

• 论 著 •

流式细胞术检测 HLA-B27 最佳抗体剂量与作用时间研究

李 娜¹, 高文波², 周玉明¹

(滨州医学院附属医院: 1. 中心实验室; 2. 神经外科, 山东滨州 256600)

摘 要: **目的** 探讨流式细胞术检测人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)时所用的最佳抗体剂量与作用时间。 **方法** 取 52 例强直性脊柱炎患者全血, 根据 HLA-B27 抗体剂量不同分为 5、10 μL 两组, 分别避光静置 5、10、15 min, 溶血后上机检测 HLA-B27 水平。 **结果** 5 μL 抗体组不同反应时间 HLA-B27 阳性率分别为 $(84.16 \pm 1.21)\%$ 、 $(94.81 \pm 1.33)\%$ 、 $(94.1 \pm 1.26)\%$; 10 μL 抗体组不同反应时间 HLA-B27 阳性率分别为 $(85.4 \pm 1.27)\%$ 、 $(96.76 \pm 1.31)\%$ 、 $(95.36 \pm 1.45)\%$; 10 μL 抗体组 HLA-B27 检测结果高于 5 μL 抗体组, 差异有统计学意义 ($F=90.08, P<0.05$); 抗体反应 10、15 min HLA-B27 检测结果高于抗体反应 5 min 检测结果, 差异有统计学意义 ($F=60.25, P<0.05$); 抗体反应 10 min HLA-B27 检测结果与抗体反应 15 min 检测结果比较差异无统计学意义 ($F=1.08, P>0.05$)。 **结论** HLA-B27 抗体剂量 10 μL , 反应 10 min 为最佳实验方案; HLA-B27 抗体剂量、反应时间无交互作用。

关键词: 强直性脊柱炎; 流式细胞术; 人类白细胞抗原 B27

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.20.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)20-2965-02

The optimal dose and reaction time of HLA-B27 antibody in flow cytometry

Li Na¹, Gao Wenbo², Zhou Yuming¹

(1. Center Laboratory; 2. Department of Neurosurgery, Binzhou Medical

University Hospital, Binzhou, Shandong 256600, China)

Abstract: **Objective** To study the optimal dose and reaction time of human leukocyte antigen B27(HLA-B27)antibody in flow cytometry. **Methods** Take 52 cases of whole blood in patients with ankylosing spondylitis(AS). According to HLA-B27 antibody doses, samples were divided into two groups: 5 μL group and 10 μL group. HLA-B27-positive rate were tested after 5, 10, 15 min, respectively. **Results** The HLA-B27 positive rate of 5 μL group at different reaction time were $(84.16 \pm 1.21)\%$ 、 $(94.81 \pm 1.33)\%$ 、 $(94.10 \pm 1.26)\%$; the positive rate of 10 μL group at different reaction time were $(85.40 \pm 1.27)\%$ 、 $(96.76 \pm 1.31)\%$ 、 $(95.36 \pm 1.45)\%$. The positive rate of HLA-B27 in 10 μL group was higher than 5 μL group ($F=90.08, P<0.05$). The positive rate of HLA-B27 after reacting for 10 and 15 min were higher than that after reacting for 5 min ($F=60.25, P<0.05$). There was not statistically significantly different between the reaction time of 10 min and 15 min ($F=1.08, P>0.05$). **Conclusion** The optimal dose and reaction time of HLA-B27 antibody in flow cytometry are 10 μL and 10 min; There is not any interaction between antibody dose and the reaction time of HLA-B27 antibody.

Key words: ankylosing spondylitis; flow cytometry; human leukocyte antigen B27

强直性脊柱炎(AS)是一种多发于青壮年男性,以中轴关节慢性炎症为主,也可累及内脏及其他组织的慢性进展性风湿性疾病,我国发病率约为 300/10 万,其病因和发病机制尚不清楚。AS 在免疫医学领域与人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)密切相关。流行病学调查显示,HLA-B27 阳性率在 AS 患者高达 96% 以上,而健康人群中仅为 4%~7%。HLA-B27 因与 AS 相关而成为临床诊断与鉴别诊断 AS 的重要辅助手段^[1]。目前常见的 HLA-B27 检测方法有流式细胞术、淋巴细胞毒法、序列特异引物引导的 PCR 反应(PCR-SSP)等。其中流式细胞术以其快速灵敏、多参数的特点在临床 HLA-B27 检测中得到广泛地应用^[2]。HLA-B27 抗体价格比较昂贵,为探讨流式细胞术检测 HLA-B27 时所用的最佳抗体剂量与作用时间,笔者进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2013 年 1~6 月本院门诊及住院患者 52 例,男 28 例、女 24 例,均符合 AS 诊断标准(采用 1984 年纽约修订的 AS 诊断标准为本研究的诊断标准)。采集上述人员空腹静脉血标本 1 mL,以乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪型号: Beckman Coulter FC-500; 溶血仪型号: Beckman Coulter Q-PREP; 微量加样器型号:

Eppendorf 10 μL 、40 μL 。主要试剂包括 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 抗体,阴性对照为 IgG2a-FITC/IgG1-PE,溶血剂为 FACS Lysing solution,均购自 Beckman Coulter 公司; EDTA 抗凝管购自山东奥塞特公司。

1.3 方法 根据 HLA-B27 抗体剂量不同分为两组。5 μL 组: 在试管中加入 5 μL 抗体溶液,依次加入 40 μL 抗凝血液,充分混匀后分别避光静置 5、10、15 min,溶血并用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后上机检测; 10 μL 组: 在试管中加入 10 μL 抗体溶液,依次加入 40 μL 抗凝血液,充分混匀后分别避光静置 5、10、15 min,溶血并用 PBS 洗涤后上机检测。

1.4 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 统计软件包中析因设计的方差分析处理实验结果, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

方差齐性检验显示方差齐 ($P=0.372$)。析因设计的方差分析显示,10 μL 抗体组 HLA-B27 检测结果高于 5 μL 抗体组,两组间比较差异有统计学意义 ($F=90.08, P<0.05$); 抗体反应 10、15 min 的 HLA-B27 检测结果高于抗体反应 5 min 的检测结果,两组之间比较差异有统计学意义 ($F=60.25, P<0.05$); 抗体反应 10 min 与抗体反应 15 min 的 HLA-B27 检测

结果间比较,差异无统计学意义($F=1.08,P>0.05$),见表 1。HLA-B27 检测结果与抗体剂量、反应时间关系图显示三条直线几乎平行,表示抗体剂量、反应时间无交互作用,见图 1。

表 1 不同抗体剂量组 HLA-B27 检测结果(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	HLA-B27 检测结果		
	5 min	10 min	15 min
5 μ L 组	84.16 \pm 1.21	94.81 \pm 1.33	94.10 \pm 1.26
10 μ L 组	85.40 \pm 1.27*	96.76 \pm 1.31*#	95.36 \pm 1.45*#

*: $P<0.05$,与 5 μ L 抗体反应组比较;#: $P<0.05$,与抗体反应 5 min 比较。

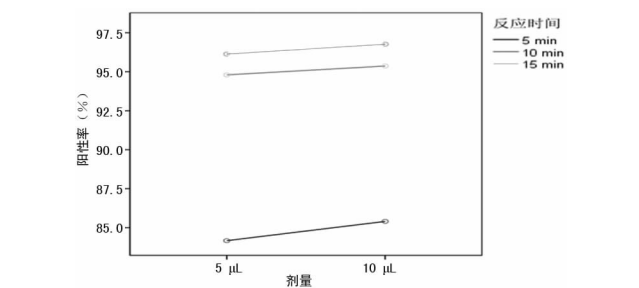


图 1 HLA-B27 检测结果与抗体剂量、反应时间关系图

3 讨 论

AS 是脊柱及附属组织的自身免疫性疾病,AS 减少致残率的关键在于早期发现、早期诊治、早期指导患者生活起居及功能锻炼,从发病到明确诊断往往需要经过 4~10 年^[3]。AS 最初起病隐匿,患者脊柱或周围关节疼痛往往与其他原因引起的脊柱或关节疼痛症状相似,而初发患者在 X 线上又没有骶

髂关节炎的明确表现,因此在临床上不易确诊,仅以 X 射线所见为依据,可能对一些早期病例的诊断不可靠。如果患者根据临床资料诊断 AS 的概率为 50%,在检出 HLA-B27 时则可提高至 93%,因而,结合患者症状与临床上的其他诊断进行 HLA-B27 检测具有十分重要的意义^[4]。流式细胞仪是检测 HLA-B27 最有效的方法,其利用荧光标记的抗 HLA-B27 的单克隆抗体和淋巴细胞表面的 HLA-B27 抗原结合,使结合后的淋巴细胞具有一定的荧光强度,这种荧光强度可由流式细胞仪测得的通道值来反映,以其值的高低判断 HLA-B27 阴、阳性,该方法操作简单,结果准确,尤其适用于大规模样本检测^[5]。HLA-B27 抗体价格昂贵,为高效合理使用抗体,本实验根据抗体剂量不同分为两组,分别避光静置 5、10、15 min,溶血后上机检测 HLA-B27 水平,结果显示抗体剂量 10 μ L 反应 10 min 为最佳实验方案,能够有效节省抗体并提高工作效率。

