

# Komparativna analiza klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu za HLA tipizaciju

---

Kenjeric, Nives

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:768939>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Nives Kenjeric**

**KOMPARATIVNA ANALIZA**  
**KLASIČNE PCR METODE**  
**S FLUOROMETRIJSKOM**  
**DETEKCIJOM KRAJNJEG PRODUKTA**  
**I METODE PCR U STVARNOM**  
**VREMENU ZA HLA TIPIZACIJU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Nives Kenjeric**

**KOMPARATIVNA ANALIZA**  
**KLASIČNE PCR METODE**  
**S FLUOROMETRIJSKOM**  
**DETEKCIJOM KRAJNJEG PRODUKTA**  
**I METODE PCR U STVARNOM**  
**VREMENU ZA HLA TIPIZACIJU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Saška Marczy

Ovaj rad sadrži 36 stranica, 9 slika i 8 tablica.

## *Zahvala*

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Saški Marczy na pomoći, sugestijama, potpori i strpljenju tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem djelatnicama Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek za pomoć, podršku, gostoprimstvo i korisne savjete tijekom praktičnog dijela rada.

Veliko hvala mojoj obitelji - roditeljima Manueli i Kruni, sestri Karli, bakama Mariji i Miri, djedu Ivanu i prijateljima.

Velika zahvala i mom Domagoju na podršci tijekom studiranja.

Naučili ste me da cijenim i volim sebe i da nikada ne odustajem!

Ovaj rad posvećujem svojoj majci!

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Sustav humanih leukocitnih antigena .....	1
1.1.1. Molekule i geni HLA.....	1
1.1.2. Nomenklatura HLA .....	3
1.2. Molekularna tipizacija HLA .....	5
1.2.1. Tehnike molekularne tipizacije HLA .....	5
1.2.2. Primjena molekularne tipizacije HLA.....	8
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
3.1. Ustroj istraživanja .....	11
3.2. Uzorci.....	11
3.3. Metode .....	11
3.3.1. Mjerenje koncentracije DNA .....	12
3.3.2. Tipizacija HLA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta.....	12
3.3.3. Tipizacija HLA primjenom metode PCR u stvarnom vremenu .....	16
3.3.4. Statističke metode .....	20
<b>4. REZULTATI</b> .....	21
4.1. Usporedba rezultata tipizacije 11 lokusa HLA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu .....	21
4.2. Zastupljenost višeznačnih rezultata HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu.....	24
<b>5. RASPRAVA</b> .....	28
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	30
<b>7. SAŽETAK</b> .....	31
<b>8. SUMMARY</b> .....	32

<b>9. LITERATURA</b> .....	33
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	36

## POPIS KRATICA

C	učestali alel/alelna skupina (engl. <i>common</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
HLA	sustav humanih leukocitnih antigena (engl. <i>human leukocyte antigens</i> )
IPD-IMGT/HLA	baza podataka alelnih sekvenci gena sustava MHC u humanom genomu (engl. <i>Immuno-Polymorphism Database - International ImMunoGeneTics</i> )
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
NK	prirodno ubilačke stanice (engl. <i>natural killer</i> )
NGS	sekvenciranje sljedeće generacije (engl. <i>next-generation sequencing, NGS</i> )
PCR-SSO	lančana reakcija polimerazom i oligonukleotidima specifičnim za određenu sekvencu DNA (engl. <i>polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide</i> )
PCR-SSP	lančana reakcija polimerazom i početnicama specifičnim za određenu sekvencu DNA (engl. <i>polymerase chain reaction – sequence specific primer</i> )
R	rijedak alel/alelna skupina (engl. <i>rare</i> )
SBT	tipizacija sekvenciranjem po Sangeru (engl. <i>Sanger-based sequencing</i> )
WD	dobro dokumentiran alel/alelna skupina (engl. <i>well documented</i> )



## 1. UVOD

### 1.1. Sustav humanih leukocitnih antigena

Imunološki sustav organizma odgovoran je za kontrolu i regulaciju visokospecifičnih odgovora na strane antigene, te istodobnu nereaktivnost na vlastite antigene. Time se osigurava očuvanje biološkog integriteta jedinke. Visokospecijalizirani sustav koji ima ključnu ulogu u imunološkom razlikovanju vlastitih antigena od tuđih naziva se glavnim sustavom tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex, MHC*), a prisutan je kod riba, gmazova, ptica i sisavaca (1). Sustav MHC primarno je otkriven i opisan kao ključno povezan s odbacivanjem ili prihvaćanjem transplantiranih organa miševa. Godine 1954. opisan je istovjetni genski sustav u ljudi. Francusko-nizozemski tim imunologa, Jean Dausset i Jan van Rood, MHC sustav čovjeka nazvali su sustavom humanih leukocitnih antigena (engl. *human leukocyte antigens, HLA*). Otkriće i razvoj HLA sustava rezultat je detekcije prisutnosti antitijela protiv antigena izraženih na leukocitima bolesnika koji su primili višestruke transfuzije krvi, na leukocitima žena koje su više puta rodile, te leukocitima pacijenata kojima je transplantiran bubreg (1, 2). Definirana su dva razreda sustava HLA, razred I i razred II HLA antigena/gena, a naknadno i razred III. Otkriće sustava HLA rezultiralo je revolucionarnim promjenama u dotadašnjoj transplantacijskoj praksi. Daljnje studije omogućile su razrješenje uloge sustava HLA u razvoju bolesti, poglavito autoimunih, te njegovu primjenu u genetskim populacijskim studijama, farmakogenomici i transfuzijskoj medicini (1).

#### 1.1.1. Molekule i geni HLA

##### *Molekule HLA*

Sustav HLA ima ulogu predočavanja antigena imunološki kompetentnim stanicama čime se pokreće imunološka reakcija. Molekule HLA, kao i geni HLA koji ih kodiraju, podijeljene su u razrede (1).

Molekule HLA razreda I transmembranski su proteini heterodimerne građe od dva polipeptidna lanca, teškog lanca (~450 kD) i lakog lanca (12 kD). Laki lanac,  $\beta 2$  mikroglobulin, kodiran je genom na kromosomu 15 i ne sudjeluje u prezentaciji antigena. Teški lanac ( $\alpha$ ) sastoji se od citoplazmatskog, transmembranskog i ekstracelularnog dijela. Ekstracelularni dio je građen od tri domene:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ . Domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  grade pukotinu u kojoj je vezan antigen, dok je uloga

domene  $\alpha 3$  vezanje staničnog receptora citotoksičnog limfocita T. Molekule HLA razreda I na površini stanice predočuju peptide stranih antigena, uključujući i viruse, citotoksičnim limfocitima T (CD8+), a reagiraju i s različitim prirodno ubilačkim (engl. *natural killer*, *NK*) stanicama (1, 3). Ekspimirane su na svim stanicama s jezgrom i na trombocitima dok ih vrlo malo nalazimo na mišićnim i stanicama središnjeg živčanog sustava, spermatozoidima, oocitima i stanicama posteljice (2).

Molekule HLA razreda II građene su od dva međusobno slična, transmembranska nekovalentno vezana polipeptidna lanca:  $\alpha$  (33-35 kD) i  $\beta$  (26-28 kD). Ekstracelularni dio molekule sastoji se od četiri domene:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  i  $\beta 2$ . Domene  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  grade pukotinu u kojoj na površini stanice predočuju vezani antigen pomoćničkim T limfocitima (3). Ekspimirane su na antigen prezentirajućim stanicama (B limfociti, dendritičke stanice, makrofagi), limfatičkom tkivu, endotelnim i epitelnim stanicama timusa (1, 2).

### *Geni HLA*

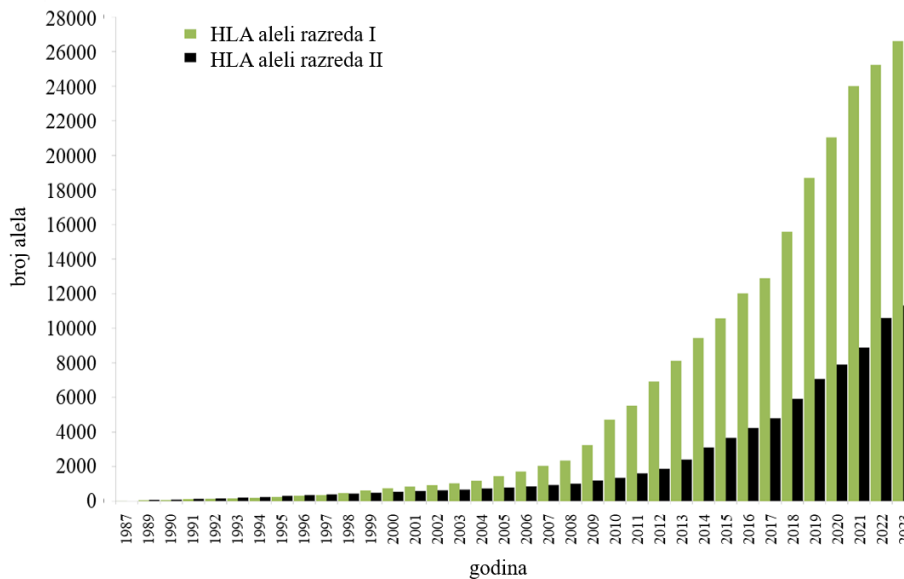
Geni odgovorni za sintezu HLA molekula nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.1-21.31. Regija HLA sadrži preko 200 gena, obuhvaća oko 4000 kilobaza i podijeljena je u tri razreda s obzirom na njihove biološke uloge. Geni HLA razreda II najbliže su centromeri, najbliže telomeri su geni HLA razreda I, dok su u sredini geni HLA razreda III. Geni HLA su kodominantno ekspimirani na površini stanica. Geni/molekule HLA razreda I i II ključni su za preradbu i predočavanje antigena (4).

Regija HLA razreda I sadrži 18 gena podijeljenih u klasične (HLA-A, -B, -C), neklasične (HLA-E, -F, -G) i pseudogene ili dijelove gena. Gene HLA-A, -B i -C odlikuje izrazita polimorfnost, dok su geni HLA-E, -F i -G nisko polimorfni.

Regija HLA razreda II sadrži 6 subregija od kojih svaka sadrži gene koji kodiraju molekule HLA razreda II. Svaka subregija (HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR) sadrži po jedan funkcionalni gen A i B za kodiranje odgovarajućeg polipeptidnog lanaca  $\alpha$  i  $\beta$  molekule HLA razreda II: parovi gena HLA-DPA1 i -DPB1, -DQA1 i -DQB1, -DRA1 i -DRB1 i td. (1, 4).

