

# Průkaz HLA-B27 u revmatologických pacientů

Olga Kryštůfková

Revmatologický ústav, Praha

Klinika revmatologie, 1. lékařská fakulta UK, Praha

## Spondyloartritidy (SpA)

- **Zánětlivá revmatologická onemocnění:** axiální skelet, periferní klouby i mimokloubní příznaky. Skupina onemocnění - nr-axSpA, AS, PsA, IBD, ReA
- **Typická symptomatologie:** zánětlivá bolest dolních zad = křížobederní krajiny (sakroiliitida).
- **Genetická vazba:** zvýšený rodinný výskyt SpA a asociace s antigenem HLA-B27 (30-70%).
- **Ankylozující spondylitida (AS):** Prevalence v populaci přibližně 0,5-1%, 2-3x častěji muži
- **Asociace AS s antigenem HLA-B27:** 95% AS x 6-8% zdravá populace
- HLA-B27+ pacienti se oproti negativním liší především **v dřívějším nástupu nemoci a v kratším diagnostickém prodlení.**

# ASAS klasifikační kritéria pro axiální SpA

Rudweleit M et al. ARD 2009;68:777-783

Zánětlivá bolest zad  $\geq 3$  měsíce, věk počátku  $< 45$  let

a

Sakroileitis\*  
+  
 $\geq 1$  SpA příznak \*\*

nebo

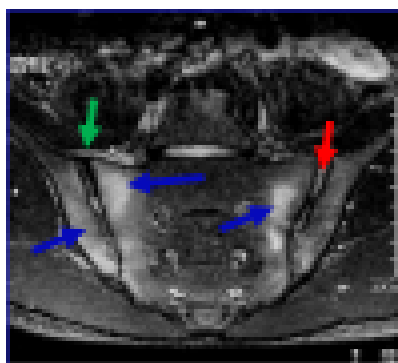
HLA-B27\*  
+  
 $\geq 2$  SpA příznaky \*\*

## \*Sakroileitis při zobrazení:

Aktivní zánět na MRI

nebo

Definitivní rtg sakroileitis  
podle NY kritérií pro AS



## \*\* SpA příznaky :

- Zánětlivá bolest zad
- Artritida
- Entezitida
- Uveitida
- Daktylitida
- Psoriáza
- Crohnova nemoc / Ulc. Colitis
- Dobrá odpověď na NSA
- Rodinná anamnéza SpA
- HLA-B27+
- $\uparrow$ CRP

# Průkaz HLA-B27 mikrolymfocytotoxickým testem

- Vazba diagnostických sér na antigeny exprimované na membráně lymfocytů
- Lýza králičím komplementem, vyhodnocení v mikroskopu

BAG HEALTHCARE

HistoTray B27



- **Falešná pozitivita**

HLA-B27 - součást zkříženě reagující skupiny

- **CREG B7** (Cross reactive epitope group)

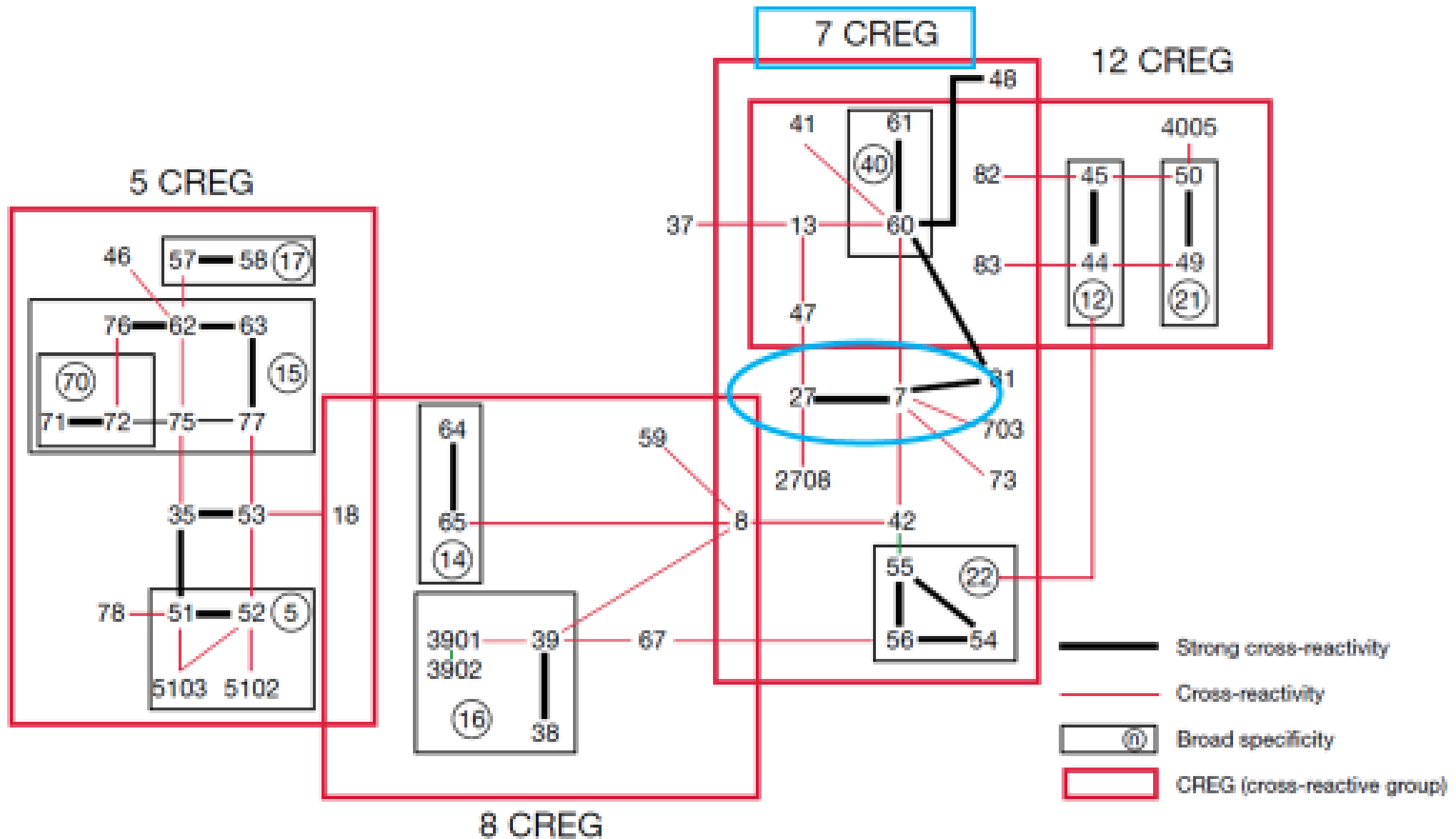
Diagnostika mají také zkříženou reaktivitu

