

• 检验技术与方法 •

免疫印迹法检测过敏性疾病的实验室分析

杨 辛, 吴颖稚, 张庆五

(上海市杨浦区控江医院检验科 200093)

摘要:目的 通过检测过敏性皮肤病患者血清中过敏源特异性 IgE, 了解过敏性皮肤病中各种过敏源的作用。方法 采用德国 Mediwiiss 敏筛过敏源免疫印迹法, 对临床确诊的 420 例过敏性疾病患者的血清总 IgE 和过敏源特异性 IgE 进行定量和定性检测。结果 420 例过敏性疾病患者中, 血清总 IgE 为阳性的占 308 例(73.3%), 其中对 1 种过敏源显示阳性的有 102 例(33.1%), 对两种和两种以上过敏源显示阳性为 206 例(66.9%)。吸入组过敏源阳性率: 尘螨 58 例(18.8%)、屋尘 35 例(11.4%)、真菌混合组 21 例(6.9%); 食入组过敏源阳性率: 牛奶 55 例(17.9%)、羊肉 50 例(16.2%)、牛肉 25 例(8.2%)。420 例患者中, 血清总 IgE 阳性而过敏源特异性 IgE 阴性 52 例(12.4%), 另外, 血清中总 IgE 和过敏源特异性 IgE 均阴性 48 例(11.4%), 还有血清中总 IgE 为阴性而过敏源特异性 IgE 为阳性 12 例(2.9%)。结论 Mediwiiss 敏筛过敏源免疫印迹法实验特异性好, 敏感度高, 且灵敏、快速, 结果高度准确、可靠。因此, 对过敏性皮肤病患者的诊断有重要价值。

关键词:被动皮肤过敏反应; 免疫球蛋白 E; 免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.052

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0106-02

过敏源(sIgE)是指由有免疫炎性反应或其他免疫应答机制所致的组织损伤或功能障碍成为变态反应。诱发变态反应的抗原成为变应原。变态反应根据反应机制分为 4 个类型, 其中最常见的是 IgE 肥大细胞和嗜碱性粒细胞介导的 I 型变态反应。现通过德国 Mediwiiss 敏筛过敏源免疫印迹法, 对临床确诊的过敏性疾病患者的血清总 IgE 和过敏源特异性 IgE 进行实验室检测, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2010 年 1~4 月根据患者临床表现确诊为过敏性疾病的住院及门诊患者共 465 例。

1.2 仪器及试剂 专用快速阅读仪及配套汉化软件、孵育暗盒和固定频率的混合仪及 19 种过敏源特异性 IgE 检测试剂盒均由德国 Mediwiiss Analytic GmbH 公司提供。

1.3 方法 抽取空腹静脉血 2 mL, 分离血清, 置于 4 ℃ 冰箱保存, 待检。过敏源免疫印迹法:(1)将膜条置于反应槽中, 加入缓冲液将膜条浸湿 5 min, 倾去缓冲液。(2)加入 250 μL 血清, 将膜条浸入置于孵育暗盒后, 放在混合仪上并置于室温(20~22 ℃), 摆动 45 min。(3)倾去血清, 每槽加入 2 mL 洗涤液, 在混合仪上摇动洗涤 3 次, 每次 5 min。(4)倾去洗涤液, 每槽加入 5 滴生物素标志的人 IgE 抗体, 放在混合仪上并置于室温(20~22 ℃), 摆动 20 min, 洗涤同上。(5)每槽加入 5 滴 BCIP/NBT 酶作用底物溶液, 置室温显色 20 min 后, 用蒸馏水洗涤膜条, 终止反应。试剂条上出现沉淀。颜色深浅与血清中过敏源的特异性 IgE 抗体含量呈正比。用吸水纸使膜条干燥, 然后用专用过敏源 Rapidreader 阅读仪检测, 读取定量检测结果。结果判断: 总 IgE ≥ 100 IU/mL 为阳性, 总 IgE < 100 IU/mL 为阴性, 过敏源的特异性 IgE ≥ 0.3 IU/mL 为阳性, IgE < 0.3 IU/mL 为阴性。

2 结 果

420 例过敏性疾病患者中, 血清总 IgE 为阳性 308 例(73.3%), 其中对 1 种过敏源显示阳性, 102 例(33.1%)对两种和两种以上过敏源显示阳性 206 例(66.9%)。420 例患者中, 血清总 IgE 为阳性而过敏源特异性 IgE 为阴性的 52 例(12.4%)。另外, 血清中总 IgE 和过敏源特异性 IgE 均为阴性, 占 48 例(11.4%), 血清中总 IgE 为阴性而过敏源特异性 IgE 为阳性, 占 12 例(2.9%)。

IgE 为阳性, 占 12 例(2.9%), 见表 1。

表 1 过敏性疾病患者吸入组和食入组过敏源特异性 IgE 阳性率检测[n(%)]

