

间接免疫荧光试验检测抗核抗体的前带效应分析

胡琼文^{1,2}, 胡朝军¹, 李 萍¹, 邓垂文¹, 吴子燕¹, 曾小峰¹,张奉春¹, 廖 璞², 李永哲¹, 张蜀澜^{1△}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院风湿免疫科, 北京 100032; 2. 重庆市人民医院三院院区检验科/重庆市临床检验中心, 重庆 400014)

摘要:目的 探讨间接免疫荧光试验(IIFA)检测抗核抗体(ANA)中的前带效应对 ANA 荧光滴度的影响。方法 将 880 例血清样本以 1:100 稀释进行手工检测, 筛选 ANA 荧光滴度 $\geq 1:1\,000$ 的样本分别以 1:100、1:1 000、1:10 000 稀释检测, 统计有前带效应(1:1 000 稀释比 1:100 稀释荧光亮)的样本数; 将前带效应的样本采用欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪和 EUROPattern 全自动荧光分析仪检测 ANA(1:100 稀释), 与手工法检测 ANA(1:100 稀释)进行比较, 检测前带效应样本的特异性自身抗体, 分析其荧光模型、荧光滴度及阳性特异性自身抗体的分布特点。结果 有明显前带效应的样本数为 34 例, 占总样本数的 3.86%, 占高滴度($\geq 1:1\,000$)ANA 样本数的 29.57%。通过手工法检测或通过 Sprinter XL 全自动荧光加样仪检测均发现前带效应, 其荧光模型及荧光滴度相似, 值得注意的是, EUROPattern 只能选取图片中间区域判读。在有前带效应的血清样本中, 以荧光滴度 $\geq 1:10\,000$ 最常见(74.42%)。在荧光模型方面, 以斑点型最为多见(46.51%)。在特异性自身抗体的分布方面, 以抗核糖核蛋白(RNP)抗体最多见(62.79%), 其次为抗双链 DNA 抗体(51.16%)和抗 SSA 抗体(51.16%)。结论 IIFA 检测高滴度 ANA 样本在低稀释度时容易产生前带效应, 从而导致错误的 ANA 荧光滴度判断, 临床检验实验室应引起重视。

关键词:前带效应; 间接免疫荧光试验; 抗核抗体**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.02.022**中图法分类号:**R446.61**文章编号:**1673-4130(2019)02-0210-04**文献标识码:**A

Prozone effect on indirect immunofluorescence assay for anti-nuclear antibody testing

HU Qiongwen^{1,2}, HU Chaojun¹, LI Ping¹, DENG Chuiwen¹, WU Ziyang¹,ZENG Xiaofeng¹, ZHANG Fengchun¹, LIAO Pu², LI Yongzhe¹, ZHANG Shulan^{1△}(1. Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Peking Union Medical College Hospital/Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100032, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing General Hospital/
Clinical Laboratory Center of Chongqing, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore the influence of prozone effect on anti-nuclear antibodies (ANA) testing by indirect immunofluorescence assay (IIFA). **Methods** The samples with high titer of ANA ($\geq 1:1\,000$) were selected from 880 fresh serum samples, and were subsequently diluted in 1:100, 1:1 000 and 1:10 000 ratio. Prozone effect was defined as fluorescence intensity from 1:1 000 dilution was stronger than that from 1:100 dilution. The samples with prozone effect were determined manually or by Sprinter XL and EUROPattern. The samples with prozone effect were further characterized by combinations of fluorescence patterns, fluorescence intensities and autoantibody specificities. **Results** A total of 880 samples were tested. Importantly, 34 samples displayed prozone effect (3.86% in total and 29.57% in samples with ANA $\geq 1:1\,000$). Interestingly, prozone effect was identified by manual detection as well as by Sprinter XL with similar fluorescence patterns and fluorescence intensities. Notably, EUROPattern can only select the central area for identification. Among all samples with prozone effect, 74.42% samples exhibited fluorescence intensities of $\geq 1:10\,000$. Speckled pattern was the most prevalent fluorescence patterns in samples with prozone effect (46.51%). In addition, anti-RNP antibodies (62.79%) were the most popular autoantibodies in samples with prozone effect,

作者简介:胡琼文,女,主治医师,主要从事自身抗体检测技术研究。△ 通信作者, E-mail: shulanpumch@126.com。

本文引用格式:胡琼文,胡朝军,李萍,等.间接免疫荧光试验检测抗核抗体的前带效应分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(2):210-213.

followed by anti-dsDNA antibodies (51.16%) and anti-SSA antibodies (51.16%). **Conclusion** Prozone effect was present in ANA testing, especially in samples with high titers, resulting in underestimating the titers. The study highlighted that special attention should be paid to the prozone effect in clinical practice.