参考文献

[1] 孙翠华,孟凡杰,王玉芳,等.强直性脊柱炎与 HLA-B27 相关性的研究进展[J].医学综述,2007,13(4):281-283.
[2] 胡晓舟,苑腾,王小林,等.流式细胞术与定量 PCR 法检测 HLA-B27 的比对[J].中国实验诊断学,2009,13(6):745-746.
[3] 黎勤云,李志强.强直性脊柱炎相关 HLA-B27 的研究进展[J].中国输血杂志,2012,25(11):1138-1140.
[4] Liu Y,Li J,Chen B,et al.Familial aggregation of ankylosing spondylitis in Southern China[J].J Rheumatol,2001,28(3):550-553.
[5] 金明威,陈哲,陈颖.流式细胞术检测 HLA-B27 及其临床意义[J].中国优生与遗传杂志,2011,19(5):35.

(收稿日期:2015-07-02)

(上接第 2964 页)

本次研究结果显示红霉素和克林霉素的耐药率高达 71.0%和 64.5%,并且结果高度一致,这与国内一些研究报道基本一致^[11,14],作为经验用药已不适用。另外左氧氟沙星的耐药率为 58.1%,比其他地区报道都高^[7-12]。这可能与本地区左氧氟沙星的大量使用有关。耐药菌株的出现与抗菌药物的广泛使用密切相关,较高的耐药率令人担忧,因此需要临床紧密结合药敏结果预防和治疗 GBS 的感染,从而减少耐药株的发生和扩散。

综上所述,徐州地区妊娠晚期妇女的 GBS 定植率在健康人群的正常范围内,应重视妊娠晚期妇女和新生儿的 GBS 感染,加强对孕 35~37 周孕妇开展 GBS 常规 PCR 方法检查,减少 GBS 感染的发生。并常规监测 GBS 耐药性的变化从而指导临床合理用药,提高妊娠晚期妇女和新生儿的生活质量,保障母婴安全。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006.
[2] Cagno CK,Pettit JM,Weiss BD.Prevention of perinatal group B streptococcal disease: updated CDC guideline[J].Am Fam Physician,2012,86(1):59-65.
[3] Schrag S,Gorwitz R,Fultz-Butts K,et al.Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC[J].MMWR Recomm Rep,2002,51(11):1-22.
[4] Michael W,蒋佩茹,曹云,等.围生期新生儿 B 族链球菌感染[J].中国循证儿科杂志,2011,06(4):241-244.

[5] Verani JR,McGee L,Schrag SJ,et al.Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC,2010 [J].MMWR Recomm Rep,2010,59(10):1-36.
[6] Academy of American Pediatrics. Committee on infectious diseases and committee on fetus and newborn, revised guidelinds for prevention of early-onset group B Streptococcal (GBS) infection[J].Pediatrics,1997,99(3):489-496.
[7] 蔡晓沂,钟镐镐,王秀艳,等.快速、准确的 B 族链球菌检测—即时荧光探针核酸扩增技术的应用[J].现代预防医学,2013,40(13):2533-2535.
[8] 吴海军,吕磊,宋柳安,等.B 群链球菌在孕妇及新生儿中的带菌调查及耐药性研究[J].重庆医科大学学报,2013,38(10):1234-1236.
[9] 何国才,白清,李高,等.桂林地区孕晚期孕妇 B 族链球菌检测及药敏分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(15):2006-2007.
[10] 黄永建,陈波,张勇,等.孕晚期妇女 B 族链球菌 PCR 检测结果分析[J].江西医药,2013,48(7):581-584.
[11] 张丽华,张丽,李超强,等.孕妇围产期 B 群链球菌检出率和耐药性分析[J].中国医药,2010,5(3):261-262.
[12] 许基平,王频佳.B 群链球菌快速检测方法研究进展[J].检验医学与临床,2011,8(19):2380-2381.
[13] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S].Wayne,PA,USA:CLSI,2013.
[14] 张红军,刘华,韩彩虹.围产期孕妇 B 群链球菌感染情况及对妊娠结局的影响研究[J].中国计划生育和妇产科,2015,4(4):50-52.

(收稿日期:2015-05-11)