U regiji HLA razreda III nalaze se geni za komponente komplementa C2, C4, za faktor B, geni proteina toplotnog šoka (engl. *heat shock proteins*, *HSP*), geni *TNF-A* i *TNF-B* za faktor nekroze tumora-alfa ( $TNF-\alpha$ ) i beta ( $TNF-\beta$ ), gen za limfotoksin te brojni drugi geni (5).

Sustav HLA gena najpolimorfiji je genski sustav u ljudi. Polimorfnost je svojstvo pojave gena u više različitih, alternativnih oblika, alela. Do prosinca 2023. godine otkriveno je 38 909 alela HLA gena opisanih HLA nomenklaturom (Slika 1.) (6).



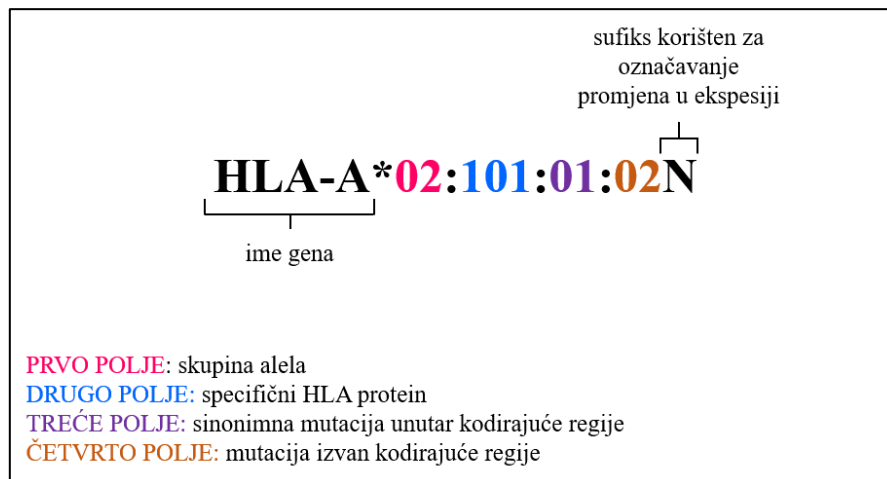
Slika 1. Grafički prikaz broja poznatih alela HLA razreda I i II otkrivenih od 1987. do 2023. godine, prilagodila autorica prema Barker D i sur. (6)

Visok stupanj polimorfizma tj. alelne raznolikosti rezultat je konverzije gena (zamjene dijelova gena ulomcima drugih gena), točkastih mutacija (zamjena pojedinačnih nukleotida) i rekombinacije između različitih alela istog lokusa (7). Evolucijski razvijena izrazita alelna raznolikost sustava HLA predstavlja mehanizam borbe protiv različitih uzročnika bolesti. Kombinacija alelnih oblika HLA gena na jednom kromosomu naziva se haplotip. Jedan je haplotip naslijeđen od majke, jedan od oca. Oba haplotipa HLA tvore genotip HLA (8).

### 1.1.2. Nomenklatura HLA

Razvoj tehnologije i primjena sofisticiranih metoda tipizacije HLA rezultirali su velikim brojem novootkrivenih alelnih varijanti. Kako bi se izbjegle pogreške u interpretaciji rezultata, sustav nazivlja HLA redovito se ažurira od strane Odbora za nomenklaturu HLA sustava koji djeluje u okviru Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*) (9). Imenovanje slijeda nukleotida u alelima HLA sadržano je u bazi podataka za imunogenetiku IMGT/HLA (engl. *Immuno-Polymorphism Database - International ImMunoGeneTics*) koja se ažurira svaka tri mjeseca (10).

Ovisno o korištenoj metodi, HLA gene je moguće identificirati do različitih stupnjeva razlučivanja. Radna skupina za usklađivanje termina tipizacije gena HLA definirala je tri vrste razlučivanja: nisko ili razlučivanje na razini 1. polja (engl. *low resolution*; *1<sup>st</sup>-field resolution*), visoko ili razlučivanje na razini 2. polja (engl. *high resolution*; *2<sup>nd</sup>-field resolution*) i alelna razina razlučivanja (engl. *allelic resolution*; *4<sup>th</sup>-field resolution*). Ekvivalent svake od razina razlučivanja je odgovarajući broj polja (engl. *field*) u nomenklaturi HLA (Slika 2.) (9). HLA tipizacija niskog razlučivanja definirana je na razini prvog polja u nomenklaturi HLA. Rezultat tipizacije je definirana alelna skupina koja kodira određeni antigen, pa se takva vrsta razlučivanja opisuje kao antigen-ekvivalentno. HLA tipizacija visokog razlučivanja definirana je s dva polja u nomenklaturi HLA. Rezultat tipizacije odnosi se na oznaku za specifičnu proteinsku sekvencu. Tipizacija koja uključuje i treće polje oznake gena HLA odnosi se na specifičnu proteinsku sekvencu uključujući i sinonimnu mutaciju unutar kodirajuće regije. HLA tipizacija alelna razine razlučivanja predstavlja najprecizniju tipizaciju, a definirana je razinom četvrtog polja u nomenklaturi HLA. Rezultat tipizacije alelna razine razlučivanja odgovara jedinstvenoj nukleotidnoj sekvenci gena (11, 12).



Slika 2. Nomenklatura HLA, izradila autorica, prilagođeno prema Barker D i sur. (6)

Učestalost HLA alela/alelnih skupina razlikuje se u svjetskim populacijama tj. etničkim skupinama. U izvješću Američkog društva za histokompatibilnost i imunogenetiku (engl. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, ASHI*) aleli su, s obzirom na učestalost, opisani kao česti (engl. *Common, C*), dobro dokumentirani (engl. *well documented, WD*) i oni koji ne pripadaju tim kategorijama (engl. *not-common/well documented*). Ta nam klasifikacija pomaže prilikom razjašnjavanja višeznačnih rezultata HLA tipizacije (engl. *ambiguities*) (13).

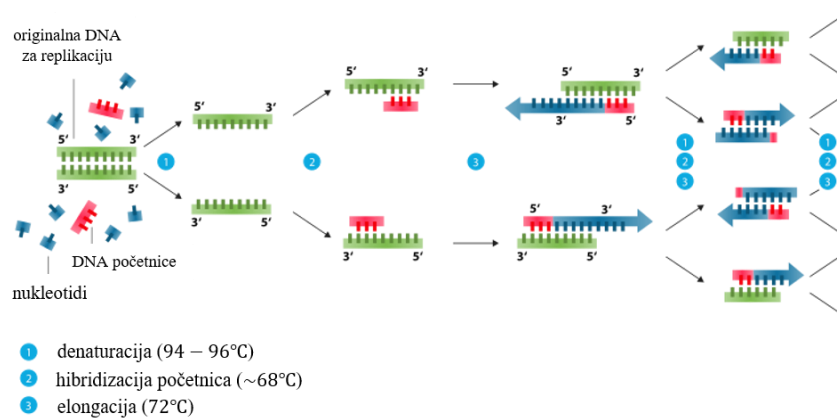
## 1.2. Molekularna tipizacija HLA

U kliničkim je laboratorijima nužno da tehnike koje se primjenjuju za tipizaciju tkiva osiguraju odgovarajuću razinu razlučivanja potrebnu u transplantaciji organa, krvotvornih matičnih stanica, povezanosti s bolestima, transfuzijskoj medicini i farmakogenomici. Tako je antigen-ekvivalentna razina razlučivanja, ili razlučivanje na razini prvog polja obično dovoljna u transplantaciji solidnih organa, dok je u transplantaciji krvotvornih matičnih stanica potrebna alelna razina razlučivanja (11).

Prema osnovnoj podjeli metodologije za tipizaciju HLA razlikujemo serološku i molekularnu tipizaciju HLA. Serološke metode tipizacije HLA imaju nisku razinu razlučivanja, a jedno od ograničenja im je subjektivnost u tumačenju rezultata tipizacije. Tehnološki napredak rezultirao je razvojem molekularnih metoda za tipizaciju HLA koje se danas najčešće i koriste u kliničkoj praksi za liječenje pacijenata, te u svrhu epidemioloških i antropoloških istraživanja (11). Molekularne metode tipizacije HLA, temelje se na analizi DNA i omogućuju veću razinu razlučivanja od seroloških metoda. Klinički laboratoriji u ovisnosti o specifičnim potrebama odabiru metodu molekularne tipizaciju HLA odgovarajuće razine razlučivanja.

### 1.2.1. Tehnike molekularne tipizacije HLA

Otkriće PCR-a (eng. *polymerase chain reaction, PCR*) osamdesetih godina prošloga stoljeća predstavljalo je revolucionarno otkriće koje je rezultiralo rapidnim napretkom metoda molekularne biologije i utemeljilo molekularni pristup u medicinskoj dijagnostici. PCR metoda služi za amplifikaciju (umnažanje) dijela/dijelova DNA čija je analiza od interesa. Osnovna PCR reakcija se sastoji od tri koraka, koji se ciklično ponavljaju. Prvi korak reakcije predstavlja korak razdvajanja dvostrukog lanca DNA (denaturacija), nakon čega slijedi hibridizacija početnica na ciljani dio DNA sekvence, te elongacija DNA lanca pomoću enzima DNA polimeraze. Tijek analize sastoji se od više ciklusa umnažanja odsječka DNA od interesa. Završetak jednog PCR ciklusa rezultira udvostručavanjem količine ciljanog odsječka DNA molekule. Ponavljanje PCR ciklusa rezultira eksponencijalnim rastom količine dobivenog produkta, a rezultat analize predstavlja velika količina fragmenta DNA od interesa koja nam olakšava analizu tog odsječka (15).



Slika 3. Shema PCR reakcije, prilagodila autorica prema

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase\\_chain\\_reaction.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg),

datum pristupa: 11.3.2024.

