



Durchflusszytometrische HLA-B27-Bestimmung

Karin Köhrer, Irene Handler, Ingrid Holzer, Susanne Körrer, Michael Ecker, H.R.M. Lang
Zentrallabor des AÖ KH Wiener Neustadt

Die immunologische Individualität jedes Menschen wird vor allem durch die Ausstattung mit Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (=MHC) bestimmt. Ein Teil dieser Gene, die auch HLA-Antigene genannt werden, kodiert für Proteinstrukturen, die an der Oberfläche von Körperzellen exprimiert werden. Diese Antigene entscheiden über wesentliche Zellkooperationen im Zusammenhang mit der Entwicklung einer spezifischen Immunantwort.

Da von solchen Mechanismen, vor allem wenn sie zu schwach oder zu stark ausfallen, die Entstehung und der Verlauf zahlreicher Krankheiten abhängen, ist es nicht verwunderlich, daß zunehmend signifikante Assoziationen zwischen besonderen Anfälligkeiten, aber auch besonderen Resistenzen gegenüber definierten Erkrankungen und einzelnen HLA-Spezifitäten oder ganzen HLA-Haplotypen gefunden werden.

Besonders stark ist diese seit mehr als 20 Jahren bekannte Assoziation zwischen dem HLA-B27, einem MHC-Klasse-I-Antigen, und einer Gruppe von rheumatischen Erkrankungen, speziell den seronegativen Spondylarthropathien, wie Morbus Bechterew

(=Spondylitis ankylosans) und Morbus Reiter. 95% dieser Patienten tragen das HLA-B27-Merkmal. Das relative Krankheitsrisiko gegenüber HLA-B27 negativen Menschen ist 90fach erhöht. Ca. 8-10% der Gesamtbevölkerung sind Merkmalsträger, überwiegend aber ohne klinische Anzeichen für eine Erkrankung.

MHC-Klasse-I-Antigene werden auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten, nicht jedoch auf Spermien exprimiert.

Zur Bestimmung des HLA-B27 stehen zur Zeit die klassischen serologischen Nachweisverfahren im Vordergrund. Dabei werden HLA-Antigene an funktionsfähigen mononukleären Zellen aus dem Blut nachgewiesen.

- Der Lymphozytotoxizitätstest nach Terasaki (LCT) ist die Referenzmethode. Entsprechend den Vorschriften des NIH (National Institute of Health) werden die mononukleären Zellen über einen Dichtegradienten isoliert. Nach einer ersten Inkubation mit HLA-Klasse-I spezifischen Antikörpern, erfolgt ein weiterer Inkubationsschritt mit Kaninchen-Komplement. Mononukleäre Zellen, die das HLA-B27 Antigen tragen, gehen infolge der, durch die Bindung der spezifischen Antikörper ausgelösten Komplementaktivierung, zugrunde. Diese vergleichsweise zeitaufwendige und kostenintensive Laboruntersuchung setzt zur Auswertung viel Erfahrung voraus, und kann nur bei frischem Material sicher durchgeführt werden.

- Alternativ wurden in jüngster Zeit enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), und vor allem auch durchflusszytometrische Methoden (FCM) zur Bestimmung des HLA-B27 entwickelt.

Bei den FCM wird Vollblut direkt mit einem Fluorochrom-besetzten monoklonalen Antikörper gegen das HLA-B27 markiert. Diese Technik wurde 1987 erstmals beschrieben. Sie hat neben den niedrigen Materialkosten hauptsächlich wegen der Automatisierbarkeit weitere Vorteile - nämlich die geringe Personalbindung, sowie die Möglichkeit des höheren täglichen Probandendurchsatzes.

Im Zentrallabor des AÖKH Wiener Neustadt

erfolgt die HLA-B27 Bestimmung durchflusszytometrisch mit einer Kombination von monoklonalen Antikörpern in Form einer Stufendiagnostik.

Wir brauchen dazu K-EDTA oder Lithium-Heparin Vollblut.

Probenvorbereitung:

-100 µl Vollblut werden mit 2 µl Ak (Anti-HLA-B27-ABC-m3, FITC konjugierter monoklonaler Ak der Fa. Behring) versetzt.

-Inkubation für 10 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Dieser Antikörper zeigt eine hohe Affinität zum HLA-B27 Antigen - aus der Literatur sind aber Kreuzreaktionen, besonders mit B7, aber auch mit B22, B42, B55 und B56 bekannt. Da 27% der kaukasischen Bevölkerung HLA-B7 positiv sind, ist diese Kreuzreaktivität besonders störend.

-Es folgt eine vollautomatische Lyse mit dem Immuno-Prep-Kit der Fa. Coulter Electronics am Multi-Q-Prep.

Diese Art der Probenvorbereitung ist rasch und mit geringem Personalaufwand durchzuführen, zudem ermöglicht sie eine optimale Differenzierung zwischen HLA-B27-negativen und - positiven Proben.

