

微阵列 ELFA 和 IBT 2 种过敏原筛查方法临床应用评价

赵凌旭, 赵 婕, 胡晓波

(上海中医药大学附属龙华医院检验科, 上海 200032)

摘要: **目的** 比较微阵列酶联免疫荧光法 (ELFA) 和免疫印迹法 (IBT) 在过敏原筛查中的差异。**方法** 选取225例于上海中医药大学附属龙华医院皮肤科就诊患者, 采用IBT和微阵列ELFA进行吸入性及食物性过敏原特异性IgE (sIgE) 检测。**结果** 在225例患者中, IBT阳性51例, 阳性率为22.7%, 抗原阳性率从高到低位于前4位的依次为屋尘螨/粉尘螨、鲑鱼/龙虾/扇贝、屋尘、猫毛; 微阵列ELFA阳性82例, 阳性率为36.4%, 抗原阳性率从高到低位于前4位的依次为螨虫组合 (粉尘螨/屋尘螨/热带无爪螨)、蟑螂组合 (德国蟑螂/亚洲蟑螂)、蟹、猫毛。2种方法对尘螨、蟑螂、猫毛、海鱼组合、蟹的分级一致性Kappa值分别为38.2%、6.04%、32.1%、22.2%、13.4%。**结论** 微阵列ELFA与IBT在临床检测中有较大差异, 微阵列ELFA包含更多的过敏原, 具有更高的阳性率, 2种方法应互为补充以提高阳性率。

关键词: 过敏原筛查; 特异性IgE; 微阵列酶联免疫荧光法; 免疫印迹法

Evaluation of microfluidic cartridge ELFA and IBT for allergen testing ZHAO Lingxu, ZHAO Jie, HU Xiaobo.
(Department of Clinical Laboratory, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To evaluate the performance of microfluidic cartridge enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA) and immunoblotting test (IBT) for allergen testing. **Methods** A total of 225 patients from Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Longhua Hospital Dermatological Department were enrolled. Allergen-specific IgE (sIgE) was determined by IBT and microfluidic cartridge ELFA. **Results** Specific allergens had been determined in 51 cases by IBT, the positive rate was 22.7%, and the top 4 common allergens were dermatophagoides pteronyssinus/dermatophagoides farinae, codfish/lobster/scallop, house dust and cat fur. Specific allergens had been determined in 82 cases by microfluidic cartridge ELFA, the positive rate was 36.4%, and the top 4 common allergens were mite mix (dermatophagoides farinae/dermatophagoides pteronyssinus/blomia tropicalis), cockroach mix (blattella germanica/blattella asahinai), crab and cat fur. The Kappa values for the consistency of the 2 methods were 38.2%, 6.04%, 32.1%, 22.2% and 13.4% for mite mix, cockroach mix, cat fur, seafish mix and crab. **Conclusions** There is difference between IBT and microfluidic cartridge ELFA for allergen testing. Comparing with IBT, there are more allergens and higher positive rate of microfluidic cartridge ELFA. The 2 methods should be a complement for each other.

Key words: Allergen testing; Specific IgE; Microfluidic cartridge enzyme-linked fluorescent immunoassay; Immunoblotting test

过敏性疾病是常见慢性病, 发病率逐年上升^[1]。常见症状有荨麻疹、特应性湿疹、过敏性鼻炎等, 严重者可引起休克及死亡。过敏体质不足以引发过敏症状, 须接触到环境中的过敏原才会产生过敏症状, 因此过敏原筛查是过敏性疾病诊断、预防和治疗的重要环节^[2], 快捷、简便、成本低廉、性能优秀的特异性IgE (specific IgE, sIgE) 检测试剂盒在过敏原筛查中尤为重要。本研究分别

采用微阵列酶联免疫荧光法 (enzyme-linked fluorescent immunoassay, ELFA) 和免疫印迹法 (immunoblotting test, IBT) 对吸入性及食物性过敏原sIgE进行测定, 分析2种筛查方法间的差异和临床价值, 为过敏性疾病的治疗追踪和流行病学调查提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

