

血“战”到底

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003090

单抗原免疫微珠法在人组织相容性抗原反应抗体检测中的局限性及影响因素分析

申林果¹,王杨²,刘玲¹,李蜀婧¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院泌尿肾病中心,重庆 400010;2. 陆军军医大学第一附属医院检验科,重庆 400038)

【摘要】人组织相容性抗原反应抗体(human leukocyte antigen-antibody, HLA-Ab)的检测已成为诊断及检测肾移植术后排斥反应的重要指标。单抗原免疫微珠法(single antigen beads, SAB)是一种灵敏度高、特异性强的HLA-Ab检测方法。然而,SAB检测结果的分析和解释较为复杂,需要综合考虑多方面的影响因素。本文将讨论使用此方法对HLA-Ab进行检测时的局限性、影响因素及解决办法。希望可以通过对上述问题的探讨来进一步完善SAB检测结果的解读与应用。

【关键词】单抗原免疫微珠法;排斥反应;人组织相容性抗原反应抗体

【中图分类号】R446

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-09

Analysis of the limitations and influencing factors of single antigen beads in the detection of human leukocyte antigen-antibody

Shen Linguo¹, Wang Yang², Liu Ling¹, Li Shujing¹

(1. Urinary Nephropathy Center, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Clinical Laboratory, The Southwest Hospital of Army Medical University)

【Abstract】The detection of human leukocyte antigen-antibody(HLA-Ab)has become an important indicator for the diagnosis and detection of rejection after renal transplantation. Single antigen beads(SAB)is a highly sensitive and specific HLA-Ab detection method. However, the analysis and interpretation of SAB results are complex, and multiple factors need to be comprehensively considered. In this article, we will discuss the limitations, influencing factors and solutions for HLA-Ab detection using this method. It is hoped that the interpretation and application of SAB results can be further improved by discussing the above problems.

【Key words】single antigen beads; rejection; human leukocyte antigen-antibody

肾脏移植是治疗终末期肾病的主要方式,但是器官来源的短缺极大地限制了移植手术的数量。即使进行了肾移植手术,术后排斥反应的发生也影响着移植肾的远期存活。随着人组织相容性抗原反应抗体(human leukocyte antigen-antibody, HLA-Ab)检测技术的不断发展,很大程度上预防了超急性排斥反应的发生,同时也为早期诊断抗体介导的排斥反应(antibody mediated rejection, ABMR)提供了帮助^[1-2]。

HLA-Ab检测多基于细胞学的检测方式,灵敏度欠佳且影响因素较多,尤其是无法确定抗体产生的位点。单抗原免

作者介绍:申林果,Email:753052449@qq.com,

研究方向:移植免疫、移植相关感染。

通信作者:李蜀婧,Email:lsj327@163.com。

基金项目:四川省科技计划重大资助项目(编号:2020YFQ0055);

重庆市自然科学基金面上资助项目(编号:cstc2020jcyj-msxmX0240)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.1155.040.html>

(2022-08-31)

疫微珠法(single antigen beads, SAB)是基于Luminex检测平台的新型HLA-Ab检测方式,其本质是“液相悬浮芯片技术”,也称xMAP技术。xMAP技术将荧光编码微球技术、激光分析技术、流式细胞技术、高速数字信号处理技术和计算机运算法则等多项技术进行整合。单一抗原检测的优势在于采用纯化抗原,可以确定捕获抗体的种类。当其与xMAP技术结合后,可解决HLA多样性的问题,实现多种类抗体的高通量检测。SAB技术先将基因重组体外表达纯化的HLA抗原分别包被于不同标记的聚苯乙烯微珠上,然后对抗体进行捕获并标记荧光素,接着采用双色激光进行微珠的识别与荧光值的读取。对于检测到的荧光值,采用数据分析软件去除背景值并进行计算,最终得到不同HLA位点的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)值^[3-5]。该技术不仅可以显示抗体的荧光强度,同时也可分辨出抗体产生的HLA抗原位点。而且单一纯化抗原在微珠上的密度远高于自然细胞,所以SAB技术比细胞水平的抗体检测有更高的敏

感性。

SAB 技术具有高通量、快速、高特异性、可以半定量且可分辨特异性抗原位点的特性,使器官移植诊治领域取得了突破性的进展。不过,此技术也存在一定的不足,如因为包被抗原谱有限而造成的漏检,以及因为抗原变性造成假阳性等问题。本文将从 SAB 与现有抗体检测技术的比较以及 SAB 技术的局限性、影响因素等方面进行讨论,希望此技术能够更好地服务于临床工作。

