

2013 年全国 175 家临床实验室 检测抗中性粒细胞胞浆抗体的比对分析*

宋 宁,张蜀澜,胡朝军,邓垂文,李 萍,白依娜,李丽君,董晓娟,吴子燕,甘晓丹,史艳萍,
李永哲,张奉春 (中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院风湿免疫科,
风湿病学教育部重点实验室,北京 100730)

摘要:目的 通过全国多中心实验室自身抗体检测比对活动,了解国内抗中性粒细胞胞浆抗体的检测水平现状,以提高检测质量。方法 由卫生公益性行业科研专项“风湿免疫病诊疗关键技术临床推广及转化应用研究”项目组(以下称“项目组”)制备自身抗体比对样品(液体血清),向全国 175 家自愿报名参加抗中性粒细胞胞浆抗体检测的实验室发放比对品。比对品包含抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)阳性或阴性、抗髓过氧化物酶(MPO)抗体阳性或抗蛋白酶 3(PR3)抗体阳性,共计 1 组 5 支血清。由项目组统一寄送至各实验室。要求各实验室在规定时间内完成检测,并将结果上传至项目组。采用 Excel 软件对检测结果进行统计分析。结果 参加 ANCA,抗 MPO 抗体及抗 PR3 抗体检测比对工作的实验室数目分别为 134 家,148 家和 148 家。ANCA,抗 MPO 抗体及抗 PR3 抗体比对品检测结果阳性符合率分别为 90.8%,98.0%和 98.0%,阴性符合率分别为 94.4%,96.1%和 98.8%。间接免疫荧光法为国内实验室检测 ANCA 的主要方法,但回报的结果符合率参差不齐,荧光模型回报率尚不理想,仅为 77.9%。结论 2013 年全国实验室检测 ANCA 比对品的阳性符合率尚不理想,且应用 IIF 法检测 ANCA 时荧光模型回报率不高。抗 MPO 抗体及抗 PR3 抗体比对结果较为满意。ANCA 检测质量仍有待提高。

关键词:抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA);抗髓过氧化物酶(MPO)抗体;抗蛋白酶 3(PR3)抗体

中图分类号:R446 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)05-137-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.043

* 基金项目:卫生公益性行业科研专项“风湿免疫病诊疗关键技术临床推广及转化应用研究”项目(201202004)。

作者简介:宋 宁(1982—),女,技师,主要从事自身免疫性疾病实验诊断工作,Tel:010-69158796,E-mail:songningluky@126.com。

通讯作者:李永哲(1964—),男,教授,博士生导师,主要从事自身免疫性疾病实验诊断及研究工作,Tel:010-69159785,E-mail:yongzhelipunch@126.com。

Analyses of the Multi-center Comparison of Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies Testing from 175 Laboratories in 2013 in China

SONG Ning, ZHANG Shu-lan, HU Chao-jun, DENG Chui-wen, LI Ping, BAI Yi-na, LI Li-jun, DONG Xiao-juan, WU Zi-yan, GAN Xiao-Dan, SHI Yan-ping, LI Yong-zhe, ZHANG Feng-chun

(Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Key Laboratory of Rheumatology and Clinical Immunology, Ministry of Education, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To survey and analyses the current situation of autoantibodies testing of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in China for evidence of further improvement of detecting quality. **Methods** 175 laboratories participated voluntarily in the study of multi-center comparison of ANCA testing. The samples (serum liquid) were prepared by the group of clinical promotion and translation application research of key technology of diagnosis and treatment of autoimmune diseases of the Research Special Fund for Public Welfare Industry of Health ("the group" for short), including 5 ANCA samples, 5 anti-myeloperoxidase (MPO) antibodies samples and 5 anti-proteinase 3 (PR3) antibodies samples, which were mailed to laboratories. The group preformed analysis of the results by Excel, including coincidence rate and titer report rate. **Results** The laboratories that eventually participated in ANCA, anti-MPO and anti-PR3 were 134, 148 and 148, respectively, and the positive coincidence rate were 90.8%, 98.0% and 98.0%, respectively, meanwhile the negative coincidence rate were 94.4%, 96.1% and 98.8%, respectively. Indirect immunofluorescence (IIF) was the most common method for detection of ANCA. ANCA about the fluorescence pattern were also not ideal and the concordance rate only was 77.9%. **Conclusion** In 2013, the positive coincidence rate of ANCA is not satisfying in clinical labs of China, while the negative coincidence rate was good. IIF method used for identifying the ANCA fluorescence pattern only got relative low rate of reported results. The coincidence rate of anti-MPO and anti-PR3 were satisfying in clinical labs of China. In conclusion, detecting quality of ANCA remains to be improved.

