

变应原特异性 IgE 检测方法之比较

郑青 郭胤仕

【摘要】 血清特异性 IgE(sIgE)的测定在变应原体外诊断中占有重要地位。近些年新的变应原体外诊断技术不断涌现,但每个方法都有其自身的优点与不足。本文就目前我国常用的 sIgE 检测方法进行介绍并对各方法间对比研究的结果进行综述,以期临床工作者解读检测结果提供些许参考。(中华检验医学杂志,2016,39:814-816)

【关键词】 变应原; 免疫球蛋白 E; 酶联免疫吸附测定; 免疫印迹法; 免疫测定

Comparison of detection methods of allergen specific IgE Zheng Qing, Guo Yinshi. Department of Allergy, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China
Corresponding author: Guo Yinshi, Email: guoyinshi@126.com

【Abstract】 The determination of serum specific IgE (sIgE) plays an important part in the diagnosis of allergen in vitro, which has been widely used. All kinds of diagnostic methods have both advantages and disadvantages. The sIgE determination in this paper, commonly used at present in China was introduced and the comparative study among the methods in recent years was reviewed, which would help physicians to understand the test results correctly. (Chin J Lab Med, 2016, 39: 814-816)

【Key words】 Allergens; Immunoglobulin E; Enzyme-linked immunosorbent assay; Immunoblotting; Immunoassay

过敏性疾病不仅常见,且发病率逐年上升,已成为全球重要的公共卫生问题^[1]。由免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE) 介导的 I 型过敏反应(变态反应)疾病,可通过检测血清变应原特异性 IgE (specific IgE, sIgE) 或皮肤试验,并结合病史与临床表现,基本明确变应原,进行针对性防治。

sIgE 检测是确定 I 型变态反应变应原最常用的体外检测方法,是过敏性疾病诊断的重要组成部分^[2]。它较体内皮肤试验安全性高,不受对症用药、病情程度等限制,结果客观、可定量、特异性高等,但需专门的仪器,费用较高,部分方法灵敏度较低^[2-3]。

血清 IgE 检测技术起步于 1967 年报道的放射性变应原吸附试验,但它存在放射性应用限制^[4]。近几十年来,随着标记免疫技术的发展,新的变应原体外诊断技术不断涌现。目前 sIgE 检测方法繁多,标准不一,敏感度与特异度各异。下面对近年临床 sIgE 的常用检测方法进行简介及比较,以期检测结果的深入解读提供些许参考。

一、血清变应原 sIgE 常用检测方法

1. ELISA:1971 年 Engvall 和 Perlmann^[5] 和 Van Weemen 和 Schuurs^[6] 分别发表了首创的以酶作标记物的免疫测定。变应原固相载体一般为聚苯乙烯或聚氯乙烯,标记酶常为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶,底物常用邻苯二胺或四甲基联苯胺,借助酶对底物的催化反应产生有颜色的产物,再通过测定颜色深浅程度来计算 sIgE 的含量。

2. 膜条酶联免疫吸附法:在传统 ELISA 的基础上采用了高效级联抗体放大技术。优势:固相载体为三维立体、疏松多孔的滤纸结构,可包被更多变应原以提高灵敏性;一张纤维膜条上包被多种变应原,可一次检测多种变应原 sIgE;反应后膜条具有良好稳定性,原始结果可较长期保存^[7]。

3. 酶联免疫捕获法:也是传统 ELISA 的改进。它将抗 IgE 抗体包被在固相载体上,实验时用以捕获血清中的 sIgE,显色体系为酶标变应原。此法可消除血清中其他免疫球蛋白的干扰,提高 sIgE 检测的灵敏度^[8]。

ELISA 及其改良法是我国目前 sIgE 检测应用最为普遍的方法,通量大,价格适中,特异性接近全定量水平,适合我国基层医院使用。但 ELISA 仅是定性检测,改良后达到半定量检测水平,敏感性不够

理想。

4. 免疫印迹法:一种将高分辨率凝胶电泳和免疫化学分析技术相结合的杂交技术。它将经过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的变应原蛋白预先转移到固相载体上,检测时先与血清反应,再与酶或同位素标记的第二抗体反应,经过底物显色或放射自显影以检测 sIgE 的含量^[9]。

