

LS-PCR toegepast voor detectie van HLA-B27: Low Stringency but High Performance

J. DANNEBERG, J. GERRITS en A. MARTENS

Seronegatieve spondylarthropathieën vertonen een hoge mate van associatie met het histocompatibiliteits antigeen HLA-B27. Met name spondylitis ankylopoëtica (ziekte van Bechterew) komt eigenlijk alleen voor bij patiënten positief voor dit HLA klasse I glycoproteïne (het relatieve risico is ca. 87). Verschillende bepalingmethoden voor HLA-B27 zijn in de loop der jaren toegepast; microcytotoxiciteitstest, reacties met cytotoxische T-cellen, isoelectric focusing, flowcytometrie. Een nadeel van bovengenoemde conventionele technieken is de kruisreactiviteit van de antisera met andere HLA klasse I antigenen, vanwege hun hoge mate van homologie. Sinds enkele jaren zijn bepalingstechnieken ontwikkeld op DNA niveau met als basis de Polymerase Chain Reaction (PCR). De meeste PCR-technieken geven voor HLA-B27 een zgn. 'all or none response'; de reactie geeft wel of geen product. Dit houdt in dat een interne PCR-controle is vereist, teneinde vals negatieve resultaten uit te sluiten. Een dergelijke controle wordt bijna altijd toegepast middels duplex-PCR; deze methode is echter niet volledig betrouwbaar. Als alternatieve methode voor interne controle hebben wij gekozen voor Low Stringency-PCR (LS-PCR). De additioneel geamplificeerde niet-specifieke producten, de zogenaamde Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD's), worden gebruikt als positieve controle op het verloop van de PCR.

Bij 550 patiëntenmonsters werd zowel een LS-PCR als een flowcytometrisch onderzoek verricht naar HLA-B27. Drie samples gaven een discrepantie te zien in de resultaten van de LS-PCR (negatief) in vergelijking met die van de flowcytometrie (positief); het Centraal Laboratorium voor Bloedtransfusiedienst (CLB) te Amsterdam heeft deze resultaten bevestigd als negatief. Uit dit onderzoek blijkt dat LS-PCR voor de detectie van HLA-B27 een betrouwbare, snelle, relatief eenvoudige en goedkope methode is vergeleken met andere PCR-gebaseerde technieken (duplex-PCR). LS-PCR kan wellicht ook een alternatief zijn voor interne controle bij andere PCR-toepassingen met een 'all or none response'.

Trefwoorden: HLA-B27; PCR; Low-Stringency-PCR; interne PCR-controle; RAPD

Twenteborg Ziekenhuis Almelo

Correspondentie: Drs. A. Martens, Twenteborg Ziekenhuis, Postbus 7600, 7600 SZ Almelo.
E-mail: A.Martens@Klin-Lab.Twenteborg.NL
Ingekomen: 01.07.98

In de 70-er jaren bleek dat veel aandoeningen een associatie vertoonden met bepaalde varianten binnen het Major Histocompatibility Complex (MHC). Een hoge mate van associatie werd bijvoorbeeld gevonden bij een groep ziektebeelden welke bekend staan als de seronegatieve (= reumafactor negatieve) spondylarthropathieën in combinatie met het Human Leucocyte Antigen B27 (HLA-B27) (1-3). Deze aandoeningen vormen een subgroep van de seronegatieve arthritiden.

De hoogste mate van associatie (> 90%) werd gevonden bij spondylitis ankylopoëtica (ziekte van Bechterew), met een relatief risico (r.r.) van ca. 87.

Andere HLA-B27 geassocieerde ziektebeelden zijn bijvoorbeeld: reactieve arthritis (o.a. syndroom van Reiter); 75%, r.r. = ca. 36 en uveitis anterior acuta (UAA); 50%, r.r. = ca. 10 (7).