### PCR-SSP

Tehnika lančane reakcije polimerazom i početnicama specifičnim za određenu sekvencu DNA (engl. *polymerase chain reaction – sequence specific primer, PCR-SSP*) temelji se na PCR metodologiji. Metodu PCR-SSP za tipizaciju HLA inicijalno su razvili znanstvenici Olerup i Zetterquist u svrhu tipizacije HLA-DR, da bi 1995. godine tim znanstvenika na čelu sa Bunceom razvio sveobuhvatnu metodu za tipiziranje HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB4, -DRB5 i DQB1 (16). Metoda PCR-SSP zasniva se na principu da je početnica koja je savršeno podudarna kalupu učinkovitija u PCR reakciji od jedne ili više ne-savršeno podudarnih početnica (17). Početnice su dizajnirane za detekciju specifičnih polimorfizama HLA. Ako postoji nepodudarnosti, početnica se ne hibridira s lancem DNA, što ne daje PCR reakciju, niti signal za vezanje polimeraze i replikaciju same DNA (18). Kod tipizacije HLA-A, -B i -C određuju se polimorfizmi u egzonima 2 i 3 gena HLA razreda I, dok su za lokuse HLA-DR, -DQ i -DP specifične početnice prilagođene za detekciju polimorfizama egzona 2 gena HLA razreda II (18). PCR-SSP metoda primjenjiva je za tipizaciju HLA na više razina razlučivanja. Osim u svrhu tipizacije razine alelne razlučivanja metoda je primjenjiva i kod niske razine razlučivanja gdje su početnice dizajnirane za detekciju skupine alela, a rezultat takve genotipizacije definiran je kao antigen-ekvivalentna razina (16). Detekcija krajnjeg produkta PCR reakcije provodi se gel elektroforezom ili nekom od komercijalno dostupnih metoda detekcije produkta PCR-a, primjerice metodom koja se temelji fluorometrijskom određivanju.

*Real time PCR*

Kako klasične PCR metode nemaju mogućnost detekcije PCR produkta tijekom same reakcije, rezultati se detektiraju i tumače nakon same PCR reakcije, nekom drugom metodom, najčešće elektroforezom ili nekom od komercijalno dostupnih metoda za vizualizaciju. Real time PCR metoda u tipizaciji HLA ima sve veću primjenu upravo zbog mogućnosti detekcije produkta PCR-a tijekom PCR reakcije pri čemu nema više dodatnog koraka vizualizacije te je cijeli postupak vremenski kraći (19). Metoda real-time PCR za genotipizaciju HLA predstavlja svojevrsnu nadogradnju metode PCR-SSP, a temelji se na kvantifikaciji PCR produkata u stvarnom vremenu, nakon svakog PCR ciklusa. Kvantifikacija PCR produkata u stvarnom vremenu moguća je zbog korištenja specijalno dizajniranih fluorescentno obilježenih proba. Probe su dizajnirane da detektiraju specifične sekvence od interesa. Promjena u fluorescenciji bilježi se tijekom analize, a rezultati genotipizacije tumače se korištenjem specijaliziranih računalnih programa (19).

*PCR-SSO*

Metoda lančane reakcije polimerazom i oligonukleotidima specifičnim za određenu sekvencu DNA (engl. *polymerase chain reaction – sequence-specific oligonucleotide, PCR-SSO*) jedna je od prvih razvijenih metoda za genotipizaciju HLA. Osnove metode PCR-SSO su PCR i tehnike hibridizacije. U početku zamišljena kao metoda genotipizacije lokusa HLA razreda II, kasnije je prilagođena i za tipizaciju HLA gena razreda I. Prvi korak PCR-SSO metode je umnažanje odsječaka DNA od interesa, tj. gena poznatih polimorfizama HLA. Početnice koje se koriste u amplifikaciji DNA obilježene su biotinom. Nakon provedene PCR reakcije, biotinom obilježeni amplikoni detektiraju se korištenjem proba specifičnih sekvenci koje su vezane na čvrstu podlogu, najčešće na polistirenske mikrokuglice. Komplementarne DNA sekvence i oligonukleotidi se hibridiziraju. Prisutnost hibrida oligonukleotidne probe i DNA određuje se nekom od komercijalno dostupnih metoda koje se najčešće temelje na kemiluminiscentnom ili kolorimetrijskom određivanju (14, 18). PCR-SSO metoda je prikladna za tipizaciju velikog broja uzoraka (13).

Tehnike molekularne tipizacije HLA temeljene na metodi sekvenciranja DNA obuhvaćaju: (1) sekvenciranje po Sangeru (engl. *Sanger-based sequencing, SBT*) i (2) sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing, NGS*). Metode molekularne tipizacije HLA temeljene na sekvenciranju predstavljaju zlatni standard za tipizaciju HLA u slučajima kada je nužna alelna razina razlučivanja, primjerice u slučaju transplantacije krvotvornih matičnih

stanica. Prije sekvenciranja je nužno provesti PCR reakciju, a amplikoni DNA se zatim podvrgavaju tehnikama sekvenciranja (19).

### *Sekvenciranje metodom po Sangeru*

Tehnika sekvenciranja metodom po Sangeru (eng. *Sanger-based sequencing, SBT*) temelji na detekciji baza prekinutih lanaca. Komercijalno su dostupni setovi za tipizaciju HLA alela koji sadrže sekvence za tipizaciju egzona 2, 3 i 4 gena HLA razreda I i egzona 2 gena HLA razreda II. Detektirani sljedovi HLA gena zatim se uspoređuju s bazom podataka, te se tako identificiraju prisutni HLA aleli (19).

### *Sekvenciranje sljedeće generacije*

Tehnika sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing, NGS*) omogućuje paralelno, odvojeno, sekvenciranje velikog broja jednostrukih lanaca DNA molekula. Za HLA tipizaciju su dostupni komercijalni setovi raznih proizvođača primjenjivi na različitim NGS uređajima. Svaki od dostupnih setova temelji se na amplifikaciji HLA gena, fragmentiranju amplificiranih produkata u nasumične segmente, koji se zatim pojedinačno sekvenciraju. Tehnika je prikladna za istovremenu tipizaciju svih HLA lokusa na velikom broj uzoraka, te posjeduje veliki potencijal za otkrivanjem novih HLA alela (19).

## **1.2.2. Primjena molekularne tipizacije HLA**

### *Transplantacija solidnih organa*

Transplantacija solidnih organa podrazumijeva visoke zahtjeve u kako u pogledu nadzora svih procedura, pravnih i etičkih ograničenja, tako i u pogledu molekularne tipizacije HLA davatelja i primatelja. Odbacivanje transplantiranog organa najčešće je posredovano antitijelima usmjerenima protiv HLA antigena davatelja. Precizna HLA tipizacija davatelja i primatelja organa nužna je za određivanje stupnja HLA nepodudarnosti, što je jedan od ključnih faktora uspješnosti same transplantacije. Za transplantaciju bubrega, najčešće transplantiranog organa, većina transplantacijskih organizacija za sada preporučuje molekularnu tipizaciju šest HLA lokusa (19) s tendencijom prelaska na tipizaciju više HLA lokusa (20).

### *Transplantaciji krvotvornih matičnih stanica*

Transplantacija krvotvornih matičnih stanica temelji se na postupku zamjene bolesnih krvotvornih matičnih stanica primatelja krvotvornim matičnim stanicama zdravog darivatelja.



Transplantacija krvotvornih matičnih stanica koristi se u liječenju hematopoetskih bolesti, najčešće leukemija. Kao i kod transplantacije solidnih organa, tako i u slučaju transplantacije krvotvornih matičnih stanica, nužno je provesti tipizaciju primatelja i davatelja. Razlike u alelima HLA, odnosno stupnju HLA podudarnosti imaju ključan utjecaj na ishod transplantacije. Preporuka je da se molekularna tipizacija HLA u svrhu transplantacije krvotvornih matičnih stanica izvodi za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 na alelnoj razini razlučivanja (19).

### *Refraktornost na transfuzije trombocita*

Prilikom transfuzija trombocita pojedini pacijenti ne reagiraju povećanjem broja trombocita nakon transfuzije. Takav odgovor na transfuziju može biti posljedica brojnih čimbenika, među kojima je imunološka reakcija razaranja trombocita povezana s anti-HLA protutijelima. Pacijentima kod kojih je primijećena refraktornost na transfuzije trombocitima određuju se anti-HLA protutijela, a ako se ona detektiraju, nužno je pacijentu osigurati HLA podudarne pripravke krvi (19).

### *Povezanost s bolestima*

Sustav HLA povezan je s rizikom od razvitka određenih bolesti, poglavito onih autoimunog podrijetla. Najpoznatija je povezanost ankilozantnog spondilitisa s HLA-B\*27. Aleli HLA povezuju se i sa sklonošću razvoja drugih bolesti kao što su Behçetova bolest, celijakija, reumatoidni artritis, narkolepsija i dr. Napretkom tehnika HLA tipizacije dolazi se i do novih saznanja o povezanosti HLA alela s bolestima. Primjerice, dokazana je povezanost HLA-B\*27:05 i -B\*27:02 s ankilozantnim spondilitisom dok rjeđi aleli, poput HLA-B\*27:06 i HLA-B\*27:09 nisu povezani s ovom bolešću (19, 21).

### *Farmakogenomika*

Poznato je da su određene alelne varijante HLA povezane s reakcijama preosjetljivosti na neke lijekove. Jedan od primjera je povezanost HLA-B\*57:01 s reakcijom na lijek abakavir koji se primjenjuje kod infekcije virusom humane imunodeficijencije. Pacijenti kod kojih je dokazana prisutnost alela HLA-B\*57:01 pod povećanim su rizikom za potencijalno smrtonosnu reakciju preosjetljivosti na abakavir. Iz tog razloga je preporuka da se svim pacijentima kod kojih je planirano liječenje abakavirom učini HLA tipizacija kako bi se ispitala prisutnost alela HLA-B\*57:01. Poznate su i druge nuspojave na liječenje povezane s HLA sustavom (22).

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su:

1. Usporediti rezultate tipizacije 11 gena HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1) na razini razlučivanja 1. polja za 10 uzoraka DNA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu.
2. Utvrditi zastupljenost višeznačnih rezultata HLA tipizacije za svaki od 11 tipiziranih gena HLA primjenom obje analitičke metode na razini razlučivanja 1. polja.
3. Usporediti zastupljenost višeznačnih rezultata na razini razlučivanja 1. polja između primijenjenih metoda tipizacije HLA.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je osmišljeno kao presječna studija (23).

#### 3.2. Uzorci

Za komparativnu analizu klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu korišteno je 10 uzoraka DNA, ujedno korištenih i u sklopu programa vanjske kontrole kvalitete kojeg provodi referentni laboratorij Poljske akademije znanosti (Hirszfild Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wroclaw). Genotipovi 11 HLA lokusa za korištene uzorke DNA potvrđeni su u okviru vanjske kontrole kvalitete Laboratorija za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek za 2022. godinu.

