

COMPARISON OF SEROLOGICAL METHODS AND MOLECULAR GENETIC METHODS OF HLA TYPING

KULCSAROVA E, KRALOVICOVA J, PARNICKA Z, FERENCIK S, BUC M

POROVNANIE VÝSLEDKOV HLA-TYPIZÁCIE SÉROMETÓDAMI A METÓDAMI MOLEKULÁRNEJ GENETIKY

Abstract

Kulcsarova E, Kralovicova J, Parnicka Z, Ferencik S, Buc M: Comparison of serological methods and molecular genetic methods of HLA typing
Bratisl Lek Listy 2000; 101 (3): 134–137

A comparison of the HLA class I typing in 50 unrelated individuals by means of serological and molecular genetic (PCR-SSP) methods was carried out. DNA-typing is more fast and reliable method in comparison with serology. It is necessary to introduce molecular genetic methods for the detection of HLA class I alleles. On the other hand there are alleles, which are not expressed on cell surface. In our laboratory both methods are established and the results of both were compared. It may be useful for determining the selection strategy of HLA-identical donor-recipient pair suitable for bone marrow transplantation. The results demonstrated 9 % misassignments of HLA-A antigens by serology, 11 % of HLA-B and 39 % of HLA-C. The serological discrepancies found were of three categories: false negatives, false positives, and an incomplete typing. The vast majority of the discrepancies were due to a combination of relatively low expression of HLA antigens, lack of serological reagents and misclassification of antigens within cross-reactive groups. These results indicate that nowadays the serological typing is insufficient for clinical histocompatibility testing. (*Tab. 3, Ref. 16.*)

Key words: HLA-complex, HLA class I antigens, HLA class I alleles.

Hlavný histokompatibilný komplex (HLA) človeka je determinovaný génmi nachádzajúcimi sa na krátkom ramene 6. chromozómu. HLA-gény rozdeľujeme do dvoch tried: gény determinujúce HLA-antigény triedy I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G a pseudogény HLA-H, -J, -K, -L, -M) a gény determinujúce HLA-antigé-

Abstrakt

Kulcsárová E., Kráľovičová J., Párnická Z., Ferencík S., Buc M.: Porovnanie výsledkov HLA-typizácie sérometódami a metódami molekulárnej genetiky
Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 3, s. 134–137

Cieľom práce bolo porovnať výsledky HLA-typizácie u 50 zdravých, nepríbuzných jedincov pomocou sérometód a pomocou metód molekulárnej genetiky (PCR-SSP). DNA-typizácia je v porovnaní so sérometódami rýchlejšia, presnejšia a v prípade potreby sa môže kedykoľvek zopakovať bez ďalšieho odberu krvi. Na druhej strane však rozdiely medzi niektorými alelami sú minimálne a na úrovni exprimovaných antigénov nie sú identifikovateľné, dokonca existujú aj alely, ktoré sa vôbec neexprimujú. V takýchto prípadoch je výhodné paralelné použitie aj DNA, aj sérotypizácie. Keďže na našom pracovisku sú zavedené obe metódy, rozhodli sme sa porovnať výsledky oboch metód, a tak prispieť k výberu adekvátnej metodiky. Rozdiel medzi sérotypizáciou a DNA-typizáciou v prípade HLA-A antigénov bol 9 %, pri HLA-B antigénoch 11 % a pri HLA-C 39 %. Najčastejšie chyby, ktoré sa vyskytli, možno zahrnúť do troch kategórií: falošne pozitívne, falošne negatívne a neúplné reakcie. Väčšina chýb bola zapríčinená chýbaním vhodných sér, zníženou expresiou antigénov alebo nesprávnym určením antigénu v dôsledku krížovej reakcie sér. Tieto výsledky potvrdzujú väčšiu citlivosť metód molekulárnej genetiky oproti sérometódam a ich nevyhnutnosť zavedenia do typizačnej praxe pre účely klinickej transplantácie. (*Tab. 3, Ref. 16.*)
Kľúčové slová: HLA-typizácia, HLA-antigény triedy I, HLA-alely triedy I.

ny triedy II (HLA-DR, -DQ, -DP, -DM, -DO). Pre veľký biologický a medicínsky význam neustáva záujem o štúdium tohto systému. Neustále sa objavujú nové lokusy a nové alely. Dnes je známych vyše 100 lokusov a 664 alel tohto komplexu (Buc, 1997, 1998; Bodmer a spol., 1997).