- s **non-B7** CREG antigeny

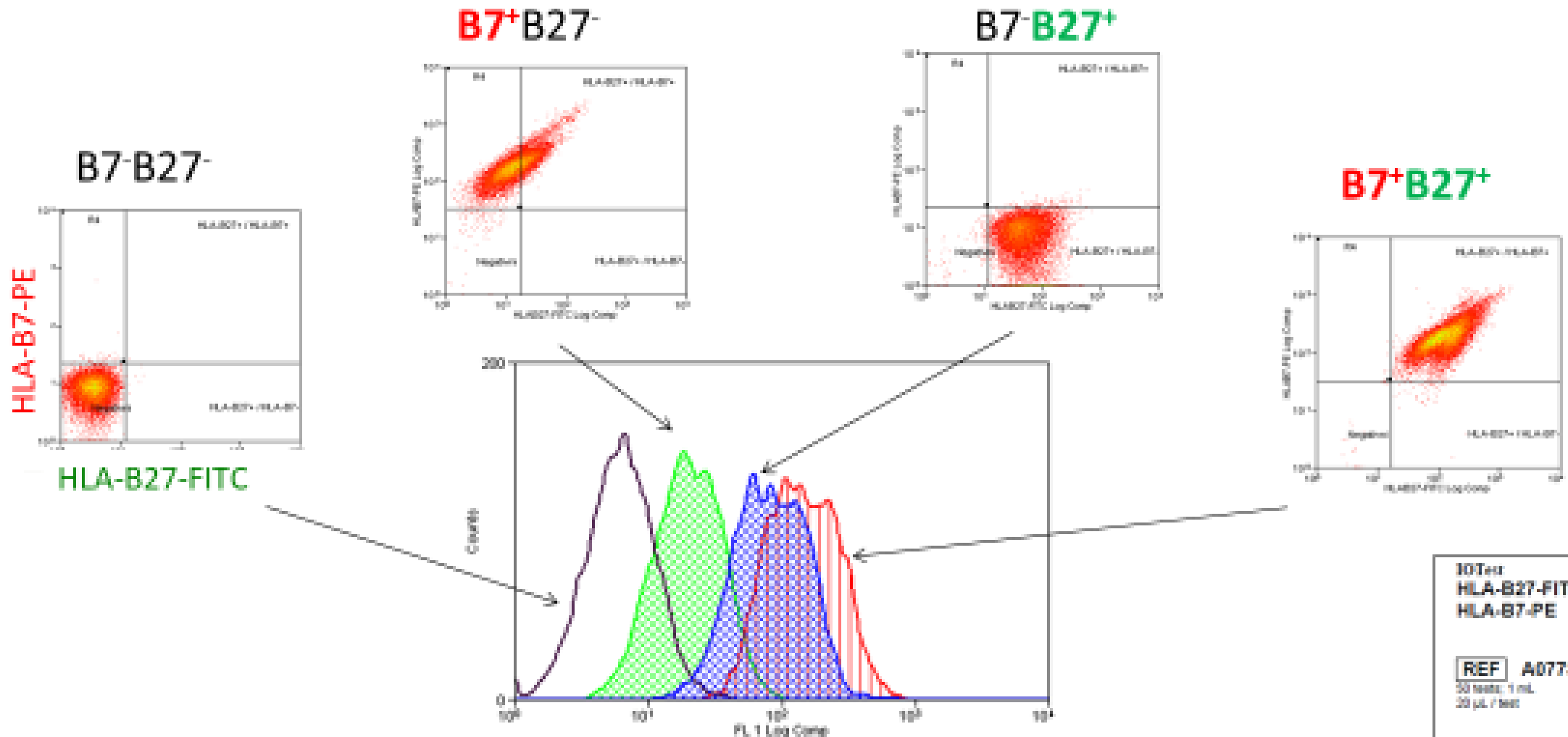
- **Falešná negativita**

- při slabé expresi HLA antigenu
- u buněk se změněnou morfolofií

# Skupina zkříženě reagujících epitopů (CREG) B7 - B27 a B7 sdílí společné epitopy



# Cytometrický průkaz anti-HLA-B27 HLA-ABC-m3 / anti HLA-B7 BB7.1 screeningový test, efekt zkřížené reaktivity



HLA-B27-FITC (intenzita fluorescence)

**10Test**  
**HLA-B27-FITC/**  
**HLA-B7-PE**  
  
**REF** A07739  
 50 testů / 1 ml  
 20 µl / test  


  
 B0007077 HLA-B7-FITC/HLA-B7-PE  
 50 testů / 1 ml  
 20 µl / test

Clin Chem. 1997 Oct;43(10):1975-81.

## **HLA-B27 phenotyping with flow cytometry: further improvement by multiple monoclonal antibodies.**

Hoffmann JJ<sup>1</sup>, Janssen WC.

### Porovnání tří klonů protilátek proti HLA-B27 (nyní dostupné v IVD formátu)

- **HLA-ABC-m3**
- **GS145.2**
- **FD705**

- From ROC curve analysis **none of the three antibodies** appeared to be suitable for use **as a single typing reagent**.
- The efficiency of the test was **affected by cross-reactions with** other HLA antigens, notably the **HLA-B7** antigen.
- **We recommend that two different monoclonal anti-B27 antibodies be used for accurate and reliable HLA-B27 phenotyping with flow cytometry.**

#### **EFI and ASHI guidelines:**

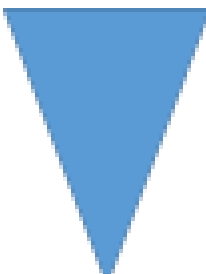
European Federation for Immunogenetics. Standards for histocompatibility testing, 4th version. Strasbourg, France: EFI 2000

American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Standards for histocompatibility Testing. Mt. Laurel, NJ: ASHI. 1998.

