

临床就诊患者抗核抗体和抗核抗体谱检测结果分析*

陈宇翔, 赵 枰 (南通大学第二附属医院检验科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 比较间接免疫荧光法(IIF)筛查抗核抗体(ANA)与线性免疫印迹法(LIA)检测抗核抗体谱(ANAs)特异性抗体结果不一致性,分析二者的相互关系及临床意义。方法 采用间接免疫荧光法与线性免疫印迹法对871份血清标本进行抗核抗体检测,检测结果可分为自身免疫病组(AID)和非AID组,并分析结果的相互关系和临床意义。结果 IIF法与LIA法检测抗核抗体的阳性率分别为21.01%和15.50%,差异有统计学意义($\chi^2=12.64$, $P<0.01$),IIF法阳性者中以均质型(34.4%),颗粒型(33.9%)和胞质颗粒型(17.5%)多见。LIA法中阳性抗体出现较多的是抗SSA,抗Ro-52等。ANA和ANAs在自身AID患者中的阳性率分别是96.4%和73.2%,显著高于非AID患者(13.1%和8.1%);ANA和ANAs在AID组和非AID组间阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 间接免疫荧光法是良好的筛查试验,ANA核型与ANAs相结合对自身免疫性疾病的诊断与鉴别诊断有重要意义;临床诊断中,IIF筛查ANA应与LIA检测ANAs同时进行,以避免单一方法检测导致AID患者的漏诊。

关键词:抗核抗体;线性免疫印迹法;间接免疫荧光法

中图分类号:R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)06-140-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.043

Analysis of Antinuclear Antibody and Antinuclear Antibody Spectrum Test for the Clinical Medical Patients

CHEN Yu-xiang, ZHAO Ping (Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: **Objective** To compare the inconsistent result of the indirect immunofluorescence (IIF) assay screening for antinuclear antibody (ANA) and linear immunoblot assay (LIA) for antinuclear antibody spectrum (ANAS) specific antibody, and evaluate the relationship and clinical significance. **Methods** 871 cases of consecutive clinical samples for ANA testing were tested by IIF and LIA for the detection of specific ANA antibodies. All the samples were divided into autoimmune diseases (AID) group and non-AID group. The relationship between different test results and their clinical significance were analyzed. **Results** The positivity rate of ANA detected by IIF and LIA was significantly different (21.01% and 15.50%, respectively, $\chi^2=12.64$, $P<0.01$). Homogenous (34.4%), Nuclear speckled (33.9%) and cytoplasmic speckled (17.5%) pattern were common in 183 positive ANA-IIF findings. The most frequently occurred antibody was anti-SSA and anti-Ro52. The positive rates of ANA and ANAs in the patients with autoimmune diseases were 96.4% and 73.2%, obviously higher than 13.1% and 8.1% in the patients with non-autoimmune diseases. The difference in positive rates of ANA and ANAs between the autoimmune disease group and the non-self-immune disease group had statistical significance ($P<0.01$). **Conclusion** ANA-IIF is a good screening test. The combination of ANA-IIF and ANAs-LIA may be useful for the diagnosis and differential diagnosis of AID. In the clinical diagnosis of AID, IIF screening for ANA should be simultaneously with the LIA-ANAs to avoid the missing diagnosis of AID patients.

Keywords: antinuclear antibody; linear immunoblot assay; indirect immuno fluorescence assay

抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)又称抗核抗原抗体,是一组将自身真核细胞的各种成分作为靶抗原的自身抗体的总称,主要存在于血清中,没有器官和种系的特异性,主要为IgG型,也可是IgA, IgM型,是自身免疫性疾病重要的血清学指标^[1,2]。抗核抗体谱(antinuclear antibodies, ANAs)是指ANA在广义上是一组各有不同临床意义的自身抗体,更确切的名称应为抗核抗体谱。抗核抗体(ANA)和抗核抗体谱(ANAs)的检测目前已广泛用于自身免疫性疾病(autoimmune diseases, AID)的诊断与疗效观察^[3]。本研究旨在通过

回顾性分析2013年11月~2014年6月本院住院的申请ANAs检测的871份标本检测结果,比较间接免疫荧光法(IIF)筛查ANAs与线性免疫印迹法(ANA-LIA)检测抗核抗体谱(ANAs)特异性抗体的结果,分析二者的相互关系,为临床提供更多的诊断和鉴别诊断疾病特性的依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2013年11月~2014年6月住院申请ANAs检测的标本871例(排除重复送检标本),所有标本均同时采用IIF法检测ANA和LIA法检测ANAs 15项。病例中确诊AID的患者56