Institute of Immunology, School of Medicine, Comenius University, Bratislava, Slovakia. kulcsarova@hotmail.com
Institute of Immunology, University Hospital, Essen, SRN
Address for correspondence: E. Kulcsarova, MD, Institute of Immunology LFUK, Sasinkova 4, SK-811 08 Bratislava, Slovakia.
Phone: +421.7.59357351, Fax: +421.7.59357578

Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Imunologický ústav Univerzitnej nemocnice v Essene, SRN
Adresa: MUDr. E. Kulcsárová, Imunologický ústav LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava 1.

V minulosti sa HLA-antigény študovali hlavne sérometódami a celulárnymi metódami, ktoré v súčasnosti už nie sú schopné zachytiť rozsiahly polymorfizmus tohto komplexu. V súčasnosti sa na celom svete prechádza na DNA-typizáciu jednotlivých alel, pretože rozsiahle štúdie dokazujú 20–30 % rozdiely medzi séro-typizáciou a DNA-typizáciou (Bozón a spol., 1997; Mytilineos a spol., 1997). Tieto rozdiely vznikajú predovšetkým v dôsledku nedostatku monošpecifických sér, ktoré určujú niektoré menej často sa vyskytujúce antigény a v dôsledku krížovo-reagujúcich sér. Najčastejšie chyby, ktoré sa vyskytujú pri sérometódach, sú falošne negatívne a falošne pozitívne reakcie, ako aj problémy pri identifikácii antigénov v rámci krížovo-reagujúcich skupín (Yu a spol., 1997). Okrem toho sa často stáva, že niektorá alela nie je na povrchu bunky exprimovaná, a preto sa pri sérotypizácii nemôže identifikovať (tzv. „blank“). Vysvetľuje sa to prítomnosťou nefunkčnej promótorovej sekvencie, alebo zavedením stop-kodónu do sekvencie niektorého exónu, prípadne bodovou mutáciou v niektorom exóne. Najčastejšie sa táto situácia vyskytuje pri alelách HLA-C (Cw*12 až Cw*17), ale boli opísané aj pri alelách HLA-A (A*0101, A*2402 atď.) a HLA-B (B*1526) (Parham, 1997; Laforet a spol., 1997).

Cielom predkladanej práce bolo porovnať výsledky typizácií HLA-antigénov a HLA-alel a porovnať citlivosť oboch metodických prístupov na našom vlastnom materiáli.

Materiál a metódy

Vyšetrili sme 50 zdravých, nepríbuzných, náhodne vybraných jednotlivcov slovenskej populácie. Určovali sme 22 antigénov HLA-A, 36 HLA-B a 9 antigénov HLA-C lokusu. Na určovanie HLA-antigénov sme použili mikrolymfocytotoxický test v modifikácii publikovanej našim pracovníkom (Nyulassy a spol., 1974). Test je založený na reakcii vyšetovaných buniek s typizačným antisérom obsahujúcim protilátky aktivujúce komplement. Nadviazanie protilátok na zodpovedajúci antigén v membráne bunky sa prejaví lýzou bunky v dôsledku aktivácie komplementu. Na určovanie antigénov sme použili séra komerčných setov „Biotest HLA-A,B,C“ firmy Merck (SRN).

Metóda PCR-SSP

DNA sme izolovali pomocou komerčnej súpravy „QIAmp Blood Kit“ (SRN), ktorý umožňuje získanie 4–12 g DNA z 200 µl

periférnej krvi. Alely lokusov HLA-A, HLA-B a HLA-C sme určovali metódou PCR-SSP (Olerup a spol., 1993) použitím pomocou amplifikačných „low resolution SSP“ primerov firmy Dynal (Nórsko) a pomocou amplifikačných primerov, ktoré boli syntetizované na oligosyntetizátore 392 firmy Perkin-Elmer na Imunologickom ústave Lekárskej fakulty v Essene, SRN. Špecifickosť a dĺžka týchto primerov je zhodná s primermi uvedenými v publikácii Bunce a spol. (1995).

