

• 论 著 •

流式细胞术检测 HLA-B27 两种试剂比较与结果分析*

陈永强¹, 郑璐¹, 张玥¹, 王杜平¹, 程星¹, 陈艳红¹, 周忠海^{2△}, 牛国平^{1▲}

1. 徐州市中心医院检验科, 江苏徐州 221009; 2. 徐州医科大学附属淮海医院实验科, 江苏徐州 221004

摘要:目的 比较两种人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)检测试剂盒临床检测效果与异常结果分析, 为临床提供可靠的检测报告。方法 采用 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 和 HLA-B27-FITC/CD3-PE 两种检测试剂盒检测 1 208 例腰椎病、颈椎病、关节痛、脊柱僵硬和强直性脊柱炎患者标本中 HLA-B27 的表达, 结合临床诊断分析比较两种方法的检测结果。结果 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 检测试剂盒在检测 1 208 份标本中有 12 份(0.99%) HLA-B7⁺ HLA-B27⁺ 细胞群的百分比≥90%, 判读为 HLA-B27 疑似阳性, 而 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒检测结果显示均为阳性结果; 另外, 淋巴细胞群分群不清晰易导致 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒将 HLA-B27 阳性结果判读为假阴性, 而 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒利用 CD3 设门可以避免假阴性的出现。结论 两种检测试剂盒检测 HLA-B27 结果均准确可靠, 且各具特点。

关键词:人类白细胞抗原 B27; 流式细胞术; 强直性脊柱炎
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.02.005 **中图法分类号:**R331
文章编号:1673-4130(2022)02-0152-04 **文献标志码:**A

Comparison and result analysis of two reagents for detecting HLA-B27 by flow cytometry*

CHEN Yongqiang¹, ZHENG Lu¹, ZHANG Yue¹, WANG Duping¹, CHENG Xing¹,
CHEN Yanhong¹, ZHOU Zhonghai^{2△}, NIU Guoping^{1▲}

1. Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221009, China;
2. Department of Experiment, Huaihai Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University,
Xuzhou, Jiangsu 221004, China

Abstract: Objective To compare the clinical detection effects and abnormal results analysis of two human leucocyte antigen (HLA)-B27 detection kits in order to provide a reliable laboratory report for clinical diagnosis. Methods A total of 1 208 samples were tested by two reagents, including HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE kit and HLA-B27-FITC/CD3-PE kit, and combined with clinical diagnosis, the results of the two methods were compared. Results Totally 12(0.99%) of 1 208 patients detected by HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE detection kit showed the percentage of HLA-B7⁺ HLA-B27⁺ cell population ≥90%, and they were interpreted as HLA-B27 suspected positive, while HLA-B27-FITC/CD3-PE kit test results were all positive. In addition, unclear lymphocyte grouping was easy to cause HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE kit to interpret HLA-B27 positive results as false negative, while the HLA-B27-FITC/CD3-PE kit could avoid false negative by using CD3 gate. Conclusion The results of HLA-B27 detection by the two detection kits are accurate and reliable, and each has its own characteristics.

Key words: human leucocyte antigen-B27; flow cytometry; ankylosing spondylitis

强直性脊柱炎(AS)是一类以脊柱和骶髂关节慢性进行性炎症为主要特征的自身免疫性疾病, 发病机制主要与遗传、免疫反应和微生物感染等有关^[1]。目前研究证实, 人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)与 AS 发病具有很强的相关性, 其阳性率在 AS 患者中高达 90%, 而在健康人群中阳性率仅为 2%~7%^[2]。有研

究报道, HLA-B27 介导 TNAP 磷酸酶活化促进 AS 中软骨组织的生成^[3]。目前, HLA-B27 已成为临床上辅助诊断 AS 的重要检测指标。在 HLA-B27 的检测方法中, 流式细胞术因其具有检测速度快、灵敏度和特异度高等优点在临床上被广泛应用^[4]。本研究主要比较美国贝克曼库尔特公司生产的 HLA-B27-

