

• 论 著 •

IgA 缺乏症献血者酶联免疫试验筛查方法的建立*

袁文声, 易 峰

(广东省中山市中心血站 528400)

摘要:目的 建立适用于大规模 IgA 缺乏症献血者筛选的 ELISA 检测方法。方法 采用间接酶联免疫法,在微孔板中包被羊抗人 IgA、用辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgA 抗体作为酶标二抗。结果 建立的 ELISA 测定法灵敏度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IgA 浓度为 0.1、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的批间变异系数(CV)是 1.74%、3.49%,批间 CV 中位数为 3.48%(范围:1.83%~6.96%)。检测过程约 80 min。结论 成功建立了 IgA 缺乏症筛查的 ELISA 测定法,其灵敏度高、特异性强、省时、操作简易,可用于大规模筛选 IgA 缺乏症献血者及建立 IgA 缺乏献血者库。

关键词: IgA; 酶联免疫试验; IgA 缺乏; 献血者

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.14.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)14-1951-03

Establishment of ELISA screening method in blood donors with IgA deficiency*

YUAN Wensheng, YI Feng

(Zhongshan Municipal Blood Center, Zhongshan, Guangdong 528400, China)

Abstract: Objective To establish the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for a large-scale screening of IgA deficiency in blood donors. **Methods** The indirect ELISA was adopted. The goat anti-human IgA antibody was coated in microwell plates and labeled by horse radish peroxidase (HRP) as enzyme-labelled secondary antibody. **Results** The sensitivity of established ELISA detection method was 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The intraassay coefficients of variation (CV) for IgA concentrations of 0.1, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were 1.74% to 3.49%. The median interassay CV was 3.48% (range: 1.83% - 6.96%). The assay process was 80 min. **Conclusion** The ELISA detection method is successfully established with high sensitivity, strong specificity, timesaving and easy operating and can be used for a large scale screening of IgA deficiency and establishment of blood donors bank of IgA deficiency.

Key words: IgA; enzyme immunoassay; IgA deficiency; blood donor

选择性 IgA 缺乏症是指血清 IgA 低于 0.05 g/L 或缺失,而 IgG 和 IgM 血清浓度正常,是免疫缺陷中最常见的类型^[1]。IgA 缺乏症患者接触外来抗原免疫刺激后,体内会产生抗 IgA 抗体,当输注含 IgA 的血液或血制品时可引起严重过敏性休克反应,因此可选择性输注 IgA 缺乏献血者的血液制品。迄今为止中国人群健康献血者中 IgA 缺乏症患者的大规模筛查鲜有报道,在血站日常的献血样本筛选中,并无 IgA 缺乏症的专项检测,所以中国人群 IgA 缺乏症患者的输血存在潜在隐患。本研究拟建立灵敏度高、特异性强,尤其是高通量的 ELISA 法,用于大规模的献血者筛查,建立 IgA 缺乏症献血者库。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 96 孔平底微板 (Greiner, 德国), 水浴箱 (德国 JULABO, SW22), 酶标仪 (安图 Phomo), 微量加样器 (安图 Lisa), 鼠抗人 IgA 单克隆抗体 (SBA, 美国), 人标准血清 (Athens Research & Technology, 美国), 辣根过氧化物酶羊抗人 IgA 抗体 (SBA, 美国), 浓缩包被缓冲液 (Thermo Scientific, 美国), 封闭液 (Thermo Scientific, 美国), 底物显色液 TMB (Thermo Scientific, 美国), 终止液 (上海迪申生物), 20×PBS 缓冲液 (上海迪申生物), 吐温 Tween-20 (上海思吉)。

