

• 检验试剂与评价 •

抗 M2-3E ELISA:一种新型、高效的 PBC 血清学诊断方法

牛泱平¹, 李 川²

(1. 北京欧蒙生物技术有限公司 100101; 2. 欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司 310013)

摘要: 原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种免疫介导的慢性炎症性胆汁性肝病,其病因不明。AMA-M2 是 PBC 患者最为灵敏和最为特异的诊断标志,高达 94% 的 PBC 患者显示 AMA-M2 阳性。AMA-M2 抗体的靶抗原 OADC,由 BCOADC-E2、PDC-E2、OGDC-E2、PDC-E1t 和 PDC-E3 结合蛋白组成。德国欧蒙公司(EUROIMMUN)率先把融合重组蛋白 BPO 与天然的 PDC 纯化抗原相混合,开发了新型的抗 M2-3E ELISA 检测法。该系统与仅采用天然 M2 抗原包被或仅包被 BPO 的 ELISA 检测系统相比,拥有敏感性较高的优点。

关键词: 血清; 诊断; 方法; 酶联免疫吸附测定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0694-02

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种免疫介导的慢性炎症性胆汁性肝病,病因不明。到目前为止,在 PBC 患者中发现 4 种类型的抗线粒体抗体(anti mitochondrial antibody, AMA),分别为抗 M2、M4、M8、M9 抗体。其中 AMA-M2 是 PBC 患者最为灵敏和最为特异的诊断标志,高达 94% 的 PBC 患者显示 AMA-M2 呈阳性^[1],高滴度 AMA-M2 抗体对于 PBC 的诊断和预测 PBC 患者是否会出现肝功能障碍或者胆汁淤积症状意义重大^[2-3]。

AMA-M2 抗体的靶抗原为线粒体呼吸链上的 2-丙酮酸脱氢酶复合物(2-oxo acid dehydrogenase complex, OADC),包括支链 2-酮酸脱氢酶 E2 亚基(branched-chain oxo acid dehydrogenase complex E2 subunit, BCOADC-E2)、丙酮酸脱氢酶 E2 亚基(pyruvate dehydrogenase complex E2 subunit, PDC-E2)、2-酮戊二酸脱氢酶 E2 亚基(oxoglutarate dehydrogenase complex E2 subunit, OGDC-E2)、PDC-E1t 亚基和 PDC-E3 结合蛋白(蛋白 X)。在这些酶组分中,大部分(80%~90%)的 M2 特异性自身抗体是直接针对 PDC-E2 的,很多商业化的 ELISA 检测试剂盒也是仅仅基于这个主要靶抗原而设计的^[1,4-7]。然而,有 4%~13% 患者因只表达针对 M2 复合体中 BCOADC-E2 和(或)OGDC-E2 的自身抗体,在应用一般的常用试剂盒检测时,常常会导致 PBC 患者的漏诊和误诊^[8-10]。近年来也有利用抗原混合或通过杂交技术融合表达 MIT3(因为它含有 PDC-E2、BCOADC-E2 和 OGDC-E2 3 个线粒体的表位而得名)或 BPO(BCOADC、PDC 和 OGDC),进行了相应的系列技术改进,并证明这些方法对早期检测大部分通常识别抗线粒体抗原的 AMA 是有用的,但不能检测和针对 PDC-E1 α 和 PDC-E1 β 表位及其他线粒体抗原亚基的自身抗体^[11-18]。

为了克服这些限制,德国欧蒙公司(EUROIMMUN)率先把融合重组蛋白 BPO 与天然的 PDC 纯化抗原相混合,开发了新型的抗 M2-3E ELISA 检测法。该系统与仅采用天然 M2 抗原(PDC)包被或仅包被 BPO 的 ELISA 检测系统相比,提高了 PBC 的检测敏感性。

1 抗 M2-3E ELISA

1.1 创新点 将融合蛋白 BPO(在大肠杆菌 E. coli 中表达)与天然 M2(纯化的猪丙酮酸脱氢酶 PDC)相混合包被在微孔板上,采用 ELISA 法检测抗 M2 自身抗体。