Die Erythrozyten werden dabei mit Amei-

sensäure lysiert; die Reaktion dann mit einem isotonen Natriumsalz Puffer gestoppt; die Fixierung erfolgt mit Paraformaldehyd.

-Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur.

-Im Anschluss wird jeder Probe als interner Gerätstandard ein Tropfen Flow-Set- Beads der Fa. Coulter Electronics zugefügt.

Durchflusszytometrische Analyse der Probe an einem EPICS-XL-MCL der Fa. Coulter Electronics:

Die Darstellung der Messergebnisse der HLA-B27- Antikörperfluoreszenz erfolgt in 4 Histogrammen (Abbildung 1):

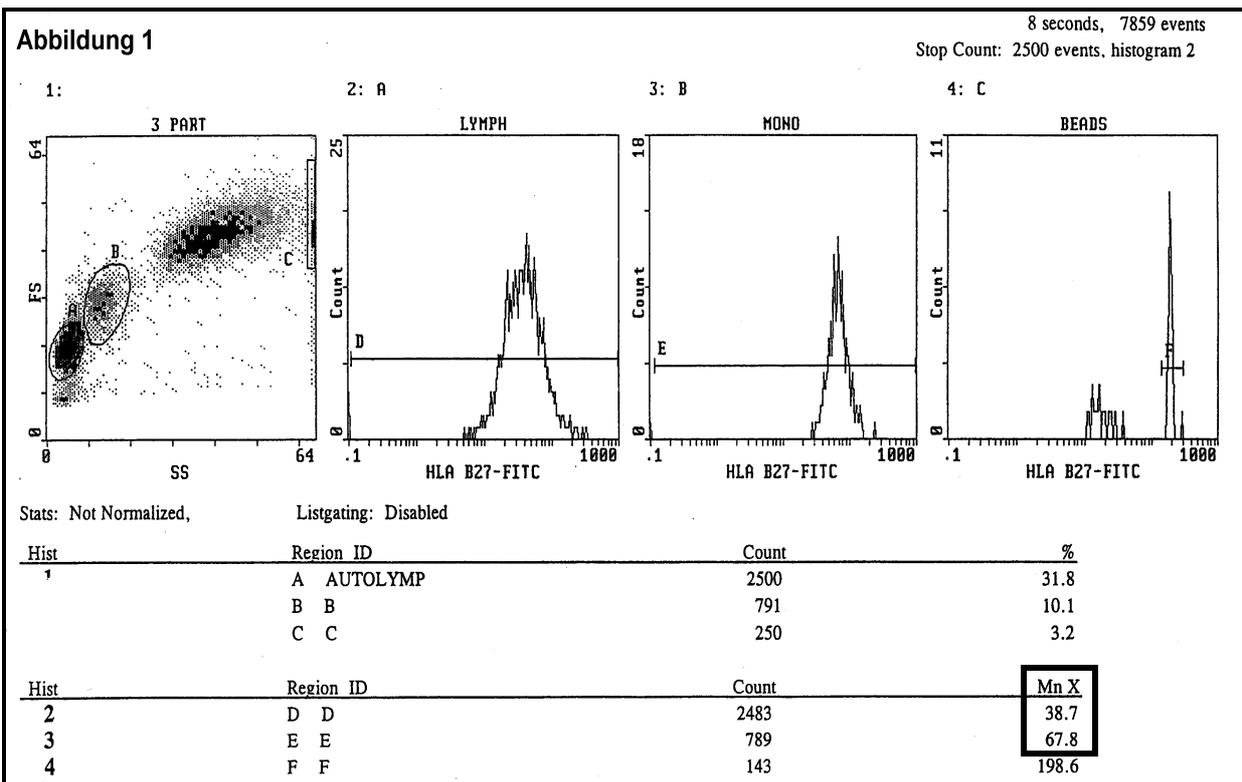
Histogramm 1: FS vs. SS; es wird um die Lymphozyten, Monozyten und die Beads je ein Gate gelegt (A, B und C). Im Lymphozyten-Gate, das auch als Autogate konfiguriert sein kann, werden 2500 Ereignisse gemessen.

Histogramm 2,3, und 4: Einparameter-Histogramme; die FITC-Fluoreszenzen der Populationen in den Gates werden in 1024 Kanälen logarithmisch dargestellt.

Der Mean Channel der Fluoreszenzen der Lymphozyten, der Monozyten und der Beads wird direkt abgelesen.

Probenvorbereitung und Analyse dauern insgesamt 30 Minuten.

Die Entscheidungsgrenzen für die durch-



flusszytometrische Bestimmung von HLA-B27 mit Anti-HLA-B27-ABC-m3 sind in Tabelle 1 beschrieben.