Na určenie alel lokusu HLA-A sme použili 24 párov primerov, v prípade alel HLA-B 48 párov primerov a pre alely HLA-C 18 párov primerov. Amplifikačné zmesi obsahovali 5 pmol špecifického primeru, 100 ng genomovej DNA, 3 µl reakčnej zmesi (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 8,3, 5 % glycerol, 200 M z každého dNTP, 0,05 % krezolová červená) a 0,4 U Taq-polymerázy (Gibco, Veľká Británia). Amplifikáciu sme urobili na termocykleri „PTC-100TM-Programmable Comprised Thermal Controller“ (MJ Research, Inc., USA). Amplifikácia pozostáva z 30 cyklov zahrňujúcich denaturáciu (94 °C, 10 s), pripojenie primerov k matrici a vlastnú amplifikáciu (65 °C, 60 s). Po ukončení PCR sme produkty naniesli na 2 % agarózový gél zafarbený etídium-bromidom (0,5 g etídium-bromidu na 1 ml gélu). Elektroforéza prebiehala 15–20 minút pri 7–8 V/cm v roztoku TBE (89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,0). Po prebehnutí elektroforézy sme amplifikačné produkty vizualizovali pod UV transluminátorom „Bioblock-scintific“ (Francúzsko).

Výsledky

Vzorky krvi sme testovali súčasne mikrolymfocytotoxickým testom, ako aj metódou PCR-SSP. V prípade rozdielnych výsledkov sme metódu PCR-SSP zopakovali. Výsledky porovnávania sérotypizácie a DNA-typizácie sú v tabuľkách 1, 2 a 3. Porovnateľné rozdiely medzi jednotlivými metódami typizácie bolo možné rozdeliť do troch skupín:

1. typ: určenie inej špecifity DNA-typizáciou ako sérotypizáciou, alebo nezachytenie antigénu sérometódou v dôsledku chýbania špecifických sér,
2. typ: určenie rozdielnych podtypov v rámci širokého antigénu,
3. typ: určenie podtypu DNA-typizáciou v prípadoch, keď sérometódou bol stanovený len široký antigén.

Tab. 1. Comparison of serological and PCR-SSP typing results for HLA-A.

Tab. 1. Porovnanie výsledkov typizácie mikrolymfocytotoxickým testom a PCR-SSP pre HLA-A.

	Mikrolymfocytotoxický test		PCR-SSP	
Rozdiely I. typu	A2	A24	A1	A24
	A3	A-	A3	A1
	A2	A-	A2	A26
	A1	A-	A1	A31
	A1	43	A1	A25
	A2	A-	A2	A3
Rozdiely II. typu	A2	A31	A2	A30
	A2	A69	A2	A68
	A2	A69	A2	A68

Tab. 2. Comparison of serological and PCR-SSP typing results for HLA-B.

Tab. 2. Porovnanie výsledkov typizácie mikrolymfocytotoxickým testom a PCR-SSP pre HLA-B.

	Mikrolymfocytotoxický test		PCR-SSP	
Rozdiely I. typu	B27	B-	B27	B61
	B18	B-	B18	B44
	B40	B18	B40	B53
	B7	B15	B7	B6701
	B13	B53	B13	B35
	B22	B-	B22	B13
	B7	B-	B7	B38
Rozdiely II. typu	B27	B-	B27	B37
	B54	B-	B55	B13

Tab. 3. Comparison of serological and PCR-SSP typing results for HLA-C.**Tab. 3. Porovnanie výsledkov typizácie mikrolymfocytotoxickým testom a PCR-SSP pre HLA-C.**

