

• 临床研究 •

流式微球技术定量检测血小板膜糖蛋白在 ITP 中的应用价值探讨*

郭 亮,宋艳萍,王 浩,贾学友,郭晓波
(西安市中心医院血液科,陕西西安 710000)

摘 要:**目的** 应用流式细胞技术检测血小板表面膜糖蛋白,评价其在血小板减少性紫癜(ITP)诊断中的价值。**方法** 选取 2013 年 1 月至 2015 年 2 月门诊及住院部收治的 77 例 ITP 患者(ITP 组)、43 例非免疫性血小板减少症患者(NITP 组)及同期进行健康体检的健康者 30 例(健康对照组)为研究对象。应用鼠抗人 GPⅡb/Ⅲa 单抗、GPIa/Ⅱa 单抗、GPⅠb/Ⅸ 单抗包被微球,采集空腹静脉血分离血样中血小板,将血小板裂解后与包被过的微球共同孵育,应用流式细胞仪结合间接荧光免疫法检测并比较三组血小板表面膜糖蛋白。分析流式微球技术诊断 ITP 的敏感度与特异度。**结果** ITP 组患者血小板表面 GPⅡb/Ⅲa、GPIa/Ⅱa、GPⅠb/Ⅸ 的水平均明显高于 NITP 组及健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),NITP 组患者高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。流式微球技术对 ITP 的诊断敏感度为 92.2%(71/77),特异度为 89.0%(65/73),准确度为 90.7%(136/150)。**结论** 应用流式微球技术定量检测血小板膜糖蛋白对诊断 ITP 有应用价值。

关键词:流式微球技术; 血小板表面膜糖蛋白; 血小板减少性紫癜; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.044 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)24-3614-02

特发性血小板减少性紫癜(ITP)是临床常见的出血性疾病,约占出血性疾病的 1/3,患者主要表现为血小板持续减少,皮肤、黏膜出血,严重者可发生内脏甚至颅内出血而危及生命^[1]。目前 ITP 的国内诊断标准仍为排除法,除血小板减少这一项较肯定外,其他诊断标准都是相对的,疗效反应在系统治疗后才能判定,故临床上存在一些难以确诊的病例,影响临床治疗,因此,寻找敏感而特异的检测方法,对提高 ITP 的诊断有重要意义^[2-3]。本研究选取 2013 年 1 月至 2015 年 2 月本院收治的 77 例 ITP 患者为研究对象,探讨流式微球技术定量检测血小板膜糖蛋白在 ITP 中的应用价值,为其诊断提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 ITP 组:ITP 患者 77 例,均本院 2013 年 1 月至 2015 年 2 月门诊及住院患者,其中男 32 例,女 45 例,男:女=1.4:1,年龄 14~78 岁,平均年龄 45 岁,均符合 ITP 诊断标准^[4]。NITP 组:非免疫性血小板减少患者 43 例,其中男性 26 例,女性 17 例,年龄 16~78 岁,平均年龄 45 岁,淋巴瘤患者 9 例,再生障碍性贫血患者 27 例,骨髓异常增生综合征患者 7 例。健康对照组:本院体检中心健康者 30 例,其中男 12 例,女 18 例,男:女为 1.5:1,年龄 15~79 岁,平均 46 岁。

1.2 仪器与试剂 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Beckon Dickinson 公司)。BD FACS Lysing Solution(溶血素)和 BD Cailibrite 3 Beads(流式细胞仪校准试剂)等全部为 BD 进口试剂。QuantumPlex4.4um-carboxyl 全部为 Bangslabs 公司进口微球。

1.3 方法 微球包被:用 200 mg/mL 的血小板膜糖蛋白单克隆抗体(抗-GPⅡb/Ⅲa、抗-GPIa/Ⅱa、抗-GPⅠb/Ⅸ)分别包被 QuantumPlex4.4um 微球,抗体包被按照微球荧光从低到高的顺序进行^[5]。包被过程如下:200 μL QuantumPlex4.4μm 微球 1 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。加入 400 μL 蛋白偶联缓冲液,1 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。加入 200 μL 蛋白偶联缓冲液和 20 μL 浓度为 20 mg/mL 的 EDAC 活化剂,活化 15 min,加入 100 μg 抗体,室温包被 4 h。1 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,加入 400 μL 清洗/贮存液,4 ℃ 存放。流式