1.2 方法

1.2.1 包被微板 用包被缓冲液 (pH9.6, 0.05 mmol/L 碳酸盐缓冲液) 将鼠抗人 IgA 抗体以 1:1 000 稀释, 每孔加入 100 μL , 用封口膜封板, 轻轻震荡混匀, 置于 4℃ 冰箱孵育过夜; 次日每孔加入 0.05% T-PBS (由 20×PBS 和吐温 Tween-20 配制而成, 吐温质量分数为 0.05%) 300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 洗涤 3 次, 扣干后加入 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 封闭液; 将微孔板置于 37℃ 水浴箱孵育, 30 min 后取出, 重复洗板 3 次。待板扣干后密封存于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 加标准品和样品血清 先将人标准血清稀释成 1、10、10²、10³、10⁴ 共 4 个浓度梯度, 最终浓度从高至低分别为 100、10、1、0.1、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。加入到 96 孔板中纵向相应位置, 每孔 100 μL ; 将血清样本作 1:100 稀释后加 100 μL 到 96 孔板中纵向相应位置, (37±1)℃ 培养 30 min。6 次洗板后, 向每个微孔中添加在 1/4 000 洗涤液稀释的 100 μL 辣根过氧化物酶偶联二抗, 并在 37℃ 下培养 30 min。洗板 6 次后, 加 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 底物显色液 TMB, 并在 22℃ 下的黑暗中孵育 20 min。加入 50 μL 的 4N 硫酸终止反应, 测定每孔在 492 nm 下的吸光度 (OD), 设定参考波长为 620 nm。吸光度值均按照样品空白校正, 其中包括人类 IgA 缺乏血浆。为了实现检测的标准化, 通过稀释 IgA 缺乏人类血浆制备的参考 IgA 获得已知浓度的 IgA。每个 IgA 稀释液都按照上述描述经过了 6 次处理, 并且

* 基金项目: 广东省中山市科技计划项目 (2015B1251)。

作者简介: 袁文声, 女, 副主任医师, 主要从事临床输血与检验研究。

计算了平均,标准偏差(s),关于平均值的 99%可信区间(CI), OD 的变异系数(CV)。

2 结 果

2.1 ELISA 标准曲线及评测评估 使用对照 IgA 制备物的稀释液,制作了与 OD 到 IgA 浓度有关的标准化和检测灵敏度 A 标准曲线。IgA 浓度的 OD 为 0.01 μg/mL,与 IgA 缺乏血浆的 OD 重叠。相比之下,IgA 浓度为 0.1 μg/mL 的平均 OD 周围的 99%CI 的下限,是 IgA 缺乏血浆平均值 99%CI 上限的 3.1 倍。因此,检测灵敏度为 0.1 μg/mL,因为这是能与空白明显区分的最低 IgA 浓度。

2.2 ELISA 精确性、灵敏度和重复性 IgA 浓度在 0.1 μg/mL 和 100 μg/mL 范围内的批内检测 CV 从 1.74% 到 3.49% 变化,见表 1。通过分析 6 次检测中正常献血者的 20 个样品,评估了批间检测 CV。OD 的批间检测 CV 中位数为 3.48%(范围:1.83%~6.96%),见表 2。

表 1 不同浓度的 IgA 标准人血清在波长 450 nm 处对应的 OD 和 CV 值

IgA 浓度(μg/mL)	OD(±s)	CV(%)
100	2.139±0.057	3.49
10	2.150±0.035	2.53
1	1.109±0.011	1.97
0.1	1.083±0.009	1.74

注:OD 为 450 nm 波长处重复 3 孔的平均值。

表 2 20 例正常献血者 IgA 检测的 OD 和 CV 值

标本序号	OD(±s)	CV(%)
1	1.913±0.082	5.16
2	1.836±0.059	4.24
3	1.849±0.105	6.96
4	1.903±0.087	5.06
5	1.842±0.022	2.18
6	1.906±0.078	4.79
7	1.845±0.089	5.02
8	1.918±0.046	2.15
9	1.895±0.045	2.10
10	1.874±0.032	1.83
11	1.805±0.064	3.26
12	1.824±0.046	2.68
13	1.815±0.049	2.47
14	1.806±0.092	6.62
15	1.846±0.078	4.42
16	1.858±0.042	2.76
17	1.864±0.095	6.82
18	1.808±0.065	3.48
19	1.806±0.042	3.32
20	1.908±0.079	4.16

注:OD 为 450 nm 波长处重复 3 孔的平均值。

2.3 ELISA 高剂量钩状效应 为了测试因献血者血浆的高 IgA 水平导致假阴性结果的可能性(高剂量钩状效应),本研究对人体单克隆 IgA 倍比稀释,最终 IgA 浓度范围是 6.8~96.7 μg/mL。在所有情况下,OD 值仍很高,证明该检测不具有高剂量钩状效应倾向。