Proben, die nach den in Tabelle 1 geforderten

	Lymphozyten Mean Channel/ MnX	Monozyten Mean Channel/ MnX
positiv	> 14	> 20
grenzwertig	8 - 14	12 - 20
negativ	< 8	< 12

Kriterien nicht eindeutig zugeordnet werden können, aber auch alle Proben, die ein grenzwertiges bzw. eindeutig positives Ergebnis liefern, werden im Hinblick auf die in der Literatur beschriebenen Kreuzreaktionen einem Ergänzungstest mit dem Anti-HLA-B27-FD 705 Antikörper der Fa. One Lambda unterzogen.

Probenvorbereitung und Messprinzip sind ident.

Der Mean Channel der Monozyten-Fluoreszenz wird allerdings nicht zur Beurteilung des HLA-B27-Status herangezogen (Abbildung 2).

Probenvorbereitung und Analyse dauern

ebenfalls insgesamt 30 Minuten.

Die Entscheidungsgrenzen sind in Tabelle 2 angegeben:

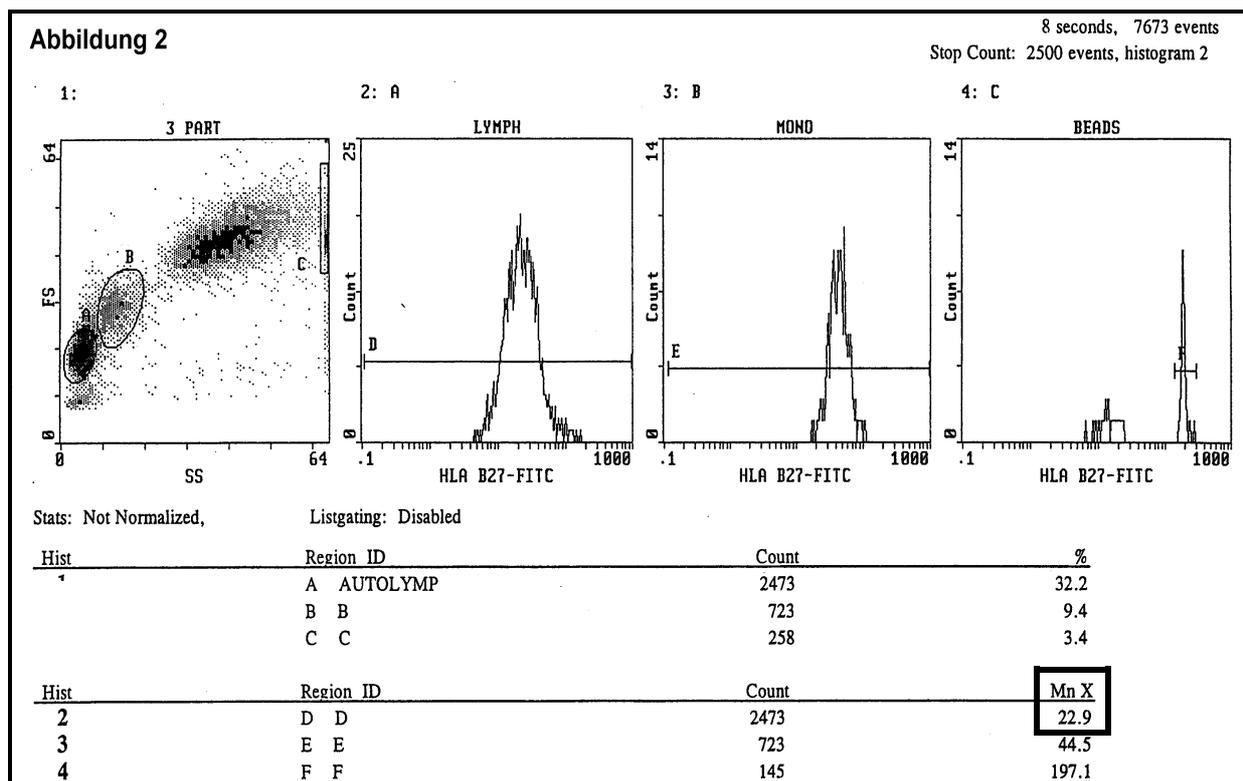
Kreuzreaktionen mit HLA-B7 sind bei diesem

positiv	Mean Channel der Lymphozyten > 7,0
negativ	Mean Channel der Lymphozyten < 7,0

Antikörper nicht beschrieben. Allerdings ist die Reaktion mit den verschiedenen Subtypen des HLA-B27 unterschiedlich - eine starke Reaktivität wird mit HLA-B27.3, B27.5 und B27.6 beobachtet. Die Reaktion mit dem Subtyp B27.2 ist schwach, aber immer erkennbar.

Aufgrund dieser schwachen Reaktion mit dem Subtyp 2 werden bei alleiniger Bestimmung des HLA-B27-Status mit diesem Antikörper vereinzelt falsch negative Ergebnisse erhoben.

Auch uns sind immer wieder Proben aufgefallen, die im Screening-Test mit dem Anti-HLA-B27-ABC-m3 Antikörper eindeutig positive Ergebnisse hatten, im Bestätigungstest mit dem Anti-HLA-B27-FD 705 Antikörper im Lymphozyten-Gate aber lediglich einen Mean Channel um den Cut off von 7,0 oder manchmal sogar knapp darunter lieferten.



