

Luminex 法检测肾移植受者体内抗 HLA 抗体的方法学分析*

刘 伟,李代红[△],宋广平

(天津市第一中心医院输血科 300192)

[摘要] **目的** 比较 Luminex 技术和酶联免疫吸附试验(ELISA)两种方法对肾移植受者血清中抗人类组织相容性抗原(HLA)抗体的检测差异及其与移植术后排斥反应的关系。**方法** 对 2017 年 1—10 月接受肾移植的 120 例受者中,同时应用 Luminex 和 ELISA 两种方法检测肾移植患者血清中的抗 HLA 抗体,并记录术后发生排斥反应的情况。**结果** 用 Luminex 技术检测抗 HLA-I 类抗体阳性率为 20.8%(25/120),检测抗 HLA-II 类抗体阳性率为 32.5%(39/120);用 ELISA 法检测抗 HLA-I 类抗体阳性率为 8.3%(10/120),检测抗 HLA-II 类抗体阳性率为 15.0%(18/120);两种方法检测抗 HLA-I 类、II 类抗体阳性率的差异有统计学意义($P<0.05$)。用 Luminex 技术检测 51 例术前抗 HLA 抗体阳性者有 12 例术后发生排斥反应,69 例术前抗 HLA 抗体阴性者有 5 例术后发生排斥反应;用 ELISA 法检测 20 例术前抗 HLA 抗体阳性者有 3 例术后发生排斥反应,100 例术前抗 HLA 抗体阴性者有 14 例术后发生排斥反应,两种方法检测的抗体阳性中排斥反应发生率差异有统计学意义($P<0.05$),两种方法检测的抗体阴性中排斥反应发生率差异也有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Luminex 技术与 ELISA 法相比,检测肾移植受者体内抗 HLA 抗体的检出率高,而且对移植后排斥反应的监测有重要的诊断意义。

[关键词] 流式荧光检测技术;肾移植;HLA 抗原;酶联免疫吸附测定**[中图分类号]** R699.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)30-3878-03

Luminex method for the detection of anti HLA antibody in renal transplant recipients*

LIU Wei, LI Daihong[△], SONG Guangping

(Department of Blood Transfusion, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

[Abstract] **Objective** To compare the differences of Luminex technology and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of anti-HLA antibodies in renal transplant recipients and their relationship with rejection after transplantation. **Methods** Luminex and ELISA were used to detect anti-HLA antibodies in serum of renal transplant patients ($n=120$) who underwent renal transplantation from January 2017 to October 2017, and the postoperative rejection was recorded. **Results** The positive rate of anti-HLA-I antibody was 20.8% (25/120) and the positive rate of anti-HLA-II antibody was 32.5% (39/120) which detected by Luminex technique; The positive rate of anti-HLA-I antibody was 8.3% (10/120) and the positive rate of anti-HLA-II antibody was 15.0% (18/120) which detected by ELISA. Fifty-one patients who were tested as anti-HLA antibody positive by Luminex, 12 patients had postoperative rejection, 69 patients who were tested as anti-HLA antibody negative by Luminex, 5 patients had postoperative rejection; 20 patients who were tested as anti-HLA antibody positive by ELISA, 3 patients had postoperative rejection, 100 patients who were tested as anti-HLA antibody negative by ELISA, 14 patients had postoperative rejection, there was a statistically significant difference in the incidence of rejection between the positive antibodies detected by the two methods ($P<0.05$). There was also a statistically significant difference in the incidence of rejection between negative antibodies detected by the two methods ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with ELISA, Luminex method has a high detection rate of anti-HLA antibody in renal transplant recipients, and it has important diagnostic significance for monitoring the rejection after transplantation.