#### 3.3. Metode

Genotip 11 lokusa HLA, HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1, za 10 uzoraka DNA određen je dvjema komercijalnim metodama kojima je zajedničko svojstvo uporaba početnica specifičnih za određenu sekvencu DNA u procesu lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction - sequence specific primer*, PCR-SSP). Parovi PCR-SSP početnica potpuno su, ili gotovo potpuno podudarni s pojedinačnim alelima ili skupinama alela, ovisno o potrebnoj razini razlučivanja (19). U strogo kontroliranim uvjetima PCR-a parovi specifičnih početnica dovode do umnažanja odsječaka DNA u prisutnosti odgovarajućeg/ih polimorfizma/polimorfizama, što se očituje kao pozitivni rezultat. U PCR smjesi se osim početnica nalazi i jedna ili više fluorescentno obilježenih proba specifičnih za ciljnu sekvencu gena HLA, te proba specifična za internu kontrolnu sekvencu (18). Jedna od metoda za umnažanje specifičnih odsječaka DNA koristi tehnologiju klasičnog PCR-a nakon kojeg se umnoženi produkti određuju fluorometrijski, a analiza rezultata provodi se pomoću specijaliziranog računalnog programa (24). Druga primijenjena metoda tipizacije HLA gena za umnažanje specifičnih odsječaka DNA koristi tehnologiju PCR-a u stvarnom vremenu i specijalizirani računalni program za analizu rezultata HLA tipizacije (25).

### 3.3.1. Mjerenje koncentracije DNA

Uzorcima DNA, poslanim iz laboratorija akreditiranog za provođenje vanjske kontrole kvalitete, izmjerena je koncentracija kako bi se prilikom primjene testova HLA tipizacije koncentracija DNA uzoraka u reakcijskoj smjesi mogla prilagoditi prema uputama proizvođača testova (26).

Za potrebe tipizacije HLA nužno je da DNA zadovoljava zahtjeve u pogledu čistoće i koncentracije. Koncentracija i čistoća DNA određivane su pomoću spektrofotometra *SpectraMax® QuickDrop™* (Molecular Devices LLC., San Jose, SAD) (26). Za određivanje koncentracije DNA apsorbancija je mjerena na 260 nm. Za određivanja čistoće DNA određivan je omjer apsorbancije OD 260/280 nm. Prihvatljivim uzorcima DNA u pogledu čistoće smatraju se oni čiji omjer apsorbancija iznosi 1,8-2,0. Odstupanje od te vrijednosti daje informaciju o prisutnosti nečistoća koje mogu imati utjecaja na daljnje analize (26).

### 3.3.2. Tipizacija HLA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta

Za tipizaciju HLA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta korišteni su komercijalni setovi HLA-FluoGene prema uputama proizvođača (Inno-Train Diagnostik, Kronborg, Njemačka). U svrhu genotipizacije 11 lokusa korišteni su setovi HLA-FluoGene A, HLA-FluoGene B, HLA-FluoGene C i HLA-FluoGene DRDQDP plus.

Setovi sadrže kombinacije početnica specifičnih za određene sekvence DNA i specifičnih TaqMan proba te daju rezultat HLA tipizacije niskog razlučivanja (24). Specifične početnice omogućavaju umnažanje definiranih DNA sljedova u reakciji klasičnog PCR-a. Detekcija krajnjeg PCR produkta temelji se na uporabi hidrolizirajućih TaqMan proba koje su dvostruko obilježene: molekulom fluorescentne boje vezanom na 5' kraj i molekulom za utišavanje vezanom na 3' kraj probe (24). U svakom ciklusu amplifikacije u PCR programu nailazak DNA polimeraze na fluorescentno obilježenu probu uzrokuje razgradnju i odvajanje probe od kalupa DNA, što rezultira detektabilnim fluorescentnim signalom. Fluorescentni signal očitavan je pomoću fluorometra FluoVista™ (Inno-Train Diagnostik, Kronborg, Njemačka) prije PCR reakcije („baseline“ fluorescencija) i nakon PCR reakcije (detekcija PCR produkta). Evaluacija rezultata provedena je pomoću licenciranog računalnog programa FluoGene (Inno-Train Diagnostik, Kronborg, Njemačka) (24).

*Reagensi*

Svaki FluoGene set sastoji se od mikrotitarske ploče s 96 jažica na kojoj se u odgovarajućem broju jažica nalaze liofilizirane početnice i probe, od tubice s PCR reakcijskom smjesom (FluoMix) i optički čiste folije (24). U jažicama su prisutne početnice specifične za umnažanje ciljnih sljedova specifičnih polimorfizama u regiji ispitivanog gena HLA, te početnice interne pozitivne kontrole. Uloga pozitivne kontrole je kontrola procesa umnažanja DNA, odnosno PCR reakcije. Kao interna kontrola koristi se gen humanog hormona rasta. Jedna jažica na mikrotitarskoj pločici služi kao negativna kontrola. U jažicu negativne kontrole umjesto uzorka DNA dodana je voda visoke čistoće (24). Negativna kontrola služi za kontrolu kontaminacije reakcijske smjese. Osim početnica u jažicama su prisutne i fluorescentno obilježene hidrolizirajuće TaqMan probe. FluoMix predstavlja smjesu deoksiribonukleotida, PCR pufera i Taq polimeraze. Za HLA tipizaciju 11 lokusa za svaki uzorak DNA korištena su po 4 FluoGene seta. Tri su namijenjena tipizaciji lokusa HLA-A, -B i -C, a četvrti tipizaciji lokusa HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1 (24).

*Postupak*

Setovi FluoGene uskladišteni na  $-20^{\circ}\text{C}$  odmrznuti su netom prije upotrebe. FluoMix je kratko vorteksiran i centrifugiran (spin down). U jažicu negativne kontrole otpipetirano je  $7,5\ \mu\text{L}$  FluoMix-a i  $7,5\ \mu\text{L}$  vode (24). Potom je pripravljena PCR reakcijska smjesa prema uputama proizvođača (Tablica 2.). Za pripremu PCR reakcijske smjese koristi se voda visoke čistoće (slobodna od DNaza, RNaza i proteaza). Konačna koncentracija uzorka DNA u reakcijskoj prilagođena je na  $1\ \text{ng}/\mu\text{L}$  (24).

Tablica 2. Sastav PCR reakcijske smjese FluoGene seta za tipizaciju HLA, prilagođeno (24)

	V(FluoMix) $\mu\text{L}$	V(DNA+H <sub>2</sub> O) $\mu\text{L}$	V(reakcijske smjese) $\mu\text{L}$
HLA-FluoGene A	210	210	420
HLA-FluoGene B	240	240	480
HLA-FluoGene C	210	210	420
HLA-FluoGene DRDQDP plus	780	780	1560

### 3. MATERIJALI I METODE

U jažice mikrotitarske ploče (osim negativne kontrole) otpipetirano je po 15  $\mu$ L PCR reakcijske smjese. Mikrotitarska ploča se pokrije optičkom folijom, kratko centrifugira, te inkubira 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je pomoću uređaja FluoVista očitana pozadinska fluorescencija. Podatak o pozadinskoj fluorescenciji detektiranoj na ploči potreban je prilikom evaluacije rezultata genotipizacije (24). Amplifikacija specifičnih ciljnih sljedova DNA provođena je uporabom standardnog PCR uređaja Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) (Slika 5.).



Slika 5. Uređaj Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, fotografiju snimila autorica u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, KBC Osijek, ožujak 2024.

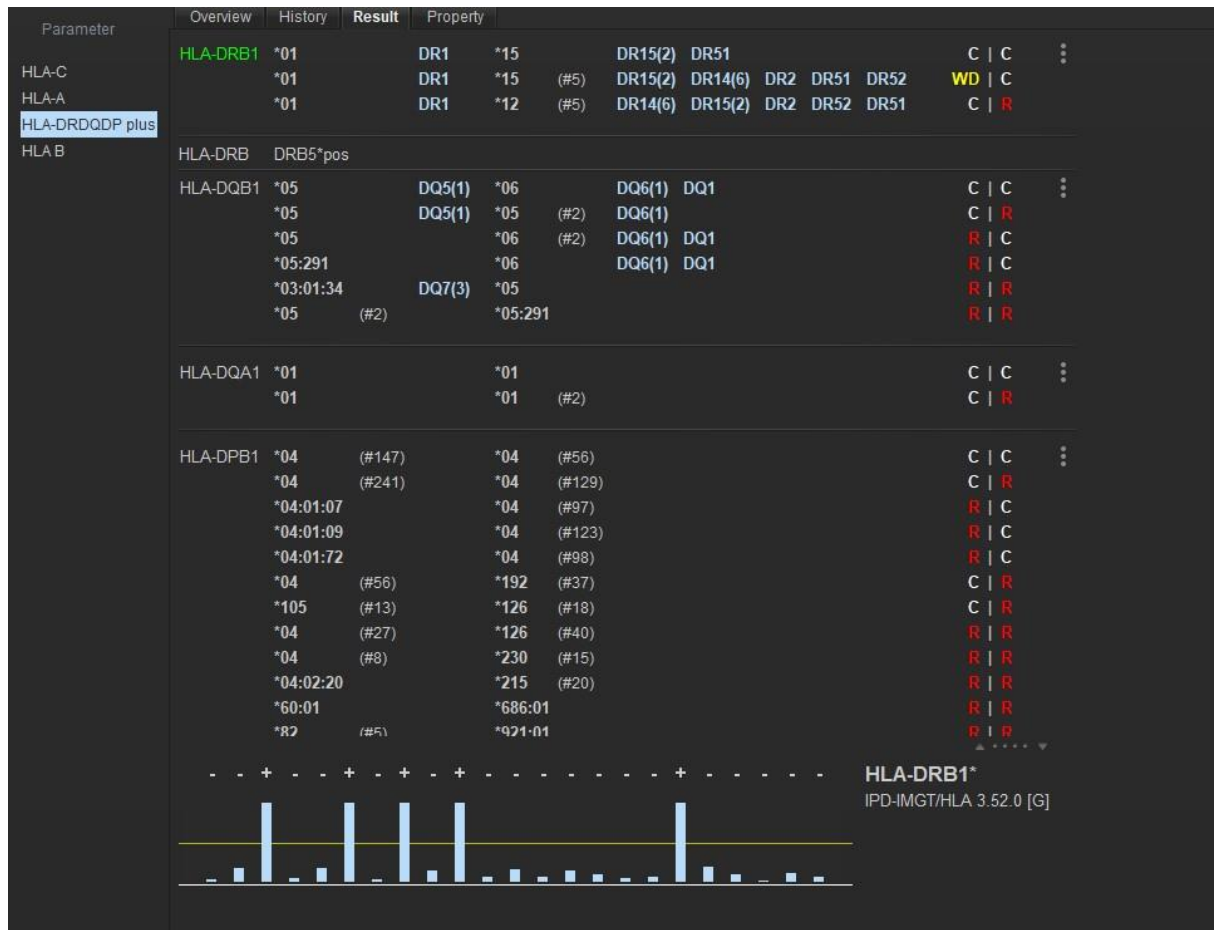
Protokol PCR reakcije za tipizaciju HLA na uređaju Veriti™ sastoji se od tri programska koraka: denaturacije uzorka (1 ciklus), PCR amplifikacije (40 ciklusa) i hlađenja. Fluorescentni signal produkta PCR reakcije očitao je pomoću FluoVista fluorometra (Slika 6.).