* 作者简介:陈宇翔(1973-),男,大学本科,主管技师,主要从事免疫学检验工作, Tel:18912252296, E-mail:ntyycyx@163.com。

例,疑似 AID 患者 89 例,确诊为其他疾病的非 AID 患者 632 例,其他无明确诊断患者 94 例。所有 AID 患者的诊断均符合国际相关学会的诊疗指南。送检标本均为待检测患者清晨空腹静脉血。

1.2 方法

1.2.1 IIF 法检测 ANA:采用德国欧蒙医学实验室诊断股份公司 HEP-2 和灵长类肝组织冰冻切片的组合 IIF 法检测患者血清 ANA。用德国欧蒙 PML 型荧光显微镜判读结果,以抗体滴度 $\geq 1:100$ 为阳性。将 $1:100$ PBS 吐温缓冲液稀释的血清标本与抗原基质片在载片反应区反应,温育 30 min,如果标本阳性,标本中特异性的 IgG, IgA, IgM 抗体与相应的抗原结合,流水冲洗 1 s,浸泡 5 min,加入荧光标记的二抗避光孵育 30 min,流水冲洗 1 s,浸泡 5 min,加甘油封片后荧光显微镜下判读结果,所有操作严格按照试剂操作说明书操作。

1.2.2 LIA 法检测 ANAs: LIA-ANAs 检测试剂来自于德国欧蒙(杭州)医学诊断有限公司,其试剂条含有 15 个测定项目:抗核糖核蛋白抗体/抗 Sm 抗体(抗 nRNP/Sm)、抗 Sm 抗体(抗 Sm)、抗干燥综合征 A 抗体(抗 SSA)、抗 R0-52 抗体(抗 R052)、抗干燥综合征 B 抗体(抗 SSB)、抗硬皮病 70 抗体(抗 SCL-70)、抗多发性肌炎/硬皮病抗体(抗 PM-Scl)、抗 J0-1 抗体(抗 J0-1)、抗着丝点蛋白 B 抗体(抗 CENP B)、抗核小体抗体(抗 nukleosome)、抗增殖性细胞核抗原抗体(抗 PCNA)、抗双链脱氧核糖核酸抗体(抗 ds-DNA)、抗组蛋白抗体(抗 histones)、抗核糖体 P 蛋白抗体、抗线粒体 M2 亚型抗体(抗 AMA-M2)。采用配套软件 EU-ROLineScan 进行显色结果灰度值扫描分析,灰度值 $0 \sim 5$ 为 LIA 阴性(-); $6 \sim 10$ 为 LIA 临界(\pm); ≥ 11 为 LIA 阳性(+). 膜条上平行包被经亲和层析纯化的天然抗原(其中 CENP B, PM-Scl, Ro-52, PCNA 为重组抗原)。在第一次温育时,经 $1:101$ 稀释的患者血清标本 1.5 ml 与膜条上靶抗原反应 30 min,若标本阳性,则特异性 IgG 抗体与靶抗原结合,形成结合抗体,洗涤 3 次(5 min/次),再加入 1.5 ml 酶标记抗人 IgG(酶结合物)行第二次温育 30 min,洗涤 3 次(5 min/次),加入底物液反应 15 min,蒸馏水清洗膜条终止反应,风干后扫描。

1.3 统计学分析 统计学分析用 SPSS13.0 统计软件进行分析,率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IIF 和 LIA 检测 ANA 结果分析 871 例被

检测标本中,两种方法同时检测,任意一种方法出现阳性的情况下,阳性结果 193 例,阳性率 22.16%(193/871),单独 IIF 检测,阳性结果 183 例,阳性率 21.01%(183/871),单独 LIA 检测,阳性结果 135 例,阳性率 15.50%(135/871),统计学分析,IIF 法(+)显著高于 LIA(+),差异有统计学意义($\chi^2 = 12.64, P < 0.01$)。

2.2 IIF 检测 ANA 阳性 183 例中有 54 例确诊为 AID,占 29.51%,以抗体高滴度为主,这些阳性标本中,荧光模式最多的是核颗粒、核均质型 见表 1。ANAs 谱阳性的标本中抗 nRNP/Sm 阳性 19 例(14.07%),抗 Sm 阳性 3 例(2.22%),抗 SSA 阳性 44 例(32.59%),抗 SSB 阳性 7 例(5.19%),抗 Ro-52 阳性 45 例(33.33%),抗 SCL-70 阳性 0 例,抗 Jo-1 阳性 0 例,抗 PM-Scl 阳性 1 例(0.74%),抗 CENP B 阳性 9 例(6.67%),抗 PCNA 阳性 1 例(0.74%),抗 dsDNA 阳性 3 例(2.22%),抗核小体阳性 3 例(2.22%),抗组蛋白阳性 2 例(1.48%),抗核糖体 P 蛋白阳性 6 例(4.44%),抗 AMA-A2 阳性 7 例(5.19%)。

