

论著·临床研究

不同检测技术检测抗核抗体对自身免疫性疾病诊断价值研究

黄燕华, 王伟佳, 马京京

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403)

摘要:目的 对不同检测技术检测抗核抗体(ANA)在自身免疫性疾病(AID)中的诊断价值研究。方法 收集系统性红斑狼疮(SLE)患者 52 例,非 SLE AID 患者 97 例,非 AID 患者 92 例。分别采用酶联免疫吸附(ELISA)法、间接免疫荧光法(IIFA)和线性免疫印迹法(LIA)检测 ANA。结果 ELISA 法与 IIFA 法检测 ANA 在 3 组受试者中平均符合率为 78.8%。ELISA 法与 IIFA 法检测 ANA 的检测结果呈正相关($r=0.598, P<0.05$)。AID 组及非 AID 组均存在 ANA 检测 IIFA+LIA- 者,荧光滴度分布均以 1:100 为主。AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA- 者荧光模式均以核颗粒型为主,分别占 67.44%和 54.69%,2 组的阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),但与其他核型相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。IIFA-LIA+ 组中 AID 患者占 73.3%,比例高于非 AID 组,AID 组 IIFA-LIA+ 患者以 SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La 为主要阳性自身抗体,而非 AID 组 IIFA-LIA+ 患者以 anti-Sm、SSA/Ro52、SSB/La、CenpB 为主要阳性抗体。结论 临床上诊断 AID 时应注重多指标多方法联合检测。

关键词:抗核抗体; 自身免疫性疾病; 间接免疫荧光法; 酶联免疫吸附法; 线性免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.022

中图法分类号:R446.61

文章编号:1673-4130(2018)04-0461-04

文献标识码:A

Diagnostic value of different detecting technologies in antinuclear antibody in autoimmune disease

HUANG Yanhua, WANG Weijia, MA Jingjing

(Sun Yat-sen University Affiliated Sun Yat-sen Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the diagnostic value of different detecting technologies in antinuclear antibody(ANA) in autoimmune diseases(AID). **Methods** A total of 52 cases of patients with systemic lupus erythematosus(SLE), 97 cases of patients with AID but without SLE, 92 cases of patients without immune diseases were collected in this study. ANA was detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), indirect immunofluorescence(IIFA) method and linear western blot method(LIA). **Results** Average coincidence rate between ELISA and IIFA method to detect the ANA was 78.8% in the three groups of participants. The result of ANA detected by ELISA method was positively correlated with that of IIFA method($r=0.598, P<0.05$). They found that patients with AID and without AID groups both existed the phenomenon of IIFA ANA+LIA ANA-, their fluorescence titers were given priority to with 1:100. Their fluorescence modes were given priority to with granularity in both AID group(67.44%) and without AID group(54.69%), there was no difference between the two groups($P>0.05$), but they were significantly higher than that of other fluorescence modes. At the same time, the study found that patients with IIFA ANA-LIA ANA+ were mostly AID patients(73.3%), the ratio was higher than without AID group, among these patients, AID patients were with SSA/Ro60, SSA/Ro52, SSB/La as the main positive autoantibodies, rather than without AID patients with anti-Sm, SSA/Ro52, SSB/La, CenpB as the main positive antibodies. **Conclusion** It should pay attention to multi-index joint and multi-tests detection when we diagnose autoimmune diseases.