检测:用 200 μL O 型血小板和血清在 37 ℃ 下孵育 30 min 后,用 PBS(EDTA,BSA)洗 3 遍,加入 150 μL 血小板裂解液后,放置 4 ℃ 30 min,2 500 r/min 离心 15 min,取上清液。加入 100 μL 血小板裂解液,25 μL 微球,避光孵育 3 h,用 PBS(Tween20,BSA)洗 2 遍,加入羊抗人 IgG-FITC、IgM-PE10 μL,避光孵育 60 min,用 PBS(Tween20,BSA)洗 1 遍,加 400 μL PBS(Tween20,BSA),上机检测并获取 10 000 个微球。同时将 30 个健康体检者人作为对照样本,并得到正常对照几何平均荧光强度(MFI)^[5]。

1.4 统计学处理 所有数据均以 SPSS17.0 进行分析;计数资料以率或构成比表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两两组比较采用独立样本 t 检验,3 组及以上采用方差分析; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组血小板膜糖蛋白表达结果比较 ITP 组患者血小板表面 GPⅡb/Ⅲa、GPIa/Ⅱa、GPⅠb/Ⅸ 的水平均明显高于 NITP 组及健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),NITP 组患者高于健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 三组血小板膜糖蛋白表达结果比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	抗-GPIIb/IIIa	抗-GPIa/IIa	抗-GP Ib/IX
ITP 组	77	7.68±6.64	2.58±2.15	3.28±2.91
NITP 组	43	4.96±3.17	1.29±0.78	2.06±1.43
健康对照组	30	0.94±0.69	0.86±0.55	0.91±0.82
<i>F</i>		8.173	3.015	4.609
<i>P</i>		0.000	0.012	0.006

2.2 流式微球技术对 ITP 诊断价值分析 ITP 组荧光强度比率均值及上下限为 5.47(0.48~19.75),NITP 组为 1.23(0.70~4.12),健康对照组为 0.98(0.41~1.62),ITP 组高于 NITP 组及健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。以

* 基金项目:陕西省西安市科技局资助基金项目(2012014)。

健康对照组上限为分界值,大于 1.62 为阳性,小于 1.62 为阴性,流式微球技术对 ITP 的诊断敏感度为 92.2%(71/77),特异度为 89.0%(65/73),准确度为 90.7%(136/150)。

3 讨 论

目前 ITP 的诊断标准主要依据临床表现和多次化验结果,血小板相关免疫球蛋白(PAIG)的检测是辅助诊断条件之一,但大量研究显示 PAIG 升高缺乏特异性,对 ITP 诊断帮助甚微,因此有研究者探索使用单克隆抗体固定血小板抗原法(MAIPA)及改良的 MAIPA 来检测血小板膜糖蛋白自身抗体,虽然可以有限的提高自身抗体检测的特异度,但因敏感度低、检测方法繁琐、耗时长等因素而限制了其临床应用。

ITP 的发生是由于自身抗体致敏的血小板被单核-巨噬细胞系统过度破坏所致,而自身抗体通常针对的是血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa、GPIb/Ⅸ 这些较为重要的靶抗原,除此之外还有 GPIa/Ⅱa、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、GMP140 等。这些少见类型的抗原决定簇有助于进一步揭示血小板自身抗体加剧 ITP 的发病机制^[6-7]。流式微球技术(CBA)是一种新的高通量检测方法,通过使用不同荧光编码大小的聚合微球,可以同时分析复杂样品中的多种分析物^[8]。每一种微球表面被修饰使其与相应的待测抗原或抗体反应,将不同微球混合即可进行多重复合测定,该技术结合了荧光编码微球的特异性与流式细胞仪的高度敏感性。本研究应用流式细胞技术检测血小板表面膜糖蛋白,评价其在 ITP 诊断中的价值,结果显示:ITP 患者 GPⅡb/Ⅲa、GPIa/Ⅱa、GPⅡb/Ⅸ 的水平均明显高于 NITP 组及健康对照组,而流式微球技术对 ITP 的诊断敏感度为 92.2%(71/77),特异度为 89.0%(65/73),高于目前临床上应用的 PAIG 检测(特异度 19%~27%)及 MAIPA(敏感度 39.0%~51.8%),提

• 临床研究 •

示作为一个技术分析平台,流式荧光微球技术大大提高 ITP 诊断敏感度及特异度,具有较高的推广价值和应用价值。

参考文献

[1] Hezard N, Simon G, Mace C, et al. Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies[J]. Transfusion, 2008, 48(2):513-518.