Üblicherweise liegt der Mean Channel der Lymphozyten-Fluoreszenz bei negativen Proben zwischen 0,8 und 4,0. Bei eindeutig positiven Proben liegt er in der Regel weit über 7.

Solche Proben, bei denen es sich offensichtlich um den Subtyp 2 des HLA-B27 handelt, führen wir seit ca. sechs Monaten einem weiteren Test zur endgültigen Bestätigung der HLA-B27 Positivität zu.

Wir verwenden dazu eine Antikörper-Kombination aus Anti-HLA-B27-ABC-m3 FITC konjugiert und Anti-HLA-B7 PE konjugiert der Fa. Immunotech.

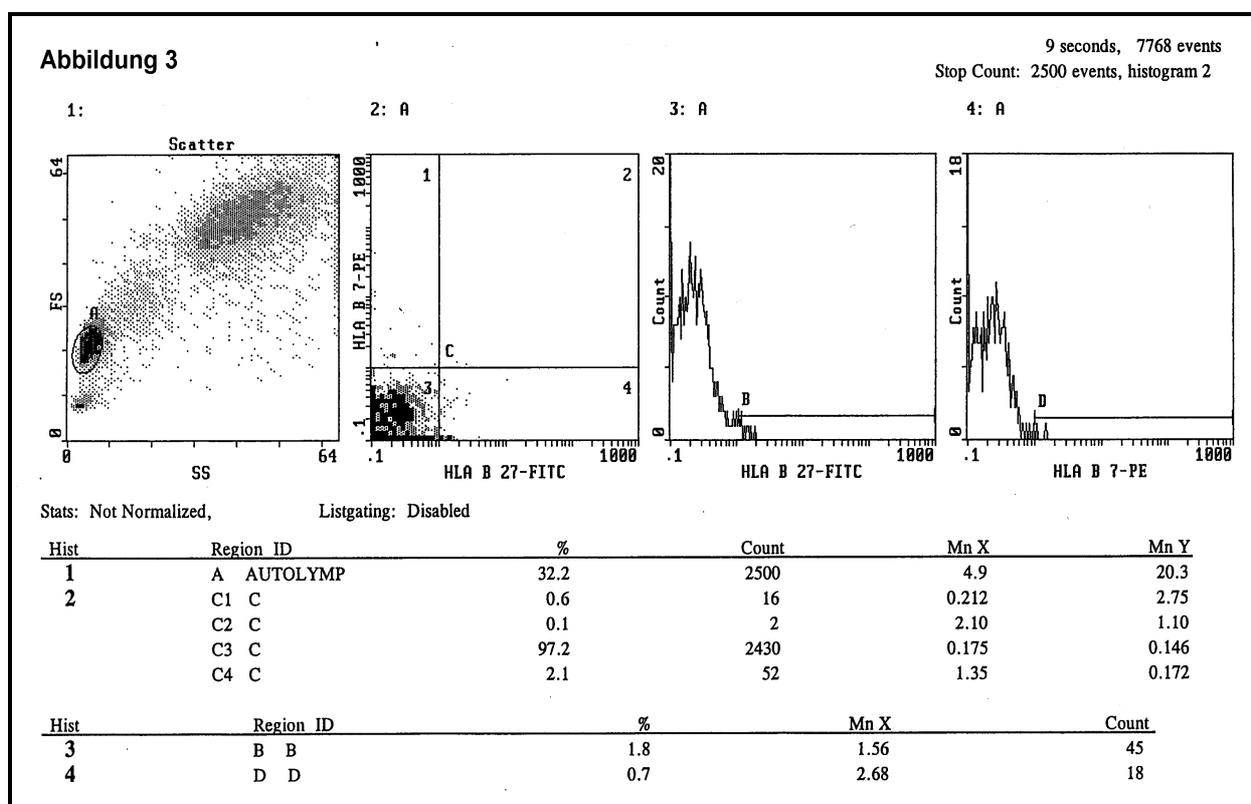
Probenvorbereitung:

-Auffüllen mit PBS-Puffer; Zentrifugieren; Dekantieren und resuspendieren mit PBS-Puffer;

Durchflusszytometrische Analyse der Probe:
Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt in 2 Histogrammen (Abbildungen 3 und 4).

Histogramm 1: FS vs. SS; es wird um die Lymphozyten ein Gate gelegt. Im Lymphozyten-Gate werden 2500 Ereignisse gemessen.

Histogramm 2: Zweiparameter-Histogramm; Fluoreszenz 1/FITC gegen Fluoreszenz 2/PE; Probenvorbereitung und Analyse dauern 60



-K-EDTA oder Lithium-Heparin Vollblut
-100 µl Vollblut werden mit 10 µl Antikörper versetzt
-Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur
-Zugabe von 500 µl Opti Lyse C, einem gepufferten hypertonen Erythrozytenlyse-Reagenz mit 1,5% Formaldehyd; sofort vortexen
-Inkubation für 10 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln
-Zugabe von 500 µl PBS-Puffer; sofort vortexen
-Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln

Minuten.