	Mikrolymfocytotoxický test		PCR-SSP	
Rozdiely I. typu	Cw1	Cw-	Cw1	Cw12
	Cw-	Cw-	Cw2	Cw8
	Cw-	Cw-	Cw7	Cw9
	Cw7	Cw-	Cw7	Cw12
	Cw2	Cw-	Cw2	Cw15
	Cw-	Cw-	Cw5	Cw7
	Cw-	Cw-	Cw7	Cw12
	Cw5	Cw-	Cw5	Cw12
	Cw3	Cw-	Cw3	Cw12
	Cw4	Cw-	Cw4	Cw12
	Cw7	Cw-	Cw7	Cw4
	Cw3	Cw-	Cw3	Cw12
	Cw6	Cw-	Cw6	Cw12
	Cw6	Cw-	Cw6	Cw7
	Cw4	Cw-	Cw4	Cw7
	Cw3	Cw-	Cw3	Cw12
	Cw-	Cw-	Cw5	Cw7
	Cw6	Cw-	Cw6	Cw12
	Cw3	Cw-	Cw3	Cw7
	Cw-	Cw-	Cw6	Cw7
	Cw-	Cw-	Cw1	Cw7
	Cw7	Cw-	Cw7	Cw8
	Cw2	Cw-	Cw2	Cw12
	Cw7	Cw-	Cw7	Cw12
	Cw-	Cw-	Cw3	Cw18
	Cw-	Cw-	Cw8	Cw12
Cw2	Cw-	Cw2	Cw7	
Rozdiely II. typu	Cw5	Cw8	Cw5	Cw7

Tabuľka 1 uvádza rozdiely v rámci lokusu HLA-A. Výsledky získané sérotypizáciou a DNA-typizáciou sa nezhodovali v 9 prípadoch zo 100, z toho 6 rozdielov môžeme zaradiť do kategórie 1. typu a tri do 2. typu. Pri HLA-B sa rozdielne výsledky pozorovali v 9 zo 100 typizácií, z toho 8 patrí do 1. typu a jeden do 2. typu. Najväčšie rozdiely pri identifikácii HLA-antigénov, resp. alel sme zachytili pri lokuse HLA-C — nezhodu sme zaznamenali až v 39 %. Iba jeden rozdiel možno zaradiť do kategórie 2. typu a až 38 do kategórie 1. typu.

Diskusia

Zavedenie metód molekulárnej genetiky do určovania alel HLA-komplexu (Kulcsárová a Fazekašová, 1998) spôsobilo, že polymorfizmus HLA-komplexu podstatne vzrástol. Kým klasickými sérometódami a celulórnymi metódami možno určiť len 28 HLA-A, 59 HLA-B a 10 HLA-Cw antigénov, metódami DNA-typizácie až 83 HLA-A 186, HLA-B a 42 HLA-Cw alel (Bodmer a spol., 1997). Súčasne sa objavujú správy o rozdieloch vo výsledkoch typizácií získaných jednotlivými metodickými prístupmi. Pri HLA-A lokuse sa opisujú 10–35 % rozdiely (Bozón a spol., 1996; Yu a spol., 1997), pri HLA-B lokuse sa udáva 20 % rozdielnosť (Bozón a spol., 1997) a napo-

kon pre HLA-C lokus sú tieto rozdiely 30–40 % (Bunce a spol., 1997). Problémy s určovaním antigénov HLA-C sú spôsobené buď chýbaním špecifických sér, alebo v dôsledku zníženej expresie týchto antigénov na povrchu bunky v porovnaní s antigénmi HLA-A a HLA-B. Všetky alely Cw*1202 až Cw*17 sú sérologicky označené ako „blank“, t.j. nedajú sa určiť. Je to dosť závažný nedostatok, pretože napr. HLA-Cw*1203 má vyššiu fenotypovú aj genotypovú frekvenciu, ako napr. alely Cw*01 alebo Cw*02.