组别	过敏源	例数(n)	百分率(%)
吸入组	户尘螨	58	18.8
	真菌混合组	21	6.9
	屋尘	35	11.4
	猫毛皮屑	7	2.3
	狗毛皮屑	2	0.64
	栎榆梧桐柳三角叶杨	18	5.8
	桑树	7	2.3
	蟑螂	15	4.9
	矮豚草	2	0.64
	食入组		
食入组	鸡蛋	15	4.9
	牛奶	55	17.9
	鱼	5	1.6
	蟹	10	3.2
	虾	7	2.3
	牛肉	25	8.2
	青贝	7	2.3
	羊肉	50	16.2
	芒果	2	0.65
	腰果	7	2.3

3 讨 论

过敏源免疫印迹法检测的原理是采用特异性过敏源被吸附于硝酸纤维素膜表面, 置于反应槽中。用移液器加入患者血清, 室温下孵育, 标本中过敏源特异性的抗体与过敏源发生反应, 并连接在硝酸纤维素膜上。将多余的抗体冲洗掉, 再加入标志了生物素的人 IgE 抗体, 室温下孵育, 洗脱未结合上的抗体。然后, 加入结合有碱性磷酸酶标志的链霉亲和素, 室温下

孵育,链霉亲和素与生物素结合。将未结合上的酶标链霉亲和素冲洗干净。当再加入 BCIP/NBT 酶作用底物并孵育后,碱性磷酸酶发生特定的酶显色反应,试剂出现沉淀。颜色深浅与血清中 sIgE 抗体含量呈正比。待试剂条干燥后,CCD 相机照相,读取检测结果。本软件是免疫印迹数字成像分析系统发展而来,通过 CCD 照相,软件评估条带颜色的深浅。方法是通过计算显色条带的面积积分并与内环准曲线对比《以草花粉为标准》,对之进行分级,分级与 IgE 是 IU/mL 浓度相对应,分析中曲线均为平滑处理,排除干扰,敏筛过敏源检测系统采用免疫印迹方法,定量检测人血清中过敏源特异性 IgE 抗体。对临床分析结果提供了极大的帮助。

过敏性皮肤病是由各型变态反应所致疾病,临幊上大多数过敏性疾病是过敏源诱发的特异性 IgE 介导的 I 型变态反应,检测特异性 IgE 可以确诊过敏源。由于居住环境的恶化,目前我国患过敏性皮肤病的人数有所增长,所以在平时生活中一定要增强自身免疫力^[1]。420 例过敏性皮肤病患者中,实验室检测出血清中总 IgE 阳性 308 例(73.3%),其中对 1 种过敏源显示阳性,102 例(33.1%)对两种和两种以上过敏源显示阳性。表 1 结果显示,大多数患者已被过敏源致敏^[2-3]。420 例患者中,血清总 IgE 检测阳性而过敏源特异性 IgE 阴性占 52 例(12.4%),主要原因为血清总 IgE 的检测一直被作为过筛实验而广泛应用于变态反应的诊断。然而,除变态反应疾病之外,种族、性别、年龄、寄生虫感染和季节性等许多因素都可对血清总 IgE 水平有所影响。另外,20%~30% 的变态反应患者血清总 IgE 水平可以正常,甚至低于正常水平,况且总 IgE 无特异性,因为决定机体对某种抗原起反应的并非是总 IgE,而是与该变应原相对应的特异性 IgE。所以,单纯依靠血清总 IgE 的检测来判断患者的过敏状态是不准确的,更不能说明对哪种过敏源过敏,但 sIgE 可作为评估特异性免疫治疗疗效的指标。

检验技术与方法

另外,还有患者过敏性症状明显,血清中总 IgE 和过敏源特异性 IgE 检测均为阴性,占 12 例(2.9%),说明本实验检测 sIgE,只有 IgE 介导的过敏反应本组才适用。由另外 3 个类型的变态反应所致的过敏性疾病本组不适用,这时就会出现阴性结果。如果患者处于疾病高峰期(IgE 耗竭期),亦可出现假阴性结果。还有血清中总 IgE 为阴性而过敏源特异性 IgE 为阳性,占 48 例(11.4%),主要原因是总 IgE 是指血清中所有 IgE 的总和,包括在检的所有 sIgE 和非在检的 IgE,两者检测的阈值不一样,每种 sIgE 占总 IgE 的比例很低,故出现 sIgE 阳性并不一定总 IgE 也阳性。本组结果可以说明,Mediwiss 敏筛过敏源免疫印迹法实验采用免疫学确认技术——免疫印迹技术,抗原非共价吸附于硝化纤维素膜,采用机器自动划线技术,可靠性高,特异性好,敏感度高。同时,融合了生物素-链霉亲和素放大技术,这一免疫酶技术中的放大系统,大大提高了反应的敏感度和特异性,可以进行极微量的抗原检测,灵敏、快速,结果高度准确、可靠。因此,对过敏性皮肤病患者的诊断有重要价值。

参考文献

- [1] 刘辅仁. 实用皮肤科学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 436.
- [2] 王宏志, 刘敏, 孙才. Mediwiiss 敏筛定量过敏源检测在过敏性疾病诊断及防治中的体会[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(6): 31.
- [3] 王玉琼, 李兰娜. 150 例变态反应性疾病过敏源检测分析[J]. 广东医学, 2003, 24(5): 503-504.