* 基金项目: 江苏省双创博士项目(2020SC01); 徐州市重点研发计划社会发展项目(KC20110); 徐州市中心医院课题(2-2109024)。
作者简介: 陈永强, 男, 副主任技师, 主要从事临床免疫检验质量控制研究。△ 通信作者, E-mail: zhouzhonghai298@aliyun.com。
▲ 共同通信作者, E-mail: xz70707@163.com。
本文引用格式: 陈永强, 郑璐, 张玥, 等. 流式细胞术检测 HLA-B27 两种试剂比较与结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(2): 152-155.

FITC/HLA-B7-PE 检测试剂盒和美国 BD 公司生产的 HLA-B27-FITC/CD3-PE 检测试剂盒在临床 HLA-B27 检测过程中影响结果准确性的关键因素与异常结果分析,期望为临床提供可靠的检测报告。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集来自徐州市中心医院 2019 年 8 月至 2020 年 7 月门诊及住院的 1 208 例临床初诊为腰椎病、颈椎病、关节痛、脊柱僵硬和 AS 患者的外周血标本,采用肝素抗凝管抽取 5 mL,所有标本均于当天应用流式细胞术完成 HLA-B27 的检测。

1.2 仪器与试剂 CytoFLEX 流式细胞仪为美国贝克曼库尔特公司生产,FACS Calibur 流式细胞仪为美国 BD 公司生产。HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒(货号:340183)和溶血素(货号:349202)为美国 BD 公司生产;HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒(货号:A07739)和溶血素(货号:A11895)为美国贝克曼库尔特公司生产。

1.3 方法

1.3.1 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 检测试剂盒检测方法 向编号的检测管中依次加入 10 μ L 检测抗体和 50 μ L 肝素抗凝外周血,振荡混匀后置于室温避光处孵育 20 min,然后每管加入 0.5 mL 货号为 A11895 溶血素,混匀避光孵育 15 min,加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液,避光孵育平衡 5 min,每管加 2 mL 磷酸盐缓冲液,1 600 r/min 离心 5 min,弃掉上清液,每管加 0.5 mL 磷酸盐缓冲液,振荡混匀后采用 Cyt-oFLEX 流式细胞仪上机检测分析。

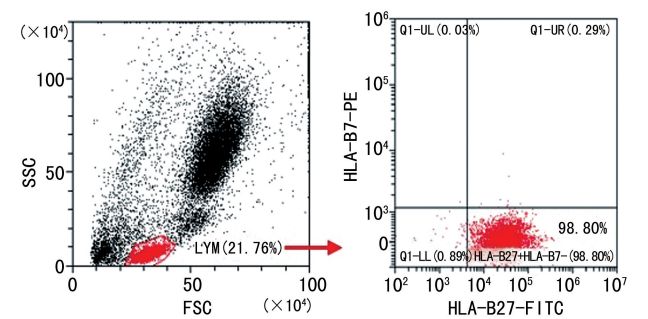
1.3.2 HLA-B27-FITC/CD3-PE 检测试剂盒检测方法 向编号的检测管中依次加入 10 μ L 检测抗体和 50 μ L 肝素抗凝外周血,振荡混匀后置于室温避光处孵育 20 min,随后加入 1 mL 货号为 349202 的溶血素,涡旋振荡混匀后避光 5 min,每管加入 1 mL 磷酸盐缓冲液混匀后 1 600 r/min 离心 5 min,弃上清液,再用 2 mL 磷酸盐缓冲液洗涤 1 次后,加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液,振荡混匀后采用 FACS Calibur 流式细胞仪检测分析。