Die HLA-B27 positiven Proben liegen im Quadranten 4 bzw. 2 (HLA-B7 und B27 positiv), die HLA-B27 negativen Proben liegen im Quadranten 3 bzw. 1.

Von September 1994 bis August 1996 untersuchten wir im Zentrallabor des AÖ KH Wiener Neustadt insgesamt 1442 Vollblutproben auf ihren HLA-B27 Status.

Dabei lieferte die Untersuchung mit dem Anti-HLA-B27-ABC-m3 Antikörper folgende Ergebnisse (Tabelle 3):

- In der ersten Zeit der HLA-B27 Bestimmung wurden auch die Proben, die bei der

Tabelle 3	
	Anti-HLA-B27-ABC-m3
negativ	1094
grenzwertig	88
positiv	260

Reaktion mit dem Anti-HLA-B27-ABC-m3 Antikörper negative Ergebnisse lieferten, parallel dazu mit dem Anti-HLA-B27-FD 705 Antikörper untersucht.

Dabei lieferte eine Probe ein für uns unplausibles Ergebnis (Tabelle 4).

Der Mean Channel der Lymphozyten-Fluoreszenz bei der Messung mit dem FD 705

Tabelle 4		
	Anti-HLA-B27-ABC-m3	Anti-HLA-B27-FD 705
Mean Channel d. Lymphozyten	2,72	9,33

Antikörper war in Relation zum eindeutig negativen Ergebnis bei der Messung mit dem ABC-m3 Antikörper zu hoch. Auch die unterschiedliche Reaktivität der beiden Antikörper mit den verschiedenen HLA-B27-Subtypen konnte dieses Phänomen nicht klären.

Die Probe wurde einem Typisierungslabor in Hamburg/Geesthacht zur weiteren Bearbeitung übermittelt. Der Lymphozytotoxizitätstest zeigte folgendes Ergebnis:

Die Probe war positiv für: A2, A24; B44, B37; cw2, cw5;

Der relativ sehr hohe Mean Channel der Lymphozyten-Fluoreszenz bei der Messung mit dem Anti-HLA-B27-FD 705 wurde nach Rücksprache mit der Fa. One Lambda auf eine geringe Kreuzreaktivität mit dem HLA-B44 zurückgeführt.

- Von den 88 grenzwertigen Proben waren im Ergänzungstest mit dem Anti-HLA-

B27-FD 705 86 Proben negativ, eine Probe zeigte ein positives Ergebnis. Offensichtlich hat es sich dabei um den Subtyp 3 des HLA-B27 gehandelt, der mit dem Anti-HLA-B27-ABC-m3 deutlich schwächer reagiert, als mit dem Anti-HLA-B27-FD 705.

Ein einziges grenzwertiges Screeningtest-Ergebnis wurde auch im Bestätigungstest nicht eindeutig klassifiziert (Tabelle 5).

Das Ergebnis des Lymphozytotoxizitätstestes dieser Probe konnte nicht in Erfahrung ge-

Tabelle 5		
	Anti-HLA-B27-ABC-m3	Anti-HLA-B27-FD 705
Mean Channel d. Lymphozyten	9,57	7,04

bracht werden. Aus unserer Sicht handelte es sich höchstwahrscheinlich um eine HLA-B27 negative Probe, bei der der relativ hohe Mean Channel der Lymphozyten-Fluoreszenz bei der Messung mit dem Anti-HLA-B27-FD 705 Antikörper auf einer Kreuzreaktivität mit einer anderen HLA-Entität beruht.

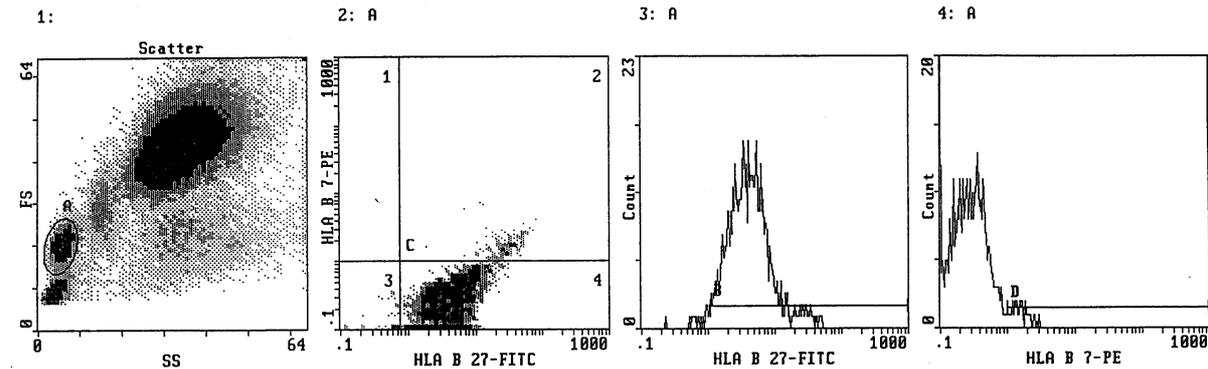
Die Antikörper-Kombination (Anti HLA-B7/ Anti-HLA-B27 der Fa. Immunotech) stand uns weder für die erste noch für die zweite unplausible Probe zu Verfügung.

