

轻链 κ 和 λ 蛋白相对分子质量分别为 $220\ 00 \times 10^3$ 和 $44\ 000 \times 10^3$, 血清中的轻链蛋白可以直接通过肾小球滤过漏入尿液中, 所以对轻链型 M 蛋白尿液免疫固定电泳检出率更高。该患者血清免疫固定电泳能检出游离轻链型 M 蛋白, 理论分析应该会有一定量的游离轻链溢出至尿液中, 而该患者的尿液免疫固定电泳图谱未见 M 蛋白浓集条带。本文分析尿液免疫固定电泳阴性有两种可能的解释: 一方面, 肾小管对轻链蛋白有一定的代谢能力, 溢出的轻链蛋白被肾小管代谢后浓度降低, 低于电泳的最低检测限; 另一方面, 溢出的轻链蛋白分子在尿液中形成聚合体, 不同相对分子质量的聚合体在凝胶区带电泳作用下成弥散条带, 且轻链蛋白形成各种聚合体后, 也弱化了单体的浓度, 从而可能低于电泳的最低检测限。所以该患者的尿液免疫固定电泳图谱未见特异性浓集条带。

β 疏基乙醇是电泳中常用的蛋白解聚液, 用来解离蛋白分子形成的聚合体。 β 疏基乙醇处理后的免疫固定电泳图谱 λ 泳道出现了弱浓集条带, 尿液原本存在的 M 蛋白显现出来, 这一结果符合尿液中的轻链蛋白发生聚合的推论。 β 疏基乙醇处理前、后尿液游离轻链定量结果相差近 1 倍, 本文分析可能是由于聚合体与单体形式的轻链分子存在空间构象不同, 导致与检测抗体试剂结合时存在差异, 以致定量结果存在偏差。 $f\lambda$ 泳道未出现 λ 泳道同位置的浓集条带, 是否是抗体的结合能力强弱差异导致未能检测到轻链蛋白, 有待进一步讨论和证实。

本文病例提示, 免疫固定电泳技术存在多变性, 需要扎实的操作技术和丰富的阅片经验才能综合分析得出可靠结论^[7]。免疫固定电泳技术在 M 蛋白检测中应用广泛, 但具有一定的检测局限性, 对于低浓度 M 蛋白和非分泌型多发性骨髓瘤患者存在漏检^[6]。

FLC 定量检测因其特异性和灵敏度高而备受关注, 是多发性骨髓瘤诊疗指南中 1 项重要的评判指标^[8]。FLC 定量及其比值对多发性骨髓瘤有很大的

• 个案分析 •

抗髓过氧化物酶抗体及抗蛋白酶 3 抗体双阳性的 ANCA 相关性血管炎 1 例

臧福宇, 朱文波, 陶月, 宁明哲[△]

南京大学医学院附属鼓楼医院检验科, 江苏南京 210008

关键词: 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎; 抗髓过氧化物酶抗体; 抗蛋白酶 3 抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.16.031

文章编号: 1673-4130(2021)16-2045-04

抗髓过氧化物酶(MPO)抗体和抗蛋白酶 3(PR3)

诊断及进展评估价值, 对于轻链型 M 蛋白和非分泌型多发性骨髓瘤患者, FLC 的差值也是较好的疗效评估指标。免疫固定电泳技术和游离轻链定量联合检测能大大提高临床对 M 蛋白相关疾病的诊治水平^[9]。