**Flow cytometric HLA-B27 screening: cross-reactivity patterns of commercially available anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with other HLA-B antigens.**

Levering WH<sup>1</sup>, Wind H, Sintnicolaas K, Hooijkaas H, Gratama JW.

Porovnání zkřížené reaktivity s dalšími antigeny → falešná pozitivita

- 
- HLA-ABC-m3 (+) **B7**, B13, B22, B37, B40, B42; (±) B12, B16, **B17**, B41, B47, B48
  - GS145.2 (+) **B7**, B16, **B37**, B42, B48; (±) B13, **B17**, B22, B40, B47
  - FD705 (+) **B17**, **B37**, B47; (±) B12, B13, B16, B48 *non B7 CREG*

- The combination of **FD705 and GS145.2** yielded the best results, with one false-positive HLA-B27 assignment among the 99 HLA-B27 samples



# 1.kolo: IOTest HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE (BC)

HLA-ABC-m3

MFI < 16  
negativní

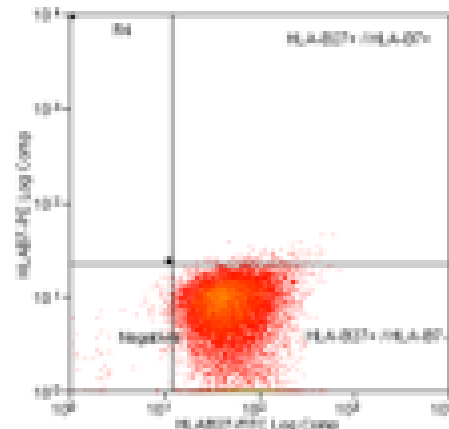
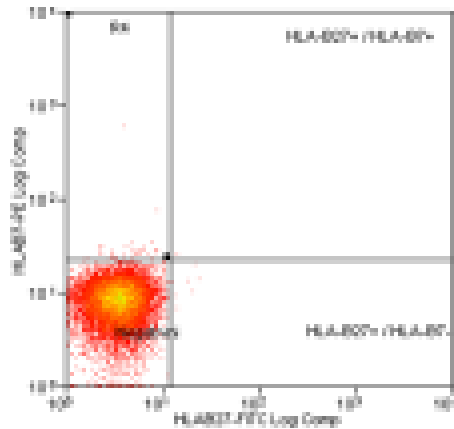
MFI > 47  
pozitivní