2 结果

2.1 两种试剂盒检测原理 美国贝克曼库尔特公司生产的 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 检测试剂盒主要通过 FSC 和 SSC 双参数图圈定淋巴细胞亚群设门,然后分析淋巴细胞中 HLA-B7⁻ HLA-B27⁺ 细胞群的百分比,比例 $\geq 90\%$ 判读为阳性,见图 1;美国 BD 公司生产的 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒首先通过 FSC 和 SSC 双参数图圈定淋巴细胞亚群设门,然后分析淋巴细胞群中 CD3⁺ 淋巴细胞中 HLA-B27 的平均荧光强度,通过试剂盒自设平均荧光强度(MFI)临界值 ≥ 145 判读为阳性(不同试剂批号 MFI 值略有差异),见图 2。

2.2 淋巴细胞亚群分群不清晰对两种试剂盒检测结

果的影响 结果发现,淋巴细胞亚群分群不清晰会导致 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 检测试剂盒将 HLA-B7⁻ HLA-B27⁺ 细胞群 $\geq 90\%$ 的阳性结果判读为阴性结果($<90\%$),见图 3;而 HLA-B27-FITC/CD3-PE 检测试剂盒利用 FSC 和 SSC 双参数图圈定淋巴细胞亚群,同时继续采用 CD3-PE 抗体进一步圈定表达 CD3⁺ 淋巴细胞,可以避免淋巴细胞亚群分群不清晰导致的假阴性。



注:A 为利用 FSC 和 SSC 双参数显示的免疫细胞散点图,B 为对 A 图中圈定的淋巴细胞分析 HLA-B7 和 HLA-B27 表达水平散点图。

图 1 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒检测示意图

2.3 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒检测 HLA-B27 异常结果统计与结果分析 采用 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒检测 1 208 份标本结果发现,除了标准的阴性标本和阳性标本之外,还存在两种异常的标本类型,异常标本 1 为淋巴细胞表达 HLA-B7 且细胞群主要分布于第一和第二象限之间;异常标本 2 为淋巴细胞表达 HLA-B7 且细胞群分布于第二象限或第二和第四象限之间,见图 4。统计结果显示,阴性标本 887 份,占 73.43%;阳性标本 225 份,占 18.63%;而异常标本 1 共有 84 份,占 6.95%;异常标本 2 共有 12 份,占 0.99%。

随后,笔者对上述两种类型的异常标本采用美国 BD 公司生产的 HLA-B27-FITC/CD3-PE 检测试剂盒进行复测,结果显示,HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒检测的阴性和阳性标本与 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒的检测结果一致;而异常标本 1 的 MFI 值介于阴性和阳性标本的数值之间,仍然判读为阴性标本;然而,12 份异常标本 2 的 MFI 值均高于阳性临界值 145,判读为阳性标本,见图 5 和表 1。

2.4 HLA-B27 检测结果与临床诊断之间的关系 对 1 208 份临床标本检测结果与临床诊断之间的关系分析结果显示,887 份 HLA-B27 阴性标本中有 32 份临床诊断为 AS 患者,占 3.16%;225 份 HLA-B7⁻ HLA-B27⁺ 淋巴细胞比例 $\geq 90\%$ 的阳性标本中有 52 份临床诊断为 AS 患者,占 23.11%;84 份异常标本 1 中有 1 份临床诊断为 AS 患者,占 1.19%;而 12 份异常标本 2 中有 3 份临床诊断为 AS 患者,占 25.00%,见表 2。异常标本 1 临床检测结果可判读为阴性,而异常标本 2 存在较高比例的 AS 患者。