[2] 刘凌,冯莹,庞瓊,等.骨髓检查和血小板相关抗体检测对免疫性血小板减少症的临床价值[J].中国医药指南,2011,9(33):46-47.

[3] 任娜,邱广斌,王成彬.流式细胞术检测血小板相关抗体在免疫性血小板减少症中的应用[J].国际检验医学杂志,2014,35(13):1689-1690.

[4] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].3版.北京:科学出版社,2007:172-176.

[5] 李金霖.流式微球技术检测特发性血小板减少性紫癜患者血小板糖蛋白自身抗体的方法建立及临床应用[D].广州:南方医科大学,2010.

[6] 赵贤霄,何杨,朱明清,等.流式免疫微球芯片技术检测血小板膜糖蛋白特异性自身抗体的方法及其临床应用[J].苏州大学学报:医学版,2012,32(6):826-829.

[7] 何杨,李锦霞,朱明清,等.流式微球技术检测血小板膜糖蛋白特异性自身抗体法的建立临床应用[J].中华检验医学杂志,2011,34(3):1-6.

[8] 常丽贤,杨林花,陈剑芳,等.应用流式细胞术检测原发免疫性血小板减少症患者血小板膜糖蛋白Ⅱb/Ⅲa的表达及其临床意义[J].中华血液学杂志,2011,32(9):630-632.

(收稿日期:2015-09-22)

常规肝功酶法项目在 POCT 分析仪上的抗干扰性能初步评价

王 玲¹,孟高乐²,鞠春影³,李建路⁴,张桂春⁵,陈丽娜⁵

(1. 辽宁省沈阳市兴城疗养院检验科,辽宁沈阳 125105;2. 吉林省武警总队医院检验科,吉林长春 130052;3. 解放军第 313 医院检验科,辽宁葫芦岛 125000;4. 中国人民解放军 93062 部队 44 分队,吉林长春 132101;5. 宁波美康生物科技股份有限公司,浙江宁波 315104)

摘 要:目的 对天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、γ-谷氨酰转氨酶(GGT)在 POCT 分析仪上的抗干扰性能进行初步评价。**方法** 根据 CLSI EP7-A2 文件,对 AST、ALT 和 GGT 进行干扰评价试验。**结果** 配对差异试验结果显示:342 μmol/L 结合胆红素(CB),342 μmol/L 非结合胆红素(FB),0.03 g/L 抗坏血酸(Vc)、2 g/L 血红蛋白(Hb)、1450 浊度乳糜对 AST、ALT 测定均无干扰;342 μmol/L CB,342 μmol/L FB,0.03 g/L Vc,2 g/L Hb、1450 浊度乳糜对高浓度 GGT 测定均无干扰;342 μmol/L CB,342 μmol/L FB,0.03 g/L Vc、1450 浊度乳糜对低浓度 GGT 测定无干扰;Hb 为 2 g/L 时对低浓度 GGT 测定有一定的干扰,其中 d_{obs} 为 20.33, d_c 为 2.36;进一步的剂量效应试验显示, Hb 对低浓度的 GGT 检测会产生一定的线性干扰效应。**结论** POCT 分析仪上的 AST、ALT、GGT 试剂具有较强的抗干扰能力,能够满足临床应用。

关键词:天冬氨酸转氨酶; 丙氨酸转氨酶; γ-谷氨酰转氨酶; 抗干扰
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.045 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)24-3615-03

基于微流控芯片技术的即时检验技术(POCT)已成为当前检验医学发展的潮流和热点,主要特点是快速得出结果,操作简便,容易使用和小型化。随着诊断和辅助技术的进步,以及人们对疾病的认识及治疗水平提高的要求,POCT 逐渐受到关注^[1]。微流控芯片技术是 21 世纪最为重要的前沿技术之一,它把生物、化学、医学分析过程中的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上^[2],自动完成分析全过程。将微流控芯片技术引入到 POCT 设备,开创

了 POCT 发展的新局面。结合微流控芯片技术的 POCT 分析仪兼具高准确度、低需血量、操作简单、检测试剂用量少、成本低等优点,非常适用于中国这样具有庞大基层医疗系统且试剂使用量极大的国家。因此建立操作简易、价格低廉、实时报告的 POCT 分析系统对发挥广大基层医院在疾病预防及诊疗中的作用有重要的意义。

本研究是对宁波美康保生生物医学工程有限公司所研发的 POCT 分析仪及配套的试剂盘片套餐中的天冬氨酸转氨酶