

• 论 著 •

## 3 种方法测定变应性鼻炎患者的变应原试验结果比较

闫津津<sup>1</sup>, 余昊<sup>1</sup>, 王美玲<sup>2</sup>

(1. 北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518000; 2. 北京大学第一医院检验科, 北京 100034)

**摘要:**目的 通过斑点免疫印迹法(dot-IBT)、荧光酶联免疫法(FEIA)测定变应性鼻炎患者血清的变应原特异性 IgE (sIgE), 皮肤点刺试验(SPT)检测变应原, 比较分析体外 dot-IBT、FEIA 与体内 SPT 的结果, 为临床提供准确可靠的 sIgE 实验数据。方法 37 例变应性鼻炎患者采用 dot-IBT、FEIA 检测 sIgE、SPT 测定变应原, 分别分析 dot-IBT、FEIA 的特异度和灵敏度, 通过 Kappa 检验分析 dot-IBT、FEIA 与 SPT 结果的一致性。结果 dot-IBT 法测定变应原灵敏度均较高, 其中树花粉、杂草花粉、真菌、尘螨和动物毛灵敏度都在 90.00% 以上, 特异度指标中, 杂草花粉、尘螨和动物毛的特异度最好(>90.00%), 一致性分析中杂草花粉、尘螨和动物毛一致性较高(Kappa 系数>0.9)。FEIA 法测定变应原的特异度较高, 树花粉、杂草花粉、霉菌、动物毛均在 90.00% 以上, 灵敏度指标中最好的是尘螨(100.00%)和动物毛(100.00%), 一致性分析中显示变应原的一致性均较高(Kappa 系数>0.6)。结论 dot-IBT 总体灵敏度较高, 快速, 需要血清量少, 可用于变应原 sIgE 的筛查。FEIA 法结果特异度较高, 灵敏度尚可, 有利于变应原的确定。综合 dot-IBT、FEIA 两种方法 sIgE 的结果, 并结合 SPT 及临床过敏症状共同确定变应原。

**关键词:**斑点免疫印迹法; 荧光酶联免疫法; 特异度 IgE; 皮肤点刺试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)24-3429-03

## Comparison of 3 kinds of method for performing allergen test in patients with allergic rhinitis

YAN Jinjin<sup>1</sup>, YU Hao<sup>1</sup>, WANG Meiling<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen,

Guangdong 518000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China)

**Abstract:** Objective To compare and analyze the results of in vitro dot immunoblotting (dot-IBT), fluorescent enzyme-linked immunoassay (FEIA) and in vivo skin prick test (SPT) by dot-IBT and FEIA for detecting allergen specific IgE (sIgE) and SPT for detecting allergens in order to provide accurate and reliable sIgE experiment data for clinic. **Methods** The allergens in 37 patients with allergic rhinitis were detected by SPT and sIgE was detected by dot-IBT and FEIA. The specificity and sensitivity of dot-IBT and FEIA were analyzed, and their consistency with SPT was analyzed through the Kappa test. **Results** The sensitivity of dot-IBT for detecting allergens was higher, which for detecting tree pollen, weeds pollen, fungi, dust mites and animal hair was more than 90.00%; in specific indicators, weeds pollen, dust mites and animal hair had best specificity (>90.00%), in the consistency analysis, weeds pollen, dust mites and animal hair had higher consistency (Kappa>0.9). The specificity of FEIA for detecting allergens was higher, which for detecting tree pollen, weeds pollen, moulds and animal hair all were above 90.00%; in the sensitivity indexes, the best was the dust mites (100.00%) and animal hair (100.00%), the consistency analysis showed the consistency of allergens was higher (Kappa>0.6). **Conclusion** dot-IBT has higher overall sensitivity with rapidness, needs less serum and can be used for the screening of allergen sIgE. The results of FEIA method has higher specificity, its sensitivity is general, which is helpful to determine the allergens. The allergens can be jointly determined by comprehensive sIgE results of dot-IBT and FEIA, and combining with SPT and clinical allergic symptoms.

