

## PCR-SBT 与 IMS-ELISA 法 在强直性脊柱炎患者 HLA-B27 检测中的比较\*

孙灵迪<sup>1,2</sup>, 梅传忠<sup>1</sup>, 王平均<sup>2</sup>, 武晓茜<sup>2</sup>, 邵先安<sup>1,2</sup>

(1. 蚌埠医学院, 安徽蚌埠 233030; 2. 解放军第123医院检验病理科, 安徽蚌埠 233015)

**摘要:**目的 比较聚合酶链反应-直接测序法(polymerase chain reaction sequence-based typing, PCR-SBT)和磁珠酶联免疫法(immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay, IMS-ELISA)检测人类白细胞抗原 B27(human leukocyte antigen B27, HLA-B27)在强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)临床诊断中的价值。方法 应用 PCR-SBT 法和 IMS-ELISA 法对 120 例疑似 AS 患者外周血进行 HLA-B27 检测。以 SPSS17.0 软件的配对  $\chi^2$  检验和受试者工作特征曲线下面积对两种方法检测 HLA-B27 在 AS 诊断中的价值进行评价。结果 120 例疑似 AS 患者中, PCR-SBT 和 IMS-ELISA 法 HLA-B27 检测阳性率分别为 45.83%(55/120)和 37.50%(45/120)。两种方法检测 HLA-B27 差异有统计学意义( $\chi^2=59.455, P=0.000$ )。PCR-SBT 法敏感度和特异度分别为 96.36% 和 96.92%; IMS-ELISA 法的敏感度和特异度分别为 69.09% 和 89.23%。两者的 AUC 分别为 0.966 和 0.792。结论 与 IMS-ELISA 法相比, 在 AS 的临床诊断中 PCR-SBT 法检测 HLA-B27 的敏感度和特异度更高, 方法更优。

**关键词:** 聚合酶链反应-直接测序法; 磁珠酶联免疫法; 人类白细胞抗原 B27; 强直性脊柱炎

**中图分类号:** R593.23; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2015)02-016-03

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.005

### Comparison Analysis of HLA-B27 Detected by PCR-SBT and IMS-ELISA in AS Patients

SUN Ling-di<sup>1,2</sup>, MEI Chuan-zhong<sup>1</sup>, WANG Ping-jun<sup>2</sup>, WU Xiao-qian<sup>2</sup>, SHAO Xian-an<sup>1,2</sup>

(1. Bengbu Medical College, Anhui Bengbu 233030, China; 2. Clinical

Laboratory and Pathological Department, the 123 Hospital of PLA, Anhui Bengbu 233015, China)

**Abstract:** **Objective** To compare PCR-SBT to IMS-ELISA in the HLA-B27 detection in the ankylosing spondylitis (AS) patients. **Methods** Simultaneously, PCR-SBT and IMS-ELISA were used to detect the HLA-B27 expression in peripheral blood samples which were suspected patients with AS from 120 cases. Chisquare test of paired design and the area under curve of receiver operating characteristics of SPSS17.0 software were used to evaluate the value of PCR-SBT and IMS-ELISA in HLA-B27 detection of AS patients. **Results** Among 120 cases of suspected patients with AS, the positive rates of HLA-B27 detected by PCR-SBT and IMS-ELISA were 45.83% (55/120) and 37.50% (45/120), respectively. There was statistical difference between the two methods in the HLA-B27 detection ( $\chi^2=59.455, P=0.000$ ). The sensibility and specificity of PCR-SBT were 96.36% and 96.92%, respectively. While the sensibility and the specificity of IMS-ELISA were 69.09% and 89.23%, respectively. Area under the curve of two methods were 0.966 and 0.792, respectively. **Conclusion** In comparison with IMS-ELISA, the sensibility and the specificity of PCR-SBT in HLA-B27 detection were higher in AS diagnosis, that is to say, PCR-SBT is better in HLA-B27 detection and AS diagnosis.