Het HLA-systeem is een onderdeel van het MHC. Dit MHC is van wezenlijk belang bij de immunologische herkenning en een eventueel daaropvolgende afweerreactie. HLA-B27 behoort tot de MHC klasse I, een groep van glycoproteïnen, welke tot expressie komen op de celmembraan van de meeste kernhoudende cellen en trombocyten (4). Er zijn tot op heden 11 subtypen van het HLA-B27 molecuul bekend: HLA-B*2701-*2711 (17,19). Het verschil tussen deze subtypen is te vinden in de zogenaamde 'peptide binding groove area' (19). Met name type B*2702 en B*2705 komen relatief veel voor in de Kaukasische populatie (8). Type B*2706 blijkt weinig associatie met M. Bechterew te vertonen. (17, 18)

De genetische code van het HLA-systeem ligt bij de mens verankerd op de korte arm van chromosoom nr. 6 (5). De gen organisatie is zeer complex en de meest polymorfe thans bekend; HLA-B27 is één van de (meer dan 22) allelen, vertegenwoordigd door het B-locus.

Verschillende bepalingmethoden voor HLA-B27 zijn in de loop der jaren toegepast; microcytotoxiciteitstest (6), reacties met cytotoxische T-cellen, isoelectric focusing, flowcytometrie (7). Een nadeel van bovengenoemde conventionele technieken is de kruisreactiviteit van de antisera met andere HLA-klasse I antigenen, vanwege hun soms hoge mate van homologie (5).

Nadat meer inzicht werd verkregen in de genetische structuur (1992), werden moleculair biologisch gebaseerde methoden geïntroduceerd. Allerlei technieken werden ontwikkeld met als basis Polymerase Chain Reaction (PCR), bijvoorbeeld: PCR, gevolgd door hybridisatie met een HLA-B27 sequentiespecifieke oligonucleotide probe (PCR-SSO) (8-10), PCR met een HLA-B27 sequentie(groep) specifieke primer (PCR-SSP) (11).

Bovengenoemde PCR-technieken geven voor HLA-B27 een zgn. 'all or none response'; de reactie geeft wel of geen product. Dit houdt in dat een interne PCR-controle is vereist, teneinde vals negatieve resultaten uit te sluiten. Controle op de PCR-condities is mogelijk door bijvoorbeeld gelijktijdige amplificatie van een zogenaamd huishoud- of reporter gen zoals β -actine (8), β -globine (10) of HGH (11).

Een inherent probleem bij deze zogeheten duplex-PCR is, dat elk primerpaar zijn eigen optimale PCR-condities heeft; deze kunnen behoorlijk verschillen. Hierdoor kan het voorkomen dat wel amplificatie plaatsvindt van de controle-locus, maar niet van de specifieke target of andersom. Ook kunnen problemen ontstaan indien bijvoorbeeld de HLA-B27 primers niet aan de PCR zijn toegevoegd. Deze vorm van controle is dus niet optimaal.

Neto et al. verrichtten in 1993 een onderzoek naar de aanwezigheid van het Y-chromosoom. In hun publicatie in *Nucleic Acids Research* (12) beschrijven ze een zogeheten Low Stringency-PCR (LS-PCR) methode, als beter alternatief voor de conventionele duplex-PCR. Het principe is eenvoudig: amplificatie vindt plaats met slechts twee specifieke primers, maar onder zeer laagstringente condities (zeer lage annealingtemperatuur). Vanwege deze lage stringentie vindt naast amplificatie van het specifieke HLA-product ook amplificatie plaats van additionele niet-specifieke producten, zgn. Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD's). Dit RAPD-patroon is vrijwel identiek in alle samples; ze dient als ideale interne PCR-controle. Doel van dit onderzoek is het bepalen van de toepasbaarheid van LS-PCR voor de detectie van HLA-B27. De resultaten van de LS-PCR werden vergeleken met die van de conventionele flowcytometrische methode.

MATERIALEN en METHODEN

Patiënten

In de periode juni 1994 tot juni 1998 werd bij alle patiënten die naar het laboratorium werden verwezen voor HLA-B27 onderzoek, naast deze bepaling op de flowcytometer het onderzoek ook middels LS-PCR uitgevoerd. Het betroffen zowel klinische als poliklinische patiënten, die werden verdacht van een seronegatieve spondyloartropathie.

Ook werden 12 monsters t.b.v. de HLA-B27 kwaliteitsronde van de Stichting Immunotypering Hematologische Oncologie in Nederland (SIHON) meegenomen in het onderzoek.

In totaal werden 550 bloedmonsters (Li-Heparine of Na-EDTA onstold) getest.

