

两种方法检测系统性红斑抗核抗体的对比分析

朱华强¹, 朱 林², 罗 军¹ (1. 四川省绵阳市中心医院检验科 621000; 2. 四川省绵阳市中心血站 621000)

【摘要】 目的 通过间接免疫荧光法(IIF)和免疫印迹法(IBT)对系统性红斑狼疮(SLE)患者和健康检测人员作对比分析,探讨两种方法对系统性红斑狼疮(SLE)的临床应用价值。**方法** 分别采用 IIF 和 IBT 对 88 例 SLE 患者和 30 例健康体检人员的 15 种抗核抗体(AVA)进行测定。**结果** IIF 检测 SLE 患者 ANA 的阳性率为 97.7% (86/88),其荧光染色核型主要为核颗粒型、核均质型、胞质颗粒型和混合型。IBT 检测结果显示,SLE 患者 ANA 的阳性率为 90.9% (80/88),SLE 患者中主要检测出抗双链 DNA 抗体(dsDNA)、抗 sm、抗 ss-A、抗 nRNP/Sm、抗核小体抗体,以及少量抗组蛋白抗体及抗核糖体 P 蛋白抗体。健康体检人员两种方法检测均为阴性。**结论** 抗核抗体的 IIF 法筛选易导致以抗(SSA)为主要抗体或低浓度抗 AMA-M2 抗体患者的 ANA 假阴性,而 IBT 法因检测的抗体不全面也无法取代 ANA 的 IIF 法检测。临床实际工作中两种 ANA 的检测方法不能相互取代,应联合应用。

【关键词】 间接免疫荧光法; 免疫印迹法; 系统性红斑狼疮; 抗核抗体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.04.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)04-0397-03

Comparative analysis on two methods of IIF and IBT to detect SLE antinuclear antibodies ZHU Hua-qiang¹, ZHU Lin², LUO Jun¹ (1. Clinical Laboratory, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China; 2. Mianyang Blood Center, Mianyang, Sichuan 621000, China)

【Abstract】 Objective To compare the detection results of indirect immunofluorescence (IIF) and immunoblotting test (IBT) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and healthy persons and to investigate the value of two methods to diagnose SLE. **Methods** IIF and IBT were used to detect 15 kinds of antinuclear antibodies in 88 cases of SLE and 30 healthy persons for physical examination. **Results** The positive rate of antinuclear antibody (ANA) in SLE cases was 97.7% (86/88) for IIF, the fluorescent staining models were mainly nuclear particle type, nuclear homogeneous type and plasma particles type. IBT results showed that the positive rate of ANA in SLE cases was 90.9% (80/88), which were mainly anti-dsDNA, anti-sm, anti-ss-A, anti-nRNP/sm, antinucleosome antibody, and a few antihistone antibody and anti-ribosomes P antibody. **Conclusion** IIF method for screening ANA can easily cause false negative ANA in the patients with anti-SSA as the main antibody or low concentration anti-AMA-M2 antibody, while IBT does not replace IIF for detect ANA due to detecting antibodies incompletely. In clinical practical work, the two testing methods of ANA should not replace each other and should be jointly applied

【Key words】 IIF; IBT; SLE; ANA

系统性红斑狼疮(SLE)是一种机体多脏器受累的自身免疫性疾病^[1]。其发病机制非常复杂,既有内在因素(遗传、内分泌、免疫失衡等),又有外来因素(感染、药物、紫外线、食物等)的作用,是严重危害人类健康的疾病,本病遍及全世界,患病率为 4/10 万至 70/10 万,黑人和亚洲人患病率高,多见于青年女性,男女比为 1:10 左右,发病高峰在 15~40 岁育龄期。SLE 患者免疫功能紊乱,体内出现多种自身抗体,对 SLE 的诊断具有重要意义。1997 年美国风湿病学会(ACR)对 SLE 修订的最新诊断标准^[2]将抗核抗体(ANA)、抗双链 DNA 抗体(dsDNA)滴度异常,抗组蛋白抗体(Anti-histone)、抗 ENSA 抗体、抗磷脂抗体阳性作为免疫学异常诊断标准之一^[3]。

广义 ANA 是一组针对多种细胞成分的自身抗体的总称,在 SLE 患者疾病活动时 ANA 阳性率几乎 100%,敏感性较高,其排除 SLE 的阴性预告值较高,所以 ANA 检测是 SLE 的最佳筛查试验^[4]。同时也有资料显示,SLE 患者的亚临床期可长达 9 年,即当 ANA 检测阳性时,患者可无临床表现,说明 ANA 产生在 SLE 发病之前^[5]。因此,ANA 检测阳性对明确诊断、临床分型、病情观察、预后及治疗评价都具有重要意义。目前有很多方法可以对 ANA 进行检测,这些方法包括采用灵