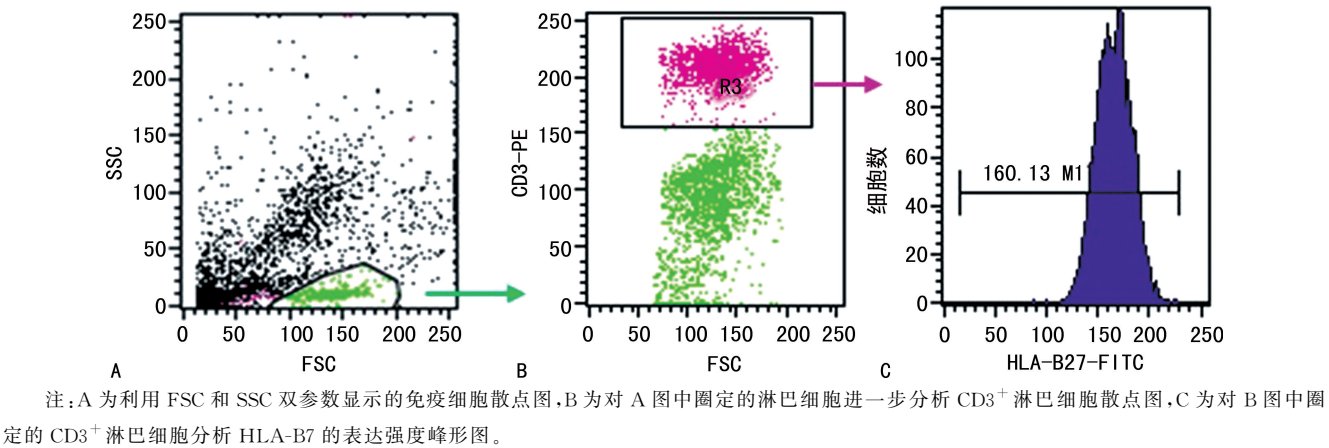


图 2 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒检测示意图

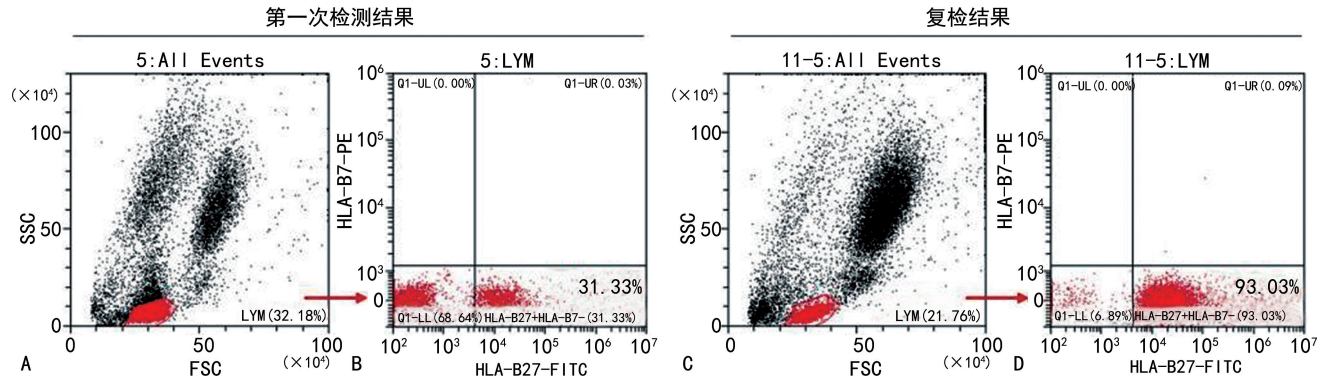


图 3 淋巴细胞亚群分群不清晰对 HLA-B27 检测结果判读的影响

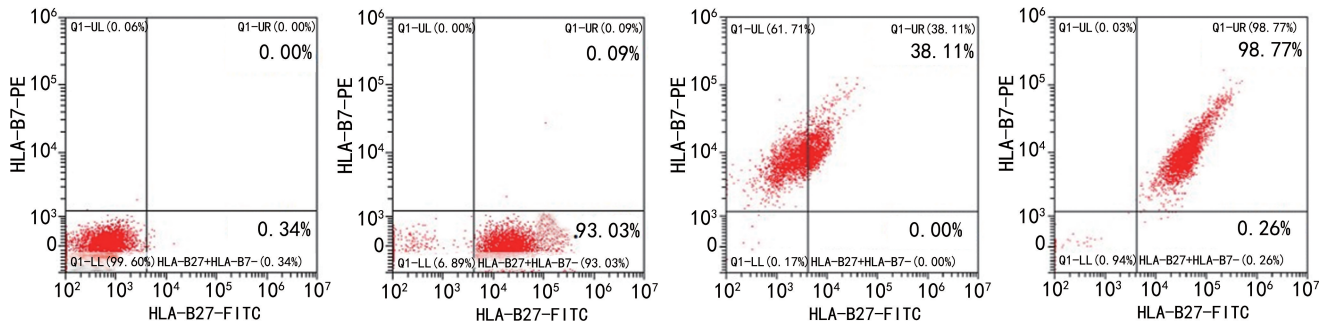


图 4 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒检测 HLA-B27 常见结果图

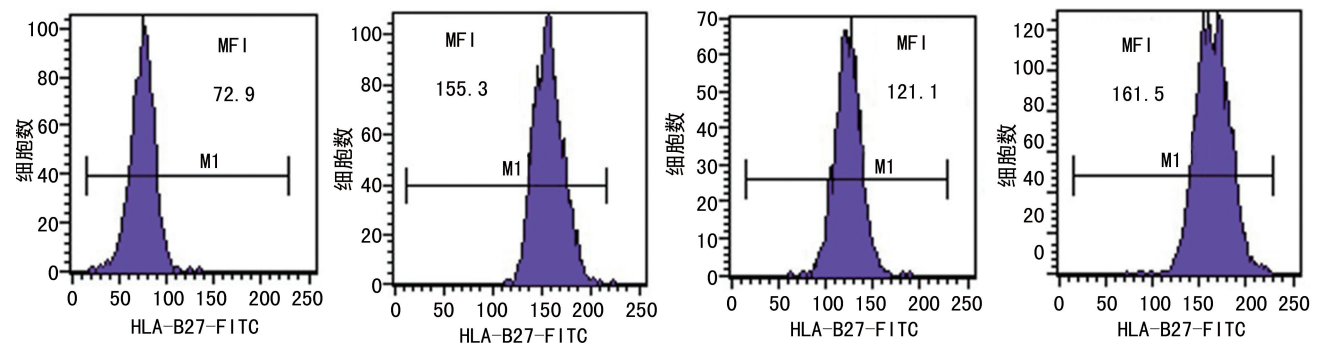


图 5 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒检测 HLA-B27 常见结果图

表 1 两种试剂盒检测 HLA-B27 结果比较			
组别	n	HLA-B7 ⁻	CD3 ⁺
		HLA-B27 ⁺ [M(P ₂₅ , P ₇₅), %]	HLA-B27 ⁺ ($\bar{x} \pm s$, MFI)
阴性标本	5	0.31(0.25, 0.40)	74.84±5.21
阳性标本	5	94.35(91.27, 94.61)	156.16±8.02
