技术与方法 文章编号：0253-3626（2011）05-0595-04

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

郑佩燕，孙宝清，黄惠敏，韦妮莉，李　靖，陈德晖
（呼吸疾病国家重点实验室、广州呼吸疾病研究所、广州医学院第一附属医院，广州　510120）

【摘　要】目的：对酶联免疫捕获法的 ALLERG-O-LIQ 系统和荧光酶联免疫吸附法的 ImmunoCAP 系统检测过敏原特异性 IgE 抗体的一致性进行对比观察。方法：研究对象为我院 2008～2010 年就诊于变态反应科、儿科的病例，采用 2 种不同的酶联免疫吸附法检测屋尘螨（D1）、粉尘螨（D2）、狗毛屑（E5）、德国小蠊（I6）、鸡蛋（F1）、牛奶（F2）、花生（F13）、蟹（F23）、虾（F24），共 9 种过敏原特异性 IgE 抗体检测，将 2 种检测结果进行一致性检验和线性回归分析。结果：共进行了 520 项次过敏原特异性 IgE 检测，两种系统对吸入性过敏原特异性 IgE 抗体定量检测结果一致性良好（$P<0.05$），特异性 IgE 结果：屋尘螨＞粉尘螨＞德国小蠊＞狗毛屑；而对食物过敏 SIgE 抗体检测结果的相关度较吸入过敏原低，特异性 IgE 结果：蟹＞虾＞花生＞鸡蛋＞牛奶。结论：ALLERG-O-LIQ 系统和 ImmunoCAP 系统都属于新一代易操作的过敏原检测系统。2 种检测方法一致性良好，结果偏离度较小，呈线性回归分布。因此，对于评估血清中的特异性 IgE 来说，ALLERG-O-LIQ 系统是一个可靠的、经济的临床诊断系统。其检测的结果与 ImmunoCAP 系统的检测结果比较相符合。

【关键词】酶联免疫捕获法；过敏原检测；过敏原特异性 IgE 抗体
【中国图书分类法分类号】R56　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-03-29

Capture ELISA and FEIA assay for allergen-specific IgE antibody: a comparative analysis

ZHENG Pei-yan, SUN Bao-qing, HUANG Hui-min, WEI Ni-li, LI Jing, CHEN De-hui
(*SKLRD, Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: Enzymes immune to the capture of the law ALLERG-O-LIQ system and enzyme immune to the fluorescence detection method ImmunoCAP system allergic IgE the specifisity antibodies of observation. in contrast. *Methods*: The object of study is for the patient's cases 2008-2010 in allergies and pediatrics departments. Adopt two different enzymes immune to the original specificity IgE antibodies detect. There are 9 kinds of allergic, consist of D. pteronyssinus (D1), Dermatophagus farinae (D2), Dog dander (E3), Blattella Germanica (I6) Egg (F1), Milk (F2), Peanuts (F13), Crub (F23), Shrimp (F24). And the two inspection results in linear regression tests and consistency. *Results*: There are 520 times allergic to the original specificity IgE detect. Two systems for inhaling of the antibodies specificity IgE an allergy test results of consistency good ($P<0.05$), specificity IgE result: D. pteronyssinus > Dermatophagus farinae > Blattella Germanica > Dog dander, but with food allergy test results of the antibodies sige relevance more into allergic to the low, Specificity IgE Result: Crub>Shrimp> Peanuts>Egg>Milk. *Conclusion*: ALLERG-O-LIQ syaterm and ImmunoCAP systerm both belong to the new generation is allergic to the operation of the detection system, Two detection methods consistent, from a relatively small, a linear regression distribution, So, with the serum Specificity IgE systerm of ALLERG-O-LIQ is a reliable, economic and clinical diagnosis. The test results and ImmunoCAP system compatible test results.

【Key words】capture ELISA; allergen diagnostics; specific IgE Antibody

变态反应疾病是以过量免疫球蛋白 E（IgE）抗体产生为特征的疾病[1]。通常主要是指Ⅰ型变态反应，根据患者的既往过敏史可以判断出一些过敏疾病的严重程度，然而由于患者过敏史是复杂的，并且牵涉接触较多过敏原。因此，明确过敏原是诊断与治疗变应性疾病的首要问题。尽管现在以世界卫生组织（WHO）75/502 作为过敏原检测的国际标准，但在不同的检测方法获得的数据在灵敏度和特异性方面都有所不同[2]。因抗原来源和提取方法不同也分出不同的标准，这些标准都缺乏统一的质控标准。全自动的定量分析诊断技术可以

