouby mezi páteří a žebry, omezení pohybu hrudníku = omezení hloubky nádechu.
- **Asociace s polymorfismami 25 genů**

(Nat Genet. 2013)

Table 1 ASAS criteria for predominantly axial spondyloarthritis

Patients with Back Pain \geq 3 Months and Age at Onset $<$ 45 Years		
Sacroiliitis on Imaging Plus \geq1 SpA Feature	OR	HLA-B27 Plus \geq2 other SpA Features
<u>Sacroiliitis on Imaging</u> <ul style="list-style-type: none">• Active (acute) inflammation on MRI highly suggestive of sacroiliitis associated with SpA• OR Definite radiographic sacroiliitis according to modified New York criteria		<u>SpA Features</u> <ul style="list-style-type: none">• Inflammatory back pain• Arthritis• Enthesitis (heel)• Uveitis• Dactylitis• Psoriasis• Crohn's disease/ulcerative colitis• Good response to NSAIDs• Family history for SpA• HLA-B27• Elevated CRP

ASAS Assessment of Spondyloarthritis International Society, *SpA* spondyloarthritis, *CRP* C-reactive protein, *HLA-B27* human leukocyte antigen-B27, *IBP* inflammatory back pain, *MRI* magnetic resonance imaging, *NSAIDs* nonsteroidal anti-inflammatory drugs

Table 1 ASAS criteria for predominantly axial spondyloarthritis

Patients with Back Pain \geq 3 Months and Age at Onset $<$ 45 Years		
Sacroiliitis on Imaging Plus \geq1 SpA Feature	OR	HLA-B27 Plus \geq2 other SpA Features
<u>Sacroiliitis on Imaging</u>		<u>SpA Features</u>
<ul style="list-style-type: none">• Active (acute) inflammation on MRI highly suggestive of sacroiliitis associated with SpA• OR Definite radiographic sacroiliitis according to modified New York criteria		<ul style="list-style-type: none">• Inflammatory back pain• Arthritis• Enthesitis (heel)• Uveitis• Dactylitis• Psoriasis• Crohn's disease/ulcerative colitis• Good response to NSAIDs• Family history for SpA• HLA-B27• Elevated CRP

ASAS Assessment of Spondyloarthritis International Society, *SpA* spondyloarthritis, *CRP* C-reactive protein, *HLA-B27* human leukocyte antigen-B27, *IBP* inflammatory back pain, *MRI* magnetic resonance imaging, *NSAIDs* nonsteroidal anti-inflammatory drugs

HLA – B27

- nalezeno zatím 132 alel, od **B*27:01** po **B*27:106**, kde **B*27:22 (=B*27:06)** je sekvenační chyba
- mutace intronových i exonových oblastí genu
- **prevalence v CZ populaci mezi 6 – 8%**
- protektivní vliv při infekci virem **HIV a HepC** (pouze určité alely B27)
- spekulace o protektivním vlivu v oblastech s vysokým výskytem **malárie**

HLA – B27

- Specifické rizikové alely HLA-B*27:

27:02 (Kavkazská populace)

27:04 (Čína) - často se vyskytuje spolu s rizikovou alelou 27:05

27:02 (Středozeří)

- Protektivní alely HLA-B*27 :

27:06 a 27:09

- Změny v AMK konformaci::

1. Záměna kys. aspartamové za histidin v pozici 114

→ záměna alely B*27:05 na B*27:09

2. Substituce histidinu za kys. aspartamovou v pozici 114 a záměna kys.

aspartamové za tyrosin v pozici 116 → odlišnost HLA-B*27:06 od B*27:04

HLA-B27 Amino Acid Variations in α -2 Domain	
	94 95 97 103 105 113 114 116 131 152 156 163 167 171
B*27:0502	T L N V P Y H D S V L E W Y
B*27:04	- - - - - - - - E - - - -
B*27:06	- - - - - D Y - E - - - -
B*27:09	- - - - - H - - - - -

B*27:04 → B*27:06 114 Histidine → Aspartic acid
116 Aspartic acid → Tyrosine

B*27:05 → B*27:09 116 Aspartic acid → Histidine



Fig. 1. Schematic and approximate representation of HLA-B27 frequency distribution among world populations (derived from MA Khan, Curr Opin Rheumatol, 1995 — reference 5). In dark blue are represented the geographic areas where the frequency is the highest; in white, those where the allele is rare or absent.