BB7.1

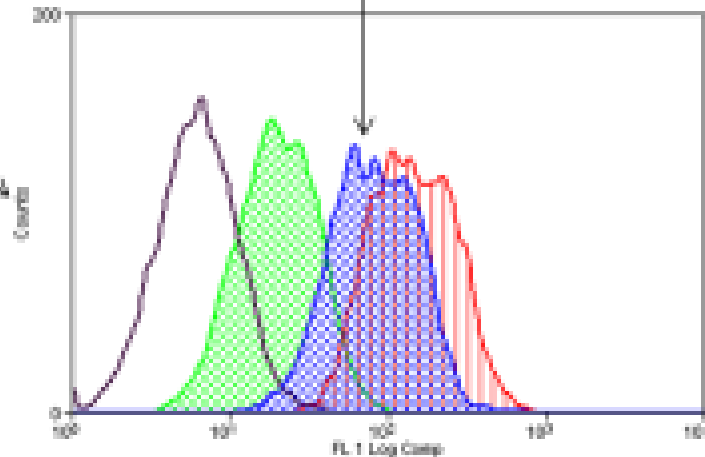
MFI < 16  
negativní

MFI > 16  
pozitivní

HLA-B7-PE



HLA-B27-FITC



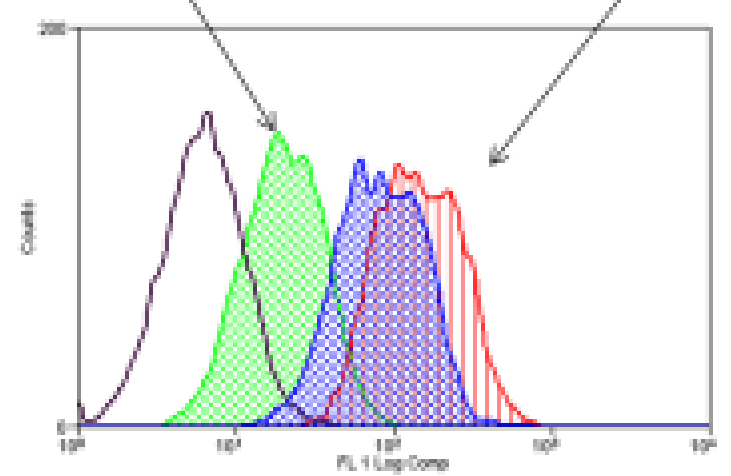
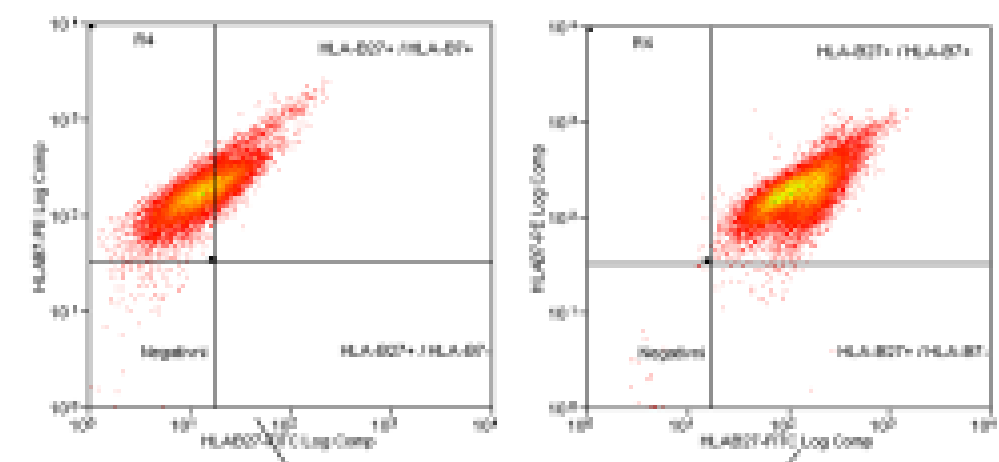
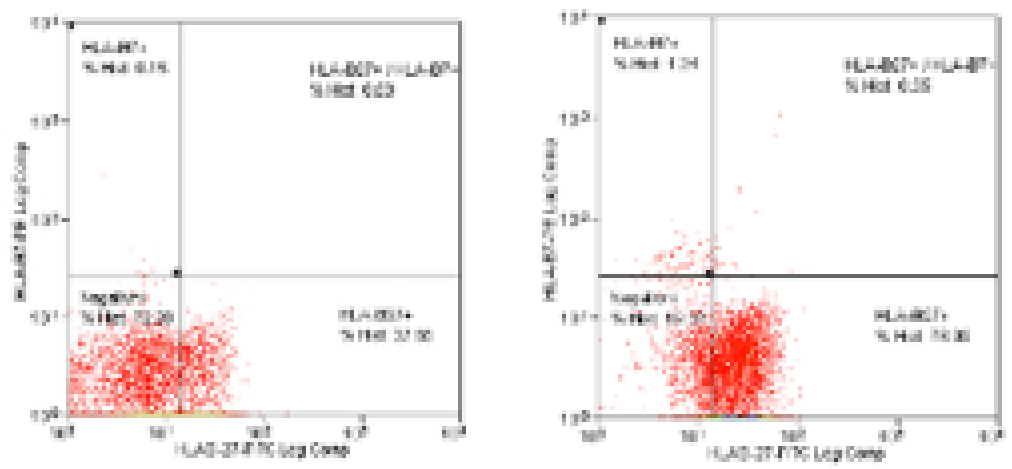
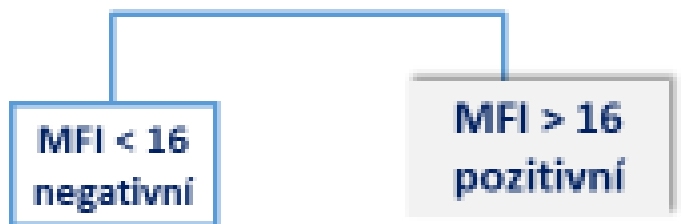
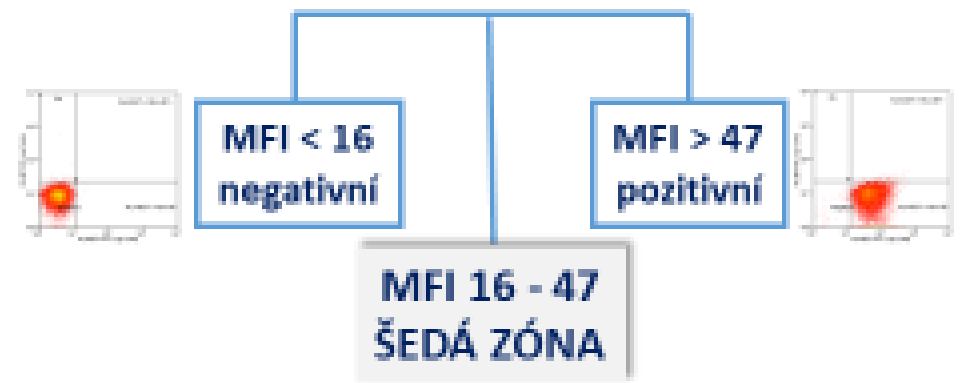
Vzorky vyšetřené cytotoxickým testem

- Podle B27<sup>-</sup> B7<sup>-</sup> vzorků vypočítána hraniční hodnota (*Cut off*) střední intenzity fluorescence (*MFI*) pro HLA-B27 pozitivitu
- **Rozhodovací algoritmus interpretace analýzy HLA-B27 ověřen ROC analýzou**

