

• 临床检验研究论著 •

抗中性粒细胞胞质抗体检测在风湿病诊断中的临床价值探讨

石莉萍, 张利方, 吴颖涛, 秦 滢

(广州军区武汉总医院检验科, 湖北武汉 430070)

摘要:目的 探讨抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)检测对风湿病患者诊断的临床意义。方法 将 965 例风湿病患者作为风湿病组,其中,SLE 256 例,MCTD 124 例,RA 336 例,干燥综合征(SS)166 例,系统性硬化症(SSc)45 例,皮炎 38 例。将 400 例健康体检者作为对照组。采用间接免疫荧光法(IIF)检测胞质型 ANCA(c-ANCA)、核周型 ANCA(p-ANCA)。ANCA 阳性者采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测其抗髓过氧化物酶(MPO)抗体。结果 风湿病组、对照组受检者血清 ANCA 的阳性率的差异有统计学意义($P < 0.01$),两组受检者 ANCA 阳性的血清中,p-ANCA 与 c-ANCA 的阳性率的差异有统计学意义($P < 0.01$)。伴 SLE 的患者血清 p-ANCA 的阳性率显著高于伴 MCTD、RA、SS、SSc、皮炎患者及对照组受检者($P < 0.05$);伴 MCTD 的患者血清 p-ANCA 的阳性率显著高于伴 RA、SS、SSc、皮炎患者及对照组受检者($P < 0.05$)。165 例 p-ANCA 阳性的风湿病患者抗 MPO 抗体的阳性率为 58.4%,显著高于对照组受检者(3%)($P < 0.01$);ANCA 阳性的风湿病患者伴肾功能损害的阳性率为 55.4%,显著高于 ANCA 阴性的风湿病患者(21.8%)及对照组受检者(6.25%)($P < 0.01$)。结论 血清 ANCA 检测对预防风湿病患者肾毒性损害有重要意义。

关键词:抗中性粒细胞胞质抗体; 荧光抗体技术,间接; 风湿性疾病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1293-03

A study on clinical values of antineutrophil cytoplasmic antibody detection in diagnosis of rheumatic diseases

Shi Liping, Zhang Lifang, Wu Yingtao, Qin Ying

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical values of antineutrophil cytoplasmic antibody(ANCA) detection in the diagnosis of rheumatic diseases. **Methods** 965 patients with rheumatic diseases were taken as rheumatic group, including 256 cases of SLE, 124 of mixed connective tissue disease(MCTD), 336 of rheumatoid arthritis(RA), 166 of Sjogren's Syndrome(SS), 45 of systemic sclerosis(SSc) and 38 of dermatomyositis. 400 healthy people were served as the control group. Indirect immunofluorescence(IIF) was employed to detect the cytoplasmic ANCA(c-ANCA), perinuclear ANCA(p-ANCA). Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was utilized to assay the anti-myeloperoxidase(MPO) antibody among patients with positive ANCA. **Results** Difference of positive rates of serum ANCA of subjects in rheumatic group and control group showed statistical significance($P < 0.01$), and the differences of positive rates of serum p-ANCA and c-ANCA of subjects with positive ANCA between the two group were also statistically significant($P < 0.01$). The positive rate of serum p-ANCA of patients with SLE was markedly higher than those with MCTD, RA, SS, SSc, dermatomyositis and healthy people in control group($P < 0.05$), while that of patients with MCTD was obviously higher than those with RA, SS, SSc, dermatomyositis and healthy people in control group($P < 0.05$). The positive rate of anti-MPO antibody of 165 patients with positive ANCA in rheumatic group was 58.4%, which was significantly higher than that in control group(3%)($P < 0.01$). The positive rate of patients with positive ANCA and impaired renal function in rheumatic group was 55.4%, which was obviously higher than those of patients with negative ANCA in rheumatic group(21.8%) and control group(6.25%)($P < 0.01$). **Conclusion** Serum ANCA detection is of important significance for prevention of nephrotoxic damage in patients with rheumatic diseases.

Key words: antineutrophil cytoplasmic antibodies; fluorescent antibody technique, indirect; rheumatic diseases

抗中性粒细胞胞质抗体(antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA)是以中性粒细胞和单核细胞胞质为靶抗原的抗体^[1]。被认为是原发性小血管炎的特异性标志物。近年来,随着多系统受累的病例不断增多,人们对 ANCA 的认识也越来越深刻。许多类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease, MCTD)及自身免疫性肝病患者的血清中也常检出 ANCA。本研究采用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)对 965 例风湿病患者和 400 例健康者进行了 ANCA 及其靶抗原的检测,分析核周型 ANCA(perinuclear ANCA, p-ANCA)与风湿病肾毒性损害的

关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2010 年 12 月至 2013 年 6 月于本院门诊及住院确诊的 965 例风湿病患者作为风湿病组,其中,男 340 例,女 625 例;年龄 5~74 岁,平均(52.3±6.7)岁;SLE 256 例,MCTD 124 例、RA 336 例、干燥综合征(Sjogren's Syndrome, SS)166 例、系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)45 例、皮炎 38 例。SLE 患者均符合 SLE 国际临床协作组(SLE international collaborating clinics, SLICC)的 SLE 分类标准修订版,其他风湿病患者均符合美国风湿病学会的分类标准^[2]。将本院体检中心的 400 例健康体检者作为对照组,其

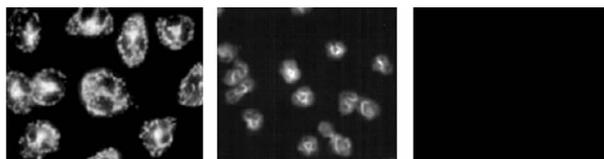
中,男 186 例,女 214 例;年龄 9~71 岁,平均(50.8±8.2)岁,均无自身免疫性疾病,肝、肾功能正常。

1.2 检测方法 抽取受试者静脉血 3 mL,及时分离血清待检。血清标本室温下复溶后采用马赛克生物薄片(德国欧蒙公司)载片,基质含甲醛及乙醇固定的中性粒细胞。采用 IIF 检测胞质型 ANCA(cytoplasmic ANCA, c-ANCA)、p-ANCA(检测试剂盒购自德国欧蒙公司),荧光显微镜判读。c-ANCA 阳性:中性粒细胞胞质中均匀分布颗粒型荧光,细胞核无荧光;p-ANCA 阳性:中性粒细胞核周显示光滑的带状荧光。ANCA 阳性者加做抗髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)抗体的酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)验证实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 风湿病患者中性粒细胞 ANCA 检测的荧光模型 乙醇固定中性粒细胞后,采用 IIF 检测 ANCA, p-ANCA 阳性、c-ANCA 阳性及 ANCA 阴性的荧光模型见图 1。



左:p-ANCA;中:c-ANCA;右:阴性对照。

图 1 风湿病患者中性粒细胞 ANCA 检测的荧光模型(IIF ×400)

2.2 风湿病组、对照组受检者血清 ANCA 的阳性率 风湿病组、对照组受检者血清 ANCA 的阳性率分别为 17.2%(166/965)、8.0%(32/400),二者差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 ANCA 阳性的风湿病组患者血清 p-ANCA 与 c-ANCA 的检测结果 风湿病组、对照组受检者 ANCA 阳性的血清中, p-ANCA 的阳性率分别为 99.4%(165/166)、96.9%(31/32), c-ANCA 的阳性率分别为 0.6%(1/166)、3.1%(1/32),二者差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 风湿病组患者血清 p-ANCA 的表现 伴 SLE、MCTD、RA、SS、SSc、皮肤炎的风湿病患者及对照组受检者血清 p-ANCA 的阳性率分别为 35.2%(90/256)、22.6%(28/124)、10.1%(34/336)、7.2%(12/166)、2.2%(1/45)、0.0%(0/38)及 7.8%(31/400)。其中,伴 SLE 的患者血清 p-ANCA 的阳性率显著高于伴 MCTD、RA、SS、SSc、皮肤炎者及对照组受检者($P<0.05$);伴 MCTD 的患者血清 p-ANCA 的阳性率显著高于伴 RA、SS、SSc、皮肤炎者及对照组受检者($P<0.05$)。

2.5 p-ANCA 阳性的风湿病患者抗 MPO 抗体及肾功能损害的阳性率 165 例 p-ANCA 阳性的风湿病组患者加做 MPO 验证试验,抗 MPO 抗体的阳性率为 58.4%,显著高于对照组受检者(3.0%)($P<0.01$);ANCA 阳性的风湿病组患者伴肾功能损害的阳性率为 55.4%,显著高于 ANCA 阴性的风湿病组患者(21.8%)及对照组受检者(6.2%)($P<0.01$)。

3 讨论

ANCA 中存在着多种靶抗原,对应这些靶抗原,ANCA 分为 4 型: c-ANCA、p-ANCA、c-ANCA (atypical) 和 atypical-ANCA。有人认为 atypical-ANCA 是 p-ANCA 和 c-ANCA 重叠的结果,故将后 3 种 ANCA 统称为 p-ANCA,而 p-ANCA 不

仅常见于多系统性血管炎,还可在自身免疫性肝病及多种风湿病中出现^[3-6]。本研究显示风湿病患者 ANCA 阳性率显著高于健康者($P<0.01$),风湿病患者血清 p-ANCA 的阳性率高于 c-ANCA;在 ANCA 阳性的风湿病患者中,伴 SLE 的患者血清 p-ANCA 的阳性率较其他风湿病患者高($P<0.01$),MCTD 次之($P<0.01$)。ANCA 阳性的风湿病组患者伴肾功能损害的阳性率显著高于 ANCA 阴性的风湿病组患者(21.8%)及对照组受检者(6.2%)。由此可见,风湿病患者发生肾损害的机制与 p-ANCA 密切相关,特别是目前发病率较高的 SLE 及 MCTD。这与廖永强等^[7]报道的 ANCA 对于 SLE 活动期是一个有价值的指标相一致。但 ANCA 检测与其他几种风湿病(特别是 MCTD 的病情评估方面)的价值还有待广泛深入的研究。

SLE 是由可溶性抗原-抗体免疫复合物沉积或自身抗体经免疫介导,以 B 淋巴细胞高度活化为特征^[8],临床表现为多系统损害的一种慢性系统性自身免疫性结缔组织病,以肾脏受累最为常见,其发病原因较为复杂。SLE 继发狼疮肾炎的发病率高达 50%~75%,严重影响患者的预后^[9-10]。有分析指出,在新月体肾炎活动指数及慢性指数均较高的情况下,患者预后差、复发率高,ANCA 阳性率亦高^[11]。但 ANCA 检测对于狼疮肾炎的诊断、病理分型和病情评估等方面的价值还有待广泛、深入的研究^[12]。

本研究显示,165 例 p-ANCA 阳性的风湿病患者中,抗 MPO 抗体阳性 97 例(58.4%)。166 例 ANCA 阳性的风湿病患者中 92 例(55.4%)有肾功能损害,且在抗 MPO 抗体阳性的 97 例患者中,存在肾功能损害的有 89 例(91.8%)。可见,抗 MPO 抗体可能在风湿病有肾功能损害的患者中起到重要作用^[13]。此结果可能为临床上判断风湿病引起的肾功能损伤增添了又一个有效的实验指标。抗 MPO 抗体在风湿病患者肾功能损害中临床意义的探讨有待扩大样本量进一步深入研究,但可以明确的是,ANCA 对于风湿病患者肾脏损害的早期发现和治疗是有意义的。p-ANCA 和抗 MPO 抗体联合检测对于风湿病肾功能损害患者病情的有效控制具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, et al. Prolactin and autoimmunity[J]. Pituitary, 2005, 8(1): 25-30.
- [2] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11): 1271-1277.
- [3] Richer C, Mouthon L, Cohen P, et al. IgA glomerulonephritis associated with microscopic polyangiitis or Churg-Strauss syndrome [J]. Clin Nephrol, 1999, 52(1): 47-50.
- [4] 任青, 李子龙, 林抹红, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体与肾小球疾病 [J]. 中国医科大学学报, 2000, 29(2): 122-124.
- [5] 曾少勇, 幸丽娅, 吴候柏, 等. 联合检测胱抑素 C、肌酐、尿素、尿酸水平在肾功能损伤中的临床诊断价值 [J]. 中国医学创新, 2011, 8(10): 26-27.
- [6] Abdellatif AA, Waris S, Lakhani A, et al. True vasculitis in lupus nephritis [J]. Clin Nephrol, 2010, 74(2): 106-112.
- [7] 廖永强, 彭可君, 刘剑荣, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体与抗核抗体谱联合检测对系统性红斑狼疮的临床意义 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(8): 706-709.
- [8] Hale MB, Krutzik PO, Samra SS, et al. Stage (下转第 1301 页)

gion, HVR) 分型是对 HVR 的 *dru* 序列扩增后进行多态性研究, 其原理是根据不同 MRSA 菌株中 *dru* 序列重复次数不同而分型的。因 *mecA* 基因是 MRSA 所特有, 且该法操作简单、快速, 不需要特殊电泳设备, 因此具有很好的实用性和广阔的应用前景, 但其分辨率不如 PFGE 法。

7 展 望

理想的细菌基因分型方法需要满足以下条件: 操作简单、省时, 重复性好, 利于实验室间相互比较, 适用范围广, 易于标准化。由于目前各种细菌基因分型方法不能完全符合理想 MRSA 基因分型要求, 并且在区分菌株差异的分辨率上各有限制, 还不能完全取代经典 PFGE 分型法。PFGE 技术越来越多地用于细菌种群的研究, 而 SPA 分型和 MLST 分型针对细菌的特异性靶序列进行测序, 用于暴发研究和流行监测。因此, 结合 2 种分型法用于 MRSA 的分型研究有助于了解暴发菌株是如何扩散的。

对 MRSA 进行理想的基因分型还需在现有分型技术的基础上进一步改进或开发新的、更好的分型方法。随着 MRSA 基因组测序及其功能基因组的研究进展, 为进一步寻找在 MRSA 基因组中保守, 而在其菌株间高度变异的序列奠定了基础。扩增高度保守区域可用于推断亲缘关系, 分析高度可变区域可用于区分非常相近的 2 个菌株间的差异。这些保守的或高度可变的序列信息提供了更简便省时, 鉴别力强, 应用更广泛且易于标准化的 MRSA 分型方法。

参 考 文 献

- [1] Salmenlinna S, Lyytikäinen O, Kotilainen P, et al. Molecular epidemiology of Methicillin-Resistant staphylococcus aureus in Finland[J]. Emerg Infect Dis, 2000, 19(2): 101-107.
- [2] Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(11): 7687-7692.
- [3] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [4] Strandén A, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3181-3186.
- [5] 宗春辉, 孙兰菊, 李东华, 等. MRSA 分子流行病学研究[J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9(2): 85-88.
- [6] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [7] Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacte-

rial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 312-316.

- [8] Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1008-1015.
- [9] Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(2): 92-97.
- [10] Enright MC, Robinson DA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(11): 7687-7692.
- [11] Strommenger B, Bräulke C, Heuck D, et al. Spa typing of staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 574-581.
- [12] Francois P, Huyghe A, Charbonnier Y, et al. Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of Staphylococcus aureus isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3346-3355.
- [13] Sabat A, Krzysztos-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing Staphylococcus aureus strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1801-1804.
- [14] Ross TL, Merz WG, Farkosh M, et al. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5642-5647.
- [15] Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, et al. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for Staphylococcus aureus genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(10): 3121-3128.
- [16] Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5442-5448.
- [17] Delaney JA, Schneider-Lindner V, Brassard P, et al. Mortality after infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) diagnosed in the community[J]. BMC Med, 2008, 6: 2.
- [18] 杜娜, 王辉, 牛俊奇, 等. 我国五家教学医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 SCCmec 分型及毒素基因的检测[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(5): 499-504.

(收稿日期: 2013-12-13)

(上接第 1294 页)

dependent aberrant regulation of cytokine-STAT signaling in murine systemic lupus erythematosus[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6756.

- [9] Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, et al. Effect of pregnancy on serum cytokines in SLE patients[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2): R66.
- [10] Frutos MÁ, Praga M, Querada C, et al. Lupus nephritis: in search of a better future[J]. Nefrologia, 2012, 32(2): 136-138.
- [11] Yu F, Tan Y, Liu G, et al. Clinicopathological characteristics and

outcomes of patients with crescentic lupus nephritis[J]. Kidney Int, 2009, 76(3): 307-317.

- [12] Nasr SH, Said SM, Valeri AM, et al. Membranous glomerulonephritis with ANCA-associated necrotizing and crescentic glomerulonephritis[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2009, 4(2): 299-308.
- [13] Morimoto S, Watanabe T, Lee S, et al. Improvement of rapidly progressive lupus nephritis associated MPO-ANCA with tacrolimus[J]. Mod Rheumatol, 2010, 20(3): 291-294.

(收稿日期: 2014-01-13)