异常标本 1	12	0	120.37±13.43
异常标本 2	12	0.24(0.12, 0.37)	157.85±10.39

表 2 各组标本中临床诊断为 AS 患者所占比例		
组别	n	AS 患者[n(%)]
阴性标本	887	32(3.61)
阳性标本	225	52(23.11)
异常标本 1	84	1(1.19)
异常标本 2	12	3(25.00)

3 讨 论

流式细胞术因为具有快速、灵敏度高和特异度高等特点已成为临床常用检测 HLA-B27 表达的方法，但是该方法也存在一定的不足之处^[5]。有文献报道，HLA-B27 的单克隆抗体会与其他 HLA-B 等位基因编码的抗原发生不同程度的交叉反应，其中以 HLA-B7 抗原的交叉反应最常见^[6-7]。因此，采用 HLA-B27-FITC/CD3-PE 两种抗体组合的试剂检测分析 CD3⁺ 淋巴细胞表达 HLA-B27 时，对同时表达 HLA-B7 抗原的标本，HLA-B27 单克隆抗体会与 HLA-B7 抗原发生交叉反应导致一定比例的标本检测结果呈假阳性；当采用 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 双抗体组合的试剂检测分析淋巴细胞群中 HLA-B7⁻ HLA-B27⁺ 细胞的比例时，可以排除因 HLA-B27 抗体与 HLA-B7 抗原交叉反应引起的假阳性。