**Keywords:** polymerase chain reaction sequence-based typing (PCR-SBT); immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay (IMS-ELISA); human leukocyte antigen B27 (HLA B27); ankylosing spondylitis (AS)

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种慢性炎症性疾病,一般多累及脊柱及骶髂关节,治疗不及时易导致相应部位的功能障碍甚至引起严重后果<sup>[1]</sup>。研究发现,人类白细胞抗原 B27(human leukocyte antigen B27, HLA-B27)是 AS 早期诊断的重要参考指标<sup>[2]</sup>。流行病学研究也证实,90%~95%的 AS 患者 HLA-B27 呈阳性<sup>[3]</sup>。

因此,HLA-B27 抗原的检测对早期发现、早期治疗 AS 具有极其重要的作用。目前,国内 HLA-B27 检测的传统方法主要有淋巴细胞毒法、酶联吸附法、流式细胞术以及序列特异性引物聚合酶链反应等<sup>[4]</sup>。近年来,随着基因测序技术的应用,使对编码 HLA-B27 抗原的基因序列进行分析成为可能<sup>[5,6]</sup>。目前,聚合酶链反应直接测序(polymerase

\* 基金项目:南京军区医学科技课题资助项目(12MB015)。

作者简介:孙灵迪(1986—),男,硕士研究生,研究方向:分子免疫诊断,Tel:18305523929。

通讯作者:邵先安,男,副教授,硕士生导师,研究方向:分子/基因免疫,E-mail: XAShao@126.com。

chain reaction sequence-based typing, PCR-SBT) 法主要用于相关实验研究,采用该方法检测 HLA-B27 应用在 AS 临床诊断中鲜有报道。因此,我们就 PCR-SBT 法与磁珠酶联免疫分析 (immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay, IMS-ELISA) 法检测 HLA-B27 的敏感度和特异度做一比较,以期探讨其在 AS 临床诊断中的应用价值。

## 1 材料与方法

1.1 标本收集 2013 年 10 月~2014 年 8 月收集来自解放军第 123 医院骨科门诊就诊及住院疑似 AS 患者 120 例,AS 患者的诊断参照有关标准<sup>[7]</sup>。采集患者空腹外周静脉血 4 ml, EDTA 抗凝。120 例患者临床最终确诊为 AS 55 例,非 AS 65 例。

1.2 主要试剂和仪器 ASB27 检测试剂盒(磁酶联免疫法)购自广州菲康生物技术有限公司。TRNzolA+ 总 RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒、Marker I 均购自北京 TIANGEN 生物技术有限公司。DNM-9602 酶标分析仪(北京普朗),可调移液器、分光光度计、普通 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂),Gel Doc XR+凝胶成像分析仪(美国 BIO-RAD 公司)。

## 1.3 检测方法

1.3.1 IMS-ELISA 检测外周血 HLA-B27 表达:严格按照试剂说明书要求操作,于 450 nm 波长处测定吸光度 A 值。判断标准:A 值<0.4 为 HLA-B27 检测阴性,A 值≥0.4 为 HLA-B27 检测阳性。

1.3.2 PCR-SBT 检测外周血 HLA-B27 基因表达:首先取新鲜 EDTA 抗凝外周血液 250  $\mu$ l,严格按照试剂说明书操作步骤进行总 RNA 的提取。分光光度计测得 RNA 浓度(ng/ $\mu$ l)及确认  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  比值在 1.8~2.1 之间。提取的总 RNA 保存于-80℃超低温冰箱待用。然后将总 RNA 反转录成 cDNA,接着进行 PCR 扩增;扩增的引物是根据 GenBank 中编码 HLA-B27 的基因序列设计,上游引物:5'-GGTCCAAGACGAGGAGGTTC-3',下游引物:5'-CGTGGGACAGGAGGAATTAG-3',目的扩增片段预期长度为 177 bp,所设计的引物由上海 Sangong 公司合成。PCR 反应的具体步骤是:94℃预变性 5 min,94℃预变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,72℃延伸 5 min。待反应结束后分别取 5  $\mu$ l PCR 扩增产物以 2 g/dl 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统分析扩增产物目的片段是否在目标位置。最后取 PCR 结果进行测序(南京 Genscript 公司)。