作者介绍：郑佩燕（1983-），男，技师，
研究方向：变态反应性疾病。
通信作者：孙宝清，女，研究员，Email：baoqingsun@yahoo.con.cn。
基金项目：广东省科技计划资助项目（编号：2009B060700081）；广州市教育局科研资助项目（编号：10A258）。

减少在处理样本时的误差频率[3]，也相应降低了操作成本，现在正逐步得到广泛应用。我们的比较主要是在新型的 Fooke 公司 ALLERG-O-LIQ 系统和已被广泛认同的 Phardia 公司 ImmunoCAP 系统之间进行的。为探寻两者对过敏原检测的一致性，我们对 251 例患者，共 520 项次过敏原特异性 IgE 检测，分别用上述 2 种方法进行检测，并对检测结果进行对比。

1 材料与方法

1.1 研究对象

检测研究对象为我院 2009-2010 年就诊于变态反应科、儿科的 251 例病例，采用 2 种不同的酶联免疫吸附法检测屋尘螨（D1）、粉尘螨（D2）、狗毛屑（E5）、德国小蠊（I6）、鸡蛋（F1）、牛奶（F2）、花生（F13）、蟹（F23）、虾（F24），共 9 种过敏原过敏原特异性 IgE 抗体检测。主要是支气管哮喘、过敏性鼻炎以及一些慢性咳嗽的患者。其中男 172 例，女 79 例，年龄 1~63 岁，平均年龄（9.25 ± 11.01）岁。

患者分别采集静脉血 5 ml 入含有分离胶的真空黄头管，室温凝血 60 min，室温下 3 000 转离心 10 min，将分离血清移至 EP 管，-20℃保存备用，检测上述 9 种过敏原 SIgE。

1.2 检测方法

1.2.1 ALLERG-O-LIQ 系统 Fooke 公司 ALLERG-O-LIQ 系统使用酶联免疫捕获法，使用了链酶亲和素和生物素技术，其结合能力是普通酶标板的 4 倍。酶标板由抗人 IgE 抗体包被，可用来检测总 IgE 和特异性 IgE。首先加入样本孵育和洗涤，酶标板结合所有 IgE，洗涤可避免其他免疫球蛋的干扰（如特异性 IgG），再加入生物素标记的过敏原，然后加入结合了酶的链霉亲和素结合物和显色底物，通过酶与底物反应后吸光度的变化来检测针对特异性过敏原的 IgE 的量。试剂盒也可以手工操作进行检测。对总 IgE 和特异性 IgE，ALLERG-O-LIQ 系统和 CAP 系统均使用标准曲线进行计算（校准品遵循 WHO IRP75/502 标准）。总 IgE 的检测范围在 0~1 000 kU/L，特异性 IgE 的检测范在 0.35~100 kU/L。所有试剂包括生物素化的过敏原均为液态即用型。单次检测需血清 50 μl。ALLERG-O-LIQ 是一个用于 ALLERgen 试剂盒的全自动仪器，包括处理和报告所有的数据。另外操作者可以通过软件对质控血清进行管理结果统计分析。

1.2.2 CAP 系统 Phardia 公司 ImmunoCAP 系统使用纤维素固相载体，该固相载体是装存小胶囊内的亲水性的多聚纤维素，经溴化氰活化后与过敏原共价结合。过敏原预先结合在固相载体帽状物的 ImmunoCAP 中，37℃孵育，如患者血清中有针对该过敏原的 SIgE，即形成抗此过敏原抗体复合物，洗脱；加入酶标记的兔抗人 IgE 抗血清(酶标二抗)，形成固相载体 - 过敏原 -SIgE- 酶标二抗的结合物，再次洗脱；加入底物，产生酶催化荧光产物；终止液终止反应；测定荧光值。优点是纤维素结构提供了较大的表面积和高结合能力。随后，β - 牛乳糖酶标记的抗体与荧光素底物反应产生荧光，根据荧光吸光度的大小换算成 SIgE 的含量。IgE 的定量结果以 kU/L 为单位。

1.3 统计学方法

以 EXCEL2000 建立数据库，采用 SPSS Statistics17 对所得数据进行 Kappa 检验和线性回归分析统计。

2 结 果

对比 ALLERG-O-LIQ 系统和 ImmunoCAP 系统用这 2 种免疫系统同时检测样品中吸入或食物过敏原的特异性 IgE 浓度，X 轴：ALLERG-O-LIQ 系统，Y 轴：Cap 系统，对比分析 2 个系统的性能。结果见下。

