

• 检验技术与方法 •

2 种 HLA-B27 检测方法在强直性脊柱炎诊断中的比较

侯 伟, 许晓东[△]

(卫生部北京医院血液科, 北京 100730)

摘要:目的 通过比较 2 种中国药监局(CFDA)批准的人类白细胞抗原(HLA)-B27 体外诊断试剂盒,探讨荧光聚合酶链式反应(PCR)体外诊断试剂盒在 HLA-B27 检测中的临床应用价值。方法 收集该院 573 例临床血液样本,分别采用基于荧光 PCR 技术和流式细胞法的 2 种上市获批试剂盒进行 HLA-B27 检测,对于 2 种方法检测结果不一致的样本采用 PCR 测序方法进行确认,同时随机抽取 5% 的荧光 PCR 法检测结果为阳性的样本进行复验。结果 573 例样本,采用流式细胞法试剂盒检测出阳性 191 例,阴性 382 例;相同样本使用荧光 PCR 试剂盒检测 HLA-B27 基因阳性共 194 例,阴性 379 例。最终结果以流式细胞法作为参照,2 种试剂盒阳性符合率为 96.33% (184/191),阴性符合率为 94.76% (362/382),27 例样本不符(占总样本数的 4.71%),2 种方法的总符合率为 95.29% [(184+362)/573],Kappa 值为 0.896, ($P=0.02$);四格表资料卡方检验 $P=0.021$,2 种方法检测结果一致性较高,但检测结果存在差异。复测标本中(包括 27 例检测结果不一致标本)HLA-B27 基因测序结果与荧光 PCR 试剂盒检测判断结果一致。结论 相比临床 HLA-B27 检测的权威方法流式细胞方法,荧光 PCR 法试剂盒在保证较高结果一致性的基础上,在 HLA-B27 检测上可能具有更为准确的判断能力,且相比标本制备和操作更为简单,具有较强的临床应用价值和前景。

关键词:流式细胞; 荧光聚合酶链反应; 强直性脊柱炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)24-3398-03

Comparison of two kinds of HLA-B27 detection method in diagnosis of ankylosing spondylitis

Hou Wei, Xu Xiaodong[△]

(Department of Hematology, Beijing Hospital of Ministry of Public Health, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application value of fluorescence PCR in vitro diagnosis (IVD) reagent kits in the HLA-B27 detection by comparing 2 kinds of HLA-B27 IVD reagent kit approved by CFDA. **Methods** A total of 573 clinical blood samples were collected and detected for HLA-B27 by the approved reagent kits based on the fluorescence PCR technique and the flow cytometry. The samples with inconsistent testing results by the two kits were further confirmed by the PCR sequencing. At the same time, about 5% samples of the positive results detected by the fluorescence PCR method were extracted for conducting the re-testing. **Results** Among 573 samples, 191 samples were HLA-B27 positive and 382 cases were HLA-B27 negative by flow cytometry; the same samples had 194 cases of HLA-B27 positive and 379 cases of HLA-B27 negative by real-time PCR. With flow cytometry as reference of the final results, the positive coincidence rate of the two kinds of kit was 96.33% (184/191), the negative coincidence rate was 94.76% (362/382), 27 samples had inconsistent results from the two kinds of assay (accounting for 4.71% of the total number of samples), the total coincidence rate was 95.29% [(184+362)/573], the Kappa value was 0.896 ($P=0.02$); the chi-square test $P=0.021$, the two kinds of testing method had the high consistency, but the differences existed in the testing results. The re-testing results by PCR sequencing (including 27 samples with inconsistent results by two kinds of kit) were entirely consistent with the fluorescence PCR testing results. **Conclusion** Compared with the authority method flow cytometry for HLA-B27 testing in clinic, the fluorescence PCR kit may present more accurate judging ability for the HLA-B27 testing on the basis of ensuring the higher consistency of the testing results, is easier compared with the sample preparation and operating procedures, and has the stronger clinical application value and prospects.