Slika 6. Uređaj FluoVista™, fotografiju snimila autorica u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, KBC Osijek, ožujak 2024.

#### *Analiza podataka i tumačenje rezultata pomoću softvera FluoGene*

Rezultati tipizacije HLA primjenom FluoGene setova analizirani su pomoću specijaliziranog računalnog programa FluoGene na temelju razlika u mjerenju fluorescencije prije i nakon PCR reakcije (24). Rezultati se uspoređuju s unaprijed definiranim graničnim vrijednostima, kako bi se podatci o rezultatima PCR reakcije klasificirali kao pozitivni ili negativni. Usporedbom dobivenih podataka s najnovijom verzijom IPD-IMGT/HLA baze podataka softver prikazuje alelne skupine detektirane u uzorku DNA (Slika 7.).



Slika 7. Primjer prikaza analize rezultata HLA tipizacije u računalnom programu FluoGene

### 3.3.3. Tipizacija HLA primjenom metode PCR u stvarnom vremenu

Tipizacija HLA metodom PCR u stvarnom vremenu provedena je pomoću komercijalnog seta Olerup QTYPE 11 prema uputama proizvođača (Olerup, CareDx, Stockholm, Švedska). Za amplifikaciju i detekciju PCR produkta u stvarnom vremenu korišten je real-time PCR uređaj LightCycler 480II (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska). Test Olerup QTYPE 11 sadrži početnice komplementarne pojedinačnim alelima, odnosno skupinama alela, te hidrolizirajuće probe koje se komplementarno vežu na specifične sljedove DNA između dviju početnica. Probe su obilježene dvjema različitim molekulama: molekulom fluorescentne boje vezanom na 5' kraju i molekulom za utišavanje vezanom na 3' kraju probe (25). Pobuda 5'-vezane molekule snopom zraka određene valne duljine rezultira emisijom fluorescencije, no zbog blizine molekule za utišavanje koja apsorbira emitiranu energiju fluorescencija je utišana. Tijekom elongacije novog DNA lanca, nailazak Taq DNA polimeraze na probu hibridiziranu na kalup



DNA uzrokuje njenu razgradnju pri čemu se reporterska boja i molekula za utišavanje razdvoje, što rezultira detektabilnim fluorescentnim signalom (25). U svakom ciklusu PCR-a količina emitirane fluorescencije povećava se proporcionalno rastućoj količini PCR produkta, a detekcija fluorescentnog signala provodi se u svakom ciklusu. U real-time PCR uređaju se pobuđivanje emisije fluorescencije odvija pomoću snopa svjetlosti koji prolazi kroz ekscitacijski filter, a detekcija fluorescencije provodi se pomoću digitalne kamere s ugrađenim emisijskim filterima. Za detekciju različitih boja koriste se različite kombinacije filtera (27). Porast fluorescencije proporcionalan je porastu količine PCR produkta. Podatci o fluorescentnim signalima u jažicama mikrotitarske ploče obrađuju se pomoću licenciranog softvera SCORE 6 (Olerup, CareDx, Stockholm, Sweden). Za analizu QTYPE 11 testa u programu SCORE 6 nužno je na uređaju LightCycler 480II izvesti i test kompenzacije boja, te datoteku provedene kompenzacije boja učitati u SCORE 6 prije analize HLA tipizacije setom QTYPE 11 (26).

#### *Reagensi*

Set QTYPE 11 omogućava genotipizaciju jedanaest lokusa HLA istovremeno na jednoj mikrotitarskoj pločici s 384 jažice. Set potreban za HLA tipizaciju pojedinog uzorka DNA sastoji se od mikrotitarske pločice, gotove PCR smjese (MasterMix) i optički čiste folije. U svakoj jažici mikrotitarske pločice nalaze se liofilizirane početnice za specifične sekvence HLA gena, početnice za umnažanje interne pozitivne kontrole (gen humanog hormona rasta) i fluorescentno obilježene probe. Jedna jažica na mikrotitarskoj pločici služi kao negativna kontrola. Za pripremu PCR reakcijske smjese i za negativnu kontrolu korištena je voda visoke čistoće, slobodna od DNaza, RNaza i proteaza (25).

#### *Postupak*

Set QTYPE 11 uskladišten na -20 °C odmrznut je na sobnu temperaturu neposredno prije upotrebe. MasterMix je kratko vorteksiran. Prije pripreme PCR reakcijske smjese u jažicu negativne kontrole na QTYPE mikrotitarskoj ploči dodano je 3 µL MasterMix-a i 12 µL vode. PCR reakcijska smjesa pripremljena je prema uputama proizvođača (Tablica 3.). Svaka jažica testa treba sadržavati 10 ng uzorka DNA (25).

Tablica 3. Sastav PCR reakcijske smjese QTYPE 11 seta za HLA tipizaciju, prilagođeno (25)

V(DNA) ( $\mu\text{L}$ )	4750 / c(DNA) ng/ $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	3800 – V(DNA)
MasterMix ( $\mu\text{L}$ )	950

Pomoću 12-kanalne mikropipete u svaku jažicu otpipetirano je 10  $\mu\text{L}$  PCR reakcijske smjese, osim u negativnu kontrolu. QTYPE 11 mikrotitarska pločica je pokrivena optički čistom folijom, centrifugirana dvije minute na minimalno 1000 RCF i postavljena u real-time PCR uređaj LightCycler 480II (Slika 7.). PCR protokol prikazan je u Tablici 3.

Tablica 3. PCR protokol za HLA tipizaciju primjenom QTYPE 11 seta u uređaju LightCycler 480II, prilagođeno (25)

Proces	Broj ciklusa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Trajanje (s)	Brzina promjene temperature ( $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ )
denaturacija	1	95	60	4,8
amplifikacija	40	98	5	4,8
		65	10	2,5
		72	15*	4,8

\*detekcija fluorescencije



Slika 8. Uređaj LightCycler 480 II, fotografiju snimila autorica u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, KBC Osijek, ožujak 2024.

#### *Analiza podataka pomoću softvera SCORE 6*

Rezultati tipizacije HLA primjenom QTYPE 11 seta analizirani su pomoću specijaliziranog softvera SCORE 6. Za analizu rezultata nužno je provesti i test kompenzacije boja. Podaci QTYPE 11 testa i testa kolor kompenzacije su u obliku .txt datoteka učitani u SCORE 6 (25). Za analizu rezultata PCR reakcije softver koristi krivulje amplifikacije PCR produkata u svakoj jažici, te uz korištenje najnovije verzije baze podataka IPD-IMGT/HLA prikazuje alelne skupine detektirane u uzorku DNA (Slika 9.).

The screenshot displays the SCORE 6 software interface for HLA typing analysis. The top navigation bar shows 'Patient', 'Test', 'Analysis', and 'Report' tabs, with 'Analysis' selected. The main window is divided into several sections:

- Search and Patient Info:** Shows 'Patient: G10-2022', 'Sample: G10-2022', and 'Test: QTYPE 11/E066 (O560)'. It also lists 'Samples linked to this patient ID' with 'G10-2022' and '24.1.2024'.
- Instrument and File Info:** Includes 'Instrument: LightCycler 480 II', 'Plate ID: 20240124\_121605', 'Data file: QTYPE\_E066\_G10-2022\_24012024', 'Test/lot: QTYPE 11/E066 Rev 00', and 'CC file: QTYPE\_CC66\_11122023\_LC26563.b'. It also shows 'Typing kit File: Typingkit\_QTYPE\_20230918.vda'.
- Well Results Grid:** A grid with rows A-P and columns 1-24. Circles in the grid are colored green or blue, indicating detected alleles. A legend below the grid shows 'Fam' colors: O560 (green), R610 (orange), Q670 (red), and another (blue).
- Allele Selection:** 'Allele 1' is set to a red bar, and 'Allele 2' is set to a blue bar.
- HLA Results Table:**

Locus	Allele combination	Serology	
HLA-A	A*02 A*24	A2, -, A24(9), -	
HLA-B	B*15 B*44:03	B62(15); B44(12)	
HLA-C	C*03:04 C*04	Cw10(w3); Cw4, -	
HLA-DRB	DRB1*01:01 DRB1*15:02:01:02	DR1, DR15(2)	
	DRB5*01	DR51, -	
<b>Common + Common allele combinations</b>			
	DRB1*01:01 DRB1*15:02:01:02	DR1, DR15(2)	
	DRB5*01	DR51, -	
	DRB5*01 DRB5*01	DR51, -	
<b>Common + Well Documented or Rare allele combinations</b>			
	DRB1*01 DRB1*15	DR1, -, Null; DR15(2), DR2, -, Null	
	DRB5*01 DRB5*01	DR51, -, Null	
<b>Well Documented and/or Rare allele combinations</b>			
	DRB1*01 DRB1*15	DR1, -, Null; DR15(2), DR2, -, Null	
	DRB5*01	DR51, -, Null	
	DRB5*01 DRB5*01	DR51, -, Null	
Analysed: 24.1.2024, Saska Marczy Allele db: HLADB_3.52.0			
<b>Assigned interpretation</b>			
<b>Assigned serology</b>			
<b>Assigned Bw status</b>			
<b>Information</b>			
<b>Bw information</b>			
HLA-DQA1	DQA1*01	DQA1*01:03:01:01	
HLA-DQB1	DQB1*05:01:01:01	DQB1*06:01:01:01	DQ5(1); DQ6(1)
HLA-DPA1	DPA1*01:03:01:01		
HLA-DPB1	DPB1*04:01:01:01	DPB1*04:02:01:01	

Slika 9. Primjer prikaza analize rezultata HLA tipizacije u računalnom programu SCORE 6

### 3.3.4. Statističke metode

Broj alela s višeznačnim rezultatima HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja za svaki HLA gen određen je direktnim brojanjem. Razlike u broju alela s višeznačnim rezultatima između metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu za svaki lokus HLA ispitane su uporabom Fisherovog egzaktnog testa, s razinom značajnosti  $\alpha=0,05$ . Za statističku analizu korišten je program MedCalc (28).