1.4 统计学分析 应用 SPSS17.0 分析软件进行

数据分析,两种检测方法差异性的比较采用配对四格表  $\chi^2$  检验分析,两种检测方法的敏感度和特异度应用统计学 ROC 曲线分析的 AUC(area under curve, AUC)值进行比较, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PCR-SBT 法和 IMS-ELISA 法检测 HLA-B27 的比较 为探讨两种方法检测 HLA-B27 的临床价值,我们分别以 PCR-SBT 法和 IMS-ELISA 法对 120 例疑似 AS 患者的临床标本进行检测,结果显示:应用 PCR-SBT 法检测 HLA-B27 阳性率为 45.83% (55/120),IMS-ELISA 法检测 HLA-B27 的阳性率为 37.5% (45/120)。两种方法 HLA-B27 检测结果差异有统计学意义( $\chi^2 = 59.455, P=0.000$ )。

2.2 PCR-SBT 法和 IMS-ELISA 法检测 HLA-B27 在诊断 AS 中的比较 见表 1。进一步结合临床资料和 ROC 曲线的 AUC 分析两种方法在 AS 临床诊断中的价值,结果显示 PCR-SBT 法检测 HLA-B27 诊断 AS 的敏感度、特异度分别为 96.36% 和 96.92%,而 IMS-ELISA 法检测 HLA-B27 诊断 AS 的敏感度、特异度分别为 69.09% 和 89.23%。两种检测方法 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.966 和 0.792。提示 PCR-SBT 法检测 HLA-B27 在 AS 临床诊断中的价值优于 IMS-ELISA 法。

表 1 两种方法检测结果与临床 AS 确诊例数的比较

临床确诊	IMS-ELISA		PCR-SBT	
	+	-	+	-
+	38	17	53	2
-	7	58	2	63

3 讨论 强直性脊柱炎(AS)是一种慢性免疫炎症性疾病,其发病机制未明。AS 患者多见于青年男性,可导致脊柱强直、疼痛,严重者功能丧失,给患者及其家庭带来沉重的负担<sup>[8]</sup>。因此,有效的临床诊断对疾病的早期发现、及时治疗具有重要的意义<sup>[9]</sup>。研究发现,HLA-B27 在疾病发生、发展过程中起着重要作用,与其他常见病相比,HLA-B27 与 AS 发病保持很强的遗传关联性<sup>[10,11]</sup>,且 AS 患者中 HLA-B27 阳性者临床症状要比 HLA-B27 阴性者早出现数年<sup>[12,13]</sup>。因此,敏感且特异性强的 HLA-B27 检测方法是实现 AS 早期诊断的重要前提。

IMS-ELISA 是一种传统定性酶免疫测定方法,是利用磁性分离原理将免疫磁珠技术与

ELISA法相结合,在高品质磁珠上耦联HLA-B27抗体,与全血中白细胞上的HLA-B27抗原结合,再加入标记抗体,最终以测取吸光度A值反映HLA-B27抗原有无或强弱的实验技术。该方法操作相对简便,不需要特殊仪器,时间较短,是目前易被临床和患者接受的HLA-B27检测方法。但操作过程中人为因素多,特别是吸附的磁珠在洗涤过程中易丢失致使结果显示较低的吸光度值甚至阴性。另外,由于携带有HLA-B27基因型细胞表面不表达或低表达HLA-B27的某些表型,即HLA-B27抗原的缘故致使结果出现假阴性也是该检测方法的不足之一。我们的实验结果显示,IMS-ELISA法检测HLA-B27抗原的敏感度为69.09%,与国内相关研究结果相近<sup>[4]</sup>。