- Von den 260 positiven Proben konnten im Ergänzungstest 233 ebenfalls positiv gemessen werden, bei den 27 verbleibenden Proben konnte das positive Ergebnis aus dem Screeningtest nicht bestätigt werden. Offensichtlich lagen hier Kreuzreaktionen des Anti-HLA-B27-ABC-m3 Antikörpers mit dem HLA-B7 oder anderen HLA-Entitäten vor.

Abbildung 4

34 seconds, 36582 events

Stop Count: 2500 events, histogram 2



Stats: Not Normalized, Listgating: Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y
1	A AUTOLYMP	6.8	2500	5.6	19.5
2	C1 C	0.0	0	****	****
	C2 C	4.7	118	25.9	1.58
	C3 C	1.4	34	0.470	0.131
	C4 C	93.9	2348	3.71	0.201
Hist	Region ID	%	Mn X	Count	
3	B B	97.2	4.46	2429	
4	D D	4.6	1.71	115	

Zusammenfassend müssen wir feststellen, dass bei den 1442 Proben, die in den letzten zwei Jahren zur HLA-B27 Bestimmung angefallen sind, nur in zwei Fällen, das sind 0,14%, ein Lymphozytotoxizitätstest zur endgültigen Klärung erforderlich war.

Die durchflusszytometrische Bestimmung des HLA-B27 Status mit einer Kombination von monoklonalen Antikörpern, insbesondere bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers ohne Kreuzreaktivität mit dem HLA-B7, ist eine sehr effektive Methode zur kostengünstigen und zeitsparenden Bewältigung großer Probenzahlen. Wir konnten so die zur Klärung der grenzwertigen Ergebnisse erforderlichen Lymphozytotoxizitätstests gegen Null reduzieren.

Literatur

- de Waal L, van der Horst A, Krom F: Comparison of three anti-HLA B27 monoclonal antibodies by flow cytometric analysis. In: Visuals of the clinical histocompatibility workshop, Palm Springs Invitational, Terasaki PI (ed). Palm Springs, California, 1993, pp. 39-40.
- Orr K, Thomson GTD, Alfa M: Utilization of commercial antisera and flow cytometry in HLA-B27 typing. Cytometry 18: 17-20, 1994.

3. Ward a, Nikaein a: Comparison of monoclonal antibodies for flow cytometric analysis of HLA-B27 antigen. Cytometry (CommunClin Cytometry) 22: 65-69, 1995.

4. Hulstaert F, Albrecht J, Hannel I, Lancaster P, Buchner L, Kunz J et al: An optimized method for routine HLA-B27 screening using flow cytometry. Cytometry 18: 21-29, 1994.

5. Ax W: Das Hla System: B27 Typisierung mit Hilfe der Flow-Zytometrie. Klin. Lab. 9:267,1991.

6. Pei R, Arjomand-Shamsai M, Deng C.-T, Cesbron A, Bignon J.D, Lee J.-H: A monospecific HLA-B27 fluoresceinisothiocyanate conjugated monoclonal antibody for rapid, simple and accurate HLA-B27 typing. Tissue Antigens 1993: 41: 200-203.

7. Böttcher M, Abel G, Medizinisches Labor Dr. Kramer, Geesthacht: Optimierung der HLA-B27-Bestimmung mit Durchflusszytometrie.