## 4. REZULTATI

### **4.1. Usporedba rezultata tipizacije 11 lokusa HLA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu**

Rezultati HLA tipizacije primjenom komercijalnih setova temeljenih na klasičnoj PCR metodi s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i komercijalnog seta koji se temelje na tehnologiji PCR u stvarnom vremenu poklapaju se na razini razlučivanja prvog polja za svih 11 tipiziranih lokusa HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1) (Tablica 4. i Tablica 5.).

Tablica 4. Rezultati HLA tipizacije 11 lokusa HLA primjenom setova FluoGene i QTYPE za uzorke 1 – 5.

HLA lokus	Uzorak 1		Uzorak 2		Uzorak 3		Uzorak 4		Uzorak 5	
A	*02 WD *32, *33, *56, *74 R *01, *03, *24, *29, *30, *361, *32, *33, *68, *74	*03	*02	*32	*02	- R *03, *24, *30, *31	*01	*68	*02	*32
	*02	*03	*02	*32	*02	-	*01	*68	*02	*32
B	*13	*14	*40	*57 R *58	*07	*50	*44	*52	*14	*44
	*13	*14	*40	*57	*07	*50	*44	*52	*14	*44
C	*06	*08	*03	*06	*06	*07	*07	*12 R *01	*05 WD *08 R *02	*08 R *02
	*06	*08	*03	*06	*06	*07 WD *06 R *12	*07	*12	*05	*08
DRB1	*13 WD *08 R *03, *14	*16 R *15	*07	*15 R *12, *15, *14, *16	*07	*14	*11 C *09 WD *09, *13 R *04, *08, *09	*15 WD *14 R *12, *13, *14	*01	*15 R *12, *13, *14, *16
	*13	*16	*07	*15	*07	*14	*11	*15	*01	*15
DRB3/4/5	DRB3	DRB5	DRB4*01:0 3:01:02N	DRB5	DRB3	DRB4	DRB3	DRB5	DRB5	
	DRB3*03	DRB5*02	DRB4*01:0 3:01:02N	DRB5*01	DRB3*02	DRB5*01	DRB3*02	DRB5*01	DRB5*01 R DRB5*02	
DQA1	*01	- R *05	*01	*02	*01	*02	*01	*05 R *01	*01	- R *05
	*01	-	*01	*02	*01	*02	*01	*05	*01	-
DQB1	*05	*06 R *05	*03	*06 R *03	*02	*05	*03	*06 R *03, *05	*05	*06 R *03
	*05	*06	*03	*06	*02	*05	*03	*06	*05	*06
DPA1	*01	*02	*01	-	*01 R *02	- R *02	*01 R *02	*02	*01	-
	*01	*02	*01	-	*01	-	*01	*02	*01	-
DPB1	*04	*05	*03	*04	*03	*04	*03	*04	*04	-
	C, WD, R *04	C, WD, R *05	C, WD, R *03	C, WD, R *04	C, WD, R *03	C, WD, R *04	C, WD, R *03	C, WD, R *04	C, WD, R *04	C, WD, R -

– = moguća homozigotnost; rezultati HLA tipizacije – tekst crne boje; višeznačni rezultati na razini 1. polja – tekst crvene boje; FluoGene komercijalni setovi – plava podloga; QTYPE 11 komercijalni set – siva podloga; C – učestale alelne varijante (*engl. common*); WD – dobro dokumentirane alelne varijante (*engl. well documented*); R – rijetke alelne varijante (*engl. rare*)

Tablica 5. Rezultati HLA tipizacije 11 lokusa HLA primjenom setova FluoGene i QTYPE za uzorke 6 – 10.

HLA lokus	Uzorak 6		Uzorak 7		Uzorak 8		Uzorak 9		Uzorak 10	
A	*01	*24 R *23	*03 R *34, *74	*11 R *03, *34	*01	*29	*03 R *34, *74	*66 WD *26 R *25, *26	*02	*24 R *23
	*01	*24	*03	*11	*01	*29	*03	*66	*02	*24
B	*27	*57 R *58	*07	*52	*13 R *44, *53	*14 R *58	*35 R *08	*41 R *15, *35	*15	*44
	*27	*57	*07	*52	*13	*14	*35	*41 WD *08 R *35	*15	*44
C	*02 WD *15:11	*06 R *15	*07	*12 WD *01 R *01, *02, *04, *14, *15, *16, *17	*06	*16 WD *12 R *06, *12, *14, *17	*04 R *12, *16, *17	*17	*03	*04 R *12, *16, *17
	*02	*06 WD *18 R *18	*07 R *12	*12	*06	*16	*04	*17	*03	*04
DRB1	*09	*11	*13 WD *08 R *03, *08	*15 C *14 WD *14 R *12, *13, *14, *16	*07	*11	*01	*13 WD *08 R *03, *14	*01	*15 WD *14 R *12, *13, *14, *16
	*09	*11	*13	*15	*07	*11	*01	*13	*01	*15
DRB3/4/5	DRB3	DRB4	DRB3	DRB5	DRB3	DRB4	DRB3		DRB5	
	DRB3*02	DRB4*01	DRB3*03	DRB5*01	DRB3*02	DRB4*01	DRB3*01		DRB5*01	
DQA1	*03	*05 R *03	*01	- R *05	*02	*05	*01	*05 R *01	*01	- R *05
	*03	*05	*01	-	*02	*05	*01	*05	*01	-
DQB1	*03	*03 R *04, *05, *06	*06 R *03, *05	-	*02	*03	*03	*05	*05	*06 R *05
	*03	*03	*06	*06	*02	*03	*03	*05	*05	*06
DPA1	*01	-	*01 R *02	-	*01 R *02	*02	*01 R *02	- R *02	*01 R *02	- R *02
	*01	-	*01	-	*01	*02	*01	-	*01	-
DPB1	*02	*04	*03	*04	*04	*11	*04	-	*04	-
	C, WD, R	C, WD, R	C, WD, R	C, WD, R	C, WD, R	C, WD, R	C, WD, R	-	C, WD, R	-
	*02 C, WD, R	*04	*03 C, WD, R	*04	*04 C, WD, R	*11	*04 C, WD, R	-	*04 C, WD, R	-

– = moguća homozigotnost; rezultati HLA tipizacije – tekst crne boje; višeznačni rezultati na razini 1. polja – tekst crvene boje; FluoGene komercijalni setovi – plava podloga; QTYPE 11 komercijalni set – siva podloga; C – učestale alelne varijante (*engl. common*); WD – dobro dokumentirane alelne varijante (*engl. well documented*); R – rijetke alelne varijante (*engl. rare*)

Odluka o rezultatu HLA tipizacije za svaki alel HLA u ispitivanim uzorcima DNA primjenom obje metode tipizacije HLA temeljila se na analizi HLA tipizacije primjenom odgovarajućeg softvera te na publiciranom katalogu učestalih i dobro dokumentiranih (CWD) HLA alela (14). Aleli za koje je na razini razlučivanja prvog polja softver pokazao mogućnost dodatnih alelnih varijanti koje se razlikuju od rezultata HLA tipizacije označeni su kao višeznačni (u Tablicama 4. i 5. naznačeni crvenom bojom teksta) te u određenoj mjeri mogu predstavljati dvojbene rezultate tipizacije HLA.

Za neke alele za koje je prisutan višeznačni rezultat, dodatne varijante alelnih skupina u populacijama imaju rijetku učestalost. Na primjer, za lokus HLA-B u uzorku 2 rezultat je HLA-B\*57, no tipizacijom pomoću FluoGene seta ne možemo isključiti određene rijetke (R) alelne varijante iz alelne skupine HLA-B\*58. Stoga je za spomenuti alel rezultat HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja ona alelna skupina koja za ovaj uzorak uključuje jednu ili više učestalih alelnih varijanti (C), u ovom primjeru to je HLA-B\*57. Dodatne varijante alelnih skupina koje softver prikazuje kao mogući rezultat za neke alele uključuju dobro dokumentirane alelne skupine (WD), npr. za lokus HLA-A u uzorku 1, za alel rezultata HLA-A\*02 softver daje i moguće WD varijante HLA-A\*32, \*33, \*56, \*74. U ispitivanoj skupini od 10 uzoraka/20 alela, za dva alela je tipizacijom pomoću FluoGene setova rezultat bio dvojbene uz prisustvo dviju učestalih (C) alelnih skupina: HLA-DRB1 za uzorak 4 (-DRB1\*11 i -DRB1\*09) (Tablica 4.), te za uzorak 7 (-DRB1\*15 i -DRB1\*14) (Tablica 5.).

#### **4.2. Zastupljenost višeznačnih rezultata HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu**

U testiranim je uzorcima primijećena veća zastupljenost višeznačnih rezultata HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja primjenom setova FluoGene u odnosu na QTYPE za sve tipizirane HLA lokuse. HLA tipizacija FluoGene setovima pokazala je za sve lokuse HLA veću prisutnost učestalih, dobro dokumentiranih, kao i rijetkih alelnih varijanti koje se razlikuju od rezultata HLA tipizacije (Tablica 6.). Iznimka je kod lokusa HLA-B, rezultat tipizacije QTYPE setom za jedan alel su prisutne i rijetke i dobro dokumentirane alelne varijante koje se razlikuju od rezultata HLA tipizacije (Tablica 6.). Za lokus HLA-DPB1 kod svih 20 alela/10 uzoraka rezultati HLA tipizacije su vešeznačni, tj. kod svih alela su prisutne mogućnosti dodatnih



alelnih varijanti (R, WD i C) koje se razlikuju od rezultata HLA tipizacije na razini razlučivanja 1. polja.

Usporedba zastupljenosti višeznačnih rezultata HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja nije učinjena za lokuse HLA-DRB3/4/5 zbog toga što se razina detekcije spomenutih lokusa za primijenjene metode razlikuje. Primjenom FluoGene seta detekcija je razine prisutan/nije prisutan, dok QTYPE set ima razinu razlučivanja prvog polja (Tablice 4. i 5.).

Tablica 6. Broj alela (%) za tipizirane lokuse HLA za koje je prisutna višeznačnost (*engl. ambiguity*) na razini razlučivanja prvog polja. Prikaz broja višeznačnih alela s obzirom na klasifikaciju učestalosti (R, WD, C) alelnih varijanti u svjetskim populacijama.