长类动物的肝脏、肾脏或培养细胞(如 He-la 细胞和 HEp-2 细胞)的间接免疫荧光法(IIF)、酶联免疫吸附法、放射免疫法、酶联免疫法、被动血凝法、颗粒凝集法、对流免疫电泳法、免疫双扩散法、免疫印迹法(IBT)等^[6]。

本课题旨在通过对目前两种常用的检测 ANA 的方法——IIF 与 IBT 进行对比研究,明确两者对 SLE 诊断的临床应用价值,寻求一种(或一套组合)SLE 实验室检测方法,达到既能提高诊断率,指导治疗,又能早预防、早发现 SLE,以降低该病所带来的危害的目的。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2010 年 11 月至 2011 年 3 月在本医院门诊或住院治疗的 SLE 患者 88 例,其中女 78 例,男 10 例;年龄 11~75 岁,平均(35±13)岁,诊断符合 1997 年国际风湿病学会修订的 SLE 诊断标准。以 30 名健康体检人员的血清作为对照。

1.2 检测方法 IIF 法检测 ANA,选用欧蒙(德国)医学实验诊断股份有限公司生产的 HEp-2/猴肝生物薄片马赛克 ANA IIF 检测试剂盒,操作步骤按照说明书进行;IBT 法检测 ANA,选用欧蒙(德国)医学实验诊断股份有限公司生产的检测试剂盒,使用 EURO Blot Master 印迹法自动操作仪,严格按说明书

操作。反应区出现明显的蓝紫色条带为阳性,根据膜条上各抗原带着色情况,借助 EURO Line Scan 软件判定结果。每个膜条上带有质控带监测,确保所有结果的准确性。荧光显微镜:Olympus BX51;波长:488 nm(激发滤片);510 nm(分光滤镜);520 nm(阻挡滤镜);物镜:40×;光源:100 W 汞灯。

1.3 统计学方法 用 SPSS17.0 统计软件分析资料,各种率的比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 两种方法对 SLE 患者的检测结果 88 例 SLE 患者中有,IIF-ANA 阳性 86 例,阳性率为 97.7%(86/88);IBT-ANA 阳性 80 例,阳性率为 90.9%(80/88),见表 1。进行 χ^2 检验,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 两种方法对健康体检者的检测结果 30 例健康者中,IIF 法未检测到 ANA 阳性,IBT 法中也未检测到与 15 种相应抗

原结合的相应抗体存在;结果见表 1,进行 χ^2 检验,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 IIF 和 IBT 检测方法结果比较

组别		IBT		合计
		阳性	阴性	
IIF	阳性	78	8	86
	阴性	2	30	32
合计	—	80	38	118

注:—表示无数据。

2.3 不同荧光核型的 IIF 法 ANA 阳性标本 IBT 检测结果 不同荧光核型 IIF 法 ANA 阳性标本 IBT 检测结果结果见表 2。

表 2 不同荧光核型 IIF-ANA 阳性标本 IBT 检测结果

分组	阴性	核颗粒型	核均质型	胞质颗粒型	核仁型	着丝点型	核膜型	混合型	合计
IIF 阳性例数	2	30	21	14	2	2	3	14	86
IBT 阳性例数	2	28	19	12	2	2	3	14	80
IBT 阳性率(%)	100	90	90.5	85.7	50	100	100	100	90.9

2.4 应用 IBT 检测 SLE 患者血清 ANA 结果 SLE 患者血清中检测出抗 dsDNA、抗 Sm、抗干燥综合征 A(抗 SSA)、抗 nRNP/Sm、抗核小体抗体、抗组蛋白抗体及抗核糖体 P 蛋白抗体等,见表 3。而在健康对照组中均未发现这些抗体。

表 3 IBT 检测 SLE 患者血清 15 种 ANA 结果[n(%)]

ANA 类型	ANA 阳性例数(n=88)
抗 nRNP/S	27(30.7)
抗 Sm	30(34.1)
抗 SS-A	41(46.0)
抗 Ro-52	26(30.0)
抗 ss-B	12(13.3)
抗 Scl-70	0(0.0)
抗 PM-Scl	0(0.0)
抗 JO-1	0(0.0)
抗着丝点蛋白 B	2(2.3)
抗 PCNA	0(0.0)
抗 dsDNA	33(35.7)
抗核小体抗体	26(23.0)
抗组蛋白抗体	13(15.0)
抗核糖体 P 蛋白抗体	8(9.0)
AMA-M2	1(1.1)