Key words: antinuclear antibody; autoimmune diseases; indirect immunofluorescence; enzyme-linked immunosorbent assay; linear western blot method

自身免疫性疾病(AID)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。抗核抗体(ANA)检测对 AID 的诊断、治疗监测和预后判断有重要意义。AID 的重要筛查指标 ANA,不但指

作者简介:黄燕华,女,主管技师,主要从事自身免疫性疾病实验室诊断方面研究。

本文引用格式:黄燕华,王伟佳,马京京.不同检测技术检测抗核抗体对自身免疫性疾病诊断价值研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(4):

针对细胞核的自身抗体,而且包括针对细胞质内各种成分的自身抗体^[1]。现已证明,以喉表皮样癌(HEP-2)细胞为底物的间接免疫荧光法(IIFA)是 ANA 检测的金标准^[2],但由于酶联免疫吸附(ELISA)法操作更为简单,且容易实现自动化,ELISA 法检测 ANA 在国内外实验室得到广泛应用^[3]。另外线性免疫印迹法(LIA)也被广泛用于检测特异性自身抗体。目前许多实验室先对 ANA 进行初筛,只有初筛结果阳性时再进行特异性抗核抗体谱(ANAs)检测^[4-5],或者有的实验室只进行特异性 ANAs 检测,而不检测 ANA。本实验室根据临床需求,针对 AID 的诊断、治疗监测和预后判断已开展 IIFA 法、ELISA 法检测 ANA, LIA 检测 12 种特异性自身抗体。但在实际工作中相同项目采用不同方法检测的结果常不完全符合。因此,本研究对 241 例临床就诊患者血清标本采用 IIFA 法、ELISA 法检测 ANA, LIA 检测 12 种特异性自身抗体,比较不同检测方法符合率,并进一步研究不符合的现象和解决方案,以为临床诊断、治疗监测和预后判断提供更有价值的参考信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2016 年 2 月 241 例就诊于中山大学附属中山医院申请自身免疫抗体检测的患者进行回顾性分析。其中系统性红斑狼疮(SLE)患者 52 例(SLE 组),男 2 例,女 50 例;年龄 12~77 岁;均符合 2009 年美国风湿病协会(ACR)修订的 SLE 诊断标准。非 SLE AID 患者 97 例(非 SLE AID 组),包括类风湿关节炎、混合性结缔组织病、重症肌无力、多肌炎、系统性硬化病、硬皮病、干燥综合征等患者,其中男 35 例,女 62 例;年龄 16~85 岁;均符合相关疾病的临床判断标准。非 AID 患者 92 例(非 AID 组),包括慢性肾炎、冠心病、糖尿病、高血压、脑梗死等患者,其中男 36 例,女 56 例;年龄 15~87 岁。

1.2 检测方法

1.2.1 IIFA 法检测 ANA 采用德国欧蒙公司提供的 ANA(马赛克)IIFA 试剂盒,以 Hep-2 抗原片 IIFA 检测患者血清 ANA。所有操作均按试剂说明书要求严格执行,并由两名长期从事该专业的技术人员判读结果。荧光模式(阳性反应)有:核均质型、核颗粒型、核仁型、着丝点型、核点型、胞浆颗粒型等。滴度的定义为与相同稀释倍数的阴性血清相比,刚好能观察到特异性荧光时标本的最高稀释倍数,包括 1 : 100, 1 : 320, 1 : 1 000, 1 : 3 200, 1 : 10 000。

1.2.2 ELISA 法检测 ANA 采用德国 ASKU 公司提供的 ELISA-ANA 试剂盒,所有操作均按试剂说明书要求严格执行,cutoff 值为 18 IU/mL。ANA≥18 IU/mL 判断为阳性。

1.2.3 LIA 检测 ANAs 采用深圳亚辉龙生物科技有限公司提供的免疫印迹诊断试剂盒,检测项目包括以下 12 种特异性自身抗体:dsDNAAb、nRNP/Sm、anti-Sm、AnuA、AHA、SSA、Ro52、SSB/La、Scl-70、Jo-1、CenpB、PO。所有操作均按仪器使用手册要求严格执行,系统自动判读出各条带的显色灰度值,从而判断阴、阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。类别资料采用四格表 χ^2 检验或校正 Fisher 确切概率法。定序变量资料进行 K 个独立标本的非参数秩和检验采用 Mann-Whitney U 统计资料。分类变量采用 Spearman 相关分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ELISA 与 IIFA 法检测 ANA 的符合率 2 种方法检测在 SLE 组符合率达到 84.62%,非 SLE AID 组符合率较低,但也达到 79.38%,在非 AID 组中的符合率为 75.00%。2 种方法在 3 组受试者中的平均符合率为 78.8%。见表 1。