该法用于 sIgE 检测,通量大,价格适中,但仅能定性或半定量,特异性及灵敏度均不够理想。

5. 化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA):将高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫分析技术相结合,是继放射免疫分析、酶联免疫分析、荧光免疫分析和时间分辨荧光免疫分析之后发展起来的一项新的免疫测定技术^[10]。它包含 2 部分:化学发光分析系统免疫反应系统。CLIA 可实现 sIgE 的全定量检测,灵敏度高,反应速度快^[11]。

6. 荧光酶联免疫分析法(fluorescence enzyme immunoassay, FEIA):即 ImmunoCAP 变应原检测系统,属生物发光免疫分析。它构建了荧光素-荧光素酶发光体系并与免疫分析技术相结合,用特定的 β -半乳糖苷酶标记单克隆二抗,作用于底物 4-甲基伞桂- β -D 半乳糖苷后产生荧光,再用荧光信号测量仪测量荧光强度即可计算出 sIgE 的含量^[12]。其另一项核心技术是以具备多孔性、弹性和亲水性的帽状纤维素粒 CAP 为固相载体,可吸附更多变应原并增加反应接触面积,是普通载体的数倍或数十倍。

FEIA 是目前国际公认的体外检测 sIgE 的金标准,可真正实现全定量的结果判读,特异度、敏感度、可重复性等都较为理想^[12-13],但费用较昂贵。

7. 蛋白质芯片技术:是近年来在生命科学领域中迅速发展起来的一项生物芯片技术,能同时提供成千上万个蛋白的信息,具备高通量、微型化和自动化等特点。目前,该技术亦可用于 sIgE 的检测^[14],其原理是对固相载体进行特殊的化学处理,使抗原抗体反应体现出良好的特异性,也让免疫检测更加方便快捷。

8. 组分解析诊断(component resolved diagnostics, CRD)^[15]:指利用天然变应原组分的提取和重组技术,从分子层面上来辨别变应原致敏分子的诊断方式。CRD 的发展使 sIgE 检测的特异性得到了根本性变革,可帮助识别变应原中真正的致敏组分和交叉反应组分,不仅利于过敏性疾病的临床诊断和风险评估,对变态反应免疫机制的研究和

特异性免疫治疗的发展都是极大的促进。

二、常用检测方法间的对比研究

1. ELISA 与 FEIA:彭洁雅等^[7]比较了膜条酶联免疫吸附法与 ImmunoCAP 对 9 种常见变应原的 sIgE 检测结果,2 种方法的总体符合率为 85.6%,2 种方法定性结果一致性高。

Lee 等^[16]对 260 例韩国过敏性疾病患者,用酶联免疫分析和 ImmunoCAP,比较了 7 种吸入物,5 种食物和 4 种微生物变应原的 sIgE,结果除艾蒿和链格孢菌,大多数变应原 2 种方法间的一致性为中度至显著($\kappa=0.713 \sim 0.898, P < 0.001$)。

2. 免疫捕获法与 FEIA:王和平等^[17]对 183 例过敏性疾病患儿,用 ImmunoCAP 和免疫捕获法进行了 6 种常见变应原 sIgE 检测,结果 2 种方法检测 sIgE 的一致性:尘螨 > 虾 > 牛奶 > 鸡蛋白和花生;尘螨 sIgE 水平 ImmunoCAP 较高($P < 0.05$),而食物 sIgE 水平 ImmunoCAP 较低($P < 0.05$)。

彭洁雅等^[18]对 151 例过敏性疾病患者,用免疫捕获法和 ImmunoCAP,检测了 4 种常见变应原 sIgE,结果显示 2 种方法对屋尘螨、德国小蠊、花生 sIgE 的定性检测结果具有良好的一致性,牛奶 sIgE 的定性结果不存在一致性。sIgE 定量分级结果的一致性:花生 > 屋尘螨 > 德国小蠊 > 牛奶。如以 ImmunoCAP 为“金标准”,免疫捕获法对 4 种变应原 sIgE 的检测敏感度都比较好,但特异度并不十分理想。