Flowcytometrie

De serologische HLA-B27 detectie werd uitgevoerd d.m.v. flowcytometrie; hierbij werd gebruik gemaakt van de 'HLA-B27 screening kit' (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). Ter uitsluiting van vals positieve resultaten door kruisreactiviteit van het anti-HLA-B27 met het HLA-B7 antigeen werd gelijktijdig van dezelfde patiënt een test uitgevoerd op de aanwezigheid van HLA-B7 (monoklonaal MAH. HLA-B7-PE, kloon BB7.1; Serotec).

De eerste 100 bloedmonsters werden geanalyseerd op een Spectrum III flowcytometer (Ortho Diagnostics, Beerse, België), gebruikmakend van het software programma Consort 30 (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). De laatste 450 monsters zijn gemeten op een FACSort Flowcytometer in het rekenprogramma Cellquest (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA). De test werd uitgevoerd volgens de instructies van de firma (een resultaat werd positief bevonden voor HLA-B27, indien de mean channel van het histogram groter was dan suffixwaarde +5) en de HLA-B7 negatief.

Isolatie van DNA

Bloedmonsters werden tot het moment van DNA-isolatie bewaard bij -20°C . Genomisch DNA werd geïsoleerd m.b.v. de 'QIAamp® Blood Kit' (Qiagen, Inc., Chatsworth, USA). Het bijgeleverde protocol voor volbloed werd in enigszins gewijzigde vorm toegepast: erythrocyten van 200 μl volbloed werden door bevriezing gelyseerd, vervolgens werd een leukocytenpellet verkregen door 5 min. centrifugeren bij 400x g, leukocyten werden geresuspendeerd in 200 μl PBS en de procedure werd vervolgd volgens Qiagen-protocol. DNA werd geëluëerd in 200 μl bij een temperatuur van 70°C . Voor berekening van concentratie en zuiverheid van het DNA-eluaat werden de absorpties gemeten bij 260-, 280-, en 320 nm (Spectrofotometer Lambda 11Bio; Perkin Elmer).

PCR-amplificatie

De primers E91s (5'-GGGTCTCACACCCTCCAG-AAT-3') en E136as (5'-CGGCGGTCCAGGAGCT-3'), zoals eerder gepubliceerd door Dominguez et al. (1992) (8), werden gebruikt om een gebied te amplificeren van codon 91 - 136 (135 bp product) op exon 3 van het HLA-B27 allel (Primers werden gesynthetiseerd door Pharmacia Biotech BV, Woerden, Nederland). Deze exon-3-PCR is specifiek voor de meeste HLA-B27 subtypen, behalve B*2707 (5, 8, 10, 17, 18). PCR werd uitgevoerd in een reactievolumen van 50 μl , afgedekt met 2 druppels olie om verdamping te voorkomen. De reactiemix bestond uit: 100 -250 ng genomisch DNA, 1 μM voor elke primer (E91s en E136as), PCR buffer (10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM KCL, 0.01% w/v gelatine, 0.1% w/v Triton X-100, 1.5 mM MgCl_2), 200 μM voor elke dNTP (HT Biotechnologie LTD, Cambridge, England) en Taq-polymerase (SuperTaq®; HT Biotechnologie LTD)*. Deze mixen werden onderworpen aan een Low Stringency-PCR temperatuurprofiel: een initiële denaturatiestap bij 94°C gedurende 3 min., 5 cycli met denaturatie bij 94°C gedurende 1 min., annealing bij 30°C gedurende 1 min. en extensie bij 72°C gedurende 1 min., gevolgd door 35 cycli met denaturatie bij 94°C gedurende 15 sec., annealing bij 40°C gedurende 1 min. en extensie bij 72°C gedurende 30 sec. Het programma werd afgerond met een extensiestap bij 70°C gedurende 5 min.

*: SuperTaq wordt in Nederland geleverd door Sphaero Q, Leiden. I.v.m. licensierechten (Roche) is per 1-1-'96 de productie aangepast; activiteit/Unit werd lager. Producties van vóór 1-1-'96 werkten met 0.5 Units per PCR-reactie, na 1-1-'96 1.5 Units per PCR.