表 1 ELISA 与 IIFA 法检测 ANA 的符合率

组别	n	ELISA+IIFA+(n)	ELISA-IIFA-(n)	ELISA-IIFA+(n)	ELISA+IIFA-(n)	符合率[% (n/n)]
SLE 组	52	41	3	5	3	84.62(44/52)
非 SLE AID 组	97	38	39	18	2	79.38(77/97)
非 AID 组	92	23	46	19	4	75.00(69/92)
合计	241	102	88	42	9	78.80(190/241)

2.2 ELISA 与 IIFA 相关性分析 对 ELISA 法和 IIFA 法检测 ANA 的结果进行 Spearman 相关分析,结果显示这 2 种方法的检测结果呈正相关($r=0.598, P<0.05$)。

2.3 AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA-者荧光滴度

分析 AID 组(包括研究对象中 SLE 组和非 SLE AID 组)及非 AID 组 IIFA+LIA-者荧光滴度分布均以 1 : 100 为主,其阳性率分别为 62.79% 和 78.13%,2 组的阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。但 AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA-者在

1 : 100、1 : 320 及 $\geq 1 : 1\,000$ 各不同滴度之间阳性率不同,以滴度 1 : 100 阳性率最高,两两之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA-者荧光滴度分析				
组别	n	IIFA+LIA-荧光滴度[n(%)]		
		1 : 100	1 : 320	$\geq 1 : 1\,000$
AID 组	43	27(62.79)	10(23.26)	6(13.95)
非 AID 组	64	50(78.13)	13(20.31)	1(1.56)

2.4 AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA-者荧光模式分析 AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA-者荧光模式均以核颗粒型为主,分别占 67.44% 和 54.69%,2 组的阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),但与其他核型相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

2.5 AID 组及非 AID 组 IIFA-LIA+者 12 种自身

抗体检测结果 AID 组 IIFA-LIA+组中 SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La 为主要阳性自身抗体,阳性率为 20.00%~33.33%,SSA/Ro52 与各指标(AnuA、AHA、anti-Sm、nRNP/Sm、CenpB、Scl-70、Jo-1)的差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。而非 AID 组 anti-Sm、SSA/Ro52、SSB/La、CenpB 阳性率均为 6.67%,各类型抗体间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 3 AID 组及非 AID 组 IIFA+LIA-者荧光模式分析 (n)						
组别	n	IIFA+LIA-			荧光核型	
		核颗粒型	核均质型	胞浆颗粒型	核仁型	着丝点型
AID 组	43	29	6	4	4	0
非 AID 组	64	35	6	18	4	1

表 4 AID 组及非 AID 组 IIFA-LIA+者 12 种自身抗体阳性检测例数(n)													
组别	n	dsDN AAb	AnuA	AHA	anti-Sm	nRNP/Sm	PO	SSA/Ro60	SSA/Ro52	SSB/La	CenpB	Scl-70	Jo-1
AID 组	11	1	0	0	0	0	1	3	4	2	0	0	0
非 AID 组	4	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
合计	15	1	0	0	1	0	1	3	5	3	1	0	0