表 1 183 例 IIF 法检测 ANA 阳性标本各种核型的阳性率

核型	n	阳性率(%)
颗粒型	62	33.88
均质型	63	34.43
胞质颗粒型	32	17.49
核仁型	14	7.65
着丝点型	11	6.01
胞浆纤维型	1	0.55

2.3 ANA, ANAs 阳性率在自身 AID 病和非 AID 疾病的比较 ANA 在 AID 的阳性率(96.4%)显著高于非 AID(13.1%)($\chi^2 = 223.8, P < 0.01$),同样 ANAs 在 AID 的阳性率(73.2%)也显著高于非 AID(8.1%)($\chi^2 = 188.5, P < 0.01$),在 AID 中 ANA 检测与 ANAs 检测的阳性率对比,差异有统计学意义($\chi^2 = 11.72, P < 0.01$)。

3 结论 自身免疫病是指机体对自身抗原发生免疫反应而导致自身组织损害所引起的疾病,可分为器官特异性自身免疫病和系统性自身免疫病。器官特异性自身免疫病主要是组织器官的病理损害和功能障碍,仅限于抗体或致敏淋巴细胞所针对的某一器官,主要有重症肌无力、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化等。由于抗原抗体复合物广泛沉积于血管壁等原因导致全身多器官损害,称系统性自身免疫病,主要有系统性红斑狼疮、混合结缔组织病、舍格伦综合征、类风湿性关节炎等。自身抗体的检测已成为诊断自身免疫疾病的重要依据。许多自身免疫性疾病都可以出现阳性,ANA 的靶

抗原分布整个细胞,包括抗DNA抗体,抗组蛋白抗体,抗非组蛋白抗体,抗核仁抗体^[4,5]。目前国内实验室检测ANA最常用的初筛方法IIF法,是检测细胞内抗原自身抗体的金标准。IIF法筛查ANA有很多的优点:实验基质制备容易,基质(Hep-2细胞和猴肝片)中含抗原谱完整,敏感度高,特异性强,可产生特征性的荧光模型^[6]。但该方法自动化程度低,操作标准化较难;读片耗时,结果的正确性和精确度很大程度上取决于阅片人的知识技术,带有一定程度的主观性^[7]。随着技术的发展,许多ANAs特异性抗体被逐渐认识,其相应的靶抗原纯化技术不断提高,ANAs的检测逐渐应用于临床,其中LIA法操作简便,易自动化,判读方便,一次可检测多种特异性自身抗体,并且有较高的敏感度和特异度,因此,作为ANA检测“金标准”的IIF法不断受到挑战^[8,9]。

本研究对ANA的IIF检测结果与特异性自身抗体的LIA检测结果进行比较分析,发现一些不一致,单独IIF检测的阳性率高于单独LIA检测,这是因为IIF的抗原基质所包含的抗原种类的范围比LIA法要广。而IIF法覆盖的基质抗原中抗原分布的均匀性,以及抗原含量不如LIA法,这是IIF检测ANA可导致几乎所有种类的ANAs特异性抗体漏检的原因。虽然可通过IIF检测ANA对荧光模型进行分析,初步判断相应抗体的性质,但有时同种抗体可出现不同的荧光染色模型,不同的抗体也可出现同样的荧光染色模型,荧光模型只具有一定的提示作用。目前认为ANA荧光模型已不能准确反映以往已知的靶抗原所呈现的经典荧光模型,应同时进行各种特异性自身抗体的检测。在我们的统计中,ANA和ANAs的阳性检出率在AID组与非AID组间存在明显差异($P<0.05$)。ANA在自身免疫病患者中的检出率高于非自身免疫病患者,ANAs在自身免疫病患者中的检出率亦显著高于非AID患者。在确诊AID的患者中,两种方法的检出率也有差异。ANA阳性,而ANAs阴性,原因可能是我们所用的ANAs只能检测到15种抗体,ANA-IIF阴性不能排除有特异性抗体存在;固定不当,可溶性抗原可被洗去而出现IIF分析的假阴性等^[10]。ANA阴性,而ANAs阳性,原因可能是患者血清中其他抗体效价较强,使不一致性抗体在IIF分析中被遮蔽,而在LIA单条带分析中显现;基质(Hep-2细胞和猴肝片)细胞不是某些抗体如Jo-1抗体的最佳检测基质,基质(Hep-2细胞和猴肝片)细胞抗原底物存在分布不均、含量过低以及不同固定方法对特定抗原的破坏等因素影响等^[11,12]。