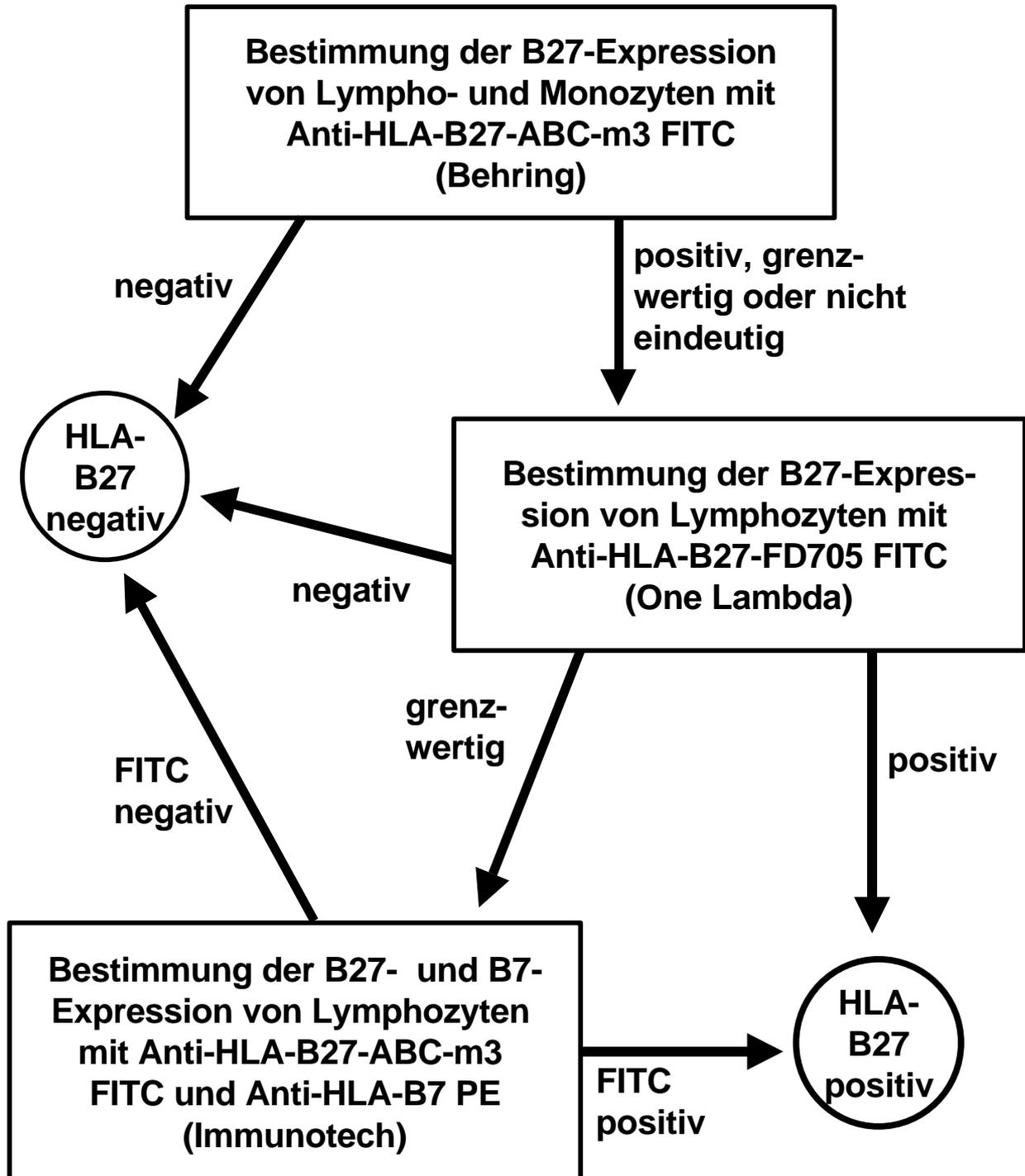
8. Neumüller J, Schwartz D.W.M, Dauber E, Mayr W.R: Evaluation of four monoclonal antibodies against HLA-B27 for their reliability in HLA-B27 typing with flow cytometry. Comparison with the classic microlymphocytotoxic test. Communications in Clinical Cytometry.

9. Thomas L: Labor und Diagnose, 4. Auflage

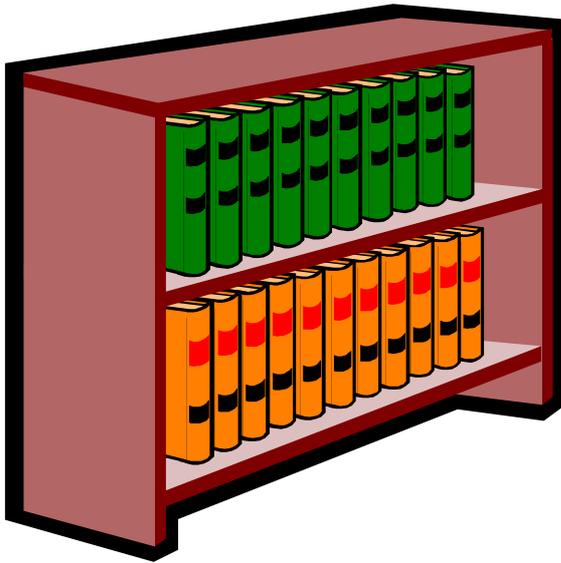
W

HLA-B27 Bestimmung Flussdiagramm

nach K.Köhler, ZL Wr.Neustadt



Nähere Erläuterungen siehe Text



HLA-B27 am FLOW. Einige Daten aus der Literatur.

W.Hübl

Reynolds et al., Cytometry 18: 109-115 (1994)

Testeten HLA-ABC-m3 Antikörper gegen Referenzmethode. Fanden Sensitivität von 1.00 und Spezifität von 0.85.

Hulstaert et al., Cytometry 18: 21-29 (1994)

Testeten GS145.2 Antikörper gegen Referenzmethode. Fanden Sensitivität von 1.00 und Spezifität von 0.974.

