

抗核抗体筛查试验阴性与特异性抗体确认试验阳性的相关性研究

郭慧娟, 尚晓泓(中国中医科学院西苑医院检验科, 北京 100091)

【摘要】 目的 分析探讨抗核抗体(ANA)筛查试验阴性与特异性抗体确认试验阳性的相关性。**方法** 用间接免疫荧光法(IIF)作为 ANA 筛查试验,用免疫印迹法(LIA)作为抗核抗体谱(ANAs)特异性抗体确认试验,对 410 例 ANA 筛查试验阴性的患者血清标本进行免疫印迹法检测分析。**结果** 410 例 ANA 筛查试验阴性患者的标本有 46 例(11.2%)LIA-ANAs 阳性。其中有 17 例单个抗体阳性,有 21 例 2 个抗体阳性,有 6 例 3 个抗体阳性,有 1 例 4 个抗体阳性,有 1 例 6 个抗体阳性。且 21 例患者经临床资料分析明确诊断自身免疫疾病(AID)。**结论** 对于临床就诊的患者,无论 ANA 初筛试验阴性与否,均需进行各种针对特异性抗体的确认试验。

【关键词】 间接免疫荧光法; 免疫印迹法; 抗核抗体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.02.006 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)02-0142-02

Correlation between the negative of screening assay of antinuclear antibody and the positive of confirmatory assay of specific antibody GUO Hui-juan, SHANG Xiao-hong (Department of Laboratory Science of Xiyuan Hospital, Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between the negative of screening assay of antinuclear antibody(ANA)and the positive of confirmatory assay about specific antibody. **Methods** Four hundred and ten patients' negative serum samples were detected by indirect immunofluorescence(IIF) and line immunoassay(LIA) for confirmatory assay about specific ANAs. **Results** forty-six (11.2%) negative serum samples by IIF-ANA were positive by LIA-ANAs. In them,17 were positive about one kind of antibody,21 were positive about two kinds of antibodies,6 were positive about three kinds of antibodies,1 was positive about four kinds of antibodies,1 was positive about six kinds of antibodies. 21 cases were diagnosed for AID. **Conclusion** It is necessary to detect specific antinuclear antibodies regardless of the result of screening assay of ANA.

【Key words】 indirect immunofluorescence; line immunoassay; ANA

抗核抗体(ANA)首先被发现与自身免疫疾病(AID)密切相关,并在 AID 诊断中应用了 50 多年。随着 ANA 的各种检测技术在不断发展,除作为检测“金标准”的间接免疫荧光法抗核抗体(IIF-ANA)检测外,许多针对特异性抗体的检测方法也不断被应用于临床,如酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫扩散法(DID)、免疫印迹法特异性抗核抗体谱(LIA-ANAs)检测等。LIA-ANAs 检测 15 种特异性抗体对 AID 诊断和鉴别诊断、病情评估与治疗监测、病程转归与预后判断等都具有重要的临床应用价值。对于 ANA 在临床中的检测应用,国内外许多实验室常先进行总抗体的筛查试验,若检测结果阳性,再进行针对特异性靶抗原的自身抗体确认试验^[1-2]。但是,在常规工作中,作者发现有部分荧光法抗核抗体检测结果阴性的标本,免疫印迹法检测结果为抗体阳性,二者的结果并不符合。作者对 410 例 IIF-ANA 阴性的标本进行 LIA-ANAs 检测分析,分析其不符合性,探讨对 AID 的诊断价值。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 收集 2011 年 4 至 2012 年 2 月中国中医科学院西苑医院门诊以及病房送检的 410 例 IIF-ANA 阴性就诊患者标本。其中男 75 例,年龄 4~90 岁;女 335 例,年龄 7~90 岁。

1.2 标本采集 抽取待检患者清晨空腹静脉血 5 mL,离心分

离血清。

1.3 IIF-ANA 检测 ANA 检测采用 IIF 法,初筛试剂购自德国欧蒙实验诊断公司,每个反应区包括 2 种抗原基质:HEp-2 细胞和鼠肝组织冰冻切片。在第一次温育时,已稀释的血清(按试剂盒要求进行 1:100 稀释)标本与定在载片反应区上生物薄片上细胞反应,如果标本阳性,特异性抗体与相应抗原结合。在第二次温育时,结合的抗体与荧光素标记的羊抗人 IgG 抗体反应,然后在荧光显微镜下观察特异性的荧光模式,严格按照试剂操作说明书操作。

1.4 LIA-ANAs 检测 采用德国欧蒙公司提供的免疫印迹法(LIA),检测项目含以下 15 种特异性抗体:nRNP/Sm、Sm、SS-A、Ro-52、SS-B、Scl-70、PM-Scl、Jo-1、着丝点蛋白 B(CENP B)、增殖细胞核抗原(PCNA)、双链 DNA(dsDNA)、核小体(nucleosome)、组蛋白(histone)、核糖体(rRNP)、线粒体-M2(AMA-M2)抗体。膜条上平行包被经亲和层析纯化的天然抗原(其中 CEN B、PM-Scl、Ro-52、PCNA 为重组抗原)。在第一次温育时,经稀释的患者血清标本与膜条上靶抗原反应,如标本阳性,则特异性抗体将与靶抗原结合,检测的是已结合的抗体。加入酶标记抗人 IgG(酶结合物)行第二次温育,然后加入加色原底物液以呈颜色反应,最后以蒸馏水清洗膜条后,终止反应。

