

• 论 著 •

IIF与ELISA在抗磷脂酶A2受体抗体检测中相关性

符克英,蔡俊宏*,符生苗,韩叶光,王茹,张培

海南省人民医院肾病研究室,海南 海口 570311

摘要:目的 分析间接免疫荧光法(IIF)与酶联免疫吸附法(ELISA)对抗磷脂酶A2受体抗体(anti-PLA₂R)检测的相关性。方法 应用IIF与ELISA检测特发性膜性肾病患者血液中的anti-PLA₂R,并分析两种检测方法的相关性和临床应用的可行性。结果 IIF法检测血液中的anti-PLA₂R敏感性为76.7%,特异性为98.3%;ELISA法检测血液中的anti-PLA₂R,敏感性为73.3%,特异性为95.0%,两种方法敏感性和特异性比较差异无统计学意义($P>0.05$);两种方法相关性分析结果发现,其阳性符合率为93.6%,阴性符合率为95.9%,总符合率为95.0%,Kappa一致性检验的Kappa为0.895。结论 IIF法与ELISA法检测血液中anti-PLA₂R的结果相关性高,均可成为体外诊断特发性膜性肾病的特异性指标,两者有互补性,能为不同条件的实验室提供选择。

关键词:抗磷脂酶A2受体抗体;特发性膜性肾病;间接免疫荧光法;酶联免疫吸附法

中图分类号:R446.61 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2015)04-457-03

Correlation between indirect immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assay
in detecting anti-phospholipase A2 receptor antibody

FU Ke-ying, CAI Jun-hong*, FU Sheng-miao, HAN Ye-guang, WANG Ru, ZHANG Pei

Division of Nephrology Research, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan, P.R.China

Corresponding author: CAI Jun-hong, E-mail: cjh7506@163.com

Abstract: Objective To assess and analyze the correlation between indirect immunofluorescence (IIF) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in detecting anti-phospholipase A2 receptor antibody (anti-PLA₂R). **Methods** Anti-PLA₂R in blood of the patients with idiopathic membranous nephropathy (IMN) was detected by IIF and ELISA, and then the correlation and clinical feasibility of the methods were analyzed. **Results** The sensibility and specificity of IIF in detecting anti-PLA₂R in blood of the patients were 76.7% and 98.3%; the sensibility and specificity of ELISA were 73.3%, and 95.0%. The positive coincidence rate and negative coincidence rate of the two assays were 93.6% and 95.9%, the total coincidence rate was 95.0%, revealed significant differences, Kappa = 0.895. **Conclusion** The conformance of IIF and ELISA in detecting anti-PLA₂R is very well, and both of them can be used as specific indicators for diagnosing IMN in vitro. They are complementary to each other, providing laboratory choices under different conditions.

Key words: Phospholipase A2 receptor antibody; Idiopathic membranous nephropathy; Indirect immunofluorescence; Enzyme linked immunosorbent assay

特发性膜性肾病(IMN)是临床常见以大量蛋白尿或肾病综合征为主要表现的原发性肾小球疾病^[1-2],伴长期的肾功能衰竭风险,以及血栓和心血管并发症。在2009年自身抗原磷脂酶A2受体(PLA₂R)被鉴定以前,IMN的诊断主要通过肾脏穿刺、组织学检查或电镜观察^[1],但仅依靠组织病理学检查并不完全能够与其他原因引起的膜性肾病加以区别。我们应用间接免疫荧光法(IIF)与酶联免疫吸附法(ELISA)检测血液中anti-PLA₂R水平,分析其相关性,探讨其在IMN诊断中的意义和可行性。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象 收集2007年4月至2014年5月海

南省人民医院90例肾活检组织标本(石蜡常温保存),其中IMN 60例,狼疮性肾炎20例,乙肝相关性肾炎10例,同时收集相对应血液样本90例及健康献血员血液样本30例(-80℃保存),对肾活检组织行HE、PAS、PASM、Masson染色,免疫荧光检查及电镜检查,观察其病理改变。病例纳入标准:IMN根据肾脏病理光镜、电镜、免疫荧光诊断结合临床诊断纳入,典型的病理学特征是肾小球上皮和基底膜内免疫复合物沉积,伴节段性或球性硬化;免疫病理检查可见IgG和C3沿基底膜细颗粒状沉积;电镜下可见电子致密物在基底膜的不同部位沉积。排除标准:(1)狼疮性肾炎患者;(2)乙肝相关性肾炎患者。(3)肿瘤相关性膜性肾病;(4)其它可能引起膜性肾病的疾病。根据光

基金项目:海南省卫生厅立项课题(No.琼卫2012 PT-16)