1 与常用 HLA-Ab 检测技术的比较

1.1 临床常用的 HLA-Ab 检测技术

1.1.1 交叉淋巴细胞毒实验 (complement-dependent cytotoxic, CDC) CDC 检测技术是依赖补体的淋巴细胞毒试验,操作简单,对仪器设备要求不高,对超急性及急性排斥反应的发生有预测作用。但该方法无法检测不引起补体反应的 HLA-Ab,且结果受操作者影响较大,所以 CDC 方法一直存在争议^[6-7]。

1.1.2 流式荧光交叉配型法 (flow cytometric crossmatch, FCXM) FCXM 技术通过将供者淋巴细胞与受者血清进行孵育,如果受者血清中存在相应抗体,则可与供者淋巴细胞表面抗原相结合,通过流式细胞仪分析结合物荧光强度,间接反应抗体的含量。虽然其灵敏度和特异性较 CDC 更高,但是设备要求高,且无法区分补体依赖性的抗体。与 CDC 技术相同的是,其结果也受到检测细胞活性的影响^[8]。

1.1.3 群体反应性抗体检测 (panel reactive antibodies, PRA) PRA 技术主要采用百分比的形式量化 HLA-Ab 含量,以判断致敏程度,预测移植结局。检测方式主要有酶联免疫吸附试验、流式细胞检测技术和免疫微珠技术。PRA 的临床应用较广,与上述 2 种检测一样,也存在无法确定阳性的抗体种类及程度的问题^[9]。

1.2 SAB 技术的发展及检测优势

就临床需求而言,对 HLA-Ab 的理想检测方法是实现快速和定量的检测,且可明确致敏位点的种类。但由于人组织相容性抗原的多样性,如若逐一进行检测,经济及时间消耗巨大,不适宜临床开展。长期以来,单一抗体快速检测技术的研究不断深入。2003 年,Pei R 等^[10]首次构建了一个由 110 个单一抗原组成的反应体系,并进行了血清 HLA-Ab 检测,发现此方式明显优于 PRA,并有助于准确分析 HLA 抗体的特异性。

SAB 不仅在操作时间及经济效益方面得到了提升,在检测 HLA-Ab 时其灵敏度与特异性也优于其他抗体的检测方式。一项由 Güleç D 等^[11]采用 CDC、FCXM 和 SAB 进行抗体检测的对比性研究中提示,在阳性结果的预测方面 CDC 最高,阳性预测值可达 1.0;FCXM 的阳性预测值,T 细胞为主时是 0.87,B 细胞为主时是 0.86;SAB 检测时,HLA-I 类和 HLA-II 类的阳性预测值分别为 0.93 和 0.83。在灵敏度方面,CDC 为 0.52,灵敏度最低;FCXM 中 T 细胞为 0.82,B 细胞为 0.75;

SAB 检测时 HLA-I 类和 HLA-II 类抗体分别为 0.83 和 0.76。综合比较而言,SAB 在 HLA-Ab 的检测中具有较高的灵敏度和特异度。在预测抗体介导的排斥反应上,暂未有研究比较上述检测技术的特异度和灵敏度的差异。最近一项由 Burballa C 等^[12]采用 SAB 预测肾移植术后抗体介导的排斥反应研究提示,与有组织学改变的患者标本进行比较,SAB 在预测抗体介导的排斥反应的敏感度达 78.8%,特异度达 93.9%。

2 SAB 的局限性

SAB 是基于 xMAP 技术和抗原-抗体结合的临床应用,由于 xMAP 技术和 HLA-Ab 自身的固有特性,使得 SAB 的结果可能存在一定偏差。

2.1 技术的局限性

首先,每种抗原 (antigen, Ag) 和抗体 (antibody, Ab) 结合的亲和力及最适反应条件存在差异。SAB 作为一种多通量的反应体系,在相同反应条件下无法保证各种类抗原与抗体反应均达到最大反应效能。其次,SAB 检测只针对 HLA-IgG,而事实上 ABMR 的发生由多种免疫球蛋白共同作用,除 HLA-IgG 外还存在 HLA-IgM 和 HLA-IgA。而且,如若检测时存在较高含量的 HLA-IgM 和 HLA-IgA,这些免疫球蛋白可与微珠上包被的抗原表位发生竞争性结合,从而降低 MFI 值^[13]。