Als referentie voor het vaststellen van de locatie van het specifieke B-27 product (135 bp) in het LS-PCR-patroon, werd parallel een specifieke HLA-B27 PCR uitgevoerd (8); een duplo van dezelfde reactiemix werd onder stringente condities geamplificeerd: initiële denaturatiestap bij 94°C gedurende 2 min., 30 cycli met denaturatie bij 94°C gedurende 10 sec., annealing bij 60°C gedurende 20 sec. en extensie bij 72°C gedurende 20 sec. Tenslotte 5 min. extensie bij 72°C.

De PCR-reacties werden uitgevoerd in een Mastercycler 5330 (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Germany).

Per PCR-serie werd een HLA-B27-positief en een -negatief DNA-sample meegenomen, bovendien een waterblanco ter uitsluiting van contaminatie.

Elektroforese

Voor analyse werd 15 µl van de verkregen LS-producten respectievelijk 10 µl specifiek product elk gemengd met 2 µl Gel Loading Buffer (25% w/v Ficoll-400 / 0,05% Broomfenolblauw). Deze mengsels werden submarine geëlektroforeerd in een 3% agarosegel (Agarose-NA; Pharmacia Biotech BV, Woerden, Nederland) waaraan 0.5 µg/ml Ethidiumbromide was toegevoegd. Elektroforese vond plaats gedurende 2 uur bij 300 V (5V/cm) in TAE-buffer (30 mM Tris-buffer / 2 mM EDTA-2Na, pH 8,0). Op iedere gel werd een geschikte commerciële molecuulgewichtmarker meegenomen.

De PCR-producten werden zichtbaar gemaakt boven een UV-transilluminator bij 302 nm (UVP Inc.) en gefotografeerd (Polaroid, Landcamera, type Cu-5). Aflezen/interpretatie werd 'blind' uitgevoerd: zonder voorkennis van het flowcytometrische resultaat.

Hybridisatie en detectie

Bij een tiental samples (zowel positief als negatief) werd Southernblot hybridisatie uitgevoerd als confirmatie voor de specificiteit van de LS-PCR. Het bandenpatroon werd gehybridiseerd met de allel-specifieke probe CL-7 (5'-TACCACCAGGACGCCTAC-3') (8, 17); deze was 5'-gelabeld met digoxigenine (Isogen Bioscience BV, Amsterdam). Deze oligonucleotide herkent een gebied geflankeerd door de codons 113-118 van exon 3 en is specifiek voor subtypen HLA-B*2701 *2702, *2703, *2704, *2705 en *2708 (8, 17).

Na elektroforese werd het DNA in de gel gedenureerd (0,4 N NaOH / 0,6 M NaCl) gevolgd door 90 min. vacuümblootting bij 50 mbar (Vacugene XL; Pharmacia LKB, Woerden) op een nylon membraan (Nylon Membranes, positively charged; Boehringer Mannheim, Almere, Nederland); daarna werd het DNA bij 254 nm ge'cross-linked' aan de membraan (UV-Stratalinker 2400; Stratagene).

Pre-hybridisatie vond plaats gedurende 1 uur bij 50°C (Hybridization oven OV11; Biometra, Göttingen, Germany) in hybridisatie oplossing (1 mM EDTA / 7% w/v SDS / 0,25 mM diNatriumfosfaat, pH 7,2). Hybridisatie duurde 2 uur bij 50°C met 0,5 pmol/ml probe CL-7 in hybridisatiebuffer (1 ml /cm² membraan). Hierna werd 2 x 5 min. bij kamertemperatuur (kT) gewassen in 2xSSC / 1% w/v SDS (1xSSC =

0,15 M NaCl / 0,015 M Na-citraat, pH 7,0). Twee stringente wasstappen van 15 min. bij 54°C werden uitgevoerd in 1xSSC / 1% w/v SDS. Tenslotte 2 x 5 min. wassen in 1xSSC.

Detectie van het digoxigeninelabel vond plaats door middel van chemiluminescentie. De membraan werd gespoeld in wasbuffer (0,3% Tween-20 in Buffer 1; Buffer 1= 100 mM Maleïnezuur / 150 mM NaCl, pH 7,5), daarna minimaal 30 min. geblokt bij kT in Blok-oplossing (2,5% w/v Blocking-reagent (Boehringer Mannheim) in Buffer-1). Incubatie met conjugaat (Fab-fragments anti-digoxigenine-AP (Boehringer Mannheim), 1:10000 in Blokoplossing; 1 ml /cm² membraan) was 30 min. bij kT.