作者简介:符克英(1971~),男,学士,副主任技师,研究方向:肾脏病实验室诊断。

***通讯作者:**蔡俊宏, E-mail: cjh7506@163.com

镜及电镜病理诊断将IMN血液设为IMN组;将狼疮性肾炎和乙肝相关性肾炎血液设为继发性膜性肾病组;健康献血员血液为健康对照组。

1.1.2 仪器和试剂 IIF和ELISA检测血液中的anti-PLA₂R水平,试剂盒均购自德国欧蒙医学实验诊断股份公司。

1.2 方法

1.2.1 IIF方法 检测血液中的anti-PLA₂R水平,IIF法采用包被有未转染及转染PLA₂R的EU90细胞为检测基质,操作方法按试剂盒提供方法进行。

1.2.2 ELISA方法 检测血液中的anti-PLA₂R水平,ELISA法采用包被有PLA₂R片段的抗原为检测基质,操作方法按试剂盒提供方法进行。

1.3 统计学分析 统计实验数据,计算各组检测的敏感性 & 特异性,采用SPSS18.0统计软件对计数资料

进行统计,对比资料进行Kappa一致性检验。

2 结果

2.1 IIF和ELISA检测结果 IIF方法检测血液中的anti-PLA₂R,在阳性样本均可见anti-PLA₂R与基质的转染细胞反应,引起特异性胞浆荧光。敏感性为76.7%,特异性为98.3%,30例健康献血员血液样本全部阴性。ELISA方法检测血液中的anti-PLA₂R,敏感性为73.3%,特异性为95.0%。30例健康献血员血液样本全部阴性,两种方法敏感性、特异性比较差异均无统计学意义($\chi^2=0.178,0.259,P>0.05$),见表1。

2.2 IIF检测与ELISA检测结果比较 IIF与ELISA检测血液中的anti-PLA₂R,两者阳性符合率为93.6%,阴性符合率为95.9%,总符合率为95.0%,Kappa一致性检验Kappa为0.895,见表2。

表1 IIF和ELISA检测血液中的anti-PLA₂R结果
Table 1 Results of anti-PLA₂R in the patients' bloods detected by IIF

组别 Groups	例数 No.case	IIF		ELISA	
		阳性数(%)	阴性数(%)	阳性数(%)	阴性数(%)
		No.positive cases(%)	No.negative cases(%)	No.positive cases(%)	No.negative cases(%)
IMN组 IMN group	60	46(76.7)	14(23.3)	44(73.3)	16(26.7)
继发性膜性肾病组 Secondary membranous nephropathy group	30	1(3.3)	29(96.7)	3(10.0)	27(90.0)
健康对照组 Healthy control group	30	0(0.0)	30(100.0)	0(0.0)	30(100.0)

表2 IIF与ELISA法检测anti-PLA₂R的相关性分析
Table 2 Correlation of the results detected by IIF and ELISA

ELISA	IIF		小计 Total
	阳性 No.positive cases	阴性 No.negative cases	
阳性 Positive cases	44	3	47
阴性 Negative cases	3	70	73
总计 Total	47	73	120

Kappa=0.895

3 讨论

磷脂酶A2受体(PLA₂R)属于I型跨细胞膜受体,是哺乳动物甘露糖受体家族4个成员之一。PLA₂R主要分为两型(M型与N型),已经确认M型PLA₂R是自身抗体的主要靶抗原^[3-5]。PLA₂R主要在肾小球足细胞呈高表达,并与IgG4共定位于IMN患者肾小球的免疫复合物沉积中,从IMN患者沉积物中洗脱的IgG可识别PLA₂R,因此PLA₂R是导致IMN的一个主要抗原,检测循环血液中的anti-PLA₂R对于诊断和监测IMN的活动很可能具有重要作用^[3,6]。有研究表明,anti-PLA₂R滴度与IMN疾病活动度有关,也可以作为评

价治疗效果的一项指标^[2-5],在一般情况下,抗体浓度的增高、减少、或消失先于临床表现,对临床缓解、复发或肾移植后复发风险评估方面有较高的预测价值。

2009年Beck等采用Western印迹法在37例IMN患者血液中有26例检出了M型PLA₂R,研究认为检测循环血液中的anti-PLA₂R对于诊断和监测IMN的活动很可能具有重要作用^[3,6]。秦卫松等报道认为anti-PLA₂R对于IMN具有很高的特异性,其血液中抗体的滴度可用于判断患者的疗效和预后^[7]。周广宇等报道认为anti-PLA₂R可能是IMN的特异性抗体和致病性抗体^[8]。Hofstra JM等研究认为anti-PLA₂R水平可作为IMN活动和治疗结果的监测工具^[9-10]。