2.1 2 种系统对吸入性过敏原特异性

IgE 抗体定量检测结果一致性良好（$P<0.05$），两者回归分析结果具有较强的相关性且具有统计学意义（图 1、表 1），过敏原特异性 IgE 相关性排序结果依次为：屋尘螨 > 粉尘螨 > 德国小蠊 > 狗毛屑；而对食物过敏特异性 IgE 抗体检测结果的相关度较吸入过敏原低，其排序结果依次为：蟹 > 虾 > 花生 > 鸡蛋 > 牛奶。

表 1 过敏原回归参数和回归方程

过敏原	N	R	R2	P	Y=bX+a
D1	78	0.841	0.708	0.000	Y=0.943X+11.941
D2	64	0.783	0.613	0.000	Y=1.054X+20.576
E5	19	0.697	0.486	0.001	Y=2.112X+0.324
I6	65	0.833	0.689	0.000	Y=0.961X-0.124
Inhalant	226	0.806	0.650	0.000	Y=1.041X+8.629
F1	110	0.593	0.352	0.000	Y=0.416X+0.348
F2	89	0.333	0.111	0.001	Y=0.196X+0.950
F13	25	0.969	0.939	0.000	Y=1.043X-1.364
F23	34	0.531	0.282	0.001	Y=0.254X+2.091
F24	37	0.440	0.194	0.006	Y=0.351X+2.912
Foods	294	0.640	0.410	0.000	Y=0.504X+0.4
All Alleger	520	0.833	0.693	0.000	Y=1.088X+2.024

2.2 2 种系统对食入性过敏原特异性

IgE 抗体检测的四合表分析一致性良好，优于食物过敏原的检测结果，ALLERG-O-LIQ 系统与 CAP 系统两种方法的阳性符合率很高，而阴性符合率食物组的 F1 和 F2 较低。用 RAST 分级对比（见表 2），吸入组半定量一致性均大于50%，而食物组范围较大，F13 一致性最高为 60.00%，F2 最低为 30.68%。将匹配范围拓宽至 1 个级别，2 种系统对吸入性过敏原的检测结果一致性（>80%）仍高于食物过敏原（>70%）其中鸡蛋和牛奶 2 个系统的一致性较低，ALLERG-O-LIQ 系统对鸡蛋和牛奶的灵敏度高，而相对于 CAP 系统鸡蛋或牛奶阴性而 ALLERG-O-LIQ 系统阳性的患者均为 8 岁以下的儿童，且根据 RAST 分级 ALLERG-O-LIQ 系统阳性而 CAP 系统阴性的患者，其结果级别均在 1~2 级之间。