3 讨 论

SLE 是一种累及多器官、多系统的小血管及结缔组织疾病,易发于年轻女性,病程中往往复发与缓解交替出现。患者体内可产生针对核酸、核蛋白和组蛋白的 ANA 及其他自身抗体。狭义 ANA 是一组针对细胞核成分的自身抗体的总称。随着分子生物学、细胞生物学与免疫化学的深入研究,不断有新的成员被发现。由于细胞核内有 DNA、RNA、碱性组蛋白、非组蛋白、磷脂及各种蛋白酶等复杂的化学组成,因此 ANA 也存在不同成分,它们构成了抗核抗体谱(ANAs)。ANA 靶抗原分布已由传统的细胞核扩展到现在的整个细胞,包括细胞

核、细胞质、细胞骨架和细胞分裂周期等。快速、准确地检测出 ANA,对 SLE 早期诊断有很大的帮助。

IIF 作为 ANA 检测的标准方法,具有检测灵敏度高、操作方便,且能针对细胞核、细胞质、细胞骨架、细胞周期等各种自身抗体具有检测范围广等优点^[7]。自从以 HEp-2 细胞为基质的 IIF-ANA 建立以后,国内外许多实验室均采用此方法作为 ANA 的筛查试验,但由于检测时干扰现象或人体正常免疫反应等会出现假阳性,基质中部分靶抗原分布不均、含量低等原因也会出现假阴性结果。虽然特异性高,但实验需要特殊仪器—荧光显微镜,判断实验结果需要操作者有娴熟的形态学技术及丰富的经验,受人为影响因素大。

欧蒙印迹膜条技术是德国欧蒙试剂诊断公司研发的一种新型印迹技术,其原理是将 nRNP、Sm、SS-A(天然 SS-A 和 Ro-52)、SS-B、Scl-70、PM-Scl、Jo-1、CENP B、PCNA、dsDNA、核小体、组蛋白、核糖体 P 蛋白和 AMA-M2 等 15 种抗原经亲和层析纯化后包被在膜条的固定位置上。若是阳性标本,已稀释血清的抗体与膜条上的抗原结合,结合的抗体与碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 抗体反应,加入底物液使已结合的抗体显色,呈现一条深色的阳性带。结果肉眼观察或用 EURO Line Scan 软件辅助判定,具有操作简单快速、易自动化,结果判读方便等优点,一次可检测与自身免疫性疾病相关的多种特异性自身抗体,且膜条结果可长期保存。

本文通过对两种检测 SLE 方法的比较,证明两者的敏感性 & 特异性均具有一致性,方法的符合率高。IIF 法和 IBT 法检测出 SLE 的阳性率分别为 97.7%和 90.9%,差异无统计意义;对 30 名健康体检人员的血清进行检测,均未出现阳性反应,可推断两者的敏感性和特异性均较高。但本次实验,对照组只收集了健康者的血清标本,在两种方法检测都显示为阴性的结果下,得到的两者的特异性均为 100%,虽然统计分析两者差异无统计学意义,但是由于资料未收集其他的自身免疫性疾病患者的血清作为对照组,就此论断两者对 SLE 的特异性是不准确的,因为 ANA 除在未治疗的 SLE 患者中的效价高

外,在大多数自身免疫性疾病中均可呈现阳性,健康老年人也可能有低效价的 ANA。ANA 阳性并不一定患有自身免疫性疾病。由于细胞核成分的复杂性,不同成分的抗原性不同,因此可产生多种类型的 ANA^[13]。所以,若要准确地比较两者的特异性,应该加入其他自身免疫性疾病患者如类风湿关节炎(RA)、混合性结缔组织病(MCTD)、干燥综合征(SS)、硬皮病、慢性活动性肝炎的患者作为对照组。在 2 例 IIF-ANA 阴性标本中,IBT 检测出抗 ANAs 的阳性率为 100%(2/2),有 1 例抗 SS-A 体阳性,1 例抗 AMA-M2 抗体阳性,有学者研究表明胞质型抗 SS-A 在采用 Hep-2 细胞作为抗原底物进行检测时容易导致假阴性,这可能与胞质中 SS-A 含量较低有关^[8];AMA-M2 是原发性胆汁性肝硬化(PBC)诊断的早期标志性抗体^[9],荧光表现为胞质颗粒型,当含量很低时,IIF 往往表现为阴性,而 IBT 的灵敏度高可以显示阳性,考虑是方法学差异造成。研究结果提示对于有临床表现,IIF-ANA 过筛试验阴性的患者,也需要做 IBT 特异性抗体检测。在 86 例 IIF-ANA 阳性的标本中,IBT 的阳性率为 93%(80/86)。由于 ANAs 检测的特异性抗体数量极其有限,无法包含 ANA 的所有抗体,所以会导致一定比例 IIF 检测阳性的患者在采用 IBT 检测 ANAs 时阴性。该实验结果提示临床实践中不能仅采用 IBT 检测 ANAs 结果代替 IIF 检测 ANA,否则易导致很多患者得到假阴性结果,延误治疗。