Lingenfelter et al., Cytometry 22: 146-149 (1995)

Testeten GS145.2 Antikörper gegen Referenzmethode. Fanden Sensitivität von 0.976 und Spezifität von 0.959.

Neumüller et al., Cytometry 26:209-215 (1996)

Verglichen wurden Antikörper von BD (GS145.2), Behring (HLA-ABC-m3, BE), One Lambda (FD705, OL) und Immunotech (HLA-ABC-m3, IT). Ausgewertet wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der FITC konjugierten anti-HLA-B27 Antikörper auf den CD3-PE-markierten T-Lymphozyten.

Ergebnisse: Die Autoren erwähnten, daß es nicht leicht war, die optimalen Grenzen für die Entscheidungsschwelle zu bestimmen. Die

Autoren überprüften die Sättigung der AK und fanden die Antikörper bei Verwendung der empfohlenen Menge passend konzentriert.

Verglichen wurden auch Ergebnisse nach 45-minütiger Inkubation mit denen nach 15-minütiger: Keine Unterschiede, kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität nach 45 Minuten.

Richtigkeit (Referenz = Lymphozytentoxizitätstest): Die Autoren fanden Kreuzreaktionen mit B7 (=falsch Positive) bei allen Antikörpern außer dem von OL. Letzterer Antikörper zeigte aber auch einen falsch Negativen (von 22 im Abstract, von 35 im Text). Der IT Antikörper zeigte auch einen falsch Positiven (von 57) der B27negativB7negativ war.

Die Verwendung mehr als eines Antikörpers, einschließlich eines nicht B7 kreuzreagierenden, wird empfohlen.

Chen et al., Cytometry 26:286-292 (1996)

Ausgewertet wurde Fluoreszenzintensität. Antikörper von One Lambda (FD705), FITC-konjugiert. CD3-PE

Ergebnisse: Autoren empfehlen CD3 Gegenfärbung und beschrieben große Unterschiede in der Intensität der HLA-B27 Markierung bei HLA-B27-positiven Individuen. Ob die nur schwach angefärbten HLA-B27-positiven den Subtyp B27.2 hatten, wird nicht beschrieben. Auch diese Autoren fanden keine Kreuzreaktivität des OL Antikörpers mit B7.

Hoffmann et al., Clinical Chemistry 43:1975-1981 (1997)

Verglichen wurden Antikörper von BD (GS145.2), Behring (HLA-ABC-m3, BE) und One Lambda (FD705, OL).

Auch Anti-HLA-B7 PE und Anti-HLA-Bw4 PE (beide von Behring) wurden eingesetzt. Gemessen wurde die Fluoreszenz der T-Lymphozyten (mit CD3-PerCP markiert). Ausgewertet wurde einerseits die mittlere Fluoreszenzintensität und andererseits der Anteil positiver Zellen.

Ergebnisse:

Auswertung: Anteil der positiven Zellen ergab die besten Ergebnisse und sei auch weniger abhängig von Zytometereinstellungen, Kalibration und Konjugatstabilität als die

mittlere Fluoreszenzintensität. (*Anmerkung: das ist natürlich nicht in allen Fällen richtig. Wenn die Population nicht deutlich von den Negativen getrennt ist, kann das Ergebnis von einer Reihe von methodischen Faktoren beeinflusst werden. Der Wert der HLA-DR-positiven T-Zellen z.B. gehört zu den kritischen Parametern im "Immunstatus"-Rundversuch*).

Anti-HLA-Bw4: Verwendung dieses Antikörpers konnte bei der Unterscheidung B7/B27 nicht helfen.

Spezifität: keiner der 3 Antikörper ist absolut spezifisch. Auch das Blockieren der B7-Kreuzreaktion führte auch zu keiner absoluten Spezifität. HLA-ABC-m3 reagiert neben B7 auch mit B 37 und B44. GS145.2 reagiert neben B7 auch mit B37 und B39. FD705 reagiert mit B44 und B57.

Sensitivität: HLA-ABC-m3 reagiert nicht mit der B2703 Variante, die aber bei Kaukasiern nicht vorkommt. FD705 reagiert mit allen B27 Varianten gleich und hat daher keine falsch negativen Ergebnisse (???: *Erstens hat der FD705 in der Result-Sektion keineswegs 100% Sensitivität und zweitens reagiert der FD705 lt. Literatur mit dem Subtyp B27.2 nur schwach.*).

Empfehlung: 2 Antikörper verwenden bei Diskrepanz: DNA-Testung.

Bonnaud et al., Clin. Rheumatol. 18:23-27 (1999)

Flowzytometrie (HLA-ABC-m3, GS145.2 und FD705) mit PCR verglichen. 304 Proben. 2 falsch Negative mit FD705. Verwendung zweier verschiedener Antikörper hat Richtigkeit nicht erhöht.

Schlußfolgerung: DNA Analyse in den Fällen, bei denen Flow keine eindeutigen Ergebnisse liefert.

W