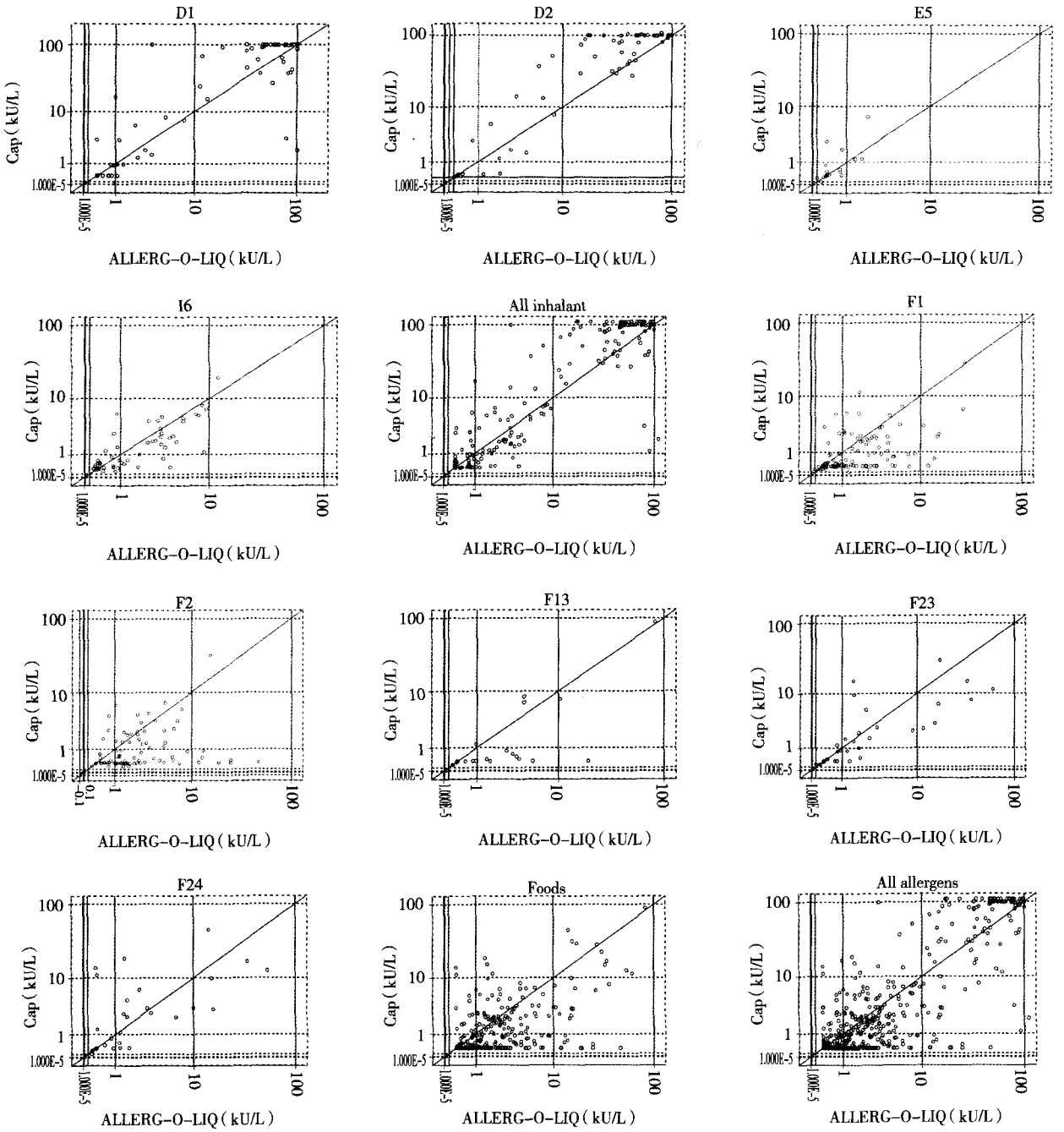


图 1　过敏原特异性 IgE 定量检测值的比较

表 2　ALLERG-O-LIQ 系统和 CAP 系统过敏原特异性 IgE 抗体检测结果分析

Fooke		D1		D2		E5		I6		F1		F2		F13		F23		F24	
		+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
Cap	+	61	2	54	0	6	4	38	7	62	2	49	0	8	0	23	0	18	3
	−	5	10	2	7	1	8	4	16	20	25	26	13	6	9	3	8	4	12
阳性符合率（%）		96.83		100.00		60.00		84.44		996.88		100.00		100.00		100.00		85.71	
阴性符合率（%）		66.67		77.78		88.89		80.00		55.56		33.33		60.00		72.73		75.00	
总符合率（%）		91.03		96.83		73.68		83.08		79.81		69.32		73.91		91.18		81.08	
Kappa		0.687		0.857		0.481		0.619		0.557		0.358		0.511		0.783		0.612	
P		0.000		0.000		0.027		0.000		0.000		0.000		0.005		0.000		0.000	
级别一致性（%）		50.00		53.33		57.89		55.38		37.61		30.68		60.00		58.82		54.05	
一致性（±1 级别）（%）		84.62		82.54		84.21		95.38		76.15		76.82		72.00		88.24		78.38	

3 讨 论

对过敏性疾病的诊断体内试验有两种：激发试验和皮肤试验。激发试验前需进行严格的体格检查，停用可能干扰检查结果的药物，并应避免剧烈运动、冷空气吸入、避免吸烟、咖啡、可口可乐饮料，支气管激发试验具有一定危险性，试验时需有经验的临床医师在场[4]。皮肤点刺实验方便，价廉，但易受药物的影响，而且皮肤点刺实验受年龄的限制（一般 5 岁以上），某些高敏人群不能进行该实验，否则会有危险；如果患者已服用了抗组胺类药物或者幼儿不能忍受点刺带来的痛苦[5]。研究证实，初期的过敏原规避应当在婴幼儿时期就开始实施，婴幼儿时期的过敏原规避能够降低屋尘螨过敏原反应的发展，可以预防儿童哮喘[6]，找出过敏原，避免接触过敏原比治疗过敏反应更重要，过敏原检测结果的本质是提出指导意见并防止患者接触到这类过敏物质。采用体外诊断技术检测 IgE 变得尤为重要[7]。对不同特异性 IgE 检测系统检测一致性的对比研究是非常必要且有用的。