参考文献

- 潘建华, 张玲, 李艳红, 等. 3 种方法筛查 M 蛋白的结果分析[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(17): 2479-2481.
- 蒋最明, 顾敏, 苏薇. 毛细管区带电泳对 M 蛋白的免疫分型[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(2): 72-73.
- 中国医师协会血液科医师分会, 中华医学会血液学分会, 中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020 年修订)[J]. 中华内科杂志, 2020, 59(5): 341-346.
- 白志瑶, 戴宏斌, 尹春琼, 等. 双克隆型多发性骨髓瘤 4 例临床及实验室综合分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(2): 234-237.
- KAPLAN B, MARTIN B M, BOYKOV O, et al. Co-deposition of amyloidogenic immunoglobulin light and heavy chains in localized pulmonary amyloidosis[J]. Virchows Arch, 2005, 447(4): 756-761.
- 赵冬慧, 李丹阳, 张帆, 等. 4 例重链或轻重链肾淀粉样变性患者的临床病理特点[J]. 北京大学学报(医学版), 2020, 52(6): 1162-1165.
- 苏薇, 高学慧, 韩建华, 等. 四种分析技术检测血清单克隆免疫球蛋白的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(3): 261-264.
- 蒋翔宁, 陈俊峰, 汪勇. 血清游离轻链 κ/λ 比值联合免疫固定电泳在多发性骨髓瘤患者预后评估中的价值[J]. 中国实验血液学杂志, 2020, 28(1): 191-195.
- 马成成, 王鑫, 高英, 等. 免疫球蛋白重链检测在浆细胞疾病中的应用进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(24): 3064-3069.

(收稿日期: 2020-10-26 修回日期: 2021-03-17)

中图法分类号: R446.1

文献标志码: C

抗体双阳性的病例在临床和实验室工作中罕见。本

[△] 通信作者, E-mail: 54669182@qq.com。

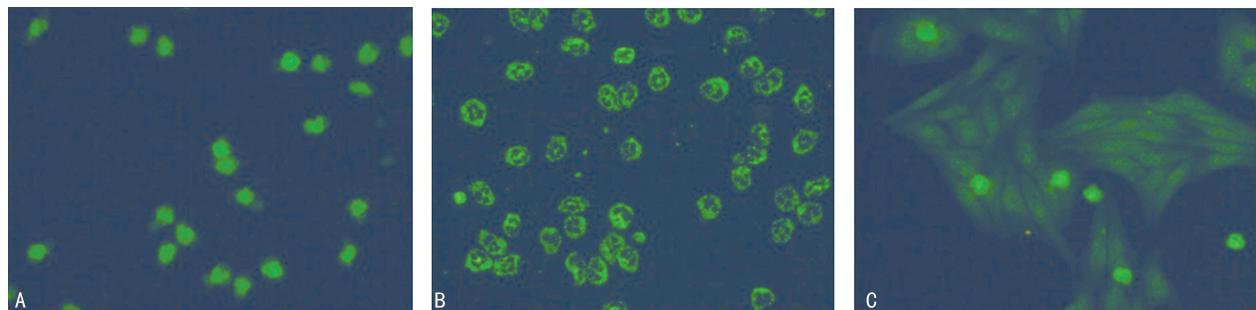
本文引用格式: 臧福宇, 朱文波, 陶月, 等. 抗髓过氧化物酶抗体及抗蛋白酶 3 抗体双阳性的 ANCA 相关性血管炎 1 例[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(16): 2045-2048.

文报道本院收治的1例以不明原因发热和呼吸系统、肾脏受累为主要特点,抗MPO抗体、抗PR3抗体双阳性男性患者的诊疗经过及门诊随访,回顾性分析抗MPO抗体、抗PR3抗体双阳性相关文献报道及临床特点,学习该病例的抗中性粒细胞浆抗体(ANCA)荧光模型,旨在提高临床医生和实验室对此类双阳性病例的认知,提高实验室对疑难罕见ANCA荧光模型报道的准确性,现报道如下。

1 临床资料

患者,男,54岁,因“反复发热20余天,伴咳嗽、咳痰”,于2019年7月4日入院。患者于2019年6月中旬受凉后发热,每日热峰38.5℃左右,咳嗽、咳白色黏痰。6月20日于当地社区医院抽血检查及摄片后考虑肺部感染,予抗感染治疗9d(详细诊疗资料丢失)。6月29日患者症状无缓解,至上级医院诊治,实验室检查显示:白细胞计数 $16.68 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分率74%;C反应蛋白142.65 mg/L,降钙素原0.07 ng/L;IgE 173 IU/mL;肝功能:前清蛋白106 mg/L。上级医院建议患者回家继续观察,未予其他治疗。患者回家后仍每日低热、咳嗽、咳痰,为进一步治疗来本院中医科就诊。入院后肺部查体发现呼吸音粗,右下肺湿啰音,考虑为肺部感染,暂予抗感染和化痰止咳治疗。完善实验室检查:咽拭子培养和痰培养均为正常菌群生长,痰抗酸杆菌涂片阴性,结核感