Laboratorní detekce HLA-B27

- **Fenotypický průkaz**

 - **Mikrolymfocytotoxický test** (stanovení povrchového antigenu B27)

 - **Průtoková cytometrie** (stanovení povrchového antigenu B27)

- **Molekulární typizace HLA**

 - Detekce alelických polymorfismů na úrovni DNA:

 - (PCR-SSP, PCR-SSOP, SBT)

Mikrolymfocytotoxický test

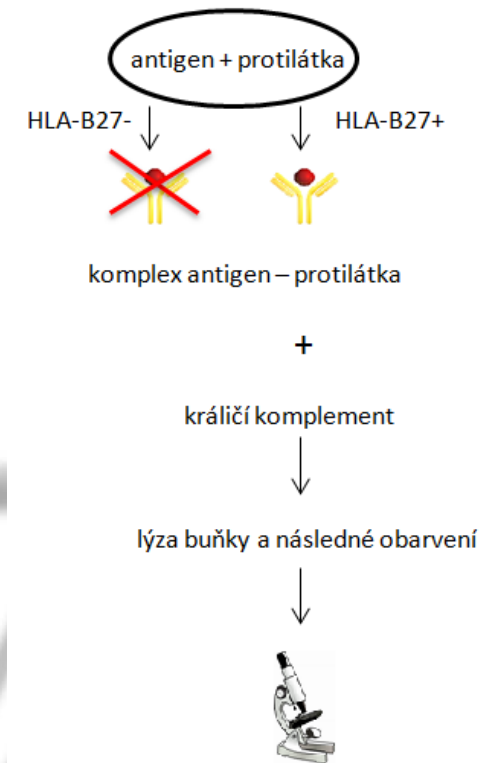
- průkaz a stanovení specifity HLA antigenu
- princip: reakce mezi HLA antigenem na povrchu buňky a specifickou HLA protilátkou

A) Buňky nesou zkoumaný HLA antigen

- vytvoření komplexu antigen – protilátka
- přidáním králičího komplementu – lýza buněčné membrány




B) Antigen není přítomen – nedojde ke vzniku komplexu antigen-protilátka a k lýze buňky

- obarvení vitálním barvivem (eosin Y, trypanová modř)
- odečtení pod mikroskopem - lyzované buňky jsou obarveny

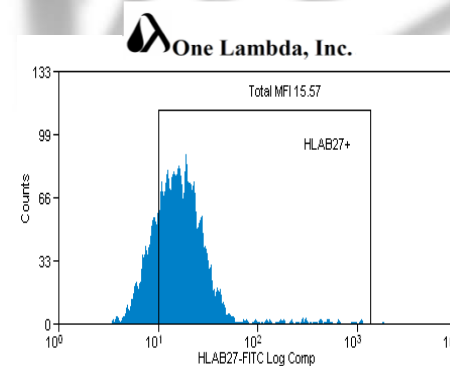
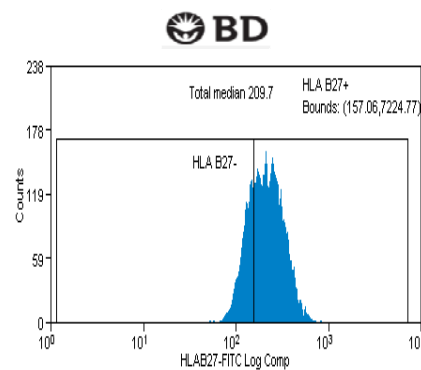
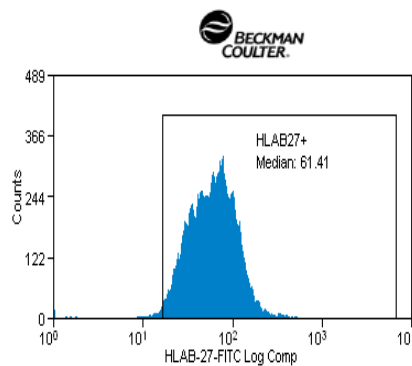


Průtoková cytometrie (FACS)

- založen na specifické vazbě konjugovaných monoklonálních protilátek na antigeny

Kit	Klon	Protilátky	
IO Test/KOMBITEST™	HLA-ABC-m3	(HLA-B27-FITC / HLA-B7-PE)	
BD™HLA-B27 kit	GS145.2	(HLA-B27-FITC / CD3-PE)	
HLA-B27-FITC	FD705-9E1E10	(HLA-B-27-FITC / CD3-APC)	