1.2 技术参数

1.2.1 抗 M2-3E ELISA 系统的敏感性和特异性 通过对 170 例 PBC 患者血清和 989 例对照样本(598 例其他自身免疫性疾病患者血清和 400 例健康献血者血清)进行 AMA-M2 抗体检测,发现抗 M2-3E 抗体 ELISA 试剂对 PBC 诊断的敏感性为 92.9%,特异性为 97.8%。

1.2.2 抗 M2-3E 抗体 ELISA 与抗 M2 抗体 ELISA、抗 BPO 抗体 ELISA 和 IFL AMA(大鼠肾)检测系统敏感性与特异性比较。

1.2.2.1 与抗 M2 抗体 ELISA 的比较 用抗 M2 抗体 ELISA 和抗 M2-3E 抗体 ELISA 同时检测 170 例 PBC 患者血清。抗 M2-3E 抗体的敏感性为 92.9%,明显高于抗 M2 抗体(79.4%),这两个检测系统针对 989 例对照样本的特异性分别为 97.8%(抗 M2-3E 抗体)和 99.5%(抗 M2 抗体)。

1.2.2.2 与抗 BPO 抗体 ELISA 的比较 同时检测了 170 例 PBC 患者血清,抗 M2-3E 抗体的敏感性为 92.9%,高于抗 BPO 抗体(90.2%)。特异性分别为 97.8%(抗 M2-3E 抗体)和 98.8%(抗 BPO 抗体)。

1.2.2.3 与 IFL(基质:大鼠肾)的相关性 针对所检测的 170 例 PBC 患者血清的敏感性分别为 92.9%(抗 M2-3E 抗体 ELISA)和 88.8%(IFL),200 例病毒性肝炎和 49 例自身免疫性肝炎患者血清这两个检测系统的特异性具有可比性(ELISA:97.8%,IFL:97.6%)。

1.3 在中国业界使用情况 张洋等^[19]通过采用 3 种不同 AMA-M2 ELISA 检测方法同时检测 96 例 PBC 患者血清,发现抗 M2-3E 抗体 ELISA 的敏感性为 96.9%,明显高于抗 M2 抗体 ELISA(81.2%)和抗 BPO 抗体 ELISA(88.5%)。

有学者报道了 107 例 PBC 患者中的敏感性和特异性,发现抗 M2-3E 抗体 ELISA 的敏感性为 92.5%,明显高于抗 M2 抗体 ELISA(72.9.2%)和抗 BPO 抗体 ELISA(87.9%)。

2 小 结

综上所述,抗 M2-3E 抗体 ELISA 是一种新颖、高效的原发性胆汁性肝硬化血清学诊断试剂,为原发性胆汁性肝硬化的诊断提供了简便、准确且有效的检查手段,值得临床推广和应用。

参考文献

[1] Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis[J]. N Engl J

Med, 2005, 353(9): 1261-1273.

[2] Mitchison HC, Bassendine MF, Hendrick A, et al. Positive antimitochondrial antibody but normal alkaline phosphatase; is this primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 1986, 6(11): 1279-1284.

[3] Metcalf JV, Mitchison HC, Palmer JM, et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis[J]. Lancet, 1996, 348(16): 1399-1402.

[4] Bogdanos DP, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies[J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(4): 759-777.

[5] Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, et al. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(6): 3374-3387.

[6] Invernizzi P, Lleo A, Podda M. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver diseases[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(7): 161-172.

[7] Muratori L, Granito A, Muratori P, et al. Antimitochondrial antibodies and other antibodies in primary biliary cirrhosis: diagnostic and prognostic value[J]. Clin Liver Dis, 2008, 12(5): 261-276.

[8] van Water J, Cooper A, Surh CD, et al. Detection of autoantibodies to recombinant mitochondrial proteins in patients with primary biliary cirrhosis[J]. N Engl J Med, 1998, 320(64): 1377-1380.

[9] Leung PS, Coppel RL, Ansari A, et al. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis[J]. Semin Liver Dis, 1997, 17(8): 61-69.