3 讨 论

AID 诊治依赖于自身抗体检测。其中 ANA 对 AID 诊断有重要意义,常被作为首选筛查项目。ANA 检测的最新欧美建议指出 IIFA 法是 ANA 检测的推荐方法。目前,ELISA 法自身抗体的检测技术在实验室诊断中应用越来越多。此方法优点是易于自动化,容易操作,对操作者技术水平要求较低,利于检测标准化及质量控制^[6]。本研究结果显示 ELISA 与 IIFA 法在 4 组受试者中的检测结果平均符合率为 78.8%;SLE 组的符合率达到 84.62%,非 SLE AID 组和非 AID 组中符合率分别为 79.38%和 75.00%。与王广杰等^[7]研究基本一致,有较好的符合率。本研究同时对 ELISA 与 IIFA 法检测 ANA 的相关性进行分析,结果显示相关系数为 0.598,两种检测结果呈正相关。王广杰等^[7]研究结果表明 2 种方法的相关系数为 0.673。由于实验条件的不同,不同研究的结果稍有差异,但是结论是一致的。另有研究显示 5%~20%健康人 IIFA 法检测 ANA 可能阳性,难以区分病理性和生理性自身抗体^[8];并且 IIFA 法操作复杂,特别阅片需要有经验的专业培训人员,主观性强。但是 ELISA 法可以克服 IIFA 法以上缺点,客观性强,易于自动化。因此,ELISA 法可以作为检测 ANA 的筛查方法。但在临床上高度可疑,而 ELISA 方法阴性时,必须应用 IIFA 法再次检测确定。

IIFA 法或 ELISA 法被认为是筛查自身抗体的有

效方法,但 ANA 的筛查对 AID 诊断没有特异性,临床需要检测更多特异性自身抗体来辅助诊断 AID。目前实验室应用最广泛的 ANAs 检测方法为 LIA,该方法操作简便快速,易自动化,结果易于判读,一个膜条可检测多种特异性自身抗体,并且有较高的灵敏度和特异度^[9]。实际工作中发现 IIFA 法检测 ANA 与 LIA 法检测 ANAs 结果不完全符合。本研究对两种方法检测结果不一致的标本进行分析,并查找原因,结合临床具体情况进行分析。本研究显示 AID 组及非 AID 组均存在 ANA 检测 IIFA+LIA-者,荧光滴度分布均以 1 : 100 为主,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。AID 组及非 AID 组中 IIFA+LIA-者荧光模式均以核颗粒型为主,与其他核型差异有统计学意义($P < 0.05$)。AID 组及非 AID 组都普遍存在检测 ANA 时 IIFA+LIA-的情况。所以部分实验室只进行 ANAs 的检测而忽略 ANA 的检测,这将导致一些 AID 的漏检,因为 IIFA 法筛查的抗体针对细胞核中所有抗原成分,而目前检测的特异性自身抗体仅为自身抗体中的一小部分,仍有大量未知的特异性自身抗体未被认识或未应用于临床检测^[10]。当 IIFA 法筛查 ANA 荧光低滴度时,可能为生理性的自身抗体,并非 AID 特异性的抗体;也可能对 AID 有重要的预警价值及提示作用。IIFA 法检测 ANA 可呈现各种不同的荧光染色模型,通过对荧光模型的分析,可初步判断相应抗体的性质,对临床有重要提示。本研

究中 AID 组中 IIFA+LIA-者荧光模式以核颗粒型为主,当 IIFA 法检测 ANA 出现低滴度核颗粒型抗体阳性,但特异性抗体检测阴性时,仍要警惕 AID。本研究发现 IIFA-LIA+组中 AID 患者占 73.3%,比率高于非 AID 组,AID 组 IIFA-LIA+患者以 SSA/Ro60、SSA/Ro52、SSB/La 为主要阳性自身抗体,而非 AID 组 IIFA-LIA+患者以 anti-Sm、SSA/Ro52、SSB/La、CenpB 为主要阳性抗体。2013 年 ANA 检测的最新欧美建议指出当临床高度疑诊时,不论 ANA 结果如何,都需要对特异性抗 ENA 抗体进行检测^[11]。由于 IIFA 法采用的 HEP-2 细胞抗原底物存在分布不均、含量过低及不同固定方法对特定抗原的破坏等因素影响^[12],因此,部分特异性抗体也许会被漏检,如抗 SSA 抗体等。如 ANA 检测出现 IIFA 法阴性而 LIA 法有某些特异性抗体阳性时,需要临床高度重视,结合实际情况判断。