3 讨 论

研究发现,多数 IgA 缺乏的患者血浆中含有 IgA 抗体,这类个体在接受含有 IgA 血液成分时,可能会发生严重的过敏性反应,虽然该过敏性反应的频率仅为 1:20 000~1:47 000 名受血者之间,但也成了最常见的非溶血性输血相关病死率原因之一^[2-4]。故此血浆中含抗 IgA 的患者应接受低 IgA 的血液成分,最理想的是含有 IgA<0.5 μg/mL 的血液成分。

对于这类含 IgA 抗体的 IgA 缺乏患者输血治疗一般有 3 种方法^[5]:自体血液输注;采用经多次洗涤后的红细胞或血小板;输注 IgA 缺乏献血者的血液成分。自体血液输注对于失血过多的患者不可行,而通过反复洗涤细胞可以获得低 IgA 红细胞和血小板,然而操作繁琐、耗时费力,且对于高度致敏受血者是不够的,同时不适合那些需要输注血浆或冷沉淀的患者,故此输注 IgA 缺乏献血者的血液成分似乎是更好的选择。

已报道的对 IgA 缺乏的检测方法有放射免疫扩散法、免疫比浊法、放射免疫、被动凝集抑制试验等^[6-8]。放射免疫扩散、免疫比浊法和放射免疫的灵敏度很低,检测时间长,无法轻易实现自动化,或者需要昂贵的仪器。被动凝集抑制试验用于某些血站筛选 IgA 缺乏的献血者。这个试验的一个优势,是可以适应自动化设备,灵敏度在 0.5 μg/mL 左右,并且检测时间较短,然而该试验需要繁复的红细胞包裹步骤,以及相对专业的技能,才能得到满意的效果。此外,若献血者血清中存在抗红细胞抗体,容易发生假阳性反应^[9]。因此,上述方法应用于大规模人群筛查 IgA 缺乏症时有局限性,而 ELISA 法由于其灵敏度高、特异性强尤其是高通量的优点适用于大规模的人群筛选,但是相关报道中仍存在需要改进的地方。本研究拟建立灵敏度高、特异性强尤其是高通量的 ELISA 检测法,用于大规模的献血者筛选,建立 IgA 缺乏症献血者库。

本研究建立的 ELISA 灵敏度水平,与那些报道的类似测定法相比,也毫不逊色,其范围为 0.5~5 μg/mL,低于 IgA 缺乏血液成分提出的 0.5 μg/mL 阈值的 5 倍^[7-8,10],精度也令人满意,因为在测定法灵敏度极限中 IgA 浓度 CV 仅为 3.49%,而对于批间重复性评估,CV 都低于 6.96%。对 IgA 缺乏献血者进行了明确区分,因为正常和 IgA 缺乏样品之间 OD 的差异约为 105 倍。理论上,因为邻孔污染,可能导致一些 IgA 缺乏症献血者未被发现。然而,不同微孔板中反复测定 IgA 缺乏症患者血清标本,没有发现污染;另外,因“高剂量钩状效应(抗原抗体比例不合适而导致假阴性的现象)”造成的检测错误也是不可忽视的,即把 IgA 血清水平异常高当成 IgA 缺乏,这一作用在一步夹心法中发生,原因为过量的被测物与固相蛋白及标记蛋白争相结合,难以或不能有效地形成夹心结合物,使强阳性标本误测为弱阳性甚至假阴性结果^[11]。高剂量钩状效应在两步法检测中是非常罕见的,本研究测试了 IgA 浓度非常高的样品后,发现 OD 值仍很高,证明该检测不具有高剂量钩状效应倾向。

本研究中的 96 孔测试板可以通过使用自动样品处理仪来

制备,用于分配包被抗体,洗涤和封闭试剂。此外,微孔板可以冷冻存储,性能上没有任何损失,至少可贮存 3 个月。因此,在处理便利性、稳定性和重现性方面,它可以与一个商用的试剂盒媲美。本研究建立的 ELISA 法在试剂成分、实验条件、实验时间、灵敏度上都作了优化和改进,并做了质控阴性对照和空白对照使实验更符合标准操作规范,与文献报道采用的其他方法相比,解决了检测时间长、对实验人员有危害等不足之处。

综上所述,本研究建立的方法与已有技术相对照,其效果是积极和明显的。由于快速、经济、简便、检测数量大,本方法可以应用于临床医疗单位及血站的常规血液检测,为 IgA 缺乏症患者减少输血风险,提高了输血的安全性,接下来利用已建立的这种可靠的方法进行中国汉族健康献血者的缺乏筛查。