2.2 检测材料的局限

检测体系中所采用的微珠载体为聚苯乙烯材料,与细胞胞膜表面的结构差异显著。已有研究发现结合在聚苯乙烯微珠表面的 HLA-Ag 虽然分布均匀,但排列并不规律;而且聚苯乙烯微珠表面包被的抗原浓度与生理状态不同,这种差异的存在会造成怎样的影响?目前还没有确切的研究结论^[14]。另一方面,由于微珠数量是一定的,所以可包被的抗原种类也是一定的。一项针对德国白人抗原分布的研究报道称,HLA 有超过 2 万个等位基因,其中 >1:10 万频率的就有约 600 个^[15]。目前的检测微珠上只能包被人群中产生频率较高的 HLA-Ag 位点,无法完全覆盖所有位点,如果遇到罕见的抗原表位,会对检测结果的分析造成困扰。还有研究发现,约 30% 的未致敏男性 SAB 结果呈阳性。这可能是在检测微珠的制作中,部分包被的抗原表位发生空间构象改变,暴露出一些隐蔽的、通常不可接近的抗原表位。这些抗原表位可与抗体结合,这种现象称为抗原的“变性”^[16-17]。

3 影响因素

3.1 血清基质方面的影响

血清基质是 SAB 检测的主要影响因素(表 1)。血清基质中存在的多种内源性分子可与检测微珠上包被的抗原表位发生反应,导致检测结果出现假阳性。其次,血清中存在的无关蛋白质,包括白蛋白、免疫球蛋白和纤维蛋白原等,也

表 1 导致 SAB 检测假阳性/假阴性结果的主要影响因素

假阳性的因素	假阴性的因素
• 新抗原表位的暴露	• 交叉抗原反应导致 MFI 值下降
• 血清基质成分的非特异性结合	• 血清基质阻碍与 HLA-Ab 的结合
• 临床药物中存在影响 HLA-Ab 的抗体	• 大量补体成分干扰与待检测抗体的结合
	• 非目的免疫球蛋白对待检免疫球蛋白结合位点的竞争性抑制,如 IgA 和(或)IgM 抗体竞争 IgG 抗体的结合位点
	• 药物中存在抗 HLA-Ab
	• 低浓度或低亲和力的 HLA-Ab 无法与检测表位充分结合

可以特异性或者非特异性结合微珠上的抗原表位,抑或直接吸附显色微珠,从而导致检测结果呈假阴性^[18]。值得注意的是血清中的补体成分也会对结果造成偏差。抗原和抗体的大量结合诱导补体通路的活化,如果标本中存在补体,会大量形成 C1 复合物并积聚在微珠上,从而影响检测结果。同时,大量产生的补体 C3 会导致抗原-抗体复合物的空间构象发生改变,也会导致 MFI 值降低^[19]。

3.2 临床用药的影响

部分临床药物的使用也是造成结果异常的影响因素,如一些多克隆抗胸腺细胞球蛋白和免疫球蛋白制剂(表 1)。此类药物中的外源性 Ab 成分可部分被微珠包被的抗原检测到,出现假阳性结果^[20-21]。另一方面,这些非特异性抗体还可与标本中的目标 HLA-Ab 竞争结合微珠上的抗原表位,从而降低 MFI 值^[20-21]。同时,在使用高浓度免疫球蛋白制剂时,标本的荧光背景强度可显著增加,即使采用标本稀释的方法也很难去除,从而导致 MFI 值不准确。

3.3 抗原-抗体反应的影响因素

由于抗体自身的固有特性,抗原表位交叉反应的发生会导致标本检测时的荧光强度低于真实水平^[22-23],这会造成临床对供体特异性抗体甄别的困难,是现在常规技术条件下很难排除且急需解决的问题(表 1)。其次,由于抗原-抗体反应存在“钩状”效应,此效应发生时会影响检测结果,从而误导临床治疗^[23],所以 SAB 技术属于一个半定量检测。

4 解决办法

实验室可通过以下方式来消减上述因素的影响。首先,做到用药前采集标本,杜绝外源性物质带来的检测结果偏差。其次,规范标本的预处理流程,最大程度减少血清基质的影响。包括充分离心、加热、加入二硫苏糖醇或乙二胺四乙酸等^[19]。再次,为防止抗体浓度过高而产生的“钩状”效应,最好对标本进行浓度梯度稀释后再检测,根据浓度曲线确定真实的 MFI 值^[22]。最后,需通过对疑似含有变性抗原表位的微珠进行酸处理后,再做 SAB 平行试验来甄别此类影响,保证结果的可信性^[14]。即使如此,针对免疫微珠表面结构对抗原-抗体结合的影响,抗原交叉反应的发生,以及待检抗原的浓度或亲和力低于检测下限等问题,则需要通过后期检测技术的不断改进来解决。