Na 3 x 30 min. wassen in wasbuffer werd 5 min. geëquilibrerd in Buffer-3 (100 mM Tris-HCl / 100 mM NaCl / 50 mM MgCl₂, pH 9,5). De (drooggedepte) membraan werd verzadigd met luminescentie-substraat (of Lumigen-PPD (Boehringer Mannheim), 1:100 in Buffer-3 of Chemiluminescent Substrate Immulite (DPC, LA, USA), 1:10 in Buffer-3) vervolgens ingeseald (Hybridization-bags; Tropix Inc.) en zo 30 min. bij 37°C geïncubeerd. Tenslotte vond belichting en ontwikkeling plaats op een X-ray-film (Film + cassette: Agfa Ortho Fast, Curix Screens, 18x24 Ontwikkelmachine: Agfa Curix HT-530 Curix capacity plus). Belichtingstijd varieerde, afhankelijk van het signaal, van 30 min. tot enkele uren.

RESULTATEN

In bovenbeschreven onderzoek zijn 550 monsters getest voor HLA-B27; LS-PCR werd vergeleken met flowcytometrisch onderzoek. Van deze groep zijn 50 monsters tevens getest volgens een specifiek, stringent PCR-programma zoals beschreven door Dominguez et al (8), 10 monsters zijn ook gehybridiseerd met de HLA-B27-specifieke oligonucleotideprobe CL-7 (8, 17).

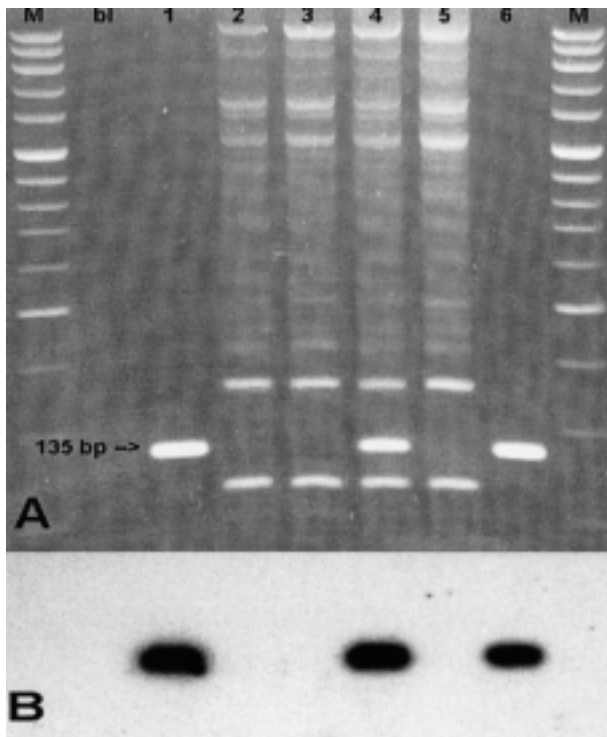
Van de 550 door ons onderzochte monsters d.m.v. LS-PCR waren er 442 negatief en 108 positief voor HLA-B27.

Na isolatie van DNA m.b.v. de 'QIAamp®Blood Kit' waren de verkregen DNA-concentraties 20 - 50 ng/µl, met zuiverheid >1,8 (A₂₆₀ / A₂₈₀, met correctie voor A₃₂₀).

Bij alle positieve monsters welke met LS-PCR waren ingezet troffen we discreet de specifieke HLA-band aan, met een lengte van 135 bp, welke zeer goed was te onderscheiden tussen de zgn. RAPD's (figuur 1A). In nagenoeg alle gevallen was het de meest intense band in het patroon. De positieve monsters die aan het stringente temperatuurprogramma waren onderworpen, toonden alleen de verwachte 135 bp band.

Bij de HLA-B27 negatieve monsters waren na LS-PCR alleen de RAPD's te zien waarbij het bandenpatroon globaal overeenkwam met dat van de positieve monsters, echter de 135 bp band ontbrak (figuur 1A). Na stringente PCR was geheel geen band aantoonbaar. Hybridisatie met CL-7 leverde zoals verwacht alleen een signaal op bij die monsters waarbij de 135 bp band aanwezig was (figuur 1B).