郑佩燕等^[19]对 251 例过敏性疾病患者,用免疫捕获法和 ImmunoCAP 进行 9 种变应原 sIgE 检测,结果显示 2 种系统对吸入物 sIgE 定量检测结果一致性良好($P < 0.05$),sIgE 相关性:屋尘螨 > 粉尘螨 > 德国小蠊 > 狗毛屑;而对食物 sIgE 检测结果的相关度较吸入物低,sIgE 相关性:蟹 > 虾 > 花生 > 鸡蛋 > 牛奶。

3. 免疫印迹法与 FEIA:张丹浩等^[20]对随机抽取的 111 份过敏疾病患者标本,用 ImmunoCAP 和免疫印迹法同时检测 sIgE,结果显示 2 种方法对 12 种变应原 sIgE 检测结果有很高的符合率,其中屋尘、矮豚草、鸡蛋白、蛋黄、腰果、花生、黄豆、小麦符合率为 100%,二者一致性极好($\kappa > 0.75$)。

王美玲等^[21]对 1 035 份血清,用斑点免疫印迹法与 ImmunoCAP 进行 sIgE 检测,结果显示 18 种变应原用两种方法定性检验结果总体符合率大于 90%, κ 系数均 > 0.74。

4. CLIA 与 FEIA:Graham 等^[22]对 37 例鸡蛋过

敏儿童,用 CLIA 和 ImmunoCAP 检测鸡蛋 sIgE,结果显示两种方法呈线性关联($r=0.864$)。

Villalta 等^[23]对 195 例过敏性疾病患者,用 CLIA 和 ImmunoCAP 进行 9 种常见变应原 sIgE 检测,结果显示两种方法的总体一致性为 98.6%。两种方法呈中高度正相关。

5. 蛋白质芯片技术与 FEIA:路雪艳等^[24]采集了 456 份标本,用芯片法 E6C(荧光免疫吸附分析)与 ImmunoCAP 对 6 种变应原 sIgE 进行检测,结果对屋尘螨、猫皮屑、鸡蛋白、蟹,2 种方法的测定结果完全一致,而虾与蚌的检测一致性偏低,认为法检测 sIgE 具有高度一致性。

三、展望

正确诊断变应原是过敏性疾病防治工作中的关键,作为目前体外诊断变应原的最主要方式,血清 sIgE 检测方法的改进越来越受到研究者的广泛重视。近年来,以化学发光、高通量芯片、组分检测为代表,变应原体外诊断技术发展迅速。相信在不久的将来,不仅是针对 sIgE,针对非 IgE 介导的变应原诊断技术也必将陆续问世,且会向更特异、更灵敏、更快速、更便宜、高通量的检测方向快速发展,从而为解决困扰世界的过敏性疾病诊断难题翻开新的篇章。

参 考 文 献

- [1] Pawankar R. Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action[J]. World Allergy Organ J,2014, 7(1): 12. DOI: 10.1186/1939-4551-7-12.
- [2] Fontaine C, Mayorga C, Bousquet PJ, et al. Relevance of the determination of serum-specific IgE antibodies in the diagnosis of immediate beta-lactam allergy[J]. Allergy, 2007, 62(1): 47-52. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01268.x.
- [3] AAAI. The use of vitro tests of IgE antibody in the specific diagnosis of IgE-mediated disorders and in the formulation of allergen immunotherapy[J]. J Allergy Clin Immunol, 1992, 90(2): 263-267. DOI: 10.1016/0091-6749(92)90081-C.
- [4] Wide L, Bennich H, Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergy antibodies [J]. Lancet, 1967, 2(7526): 1105-1107. DOI: 10.1016/S0140-6736(67)90615-0.
- [5] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G [J]. Immunochemistry, 1971, 8(9): 871-874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- [6] Van Weemen BK, Schuur AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates [J]. FEBS Lett, 1971, 15(3): 232-236. DOI: 10.1016/0014-5793(71)80319-8.
- [7] 彭洁雅,孙宝清,郑佩燕.膜条酶联免疫法检测特异性 IgE 抗体的比对分析[J].中国实用医药,2014,9(10): 88-90. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2014.10.116.
- [8] Falagiani P, Mistrello G, Rapisarda G, et al. Specific IgE density