HLA lokus	FluoGene			QTYPE		
	R	WD	C	R	WD	C
A	2 (10%)					
	6 (30%)					
B				1 (5%)		
	6 (30%)					
C	3 (15%)			2 (10%)		
	5 (25%)	1 (5%)		1 (5%)		
DRB1	2 (10%)					
	5 (25%)					
	3 (15%)					
DQA1						
	7 (35%)					
DQB1						
	7 (35%)					
DPA1						
	9 (45%)					

C – učestale alelne varijante (*engl. common*); WD – dobro dokumentirane alelne varijante (*engl. well documented*); R – rijetke alelne varijante (*engl. rare*)

Analizom broja alela s jednoznačnim rezultatom u odnosu na broj alela s višeznačnim rezultatom kod pojedinačnih lokusa utvrđena je statistički značajno veća prisutnost višeznačnih

rezultata primjenom FluoGene setova u odnosu na rezultate dobivene primjenom QTYPE setova za lokuse HLA-A, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1 i -DPA1 (Tablica 7.)

Tablica 7. Usporedba rezultata HLA tipizacije primjenom FluoGene setova i QTYPE setova s obzirom na prisutnost višeznačnih rezultata na razini razlučivanja prvog polja

Metoda / komercijalni set	Broj alela s jednoznačnim rezultatom	Broj alela s višeznačnim rezultatom	Ukupan broj alela	P*
<b><i>HLA-A</i></b>				
FluoGene	12	8	20	0,003
QTYPE	20	0	20	
<b><i>HLA-B</i></b>				
FluoGene	14	6	20	0,09
QTYPE	19	1	20	
<b><i>HLA-C</i></b>				
FluoGene	11	9	20	0,04
QTYPE	17	3	20	
<b><i>HLA-DRB1</i></b>				
FluoGene	10	10	20	0,001
QTYPE	20	0	20	
<b><i>HLA-DQA1</i></b>				
FluoGene	13	7	20	0,008
QTYPE	20	0	20	
<b><i>HLA-DQB1</i></b>				
FluoGene	13	7	20	0,008
QTYPE	20	0	20	
<b><i>HLA-DPA1</i></b>				
FluoGene	11	9	20	0,001
QTYPE	20	0	20	

\*Fisherov egzarktni test

Statistički značajno veća prisutnost višeznačnih rezultata HLA tipizacije, koja se odnosi na prisutnost rijetkih alelnih varijanti, uočljiva je kod primjene FluoGen setova za lokuse HLA-A, -B, -DQA1, -DQB1 i -DPA1 (Tablica 8.). Značajno veća prisutnost rijetkih i dobro dokumentiranih alelnih varijanti koje se razlikuju od rezultata HLA tipizacije utvrđena je kod lokusa HLA-DRB1 primjenom FluoGene seta u odnosu na rezultate dobivene QTYPE setom (Tablica 8.).

Tablica 8. Usporedba rezultata HLA tipizacije primjenom FluoGene i QTYPE setova s obzirom na prisutnost višeznačnih rezultata na razini razlučivanja prvog polja. Prikaz broja jednoznačnih i višeznačnih rezultata tipizacije stratificiran s obzirom na klasifikaciju (R, WD, C) alelnih varijanti koje ne predstavljaju rezultat tipizacije, no ne mogu se isključiti iz razmatranja prilikom analize rezultata.

	R		p*	WD		p*	R i WD		p*	R i WD i C		p*
	Broj alela			Broj alela			Broj alela			Broj alela		
	Jedno- značnih	Više- značnih		Jedno- značnih	Više- značnih		Jedno- značnih	Više- značnih		Jedno- značnih	Više- značnih	
<b>HLA-A</b>												
FluoGene	14	6	0,02	20	0	/	18	2	0,24	20	0	/
QTYPE	20	0		20	0		20	0		20	0	
<b>HLA-B</b>												
FluoGene	14	6	0,02	20	0	/	20	0	1,00	20	0	/
QTYPE	20	0		20	0		19	1		20	0	
<b>HLA-C</b>												
FluoGene	15	5	0,18	19	1	0,50	17	3	1,00	20	0	/
QTYPE	19	1		20	0		18	2		20	0	
<b>HLA-DRBI</b>												
FluoGene	17	3	0,11	20	0	/	15	5	0,02	18	2	0,24
QTYPE	20	0		20	0		20	0		20	0	
<b>HLA-DQA1</b>												
FluoGene	13	7	0,008	20	0	/	20	0	/	20	0	/
QTYPE	20	0		20	0		20	0		20	0	
<b>HLA-DQB1</b>												
FluoGene	13	7	0,008	20	0	/	20	0	/	20	0	/
QTYPE	20	0		20	0		20	0		20	0	
<b>HLA-DPA1</b>												
FluoGene	11	9	0,001	20	0	/	20	0	/	20	0	/
QTYPE	20	0		20	0		20	0		20	0	

\*Fisherov egzaktni test

## 5. RASPRAVA

U ovom su istraživanju uspoređeni rezultati HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja za 11 lokusa HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1) primjenom metode klasičnog PCR-a s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR-a u stvarnom vremenu. HLA tipizacija razine razlučivanja prvog polja, odnosno niskog razlučivanja (*engl. low resolution*), primjenjuje se u transplantaciji solidnih organa, kod povezanosti s bolestima, te u transfuzijskoj medicini za primjenu HLA podudarnih pripravaka trombocita pacijentima kod kojih je prisutna refraktornost na transfuzije trombocitima (8).

Komercijalni setovi obje analitičke metode tipizacije HLA koji su korišteni u ovom radu od strane proizvođača su specificirani kao setovi za HLA tipizaciju niskog razlučivanja. Primijenjene metode se razlikuju u tehnologiji detekcije fluorescentnog signala. Kod FluoGene setova se nakon završetka PCR reakcije fluorescentni signal krajnjih produkata PCR reakcije očitava pomoću fluorometra. Primjenom QTYPE setova fluorescentni signal produkata koji se umnažaju očitava se sukcesivno tijekom PCR reakcije, u svakom od 40 ciklusa amaplikacije. S obzirom na jednak broj ciklusa amplifikacije i jednaku koncentraciju DNA kalupa u reakcijskim smjesama definiranim od strane oba proizvođača setova za tipizaciju HLA, razlika u načinu detekcije PCR produkta ne bi trebala biti uzrokom razlike u zastupljenosti višeznačnih rezultata HLA tipizacije. Kako obje primijenjene metode koriste početnice koje su potpuno ili skoro potpuno specifične za određene sekvence DNA (*engl. sequence specific primer, SSP*), razlika u zastupljenosti višeznačnih rezultata mogla bi se djelomično objasniti različitim dizajnom početnica od strane proizvođača. Moguća je razlika u slijedu baza oligonukleotidnih početnica te u specifičnosti početnica za određene sljedove u kalupu DNA. Nadalje, razlikama u zastupljenosti višeznačnih rezultata HLA tipizacije među korištenim setovima dviju metoda doprinos daju i različito raspoređene kombinacije parova početnica za različite lokuse HLA u jažicama mikrotitarske ploče testa.

Višeznačni rezultati HLA tipizacije prilikom analize u računalnom programu otežavaju odluku o rezultatu tipizacije. Dvojba je prisutna ukoliko softver, osim alelne skupine koja nam predstavlja rezultat s obzirom na očitane fluorescencije PCR produkata, daje višeznačni rezultat u obliku dodatne vjerojatnosti učestale alelne skupine (*engl. common, C*) ili dobro dokumentirane alelne skupine (*engl. well documented, WD*) za isti lokus HLA na određenom alelu. U tom slučaju je preporuka učiniti HLA tipizaciju lokusa HLA za kojeg postoji dvojbeni

rezultat. U svrhu razjašnjenja rezultata HLA tipizacija se može učiniti istom metodom drugog proizvođača, ukoliko je kombinacija početnica posložena na način da omogućava razjašnjenje dvojnog rezultata, ili se HLA tipizacija može učiniti drugom molekularnom tehnikom, npr. metodom PCR-SSO ili metodom sekvenciranja (19).

Rezultati ovog istraživanja dobiveni metodom klasičnog PCR-a s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta (FluoGene setovi) u dva su uzorka pokazali višeznačni/dvojbeni rezultat (Tablica 4., uzorci 4 i 7) s dodatnom mogućnosti učestale alelne skupine za lokus HLA-DRB1. Nadalje, istom metodom je za 2 uzorka na HLA-A, za 4 uzorka na HLA-C, za 6 uzoraka na HLA-DRB1 uočena dodatna mogućnost dobro dokumentirane alelne skupine (Tablica 4.). Istraživanje je pokazalo da se spomenuti višeznačni rezultati tj. dvojbe mogu razjasniti primjenom seta QTYPE 11. Primjenom setova QTYPE 11 u 3 su uzorka uočeni višeznačni/dvojbeni rezultati (Tablica 4, uzorku 9 na HLA-B, uzorci 3 i 6 na HLA-C). Usporedba rezultata testova pokazala je da se te dvojbe mogu razjasniti primjenom FluoGene setova. Izdvojeni slučaj je lokus HLA-DPB1 za kojeg su rezultati za sve testirane uzorke pomoću obje primijenjene metode bili višeznačni, s brojnim R, WD i C dodatnim mogućnostima alelnih skupina. Ovaj je rezultat u skladu s objavljenim radovima u kojima se navodi da genotipizacija lokusa HLA-DPB1 inače generira visok udio višeznačnosti ukoliko se izvodi molekularnim tehnikama koje su tehnički ograničene u karakterizaciji alela koji se razlikuju u egzonu 1 gena HLA-DPB1 ili nisu u mogućnosti razlikovati heterozigotne pozicije u egzonima 2 do 5 (29).

S obzirom na klinička područja primjene molekularne tipizacije HLA na razini razlučivanja prvog polja od iznimne je važnosti točno odrediti koje su alelne skupine lokusa HLA prisutne u genomu pacijenta. Ovo istraživanje naglašava važnost poznavanja tehničkih ograničenja metoda i komercijalnih setova koji se rutinski primjenjuju u dijagnostičkom laboratoriju za HLA tipizaciju, te važnost poznavanja mogućnosti prevladavanja tih ograničenja.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Rezultati HLA tipizacije primjenom komercijalnih setova temeljenih na klasičnoj PCR metodi s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i komercijalnog seta koji se temelji na tehnologiji PCR u stvarnom vremenu poklapaju se na razini razlučivanja prvog polja za svih 11 tipiziranih lokusa HLA (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 i -DPB1)
- Primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta višeznačne alelne skupine rijetke učestalosti (R) utvrđene su za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1. Istovremena prisutnost višeznačnih alelnih skupina rijetke učestalosti (R) i dobro dokumentiranih alelnih skupina (WD) uočena je za lokuse HLA-A, -C i -DRB1, a prisutnost samo WD višeznačnih alelnih skupina uočena je kod HLA-C. Istovremena prisutnost R, WD i učestalih (C) alelnih skupina utvrđena je kod lokusa HLA-DRB1 i -DPB1.
- Primjenom metode PCR u stvarnom vremenu višeznačne alelne skupine R učestalosti uočene su za lokus HLA-C. Istovremena prisutnost višeznačnih R i WD alelnih skupina utvrđena je za lokuse HLA-B i -C, dok su višeznačne R, WD i C alelne skupine nađene za lokus HLA-DPB1.
- Utvrđena je statistički značajno veća prisutnost višeznačnih rezultata HLA tipizacije na razini razlučivanja prvog polja kod primjene komercijalnih setova temeljenih na klasičnoj PCR metodi s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta u odnosu na komercijalni set temeljen na tehnologiji PCR u stvarnom vremenu za višeznačne R alelne skupine kod lokusa HLA-A, -B, -DQA1, -DQB1 i -DPA1, te za višeznačne R i WD alelne skupine kod lokusa HLA-DRB1.
- Na razini razlučivanja prvog polja za HLA-DPB1 obje primijenjene analitičke metode pokazuju višeznačnost rezultata HLA tipizacije s prisutnim R, WD i C alelnim skupinama koje se razlikuju od rezultata tipizacije.