[Key words] Luminex; kidney transplantation; HLA antigens; enzyme-linked immunosorbent assay

肾移植是目前临床上治疗肾脏器官功能丧失最有效的治疗手段。国内外研究表明,肾移植前对受者

抗人类组织相容性抗原(HLA)抗体进行监测,对预测移植风险、避免排斥反应的发生等具有重要意义^[1]。

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金面上项目(81500574)。
△ 通信作者, E-mail: ldh_hla@163.com。

作者简介:刘伟(1980—),副主任技师,硕士,主要从事临床输血与移植

免疫的研究。

表 1 两种方法检测抗 HLA、HLA-I 类、HLA-II 类抗体阳性情况

检测结果	Luminex			ELISA		
	抗 HLA 抗体	抗 HLA-I 类抗体	抗 HLA-II 类抗体	抗 HLA 抗体	抗 HLA-I 类抗体	抗 HLA-II 类抗体
阳性(n)	51	25	39	20	10	18
阴性(n)	69	95	81	100	110	102
阳性率(%)	42.5	20.8	32.5	16.7	8.3	15.0

当受者体内存在抗 HLA 抗体,特别是供者特异性抗体时,若移植前能够及时检测出此类抗体,在选择供体上可避开具有相应抗原的供者,则可避免潜在的免疫反应发生。而在肾移植后出现抗 HLA 抗体,则大多会发生排斥反应,如果治疗延缓则可导致移植失败^[2-3]。

随着抗 HLA 抗体检测方法灵敏度和特异性的进一步提高,移植受者体内抗 HLA 抗体的检出率上升到 95%,其检测技术的进步对肾移植临床的诊断和治疗具有更强的指导意义^[4-5]。本研究通过比较 Luminex 技术和酶联免疫吸附试验(ELISA)两种方法对肾移植受者血清中抗 HLA 抗体的检测差异并分析其与移植术后排斥反应的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 1—10 月在本院接受肾移植的患者 120 例,其中男 78 例,女 42 例,平均年龄(44.0±7.5)岁。所有肾移植供受者 ABO 血型相同,术前淋巴细胞毒试验均小于 10%。术后常规采用环孢素 A(他克莫司)+吗替麦考酸酯+泼尼松三联免疫抑制方案治疗。

1.2 试剂与仪器 HLA 抗体筛查试剂盒和 HLA 抗体确定试剂盒由美国 One Lambda 公司生产;Lifecodes LMX 试剂盒和 Lifecodes LSA 单抗(I+II)试剂盒由美国 Immucor 公司提供。洗板机和酶标仪由 Bio-RAD 公司提供;Luminex 200 由美国 Luminex 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 Luminex 技术检测 将 20.00 μL 洗液、2.50 μL 荧光微球和 6.25 μL 待检血清加入到 96 孔板中,盖上封板膜,用锡箔纸包严反应板,室温振荡孵育 30 min。然后每反应孔加入 50 μL 洗液,洗后用真空泵抽掉洗液,每孔加入 120 μL 洗液,洗涤 3 次,洗后用真空泵抽掉洗液。然后,每孔加 25 μL 稀释的二抗,用锡箔纸包严反应板,室温振荡孵育 30 min。每孔加 100 μL Wash Buffer,小心混匀重悬微珠。上 Luminex200 平台获取特异性结合微球的荧光信号,再利用 MATCH IT Antibody 分析软件分析得到特异性抗原的类型。检测抗 HLA 抗体的强度以平均荧光强度表示,可分为强阳性、中阳性和弱阳性 3 个危险度分层。

1.3.2 ELISA 法检测 在 Lambda 抗原板相应孔中加已稀释的 10 μL 标本与质控血清,室温放置 1 h。

加 15~20 μL 稀释好的洗液,轻轻混匀,反复洗涤 3 次,然后在 Lambda 抗原板所有孔中加 10 μL 酶标二抗,室温放置 40 min,洗涤 3 次。然后加入 10 μL 混合的底物液,室温放置 10~15 min。最后加入 5 μL 终止液,15 min 后上酶标仪检测其光密度(OD)值。