Key words: flow cytometry; fluorescence polymerase chain reaction; ankylosing spondylitis

强直性脊柱炎(AS)是一种病因尚不明确的自身免疫性疾病^[1],诊断主要建立在影像学检查基础上,因缺乏实验室特异性诊断指标给早期诊断带来困难^[2]。多年来人们一直致力于寻找一种早期诊断的方法。1973 年 Brewerton 和 Schlosstein 第一次提出 AS 与人类白细胞抗原(HLA)-B27 相关^[3],此后的大量研究证明 AS 与 HLA-B27 具有很强的相关性,并将 HLA-B27 检测作为临床上诊断强直性脊柱炎的重要依据。

HLA-B27 是 HLA B 座上的一组重要等位基因,属主要

组织相容性复合体(MHC) I 类分子,其主要生理功能是递呈内源性抗原肽给 CD8⁺ T 细胞,通常被认为参与 T 细胞限制性识别^[4]。HLA-B27 与 AS 相关性的发现对于强直性脊柱炎的早期预防、诊断具有重要意义。

目前,临床上检测 HLA-B27 常用的方法有针对抗原检测的淋巴细胞毒法、流式细胞法和针对基因序列检测的普通聚合酶链反应(PCR)法等,基于的原理和检测操作步骤判断标准各不相同,检测结果相关性缺乏数据支持。在国内,基于大规模

临床试验数据获中国药监局(CFDA)批准进入国内临床诊断市场的试剂盒包括美国 Becton Dickinson 公司(BD 公司)生产的 HLA-B27 检测试剂盒(流式细胞法)和博奥生物有限公司生产的 HLA-B27 核酸扩增荧光检测试剂盒(荧光 PCR 法)。

2 种试剂盒所基于的技术原理差异较大。BD 公司生产的 HLA-B27 检测试剂盒(流式细胞法)在国内资金技术条件较强的三级甲等医院已得到较为广泛认可和使用。而 HLA-B27 核酸扩增荧光检测试剂盒(荧光 PCR 法, 还未得以在临床大规模推广使用。因此, 为探讨 HLA-B27 核酸扩增荧光检测试剂盒的临床应用价值, 本研究以流式细胞法检 B27 测试剂盒为标准, 对 573 例临床疑似强直性脊柱炎患者血样进行双试剂盒 HLA-B27 检测, 通过对检测结果的分析, 讨论基于荧光 PCR 法的体外诊断试剂盒在临床检测强直性脊柱炎中的临床应用价值及前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集卫生部北京医院门诊及住院疑似 AS 病例 573 例, 男 320 例, 女 253 例, 年龄 2~81 岁。取上述人员 EDTA 抗凝静脉血 2 mL。

1.2 仪器与试剂 流式细胞法采用美国 BD 公司生产的 FACS Calibur 流式细胞仪。其试剂购自美国 BD 公司, HLA-B27 检测试剂盒(流式细胞法)[国食药监械(进)字 2010 第 3402056 号]。

荧光 PCR 法所用 PCR 仪为美国 ABI 公司生产的 7500 型荧光定量 PCR 仪。其试剂购自博奥生物有限公司, HLA-B27 核酸扩增荧光检测试剂盒(PCR 染料法)(国食药监械(准)字 2011 第 3401512 号)。

1.3 方法

1.3.1 流式细胞法 在检测之前, 仪器已经 FACS Comp Cal-iBRITE beads 和 HLA-B27 Calibration beads 调试成功。用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝的真空管收集外周血 2 mL, 调整白细胞浓度 $0.5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^9 / L$ 。取 50 μL 全血加 HLA-B27 异硫氰酸荧光素(FITC)/CD3PE 荧光标记抗体 30 μL , 混匀, 室温避光静置 20 min, 再加入 2 mL $1 \times$ 的溶血素, 混匀, 室温避光静置 10 min, 300 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 遍。上机获取细胞 15 000 个检测。结果使用 BD 公司专用 HLA-B27 分析软件进行分析。以 CD3-PE 标记的 T 淋巴细胞设门, 检测门内细胞抗 HLA-B27 FITC 信号的平均荧光强度, 并与参考值相比较, 大于或等于此值判定为 HLAB27 阳性, 小于则为 HLA-B27 阴性。