Na našom pracovisku sme v posledných rokoch zaviedli metódy DNA-typizácie HLA-alel (Kulcsárová a Fazekašová, 1998; Fazekašová a spol., 1998), a preto bolo potrebné urobiť porovnanie citlivosti sérometód a DNA-metód na vlastnom materiáli. V našej štúdií sme potvrdili v porovnaní so sérometódami vyššiu citlivosť DNA-typizácie, čo je v súlade s výsledkami iných autorov (Chang and Hawkins, 1998; Bunce a spol., 1995, 1997; Bozón a spol., 1997).

Výsledok transplantácie tkanív a orgánov závisí aj od stupňa zhody v HLA-antigénoch. Je preto nevyhnutné, aby stanovenie týchto antigénov bolo čo najpresnejšie. Nedostatky v typizácii HLA-antigénov sérometódami si preto vyžadujú ich doplnenie molekulárno-biologickými metódami založenými na DNA-typizácii, čo je aj naša úloha ako pracoviska, ktoré sa zaoberá výberom párov darca—prijemca pre transplantáciu programu kostnej drene na Slovensku.

Literatúra

Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Charron D., Dupont B., Erlich H.A., Fauchet R., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G.M.T., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I.: Nomenclature for factors of the HLA systém, 1996. *Tissue Antigens*, 1997, 49, s. 297–321.

Bozón M.V., Delgado J.C., Selvakumar A., Clavijo O.P., Salazar M., Ohashi M., Alosco S.M., Russell J., Yu N., Dupont B., Yunis E.J.: Error rate for HLA-B antigen assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods. *Tissue Antigens*, 50, 1997, s. 387–394.

Bozón M.V., Delgado J.C., Turbay D.: Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. *Tissue Antigens*, 47, 1996, s. 512–518.

Buc M.: *Klinická imunológia*. Bratislava, Veda 1997, 363 s.

Buc M.: Gény, polymorfizmus a funkcia HLA-genetickej oblasti. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 447–453.

Bunce M., Barnardo M.C.N.M., Procter J., Marsh S.G.E., Vilches C., Welsh K.I.: High resolution HLA-C typing by PCR-SSP: identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens*, 50, 1997, s. 100–111.

Bunce M., Fanning G.C., Welsh K.I.: Comprehensive, serologically equivalent DNA typing for HLA-B by PCR using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 45, 1995, s. 81–90.

Fazekašová H., Shawkatová I., Buc M., Ferencík S.: Frekvencia alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 v slovenskej populácii. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, č. 11, s. 601–604.

- Grundschober C., Rufer N., Sanchez-Mazus A., Madrigal A., Jeannot M., Roosnek E., Tiercy J.M.:** Molecular characterisation of HLA-C incompatibilities in HLA-ABDR-matched unrelated bone marrow donor-recipient pairs. Sequence of two new Cw alleles (Cw*02023 and Cw*0707) and recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Tissue Antigens*, 49, 1997, s. 612—623.
- Chang Y.W., Hawkins B.R.:** Comparison of serologic HLA class I results in a bone marrow registry with results obtained by DNA methods. *Transpl. Proc.*, 30, 1998, s. 3486—3487.
- Kulcsárová E., Fazekášová H.:** DNA-typizácia HLA-alel triedy I. *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, č. 11, s. 597—600.
- Laforet M., Froelich N., Parissiadis A., Pfeiffer B., Schell A., Faller B., Woehl-Jaegle M.-L., Cazenave J.P., Tongio M.M.:** A nucleotid insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A*01 allele. *Tissue Antigens*, 50, 1997, s. 347—350.
- Mytilineos J., Christ U., Lempert M., Opelz G.:** Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens*, 50, 1997, s. 395—400.
- Nyulassy Š., Buc M., Štefanovič J.:** Sledovanie antigénov HLA systému v slovenskej populácii. *Frekvencia HLA antigénov*. *Bratisl. lek. Listy*, 62, 1974, č. 1, s. 7—15.
- Parham P.:** Filling in the blanks. *Tissue Antigens*, 50, 1997, s. 318—321.
- Yu N., Ohashi M., Alosco S., Granja C., Salazar M., Hegland J., Yunis E.:** Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies. *Tissue Antigens*, 50, 1997, s. 380—386.

Received April 8, 1999.

Accepted February 11, 2000.