选取2016年3—6月上海中医药大学附属龙

作者简介: 赵凌旭, 男, 1986年生, 学士, 主管技师, 主要从事临床免疫学检验工作。

通信作者: 胡晓波, 联系电话: 021-64385700。

华医院皮肤科就诊的225例门诊及住院患者，经诊断后行吸入性及食物性过敏原sIgE检测，其中男91例、女134例；门诊118例、住院107例；年龄8~84岁，≤18岁13例、19~60岁133例、>60岁79例。225例患者分别诊断为湿疹（78例）、过敏性皮炎（55例）、荨麻疹（38例）、牛皮癣（26例）、疱疹（7例）、痒疹（2例）、痤疮（2例）、银屑病（2例）、其他皮肤症状（15例）。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 常规采集患者静脉血3 mL，以1 000×g离心10 min取血清待测。

1.2.2 过敏原检测方法 台湾洹艺化学发光分析仪和百敏析ELFA sIgE检测试剂盒，该试剂能检测40种过敏原，包括19种吸入性过敏原和21种食物性过敏原。英国欧蒙EUROBlotOne自动免疫印迹分析仪和IBT sIgE检测试剂盒，该试剂能检测17种过敏原，包括10种吸入性过敏原和7种食物性过敏原。

1.2.3 结果判定 百敏析ELFA sIgE检测试剂盒以1 AU（Class I）为临界值，检测结果≥1 AU为阳性、<1 AU为阴性。欧蒙IBT sIgE检测试剂盒以0.35 kU/L为临界值，检测结果≥0.35 kU/L为阳性、<0.35 kU/L为阴性。2种方法检测结果分级标准见表1。

表1 微阵列ELFA和IBT检测结果的分级标准

微阵列ELFA (AU)	IBT (kU/L)	分级
<1	<0.35	阴性
1~<2	0.35~<0.70	I
2~<4	0.70~<3.50	II
4~<8	3.50~<17.50	III
8~<16	17.50~<50.00	IV
16~<32	50.00~<100.00	V
≥32	≥100.00	VI

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析，2种检测方法分级比较采用Kappa一致性检验，Kappa值越高，说明一致性程度越高。

2 结果

2.1 微阵列ELFA检测结果分析

微阵列ELFA检测sIgE阳性82例，阳性率为36.4%，其中男40例、女42例。阳性率从高到低位于前4位的依次为螨虫组合（粉尘螨/屋尘螨/热带无爪螨）、蟑螂组合（德国蟑螂/亚洲蟑螂）、蟹、猫毛。见表2。

2.2 IBT检测结果分析

IBT检测sIgE阳性51例，阳性率为22.7%，其中男20例、女31例。阳性率从高到低位于前4位的

依次为屋尘螨/粉尘螨、鳕鱼/龙虾/扇贝、屋尘和猫毛。见表3。

表2 微阵列ELFA sIgE部分检出结果

组别	阳性	阳性结果分级（例）					
	[例（%）]	I	II	III	IV	V	VI
吸入性过敏原							
屋尘螨	54（24.00）	11	7	2	10	11	13
粉尘螨	65（28.90）	15	14	10	14	1	11
热带无爪螨	16（7.11）	6	4	1	1	0	4
德国蟑螂	10（4.44）	8	2	0	0	0	0
亚洲蟑螂	13（5.78）	8	3	1	1	0	0
猫毛	9（4.00）	5	2	0	1	0	1
狗毛皮屑	6（2.67）	4	1	0	0	0	1
食物性过敏原							
花生	4（1.78）	3	0	1	0	0	0
黄豆	5（2.22）	4	1	0	0	0	0
蟹	12（5.33）	7	3	1	0	0	1
虾	4（1.78）	3	0	0	0	1	0
牛奶	5（2.22）	3	1	1	0	0	0