[10] Muratori L, Muratori P, Granito A, et al. The western immunoblotting pattern of anti-mitochondrial antibodies is independent of the clinical expression of primary biliary cirrhosis[J]. Dig Liver Dis, 2005, 37(17): 108-112.

[11] Oertelt S, Rieger R, Selmi C, et al. A sensitive bead assay for antimitochondrial antibodies: chipping away at AMA-negative primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 2007, 45(4): 659-665.

[12] Moteki S, Leung PS, Coppel RL, et al. Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies[J]. Hepatology, 1996, 24(19): 97-103.

[13] Jiang XH, Fang XY, Zhong RQ, et al. Development of an enzyme immune assay for detecting M2 autoantibodies specific for primary biliary cirrhosis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2003, 2(6): 290-294.

[14] Leung PS, Coppel RL, Ansari A, et al. Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis[J]. Semin Liver Dis, 1997, 17(8): 61-69.

[15] Iwayama T, Leung PS, Coppel RL, et al. Specific reactivity of recombinant human PDC-E1 alpha in primary biliary cirrhosis[J]. J Autoimmun, 1991, 4(11): 769-778.

[16] Maeda T, Loveland BE, Rowley MJ, et al. Autoantibody against dihydrolipoamide dehydrogenase, the E3 subunit of the 2-oxoacid dehydrogenase complexes; significance for primary biliary cirrhosis[J]. Hepatology, 1991, 14(12): 994-999.

[17] Mori T, Ono K, Hakozaki M, et al. Autoantibodies of sera from patients with primary biliary cirrhosis recognize the alpha subunit of the decarboxylase component of human branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex[J]. J Hepatol, 2001, 34(7): 799-804.

[18] Mori T, Ono K, Hakozaki M, et al. Epitope mapping on E1alpha subunit of pyruvate dehydrogenase complex with autoantibodies of patients with primary biliary cirrhosis[J]. Cell, 2008, 17(3): 634-636.

[19] 张洋, 李永哲, 冯雪, 等. 抗线粒体抗体 M2 亚型抗体三种检测方法的比较及其对原发性胆汁性肝硬化的诊断价值研究[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(9): 1073-1075.

(收稿日期: 2011-01-05)

(上接第 693 页)

内质控限值时, 其室内质控的结果按 I2S 和 I3S 规则判断报警和失控次数, 结果前者(按统计学方法设置质控限值)报警和失控次数明显多于后者, 且前者假失控概率偏高, 因此设置质控限值对室内质控至关重要。

3.4 由于现代仪器作为临床检验精密度的提高, 给统计学室内质控的运行也增加了难度^[4]。因为仪器或检测系统精密度的提高, 使得检测质控品的标准差(S_1)变小, 按统计学理论设置的质控限值($3S_1$)就要小。这样在日常工作中, 各室内质控品测定时就很容易导致失控, 如本组中 LDH 的室内质控, 由于平均值($\bar{x}$)为 317.70 而标准差(S_1)仅为 2.88, 质控限值 $3S_1$ 为 8.64, 使得质控限值很小, 容易导致失控, 在临床实际中 LDH 在 317.7 时增加或减少, 8.64LDH 对临床诊断意义不大, 可以认为是假失控, 这种情况在检验工作中非常常见, 也导致检验人员对室内质控失去信心。如以 $1/4 TEa$ 推算 S 再按 $3S$ 设置质控限, 就可减少假失控, 又可达到临床允许误差的需要(见表 2)。

综上所述, 在统计学室内质控过程中, 如检测系统精密度好, 使得标准差很小时应以 $1/4 TEa$ 推算出 S 再设置质控限, 至于 $1/4 TEa$ 是否合理, 有待检验学者进一步研究, 而对于精密度差导致 S 过大的检测系统, 应进行改进并达到检验最基本的性能要求。

参考文献

[1] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 241.

[2] 万腊根. 实用临床实验室质量管理[M]. 南昌: 江西科技出版社, 2006: 185.

[3] 王志剑, 李莉, 李琳. 两种质控血清测定结果不精密度的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(2): 180.

[4] 袁先武, 冉奔, 何仕钦, 等. AC920EO 血球仪的校准与质量控制[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(7): 672.

(收稿日期: 2010-12-01)