De correlatie van LS-PCR met stringente, specifieke PCR was 100% (N=50).



Figuur 1. LS-PCR toegepast voor detectie van HLA-B27: Low Stringency but High Performance. A: LS-PCR patroon van HLA-B27. Van de DNA-samples 1-6 werd een PCR uitgevoerd volgens het hiervoor beschreven Low Stringentie temperatuurprogramma met de primers E91s/E136as (8). Bij de negatieve samples 2, 3 en 5 ontbreekt de 135 bp band, wel is het controlepatroon aanwezig. De positieve samples 1, 4 en 6 vertonen wel de 135 bp band. Bij sample 1 en 6 ontbreekt het controlepatroon (zie ook discussie). B: Southernblot hybridisatie van HLA-B27. Het patroon uit figuur A werd gehybridiseerd met oligonucleotide-probe CL-7 (8, 17). Alléén de HLA-B27-specifieke band van 135 bp gaf een hybridisatiesignaal, waarmee de specificiteit van de LS-PCR is aangegevoerd; bij de negatieven was geheel geen band te zien. M: marker; 1: positieve controle; 2: negatieve controle; bl: waterblanco

De correlatie LS-PCR met hybridisatie was 100% (N=10).

Drie patiënten welke negatief waren met LS-PCR, gaven een positief resultaat met flowcytometrie; mean channel (MC) 150-200 (cut-off van de controlebeads: MC = ca. 140). Het onderzoek bij deze patiënten is herhaald in een nieuw afgenomen bloedmonster; dit leverde dezelfde resultaten op. Van deze tweede bloedmonsters is tevens een HLA-B27 bepaling uitgevoerd door het Centraal Laboratorium voor Bloedtransfusiedienst (CLB) te Amsterdam; de resultaten waren in alle drie gevallen HLA-B27 negatief, wat overeenkomt met LS-PCR.

DISCUSSIE

M. Bechterew komt vrijwel niet voor bij HLA-B27 negatieve individuen. De bepaling is daarom relevant bij de differentiaaldiagnose van patiënten met lage rugpijn (11). Echter een gering percentage HLA-B27 positieve individuen krijgt M. Bechterew, hetgeen betekent dat naast HLA-B27 ook additionele factoren een rol spelen. De HLA-B27 bepaling is daarom met

name zinvol om de kans op het hebben van de eerder genoemde geassocieerde ziektebeelden onwaarschijnlijk te maken. De frequentie van HLA-B27 in de Kaukasische populatie is negen procent en die van M. Bechterew twee promille (7).

Eerder beschreven PCR-technieken (PCR-SSO, PCR-SSP) (8-11) voor detectie/typering van HLA waarbij of een hybridisatiestap noodzakelijk is en/of een controle-allel simultaan wordt geamplificeerd (duplex-PCR) als interne PCR-controle, zijn arbeidsintensief of minder betrouwbaar. Uit dit onderzoek blijkt dat LS-PCR (12) een snelle en betrouwbare methode is voor detectie van HLA-B27.

De LS-PCR resultaten van de 550 geteste samples zijn vergeleken met flowcytometrie; drie keer werd hierbij een verschil aangetoond (LS-PCR neg / flowc. pos) waarbij de resultaten van LS-PCR overeenkwamen met die van het CLB. Bij flowcytometrie wordt de (bekende) kruisreactiviteit met het HLA-B7 antigeen uitgesloten, mogelijk zijn er nog andere kruisreagerende epitopen waardoor de hoge mean channel waarden worden veroorzaakt.

De specificiteit van de LS-PCR werd, naast controle middels flowcytometrie, ook geverifieerd door hybridisatie met de HLA-B27 allel-specifieke probe CL-7 (8, 17).