1.4 排斥反应的诊断 根据受者的病史、临床症状及体征、实验室检查指标、彩色多普勒超声检查结果,移植肾病理结果及抗排斥反应治疗的效果等进行综合评价。

1.5 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法检测抗 HLA 抗体的阳性率比较 在 120 例肾移植患者的血清样本中,Luminex 技术抗 HLA 抗体阳性(I 类阳性且/或 II 类阳性)血清样本 51 例,占总数的 42.5%;ELISA 法抗 HLA 抗体阳性(I 类阳性且/或 II 类阳性)血清样本 20 例,占总数的 16.7%。Luminex 技术抗 HLA 抗体阳性检出率明显高于 ELISA 法($P < 0.05$)。Luminex 技术检测抗 HLA-I 类抗体阳性为 25 例,占总数的 20.8%,ELISA 法检测抗 HLA-I 类抗体阳性为 10 例,占总数的 8.3%,两种方法检测抗 HLA-I 类抗体结果的符合率为 40%。Luminex 技术检测抗 HLA-II 类抗体阳性为 39 例,占总数的 32.5%,ELISA 法检测抗 HLA-II 类抗体阳性为 18 例,占总数的 15%,两种方法检测抗 HLA-II 类抗体结果的符合率为 46%。两种方法所测结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 两种方法检测抗 HLA 抗体结果与排斥反应的关系 120 例肾移植受者中,术后有 17 例发生排斥反应(14.2%)。Luminex 技术检测结果显示:51 例术前抗 HLA 抗体阳性者有 12 例术后发生排斥反应(占 23.5%),69 例术前抗 HLA 抗体阴性者有 5 例术后发生排斥反应(占 7.2%),按照平均荧光强度分析,抗 HLA 抗体滴度强阳性 10 例,中阳性 7 例术后出现移植肾功能异常。用 ELISA 法检测 20 例术前抗 HLA 抗体阳性者有 3 例术后发生排斥反应(占 15.0%),100 例术前抗 HLA 抗体阴性者有 14 例术后发生排斥反应(占 14.2%),按照 OD 值分析,抗 HLA 抗体滴度强阳性 5 例,中阳性 12 例术后出现移植肾功能异

常。两种方法检测的抗体阳性中排斥反应发生率差异有统计学意义($P < 0.05$),两种方法检测的抗体阴性中排斥反应发生率,差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

近年来,通常把 ELISA 技术作为检测抗 HLA 抗体的常规方法,但该方法只能检测到血清学分型水平(例如 DR1),特异性不强,导致在肾脏移植供者筛选时部分合适供者漏选。此外,应用 ELISA 法检测抗 HLA 抗体,操作繁琐,耗时,多次洗板容易造成污染,导致假阳性结果的出现^[6]。Luminex 技术是继人类基因组计划完成后逐渐发展起来的集流式细胞技术、激光技术、数字信号处理技术及传统化学技术为一体的新型生物分子检测技术,其原理是在不同荧光编码的聚苯乙烯微球上进行抗原-抗体-酶-底物、配体-受体的结合反应及核酸杂交反应、通过红、绿两束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定量和定性的目的。Luminex 技术主要有以下优点^[7-8], (1)高通量:可以对同一样本中的多种不同目的分子同时进行实时、定性、定量分析;(2)所需样本量少:在同一个反应孔中可以同时完成 100 种不同的生物学反应,可以显著地节约了标本用量;(3)灵敏度高:微球表面积大,每个微球可包被 10 万个捕获抗体,高密度的捕获抗体保证了最大程度地与样本中的抗原分子结合,提高检测灵敏度;(4)准确性高:微球上的报告分子荧光强度与结合的待测分子成正比;(5)重复性好:相对于 ELISA, Luminex 技术液相芯片中的荧光读值更加直接、稳定、灵敏,最终取荧光强度的中值作为结果;(6)自动化程度高:应用计算机软件自动读取数据和相应软件分析结果,减少人为主观判断错误,增加了结果的准确性。

有文献报道, Luminex 技术灵敏度和特异度都远远高于以 ELISA 为代表的传统检测受者抗 HLA 抗体水平的技术^[9]。本研究结果显示在 120 例肾移植患者的血清标本中, Luminex 技术抗 HLA 抗体阳性(I 类阳性且/或 II 类阳性)血清样本 51 例,占总数的 42.5%; ELISA 法抗 HLA 抗体阳性(I 类阳性且/或 II 类阳性)血清样本 20 例,占总数的 16.7%。Luminex 技术抗 HLA 抗体的阳性检出率明显高于 ELISA 法($P < 0.05$)。王庆华等^[10]对 34 例亲体肾移植受者进行两种方法学的比较,证实 Luminex 技术检测肾移植受者抗 HLA 抗体的阳性检出率明显高于 ELISA 法。

有研究证实,肾移植患者术前抗 HLA 抗体的存在与术后排斥反应的风险增加显著相关^[11]。本研究通过对 120 例肾移植受者移植前抗 HLA 抗体的检测和移植后出现排斥反应的病例分析,发现 120 例肾移植受者中,术后有 17 例发生排斥反应(14.2%)。两种方法检测的抗 HLA 抗体阳性中排斥反应发生率差