Key words: prozone effect; indirect immunofluorescence assay; anti-nuclear antibody

抗核抗体(ANA)是自身免疫性疾病(AID)非常重要的血清自身抗体,欧洲自身免疫标准化促进会(EASI)推荐 ANA 作为 AID 诊断的必要检测项目^[1]。ANA 检测已被纳入了一些 AID 如系统性红斑狼疮、未分化结缔组织病、原发性干燥综合征的诊断指南^[2-4]。目前,以 HEP-2 细胞为基质的间接免疫荧光试验(IIFA)仍然被美国风湿病学会(ACR)、EASI、中国免疫学会临床免疫分会等专业学会推荐为 ANA 检测的“参考方法”^[1,5-6]。ANA 检测结果推荐以滴度值表示,即阳性血清恰好呈阳性反应的最大稀释倍数的倒数^[6]。IIFA 检测 ANA 的荧光滴度越高,患者与 AID 的相关性越大,而低滴度的 ANA 可见于其他非 AID 患者甚至健康人群^[1,6]。因此,IIFA 检测 ANA 荧光滴度的准确性对于 AID 患者的诊断尤为重要。然而,目前国内外尚无研究报道 IIFA 检测 ANA 中的前带效应对 ANA 荧光滴度的影响。本研究通过对 43 例高浓度 ANA 血清样本倍比稀释实验,探讨 IIFA 检测 ANA 中的前带效应对 ANA 荧光滴度的影响,从而尽可能避免前带效应对高滴度标本的影响。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集北京协和医院风湿免疫实验室 2018 年 2 月 26 日至 2018 年 2 月 28 日常规检测 ANA 的 880 例新鲜血清样本。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪、EUROPattern 全自动荧光分析仪、EUROStar III Plus 欧蒙之星荧光显微镜及成像系统、欧蒙 EURO-LineMaster Plus 全自动免疫印迹仪、TECAN-sunrise 酶标仪、Thermo 洗板机、10~100 μ L 加样枪。

1.2.2 试剂 德国欧蒙医学诊断(中国)有限公司提供的成套商品试剂盒:ANA IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)、ANA 谱(IgG)检测试剂盒(欧蒙印迹法)、抗 dsDNA(dsDNA)抗体 IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)、抗 dsDNA 抗体(IgG)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 ANA 检测 将 880 例血清样本以 1:100 稀释进行手工检测,操作步骤按 ANA IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)说明书进行。在荧光显微镜下观察荧光模型及荧光滴度,根据试剂盒说明书的滴度判断标准及阳性判断标准(荧光滴度 $\geq 1:100$ 判为阳