Keywords: anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA); anti-myeloperoxidase (MPO) antibodies; anti-proteinase 3 (PR3) antibodies

抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 是一种以中性粒细胞和单核细胞胞浆成分为靶抗原的自身抗体。ANCA 作为系统性血管炎的血清学标志抗体, 对血管炎的诊断、分类和预后的评估均有重要意义^[1,2]。应用间接免疫荧光法 (IIF) 可鉴别出两种主要的荧光模型。一种为均匀分布在整个中性粒细胞胞浆中的颗粒型荧光, 细胞核无荧光, 称之为胞浆型 ANCA (cytoplasmic ANCA, cANCA), 其主要靶抗原是蛋白酶 3 (protenase 3, PR3); 另一种为在中性粒细胞核周显示光滑的带状荧光, 称之为核周型 ANCA (perinuclear ANCA, pANCA), 其靶抗原主要是髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)。ANCA 的靶抗原除常见的 PR3 和 MPO 外, 还包括人白细胞弹性蛋白酶、乳铁蛋白、溶酶体、组织蛋白酶 G 和杀菌/通透性增高蛋白等^[3]。

目前, 越来越多的实验室开展 ANCA 的检测, 不同的方法和不同的实验室间的结果存在一定差异。开展室间质评活动对各实验室增强质量认识, 不断改进其检测水平有重要意义^[4]。对此, 为了解全国 ANCA 检测现状, 本研究就 2013 年 175 家实验室 ANCA 的检测结果进行分析, 以发现问题、提高检测质量。

1 材料与方法

1.1 参加实验室 由“项目组”发布关于开展 2013 年全国实验室自身抗体检测比对通知, 共有 175 家实验室自愿报名参加本次多中心的 ANCA 检测。

1.2 方法

1.2.1 比对品的制备: 比对品由“项目组”研制, 收集自身免疫性疾病患者血清, 尽量减少混合血清。对所有血清进

行过滤灭菌预处理以保证运输稳定性。采用第三方质控血清进行结果控制, 采用市场主流试剂供应商的试剂进行联合检测, 选取各项目所有试剂检测结果一致的血清配制成高中低范围组合的比对品。

1.2.2 样品发放与回报: 包含 ANCA, 抗 MPO 抗体和抗 PR3 抗体阳性或阴性的样品, 共计 1 组 5 支血清。比对样品编号如下: 301, 302, 303, 304 和 305。样品 301 为 ANCA (核周型) 阳性, 样品 302 为 ANCA (核周型) 及抗 MPO 抗体双阳性, 样品 303 为 ANCA (胞浆型) 及抗 PR3 抗体双阳性, 样品 304 和 305 为 ANCA 阴性。比对品经快递邮寄至各报名参加的实验室, 要求在规定的时间内完成样品检测并对实验结果进行网络回报至项目组, 以提高效率及减少文本报告差错。

1.3 统计学分析 采用 Excel 软件对检测结果进行统计分析。因检测比对样品的方法不同, 仅对定性结果采用符合率指标进行描述性评价。阳性样品符合率: 回报阳性结果实验室数之和 / (阳性比对品数之和 × 参加该项目实验室总数) × 100%, 阴性样品符合率分析原则与之类似。荧光模型回报率: (回报荧光模型实验室数 / 参加该项目实验室总数) × 100%。符合率 > 80% 时认为检测结果较理想。