1.3.2 荧光 PCR 法 采用 NucleoSpin Blood Quick Pure DNA 提取试剂盒(德国 MN 公司)对血液标本进行核酸提取, 按照试剂盒说明书进行操作。之后使用紫外分光光度计对所提取的核酸标本进行定量。将定量后且满足要求的核酸样本加入试剂盒提供的反应管中, 根据说明书进行扩增。使用该试剂盒包含两对引物, 同一反应管中, 可同时扩增内对照(管家基因)和 HLA-B27 基因, 该试剂盒使用荧光染料法进行荧光 PCR 检测, 通过溶解曲线对 HLA-B27 扩增产物进行分析, 计算内对照(管家基因)与 HLA-B27 溶解曲线荧光信号峰值的比值, 比值大于试剂盒说明书中提供的参考值即为阴性; 反之即为阳性(见图 1)。

1.3.3 测序法 对 HLA-B 进行扩增并测序分析。对荧光

PCR 法检测结果与流式细胞法检测结果不相符的标本进行测序确认, 同时在检测结果一致的标本中随机抽取 5%(5% 阳性样本+5% 阴性样本)进行测序验证, 确保 PCR 检测结果的可靠性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行 χ^2 检验以及 Kappa 值计算分析。根据 P 值进行判断, 在 0.05 显著性水准, $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义, 反之则差异无统计学意义。一致性检验采用 Kappa 值评价(Kappa 值 > 0.75 认为有很强的一致性)。

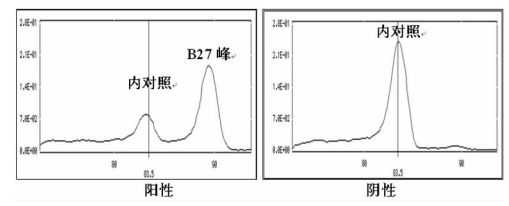


图 1 HLA-B27 核酸扩增荧光检测试剂盒(PCR 染料法)检测结果示意图

2 结果

2.1 流式细胞法和荧光 PCR 法检测结果的比较 北京医院 573 例临床标本, 流式细胞法检测阳性 191 例, 阴性 382 例, 相同标本使用荧光 PCR 技术检测 HLA-B27 基因阳性共 184 例, 阴性 369 例, 其中 27 例标本不符(占总样本数的 4.71%)。以流式细胞法试剂盒检测结果作为参照, 2 种试剂盒阳性符合率为 96.33%(184/191), 阴性符合率为 94.76%(362/382), 两法的总符合率为 95.29%[(184+362)/573], Kappa 值为 0.896, ($P=0.02$); 四格表资料卡方检验 $P=0.021$, 2 种方法检测结果的一致性较高, 但检测结果存在差异。

2.2 测序法验证结果 针对 27 份 2 种方法检测结果不一致的标本进行测序确认, 结果显示 27 份标本测序及荧光 PCR 检测结果一致。同时, 在 204 例荧光 PCR 检测为 HLA-B27 阳性样本中随机抽取 11 例, 进行测序复检, 结果显示 11 例标本测序及荧光 PCR 检测结果一致(符合率 100%, 排除污染因素及假阴性结果); 在 369 例荧光 PCR 检测为 HLA-B27 阴性样本中随机抽取 19 例, 进行测序复检, 结果显示 19 份标本测序及荧光 PCR 检测结果一致(符合率 100%, 排除假阴性结果)。