5 SAB 亟待解决的问题及展望

总的来说,SAB 用于 HLA-Ab 的检测已有近 20 年历史。此技术实现了高效、灵敏的检测。随着检测技术的日益进步,既要看到这种高灵敏检测技术的优越性,也要克服它的一些不足并做到更准确的结果解读。除了上述与 SAB 技术相关的影响因素以外,在报告解读方面也存在一些亟需解决的问题^[24]。首先,对于一个临床检测项目而言,阴/阳性阈值的确定是结果判断的重要依据。而 SAB 检测结果尚未有一个统一的阈值判定标准,各实验室间存在差异。对于 MFI 值与 ABMR 的发生和移植肾丢失之间的关系等问题,国内还没有达成共识。其次,在临床工作中也发现 HLA-Ab 的产生与临床表现及 ABMR 的产生存在不一致的现象。包括不同个体间进行相同的治疗时也会出现不同的治疗反应和结局,现在只发现与 DR、DQ 相关的 HLA-Ab 的致病性更强并与移植丢失及 ABMR 的产生相关性更大^[25]。这意味着对于 HLA-Ab 的评价还存在一个免疫风险分层的问题。一些研究提示,可与补体 C1q 或 C3d 结合的 HLA-Ab 具有更强的致病性^[26-29]。同时,通过分析免疫球蛋白 G 亚型的差异也可以进一步区分免疫风险,强补体结合的 IgG 亚型(即 IgG1 和 IgG3)比弱或非补体结合的 IgG 亚型(IgG2 和 IgG4)更有害,而 IgG3 亚类致病性更强^[30]。不同亚型的存在或者组合对 ABMR 的发生产生的影响各异,但机制仍有待研究。毫无疑问,SAB 检测结果在一定程度上可以佐证抗体的存在并指导临床治疗。

综上所述,在器官移植中 HLA-Ab 的检测至关重要,应该尽快建立采用 SAB 检测 HLA-Ab 的指南、规范 HLA-Ab 筛查流程、优化 SAB 技术、完善质控体系及标准化操作流程。

参 考 文 献

- [1] Lichvar AB, Tremblay S, Leino AD, et al. Reducing donor-specific antibody during acute rejection diminishes long-term renal allograft loss: comparison of early and late rejection[J]. Transplantation, 2020, 104(11):2403-2414.
- [2] Chen XT, Qiu J, Wu ZX, et al. Using both plasma and urine donor-derived cell-free DNA to identify various renal allograft injuries[J]. Clin Chem, 2022, 68(6):814-825.