2 结果

2.1 参加单位分布情况 全国参加 ANCA 室间比对的实验室共计 175 家, 实验室地域分布统计, 见表 1。参加室间比对的实验室主要集中在北京、广东、浙江、河南、山东等地, 分布在 4 个直辖市和 25 个省自治区, 大部分实验室来自三甲医院、其余小部分来自二甲医院、三乙医院或企业实

实验室。实验室分布之广,可以代表全国范围 ANCA 的检测情况。

表1 2013年参加全国抗中性粒细胞胞浆抗体
检测室间比对的实验室地域分布(家)

地区	实验室数	地区	实验室数	地区	实验室数
北京	17	陕西	3	黑龙江	6
上海	4	安徽	2	吉林	4
河北	3	重庆	7	江苏	7
河南	13	福建	5	江西	7
湖南	4	广东	27	辽宁	6
湖北	3	广西	5	内蒙古	5
山西	5	甘肃	2	青海	1
云南	3	海南	2	贵州	1
四川	7	浙江	12	新疆	2
山东	11	天津	1		

表2 不同方法检测 ANCA 的符合率[% (n)]

检测方法	实验室数	样品 301	样品 302	样品 303	样品 304	样品 305
IIF	125	75.2(94)	98.4(123)	98.4(123)	89.6(112)	98.4(123)
ELISA	4	100.0(4)	100.0(4)	100.0(4)	100.0(4)	100.0(4)
WB	2	100.0(2)	100.0(2)	100.0(2)	100.0(2)	100.0(2)
LIA	3	100.0(3)	66.7(2)	66.7(2)	100.0(3)	100.0(3)
总符合率	134	76.9(103)	97.8(131)	97.8(131)	90.3(121)	98.5(132)

表3 间接免疫荧光法检测 ANCA 的荧光模型回报率及符合率[% (n)]

比对品	参加实验室数	回报荧光模型实验室数	回报率	符合率
样品 301(核周型)	125	80	64.0(80)	98.8(79)
样品 302(核周型)	125	106	84.8(106)	95.3(101)
样品 303(胞浆型)	125	106	84.8(106)	97.2(103)

2.3 抗 MPO 抗体和抗 PR3 抗体比对品检测结果 参加检测 ANCA 抗体的 175 家实验室中共有 148 家回报了抗 MPO 抗体和抗 PR3 抗体检测结果,其中有 1 家实验室未回报检测方法,见表 4,表 5。本次比对分析中抗 MPO 抗体检测结果阳性符合率为 98.0%,阴性符合率为 96.1%。

表4 不同方法检测抗 MPO 抗体的符合率[% (n)]

检测方法	实验室数	样品 301	样品 302	样品 303	样品 304	样品 305
微阵列流式荧光法	1	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)
ELISA	75	98.7(74)	97.4(73)	94.7(71)	98.7(74)	100.0(75)
WB	45	100.0(45)	100.0(45)	88.9(40)	100.0(45)	100.0(45)
IB	7	100.0(7)	100.0(7)	85.7(6)	100.0(7)	100.0(7)
IIF	5	100.0(5)	100.0(5)	60.0(3)	100.0(5)	100.0(5)
LIA	14	85.7(12)	100.0(14)	50.0(7)	100.0(14)	100.0(14)
未报	1	100.0(1)	0(0)	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)
总符合率	148	98.0(145)	98.0(145)	87.2(129)	99.3(147)	100.0(148)

表5 不同方法检测抗 PR3 抗体的符合率[% (n)]

检测方法	实验室数	样品 301	样品 302	样品 303	样品 304	样品 305
微阵列流式荧光法	1	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)	100.0(1)
ELISA	75	100.0(75)	100.0(75)	97.3(73)	100.0(75)	100.0(75)
WB	44	100.0(44)	97.7(43)	97.7(43)	100.0(44)	100.0(44)
IB	7	100.0(7)	85.7(6)	100.0(7)	100.0(7)	100.0(7)
IIF	6	100.0(6)	100.0(6)	100.0(6)	100.0(6)	83.3(5)
LIA	14	85.7(12)	92.9(13)	100.0(14)	100.0(14)	92.9(13)
未报	1	100.0(1)	100.0(1)	0(0)	100.0(1)	100.0(1)
总符合率	148	98.6(146)	98.0(145)	98.0(145)	100.0(148)	98.6(146)