异有统计学意义($P < 0.05$),两种方法检测的抗 HLA 抗体阴性中排斥反应发生率差异也有统计学意义($P < 0.05$)。由此可见,用 Luminex 技术检测出的抗 HLA 抗体水平与排斥反应的发生具有更强的相关性,临床预警效果更为明显。

Luminex 技术能够更精确地判断出抗 HLA 抗体阳性是否为抗供者特异性抗体(DSA),便于筛选移植供体,有效地缩短了高致敏患者的等待时间,避免了供体的浪费,同时为急性排斥反应的诊断和治疗提供了有力的技术支撑。近年来,有研究表明,供者特异性 HLA-DP 抗体能介导急、慢性排斥反应^[12]。然而, ELISA 法检测 HLA-II 类抗体中的 HLA-DQ/DP 抗体时常出现漏检,而 Luminex 技术包被的单抗原微球位点远多于 ELISA 法,增加了抗 HLA 抗体检出的宽度。

总之,肾移植术前准确地检测出受者的抗 HLA 抗体水平,判断其 HLA 致敏状态,对有效减少排斥反应的发生,提高移植成功率和移植物长期存活率具有重要的意义。同时有利于肾移植术后方案的调整,避免移植术前抗 HLA 抗体,减少抗体介导的排斥反应的发生风险,有利于改善受者的生活质量。

参考文献

- [1] SELLARÉS J, REEVE J, LOUPY A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(4):971-983.
- [2] LOUPY A, LEFAUCHEUR C, VERNEREY D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(13):1215-1226.
- [3] DUQUESNOY R J. HLA epitope based matching for transplantation[J]. *Transpl Immunol*, 2014, 31(1):1-6.
- [4] HALLORAN P F, REEVE J P, PEREIRA A B, et al. Antibody-mediated rejection, T cell-mediated rejection, and the injury-repair response: new insights from the Genome Canada studies of kidney transplant biopsies[J]. *Kidney Int*, 2014, 85(2):258-264.
- [5] DELVILLE M, CHARREAU B, RABANT M, et al. Pathogenesis of non-HLA antibodies in solid organ transplantation; where do we stand? [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(11):1055-1062.
- [6] MEHRA N K, SIDDIQUI J, BARANWAL A, et al. Clinical relevance of antibody development in renal transplantation[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1283:30-42.
- [7] TANG Y W, GONSALVES S, SUN J Y, et al. Clinical evaluation of the luminex NxTAG respiratory pathogen panel[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(7):1912-1914.
- [8] KHALIFIAN S, RAIMONDI G, BRANDACHER G. The use of luminex assays to measure cytokines[J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 135(4):1-5.
- [9] SUSAL C O G, VALUE O. Role and value of lumine®-detected HLA antibodies before and (下转第 3884 页)

回归分析结果显示受教育年限进入方程,说明除教育程度、BMI 外,FMD 是老年正常高值血压患者认知功能障碍的独立影响因素。老年正常高值血压患者受教育程度越低、BMI 越高,越容易出现认知功能障碍,这与以往的研究一致^[18]。同时老年正常高值血压患者 FMD 越低,也越容易出现认知功能障碍。受教育程度高作为认知功能损害的一个保护性因素已得到公认,而 BMI 升高易发生认知功能障碍也被既往的研究证实^[18]。本研究分析 FMD 影响老年正常高值血压患者认知功能的机制可能为:当 FMD 降低,内皮细胞功能障碍时可打破血管内环境的稳态,引起血小板聚集、黏附因子表达增加、血管收缩、平滑肌细胞增生和迁移等导致 AS 的发生^[4]。而 AS 可引起脑血流动力学发生改变,动脉壁增厚导致血管腔变窄,降低颅内动脉灌注压,血流量减少导致低灌注。导致大脑慢性缺血和能量供应减少,最终导致认知功能障碍^[10]。

综上所述,本研究表明,老年正常高值血压患者认知功能障碍与血管内皮依赖性舒张功能存在相关性,FMD 降低可能是老年正常高值血压患者认知功能障碍的独立危险因素。但本研究为单纯病例对照研究,且研究病例数相对较少,故未来需要进一步研究论证。