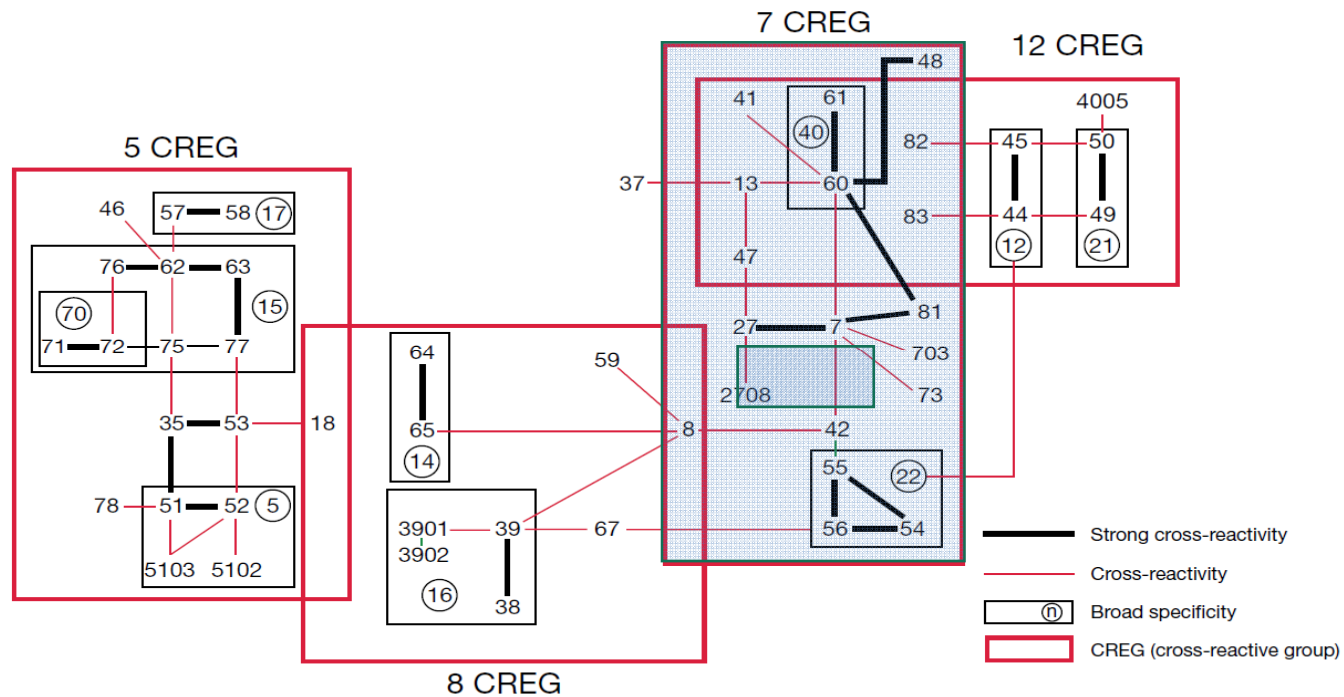
- **IO Test/KOMBITEST™** - detekce HLA-27, HLA-B7
- **BD™HLA-B27 kit** - detekce HLA-B27, gate CD3
- **HLA-B27-FITC** - detekce HLA-B27 , gate CD3



Průtoková cytometrie (FACS)

Kit	Klon	Protilátky
IO Test/KOMBITEST™	HLA-ABC-m3	(HLA-B27-FITC / HLA-B7-PE)
BD™HLA-B27 kit	GS145.2	(HLA-B27-FITC / CD3-PE)