3 讨论 ANCA 是一组针对中性粒细胞和单核细胞胞浆中的抗原所产生的一组自身抗体,通常认为其靶抗原实际为中性粒细胞胞浆中的嗜苯胺蓝颗粒和特异性颗粒中的蛋

2.2 ANCA 比对品检测结果 共有 134 家实验室回报了 ANCA 比对品的定性检测结果,见表 2。阳性比对品(301~303)检测结果符合率为 90.8%,阴性比对品(304~305)检测结果符合率为 94.4%。IIF 为 ANCA 的主要检测方法,除样品 301 检测结果符合率为 75.2%以外,在其他比对品中检测结果符合率均>80%。使用 IIF 检测 ANCA,荧光模型回报率及符合率,见表 3。IIF 法检测 ANCA 的 125 家实验室中,ANCA 荧光模型回报率较低,样品 301,302 和 303 分别为 64.0%,84.8%和 84.8%,但在已回报结果的实验室荧光模型符合率较好。ANCA 滴度回报率不高,且滴度结果分布较为分散。

抗 PR3 抗体检测结果阳性符合率为 98.0%,阴性符合率为 98.8%。说明抗 MPO 抗体,抗 PR3 抗体的检测结果符合率均较为理想。另外,在此次比对分析中酶联免疫吸附试验(ELISA)及免疫印迹法(WB)是检测抗 MPO 抗体及抗 PR3 抗体的主要方法。

白酶。ANCA 对 ANCA 相关性血管炎(肉芽肿性多血管炎、显微镜下多血管炎、嗜酸性肉芽肿性多血管炎)、肺间质纤维化、肾脏疾病、炎症性肠病、狼疮性肾炎等疾病的诊断

与鉴别具有重要的临床意义^[1,2,5~7]。

IIF 作为检测 ANCA 的重要方法,主要针对 ANCA 的总抗体^[8]。由于 IIF 检测 ANCA 针对靶抗原范围广,检测敏感度高,而被国内临床实验室广泛采用,并作为 ANCA 检测的筛查试验^[9]。在 IIF 检测 ANCA 中,根据靶抗原的分布,其荧光模型主要分为胞浆型 ANCA(cANCA)和核周型 ANCA (pANCA),荧光模型的回报对临床诊断也具有重要价值。同样,在本次比对试验中,IIF 法仍作为检测 ANCA 的主要方法,占总参加实验室数的 93.3%(125/134)。ANCA 检测结果比对分析中,阳性符合率为 90.8%,其中样品 301(pANCA)检测结果的阳性符合率仅为 76.9%,而样品 302(pANCA)和 303(cANCA)检测结果的阳性符合率均为 97.8%。出现比对品 301 检测结果的符合率偏低的原因,可能由于此比对品 pANCA 常见的特异性抗 MPO 抗体阴性,从而影响实验室人员对结果的判读。另外,在 125 家采用 IIF 检测 ANCA 中,ANCA 荧光模型回报率为 77.9%,荧光模型阳性符合率为 97.2%。回报滴度的实验室仅有 80 家,滴度回报率仅为 64.0%(80/125)。由于 ANCA 荧光模型的结果判读需对实验室人员进行特殊的培训,且对于实验报告者的判断能力要求较高,这可能是导致荧光模型回报率偏低的原因。同时,临床上 ANCA 滴度的高低可与疾病的活动具有相关性,故应重视滴度的判读,并逐步建立并规范 ANCA 滴度的报告体系。