参考文献

- [1] Ozsoylu S. About selective IgA deficiency[J]. Turk J Pediatr, 2011, 53(6):717.
- [2] Robitaille N, Delage G, Long A, et al. Allergic transfusion reactions from blood components donated by IgA-deficient donors with and without anti-IgA: a comparative retrospective study[J]. Vox Sang, 2010, 99(2):136-141.
- [3] Sandler SG, Eckrich R, Malamut D, et al. Hemagglutination assays for the diagnosis and prevention of IgA anaphylactic transfusion reactions[J]. Blood, 1994, 84(6):2031-2035.
- [4] Petz LD, Swisher SN, Kleinman S, et al. Clinical practice of transfusion medicine[M]. 3rd ed. Glasgow: Churchill Livingstone, 1996:914-915.

- [5] Foudoulaki-Paparizos L, Tzavara V, Stamoulis K E, et al. Prevalence of IgA deficiency in Greek blood donors[J]. Haema, 2002, 5(4):330-332.
- [6] Laschinger C, Gauthier D, Valet JP, et al. Fluctuating levels of serum IgA in individuals with selective IgA deficiency[J]. Vox Sang, 1984, 47(1):60-67.
- [7] Haun M, Wasi S. An enzyme immunoassay for the determination of low levels of IgA in human serum[J]. J Immunol Method, 1989, 121(2):151-155.
- [8] Eckrich RJ, Mallory DM, Director SGSM. Laboratory tests to exclude IgA deficiency in the investigation of suspected anti-IgA transfusion reactions[J]. Transfusion, 1993, 33(6):488-492.
- [9] Hansen AL, Turner TR, Kurach JD, et al. Quality of red blood cells washed using a second Wash sequence on an automated cell processor[J]. Transfusion, 2015, 55(10):2415-2421.
- [10] Rumilla KM, Winters JL, Peterman JM, et al. Development and validation of a fluorescent microsphere immunoassay for anti-IgA [J]. Immunohematology, 2009, 25(1):24-28.
- [11] Butch AW. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon [J]. Clin Chem, 2000, 46(10):1719-1721.

(收稿日期:2016-01-11 修回日期:2016-03-22)

(上接第 1950 页)

性回归方程 $Y=1.08X+1.84$, 其中 X 与 Y 分别代表贝克曼与罗氏皮质醇测定值结果), 但此测定值偏差并不影响临床判断, 二者的阳性符合率、阴性符合率均为 100%。

综上所述, 本次研究遵循 ISO15189 实验室认可要求, 建立了化学发光免疫法不同检测系统间的性能评价方法, 应用贝克曼和罗氏化学发光免疫分析系统对皮质醇的分析性能进行评估, 两分析系统均满足临床检验性能要求, 并且系统间的测值相关性良好, 但相互引证时需考虑二者间存在的系统性测定值偏差, 在临床判断时需结合各自参考范围进行分析。

参考文献

- [1] Foster LB, Dunn RT. Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma [J]. Clin Chem, 1974, 20(3):365-368.
- [2] Beisel WR, Diraimondo VC, Chao PY, et al. The influence of plasma protein binding on the extra-adrenal metabolism of cortisol in normal, hyperthyroid and hypothyroid subjects[J]. Metabolism, 1964, 13(10):942-951.
- [3] Newell-Price J, Trainer P, Besser M, et al. The diagnosis

and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states[J]. Endocr Rev, 1998, 19(5):647-672.

- [4] Schein RM, Sprung CL, Marcial E, et al. Plasma cortisol levels in patients with septic shock[J]. Crit Care Med, 1990, 18(3):259-263.
- [5] CLSI. EP12-A2 User protocol for evaluation of qualitative test performance; Approved guideline[S]. 2nd ed. Wayne, PA:CLSI, 2008.
- [6] 李金明, 申子瑜. 正确认识临床实验室认可与提高检验质量之间的关系[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2):136-139.
- [7] CLSI. C28-A3 Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved guidelines[S]. 3rd ed. Wayne, PA:CLSI, 2008.
- [8] CLSI. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; Approved guideline [S]. 2nd ed. Wayne, PA:CLSI, 2004.

(收稿日期:2016-01-12 修回日期:2016-03-18)