综上所述,如果只采用IIF法检测ANA来对自身免疫性疾病进行筛查,有可能对一些ANA阴性而ANAs阳性的样本产生漏检;而ANAs检测因其测定的抗体数量有限也容易导致AID患者的ANA漏检。IIF-ANA和LIA-ANAs检测不能相互代替,对需要通过检测ANA来排除AID的患者标本应同时进行IIF-ANA和LIA-ANAs的检测,以避免仅采用一种方法进行检测时导致AID患者漏诊^[11],以便为自身免疫性疾病的早期诊断与及时治疗提供有力的帮助。

参考文献:

- [1] Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(8): 1420-1422.
- [2] 何蕊, 徐兰峰, 宋秀军, 等. 抗核抗体谱检测的临床诊断意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(9): 1017-1018.
He R, Xu LF, Song XJ, et al. Clinical diagnostic significance of anti nuclear antibody spectrum detection[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2011, 27(9): 1017-1018.
- [3] 邓学新, 曲昌华. 818例自身免疫病抗ENA抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(4): 302-303.
Deng XX, Qu CH. Comparative analysis of anti ENA and anti nuclear antibodies against 818 cases of autoimmune disease[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2005, 23(4): 302-303.
- [4] 陆慧琦, 李畅, 叶伟民, 等. ANA和ENA检测在自身免疫性疾病中的应用评价[J]. 现代免疫学, 2011, 31(1): 56-59.
Lu HQ, Li C, Ye WM, et al. Evaluation on the detection of anti-nuclear antibody and anti-soluble nuclear-antigen antibody for the diagnosis of autoimmune diseases[J]. Current Immunology, 2011, 31(1): 56-59.
- [5] 舒颖, 张平安, 魏新素, 等. 抗核抗体滴度与IgG, C3, C4水平及抗ENA抗体结果的相关性[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(2): 48-50.
Shu Y, Zhang PA, Wei XS, et al. Relationship between human immuno globulin and complement and the positive results of different items in the anti-extractable nuclear antigen with the titer of antinuclear antibodies[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(2): 48-50.
- [6] 程艳杰, 王旭, 朱鸿, 等. 关于抗核抗体概念及核膜型临床意义的建议[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 477.
Cheng YJ, Wang X, Zhu H, et al. About the concept of anti nuclear antibodies and nuclear envelope type clinical significance suggestion[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2012, 35(5): 477.
- [7] 周仁芳, 胡朝军, 张蜀澜, 等. 临床标本抗核抗体102651例检测结果回顾性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(12): 1339-1343.
Zhou RF, Hu ZJ, Zhang SL, et al. Retrospective analysis of antinuclear antibody test results of 102 651 specimens[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2009, 32(12): 1339-1343.

(下转 146 页)

(上接 142 页)

- [8] 姚海红,贾汝林,贾 园,等. 2011 年全国多中心自身抗体检测质量控制结果分析[J]. 中华风湿病学杂志, 2012,16(12):825-829.
Yao HH, Jia RL, Jia Y, et al. Summary of the 2011 national autoantibody testing quality control[J]. Chinese Journal of Rheumatology, 2012, 16 (12): 825-829.
- [9] 张 瑞,张 括,王露楠,等. 2006~2011 年中国临床实验室检测自身抗体的室间质量评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(3):271-276.
Zhang R, Zhang K, Wang LN, et al. External quality assessment of autoantibodies detection in clinical Laboratories during 2006 ~ 2011 in China[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2012, 35 (3): 271-276.
- [10] 郭大文,张英辉,单 娜,等. 抗核抗体核型与条带免疫抗体谱相关性分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂

志, 2012,26(6):560-562.

- Guo DW, Zhang YH, Shan N, et al. Correlation of antinuclear antibody immunofluorescence patterns with immune profile using line immunoassay [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2012,26(6):560-562.
- [11] 黄 芳,陈静宏,王香玲,等. 间接免疫荧光法与蛋白印迹法检测抗核抗体的比较研究[J]. 现代检验医学杂志, 2013,28(4):48-51.
Huang F, Chen JH, Wang XL, et al. Comparison of indirect immunofluorescence and line immunoassay for autoantibody derection [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013,28(4):48-51.
- [12] Higashi N, Niimi Y, Aoki M, et al. Clinical features of antinuclear antibody-positive patients with atopic dermatitis[J]. J Nippon Med Sch, 2009,76(6):300-307.

收稿日期:2015-03-03

修回日期:2015-06-12