# 1.kolo: IO Test HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE (BC)

HLA-ABC-m3

BB7.1



# 1.kolo: IOTest HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE (BC)

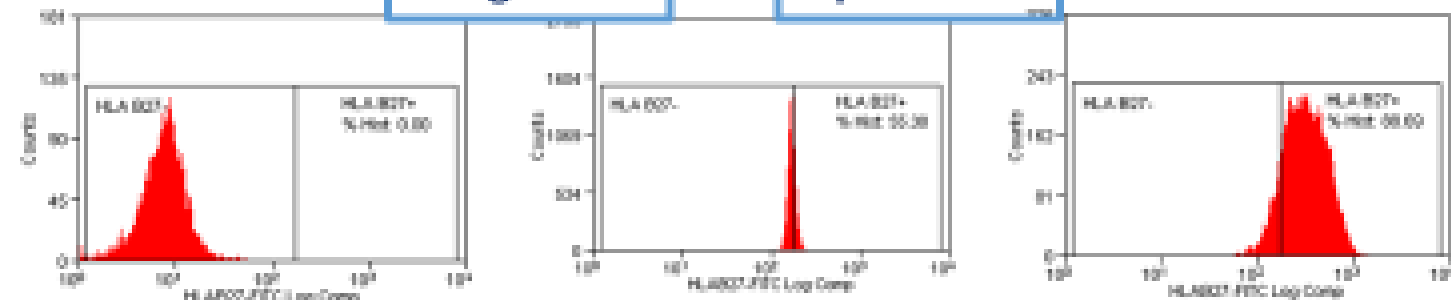


## 2.kolo: HLA-B27 Kit (BD)

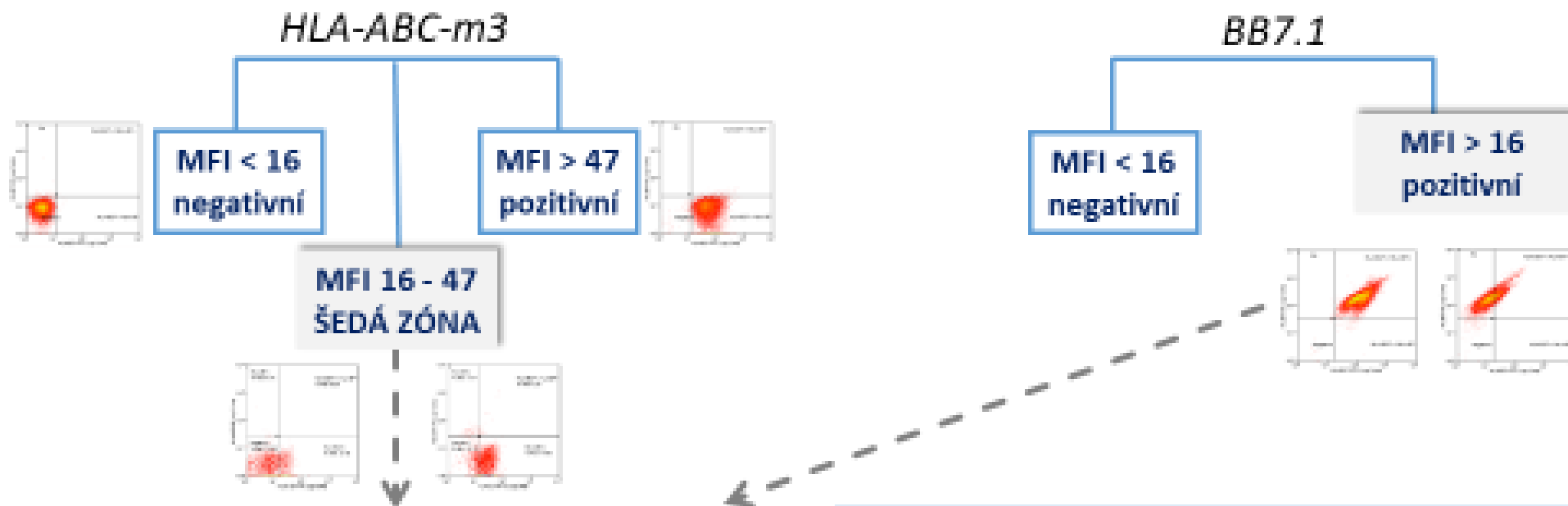
*GS145.2*

MFI < beads negativní

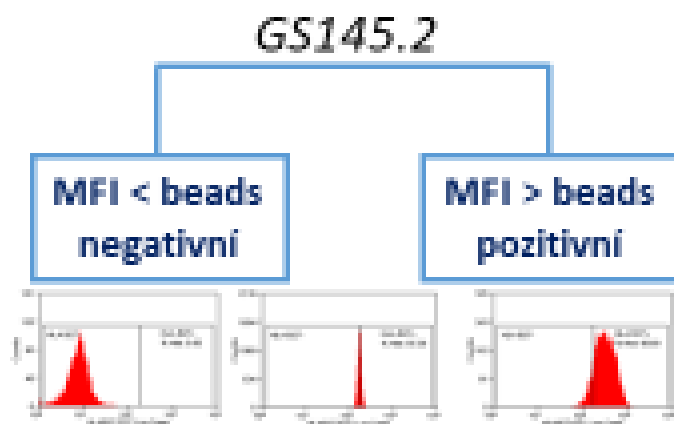
MFI > beads pozitivní



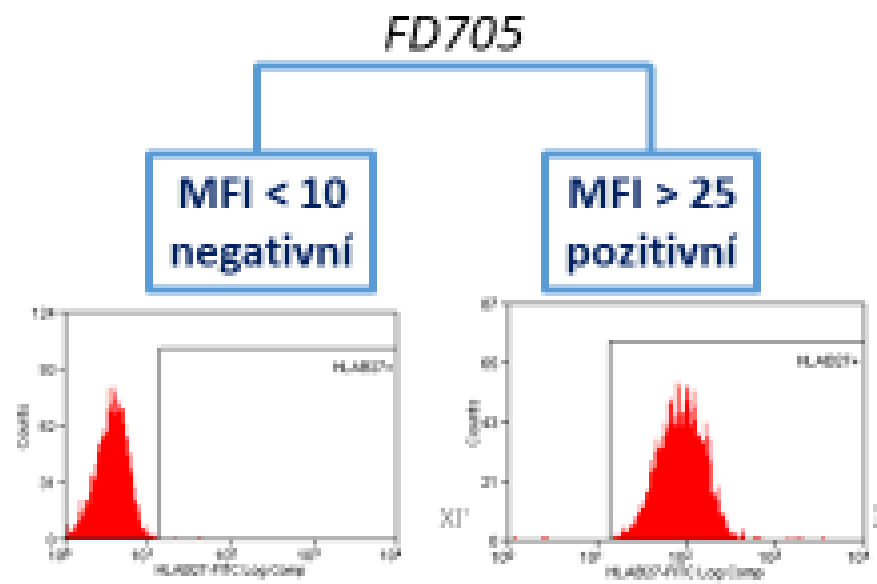
# 1.kolo: IOTest HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE (BC)



## 2.kolo: HLA-B27 Kit (BD)



## 3.kolo: HLA-B27 FITC (One Lambda)



## Zastoupení HLA-B27 pozitivních a neprůkazných vzorků

Rok	HLA-B27-	HLA-B27+		Neprůkazné	
<b>2014</b>	899	323	26%	<b>4</b>	0,3%
<b>2015</b>	881	286	25%	<b>3</b>	0,3%
<b>2016</b>	871	342	28%	<b>7</b>	0,6%
<b>2017</b>	971	326	25%	<b>4</b>	0,3%
<b>2018</b>	1144	449	28%	<b>16</b>	1,0%
<b>2019</b>	1372	444	24%	<b>16</b>	0,9%
<b>2020</b>	1218	394	24%	<b>11</b>	0,7%
<b>2021</b>	1587	447	22%	<b>13</b>	0,6%
<b>Celkem</b>	<b>9546</b>	<b>3215</b>	<b>25%</b>	<b>105</b>	<b>0,8%</b>

## **HLA-B27 phenotyping with flow cytometry: further improvement by multiple monoclonal antibodies.**

Hoffmann JJ<sup>1</sup>, Janssen WC.