Het RAPD-patroon bij LS-PCR was bij alle HLA-B27 negatieve samples duidelijk aanwezig. Ter hoogte van de 135 bp band was nooit een niet-specifieke band aantoonbaar. In geval van positieve samples was het RAPD-patroon soms zwakker of afwezig; mogelijk speelt voorkeur van de primers voor de specifieke target hierbij een rol. Echter de specifieke 135 bp band was prominent aanwezig (figuur 1A). Daar controle juist bij HLA-B27 negatieve samples van belang is (uitsluiten van vals negatieven) kan het RAPD-patroon bij LS-PCR beschouwd worden als een zeer geschikte interne PCR-controle. Tevens wordt bij een LS-PCR slechts met één set primers gewerkt, terwijl bij hybridisatie/duplex-PCR meer oligonucleotides noodzakelijk zijn, wat naast hogere kosten ook meer kans geeft op storingen en ongewenste interferenties. Het LS-patroon bleek globaal bij alle samples identiek en zeer gevoelig voor storende invloeden; ook op deze wijze vormt het patroon een goede kwaliteitscontrole voor de gevolgde procedure. LS-PCR kan mogelijk ook voor andere PCR-testen met een 'all or none response' een aantrekkelijk alternatief zijn.

Bij de beschreven LS-PCR werd gebruik gemaakt van primers zoals beschreven door Dominguez et al (8). Primer E136as is specifiek voor meeste B-allelen, E91s vanwege 3'-einstandige sequentie AT, herkent alleen B27-allelen. Deze exon-3-PCR is specifiek voor de meeste HLA-B27 subtypen (5, 8, 10, 17, 18), behalve B*2707 waarvan het voorkomen in de Kaukasische populatie echter zeer zeldzaam is (5, 10). De associatie van B*2706 met M. Bechterew is minimaal (17, 18). Meest voorkomende subtypen in Kaukasische populatie zijn B*2705 en B*2702 (96% en 4% respectievelijk) (8). Olerup et al. hebben recent een exon-2-PCR beschreven waarbij ook subtype B*2707 wordt herkend (11).

- T.o.v. flowcytometrie biedt PCR een aantal voordelen:
- geen hinder van kruisreactiviteit B27 → B7
 - bloedmonsters zijn meerdere dagen houdbaar bij kT, daarna vrijwel onbeperkt bij -20°C alvorens DNA-isolatie plaatsheeft terwijl flowcytometrie bij voorkeur dezelfde dag uitgevoerd moet worden
 - relatief eenvoudig uitvoerbaar
 - lagere investeringskosten apparatuur.

Reagenskosten voor flowcytometrie en (duplex) PCR zijn ongeveer gelijk (10), LS-PCR is voordeliger.

PCR-technieken vereisen, vanwege het potentiële contaminatie gevaar, strikte voorzorgsmaatregelen waaronder fysiek gescheiden laboratoriumruimtes voor reagensbereiding, monsteropwerking (DNA-isolatie) en toevoeging, analyse van PCR-producten (13-15).

In ons laboratorium wordt zowel flowcytometrie als LS-PCR uitgevoerd voor detectie van HLA-B27. Deze werkwijze komt goed overeen met een van de standaardregels voor HLA-typering die, zoals aanbevolen door de American Association for Histocompatibility and Immunogenetics (AS-HI), luidt dat gebruik gemaakt dient te worden van tenminste twee specifieke reagentia (monoclonalen) (16).

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat LS-PCR voor de detectie van HLA-B27 een snelle, relatief eenvoudige en goedkope methode is vergeleken met andere, eerder genoemde, PCR-gebaseerde technieken (duplex-PCR) en met flowcytometrie. LS-PCR kan wellicht ook een alternatief zijn voor interne controle bij andere PCR-toepassingen met een 'all or none response'.