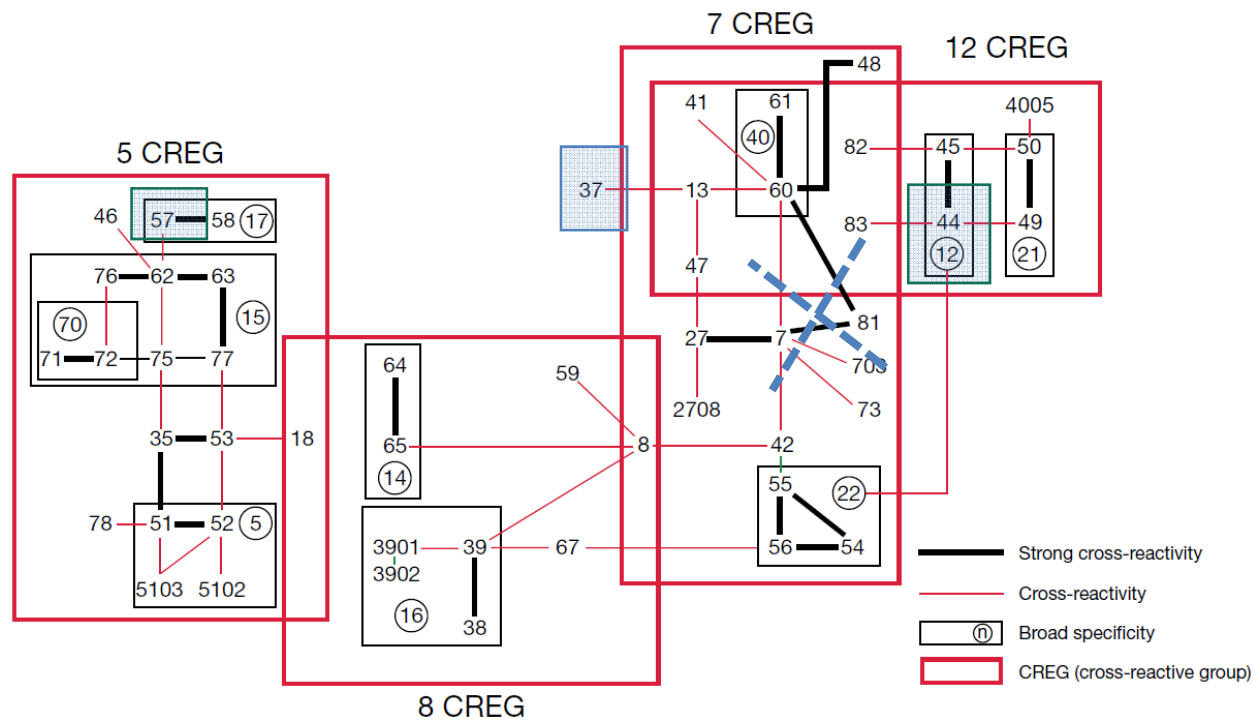
Serological cross-reactivity—HLA-B locus



Průtoková cytometrie (FACS)

Kit	Klon	Protilátky
HLA-B27-FITC	FD705-9E1E10	(HLA-B-27-FITC / CD3-APC)

Serological cross-reactivity—HLA-B locus





Detekce na úrovni DNA

- určení citlivosti průtokové cytometrie (při zavedení metody)
- řešení sporných výsledků z FACS (falešné negativy i pozitivy)
- metoda SBT (Sequence Based Typing, Conexio Genomics)
- metoda PCR-SSP (Olerup SSP)

HLA-B SBT Resolver Kit

Conexio Genomics

- Lokus specifická PCR
- 7 specifických sekvenačních primerů



- Výhoda – vysoké rozlišení genotypizace
- Problém – ambiguous typing
- Řešení – primery HARPS (Heterozygous Ambiguity Resolving Primers)

Software Assign_{SBT}4.7+ Conexio Genomics

The screenshot displays the Sequencing software interface (HLAB.xml) showing a genomic map and sequence alignment. The map includes 5' UTR, Exon 1, Intron 1, Exon 2, Intron 2, Exon 3, Intron 3, Exon 4, Intron 4, and 3' UTR. The sequence alignment shows reads from Q950050964 and R970900270 aligned to the reference sequence. The chromatogram shows the signal for the sequence. The variant table on the right lists differences between Allele 1 and Allele 2, including positions, differences, and indels.

Allele 1	Allele 2	MM	N-C	IND	Differences
B*18:01:01	B*44:02:01:01	0			
B*18:01:01	B*44:02:01:02S	0			Intron 4
B*18:01:05	B*44:02:01:02S	0			Exon 2
B*18:01:05	B*44:02:01:02S	0			Exon 2, Intron 4
B*18:01:05	B*44:27:01	0			Exon 2
B*18:09	B*44:09	0			Exon 2
B*18:12	B*44:12	0			Exon 2
B*18:20	B*44:51	0			Exon 3
B*18:43	B*44:55	0			Exon 2
B*18:01:01	B*44:02:02	1			
B*18:01:01	B*44:02:03	1			
B*18:01:01	B*44:02:04	1			
B*18:01:01	B*44:02:05	1			
B*18:01:01	B*44:02:06	1			
B*18:01:01	B*44:02:07	1			
B*18:01:01	B*44:02:08	1			
B*18:01:01	B*44:02:09	1			
B*18:01:01	B*44:02:10	1			
B*18:01:01	B*44:02:11	1			
B*18:01:01	B*44:02:12	1			
B*18:01:01	B*44:02:13	1			
B*18:01:01	B*44:02:14	1			
B*18:01:01	B*44:02:15	1			
B*18:01:01	B*44:02:16	1			
B*18:01:01	B*44:02:17	1			
B*18:01:01	B*44:05:01	1			
B*18:01:01	B*44:11	1			
B*18:01:01	B*44:22	1			
B*18:01:01	B*44:23N	1			
B*18:01:01	B*44:27:01	1			
B*18:01:01	B*44:33	1			
B*18:01:01	B*44:35	1			
B*18:01:01	B*44:49	1			