<b>Conditions</b>	<b>Specificity<sup>a</sup></b>
B7 + HLA-ABC-m3/GS145.2	1.000 (151/151)
B7 + HLA-ABC-m3/GS145.2	0.994 (161/162)
B7 + HLA-ABC-m3/FD705	1.000 (162/162)

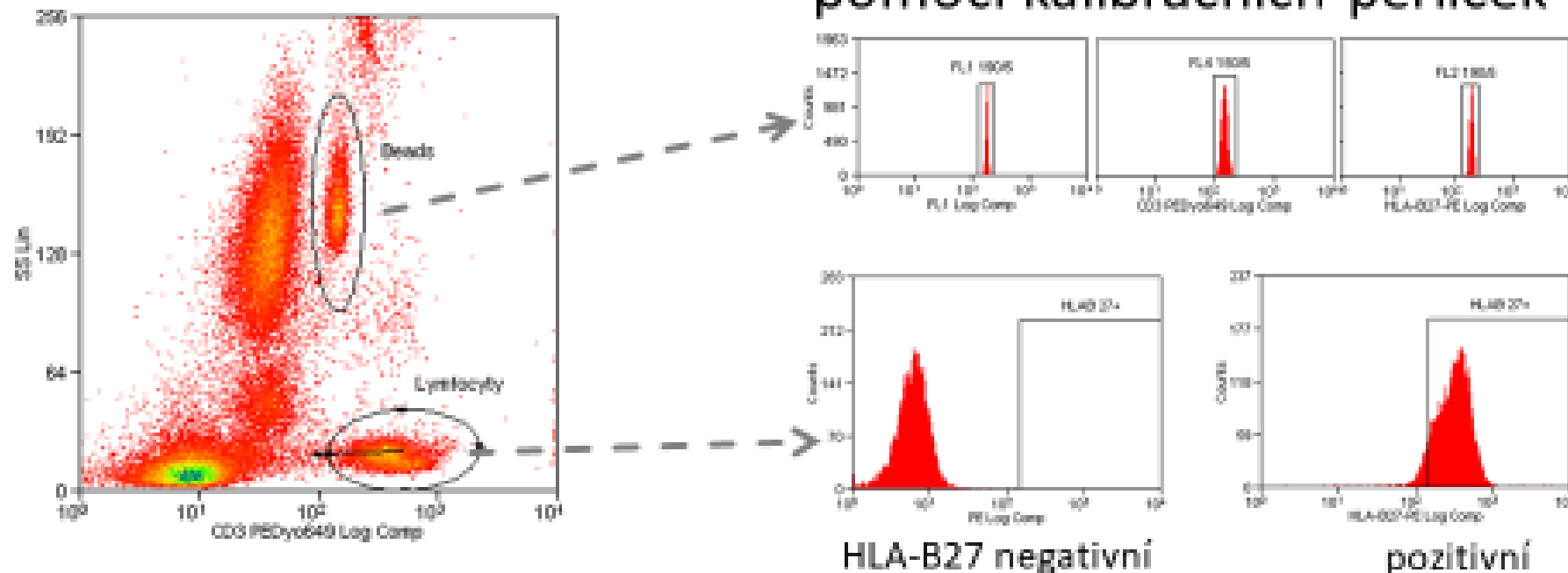
- The efficiency of the test was affected by cross-reactions with other HLA antigens, notably the HLA-B7 antigen.
- **Preincubation with anti-B7 serum** efficiently inhibited this cross-reaction and **raised the test efficiency considerably**

# Testování nové soupravy DuraClone B27 (Beckman Coulter)

Dvě detekční protilátky anti-HLA-B27- RPE (*klony ABC-m3 a FD705*)

Specificity	CD3	HLA B27	HLA B27	HLA B7
Clone	UCHT1	ABCm3	FD705	BB7.1

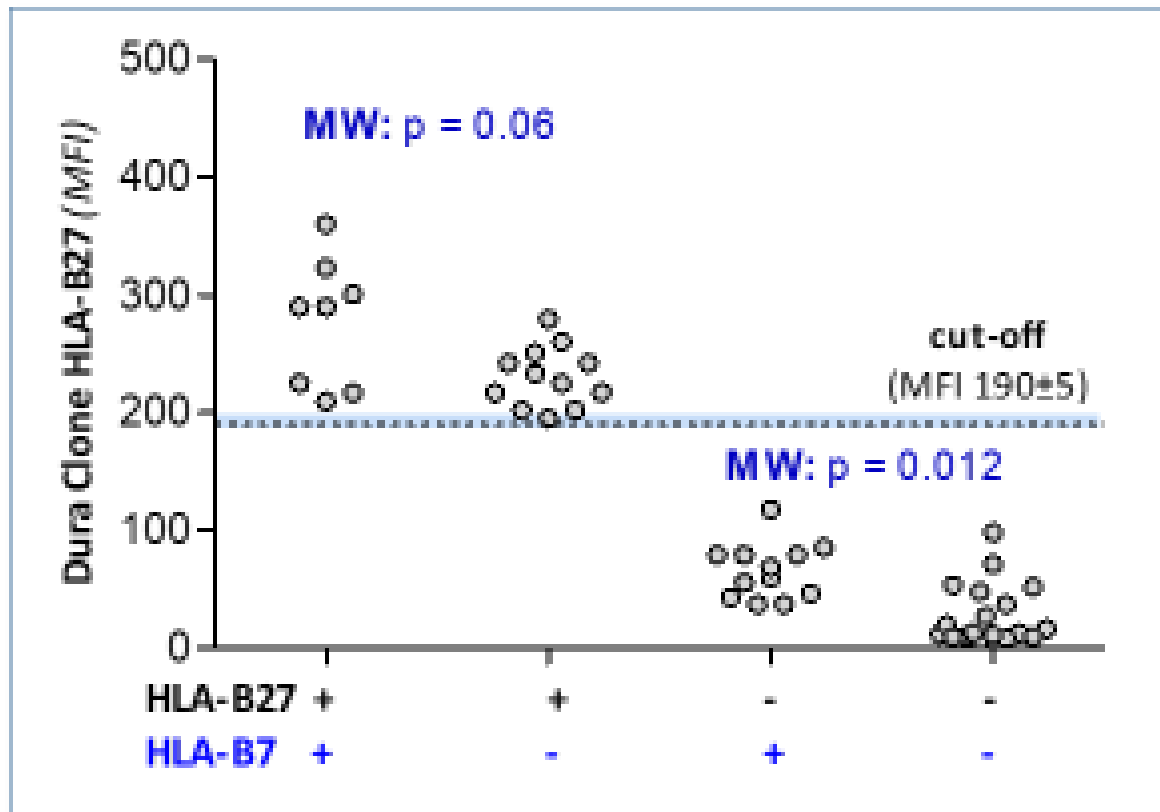
Cílová hraniční hodnota MFI nastavena pomocí kalibračních perliček