性)进行结果判断,并统计 ANA 阳性样本数量和高 ANA 滴度($\geq 1:1\ 000$)样本数量。

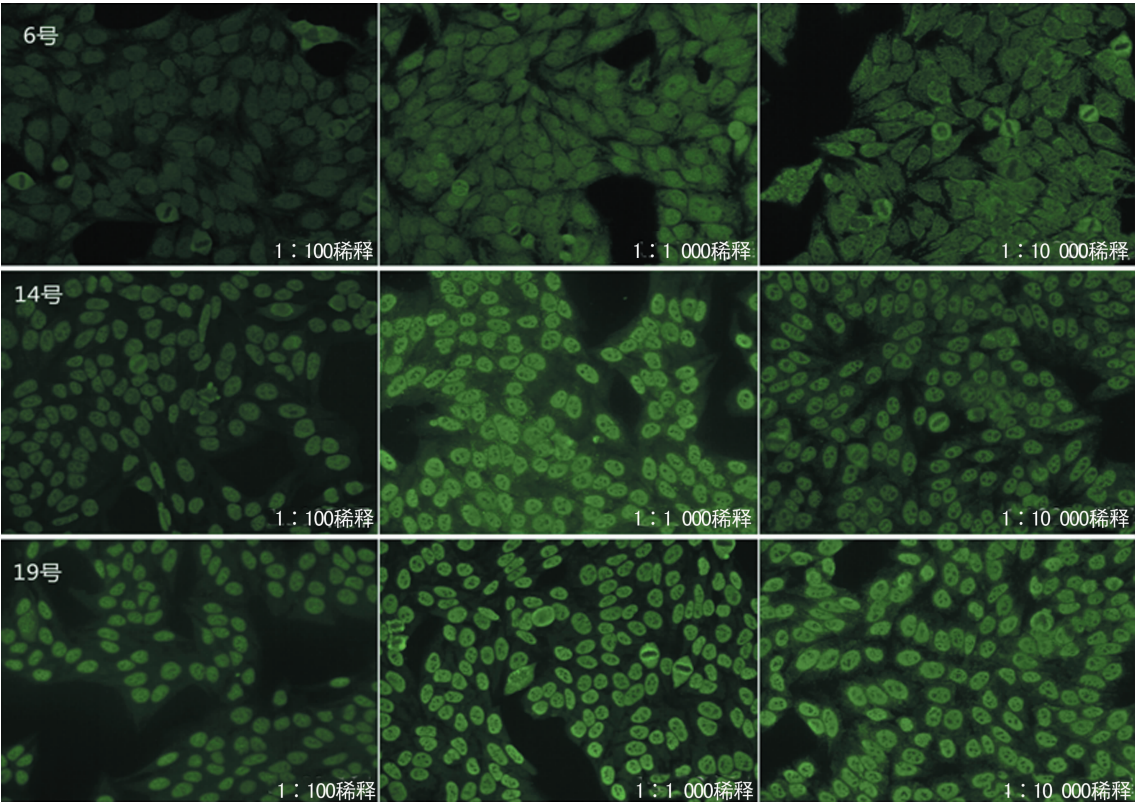
1.3.2 有前带效应的样本筛选 将上述检测的高 ANA 滴度($\geq 1:1\ 000$)样本分别以 1:100、1:1\ 000、1:10\ 000 稀释进行手工检测,步骤按 ANA IgG 检测试剂盒(间接免疫荧光法)说明书进行。在荧光显微镜下观察荧光模型及荧光滴度,根据《临床免疫学与检验》等全国高等学校教材中前带效应的定义,本研究将 1:1\ 000 稀释后荧光亮度反而比 1:100 稀释后荧光亮度更强的样本定义为有前带效应的样本,并选取荧光片的中央区域($\times 400$)拍照保存。将有前带效应的样本采用欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪和 EUROPattern 全自动荧光分析仪检测 ANA(1:100 稀释),与手工法检测 ANA(1:100 稀释)进行比较,并选取荧光片的中央区域和边角区域($\times 200$)拍照保存。

1.3.3 特异性自身抗体检测 选取上述有前带效应的血清样本 43 例,采用 ANA 谱(IgG)检测试剂盒(欧蒙印迹法)检测其的特异性自身抗体,抗 dsDNA-IgG 抗体采用 IIFA 与 ELISA 同时检测。

2 结果

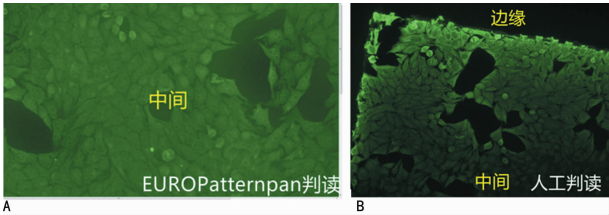
2.1 前带效应样本分析 检测 ANA 的 880 例血清样本中,ANA 阳性(滴度 $\geq 1:100$)样本数为 492 例(55.91%),高 ANA 滴度($\geq 1:1\ 000$)样本数为 115 例(13.07%)。将高 ANA 滴度($\geq 1:1\ 000$)的样本分别以 1:100、1:1\ 000、1:10\ 000 稀释进行手工检测,在荧光显微镜下观察其是否存在前带效应。研究发现前带效应的样本(1:1\ 000 稀释比 1:100 稀释荧光亮度更强)数为 34 例,占总样本数的 3.86%,占高滴度 ANA 样本($\geq 1:1\ 000$)数的 29.57%。前带效应的镜下结果见图 1,可以发现其荧光亮度随着血清样本稀释度的增加而增强。