染T细胞检测阴性,肺炎支原体抗体定量阴性,肺癌4项正常,尿蛋白阳性,尿潜血阳性,尿素氮7.65 mmol/L↑,降钙素原2.45 ng/mL↑,白细胞计数 $11.5 \times 10^9/L$ ↑,中性粒细胞百分率94.2%↑,红细胞计数 $3.06 \times 10^{12}/L$ ↓,血红蛋白92 g/L↓,红细胞沉降率62 mm/h↑;完善胸部CT:两肺多发实性小结节,右肺下叶少量渗出,两肺尖局限性肺气肿。中医科以抗感染继续治疗,因存在贫血和肾功能损伤不排除合并其他疾病可能。经治疗后患者咳嗽、咳痰、发热等症状一度好转,但7月12日体温再次上升,热峰38.5℃左右。此时患者已无咳嗽、咳痰,肺部听诊无干、湿啰音,结合实验室检查和影像学检查初步排除仍有感染存在可能。7月12日临床实验室报告ANCA检测结果:抗MPO抗体定量83.664 RU/mL、抗PR3抗体定量 >200 RU/mL[酶联免疫吸附试验(ELISA),参考区间0~20 RU/mL,检测上限200 RU/mL],pANCA阳性,cANCA阳性(图1)。因双阳性结果罕见,本实验室对此ANCA双阳性结果进行复查并使用蛋白质免疫印迹法(IBT)(图2)验证,复查结果与首次检测结果一致,IBT亦验证该患者确属罕见的抗MPO抗体、抗PR3抗体双阳性。中医科遂请风湿免疫科会诊,风湿免疫科考虑发热系因ANCA相关性血管炎(AAV),建议予醋酸泼尼松免疫抑制治疗。



注: A为乙醇固定粒细胞;粒细胞胞浆呈颗粒状荧光,粒细胞细胞核周围呈增强的带状荧光;B为甲醛固定粒细胞;粒细胞胞浆呈粗颗粒状荧光;C为乙醇固定粒细胞和人喉癌上皮细胞(Hep-2);HEp-2仅有微弱荧光,粒细胞的荧光强度明显强于相邻的HEp-2。

图1 ANCA荧光模型(荧光显微镜×400)



图2 抗MPO抗体、抗PR3抗体、抗肾小球基底膜(GBM)抗体检测(IBT)

为明确诊断,7月17日行左唇腺光学显微镜活检,镜下所见:涎腺组织、腺泡间及导管周围见散在淋巴细胞、浆细胞浸润;病理诊断:符合慢性炎症细胞浸润Ⅱ级(图3)。8月7日于本院风湿免疫科住院,诊断为AAV,以注射用泼尼龙琥珀酸钠40 mg抗炎6 d后,减为醋酸泼尼松15 mg口服,每日2次,并用环孢素50 mg口服,每日2次。4 d后患者病情好转出院,予醋酸泼尼松10 mg口服,每日2次,2个月后减量至

15 mg口服,每日1次;环孢素50 mg口服,每日2次。患者2019年10月复诊时自述未再有发热,复查抗MPO抗体、抗PR3抗体均下降到参考区间内。患者此后自行停用2个月环孢素,再现发热,热峰38℃,复查抗MPO抗体、抗PR3抗体有回升但还在参考区间内。12月12日收治入院,恢复环孢素用药,75 mg口服,每日2次,次日后再无发热,12月23日患者出院,并维持以上用药,嘱咐勿随意停药。此后2次