3 讨论

强直性脊柱炎是一种慢性、进行性和炎性疾病, 主要累及骶髂关节、脊柱骨软组织及四肢关节, 也可累及内脏和其他组织的慢性疾病, 严重危害人体健康^[5], 且不易早期诊断。进行 HLA-B27 检测已成为临床辅助诊断强直性脊柱炎的重要手段。PCR 技术的出现使人们能从更为微观的基因角度了解事物本质, 该技术在检测领域的应用也为提高 HLA-B27 检测的准确性和精确性提供可能, 其中新兴的荧光 PCR 技术克服传统 PCR 技术易污染劣势的同时又较其对结果的判定更为直观。

本研究共对 573 例临床标本进行 HLA-B27 荧光 PCR 检测, 并与流式细胞检测结果进行对比, 结果显示, 2 种方法检测结果具有很强的一致性。本结果与陈建华等^[6]研究结果一致。

从检测结果中可知, 7 份流式细胞检测阳性的标本, PCR 方法检测为阴性; 20 份流式细胞法检测为阴性的样本, PCR 检测为阳性, 不相符的样本占总样本数的 4.71%, 2 种方法检测

结果虽说有很高的一致性,但检测结果间仍存在差异。采用基因检测金标准 PCR 测序法对部分标本(包括检测结果不一致样本)复检的结果显示与荧光 PCR 检测结果完全一致。这与 2 种检测方法所基于的方法学和原理不同有关,荧光 PCR 技术检测的是 HLA-B27 的基因型,而流式细胞技术检测的是 HLA-B27 的表型。复检结果的一致性说明该荧光 PCR 试剂盒在检测 HLA-B27 基因上具有较高的准确度和灵敏度。

对于 2 种检测试剂盒检测结果不一致的更进一步原因分析如下:对于流式细胞检测阳性,荧光 PCR 方法检测为阴性的标本。从实验技术本身,流式细胞技术是一种免疫学方法,主要是根据直接荧光染色和抗原与抗体特异性结合的原理,使鼠抗人的 B27 单克隆抗体与人淋巴细胞表面 B27 抗原结合。由于使用了单克隆抗体,因此无法摆脱免疫学技术所固有的缺陷交叉反应。有研究显示流式细胞法试剂盒尽管使用鼠源抗 HLA-B27 单克隆抗体以提高 HLA-B27 的特异性,但仍然存在不同程度的交叉反应,其中以 HLA-B7 的交叉反应最为常见^[7-9]。现已有厂商(如 Beckman Coulter INC)采用 2 种单克隆抗体组合的方法以排除 B7 的干扰,其判断标准为当 HLA-B27 MFI 超过 8,且 HLA-B27 和 HLA-B7 细胞百分比超过 90% 时,判断此标本为阳性^[2]。

对于流式细胞检测阴性,荧光 PCR 方法检测为阳性的样本可能与以下原因有关:(1)流式细胞法检测时既要求标本为新鲜标本,同时要求根据试剂盒说明书在加入 HLA-B27 FIFC / CD3PE 荧光标记抗体后尽快检测。而实际工作中发现检测荧光信号值会随着标记样本暴露时间增加而衰减,这种标本制备、仪器检测时间的矛盾在大样本检测中可能会因为荧光信号的衰减造成漏检^[10];(2)流式细胞技术检测的是淋巴细胞表面的 HLA-B27 抗原,该表面的抗原可受感染等因素影响而改变 HLA-B27 抗原的数量或结构继而出现假阴性结果^[8]。

此外,临界值的设定也可能是造成检测结果不符的因素之一,目前国内院所使用的 BD HLA-B27 检测试剂盒,其阴、阳临界判定值主要是以白种人 HLA-B27 的表达量为标准设定,该标准未经矫正直接用于东方人群也可能造成检测结果的误差^[11]。