研究显示，2 种不同方法之间有着一定的符合性，ALLERG-O-LIQ 系统特异性 IgE 结果能与 Cap 系统很好的吻合，定量和半定量结果较一致。对比 2 种不同的免疫检测系统主要还需要与临床结合，结果的灵敏度和特异度并不太重要，与临床吻合并为临床提供诊断依据才是根本问题。通过对不同研究数据的分析，过敏原相关性单一过敏原 > 复杂过敏原混合物；吸入 > 食物。使用高纯度的单一过敏原取代过敏原提取液的吻合度会有所提高。特别是食物过敏原的检测，由于食物蛋白的复杂性，分析产生的原因可能是因为不同过敏原之间的交叉反应，一般患者的 IgE 水平升高，这种交叉反应的概率也会加大，例如鸡蛋和牛奶半定量和定量结果两个系统的一致性均较低，这些现象可能和特异性 IgE 的非特异性反应相关。蒂莫·万托等[8]做了过敏婴儿到 4 岁产生牛奶耐受的预测研究发现，牛奶特异性 IgE<2 kU/L 的测试结果多数的牛奶过敏婴儿到了整 4 岁出现了牛奶耐受，而特异性 IgE>2 kU/L 的测试结果多数过敏婴儿到整 4 岁仍出现持续性的牛奶过敏。所以特异性 IgE 是牛奶过敏婴儿出现牛奶耐受的有用预测因子。对于随着年龄的增大，高浓度的特异性 IgE 牛奶的过敏儿童是否会出现耐受，还是一个值得研究的问题。

2种系统都采用友好的程序界面，全自动操作，操作人员对仪器的工作准备，样本和试剂处理和工作流程都比较满意。与 Cap 系统相比，ALLERG-O-LIQ 系统是一个革新的先进系统[9]，每个批号都设有标准曲线，可只进行两点定标，所有的测试过程和数据处理都是全自动的。操作人员只需编辑好工作表并装载好样本和试剂即可。简单易用的软件可以对检测的质控结果进行分析和统计学评估。Cap 系统是现在过敏原体外检测较常用的系统，也是 OGAI 过敏原质控的主要参评仪器，但其收费高，在基层医院很难进行。Fooke 试剂可以进行手工操作，通过简单的酶标仪均可得到可靠的结果，其成本适中，对儿童尤为适用，可在临床筛查推广。酶联免疫捕获法作为一种新型的过敏原检测方法于 2006 年传入中国，性价比高，减轻了患者的经济负担。

因此，临床上选择应用其中的一种或两种检测方法，能够较准确的进行变应原的诊断，对变态反应性疾病的诊断和鉴别诊断有重要意义。临床医生可根据患者的实际情况取舍，若是准备脱敏，最好结合体内、体外实验共同评价。

参 考 文 献

[1] Johanssn S G, Hourihane J O, Bousquet J, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force[J]. Allergy, 2001, 56(9): 813-824.

[2] Werner Aberer, Birger Kranke. Measurement of immunoglobulin E antibodies using liquid allergens-an inter-method and inter-laboratory quality assessmen[J]. Laboratory Medicine, 2006, 21. Suppelment: 11-18.

[3] Fink P C I, Aberer W, llausen B M. Measurement of total IgE and allergen specific lgE with the pharmacia CAP system: a multicentre evaluation[J]. Klin Lab, 1995, 41(2): 119-133.

[4] Gosepah J, Amedee R G, Mann W J. Nasal provocation testing as an international standard for evaluation of allergic and nonallergic rhinitis[J]. Largngoscope, 2005, 115(3): 512-516.

[5] Hayden M L. Allergic rhinitis: proper management benefits concomitant diseases[J]. Nurse Pract, 2004, 29(12): 26-30.

[6] Arshad S H, Bateman B, Matthews S M. Primary prevention of asthma and atopy during childhood by allergen avoidance in infancy: a randomised controlled study[J]. Thorax, 2003, 58(6): 489-493.

[7] AAAI. Position statement. The use of in vitro tests of IgE antibody in the specific diagnosis of IgE mediated disorders and in the formulation of allergen immunotherapy[J]. J Allergy Clin Immunology, 1992, 90(2): 263-267.

[8] Vanto T, Helppila S, Junlunen Backman K, et al. Prediction of the development of tolerance to milk in children with cow's milk hypersensitivity[J]. Pediatr, 2004, 144(2): 218-222.

[9] Kleine-Tebbe J, Breuer K, Lepp U, et al. Spezifische IgE-werte gegen aero-und nahrungsmittelallergene im vergleich: Dr. Fooke ALLERG-O-LIQ und Pharmacia CAP-system[J]. Allergologie, 2004, 4(2): 129-134.

（责任编辑：张学颖）