NAVIGATE

- [Product Information / Downloads](#)
 - [HLA Kits](#)
 - [Disease Associated Alleles](#)
 - [Ankylosing Spondylitis](#)
 - [Coeliac Disease](#)
 - [Narcolepsy](#)
 - [Abacavir](#)
 - [KIR Typing Kits](#)
 - [Accessory Products](#)
 - [Other](#)
- [Technical Documents](#)
- [Resolved Alleles](#)

LATEST NEWS

Olerup, Platinum Sponsor at the upcoming EFI Meeting

2015-04-01 Olerup will be present as Platinum Sponsor at the annual EFI Meeting held in Geneva starting April 27, 2015

Olerup Platinum Sponsor at the upcoming EFI meeting

2014-06-24 Olerup will be Platinum Sponsor at the EFI Meeting held in Stockholm starting June 25.

Olerup to present at the upcoming APHIA meeting in Hong Kong

2013-05-23 Olerup, a leading company within the field of transplant diagnostics, will be present at the upcoming APHIA meeting in Hong Kong, July 28 - Aug 2

Ankylosing Spondylitis

Olerup SSP® kits for the screening of disease associated HLA-alleles.

All kits are available in 2 formats: with and without Taq Polymerase. All master mixes contain cresol red, glycerol, PCR buffer and dNTPs. For more information on the kits please follow the different links below for review of product inserts, work sheets, release notes and interpretation tables

For screening of B*27, associated with Ankylosing Spondylitis:

	<u>Product No.</u> ▲	<u>Product name</u>	<u>No. Of tests</u>	<u>Lot</u>	<u>List price</u>
	101.531-48	B*27 unit dose	48	57Y 16X 65S 39R 75M 84K 77G 53F 49E Y02	Inquire
	101.531-48u	B*27 unit dose	48	57Y 16X 65S 39R 75M 84K 77G 53F 49E Y02	Inquire
	101.532-48	B*27 bulk	48	46Y 15X 16V 30S 20N 83K 38G 54F 86E X19	Inquire
	101.532-48u	B*27 bulk	48	46Y 15X 16V 30S 20N 83K 38G 54F 86E X19	Inquire
	101.911-96	B*27 unit dose single well	96	56Y 64X 49V 34S 53R 97M 86M 34K	Inquire
	101.911-96u	B*27 unit dose single well	96	56Y 64X 49V 34S 53R 97M 86M 34K	Inquire

For high resolution of HLA-B*27:

	<u>Product No.</u> ▲	<u>Product name</u>	<u>No. Of tests</u>	<u>Lot</u>	<u>List price</u>
	101.521-04	HLA-B*27	4	21X 77R 10N 22L 53G 09F X94	Inquire
	101.521-04u	HLA-B*27	4	21X 77R 10N 22L 53G 09F X94	Inquire
	101.521-24	HLA-B*27	24	21X 77R 10N 22L 53G 09F X94	Inquire
	101.521-24u	HLA-B*27	24	21X 77R 10N 22L 53G 09F X94	Inquire

Předpokládané problémy při (feno)typizaci

- Nízce exprimované („L“) alely a nulové („N“) alely
- Zkřížená reakce (problém falešné positivity např. u B7)
- Klinický význam protektivních a predispozičních alel (B*27:06, B*27:09 vs. B*27:05, B*27:02)

Porovnání jednotlivých metod detekce HLA-B27

1) Mikrolymfocytotoxický test

- Časově náročná metoda
- Finančně nenáročná
- Malá kapacita

2) Průtoková cytometrie

- Časově nenáročná metoda, finančně přístupná, vysoká kapacita
- Shoda s cytotoxickým testem v 96 % případů při použití jedné protilátky (HLA-B7)
- Použití protilátek 3 různých klonů – algoritmus (specifická 100%)
- Nedostatečná citlivost pro konkrétní alely (B*27:08 – One Lambda, B*27:03 – Beckman Coulter)
- Falešná pozitivita (HLA-B7), vysoké pozadí (např. B37, B44, B57)

3) Genotypizace DNA

- Časově nenáročná metoda
- Dostatečná rozlišovací schopnost a spolehlivost
- Nejvyšší cena (SBT)
- Cenově velmi výhodná (SSP)



Děkuji za pozornost.