2 结 果

410 例 IIF-ANA 阴性标本中,有 46 例(11.2%)LIA-ANAs 阳性,其中有 17 例单个抗体阳性,有 21 例两个抗体阳性,有 6 例 3 个抗体阳性,有 1 例 4 个抗体阳性,有 1 例 6 个抗体阳性。从表 1 可以看出 IIF-ANA 阴性标本几乎可以导致所有

种类的 ANAs(除了抗核小体抗体和 Sm 抗体外)特异性抗体漏检。IIF-ANA 阴性 LIA-ANAs 阳性的标本中, Ro-52、SSA 抗体阳性率最高,分别是 62% 和 42%,其次则是 dsDNA 和 M2,阳性率皆为 14%。

表 1 46 例 LIA-ANAs 阳性(IIF-ANA 阴性)的特异性抗体分布[n(n)]

性别	SS-A	Ro-52	SS-B	RIB	Jo-1	CEN B	M2	Scl-70	PM-Scl	PCNA	dsDNA	HIS	nRNP/Sm
男	6(42)	8(56)	1(7)	0(0)	1(7)	1(7)	2(14)	1(7)	0(0)	1(7)	2(14)	1(7)	1(7)
女	15(47)	23(72)	3(9)	1(3)	4(12)	1(3)	5(15)	1(3)	1(3)	1(3)	5(15)	0(0)	2(6)
合计	21(42)	31(61)	4(8)	1(2)	5(10)	2(4)	7(14)	2(4)	1(2)	2(4)	7(14)	1(2)	3(6)

3 讨 论

近年来,随着对 AID 认识的提高,加之临床经验的积累和实验室诊断技术的进步,AID 发病率明显上升,其总体发病率占世界人口的 3%~5%^[1]。而以 HEp-2 细胞结合动物肝组织建立的 IIF 检测 ANA 方法,具有操作简单、敏感度高、特异度好,且结果易于判断等优点,能适合临床实验室常规 ANA 的检测^[3]。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。而 LIA 作为 ANAs 的特异性抗体确认试验中的一种,在反应膜条上平行包被多种高度纯化或重组的抗原物质,具有操作简单快速、易自动化,结果判读方便,一次可检测 AID 相关的多种特异性自身抗体,并且在方法学上与 ELISA 比较有相似的灵敏度和特异性等优点^[4]。在临床实际工作中,由于检测成本因素的影响,许多实验室仅对 IIF-ANA 阳性的标本再做进一步 ANAs 特异性抗体确认,但是从本研究中发现若 IIF-ANA 阳性后再进行 ANAs 特异性抗体检测,则会导致 11.2% 的患者假阴性,很容易造成部分具有重要临床意义的 ANAs 特异性抗体漏检,导致 AID 患者漏诊、误诊。本研究中 410 例 IIF-ANA 检测结果为阴性的标本中有 46 例 ANAs 阳性,不符合率为 11.2%。46 例中的 21 例患者经临床资料分析明确诊断 AID。荧光 IIF-ANA 检测结果与 LIA-ANAs 检测结果相互关系分析结果显示,46 例 IIF-ANA 阴性而 ANAs 抗体阳性的标本中,有 21 例(42%)SS-A 抗体阳性,31 例(62%)Ro-52 抗体阳性,4 例(8%)SS-B 抗体阳性,1 例(2%)RIB 抗体阳性,5 例(10%)Jo-1 抗体阳性,2 例(4%)CEN B 抗体阳性,7 例(14%)AMA-M2 抗体阳性,2 例(4%)Scl-70 抗体阳性,1 例(2%)PM-Scl 抗体阳性,2 例(4%)PCNA 抗体阳性,7 例(14%)dsDNA 抗体阳性,1 例(2%)HIS 抗体阳性,3 例(6%)nRNP/Sm 抗体阳性。其中有 17 例单个抗体阳性,有 21 例 2 个抗体阳性,有 6 例 3 个抗体阳性,有 1 例 4 个抗体阳性,有 1 例 6 个抗体阳性。在本研究中除了抗核小体抗体和 Sm 抗体外,其余的 13 种抗体皆以不同的比例出现, Ro52、SSA 抗体阳性率最高,分别是 62% 和 42%,说明 IIF-ANA 阴性而 LIA-ANAs 阳性的特异性抗体以 SSA 抗体、Ro-52 抗体阳性为主,符合文献中提及选择转染 R060 cDNA 的 HEp-2000 细胞基质可提高检测灵敏度^[5-6]的结论。有学者研究表明胞质型 SSA 抗体在采用 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 SSA 含量较低有关^[7]。考虑是方法学差异造成。在 IIF-ANA 阴性 LIA-ANAs 阳性的其他特异性抗体中,包括 Jo-1 抗体、组蛋白抗体、rRNP 抗体及 Scl-70 抗体、SS-B 抗体、RIB 抗体、CENB 抗体、PM-Scl 抗体、PCNA 抗体、DSDNA 抗体、AMA-M2 抗体。分析原因可能与部分 HEp-2 细胞胞质中表达的靶抗原含量低(Jo-1 抗体、AMA、dsDNA 抗体、rRNP 抗体等),或对于同一种特异性抗体(如 Scl-70 抗体),除了针对 HEp-2 细胞上典型的靶抗原外,还存在针对细胞其他成分的靶抗原^[8]。对 IIF-ANA 阴性 LIA-ANAs 阳性的各种特异性抗体确认试验方法中,LIA-ANAs 检测出除了抗核小体抗体和 Sm 抗体之外的 13 种抗体。研究结果提示如果实验室以 IIF-ANA 作为过筛试验,初筛阳性后再进行 LIA-ANAs 特异性抗体检测,则会导致 10% 以上的患者 ANA 假阴性,很容易造成部分具有重要临床意义的 ANAs 特异性抗体漏诊,导致自身免疫疾病的误诊、漏诊。