由于近些年随着抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体检测的临床推广应用,实验室对其质量意识的提高,试剂厂家对试剂质量的提升,在本次全国比对分析中,使得本次抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体比对的检测结果符合率均高于 96.0%,结果令人满意。另外,鉴于抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体量值的变化能作为疾病活动性和疗效观察指标^[10],临床实验室还需对抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体进行定量检测。今后对抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体比对工作需将同一定量检测方法(如 ELISA)不同实验室或不同试剂厂家的检测值进行进一步分析。由于 ANCA 总抗体与特异性抗体(抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体)检测结果的不一致^[3,9,10]。使用 IIF 法不能严格排除 ANA 的干扰,易出现假阳性结果。且仅用 IIF 检测 ANCA,未检测 ANCA 特异性抗体(抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体等),会降低 ANCA 对疾病诊断的特异性。仅检测抗 MPO 抗体和抗 PR3 抗体,未使用 IIF 检测 ANCA,会降低 ANCA 对疾病诊断的应用范围。因此,国际指南建议联合应用 IIF 检测 ANCA 和抗 MPO 抗体及抗 PR3 抗体作为检测 ANCA 的筛查和确诊试验,可大大提高诊断的特异性^[11]。

综上所述,通过本次 ANCA 的全国室间质评,了解了 ANCA 在各临床实验室的检测现状,ANCA 检测质量在实验室得到一定的提高。且如何实现 ANCA 检测方法学和检测程序的标准化仍是一个亟需解决的问题。

参考文献:

- [1] Gadola SD, Gross WL. Vasculitis in 2011: the renaissance of granulomatous inflammation in AAV[J]. Nat Rev Rheumatol, 2012, 8(2): 74-76.
- [2] Bouzid D, Haddouk S, Amouri A, et al. Contribution of immunofluorescence to identification and character-

ization of antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel diseases [J]. Indian J Gastroenterol, 2011, 30(5): 229-232.

- [3] 曾智杰,孙艳虹,孙丽琴,等.联合使用间接免疫荧光法和酶联免疫吸附法检测抗中性粒细胞胞质抗体结果不一致 589 例临床分析[J].中华风湿病学杂志, 2014, 18(4): 263-266.
- Zeng ZJ, Sun YH, Sun LQ, et al. Clinical analysis of the inconsistency of antineutrophil cytoplasmic antibodies test results between indirect immune fluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay in 589 case[J]. Chinese Journal of Rheumatology, 2014, 18(4): 263-266.
- [4] Tsunekawa S, Arai J, Ishihara Y, et al. MBL quality control survey of autoantibodies-25 years of activity and its achievement-mainly antinuclear antibodies[J]. Rinsho Byori, 2010, 58(2): 131-138.
- [5] Homma S, Matsushita H, Nakata K. Pulmonary fibrosis in myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides [J]. Respirology, 2004, 9(2): 190-196.
- [6] Kawakami T, Kyoya M, Matsuoka S, et al. Acceleration of pulmonary interstitial fibrosis in a patient with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-positive erythema elevatum diutinum[J]. J Am Acad Dermatol, 2011, 65(3): 674-675.
- [7] 杨玉芹,张迎梅,王兵.狼疮性肾炎患者抗中性粒细胞胞浆抗体的检测及临床意义[J].现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 130-131.
- Yang YQ, Zhang YM, Wang B. Anti-neutrophil cytoplasm antibody test in patients with lupus nephritis and its clinical significance[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2009, 24(5): 130-131.
- [8] Savage J, Dimech W, Fritzler M, et al. Addendum to the international consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testingn other autoimmune diseases[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 120(3): 312-318.
- [9] 孙艳艳,胡朝军,康熙雄,等.抗中性粒细胞胞浆抗体 IIF 法筛查与特异性抗体检测的相互关系及临床意义[J].中华检验医学杂志, 2013, 36(8): 761-763.
- Sun YY, Hu CJ, Kang XX, et al. The clinical significance and relationship between the screening of antineutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunofluorescence and detection of specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2013, 36(8): 761-763.
- [10] Rao DA, Wei K, Merola JF, et al. Myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibodies (MPO-ANCA) and proteinase 3-ANCA without immunofluorescent ANCA found by routine clinical testing[J]. J Rheumatol, 2015, 42(5): 847-852.
- [11] Shoenfeld Y, Gershwin ME, Memni PL. 自身抗体[M]. 2 版. 邹和建, Winfried Stoecker, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 73-95.
- Shoenfeld Y, Gershwin ME, Memni PL. Autoantibodies[M]. Second Edition. Zou HJ, Winfried Stoecker, Translation. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009: 73-95.

收稿日期: 2015-06-09

修回日期: 2015-07-29