2.2 手工与 Sprinter XL 检测对比 将有前带效应的样本采用欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪和 EUROPattern 全自动荧光分析仪检测 ANA(1:100 稀释),与手工法检测 ANA(1:100 稀释)进行比较,手工检测和欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪检测其荧光模型及荧光滴度相似,在 1:100 稀释度时均存在边缘区域荧光亮中间区域荧光暗的情形,值得注意的是,EUROPattern 全自动荧光分析仪判读只能选取图片中间区域拍照判读。见图 2。



注:6 号、14 号、19 号样本分别以 1 : 100、1 : 1 000、1 : 10 000 稀释

图 1 ANA 荧光滴度对比图(×400)



注:A 为 EUROPattern 全自动荧光分析仪检测;B 为手工检测

图 2 手工检测与欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪和 EUROPattern 全自动荧光分析仪检测 ANA 的荧光对比图(×200)

2.3 特异性自身抗体分析 选取 43 例有前带效应的血清样本检测其特异性自身抗体,分析其荧光模型、荧光滴度及阳性特异性自身抗体的分布特点。所有 43 例前带效应的血清样本荧光滴度均 $\geq 1:3\,200$,其中,以荧光滴度 $\geq 1:10\,000$ 最常见(74.42%)。而

在荧光模型方面,以核斑点型最为多见(46.51%)。在特异性自身抗体的分布方面,以抗核糖核蛋白(RNP)抗体最多见(62.79%),其次为抗 dsDNA-IgG 抗体(51.16%)和抗 SSA 抗体(51.16%)。见表 1、2。

表 1 有前带效应的 43 例血清样本荧光模型与荧光滴度分布

荧光模型	n	占比(%)
核均质型	5	11.63
核斑点型	20	46.51
核仁型	1	2.33
核均质与斑点混合型	9	20.93
核均质与细胞质颗粒混合型	2	4.65
核斑点与细胞质颗粒混合型	5	11.63
核均质、斑点与细胞质颗粒混合型	1	2.33
荧光滴度		
1 : 3 200	11	25.58
1 : 10 000	29	67.44
1 : 32 000	3	6.98

表 2 有前带效应的 43 例血清样本阳性特异性抗体分布

抗体	dsDNA (IIF)	dsDNA (ELISA)	Sm	RNP	SSA	SSB	rRNP	AHA	Ro52	ANuA	AMA (M2)	Jo-1
n	15	22	8	27	22	7	13	13	20	13	2	1
占比(%)	34.88	51.16	18.6	62.79	51.16	16.28	30.23	30.23	46.51	30.23	4.65	2.33

注:dsDNA 为抗 dsDNA 抗体;Sm 为抗 Sm 抗体;RNP 为抗 RNP 抗体;SSA 为抗 SSA 抗体;SSB 为抗 SSB 抗体;rRNP 为抗核糖体抗体;AHA 为抗组蛋白抗体;Ro52 为抗 Ro52 抗体;ANuA 为抗核小体抗体;AMA(M2)为抗线粒体 M2 型抗体;Jo-1 为抗组氨酰-tRNA 合成酶抗体

3 讨 论

20 世纪初免疫学家发现在抗原抗体反应中,抗体数量的增加反而会减少抗原抗体复合物沉淀数量。

之后,人们观察到有一个超出最佳抗原抗体反应浓度的抗体浓度范围是无效的,并将其称为“前带”,这个相关的现象被称为前带效应或钩状效应^[7-8]。前带效

应是生物化学复合物形成中存在的普遍现象,它通常发生在双位点免疫测定中,即当一种蛋白质在免疫复合物中起“桥接”作用时^[8-9]。目前,免疫比浊法、化学发光法、液相芯片法、凝集法等各类免疫测定方法均有前带效应的报道^[10-13]。然而,IIFA 中的前带效应国内外尚鲜有研究报道。