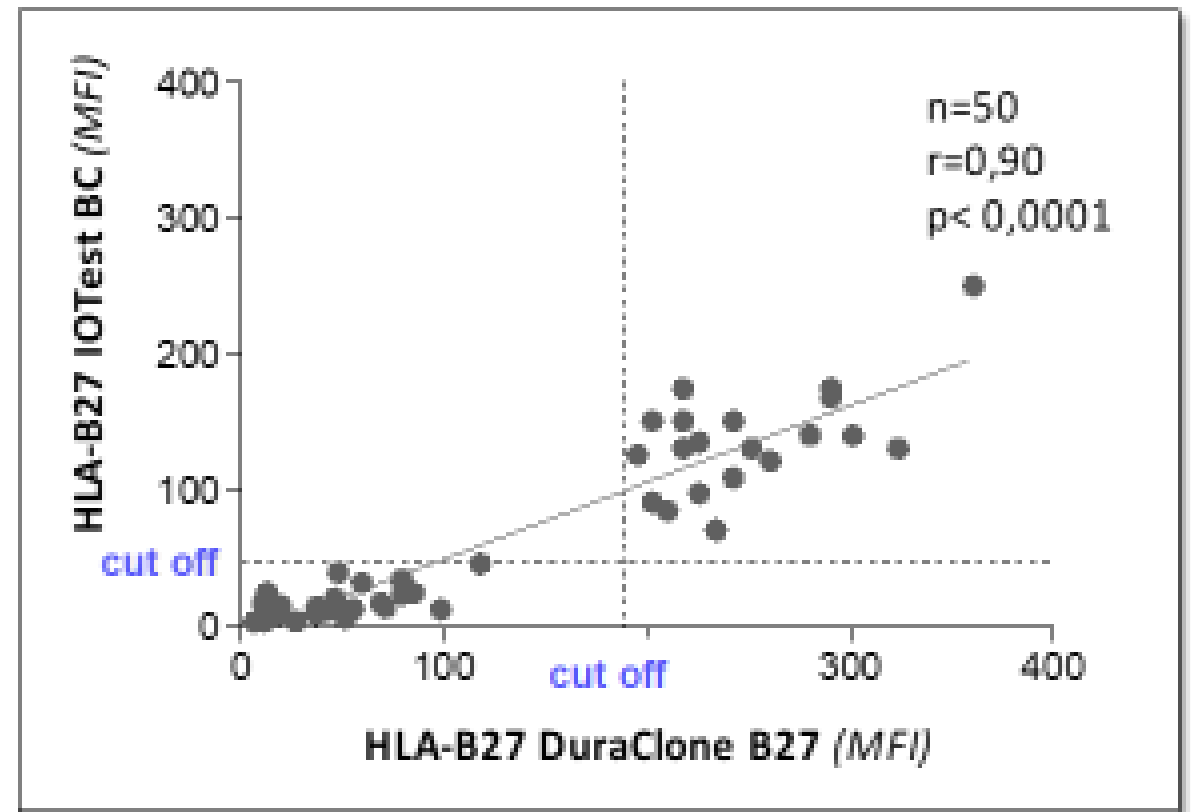
# Duraclone B27

- souprava obsahuje **blokující protilátku anti HLA-B7 klon BB7.1**

Porovnání MFI HLA-B27 pozitivních a negativních vzorků podle HLA-B7



Korelace MFI IOTest x DuraClone

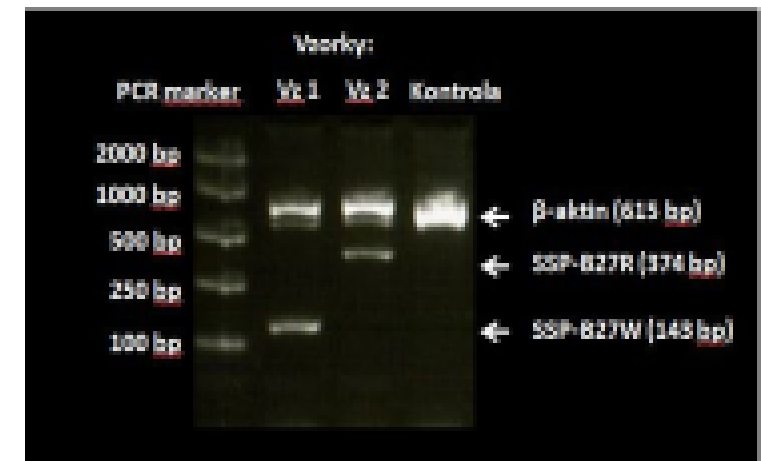


MW = Mann-Whitney test



# Detekce HLA-B\*27 alel pomocí specifické polymerázové řetězové reakce

Zino E, Di Terlizzi S, Carugo C, et al.: *Tissue Antigens*, 2004 Jan;63(1):88-92  
Rapid detection of all HLA-B\*27 alleles (B\*2701-B\*2725) by group-specific polymerase chain reaction.