复诊未再发热,ANCA 亦持续下降,保持在参考区间内(图 4)。

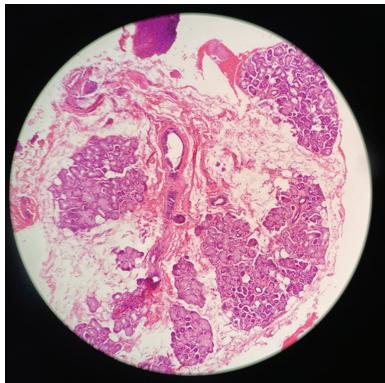


图 3 左唇腺光学显微镜活检($\times 400$)

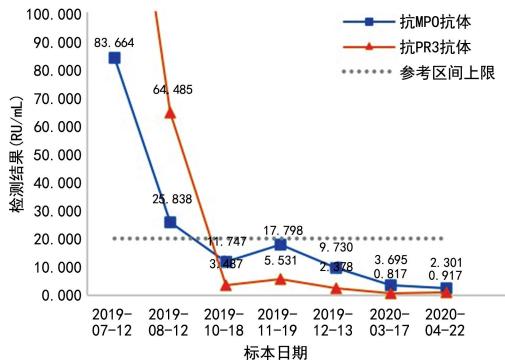


图 4 抗 MPO 抗体和抗 PR3 抗体检测结果变化趋势 (ELISA)

2 讨 论

ANCA 是一组以中性粒细胞胞浆及单核细胞胞浆成分为靶抗原的自身抗体,主要存在于 AAV 患者中^[1]。临床实验室常选用 ANCA 的荧光模型及其靶抗原检测结果对 ANCA 进行分类。通过间接免疫荧光法可以区分 ANCA 的荧光模型(如 pANCA、cANCA 等),通过 ELISA、化学发光法(CLIA)、IBT 可以区分 ANCA 的靶抗原(如抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体等)。AAV 主要有肉芽肿性血管炎(GPA)、显微镜下多动脉炎(MPA)及嗜酸细胞性肉芽肿性多血管炎(EGPA)等。在多数 GPA 患者中出现的 cANCA 靶抗原主要是 PR3,而在 MPA 和 EGPA 患者中出现的 pANCA 靶抗原主要是 MPO^[2-3]。ANCA 作为临床诊断 AAV 的常规项目,对于相关疾病的诊断、鉴别诊断有重要作用。

该患者入院前有 20 余天的发热症状,多次就诊均以抗感染治疗且治疗效果差。对于长期不明原因发热患者,首先需要鉴别感染性发热和非感染性发热,该患者入院后完善了相关检查,排除仍有感染性疾病存在,但患者再度发热,提示此时患者的发热并非感染性疾病主导。对此中医科医生完善了肿瘤标志物、抗核抗体谱、ANCA、唇腺活检等相关检查,以进一步鉴别发热原因,并在确认该病例抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体双阳性后怀疑为风湿免疫疾病导致的发

热,请风湿免疫科会诊,最终明确诊断。

该患者查体时有呼吸道异常表现,胸部 CT 亦提示该患者存在肺部受累;实验室生化检查结果中尿素氮水平升高,且尿蛋白阳性、尿潜血阳性,提示肾功能受损。肾脏和呼吸系统是 AAV 常受累的器官,2019 年 KIM 等^[4]研究显示,MPO⁺、PR3⁺ 的 AAV 患者相对 MPO⁻、PR3⁺ 的 AAV 患者更可能有肾小球功能受损表现,相对于 MPO⁺、PR3⁻ 的 AAV 患者更可能有呼吸道受累表现。2012 年林育红等^[5]对 12 例以不明原因发热为主要表现的 AAV 患者进行观察发现,这些病例都具有以下一种或几种表现:呼吸系统症状(8/12),血尿、蛋白尿表现的肾脏受累(10/12),贫血(12/12),血浆清蛋白低(11/12)。而本文病例具有以上全部表现,可能与其 ANCA 双阳性的特性相关。以上研究结果与本病例的临床表现及 ANCA 双阳性等实验室检查结果均相符。患者使用抗感染治疗后,发热未得到有效控制,改为免疫抑制剂和非甾体抗炎药物治疗后病情缓解,患者出院后坚持小剂量免疫抑制剂维持治疗,未出现病情反复,亦印证了 AAV 的诊断。本文病例提示临床医生,长期不明原因发热,若抗感染治疗效果差,无明确感染证据,尤其还伴有多系统病变时,除感染因素外,还要考虑风湿免疫病等其他可能,并完善实验室检查,以避免漏诊、误诊,提高预后^[6]。