表3 IBT sIgE部分检出结果

组别	阳性 [例 (%)]	阳性结果分级 (例)					
		I	II	III	IV	V	VI
吸入性过敏原							
屋尘螨/粉尘螨	37 (16.40)	3	8	11	9	5	1
屋尘	9 (4.00)	4	2	1	2	0	0
猫毛	6 (2.67)	1	1	0	1	3	0
狗上皮	2 (0.89)	1	0	0	0	1	0
蟑螂	1 (0.44)	1	0	0	0	0	0
食物性过敏原							
花生	3 (1.33)	2	1	0	0	0	0
黄豆	3 (1.33)	2	1	0	0	0	0
鳕鱼/龙虾/扇贝	10 (4.44)	3	2	4	1	0	0
虾	5 (2.22)	1	2	1	0	1	0
蟹	2 (0.89)	1	0	0	0	1	0

2.3 微阵列ELFA和IBT检测结果的比较

微阵列ELFA和IBT同时检出过敏原46例，仅微阵列ELFA检出36例，仅IBT检出5例，微阵列ELFA总体阳性率高于IBT。将2种方法的尘螨（屋尘螨/粉尘螨）、蟑螂、猫毛、海鱼组合、蟹的分级一致性进行比较（其他过敏原因阳性分级例数较少，故不做比较），Kappa值分别为38.2%、6.04%、32.1%、22.2%、13.4%。

3 讨论

血清sIgE检测主要有酶联免疫捕获法、IBT和ELFA等，本研究采用常用的IBT与近期的新技术——微阵列ELFA进行比较。微阵列ELFA以微流控芯片为载体进行两步骤酶联免疫吸附试验，反应结束后通过高敏感性的成像CCD系统截取荧光反应图像，并处理芯片上的一组标准信号计算出校正曲线，得到sIgE的半定量结果。微阵列ELFA芯片内建质控标准曲线，具有特异性高、敏感性强的特性，

在过敏原筛查中具有重要的应用前景^[3]。

本研究结果显示,微阵列ELFA检测sIgE的阳性率高于IBT,这可能是因为前者包被有更多和更细分化的抗原之故。2种方法对吸入性过敏原阳性率最高的均是螨虫组合,表明尘螨滋生于人类居住环境,是过敏性疾病最常见的过敏原,与国内相关研究结果^[4]相一致。HUGHES^[5]的研究表明,居室环境滋生的螨类涉及23种,常见的除屋尘螨、粉尘螨外,还包括热带无爪螨、腐食酪螨等。不同地区优势螨种不同,引起过敏反应的螨种亦不同,在我国温暖潮湿的南方地区,如海口、金华等地热带无爪螨为优势螨种^[6-7]。虽然有研究指出热带无爪螨同屋尘螨和粉尘螨的变应原存在明显的交叉反应,86%对尘螨过敏的患者对热带无爪螨皮肤点刺试验亦呈阳性反应^[8],但包被纯化的热带无爪螨变应原对热带和亚热带地区的螨虫进行过敏筛查仍有重要意义^[9]。食物性过敏原中海鱼组合(鲑鱼/龙虾/扇贝)在IBT有更高的阳性率,而蟹在微阵列ELFA中有更高的阳性率,这可能与2种方法抗原表位及其来源不同有关,表明2种试剂盒在食物性过敏原检测中有不同优势。有研究表明,海产品中的主要过敏原是小清蛋白及原肌球蛋白,但不同的抽提方法会使蛋白组分产生较大变化,加上地区、年龄等饮食习惯因素使得不同试剂盒的调查结果具有较大差异^[10]。另外,2种方法检测食物性过敏原时均存在一定的局限性,有些具有过敏史的患者,检测体内sIgE时可能低于检测范围而无法得出阳性结果,这是因为这些体内抗体所辨识的抗原可能是食物经烹饪、加工、消化过程中或在结构改变后才会显现出来,因此这些抗原并不存在于这些用来检测患者的食物原料中^[11]。由此可见,常见食物过敏原生化及分子生物学的研究、食品加工对过敏原免疫原性的影响、试剂盒中食物过敏原的标准化、将加工处理的食物过敏原蛋白与生鲜食物过敏原蛋白进行细分是获得更加客观、准确的检验结果仍需解决的问题。