近几年,随着基因测序方法的应用增加<sup>[6,14]</sup>,PCR-SBT检测HLA基因也逐渐应用于临床,成为诊断AS最具前景的检测方法。我们的实验结果显示,PCR-SBT法检测HLA-B27的阳性率高于IMS-ELISA法;PCR-SBT法检测HLA-B27诊断AS的敏感度和特异度分别为96.36%和96.92%,也明显高于IMS-ELISA法。该方法还可对微量标本进行HLA-B27基因扩增,且标本可以长期保存<sup>[15]</sup>。另外,PCR-SBT法准确测得HLA-B27基因序列后,可以根据碱基序列确定HLA-B27基因亚型,对判断患者是否具有基因易感性和发病机制研究具有非常重要的现实价值<sup>[8]</sup>。虽然PCR-SBT检测所需时间稍长而且检测所需条件要求稍高,但该方法检测HLA-B27的优势明显。随着基因测序方法的普及和成本降低,PCR-SBT检测HLA-B27将有可能逐渐成为实验室辅助诊断AS的常规方法。

综上所述,PCR-SBT法检测HLA-B27的敏感度和特异度均优于传统IMS-ELISA法,在AS的辅助诊断和发病机制研究中具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Robinson PC, Brown MA. The genetics of ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2012, 38(3): 539-553.
- [2] Wallis D, Inman RD. Recognition of preclinical and early disease in axial spondyloarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2014, 40(4): 685-697.
- [3] Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, et al. Global prevalence of ankylosing spondylitis [J]. Rheumatology, 2014, 53(4): 650-657.
- [4] 徐炳燕, 黎四平, 彭琪, 等. 三种不同方法检测HLA-B27的比较 [J]. 吉林医学, 2014, 38(22): 4845-4846.
- [5] Daroy ML, Lopez JS, Torres BC, et al. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(5): 776-779.
- [6] 王中梅, 刘娜, 龚治尹, 等. 人类白细胞抗原HLA A/C座位间基因重组的发现 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(5): 107-111.
- [7] Raychaudhuri SP, Deodhar A. The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis [J]. J Autoimmun, 2014(48-49): 128-133.
- [8] Zhang Z, Dai D, Yu K, et al. Association of HLA-B27 and ERAP1 with ankylosing spondylitis susceptibility in Beijing Han Chinese [J]. Tissue Antigens, 2014, 83(5): 324-329.
- [9] Sieper J, Braun J. How important is early therapy in axial spondyloarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2012, 38(3): 635-642.
- [10] Yang T, Duan Z, Wu S, et al. Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis [J]. Mod Rheumatol, 2014, 24(1): 150-161.
- [11] Emmungil H, Erdogan M, Kalfa M, et al. Autoimmune thyroid disease in ankylosing spondylitis [J]. Clin Rheumatol, 2014, 33(7): 955-961.
- [12] Sorrentino R, Boeckmann RA, Fiorillo MT. HLA-B27 and antigen presentation: At the crossroads between immune defense and autoimmunity [J]. Mol Immunol, 2014, 57(1): 22-27.
- [13] Robinson PC, Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis [J]. Mol Immunol, 2014, 57(1): 2-11.
- [14] 刘锋, 粟玉萍, 代敏, 等. 湖南省岳阳地区汉族人群造血干细胞捐献志愿者HLA-A\*02亚型等位基因分布 [J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 49-52.
- [15] Liu F, SU YP, Dai M, et al. Distribution subtype HLA-A\*02 allele of hematopoietic stem cell donation volunteers in hunan province yueyang han population [J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(3): 49-52.
- [15] 沈静, 张肖, 瑜刚, 等. SSP-PCR法与流式细胞仪检测HLA-B27的相关性比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(1): 70-71, 74.
- Shen J, Zhang X, Yu G, et al. Comparison on correlation of SSP-PCR and flow cytometry for HLA-B27 detection [J]. Int J Lab Med, 2014, 35(1): 70-71, 74.

收稿日期: 2014-12-27

修回日期: 2015-01-28