本研究将 1:1 000 稀释比 1:100 稀释荧光亮的样本判为有明显前带效应,发现有明显前带效应的样本数占高滴度 ANA 样本($\geq 1:1 000$)的 29.57%,说明前带效应在高滴度 ANA 样本中发生率不低,应得到检验工作人员的重视。本研究观察到有明显前带效应的血清样本采用手工法检测与全自动荧光加样仪检测,其荧光模型及荧光滴度均无差别,且它们均存在边缘区域荧光亮中间区域荧光暗的情形,这种“边缘现象”在抗体浓度高的 1:100 稀释时最明显,随着血清样本稀释比例增加而逐渐减弱。“边缘现象”产生的原因不清楚,但应该不是因为血清或酶标二抗孵育过程中压片或接触不良所致,因为采用欧蒙 Sprinter XL 全自动荧光加样仪检测是将生物薄片朝上平放,血清或酶标二抗直接滴于生物薄片表面,液滴上无任何覆盖,不存在挤压问题。分析 43 例前带效应的血清样本荧光模型、荧光滴度及阳性特异性自身抗体的分布特点发现,有前带效应的血清样本荧光滴度均 $\geq 1:3 200$,其中,荧光滴度 $\geq 1:10 000$ 的占 74.42%,说明 ANA 荧光滴度越高越容易发生前带效应。荧光模型以核斑点型最多见(46.51%),阳性特异性自身抗体以抗 RNP 抗体最多见(62.79%),可能因为核斑点型与抗 RNP 抗体容易出现高滴度阳性,未发现前带效应与荧光模型及阳性特异性自身抗体种类具有相关性。

由于经济水平限制,国内大多数实验室 ANA-IIFA 检测时仅做起始稀释度,根据荧光强度粗略判断滴度,而不进一步稀释。由于前带现象存在,可能导致强阳性的结果误报为中等阳性结果,甚至弱阳性结果,最终影响患者的及时准确的诊断和治疗。在人工判读时,观察视野比较完整,有经验的工作人员可根据荧光基质片中部和边缘染色不均一,判断可能存在前带现象,通过进一步稀释来确认,从而避免前带现象对滴度判读的干扰。虽然 MELEGARI 等^[14]的研究表明,人眼判读 ANA-IIFA 与 AKLIDES 自动判读系统判读相比具有高达 98.9%的一致性,但是,对于具有前带效应的样本,由于仪器选取视野的局限性,采集的图像可能位于荧光基质片中部,当工作人员通过仪器采集图片确认结果时,误判滴度的可能性就大大增加。因此,了解前带现象对于 ANA-IIFA 检测的影响具有重要价值。

4 结 论

IIFA 检测高滴度 ANA 样本在低稀释度时容易产生前带效应,从而导致错误的 ANA 荧光滴度判断,临床检验实验室应引起重视。

参考文献

- [1] 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.
- [2] GORDON C, AMISSAH-ARTHUR M B, GAYED M, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2018, 57(1):1-45.
- [3] MOSCA M, TANI C, VAGNANI S, et al. The diagnosis and classification of undifferentiated connective tissue diseases[J]. *J Autoimmun*, 2014(48/49):50-52.
- [4] SHIBOSKI S C, SHIBOSKI C H, CRISWELL L, et al. American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren's syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the SICCA cohort[J]. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64(4):475-487.
- [5] MERONI P L, SCHUR P H. ANA screening: an old test with new recommendations[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(8):1420-1422.
- [6] 中国免疫学会临床免疫分会. 自身抗体检测在自身免疫病中的临床应用专家建议[J]. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(7):437-443.
- [7] HOOFNAGLE A N, WENER M H. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry[J]. *J Immunol Methods*, 2009, 347(1/2):3-11.
- [8] ROY R D, ROSENMUND C, STEFAN M I. Cooperative binding mitigates the high-dose hook effect[J]. *BMC Syst Biol*, 2017, 11(1):74.
- [9] WARD G, SIMPSON A, BOSCATO L, et al. The investigation of interferences in immunoassay[J]. *Clin Biochem*, 2017, 50(18):1306-1311.
- [10] KHOSROSHAHI A, CHERYK L A, CARRUTHERS M N, et al. Brief Report: spuriously low serum IgG4 concentrations caused by the prozone phenomenon in patients with IgG4-related disease[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1):213-217.
- [11] WU S J, HAYDEN J A. Upfront dilution of ferritin samples to reduce hook effect, improve turn around time and reduce costs[J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2018, 28(1):010903.
- [12] CAREY B S, BOSWIJK K, MABROK M, et al. A reliable method for avoiding false negative results with Luminex single antigen beads; evidence of the prozone effect[J]. *Transpl Immunol*, 2016, 37:23-27.
- [13] 魏虹娟, 唐冬松, 李宇, 等. 梅毒螺旋体 RPR 试验前带现象检测分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(16):2320-2321.
- [14] MELEGARI A, BONAGURI C, RUSSO A, et al. A comparative study on the reliability of an automated system for the evaluation of cell-based indirect immunofluorescence[J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 11(10):713-716.