- assay: A new reverse enzyme allergosorbent test - based procedure for the quantitative detection of allergen-specific IgE [J]. Allergol Int, 1999, 48(3): 199-207. DOI: 10.1046/j.1440-1592.1999.00135.x.
- [9] Kurien BT, Scofield RH. Western blotting [J]. Methods, 2006, 38(4): 283-293. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007.
 - [10] 黄伟,陈海燕.化学发光免疫分析的研究进展[J].数理医药学杂志,2015(5): 747-748. DOI: 10.3969/j.issn.1004-4337.2015.05.066.
 - [11] 李振甲,应希堂,马世俊.化学发光免疫分析技术的研究现状与展望[J].国际检验医学杂志,2006, 27(1): 95-96. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2006.01.036.
 - [12] Johansson SG. ImmunoCAP Specific IgE test: an objective tool for research and routine allergy diagnosis [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2004, 4(3): 273-279. DOI: 10.1586/14737159.4.3.273.
 - [13] 沃纳·埃伯,博格·克拉克.使用酶联免疫捕获法检测抗过敏原 IgE——不同方法间和实验室间的质量评估 [J]. 检验医学, 2006, 21(b10): 11-18. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2006.z1.004.
 - [14] Pawliczak R. New horizons in allergy diagnostics and treatment [J]. Pol Arch Med Wewn, 2013, 123(5): 246-250.
 - [15] Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, et al. A WAO-ARIA-GA²LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics [J]. World Allergy Organ J, 2013, 6(1): 17. DOI: 10.1186/1939-4551-6-17.
 - [16] Lee JH, Park HJ, Park KH, et al. Performance of the PROTIATM Allergy-Q[®] System in the Detection of Allergen-specific IgE: a comparison with the immunoCAP[®] system [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2015, 7(6): 565-572. DOI: 10.4168/aaair.2015.7.6.565.
 - [17] 王和平,郑跃杰,邓继贵,等.2种定量检测方法在儿童血清变应原检测中的相关性[J].中华实用诊断与治疗杂志,2013, 27(2): 160-161.
 - [18] 彭洁雅,杨小华,孙宝清.2种方法检测常见过敏原特异性 IgE 的比对分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(12): 1649-1650. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.062.
 - [19] 郑佩燕,孙宝清,黄惠敏,等.采用酶联免疫捕获法和荧光酶联免疫吸附法检测过敏原 IgE 抗体的比较分析 [J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(5): 595-598.
 - [20] 张丹浩,王海燕,杨晓莉,等. UniCAP100 和 Allergy Screen 两种过敏原检测方法的一致性研究 [J]. 生物医学工程与临床, 2012, 16(4): 382-384. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7090.2012.04.018.
 - [21] 王美玲,冯珍如,李志艳,等.斑点免疫印迹法检测变应原特异性 IgE 抗体的比对分析 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(3): 430-432.
 - [22] Graham F, Bégin P, Paradis L, et al. Comparison of ImmunoCAP and Immulite serum specific IgE assays for the assessment of egg allergy [J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2016, 12: 29. DOI: 10.1186/s13223-016-0134-0.
 - [23] Villalta D, Da Re M, Conte M, et al. Allergen component specific IgE measurement with the ImmuliteTM 2000 system: diagnostic accuracy and intermethod comparison [J]. J Clin Lab Anal, 2015, 29(2): 135-141. DOI: 10.1002/jcla.21741.
 - [24] 路雪艳,王晶,张春雷.新型蛋白质芯片与荧光酶联免疫法检测过敏原特异性 IgE 的对比研究 [J]. 临床皮肤科杂志, 2016, 45(3): 164-167. DOI: 10.16761/j.cnki.1000-4963.2016.03.004.

(收稿日期:2016-07-04)

(本文编辑:武昱)