抗 MPO 抗体、抗 PR3 抗体双阳性病例较为罕见,2004 年 FERRAZ-AMARO 等^[7]、2008 年 TILIAKOS 等^[8]、2013 年 MURAKAMI 等^[9]、2005 年 UEDA 等^[10]分别对此类病例进行了个案报道与分析,目前对这一双重阳性结果的诊断价值尚无明确结论^[11]。本实验室对 MPO⁺、PR3⁺ 的 AAV 病例的报道,有助于对临床医生的诊断及鉴别诊断提供相关参考,并且可丰富文献中对于此类病例的报道,有助于对此类病例的临床特征做进一步研究。

近年来,临床对 ANCA 和 AAV 的认识普遍提高,国际公认 ANCA 是 AAV 灵敏度、特异度均较高的血清学指标,并将其作为诊断和分类 AAV 的重要参考^[12],因此,需要临床实验室提高 ANCA 检测报告的准确性,为临床诊治提供可靠依据。临床实验室可参考中国合格评定国家认可委员会的相关文件^[13],用于规范对 ANCA 的检测与报告:定期对实验室人员进行培训和考核,加强疑难荧光模型判读的培训;在日常工作中落实对仪器试剂、室内质控、环境监测等要素的管理;对不同方法(ELISA、CLIA、IBT 等)进行评估与对比,选择适合所在实验室且性能较好的方法;实验室人员在遇到少见核型时,应结合 ANCA 相关特异性抗体检测结果,及时与临床医生沟通,帮助临床准确诊疾病。

参考文献

- [1] SCHULTE-PELKUM J, RADICE A, NORMAN G L, et

- al. Novel clinical and diagnostic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies[J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 185416.
- [2] CORNEC D, GALL E C L, FERVENZA F C, et al. ANCA-associated vasculitis-clinical utility of using anca specificity to classify patients: 10[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(10): 570-579.
- [3] SAVIGE J, POLLOCK W, TREVISIN M. What do Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) tell Us? [J]. *Best Practice Res Clin Rheumatol*, 2005, 19(2): 263-276.
- [4] KIM S M, CHOI S Y, KIM S Y, et al. Clinical characteristics of patients with vasculitis positive for anti-neutrophil cytoplasmic antibody targeting both proteinase 3 and myeloperoxidase: a retrospective study[J]. *Rheumatol Internat*, 2019, 39(11): 1919-1926.
- [5] 林育红, 车向前, 张丽丽. 以不明原因发热为主要表现的ANCA相关性小血管炎12例临床分析[J]. 疑难病杂志, 2012, 11(6): 32-34.
- [6] 王威, 郑红霜, 徐迪世, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体相关性小血管炎二例[J]. 临床误诊误治, 2009, 22(10): 20-21.
- [7] FERRAZ-AMARO I, HERRERO M, JURADO A, et al. Dual positivity for cytoplasmic and perinuclear antineutrophil antibodies in a patient with henoch-schonlein purpura[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2004, 22(2): 233-234.
- [8] TILIAKOS A M, TILIAKOS N A. Dual ANCA positivity in subacute bacterial endo-carditis[J]. *J Clin Rheumatol*, 2008, 14(1): 38-40.
- [9] MURAKAMI M, SHIMANE K, TAKAHASHI H, et al. ANCA-associated vasculitis with dual ANCA positivity in coexistence with mixed connective tissue disease [J]. *Modern Rheumatol*, 2013, 23(1): 156-161.
- [10] UEDA H, ISHIMURA E, YUNOKI T, et al. Cimetidine-induced tubulo-interstitial nephritis with both MPO-ANCA and PR3-ANCA[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2005, 9(4): 332-334.
- [11] CHOU J, RANDALL K, GATENBY P. Clinical outcomes of patients with dual positivity for proteinase 3 and myeloperoxidase specific antineutrophil cytoplasmic antibodies[J]. *J Clin Cell Immunol*, 2015, 6(3): 335-339.
- [12] JENNETTE J C, FALK R J, BACON P A, et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides[J]. *Arthritis Rheum*, 2013, 66(1): 1-11.
- [13] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明: CNAS-CL02-A003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.

