

抗核抗体谱的检测在自身免疫性疾病中的应用价值

蒋新颖,金玉,张颖,冯潜(徐州医学院附属医院检验科,江苏徐州 221000)

【摘要】 目的 探讨用间接免疫荧光法(IIF)抗核抗体(ANA)与免疫印迹法(LIA)特异性抗核抗体谱(ANAs)的联合检测在自身免疫性疾病(AID)中的应用价值。**方法** 436 例患者,其中自身免疫病患者 271 例,非自身免疫病患者 165 例,所有患者同时检测血清 ANA 和 ANAs,两种检测方法产生 4 种检出模式:IIF(+)/LIA(+)、IIF(-)/LIA(-)、IIF(+)/LIA(-)和 IIF(-)/LIA(+)**结果** 436 份标本中 IIF(+)/LIA(+)占 40.15%,IIF(-)/LIA(-)占 25.52%,IIF(+)/LIA(-)占 15.27%,IIF(-)/LIA(+)占 9.81%,IIF 与 LIA 检测 ANA 的结果总体符合率为 65.67%,ANA 和 ANAs 在自身免疫病患者中的阳性率分别是 65.3%和 57.9%,显著高于非自身免疫病患者的 17.6%和 20.0%;ANA 和 ANAs 在自身免疫病组和非自身免疫病组间阳性率比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。两检测结果仅在 MCTD 和 SLE 患者中存在相关性($P<0.01$),在其他观察组中不存在相关性($P>0.05$)。**结论** IIF 检测 ANA 容易导致 AID 患者部分具有临床意义的 ANA 特异性抗体漏检,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 LIF-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。ANA 的 IIF 法易导致以抗-SSA、抗-SSB 和抗-Ro52 为主要抗体的患者 ANA 假阴性,而 LIA 法特异性 ANAs 的检测因检测的抗体不全面也无法取代 ANA 的 IIF 法检测。在临床实际工作中两种 ANA 的检测方法不能相互取代,应联合应用。

【关键词】 间接免疫荧光法; 抗核抗体; 免疫印迹法; 自身免疫性疾病
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.06.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)06-0691-03

Application value of antinuclear antibody spectrum detection in diagnosis of autoimmune diseases JIANG Xin-ying, JIN Yu, ZHANG Ying, FENG Qian (Department of Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the application value of the combination detection of the serum antinuclear antibody(ANA) measured by the indirect immunofluorescence(IIF) and the antinuclear antibodies(ANAs) measured by Western blot(LIA) in diagnosing autoimmunity diseases(AID). **Methods** 436 patients were selected, including 271 patients with autoimmune diseases and 165 patients with non-autoimmune diseases. Serum ANA and ANAs were measured in all patients at the same time. The two detection methods produced four kinds of results:IIF(+)/LIA(+),IIF(-)/LIA(-),IIF(+)/LIA(-) and IIF(-)/LIA(+). **Results** Among 436 specimens, the results of IIF(+)/LIA(+)accounted for 40.15%,IIF(-)/LIA(-) for 25.52%,IIF(+)/LIA(-) for 15.27%,and IIF(-)/LIA(+)for 9.81%. The coincidence rate of IIF and LIA results detecting ANA was 65.67%. The positive rates of ANA and ANAs in the patients with autoimmune diseases were 65.3% and 57.9%, obviously higher than 17.6% and 20.0% 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($P<0.01$). The correlation of the results of two detection methods only existed in MCTD and SLE patients($P<0.01$),but without correlation among the other observation groups($P>0.05$). **Conclusion** IIF detecting ANA will easily miss some AID patients with positive ANA-specific antibodies,while ANAs detection will also easily lead to ANA of AID patients missed because of its limitation in detecting the number of antibody. So the IIF-ANA and LIA-ANAs detection can not substitute each other. The patient specimens which need to exclude AID by detecting ANA should use the IIF-ANA and LIF-ANAs detection at the same time,to avoid AID patients' missed diagnosis when only one method is used to detect. The IIF method of ANA will easily lead to ANA false-negative in the patients with the primary antibodies of anti-SSA,anti-SSB and anti-Ro52. Due to the incomplete detection of antibodies,the specific ANAs detection of LIA method can not replace the IIF method. The two ANA detection methods can not replace each other,but should be combined in clinical practice work.

【Key words】 indirect immunofluorescence assay; antinuclear antibody; Western blot; autoimmune diseases

自身抗体是自身免疫性疾病(AID)的重要标志物。间接免疫荧光法抗核抗体(IIF-ANA)检测是 AID 的筛选试验,而免疫印迹法特异性抗核抗体谱(LIA-ANAs)检测对 AID 诊断和鉴别诊断、病情评估与治疗监测、病程转归与预后判断等都

具有重要的临床应用价值^[1]。以往文献大多对荧光法抗核抗体与印迹法抗核可提取性核抗原抗体(ENA) 的相关性进行研究,但是在常规工作中,作者发现荧光法抗核抗体检测结果有时与免疫印迹法检测结果不符合。为探讨 IIF-ANA 与 LIA-ANAs 的相关性,本文对 436 例检测结果进行对比研究,分析其相关性,探讨对 AID 的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 4 月至 2012 年 4 月,在本院门诊及住院确诊为 AID 的患者 271 例,包括系统性红斑狼疮(SLE)90 例、混合性结缔组织病(MCTD)35 例、干燥综合征(SS)23 例、类风湿关节炎(RA)37 例、系统性硬化症(SSc) 18 例、自身免疫性肝炎(AIH)28 例、其他 AID 40 例;确诊为非 AID 的患者 165 例,其中男 143 例,年龄 17~65 岁,平均 41. 1 岁;女性 293 例,年龄 13~70 岁,平均 39. 8 岁;诊断均符合相关疾病的国际诊断标准,所有患者均空腹采血分离血清直接检测。

1.2 方法

1.2.1 IIF-ANA 检测 试剂盒来自于德国欧蒙医学实验诊断有限公司。每个反应区同时有灵长类肝组织切片和 HEP-2 细胞。血清稀释后与抗原基质片反应 30 min 同时设阳性和阴性对照,浸泡 5 min,加入荧光标记的二抗避光孵育 30 min,浸泡 5 min,加甘油封片后荧光显微镜下判读结果。以抗体滴度大于或等于 1:100 为阳性。

1.2.2 LIA-ANAs 检测 试剂来自于北京海瑞祥天生物有限公司,采用 LIA 检 ANAs 特异性抗体,包括抗-AMAM2、抗-U1-nRNP、抗-SmD1、抗-SS-A/60kd、抗 SS-A/52kd 抗体、抗-SS-B、抗-Scl-70、抗-Jo-1、CBNPB(抗着丝点抗体)、抗-dsDNA、抗-Nuc(核小体抗体)、抗-His(组蛋白抗体)、抗-PO(核糖体 P 蛋白抗体)。1:100 稀释的患者 1 L 血清与膜条上的靶抗原反应 30 min,洗涤 3 次加入 1 L 酶标记的抗人 IgG(酶结合物)反应 30 min,洗涤 3 次(每次 5 min),加入底物液反应 10 min,蒸馏水清洗膜条加入终止液终止反应,待膜干燥后,将实验结果与试剂盒提供的 LIA 特异判读卡比较,判定结果。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11. 0 统计软件分析,组间阳性率比较用 χ^2 检验, $P<0. 05$ 为差异有统计学意义。指标相关性分析采用 Spearman 相关分析方法, $P<0. 05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

IIF-ANA 和 LIF-ANAs 在自身免疫病组与非自身免疫病组之间存在明显差异($P<0. 01$),ANA 在自身免疫病患者中的阳性率(65. 3%)明显高于非自身免疫病患者(17. 6%),AN-As 在自身免疫病患者中的阳性率(57. 9%)明显高于非自身免疫病患者(20. 0%)。但 ANA 和 ANAs 检测结果仅在 MCTD 和 SLE 患者中存在相关性($P<0. 01$),在其他观察组中不存在相关性($P>0. 05$),表 1。

表 1 IIF-ANA 和 LIF-ANAs 在不同自身免疫疾病中的相关性[n(%)]

组别	n	IIF-ANA	LIA-ANAs
AID	271	177(65. 3)*	157(57. 9)*
SLE	90	63(70. 2) Δ	55(61. 1)
MCTD	35	30(5. 7) Δ	31(88. 6)
SS	23	8(34. 8) $^\#$	16(69. 6)

续表 1 IIF-ANA 和 LIF-ANAs 在不同自身免疫疾病中的相关性[n(%)]

组别	n	IIF-ANA	LIA-ANAs
RA	37	29(8. 4) $^\#$	20(54. 0)
SSc	18	12(66. 7) $^\#$	14(77. 8)
AIH	28	13(46. 4) $^\#$	7(35. 0)
其他 AID	40	22(55. 0) $^\#$	14(5. 0)
非 AID	165	29(17. 6) $^\#$	33(20. 0)

注:与非 AID 组相比,* $P<0. 01$;在同一种疾病中与 LIA-ANAs 比较, $\Delta P<0. 01$, $^\# P>0. 05$ 。

3 讨 论

IIF 作为 ANA 检测的标准方法,具有检测灵敏度高、操作方便,且能针对细胞核、细胞质、细胞骨架、细胞周期等各种自身抗体,具有检测范围广等优点^[2]。自从以 HEP-2 细胞为基质的 IIF-ANA 建立以后,国内外许多实验室均采用此方法作为 ANA 的筛查试验,但由于检测时干扰现象或人体正常免疫反应等会出现假阳性,基质中部分靶抗原分布不均、含量低等原因也会出现假阴性结果。而 LIA 作为 ANAs 的特异性抗体确认实验中的一种,在反应膜条上平行包被多种高度纯化或重组的抗原物质,具有操作简单快速、易自动化,结果判读方便,一次可检测 AID 相关的多种特异性自身抗体,并且在方法学上与 ELISA 比较有相似的灵敏度和特异性等优点^[3-4]。

本研究结果显示两种方法检测结果的总体符合率仅为 65. 67%。经统计分析,IIF-ANA 与 LIA-ANAs 检测结果的差异有统计学意义($P<0. 01$),从方法学角度分析,IIF-ANA 与 LIA-ANAs 检测结果并不完全一致,不能相互替代。以 HEP-2 细胞为抗原基质检测 ANA 时,基质中的抗原存在分布不均、含量过低以及不同固定方法对特定抗原的破坏等因素的影响,可能导致部分特异性抗体的漏检^[5-6]。如果实验室以 IIF 作为 ANA 初筛试验,初筛阳性后再进行 ANAs 特异性抗体检测,会导致 10% 以上的患者 ANA 假阴性,很容易造成部分具有重要临床意义的 ANAs 特异性抗体漏检,导致 AID 患者的误诊、漏诊^[7]。另一方面,由于 LIA-ANAs 检测的特异性抗体数量极其有限,而 AID 患者体内存在的自身抗体多达上百种^[8-9],从理论上分析该方法不能代替针对总抗体的 IIF-ANA 检测。

本实验 ANA 和 ANAs 的阳性检测率在自身免疫病组与非自身免疫病组间差异有统计学意义($P<0. 01$)。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自身免疫病患者。ANA 和 ANAs 检测结果仅在 MCTD、SLE 患者中存在相关性,在其他观察组中不存在相关性。本结果中 SLE 患者的 ANA 阳性检出率为 70. 2%,抗-Sm、抗-dsDNA、抗-histone 作为 SLE 的特异性标志抗体,抗-Sm 对 SLE 诊断特异性高,但敏感性低,因此同时做 ANAs 的检测可增加检测的敏感性。抗-SSA 和抗-SSB 是诊断 SS 的标志性抗体,抗-SSA 的敏感性高,但抗-SSB 较抗-SSA 诊断 SS 更为特异。抗 U1-nRNP 是 MCTD 的标志性抗体,但也存在特异性较差的不足,因此 IIF-ANA 与 LIA-ANAs 同时检测可以提高自身免疫病的检出率,对患者病情的判定、追踪和预防也具有重要作用。

本研究的 IIF-ANA(-)/LIA-ANAs(+)结果表明,IIF 检测 ANA 可导致几乎所有种类的 ANAs 特异性抗体漏检,其中

最易漏检的特异性抗体为抗-Ro-52、抗-SS-A、抗-SS-B,其次为抗-AMA-M2、抗-Sm 和抗-Jo-1,这些漏检的特异性抗体都具有重要的临床意义,因此,无论从不同检测方法的本质特征还是从实际临床意义来看,IIF-ANA 的检测不能完全代替 LIA-ANAs 的检测。

本实验中 IIF-ANA(+) /LIA-ANAs(-) 组常见的 13 项特异性抗体均为阴性,虽然 ANA 阳性可在许多疾病出现,结合临床诊断发现抗体滴度与疾病活动有一定关系,即滴度越高,疾病处于活动期可能性越大。ANA 不能作为某种 AID 的特异性诊断指标,作为初筛实验,与 ANAs 的联合检测,更有利于提高诊断的准确率,使特异性、敏感性大大增强^[10-11]。

总之,ANAs 特异性抗体检测具有疾病特异度和较高的检测敏感度,而 IIF-ANA 筛查具有抗体检测的全面性。无论是从方法学角度还是实际临床意义分析,本次统计的结果均表明 IIF-ANA 和 LIA-ANAs 特异性抗体检测不能相互代替,临床应对需要通过检测 ANA 来排除 AID 患者的标本同时进行 IIF-ANA 和 ANAs 特异性抗体的检测,以避免仅用一种方法检测导致的 AID 患者漏诊。

参考文献

[1] von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases [J]. Semin Arthritis Rheum, 1995, 24(5): 323-358.

[2] Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(1): 71- 81.

[3] Meheus L, Van Venrooij WJ, Wiik A, et al. Multicenter validation of recombinant, natural and synthetic antigens used in a single multiparameter assay for the detection of specific anti-nuclear autoantibodies in connective tissue disorders[J]. Clin Exp Rheumatol, 1999, 17(2): 205-214.

[4] Damoiseaux J, Boesten K, Giesen J, et al. Evaluation of a

novel line-blot immunoassay for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1050: 340-347.

[5] Tanaka N, Muro Y, Sugiura K, et al. Anti-SS-A/Ro antibody determination by indirect immunofluorescence and comparison of different methods of anti-nuclear antibody screening: evaluation of the utility of HEp-2 cells transfected with the 60 kDa SS-A/Ro as a substrate[J]. Mod Rheumatol, 2008, 18(6): 585-592.

[6] Bossuyt X, Luyckx A. Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples[J]. Clin Chem, 2005, 51(12): 2426-2427.

[7] Peene I, Meheus L, Veys EM, et al. Detection and identification of antinuclear antibodies(ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing[J]. Ann Rheum Dis, 2001, 60(12): 1131-1136.

[8] Hu CJ, Zhang FC, Li YZ, et al. Primary biliary cirrhosis: what do autoantibodies tell us? [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(29): 3616-3629.

[9] Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, et al. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients[J]. Semin Arthritis Rheum, 2004, 34(2): 501-537.

[10] Verstegen G, Duyck MC, Meeus P, et al. Detection and identification of antinuclear antibodies(ANA) in a large community hospital [J]. Acta Clin Belg, 2009, 64(4): 317-323.

[11] Tampoia M, Brescia V, Fontana A, et al. Application of a combined protocol for rational request and utilization of antibody assays improves clinical diagnostic efficacy in autoimmune rheumatic disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(1): 112-116.

(收稿日期:2012-09-02 修回日期:2012-12-31)

(上接第 690 页)

的日常维护与保养,做好室内与室间质控,选择国内正规的(通过 ISO 认证)、可溯源的试剂商提供的试剂和校正物,严格按照操作规程进行临床检测工作。当实验室内同一检测项目在两套以上检测系统检测时,必须对其进行比对分析和偏倚评估,保证了同一实验室检测结果的准确、可靠性,满足临床的需要,更好地为临床服务。

参考文献

[1] NCCLS. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples: NCCLS Document EP9-A2 [M]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.

[2] [NO authors listed]. Medicare, Medicaid and CLIA programs, regulations implementing the Clinical Laboratory Improvement Amendment of 1998 (CLIA)-HCFA. Final

rule with comment period[J]. Fed Regist, 1992, 57(40): 7002-7186.

[3] 张秀明,郑松柏,孙蕾,等.应用 Westgard 方法评价决定图判断生化检测系统性能的可接受性[J].中华检验医学杂志, 2007, 30(1): 86.

[4] 邱玲,程歆琦,刘荔,等.多台生化分析仪多项目同时进行比对的实验研究设计及应用[J].中华检验医学杂志, 2007, 30(9): 1001-1004.

[5] 罗万义,吴英.自建检测系统测定血清总蛋白的结果比对及偏倚评估[J].检验医学与临床, 2011, 24(8): 3401-3402.

[6] 陈志龙,张斌豪.血清丙氨酸氨基转移酶、总蛋白定量分析方法的评价[J].现代诊断与治疗, 2005, 16(2): 70-71.

(收稿日期:2012-07-06 修回日期:2012-11-19)