Literatuur

1. Schlosstein L, Terasaki PJ, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HLA antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288: 704-706.
2. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nicholls A, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HLA 27. *Lancet* 1973; 904-907.
3. Woodrow JC. Histocompatibility antigens and rheumatic diseases. *Sem Arth Rheum* 1977; 6: 257-276.
4. Dausser J. The major histocompatibility in man. Past, present and future concepts. *Science* 1981; 213: 1469-1474.
5. Zemmour J, Parham P. HLA class I nucleotide sequences. *Human Immunology* 1992; 34: 225-241.
6. Ray JG. NIH lymphocyte microcytotoxicity technique. In: NIAID manual of tissue typing techniques. Washington DC. DHEW Publication 1977; 77-545.
7. Hooijkaas H, Waal LP de, Hoffmann H, Marvelde JG te, Krom FEJM, Janssen WCM, Beemd R van den, Horst AR van der, Groeneveld K. Bepaling van HLA-B27 expressie. In: Immunofenotypering in de diagnostiek: Indicatiestellingen, uitvoering en interpretatie 1994; hoofdstuk 12, 163-179.
8. Domiguez O, Coto E, Martinez-Naves E, Choo SY, López-Larrea C. Molecular typing of HLA-B27 alleles. *Immunogenetics* 1992; 36: 277-282.
9. Yoshida M, Kimura A, Numano F, Sasazuki T. Polymerase-chain-reaction based analysis of polymorphism in the HLA-B gene. *Human Immunology* 1992; 34: 257-266.
10. Steffens-Nakken HM, Zwart G, Bergh FAJTM van den. Validation of allele-specific PCR for DNA typing of HLA-B27: a robust and simple alternative for classical serological techniques. *Clinical Chemistry* 1995; 41: 687-692.

11. Olerup O. HLA-B27 typing by a group-specific PCR amplification. *Tissue Antigens* 1994; 43: 253-256.
12. Neto ED, Santos FR, Pena SDJ, Simpson AJG. Sex determination by Low Stringency PCR (LS-PCR). *Nucleic Acids Research* 1993; 21: 763-764.
13. Kwok S. Procedures to minimize PCR product carry-over. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego, Academic Press, 1990; 142-145.
14. Orrego C. Organizing a laboratory for PCR work. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, San Diego: Academic Press 1990; 447-454.
15. Victor T, Jordaan A, Du Toit R, Helden PD van. Laboratory experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 531-535.
16. Waal LP de, Krom FEJM, Horst AR van der. Een snelle en eenvoudige HLA-B27 bepaling? *Tijdschr NVKC* 1993; 18: 233-235.
17. Nasution AR, Mardjuali A, Kunmartini S, Suryadhana NG, Setyohadi B, Sudarsono D, Lardy NM, Feltkamp TEW. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthritis. *The Journal of Rheumatology* 1997; 24: 1111-1114.
18. Lopez-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169-176.
19. Lopez de Castro JA. HLA-B27 and HLA-B73 polymorphism and its role on antigenicity, peptide presentation and disease susceptibility. *Clin Rheumatol* 1996; (suppl 1) 15: 67-71.

Summary

LS-PCR adapted to the detection of HLA-B27: low stringency but high performance. Danneberg JD, Gerrits JG and Martens AM. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 249-253.

Seronegative spondyloarthropathies are found to be strongly associated with the histocompatibility antigen HLA-B27. Especially ankylosing spondylitis (M. Bechterew) is mainly to be found in patients who are positive for this HLA class I glycoprotein. (the relative risk is about 87). In the past years, several detection methods for HLA-B27 have been used; microlymphocytotoxicity test, reactions with cytotoxic T-cells, isoelectric focusing, flowcytometry. A major limitation of the above mentioned techniques is cross-reaction of the antibodies with different HLA class I antigens, due to their high degree of homology. Recently detection techniques at the DNA-level were developed, which are based on the polymerase chain reaction (PCR). Most of these PCR-techniques will give an all or none response for HLA-B27; the reaction does or does not produce a PCR-product. This implies that internal PCR-control is required to exclude false negative results. This control is mostly performed by duplex-PCR, however this method is not perfect. As an alternative method for internal control we have chosen for Low Stringency-PCR (LS-PCR). The additional amplified non-specific products, the so called Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD's), serve as positive control for PCR efficiency. LS-PCR and flowcytometric detection of HLA-B27 was performed for a group of 550 patient samples. Three of the samples showed a discrepancy between the results obtained with LS-PCR (negative) and with flowcytometry (positive); the Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service (CLB; Amsterdam, the Netherlands) has confirmed these results to be negative.

According to this report, LS-PCR appears to be a reliable, fast, relative simple and inexpensive method compared to other PCR-based techniques (duplex-PCR). Possibly LS-PCR can serve as a useful alternative for internal control in other PCR-applications which produce an all or none response.

Key-words: HLA-B27; PCR; Low-Stringency-PCR; internal PCR-control; RAPD