Doc. Ing. Mgr. Blanka Stibůrková, Ph.D  
MUDr. Kateřina Pavečková, PhD

- **PCR - specifické primery**

SSP-B27W (28 alel B\*27,  
B\*4202, B\*7301)

SSP-B27R (většina alel B\*27)

interní kontrola  $\beta$ -aktin

- Zamražené primární vzorky
- Informovaný souhlas

**60 neprůkazných z 8352 vyšetření  
během 2017-2021**

Pro genetiku dodáno 48 souhlasů

	HLA-B27-	HLA-B27+
HLA-B7-	19	14
HLA-B7+	9	9
<b>Shody ověření +/-</b>	<b>19 z 21</b>	<b>18 z 20</b>
<b>Neinterpretovatelné</b>	<b>6</b>	<b>2</b>

## FD705 (OL)

zkřížená reaktivita s non-CREG7

HLA-B\*27 alela neprokázána

Rok	Ident.	BC HLA-B27 (MFI)	BC HLA-B7 (MFI)	BD HLA-B27 (MFI)	OL HLA-B27 (MFI)
2018	Ct-0920	39,81	2,21	15,6	55,1
2019	Ct-1163	39,81	1,85	88,12	94,73
2021	Ct-1179	41,27	1,38	131,11	109,45

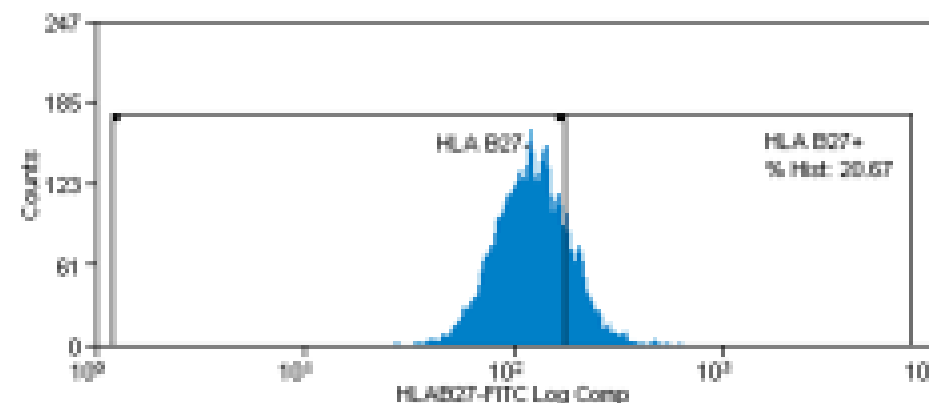
HLA-B\*27 alela neprokázána

2018	Ct-1592	140,94	279,94	188,15	3,81
------	---------	--------	--------	--------	------

## GS145.2 (BD) šedá zóna

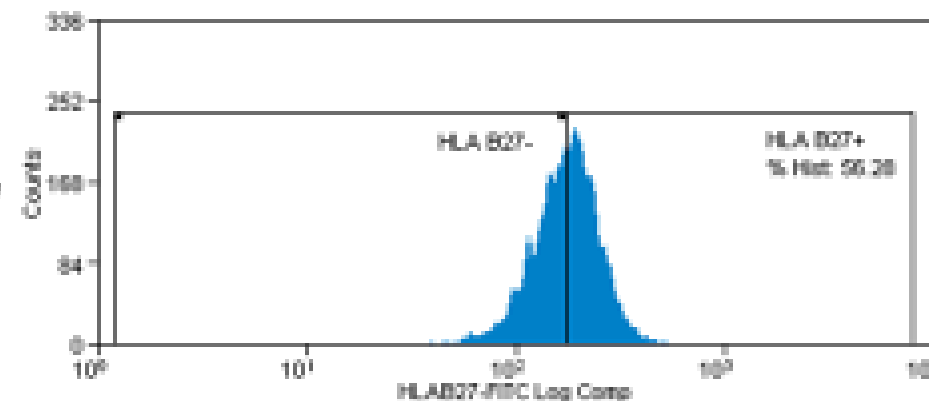
n=18 z 58

HLA-B\*27 alela prokázána



- ovlivněno preanalytickou fází, fixací → EHK

HLA-B\*27 alela neprokázána



## Vztah alel HLA-B\*27 k riziku AS

Populace	Kavkazská	Asijská
Riziková	B*2705 B*2702	B*2704 B*2705
Protektivní	B*2709	B*2706

AS také u jedinců s B\*27:08, B\*27:13, B\*27:19  
Tyto alely jsou ale příliš vzácné, tudíž nelze prokázat, zda asociují s AS.

- Ambulance časných SpA
- Vyšetření prvostupňových příbuzných pacientů se známou AS na přítomnost sakroileitidy

	B*2702	B*2705	
<b>AS (n=48)</b>	11	37	1 homo *2705
<b>Příbuzní (n=42)</b>	12	32	2 hetero *2702 *2705
<b>Sakroileitida (n=10)</b>	4	8	

# Závěr

- HLA-B27 má silnou asociaci s onemocněním spondylartritidou
- Průkaz HLA-B27 je součástí klasifikace – pomocný znak
- Stanovení metodou průtokové cytometrie je v porovnání s cytotoxickým testem časově méně náročné, s vyšší kapacitou a výrazně menší spotřebou krve
- Cytometrická detekce při správném uspořádání a interpretaci má vysokou specificitu.
- Do 1% vzorků v našem systému je neprůkazných - nutno ověřit genetickým testem.
  
- Probíhá studie asociace intenzity exprese HLA-B27 a rizika rozvoje SpA u prvostupňových příbuzných a u nemocných s uveitidou
- Perspektiva asociační studie alel HLA-B\*27

## Poděkování

Ing. Hana Hulejová

Ing. Klára Prajzlerová, Ph.D

Jana Menclová

Doc. Ing. Mgr. Blanka Stibůrková, Ph.D

MVDr. Kateřina Pavelcová, Ph.D

Konzultace Ing. Milena Vraná