综上,比较 2 种试剂盒最大的争议还是在于采用抗原还是基因型作为检测标准。目前,AS 发病机制存在多种假说,具体机制并不明确。多项研究表明 AS 的发病与细胞表面 B27 抗原的表达量并无直接关系,抗原的表达量不会随着治疗和临床症状的改善而发生变化^[12]。另一方面 AS 较强的家族遗传性特点提示将 HLA-B27 作为一种遗传标志而非与疾病体征相关的表型特征更为合理^[13]。

相比,荧光 PCR 具有设备通用性强、试剂耗材价格低廉、特异性好、准确性高、对样本要求低、样本制备简单、高通量等特点,更适合进行大规模样本集中检测且有利于实验室间数据

的横向比较。在 HLA-B27 大规模检测和筛查上具有较好的临床应用价值和前景。

针对 HLA-B27 检测标准的设定和 2 种试剂盒检测参数及参考值设定还需以临床上确诊 AS 患者作为研究对象,开展更为严格设计的对比试验加以确证,同时,由于专利等因素,国外尚无获批在临床使用的 HLA-B27 核酸检测试剂盒。因此,学界尚无基于 HLA-B27 基因分型的强直性脊柱炎流行病学调查数据及相关报告,目前普遍认为,存在近 10% 的 AS 患者 HLA-B27 检测为阴性,这部分 AS 患者 HLA-B27 基因的携带情况尚需进一步的研究。

参考文献

- [1] 曲敬波,张易水,李庆源. HLA-B27 抗原检查在强直性脊柱炎临床诊断中的意义[J]. 中国医药研究,2005,3(1):184.
- [2] 胡晓舟,苑腾,王小林,等. 流式细胞术与定量 PCR 法检测 HLA-B27 的对比[J]. 中国实验诊断学,2009,13(6):745-746.
- [3] Brewerton DA, Cafrey M, Hart FD, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27[J]. Lancet, 1973, 27(9):904.
- [4] 吴震,古洁若. HLA-B27 与脊柱关节炎发病机制研究进展 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志,2006,12(6):514-516.
- [5] 潘克女,杨文波,谭登玲. HLA-B27 聚合酶链反应体系的建立和初步临床应用[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(9):1018-1019.
- [6] 陈建华,魏文宁,喻喜. PCR-SSP 法与流式细胞仪检测强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的比较[J]. 检验医学与临床,2007,4(3):161-162.
- [7] 曹鲁宁,张玲珍,仲人前. 流式细胞仪检测人白细胞抗原-B27 的影响因素[J]. 检验医学,2007,22(3):233-234.
- [8] 贺秋萍,隋秀丽,王燕. 流式细胞术检测 HLA-B27 抗原在强直性脊柱炎诊断中的价值[J]. 中国误诊学杂志,2008,8(27):6654-6655.
- [9] Wilfried HBM Levering, Henk Wind, Kees Sintnicolaas, et al. Flow cytometric HLA-B27 screening: cross-reactivity patterns of commercially available Anti-HLA-B27 monoclonal antibodies with other HLA-B antigens cytometry part B [J]. Clinical Cytometry, 2003, 54(1):28-38.
- [10] 胡晓舟,王小林,张捷. HLA-B27 流式细胞术检测中的荧光衰减 [J]. 中国实验诊断学,2007,11(12):1659-1660.
- [11] 周文英,汤艳萍,叶于闽. 流式细胞仪检测 HLA-B27 抗原界定值的设置对判断强直性脊柱炎阳性率的影响[J]. 中国实验诊断学, 2009,13(6):732-734.
- [12] 孙维萍. 379 例疑似强直性脊柱炎患者 HLA-B27 抗原检查结果分析[J]. 华西医学,2007,22(6):617-618.
- [13] 邵标,王辉. HLA-B27 检测在早期脊柱关节病中的诊断作用[J]. 中国医疗前沿,2008,3(1):94.

(收稿日期:2014-05-15)