**Key words:** dot immunoblotting; FEIA; specific IgE; skin prick test

变应性鼻炎是接触变应原后, 由 Th2 细胞介导的免疫炎症。Th2 细胞产生细胞因子, 如白细胞介素(IL)-4, IL-13, 诱导变态反应炎症的发生, 并诱导产生 IgE 抗体<sup>[1]</sup>。诊断变应性鼻炎的基础是看是否有过敏, 临床怀疑变应性鼻炎需要了解患者的变态反应病史, 而找到变应原是确诊变应性鼻炎的有力证据<sup>[2]</sup>。变应原检测的皮肤点刺试验(SPT)是目前诊断变态反应病中寻找变应原推荐的试验, 然而其常受药物、皮肤划痕症等条件的限制<sup>[2]</sup>。体外血清学检测特异度 IgE (sIgE) 不受身体等条件的限制弥补了 SPT 试验的不足, 斑点免疫印迹法(dot-IBT)和荧光酶联免疫法(FEIA)是目前体外检测 sIgE 应用较广泛的两种方法。FEIA 法是自 1989 年生产以来因其较好的灵敏度和特异度, 目前公认为较可靠的 IgE 试验方法<sup>[3]</sup>, 但其成本较高, 需要血清量较大, 使其临床应用受到较大限制。

dot-IBT 是近年来兴起的具有简单、快速、用血量较少的特点的 sIgE 试验, 可同时测定多种变应原组合, 成本较低。但临床试验中常发现 sIgE 结果与 SPT 结果不符的情况, 为了解体外 sIgE 不同检测方法与 SPT 结果的符合情况, 本文比较了 dot-IBT、FEIA 分别与 SPT 结果的异同。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2012 年 3 月至 2013 年 8 月北京大学第一医院就诊于耳鼻喉科确诊的变应性鼻炎患者 37 例, 男 18 例, 女 19 例, 年龄 4~70 岁, 中位年龄 36 岁。主诉有变应性鼻炎病史或接触变应原后出现相关变态反应病症状, 皮肤点刺试验(SPT)或(和)特异度 IgE 阳性。

**1.2 仪器与试剂** dot-IBT 采用德国欧蒙医学实验诊断股份公司的 EURO Blot Master 印迹法自动操作仪以及特异性变应

原(中国组合)检测试剂盒,佳能 Canoscanline 100 扫描判读系统。

**1.3 方法** SPT 将变应原液点于患者前臂屈侧皮肤,持点刺针将针尖垂直点压在液滴中,一液一针,不重复使用,破皮而不出血,且深度一致。SPT 点刺 20 min 后观察抗原的皮肤反应。

dot-IBT:用 dot-IBT 法检测 5 类血清变应原 sIgE,操作严格按照试剂盒说明书步骤如下:(1)加样。复融血清至室温,充分混匀后加入血清 150  $\mu$ L 至预先加有 1.0 mL 通用缓冲液及检测膜条的温育槽内,摇床温育 16 h;(2)清洗。吸取温育槽内液体,用 1.0 mL 通用缓冲液清洗膜条 3 次,每次 5 min;(3)加酶结合物。于各温育槽加入 1.0 mL 酶结合物,摇床温育 60 min 后重复上述清洗步骤 1 次;(4)加底物。每个温育槽中加入底物 1.0 mL,避光摇床温育 10 min 后终止反应;(5)取出检测膜条自然风干,采用专门软件自动判读结果。

FEIA:Immuno-CAP 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,经溴化氧化活化后与过敏原共价结合,过敏原预先结合在固相帽状物的 Immuno-CAP 中,37  $^{\circ}$ C 孵育,如患者血清中有针对该变应原的 sIgE,即形成抗此变应原抗体复合物,洗脱,加酶标记的兔抗人 IgE 抗血清(酶标二抗),形成固相载体-变应原-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。根据荧光吸光度的大小换算成 sIgE 的含量。

sIgE 的定量结果以 KU/L 为单位。

**1.4 结果判断** SPT:变应原风团反应与阴性对照相同为阴性;变应原分团反应范围为标准组胺分团反应范围的 1/4 为+;变应原分团反应范围为标准组胺分团反应范围的 1/2 为++;变应原分团反应范围为标准组胺分团反应范围为+++;变应原分团反应范围为标准组胺分团反应范围的 2 倍为++++。

dot-IBT:结果用扫描仪收集数据后,由专用软件根据条带着色强度自动判读结果。条带着色强度 < 3 为阴性,着色强度  $\geq$  3 为阳性。

FEIA:检测结果根据吸光度的大小换算成 IgE 结果。sIgE < 0.35 KU/L 为阴性,  $\geq$  0.35 KU/L 为阳性。

**1.5 统计学处理** 所有数据录入 Excel 中建立数据库。以 SPSS13.0 软件进行统计学分析,以 SPT 为比对方法, dot-IBT、FEIA 与其进行一致性检验, Kappa 系数  $\geq$  0.6 表示一致性较好, 0.4 < Kappa 系数 < 0.6 为中度一致, Kappa 系数  $\leq$  0.4 表示一致性较差。