综上所述,IIFA 进行 ANA 筛查具有覆盖 ANA 抗体面广的特点,而 ANAs 检测具有疾病特异性,并且由于不同方法灵敏度和特异度有差别,如果单用任何一种方法检测都有可能造成 ANA 阳性结果的漏检、漏报或 AID 的漏诊。临床诊断 AID 时应注重多指标多方法联合检测。

参考文献

[1] NOSSENT H,REKVIG O P. Antinuclear antibody screening in this new millennium:farewell to the microscope[J]. Scand J Rheumatol,2001,30(3):123-128.

[2] MERONI P L,SCHUR P H. ANA screening:an old test with new recommendations[J]. Ann Rheum Dis,2010,69(8):1420-1422.

[3] BERNARDINI S,INFANTINO M,BELLINCAMPI L,et al. Screening of antinuclear antibodies: comparison between enzyme immunoassay based on nuclear homogenates,purified or recombinant antigens and immunofluo-

rescence assay[J]. Clin Chem Lab Med,2004,42(10):1155-1160.

[4] HOFFMAN I E,PEENE I,VEYS E M,et al. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening tests[J]. Clin Chem,2002,48(12):2171-2176.

[5] HAHM D,ANDERER U. Establishment of HEP-2 cell preparation for automated analysis of ANA fluorescence pattern[J]. Cytometry A,2006,69(3):178-181.

[6] 田卫花,马文媛,李莎莎. ELISA 与胶体金免疫层析法检测血清抗 CCP 抗体在 RA 诊断中的比较[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(11):1528-1529.

[7] 王广杰,陈洁,李士军. 比较酶联免疫吸附法与间接免疫荧光法检测抗核抗体的价值[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(19):2814-2816.

[8] KAVANAUGH A,TOMAR R,REVEILLE J,et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific auto antibodies to nuclear antigens[J]. Arch Pathol Lab Med,2000,124(4):71-81.

[9] 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.

[10] 董晓微,胡朝军,张道强,等. 抗核抗体与特异性自身抗体检测结果不一致的临床意义分析[J]. 检验医学杂志,2011,26(9):606-609.

[11] AGMON-LEVIN N,DAMOISEAUX J,KALLENBERG C,et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies[J]. Ann Rheum Dis,2014,73(1):17-23.

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

(收稿日期:2017-08-10 修回日期:2017-10-16)

(上接第 460 页)

验检验医学与临床,2017,14(15):2322-2324.

[10] 朱琳,郭广宏. 血清 CEA、CYFRA21-1、NSE、SCC 和 Pro-GRP 联合检测在肺癌诊断中的价值[J]. 标记免疫分析与临床,2016,23(11):1237-1241.

[11] 罗卫民,罗湘玉,郭家龙,等. miR-200b 靶向 VEGF 抑制肺癌细胞侵袭[J]. 中南医学科学杂志,2016,44(3):271-274.

[12] 赵佳,陈建业,汤建才. 非小细胞肺癌吉非替尼耐药机制及治疗研究进展[J]. 中国现代应用药学,2017,34(6):923-927.

[13] BAE J M,SHIN S Y,KIM E H. Mean sojourn time of

preclinical gastric cancer in Korean men:a retrospective observational study[J]. J Prev Med Public Health,2014,47(4):201-205.

[14] 赵春燕. 替吉奥联合多西他赛方案维持治疗非小细胞肺癌的临床疗效及安全性分析[J]. 实用癌症杂志,2017,32(10):1651-1653.

[15] 余安运,陶丹,刘夏炎,等. 肿瘤标志物在消化系统肿瘤早期诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志,2015,30(6):133-135.

(收稿日期:2017-07-22 修回日期:2017-09-26)