参考文献

- [1] 罗晓佳,胡咏梅. 正常高值血压临床研究进展[J]. 中华高血压杂志,2015,23(6):526-529.
- [2] 顾培. 老年认知障碍的临床及药物治疗进展[J]. 天津药学,2017,29(2):71-74.
- [3] 周涛,范忠. 血管内皮细胞与动脉粥样硬化的关系[J]. 现代医药卫生,2016,32(5):708-771.
- [4] 高文静,刘雪梅,沈志霞,等. 颈动脉硬化及脑梗死与老年人认知功能障碍的相关性研究[J]. 山东医药,2009,49(23):48-49.
- [5] 张福娟,陈立. H 型高血压与认知功能障碍的相关性研究[J]. 河北医学,2016,22(4):614-615.
- [6] CORRETTI M C, ANDERSON T J, BENJAMIN E J, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial

artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(2): 257-265.

- [7] MA W, YANG Y, QI L T, et al. Relationship between high normal blood pressure and carotid artery atherosclerosis in Beijing residents[J]. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2014, 42(6): 510-514.
- [8] 杨郑,孙颖. 老年心血管病与认知功能障碍的相关性[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(1): 97-99.
- [9] 周辰,潘晓东,徐俊,等. 认知障碍简明评价量表对老年慢性阻塞性肺疾病患者认知功能的评估价值[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(4): 349-352.
- [10] 陈艳春,周晓辉. 老年轻度认知功能障碍影响因素研究进展[J]. 实用老年医学, 2012, 26(1): 71-74.
- [11] 费敏,柴常运. 血管性认知功能障碍与颈动脉粥样硬化斑块及尿酸水平的相关性研究[J]. 临床医药实践, 2017, 26(3): 204-205.
- [12] 陈乔,杨小利,张骏,等. 微泡及其与动脉粥样硬化发生的关系研究进展[J]. 重庆医学, 2015, 44(24): 3441-3444.
- [13] REKHVIASHVILI A, ABASHIDZE R. The relationship between endothelial dysfunction and 24-hour blood pressure rhythm in patients with arterial hypertension[J]. Georgian Med News, 2008(155): 13-17.
- [14] 李玲,秦宇宏,姜树强,等. 不同疾病人群血管内皮功能与颈动脉超声检测的关系[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(7): 1718-1720.
- [15] 罗贤都,胡伟通,苏海,等. 临床常用血管内皮功能无创检测进展[J]. 中华高血压杂志, 2016, 24(4): 128-131.
- [16] YANG H N, LUO S X. Application and progress of telephone interview for cognitive status in cardiovascular disease[J]. Adv Cardiovasc Dis, 2017, 38(3): 310-313.
- [17] CHARAKIDA M, DE GROOT E, LOUKOGEOR-GAKIS S P, et al. Variability and Reproducibility of low-mediated dilatation in a multicentre clinical trial [J]. Eur Heart J, 2013, 34: 3501-3507.
- [18] MARFELLA R, PAOLISSO G. Increased arterial stiffness trumps on blood pressure in predicting cognitive decline in Low-Risk populations[J]. Hypertension, 2016, 67(1): 30-31.

(收稿日期:2018-05-11 修回日期:2018-06-26)

(上接第 3880 页)

- after kidney transplantation[J]. Transfus Med Hemother, 2013, 40(3): 190-195.
- [10] 王庆华,尚乐乐,唐敏英,等. Luminex 技术与 EILSA 方法检测抗 HLA 抗体在肾移植急性排斥反应中的作用[J]. 中华器官移植杂志, 2013, 34(8): 455-457.
- [11] YAMANAGA S, WATARAI Y, YAMAMOTO T, et al. Frequent development of subclinical chronic antibody-mediated rejection within 1 year after renal transplantation with pre-transplant positive donor-specific antibodies and

negative CDC crossmatches[J]. Hum Immunol, 2013, 74(9): 1111-1118.

- [12] FREITAS M C, REBELLATO L M, OZAWA M, et al. The role of immunoglobulin-G subclasses and C1q in de novo HLA-DQ donor-specific antibody kidney transplantation outcomes[J]. Transplantation, 2013, 95(9): 1113-1119.

(收稿日期:2018-05-20 修回日期:2018-07-04)