- [3] El-Awar N, Lee J, Terasaki PI. HLA antibody identification with single antigen beads compared to conventional methods[J]. *Hum Immunol*, 2005, 66(9): 989–997.
- [4] Hansen EO, Dias NS, Burgos ICB, et al. Millipore xMap® luminex (HATMAG-68K): an accurate and cost-effective method for evaluating Alzheimer's biomarkers in cerebrospinal fluid[J]. *Front Psychiatry*, 2021, 12: 716686.
- [5] Kong WW, Li Y, Cheng SH, et al. Luminex xMAP combined with Western blot improves HIV diagnostic sensitivity[J]. *J Virol Methods*, 2016, 227: 1–5.
- [6] Schlaf G, Bau D, Horstmann N, et al. Solid phase-based cross-matching for solid organ transplantation: currently out-of-stock but urgently required for improved allograft outcome[J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(9): 937–948.
- [7] 郑瑾,薛武军.肾移植排斥反应免疫风险评估与监测[J].器官移植,2021,12(6):643–650.
- Zheng J, Xue WJ. Assessment and monitoring of immune risk of kidney transplantation rejection[J]. *Organ Transplant*, 2021, 12(6): 643–650.
- [8] Koktathong K, Vejbaesya S, Bejrachandra S, et al. Flow cytometric crossmatch for kidney transplantation[J]. *J Med Assoc Thai*, 2005, 88(6): 769–774.
- [9] Martínez-Mier G, Vazquez-Crespo LV, Angeles-Hernández F, et al. Effect of panel-reactive antibody on graft survival in living kidney donor transplantation: analysis of 10 years in a transplant center in Veracruz, Mexico[J]. *Transplant Proc*, 2020, 52(4): 1140–1142.
- [10] Pei R, Lee JH, Shih NJ, et al. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities[J]. *Transplantation*, 2003, 75(1): 43–49.
- [11] Güleç D, Soyöz M, Pirim I, et al. Comparison of single antigen bead-based, cell-based, and solid phase-based crossmatch methods[J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(4): 1016–1020.
- [12] Burballa C, Pérez-Sáez MJ, Redondo-Pachón D, et al. Luminex screening first vs. direct single antigen bead assays: different strategies for HLA antibody monitoring after kidney transplantation[J]. *Hum Immunol*, 2020, 81(6): 293–299.
- [13] Visentin J, Guidicelli G, Couzi L, et al. Deciphering IgM interference in IgG anti-HLA antibody detection with flow beads assays[J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(11): 1048–1054.
- [14] Sullivan HC, Liwski RS, Bray RA, et al. The road to HLA antibody evaluation: do not rely on MFI[J]. *Am J Transplant*, 2017, 17(6): 1455–1461.
- [15] Eberhard HP, Schmidt AH, Mytilineos J, et al. Common and well-documented HLA alleles of German stem cell donors by haplotype frequency estimation[J]. *HLA*, 2018, 92(4): 206–214.
- [16] Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, et al. The significance of pre-transplant donor-specific antibodies reactive with intact or denatured human leucocyte antigen in kidney transplantation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173(3): 536–543.
- [17] Gutiérrez-Larrañaga M, Riesco L, Guijal S, et al. Detection of antibodies to denatured human leucocyte antigen molecules by single antigen Luminex[J]. *HLA*, 2021, 97(1): 52–59.
- [18] Zerrouki A, Ouadghiri S, Benseffaj N, et al. High background in Luminex® assay for HLA antibody screening: interest of Adsorb Out™ [J]. *Transpl Immunol*, 2016, 36: 20–24.
- [19] Guidicelli G, Visentin J, Franchini N, et al. Prevalence, distribution and amplitude of the complement interference phenomenon in single antigen flow beads assays[J]. *HLA*, 2018, 91(6): 507–513.
- [20] Popow I, Leitner J, Grabmeier-Pfistershamer K, et al. A comprehensive and quantitative analysis of the major specificities in rabbit anti-thymocyte globulin preparations[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(12): 3103–3113.
- [21] Barahona Afonso AF, João CMP. The production processes and biological effects of intravenous immunoglobulin[J]. *Biomolecules*, 2016, 6(1): 15.
- [22] Gu Y, Koh RWK, Lai ML, et al. Defining the structural basis for human leukocyte antigen reactivity in clinical transplantation[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18397.
- [23] Garcia-Sánchez C, Usenko CY, Herrera ND, et al. The shared epitope phenomenon: a potential impediment to virtual crossmatch accuracy[J]. *Clin Transplant*, 2020, 34(8): e13906.
- [24] Choi J, Chandraker A. Immunologic risk assessment and approach to immunosuppression regimen in kidney transplantation[J]. *Clin Lab Med*, 2019, 39(4): 643–656.
- [25] Tafulo S, Malheiro J, Santos S, et al. Degree of HLA class II epitope mismatch load improves prediction of antibody-mediated rejection in living donor kidney transplantation[J]. *Hum Immunol*, 2019, 80(12): 966–975.
- [26] Lan JH, Tineckam K. Clinical utility of complement dependent assays in kidney transplantation[J]. *Transplantation*, 2018, 102(1 Suppl 1): S14–S22.
- [27] Bailly E, Anglicheau D, Blanchard G, et al. Prognostic value of the persistence of C1q-binding anti-HLA antibodies in acute antibody-mediated rejection in kidney transplantation[J]. *Transplantation*, 2018, 102(4): 688–698.
- [28] Bertrand D, Kaveri R, Laurent C, et al. Intensity of de novo DSA detected by immucor lifecodes assay and C3d fixing antibodies are not predictive of subclinical ABMR after kidney transplantation[J]. *PLoS One*, 2021, 16(4): e0249934.
- [29] Hayde N, Solomon S, Caglar E, et al. C1q-binding DSA and allograft outcomes in pediatric kidney transplant recipients[J]. *Pediatr Transplant*, 2021, 25(2): e13885.
- [30] Pernin V, Bec N, Beyze A, et al. IgG3 donor-specific antibodies with a proinflammatory glycosylation profile may be associated with the risk of antibody-mediated rejection after kidney transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2022, 22(3): 865–875.

(责任编辑:唐秋姗)