**2 结 果**

**2.1 dot-IBT 方法评价** 以 SPT 为比对方法,评价 dot-IBT 与 SPT 测定结果的符合率见表 1。

**2.2 FEIA 方法评价** 以 SPT 为比对方法,评价 FEIA 与 SPT 测定结果的符合率见表 2。

表 1 dot-IBT 法检测变应原 sIgE 的性能

变应原	SPT		dot-IBT		阴性符合 (n)	阳性符合 (n)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	PPV	NPV	Kappa 系数	总符合率 (%)
	阴性(n)	阳性(n)	阴性(n)	阳性(n)								
树花粉	22	15	16	21	16	15	100.00	72.73	71.43	100.00	0.684	83.78
杂草	18	19	19	18	18	18	94.74	100.00	100.00	94.74	0.946	97.30
霉菌	30	7	18	19	18	7	100.00	60.00	36.84	100.00	0.362	65.57
尘螨	18	19	17	20	17	19	100.00	94.44	95.00	100.00	0.946	97.30
动物毛	27	10	26	11	26	10	100.00	96.30	90.91	100.00	0.934	97.30

表 2 FEIA 法检测变应原 sIgE 的性能

变应原	SPT		FEIA		阴性符合 (n)	阳性符合 (n)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	PPV	NPV	Kappa 系数	总符合率 (%)
	阴性(n)	阳性(n)	阴性(n)	阳性(n)								
树花粉	22	15	26	11	22	11	73.33	100.00	100.00	84.62	0.766	89.19
杂草	18	19	24	13	18	13	68.42	100.00	100.00	75.00	0.678	83.78
霉菌	30	7	32	5	30	5	71.43	100.00	100.00	93.76	0.802	94.60
尘螨	18	19	14	23	14	19	100.00	77.78	82.61	100.00	0.782	89.19
动物毛	27	10	25	12	25	10	100.00	92.60	83.33	100.00	0.871	94.59

表 3 变应原不同方法 ROC 曲线下面积

变应原	方法	约登指数	ROC 曲线下面积
树花粉	dot-IBT	0.727	0.767
	FEIA	0.733	0.839
杂草花粉	dot-IBT	0.947	0.868
	FEIA	0.684	0.842
霉菌	dot-IBT	0.600	0.743
	FEIA	0.714	0.857
尘螨	dot-IBT	0.944	0.947
	FEIA	0.778	0.915
动物毛	dot-IBT	0.963	0.950
	FEIA	0.926	0.978

**2.3 变应原不同方法 ROC 曲线下面积** 各种类变应原 dot-IBT、FEIA 法 ROC 曲线下面积结果见表 3。

**3 讨 论**

SPT 检测是将多种变应原刺入皮肤,模拟变应原接触的过程,诱发 I 型变态反应的发生,是直接观察机体对于变应原的反应,反映患者对变应原的真实情况,但结果易受到操作者的技术和经验影响,且标准变应原的含量和纯度也会有所不同<sup>[2]</sup>。dot-IBT 是根据某些固相载体具有较强吸附蛋白能力的特点建立起来的,是将经分离的变应原提取物吸附到膜条上作为固相。FEIA 是将变应原固定在亲水性的多聚纤维素上,经溴化氟活化后与变应原共价结合。两种方法的 sIgE 检测结

果不尽相同,王美玲等<sup>[4]</sup>对 dot-IBT 与 FEIA 两种方法进行了 sIgE 结果的比对,表明两者之间具有良好的一致性。但与 SPT 结果是否一致需进一步阐述。

本研究以变应性鼻炎患者为研究对象,选取了吸入性变应原中最常见的五类变应原,根据 dot-IBT 与 SPT 结果比对得出, dot-IBT 法测定变应原灵敏度较高,五类吸入性变应原灵敏度都在 90.00% 以上,特异度指标中,杂草花粉、尘螨和动物毛的特异度最好(>90.00%),一致性分析中杂草花粉、尘螨和动物毛一致性较高(Kappa 系数>0.9)。加之 dot-IBT 实验使用小型仪器,也可手工操作,操作过程简单,易于推广和普及,因此, dot-IBT 用于筛查试验结果较为理想。

FEIA 法与 SPT 结果比对得出, FEIA 法测定变应原的特异度较高,树花粉、杂草花粉、真菌、动物毛均在 90.00% 以上,灵敏度指标中最好的是尘螨(100.00%)和动物毛(100.00%),杂草花粉和霉菌的灵敏度较低,一致性分析中显示变应原的一致性均较高(Kappa 系数>0.6),总符合率高于 dot-IBT。FEIA 法中变应原的特异度较高,可用于确诊具体变应原的种类,但是 FEIA 使用大型仪器,价格较昂贵,普通实验室推广较为困难。