在 86 例 IIF-ANA 阳性标本中,核颗粒、核均质、胞质颗粒型、混合型占总核型的 91.8%[(30+21+14+14)/86],推断 SLE 患者 ANA 的核型主要为核颗粒型、核均质型、胞质颗粒型和混合型,和文献报道相符^[10];在对 IBT 检测 SLE 的结果统计发现,抗 dsDNA、抗 Sm、抗 SS-A、抗 nRNP/Sm、抗核小体抗体在 SLE 患者中出现比例很高,进一步证实了有关文献报道的抗 dsDNA、抗 sm、抗核小体等抗体对 SLE 的特异性诊断价值^[11]。

在不同荧光核型 IIF-ANA 标本中 IBT 检测结果显示:核颗粒型、核均质型、浆颗粒型、核仁型 4 种核型在 IBT 法中占很大的比例,可以推断 ANA 的荧光核型与 IBT-ANAs 类型有一定的相关性,但是此次没有研究荧光核型和 IBT-ANAs 的相关数据分析,所以尚不知道有无规律可寻,但是有文献报道同一种自身抗体可以出现不同的荧光核型,不同的自身抗体可以出现相同的荧光核型^[12],不能简单地通过分析 ANA 荧光核型来判断相应抗体的特异性,必须联合检测 ANAs。

从上述实验结果中可以看出,对 SLE 的良好诊断既需要做 ANA 的 IIF 检测,也离不开对单一抗体的 IBT 法检测。应用两种方法联合检测,在 SLE 诊断中具有互补性,并能提高检出率。因此,建议将两种方法或更多的方法结合起来进行 SLE 等自身免疫性疾病的诊断。

(上接第 396 页)

参考文献

[1] 王辉,陈民钧,倪语星,等. 2006 年中国十家教学医院革兰阴性杆菌的耐药情况[J]. 中华检验医学杂志,2008,31(6):627-628.

[2] 吴朝阳,黄福达,陶剑霜. 下呼吸道感染铜绿假单胞菌耐药分析[J]. 中国医师进修杂志,2007,30(2):11.

[3] 康燕,王 静,鸽美菊,等. 呼吸科和 ICU 下呼吸道感染痰标本细菌分类及耐药性分析[J]. 河南医学研究,2010,19

参考文献

[1] 靳淑玲,王北宁,李彩,等. 系统性红斑狼疮抗 ENA 抗体及抗核抗体的检测[J]. 中国实验临床免疫学杂志,1998,10(5):295

[2] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum,1997,40(9):1725.

[3] Egner WU. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE[J]. J Clin Pathol,2000,53(5):424-432.

[4] Agarwal S,Harper J,Kiely PD. Concentration of antibodies to extract-able nuclear antigens and disease activity in systemic lupus erythemato-SUS[J]. Lupus,2009,18(5):407-412.

[5] Arbuckle MK,Mcclain MT,Rubeone MV. Development of antoanti-bodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus[J]. New Engl J Med,2003,349:1526-1533.

[6] William Egner. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE[J]. J Clin pathol,2000,53(4):424-432.

[7] Kavanaugh A,Tomar R,Reveille J,et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens[J]. ArchPathol Lab Med,2000,124(1):71-81.

[8] 蒋明,朱立平,林孝义. 风湿病学[M]. 北京:科学出版社,1995:347.

[9] Metcalf JV,Mitchison HC,Palmer JM,et al. Natural history of early primary biliary cirrhosis[J]. Lancet,1996,348(9039):1399-1402.

[10] 姜烈君,罗焰芳. 间接免疫荧光法和免疫印迹法检测 113 例系统性红斑狼疮患者抗核抗体谱结果分析[J]. 中国医学杂志,2008,3(4):546.

[11] Sherer Y,Gorstein A,Fritzier MJ,et al. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients[J]. Semin Arthritis Rheum,2004,34(2):501-537.

[12] 张道强,隋秀梅,林荣海,等. 抗核抗体间接免疫荧光法检测结果与抗核抗体谱免疫印迹法检测结果对比分析[J]. 2010,31(11):1212-1214.

(收稿日期:2011-08-13)

(1):48.

[4] 张花菊,张立平,牟立东,等. 下呼吸道感染致病菌的分布与耐药性分析[J]. 中国医师进修杂志:内科版,2006,29(12):49-50.

[5] 马熊剑,警善民. 959 株下呼吸道感染细菌的耐药性检测[J]. 检验医学与临床,2011,8(11):1334-1336.

[6] 何卫国,赵子文,曾军,等. 下呼吸道感染常见病原菌能分析[J]. 临床和实验医学杂志,2010,9(14):1061-1063.

(收稿日期:2011-07-15)