本研究将2种方法部分过敏原阳性分级结果的一致性也做了初步比较。从结果来看,2种方法的几种过敏原阳性分级一致性较差($Kappa$ 值 $\geq 75\%$ 说明二者一致性程度较高; $Kappa$ 值 $< 40\%$ 说明二者一致性程度较差)。分析原因,可能与试剂盒包被过敏原的标准差异有关,还可能是因为此次研究的阳性病例不够多,对统计结果有一定影响。这也是本研究的不足之处。

我国幅员辽阔,不同地区的气候环境及饮食习惯造成过敏原种类具有较大差异,如沿海地区食物性过敏原中海鱼组合、蟹、虾等阳性率要高于内陆地区,气候闷热潮湿地区螨虫和真菌类过敏原阳性率要高于气候干燥地区^[12]。因此,利用成本低廉、包被抗原多且性能优秀的方法来进行区域性过敏原流行病学调查,对过敏性疾病的诊断、治疗和预防有重大意义。通过大样本分析,亦可进一步优化试剂盒抗原种类以更符合区域性流行病学特点。在临床过敏原筛查中切忌片面,应合理应用多种方法以提高过敏原检出阳性率^[13]。

参考文献

- [1] DOWNS S H, MARKS G B, SPORIK R, et al. Continued increase in the prevalence of asthma and atopy[J]. Arch Dis Child, 2001, 84 (1): 20-23.
- [2] 张春梅, 邓云峰, 赖荷, 等. 过敏性疾病患者多种过敏原特异性IgE分析[J]. 广东医学, 2015, 33 (7): 1037-1039.
- [3] 李晓琼, 杨春华, 潘邵武, 等. 面向POCT应用的微流控芯片技术综述[J]. 世界复合医学, 2015, 1 (1): 30-37.
- [4] 杨德平. 450例患者过敏原体外检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 37 (10): 1453-1454.
- [5] HUGHES A M. The mites of stored food and house[M]. London: Her Majesty's Stationery Office, 1976: 1-400.
- [6] 饶朗毓, 林英姿, 王永存, 等. 海口市大学生宿舍尘螨孳生情况的调查[J]. 海南医学院学报, 2006, 12 (2): 124-127.
- [7] 赵仕勇, 韦翊, 李小兵, 等. 金华哮喘患儿的尘螨过敏测定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25 (5): 432-433.
- [8] 孙劲旅, 陈军, 张宏誉. 尘螨过敏原的交叉反应性[J]. 昆虫学报, 2006, 57 (4): 695-699.
- [9] 吴桂华, 杨峰巍, 孙新, 等. 热带无爪螨与相关变应原[J]. 热带病与寄生虫学, 2009, 7 (1): 55-58.
- [10] 张晴晴, 吴子健, 胡志和, 等. 常见食物过敏原结构稳定因素与致敏性的关系研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36 (3): 217-222.
- [11] 杨勇, 阚建全, 赵国华, 等. 食物过敏与食物过敏原[J]. 粮食与油脂, 2004, 18 (3): 43-45.
- [12] 胡雯, 王红娟, 关猛猛, 等. 118例变应性皮肤病过敏原及总IgE水平的实验研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2015, 14 (2): 104-106.
- [13] 廖春盛, 戴小波, 温小平. 440例患者食物过敏原特异性IgE抗体浓度分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8 (11): 1297-1298.

(收稿日期: 2016-09-19)

(本文编辑: 姜 敏)