根据国外报道,免疫组织化学法可以用来检测anti-PLA₂R^[3],以转染细胞作为检测基质的IIF方法是血液学筛查anti-PLA₂R的一种便捷可靠方法,适于anti-PLA₂R的定性与定量分析^[3,11-13]。而ELISA方法中以转染细胞中纯化的人重组的PLA₂R蛋白作为包被抗原,同样适合于人anti-PLA₂R的定性和半定量检测,且相对来说更具有定量检测的优势,对实验室设备条件和人员条件要求更低。

本研究结果显示, IIF方法检测患者血液中的 anti-PLA₂R, 敏感性、特异性略优于 ELISA 方法, 而健康献血员血液样本 30 例中, 两种方法均无阳性结果。两种方法检测结果的相关性分析发现, 总符合率高达 95.0%, Kappa 一致性检验, 一致性也非常好。在本次研究中, 有 14 例临床确诊 IMN 患者 IIF 结果为阴性, 16 例临床确诊 IMN 患者 ELISA 结果为阴性, 可能与以下几点有关: 第一、IMN 患者体内可能存在除了 PLA₂R 受体以外的自身抗体靶抗原; 第二、在样本采集时, IMN 患者正处于病情缓解阶段或治疗过程中, 病理性免疫活动处于低水平状态, 自身抗体的滴度降低; 第三、由于转染细胞内靶抗原的表达水平和构象的影响, 造成检测 anti-PLA₂R 的误差。对照组中, IIF 有 1 例阳性, ELISA 有 3 例阳性, 是否存在 IMN 与继发性膜性肾病混合表现的可能, 还有待于进一步的研究。

综上所述, 应用包被有未转染及转染 PLA₂R 的 EU90 细胞为检测基质的 IIF 方法与包被有 PLA₂R 片段为抗原检测基质的 ELISA 方法, 检测患者血液中的 anti-PLA₂R 均可作为体外诊断 IMN 的特异性指标。IIF 方法敏感性和特异性略高于 ELISA 方法, 也可以 10 为稀释因子做进一步稀释, 如 1:100、1:1 000、1:10 000 等, 达到半定量的结果, 但需要实验室配备有专业荧光显微镜, 同时要求实验室人员具备荧光判读结果的经验, 如果所有细胞的细胞核或细胞浆都被染色, 可能是由抗核抗体、抗线粒体抗体或其它细胞抗体引起的。ELISA 方法虽然敏感性、特异性略低于 IIF 方法, 但具有定量的优势, 且最低检出限可达 0.6RU/mL。另外, 当血红蛋白浓度达到 10mg/mL 的溶血、甘油三酯浓度达到 20mg/mL 的脂血、胆红素浓度达到 0.4mg/mL 的黄疸血液对检测结果均没有干扰, 因此 ELISA 方法更适合于基层实验室的检测, 两者具有互补性。

参考文献

- [1] Ponticelli C, Passerini P. Can prognostic factors assist therapeutic decisions in idiopathic membranous nephropathy[J]? J Nephrol, 2010, 23(2): 156-163.
- [2] Fervenza FC, Sethi S, Specks U. Idiopathic membranous nephropathy: diagnosis and treatment[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2008, 3(3): 905-919.
- [3] Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy[J]. N Engl J Med, 2009, 361(1): 11-21.
- [4] Ronco P, Debiec H. Antigen identification in membranous nephropathy moves toward targeted monitoring and new therapy[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(4): 564-569.
- [5] Beck LH Jr, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead[J]. Kidney Int, 2010, 77(9): 765-770.
- [6] Beck LH Jr, Fervenza FC, Beck DM, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA₂R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(8): 1543-1550.
- [7] Qin W, Beck LH Jr, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(6): 1137-1143.
- [8] 周广宇, 金玲, 于晶, 等. 成人膜性肾病患者血清抗 PLA₂R 抗体与病情的相关性[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(2): 111-114.
- [9] Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2011, 6(6): 1286-1291.
- [10] Hofstra JM, Wetzels JF. Anti-PLA₂R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice[J]? Neth J Med, 2012, 70(3): 109-113.
- [11] Stöcker W, Wessel S, Morrin M, et al. Konstante Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie [P]. Deutsche Patentanmeldung (Offenlegungsschrift) DE: 10 2006 027 518.7, 2006.
- [12] Stöcker W, Fauer H, Krause C, et al. Verfahren zur Optimierung der automatischen Fluoreszenzerkennung in der Immundiagnostik[P]. Deutsche Patentanmeldung (Offenlegungsschrift) DE: 10 2006 027 516.0 und WO2007/140952, 2006.
- [13] Stöcker W, Voigt JF, Berg S, et al. Netzplangesteuertes Verfahren zur Sicherstellung der Authentizität und Qualität visuell erhobener Befunde in der indirekten Immunfluoreszenz [P]. Europäische Patentanmeldung: PCT/EP2007/062217, 2007.

收稿日期: 2015-01-13 编辑: 符式刚