在 HLA-B27 检测过程中，经常遇到一些可能由于溶血效果不好或细胞碎片等因素导致上机检测时淋巴细胞群分群不清晰的标本，本研究结果发现，HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒检测 HLA-B27 的方法会导致部分淋巴细胞群分群不清晰的阳性标本被误判为阴性标本，因此该检测方法对淋巴细胞群分群有较高的要求，对检测过程中遇到分群不清晰的标本一定要进行复检，而 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒利用 CD3-PE 抗体进一步圈定表达 CD3⁺ 淋巴细胞，可以避免淋巴细胞群分群不清晰导致的假阳性。HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒检测方法容易将 HLA-B7 表达的标本误判为假阳性标本，而 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒可以将此类标本区分出来，但对于淋巴细胞同时表达 HLA-B27 抗原与

HLA-B7 抗原的标本检测结果仍无法准确判断，这类标本结果的判读只能结合病历资料或与临床医生沟通进行判断。为了能对本研究中异常标本 2 结果进行准确判断，后期笔者将收集该类标本并采用引物特异性聚合酶链反应(SSP-PCR)对 HLA-B7 和 HLA-B27 的表达情况进行检测^[8]，然后结合临床诊断进一步分析，为今后提高临床 AS 患者的诊断率和结果的可靠性提供依据。

综上所述，两种 HLA-B27 试剂盒检测结果均准确可靠；HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 试剂盒能区分出 HLA-B7/HLA-B27 双阳性的疑似 AS 患者，但检测过程对淋巴细胞亚群分群要求较高；而 HLA-B27-FITC/CD3-PE 试剂盒利用 CD3 设门可以避免淋巴细胞亚群分群不清导致的假阴性结果的出现，但不能区分 HLA-B7/HLA-B27 双阳性标本且在结果判读中存在一定比例的假阳性。

参考文献

[1] ZHU W, HE X X, CHENG K Y, et al. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments [J]. Bone Res, 2019, 7: 22-28.

[2] BREWETON D A, CAFFREY M, HART F D, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27 [J]. Lancet, 1973, 1 (13): 904-914.

[3] LIU C H, RAJ S, CHEN C H, et al. HLA-B27-mediated activation of TNAP phosphatase promotes pathogenic syndesmophyte formation in ankylosing spondylitis [J]. J Clin Invest, 2019, 129(12): 5357-5373.

[4] 高乐女, 吴红, 游荷霞, 等. 7 829 例疑似强直性脊柱炎患者 HLA-B27 抗原阳性率及分型研究 [J]. 第三军医大学学报, 2020, 42(12): 1220-1224.

[5] 吴蓓颖, 顾燕英, 范臻佳, 等. 流式细胞术检测 HLA-B27 阴阳性判读标准的建立及灰区样本的基因型分析 [J]. 检验医学, 2020, 35(1): 15-19.

[6] MACARDLE P J, MCEVOY R, JOVANOVICH S. HLA-B27 expression by flow cytometry: an analysis of 7 years quality assurance data [J]. J Immunol Methods, 2000, 243(1/2): 51-57.

[7] ULRICH G. Use of flow cytometry for HLA-B27 phenotyping: study of a HLA-B7/HLA-B27 double marker technique [J]. Allerg Immunol (Paris), 1997, 29 (1): 11-14.

[8] 陈慧毅, 褚为靖, 张会英, 等. 实时荧光 PCR 法与流式细胞术两种方法检测 HLA-B27 的比较 [J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(12): 2251-2254.