## 7. SAŽETAK

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA:** Usporediti rezultate tipizacije 11 gena HLA na razini razlučivanja prvog polja za 10 uzoraka DNA primjenom klasične PCR metode s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i metode PCR u stvarnom vremenu, te utvrditi i usporediti zastupljenost višeznačnih rezultata između primijenjenih metoda tipizacije HLA.

**NACRT STUDIJE:** Presječna studija.

**MATERIJAL I METODE:** Materijal za komparativnu analizu dviju metoda HLA tipizacije činilo je 10 uzoraka DNA pribavljenih u sklopu Programa vanjske kontrole kvalitete Poljske akademije znanosti. HLA aleli određeni su dvjema komercijalnim metodama temeljenima na metodi PCR-SSP. FluoGene metoda, za umnožavanje specifičnog odsječka DNA koristi tehnologiju klasičnog PCR-a, produkti se određuju fluorometrijski, a analiza rezultata provodi se pomoću FluoGene računalnog programa. QTYPE metoda koristi se tehnologijom PCR-a u stvarnom vremenu, a za analizu rezultata koristi SCORE6 računalni program.

**REZULTATI:** Rezultati HLA tipizacije za obje metode poklapaju se na razini razlučivanja prvog polja za svih 11 tipiziranih lokusa. U testiranim uzorcima primijećena je veća zastupljenost višeznačnih rezultata HLA tipizacije primjenom setova FluoGene u odnosu na QTYPE za sve tipizirane HLA lokuse.

**ZAKLJUČAK:** Rezultati HLA tipizacije primjenom komercijalnih setova temeljenih na klasičnoj PCR metodi s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta i komercijalnog seta koji se temelji na tehnologiji PCR u stvarnom vremenu poklapaju se na razini razlučivanja prvog polja za svih 11 tipiziranih lokusa. Objema metodama utvrđeni su višeznačni rezultati, uz statistički značajno veću prisutnost višeznačnih rezultata kod primjene komercijalnih setova temeljenih na klasičnoj PCR metodi s fluorometrijskom detekcijom krajnjeg produkta.

**KLJUČNE RIJEČI:** HLA, molekularna tipizacija, slijedno specifične početnice, višeznačni rezultati

## 8. SUMMARY

Comparative analysis of the conventional PCR method with fluorimetric end-point detection and the real-time PCR method for HLA typing

**RESEARCH OBJECTIVES:** Compare the typing results of 11 HLA genes at the resolution level of the 1st field for 10 DNA samples using the classic PCR method with fluorometric detection of the amplified DNA product and the real time PCR method. Determination and comparing the prevalence of ambiguous results between used HLA typing methods.

**STUDY DESIGN:** Cross-sectional study.

**MATERIAL AND METHODS:** The material for the comparative analysis of the two HLA typing methods was 10 DNA samples obtained as part of the External Quality Control Program of the Polish Academy of Sciences. HLA alleles were determined by two commercial methods based on the PCR-SSP method. The FluoGene method uses classic PCR technology to amplify a specific segment of DNA, the products are determined by end-point fluorescence method, and the results are analyzed using the FluoGene software. The QTYPE method uses real-time PCR technology, and the results are analyzed using SCORE6 software.

**RESULTS:** Typing results of both methods match at the resolution level of the 1st field, for all 11 typed loci. A higher prevalence of ambiguous HLA typing results using FluoGene sets compared to QTYPE was observed for all typed HLA loci, for all 10 samples.

**CONCLUSION:** The results of HLA typing using commercial kits based on the classic PCR method with end-point fluorescence detection and a commercial kit based on real-time PCR technology match at 1st field resolution for all 11 typed loci. Ambiguous results were determined by both methods, with a statistically significantly higher presence of ambiguous results when using commercial kits based on the classic PCR method with fluorometric detection of the end product.

**KEYWORDS:** HLA, molecular typing, sequence-specific primers, ambiguous results



**9. LITERATURA**

1. Abbas KA, Lichtman HA. Basic Immunology. 2.izd. Elsevier Inc; 2004. 47-61 str.
2. Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. 2013. PubMed: El Rosario University Press. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29087650/>. Datum pristupa: 03.03.2024.
3. Medhasi S, Chantratita N. Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections. *J Immunol Res*. 2022.
4. Andreis, I. i sur. *Imunologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. 98-112 str.
5. Sertić J. i sur. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika*. 1. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 292-300.
6. Barker D, Maccari G, Georgiou X, Cooper M, Flicek P, Robinson J, Marsh SGE. The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research*. 2023;51(D1): D948-D955.
7. Anzar I, Sverchkova A, Samarakoon P, Ellingsen EB, Gaudernack G, Stratford R, i sur. Personalized HLA typing leads to the discovery of novel HLA alleles and tumor-specific HLA variants. *HLA*. 2022; 99(4):313-327.
8. Jaramillo A, Hacke K. The human Leukocyte antigen system: Nomenclature and DNA-based typing for transplantation [Internet]. IntechOpen; 2023. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/chapters/1128877>. Datum pristupa: 06.03.2024.
9. Hurley CK. Naming HLA diversity: A review of HLA nomenclature. *Hum Immunol*. 2021;82(7):457-465.
10. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res*. 2020;8;48(D1):D948-D955.
11. Larkins NG, D'Orsogna L, Taverniti A, Sharma A, Chakera A, Chan D i sur. The Accuracy of Sequence-Specific Oligonucleotide and Real-Time Polymerase Chain Reaction HLA Typing in Determining the Presence of Pre-Transplant Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Total Eplet Mismatches for Deceased Donor Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2022;13:844438.
12. Nunes E, Heslop H, Fernandez-Vina M, Taves C, Wagenknecht DR, Eisenbrey AB i sur. Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group. *Blood*. 2011;118(23):e180-e183.

13. Hurley CK, Kempenich J, Wadsworth K, Sauter J, Hofmann JA, Schefzyk D i sur. Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0. *HLA*. 2020;95(6):516-531.
14. Bontadini A. HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. *Methods*. 2012;56(4):471-476.
15. Turnpenny PD, Ellard S i sur. Emeryjeve osnove medicinske genetike. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 110-111.
16. Bunce M, Passey B. HLA typing by sequence-specific primers. *Methods Mol Biol*. 2013;1034:147-159.
17. Sequence-specific Primer (PCR-SSP) Technology [Internet]. Creative-Biolabs. Dostupno na: <https://www.creative-biolabs.com/sequence-specific-primer-pcr-ssp-technology.html>. Datum pristupa: 07.03.2024.
18. Dunckley H. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol*. 2012;882:9-25.
19. Madden K, Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory. *Virchows Arch*. 2019;474(2):139-147.
20. Lehmann C, Pehnke S, Weimann A, Bachmann A, Dittrich K, Petzold F, i sur. Extended genomic HLA typing identifies previously unrecognized mismatches in living kidney transplantation. *Front Immunol*. 2023;14:1094862.
21. Trabace, S. HLA and disease association. *J Headache Pain*. 2000;1(2): S109–S113.
22. Kloypan C, Koomdee N, Satapornpong P, Tempark T, Biswas M, Sukasem C. A Comprehensive Review of HLA and Severe Cutaneous Adverse Drug Reactions: Implication for Clinical Pharmacogenomics and Precision Medicine. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(11):1077.
23. Lukić IK, Sambunjak D. Vrste istraživanja. U: Marušić M, urednik. *Uvod u znanstveni rad u medicine*. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str.41.
24. Instructions for use HLA-FluoGene®, Inno-Train Diagnostik. Dostupno na: <https://www.inno-train.de/en/endpoint-fluorescence-measurement/>. Datum pristupa: 07.03.2024.
25. Olerup QTYPE®11. Instructions for use. CareDx. Dostupno na: <https://labproducts.caredx.com/products/olerup-ssp/technical/instructions-for-use>. Datum pristupa: 07.03.2024.
26. SpectraMax QuickDrop UV-Vis Spectrophotometer User Guide. Molecular Devices LLC. Dostupno na adresi: [https://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/2020-12/QuickDrop\\_user\\_guide.pdf](https://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/2020-12/QuickDrop_user_guide.pdf). Datum pristupa: 11.03.2024.

27. Olerup Qtype Brochure. Dostupno na: [https://www.dlongwood.com/wp-content/uploads/2020/04/Olerup\\_Qtype\\_Brochure\\_CE\\_IVD\\_SF\\_190424.pdf](https://www.dlongwood.com/wp-content/uploads/2020/04/Olerup_Qtype_Brochure_CE_IVD_SF_190424.pdf). Datum pristupa: 15.03.2024.
28. MedCalc® Statistical Software version 22.021. MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium. Dostupno na: <https://www.medcalc.org>. Datum pristupa: 05.03.2024.
29. Duke JL, Mosbrugger TL, Ferriola D, Chitnis N, Hu T, Tairis N, i sur. Resolving MiSeq-Generated Ambiguities in HLA-DPB1 Typing by Using the Oxford Nanopore Technology. *J Mol Diagn.* 2019;21(5):852-861.

## 10. ŽIVOTOPIS

### **Nives Kenjeric**

Datum i mjesto rođenja:

- 17. srpnja 2000. godine, Virovitica

Obrazovanje:

- 2007. – 2015. Osnovna škola Antunovac, Antunovac
- 2015. – 2019. Zdravstvena gimnazija pri Medicinskoj školi Osijek
- 2019. – 2022. Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika
- 2022. – 2024. Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika