·论　著·

两种方法检测 146 例抗核抗体结果的差异分析

黄雪梅，蒲泽晏
（四川省遂宁市中心医院检验科　62900）

摘　要：目的　探讨间接免疫荧光法（IIF）和免疫印迹法（LIA）检测抗核抗体（ANA）的结果差异及临床价值。**方法**　收集 146 例 ANA 检测 IIF（－）与 LIA（＋）的标本，并进行乙型肝炎病毒（HBV）抗原、抗体和丙型肝炎病毒（HCV）抗体的检测。**结果**　（1）在 146 例 IIF（－）LIA（＋）的标本中，单独出现抗 Ro52 抗体、抗 SS-A、抗 AMA-M2 抗体阳性的标本数分别为 69 例、42 例、15 例，抗 RNP 抗体、抗 PCNA 抗体、PM-Scl 抗体阳性的标本数分别为 3 例、5 例、2 例，有两项阳性的共 8 例。（2）单 Ro52 抗体阳性标本中，乙肝小三阳：HBsAg（＋）、HBeAb（＋）、HBcAb（＋），乙肝大三阳：HBsAg（＋）、HBeAg（＋）、HBcAb（＋）及丙型肝炎患者患者例数分别为 51 例、4 例、7 例，非肝炎患者 7 例。（3）单 SSA 抗体阳性标本中，乙型肝炎患者 6 例，非乙肝的患者 36 例。**结论**　IIF 检测 ANA 容易漏检 Ro52 抗体、SSA 抗体，Ro52 抗体与乙肝小三阳有一定关系。

关键词：抗 Ro52 抗体；　抗 SSA 抗体；　乙肝小三阳；　抗核抗体
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.024　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130（2017）05-0635-03

Analysis on results difference of two methods for detecting 146 cases of anti-nuclear antibody

HUANG Xuemei, PU Zeyan
（*Department of Clinical Laboratory, Suining Municipal Central Hospital, Suining, Sichuan* 629000, *China*）

Abstract: Objective　To investigate the results difference of the indirect immunofluorescence (IIF) and immunoblotting (LIA) for detecting ant-inuclear antibodies (ANA) and clinical value. **Methods**　One hundred and forty-six ANA detection specimens of IIF negative and LIA positive were collected and performed the detection of HBV antibodies and anti-HCV antibodies. **Results**　(1) In 146 specimens of IIF (－) LIA (＋), the positive specimen numbers of single anti-Ro52 antibody, anti-SSA antibody and anti-AMA-M2 antibody were 69 cases, 42 cases and 15 cases respectively, which of anti-RNP antibody, anti-PCNA antibody and PM-Scl antibody were 3 cases, 5 cases and 2 cases respectively, the combined 2-item positive was in 8 cases. (2) Among positive specimens of single anti-Ro52 antibody, HBsAg(＋), anti-HBe(＋), anti-HBc(＋) model and HBsAg(＋), HBeAg(＋), HBcAb(＋) model of hepatitis B, and hepatitis C were 51 cases, 4 cases and 7 cases respectively, 7 cases were non-hepatitis patients. (3) Among positive specimens of single ant-SSA antibody, 6 cases were hepatitis B patients and 36 cases were the patients with non-hepatitis B. **Conclusion**　Anti-Ro52 antibody and anti-SSA antibody are easier to be missed by the IIF detection. Anti-Ro52 antibody positive has a certain relation with small three positive of hepatitis B.

Key words: anti-Ro52 antibody;　anti-SSA antibody;　small three positive of hepatitis B;　anti-inuclear antibodies

自身抗体检测是系统性自身免疫病（SARD）诊治中必不可少的工具。随着早期诊断、规范化治疗的广泛开展，自身抗体检测发挥的作用越来越受到重视。随着检测技术的发展，对于自身抗体检测的方法日渐多样化，抗核抗体（ANA）检测应用最广泛的为间接免疫荧光法（IIF）和免疫印迹法（LIA），但由于检测系统的不同，两种方法的结果难以完全一致。对同一标本进行 ANA 检测 IIF（＋）而 LIA（－）临床已有了足够认识，但对 IIF（－）LIA（＋）的结果还有待于进一步探讨。

1　资料与方法

1.1　一般资料　收集本院 2014 年 9 月至 2015 年 12 月的 ANA 检测 IIF（－）LIA（＋）标本 146 例，进行结果分析，并进行乙肝表面抗原（HBsAg）、表面抗体（HBsAb）、e 抗原（HBeAg）、e 抗体（HBeAb）、核心抗体（HBcAb）的检测（简称乙肝两对半检测）以及抗丙型肝炎病毒（HCV）抗体的检测。

1.2　仪器与试剂　ANA 检测试剂盒（IIF 和 LIA）均由欧蒙医学诊断（中国）有限公司提供。乙肝两对半检测试剂由四川迈克生物科技股份有限公司提供。抗 HCV 抗体由苏州新波生物技术有限公司提供。

1.3　方法　IIF 使用 HEp-2 细胞和灵长类猴肝组织双基质检测 ANA。用 LIA 测定 ANA 靶抗原（包括 U1-nRNP、Sm、SS-A、SS-B、SCL-70、Ro52、CENPB、PCNA、Jo-1、AMA-M2、PM-Scl、核糖体 P 蛋白、核小体、组蛋白、dsDNA），用化学发光法测定乙肝两对半。用双抗原夹心时间分辨免疫荧光分析法测定抗 HCV 抗体。操作说明严格按照试剂盒说明书进行。

1.3　结果判定

1.3.1　ANA IIF 检测结果观察　患者血清按 1∶100 稀释，HEp-2 细胞和猴肝组织片产生特异性荧光反应则判定为阳性。

1.3.2　ANA LIA 检测结果观察　患者血清按 1∶101 稀释，抗原带出现着色条带者判定为阳性。

1.3.3　乙肝两对半检测　HBsAg（＋）、HBeAb（＋）、HBcAb（＋）为小三阳，HBsAg（＋）、HBeAg（＋）、HBcAb（＋）为大三阳。

1.3.4　抗 HCV 抗体检测　抗 HCV 抗体检测标本吸光度值比临界值（S/CO）＞1.0 为阳性。

1.4　统计学处理　用 SPSS16.0 软件进行统计学处理，计数资料以率表示，组间比较采用 χ^2 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

作者简介：黄雪梅，女，副主任技师，主要从事临床免疫与微生物学检验的研究。

2　结　果

2.1　IIF(－)LIA(＋)标本的抗核抗体谱分布　146 例 IIF(－)LIA(＋)标本 Ro52 抗体、SSA 抗体的检出率明显高于其他项目($P<0.05$)，见表 1。

表 1　ANA IIF(－)/LIA(＋)标本抗核抗体谱的检出的情况($n=146$)

项目	阳性(n)	阳性率(%)
Ro52	69	47.30
SSA	44	30.10
AMA-A2	15	10.3
PCNA	5	3.42
RNP	3	2.05
Rib-P	3	2.05
PM-SCL	2	1.37
SSA(＋)RO52(＋)	3	2.05
SSA(＋)SSB(＋)	1	0.68
RNP(＋)RO52(＋)	1	0.68

2.2　单 Ro52 抗体阳性标本的 HBV 抗体检出模式　小三阳所占比例最高，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表 2。

表 2　单 Ro52 抗体阳性标本的 HBV 抗体检出模式分布($n=69$)

HBV 模式	n	所占比例(%)
小三阳	51	73.90
大三阳	4	5.80
HBsAg 阴性(丙肝抗体阳性)	7	10.15
HBsAg 阴性(其他)	7	10.15

2.3　单抗 SSA 抗体阳性标本的 HBsAg 检出情况　HBsAg(－)与 HBsAg(＋)所占比例比较，差异有统计学意义($P<0.05$)，见表 3。

表 3　单独抗 SSA 抗体阳性标本的 HBsAg 检出情况($n=44$)

项目	n	所占比例(%)
HBsAg(＋)	9	20.5
HBsAg(－)	33	75.0

3　讨　论

IIF 是第一个被用于检测自身抗体的技术，由于其检测灵敏度高，且能针对细胞核、细胞质、细胞骨架等各种细胞成分进行模型分析，检测范围广，并能发现一些未知靶抗原，从而作为 ANA 诊断的金标准一直沿用到现在。但 IIF 检测技术也有一定的局限性，如只能根据荧光表型，判断靶抗原在细胞中的分布，推测可能的靶抗原，而无法确定具体的靶抗原；不同抗原在细胞中的水平不同，检测的敏感性不同；结果判断受主观因素影响大，不同实验人员得出的结果不尽相同。所以 IIF 检测需要一些基于固相免疫检测的试验方法进行补充，如 ELISA、碱性免疫印迹法(LIA)、多元微珠流式分析(MBA)等[1-2]。当出现 IIF(－)，而部分靶抗原阳性的情况时，可能原因有如下：(1)此类抗原在细胞中的浓度低于检测阈值；(2)此类抗原分布比较弥散时，易受到其他荧光模型/非特异荧光干扰，也不易检出；(3)当抗原表位在反应时被周围结构所覆盖或者与其他分子相互作用，影响抗体结合，可能影响检测的敏感性；(4)方法学影响，在制作检测基质时，将 HEp-2 细胞/猴肝包被在玻片时，固定剂的使用使一些抗原表位被覆盖或改变，抗体难以检测到此类抗原。因此基于培养细胞作为基质的 IIF 有时候也绝非是此类抗体的最佳检测方案[3]。

抗 SSA 抗体是最常见的抗核抗体，分为抗 SSA60 抗体和抗 SSA52/TRIM21(Ro52)抗体两个类型，之前一直认为这两个抗体属于同一种自身抗体，但最新研究证据显示，抗 SSA60 抗体和抗 Ro52 抗体是两种不同的自身抗体体系，分别具有特异性的抗原，它们以不同形式的稳定的大分子复合物存在于细胞类的不同部位，而引起不同的临床症状[4]。目前，普遍认为抗 Ro52 抗体与自身免疫病(自身免疫性肝病、原发性干燥综合征、系统性硬化病、多发性肌炎、皮肌炎等)以及非自身免疫性疾病(感染、肿瘤等)均有相关性，而抗 SSA60 抗体对于 SLE 和 pSS 具有特异性，并且在 SLE 中可能只出现抗 SSA60 抗体[5-7]，而不出现其他抗体。

IIF(－)LIA(＋)的标本中，单独抗 Ro52 抗体和单独抗 SSA 抗体阳性所占比例排在前两位，说明 IIF 法最易漏检的是抗 Ro52 抗体和抗 SSA 抗体。抗 Ro52 抗体在原发性胆汁性肝硬化中的阳性率可达 27%，在自身免疫性肝炎中的阳性率可达 35%，在丙型肝炎患者中达 22%，在乙型肝炎患者中可达 10%。有文献报道，抗 Ro52 抗体平均比系统性红斑狼疮(SLE)相关的其他自身抗体(如 ds-DNA、抗 Sm 等)早 3～4 年出现，因此抗 Ro52 抗体可能对 SLE 的早期诊断有重要意义[11]。虽然抗 Ro52 抗体特异性较差，但在自身免疫性疾病中检出高滴度的抗 Ro52 抗体，也提示 Ro52 蛋白可能是免疫系统的相关蛋白。抗 AMA-M2 抗体是原发性胆汁性肝硬化诊断的早期标志性抗体，荧光表现为胞浆颗粒型，当水平很低时，IIF 往往表现为阴性，而 LIA 包被的为纯化抗原，灵敏度较高，可以检出阳性，这可能是方法学差异造成的。

在 69 例单 Ro52 抗体阳性标本中，检出为乙肝小三阳的占 73.9%，病毒性肝炎患者达到了 89.85%。在 42 例单抗 SSA 抗体阳性标本中，表面抗原阳性仅有 6 例。有文献报道，干扰素在自身免疫调节反面具有强大的功能，尤其是其干扰病毒复制拷贝的效能，已经得到了实践的充分证实。许多研究人员通过研究 Ro52 的相关分子，发现 Ro52 与干扰素之间存在着密切的联系，干扰素的过量表达会引起自身免疫系统的紊乱。Ro52 是一种 E3 泛素链接酶，可以泛素化修饰不同的干扰素家族成员，被称为干扰素诱导蛋白。它可以在 α 干扰素的刺激下迁移至核内。免疫细胞分泌的干扰素可以激活泛素链接酶 Ro52，激活的 Ro52 在干扰素信号通路中是一个负性调节因子[12]。这样的结果提示 Ro52 蛋白的缺失可以加重自身免疫性疾病的发生。

69 例单抗 Ro52 抗体阳性的患者中 55 例为乙型肝炎患者，7 例为丙型肝炎患者。乙型肝炎患者中 42 例为门诊患者，13 例为住院患者。笔者对 13 例住院患者进行了调查，其中 12 例被诊断为慢性活动性乙型肝炎，乙型肝炎病毒 DNA 为阳性且肝功能异常，用药均为复方二氯醋酸二异丙胺等护肝药。7 例丙型肝炎患者均被诊断为慢性活动性丙型肝炎，均使用了聚乙二醇干扰素药物。从数据中可以看出，在肝病患者中，IIF 法最易漏检的是抗 Ro52 抗体。

Song 等[13]的研究表明，原发性干燥综合征患者中，抗 Ro52 抗体阳性患者更容易出现肝脏受累，若抗 Ro52 抗体阳性伴有抗 Ro60 抗体阳性的患者出现肝脏受累较单 Ro52 抗体阳性的比例更大。然而，抗 Ro52 抗体究竟是肝损害的原因还是结果仍然存在争议。已有文献报道，约有 1/3 的慢性丙型肝炎患者血清中可以检测到自身抗体[14]，HCV 感染能诱导自身免疫反应，使患者血清出现多种自身抗体，自身抗体在低滴度时，是自身免疫现象反应标志，在高滴度时才与自身免疫性病密切相关[15]。

综上所述，抗 Ro52 抗体、抗 SSA 抗体在 IIF 中最易漏检，而漏检的样本中乙肝小三阳占的比例最大。而为何漏检的抗 Ro52 抗体阳性标本中乙肝小三阳占的比例最大，漏检的抗 SSA 抗体阳性标本中 HBsAg 阳性占的比例很小，还需要进一步研究。

参考文献

[1] Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay[J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(12): 801-808.

[2] Op De Beéck K, Vermeersch P, Verschueren P, et al. Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis [J]. Autoimmun Rev, 2012, 12(2): 137-143.

[3] 张铭明，张锐，徐建华. 系统性自身免疫性风湿病自身抗体检测进展及评价[J]. 中华风湿病学杂志，2014，18(4)：276-279.

[4] Schulte-Pelkum J, Fritzler M, Mahler M. Latest update on the Ro/SS-A autoantibody system[J]. Autoimmun Rev, 2009, 8(7): 632-637.

[5] Menéndez A, Gómez J, Escanlar E, et al. Clinical associations of anti-SSA/Ro60 and anti-Ro52/TRIM21 antibodies: Diagnostic utility of their separate detection[J]. Autoimmunity, 2013, 46(1): 32-39.

[6] Ghillani P, André C, Toly C, et al. Clinical significance of anti-Ro52 (TRIM21) antibodies non-associated with anti-SSA 60kDa antibodies: results of a multicentric study[J]. Autoimmun Rev, 2011, 10(9): 509-513.

[7] Dugar M, Cox S, Limaye V, et al. Diagnostic utility of anti-Ro52 detection in systemic autoimmunity[J]. Postgrad Med J, 2010, 86(112): 79-82.

[8] 孙丽梅，闫惠平，冯霞，等. Ⅰ型自身免疫性肝炎患者抗 Ro52 抗体的检测及临床意义[J]. 中国实验诊断学，2014，18(2)：236-239.

[9] Granito A, Muratori P, Muratori L, et al. Antibodies to SS-A/Ro-52kD and centromere in autoimmune liver disease: a Clue to diagnosis and prognosis of primary biliary cirrhosis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2007, 26(6): 831-838.

[10] Eyraud V, Chazouilleres O, Ballot E, et al. Significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas: a large French study[J]. Liver Int, 2009, 29(6): 857-864.

[11] Arbuckle MR, Mcclain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2003, 349(16): 1526-1533.

[12] Bolland S, Garcia-Sastre A. Vicious circle: systemic autoreactivity in Ro52/TRIM21-deficient mice [J]. J Exp Med, 2009, 206(8): 1647-1651.

[13] Song JS, Do JH, Lee SW. The prevalence and the clinical relevance of anti-Ro52 in Korean patients with primary Sjögren's syndrome[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(2): 491-495.

[14] 余宏，齐名，李保全，等. 丙型肝炎病毒感染者的自身抗体分析[J]. 上海免疫学杂志，1998，18(2)：98.

[15] 吴赤红，徐小元，田庚善，等. 慢性丙肝肝炎患者血清自身抗体检测的研究[J]. 中华医学杂志，2006，86(6)：390-393.

（收稿日期：2016-09-21　修回日期：2016-11-23）

（上接第 634 页）

[2] Ji Z, Tang Q, Hao R, et al. Induction of apoptosis in the SW620 colon carcinoma cell line by triterpene-enriched extracts from Ganoderma lucidum through activation of caspase-3[J]. Oncol Lett, 2011, 2(3): 565-570.

[3] Wang M, Liu Q, CHE Q, et al. Effects of triterpenoids from Ganoderma lucidum (Leyss. Ex Fr.) karst on tree different experimental liver injury models in mice[J]. Acta Pharm Sin, 2000, 35(5): 326-329.

[4] Zhu M, Chang Q, Wong LK, et al. Triterpene antioxidants from ganoderma lucidum[J]. Phytother Res, 1999, 13(6): 529-531.

[5] 李保明，古海锋，李晔，等. HPLC 测定不同产地灵芝中 9 种三萜酸[J]. 中国中药杂志，2012，37(23)：3599-3603.

[6] Tang W, Liu JW, Zhao WM, et al. Ganoderic acid T from Ganoderma lucidum mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells[J]. Life Sci, 2006, 80(3): 205-211.

[7] Liu RM, Zhong JJ. Ganoderic acid Mf and S induce mitochondria mediated apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells[J]. Phytomedicine, 2011, 18(5): 349-355.

[8] Johnson BM, Doonan BP, Radwan FF, et al. Ganoderic acid DM: an alternative agent for the treatment of advanced prostate cancer[J]. Open Prost Cancer J, 2010, 3(1): 78-85.

[9] 董虹玲，赵娜夏，商倩，等. 赤芝子实体中三萜酸类成分及其抗人乳腺癌 SKBR3 细胞增殖活性[J]. 现代药物与临床，2013，28(2)：132-137.

（收稿日期：2016-08-23　修回日期：2016-10-25）