(收稿日期: 2020-10-30 修回日期: 2021-04-12)

(上接第2032页)

- [2] 宋明香, 蒋敏海. 急性脑梗死病情及预后与血清淀粉样蛋白A、触珠蛋白水平的关系[J]. 心脑血管病防治, 2019, 19(3): 231-234.
- [3] 王玉杰, 李元建, 江俊麟. Klotho 在缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(7): 746-750.
- [4] 颜雪琴, 陈勇. 急性脑梗死并发上消化道出血相关因素的临床分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2017, 24(7): 770-773.
- [5] 饶明俐. 中国脑血管病防治指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 218.
- [6] 万敏, 高亚丽, 陈炜, 等. LDC、Fg、hs-CRP 对 TIA 后早期脑梗死风险的预测价值研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(5): 637-640.
- [7] 任小山. Klotho 蛋白在肾缺血再灌注损伤中的作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2019, 28(6): 561-564.
- [8] 钟迪, 张舒婷, 吴波. 《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018》解读[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19(11): 897-901.
- [9] 葛建钢. 探讨弥散加权成像(DWI)表观扩散系数(ADC)图在急性脑梗死中的临床应用价值[J]. 影像研究与医学应用, 2019, 3(11): 36-37.
- [10] 傅增辉, 孙洪英, 刘松, 等. 血清成纤维细胞生长因子 23、Klotho 蛋白水平与急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化和脑卒中危险因素的相关性[J]. 中风与神经疾病杂志, 2017, 34(4): 316-319.

- [11] 黄玲玲, 侯蝶咪. 血清成纤维细胞生长因子 23、Klotho 蛋白水平与急性脑梗死患者颈动脉粥样硬化和脑卒中危险因素的相关性[J]. 贵州医药, 2018, 42(1): 11-14.
- [12] 孟祥武, 李青, 陈娟, 等. 急性脑梗死患者血清 MMP-9、IGF-1 及 klotho 蛋白与颈动脉粥样硬化程度的关系[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(24): 5907-5909.
- [13] 张红艳, 翟丽, 王婷婷, 等. 胡黄连昔 II 通过抑制 cyto C/Caspase-9/Caspase-3 通路发挥神经保护作用[J]. 中国药理学通报, 2017, 33(5): 668-674.
- [14] 唐诗琪. 大鼠脑缺血再灌注后 CathepsinB 介导的细胞凋亡与 Caspase-9-Caspase-3 凋亡信号通路的关系[D]. 衡阳: 南华大学, 2017.
- [15] 周宾, 冯涛, 贺生, 等. 瑞舒伐他汀对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Bax Bcl-2 和脑含水量的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2019, 22(18): 1973-1980.
- [16] 尤良军, 左小丽, 宋元贞. 依达拉奉联合神经节苷脂钠对脑梗死患者脑血管储备能力的影响[J]. 中国合理用药探索, 2019, 10(5): 122-125.
- [17] 刘金泉, 纪宁, 刘金涛. NLRP2-caspase-1 炎性小体在脑缺血损伤中的表达量及作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(6): 735-739.
- [18] 李令建, 汤艳萍, 左常阳. 不同介入时间电针治疗对脑缺血后脑组织 Bax、Bcl-2 表达及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 广东医学, 2017, 38(23): 3571-3576.

(收稿日期: 2020-10-27 修回日期: 2021-04-27)