ROC 曲线分析中显示, FEIA 法对于测定树花粉、霉菌、动物毛变应原优于 dot-IBT 法,杂草、尘螨两种检测方法 dot-IBT 法的 ROC 曲线下面积大于 FEIA 法,两者曲线下面积均大于 0.7,说明两种方法检测结果与 SPT 一致性均较好,然而两种方法与 SPT 对于霉菌变应原的测定均较其他组低,自然界中可引起变态反应的霉菌变应原种类繁多,空气中大多为曲霉菌、链格菌、枝孢菌、念珠菌等, SPT 霉菌变应原提取物由多种霉菌组成, dot-IBT 中霉菌变应原中仅包括点青霉、分枝孢霉、烟曲霉和交链孢霉组成,而 FEIA 中霉菌变应原组成包括青霉、多住分枝孢霉、烟曲霉、白色假丝酵母菌、交链孢霉、长蠕孢霉,均无 SPT 中所包含的霉菌类型多,由此可能会漏掉某些霉菌变应原。可能是造成符合率低的原因之一;其二可能是由于人体产生的抗交叉反应性糖类决定簇(anti-CCDIgE)的影响,而抑制实验可提高变应原的符合率<sup>[6]</sup>。

3 种不同方法检测变应原中各类变应原所包含的具体变应原种类不尽相同,需要指出的是 3 种变应原检测方法所用的变应原提取物有的为天然变应原,有的为重组变应原<sup>[7-8]</sup>,有些是根据欧洲人群变应原设计的,有些是本国特有的变应原,并且同一类变应原中的变应原组分也不尽相同,提取制备的方法差别也较大<sup>[8-9]</sup>。现在对变应原主要组分研究相对成熟,是否可以制备标准化变应原提取物,有待进一步研究。

dot-IBT 与 FEIA 检测 sIgE 各有优缺点。 dot-IBT 由于包被变应原种类较多,可一次测定多种类型,总体灵敏度较高,可用于变应原的筛查试验,快速、需要血清量少、成本适中。 FEIA 法则结果特异度较高、灵敏度尚可,可用于变应原的确

定,对具体变应原种类有较好的指示作用。因此,对于变应原的确定需结合 SPT 和血清 sIgE 结果综合判断,根据患者的情况先进行 SPT 及血清 dot-IBT 法进行筛选变应原,再根据结果使用 FEIA 法进行变应原确诊。

参考文献

[1] Rantala A, Jaakkola JJ, Jaakkola MS. Respiratory infections in adults with atopic disease and IgE antibodies to common aeroallergens[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68582.

[2] Jung YG, Cho HJ, Park GY, et al. Comparison of the skin-prick test and Phadia Immuno CAP as tools to diagnose house-dust mite allergy[J]. Am J Rhinol Allergy, 2010, 24(3): 226-229.

[3] Bousquet J, Chanez P, Chanal I, et al. Comparison between RAST and Pharmacia CAP system; A new automated specific IgE assay[J]. J Allergy Clin Immunol, 1990, 85(6): 1039-1043.

[4] 王美玲,冯珍如,李志艳,等. 斑点免疫印迹法检测变应原特异性 IgE 抗体的比对分析[J]. 中国实验诊断学, 2010, 15(3): 430-432.

[5] 闫津津,冯珍如,王美玲,等. 北京地区人群血清抗交叉反应性糖类决定簇 IgE 检测与分布特征分析[J]. 中国全科医学, 2013, 16(27): 2520-2522.

[6] Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, et al. In vitro, hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition[J]. Allergy, 2006, 61(10): 1220-1229.

[7] De D, Khullar G, Handa S. Performance of a commercially available allergen series in the assessment of suspected occupational contact dermatitis to plants in north Indian patients[J]. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2015, 81(4): 376-379.

[8] Moverare R, Ahlstedt S, Bengtsson U, et al. Evaluation of IgE antibodies to recombinant peanut allergens in patients with reported reactions to peanut[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2011, 156(3): 282-290.

[9] Bolla M, Zenoni S, Scheurer S, et al. Pomegranate expresses several nsLTP isoforms characterized by different immunoglobulin E-binding properties[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2014, 164(2): 112-121.

(收稿日期:2016-09-06 修回日期:2016-10-25)

(上接第 3428 页)

Stability of intact chorionic gonadotropin (hCG) in serum, liquid whole blood, and dried whole-blood filter-paper spots: impact on screening for Down syndrome by measurement of free hCG subunit[J]. Clin Chem, 1993, 39(6): 1064-1068.

[20] Lambert-Messerlian GM, Eklund EE, Fergal D, et al. Stability of first- and second-trimester serum markers after storage and shipment[J]. Prenatal Diagnosis, 2006, 26(1): 17-21.

(收稿日期:2016-09-01 修回日期:2016-10-20)