总之,对于临床疑似自身免疫疾病的患者,应无论 IIF-ANA 初筛试验阴性与否,均需进行 LIA-ANAs 特异性抗体的确认试验检测,以便为自身免疫疾病的早期诊断与及时治疗提供有力的帮助。

参考文献

- [1] 李永哲. 自身抗体检测技术临床推广应用和质量保证工作中应重视的问题[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 769-773.
- [2] Hoffman IE, Peene I, Veys EM, et al. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests[J]. Clin Chem, 2002, 48(12): 2163-2171.
- [3] Renato T, Nicola B, Elio T, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases[J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(2): 316-324.
- [4] 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(2): 340-347.
- [5] Peene I, Van Ael W, Vandebossche M, (下转第 145 页)

2.2 hs-CRP 检测结果 手足口病患儿组超敏 CRP 明显高于健康对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 异常率为 56.8%, 测定结果见表 1。

2.3 心电图检测结果 手足口病患儿心电图有异常改变者 18 例, 主要表现为 T 波倒置, ST 段低平, 心律不齐和心动过速等, 心电图检测异常者其心肌酶和 hs-CRP 改变亦较明显。

3 讨 论

手足口病 (HFMD) 是 1957 年首次在新西兰发现的一种新型传染病, 我国 1981 年在上海首次发现该病。其主要由柯萨奇 A16 型和肠道病毒 71 型引起的, 另外柯萨奇 A5、A9 和 A10 也可致病, 其中 CoxA16 和 EV71 感染对机体的损伤更大, 不但病程较长且并发症多^[4], 多发生于学龄前儿童, 多见于 4 岁以下小儿, 主要表现为发热、口腔炎和手足皮疹。该病的传染源主要是人, 包括患者和健康携带者, 患者的唾液和鼻咽分泌物中的病毒可经空气飞沫传播, 被带有病毒的疱疹液、唾液或粪便污染的食物、餐具、玩具及床上用品、内裤等传播, 通过日常接触可经口感染。本病具有自限性, 轻者可自愈, 但部分患儿常出现严重的并发症如急性心肌炎、脑干脑炎、急性脊髓炎、肺水肿和类小儿麻痹症候群等。2000 年招远市王晓华^[5]报道 1 698 例手足口病患儿, 3 例死于暴发性心肌炎, 故应引起临床重视。

心肌酶谱 AST、LDH、CK、CK-MB、LDH-1、 α -HBDH 的活性与心脏的损伤密切相关, 其中 CK-MB 是心肌特异性同工酶, 在心肌细胞中含量最高, 正常血清中含量极微, 当心肌细胞受损时释放入血, 对判断心肌损害具有高度特异性^[6]。血清中 CK-MB 升高是公认的诊断急性心肌梗死和确定有无心肌坏死的重要指标。特别是对于心电图无 Q 波的急性心肌梗死和再发性心肌梗死, 血清中 CK-MB 升高具有决定性诊断的作用。

LDH-1 是 LDH 的一种同工酶, 主要存在于心肌, 当心肌梗死和心肌炎时升高, CK-MB 和 LDH-1 的联合检测有助于心肌方面疾病的诊断。CRP 是由肝细胞合成的一种急性时相反应蛋白, 不仅结合多种细菌、真菌及原虫等体内的多糖物质, 在钙离子的存在下, 还可以结合卵磷酯和核酸, 结合后的聚合物具有对补体系统的激活作用, 可引发对侵入细胞的免疫调节作用和吞噬作用而表现出炎症反应^[7]。超敏的方法检测到更低、更精密的 C 反应蛋白浓度即称为 hs-CRP, 其半衰期仅 5~7 h, 并且不受全血、抗炎药物和激素因素的影响, 能与炎症同步变化, 在感染早期血清 hs-CRP 水平即迅速升高, 升高程度与感

染程度呈正相关^[8]。

手足口病为一种病毒感染, 心肌酶谱和 hs-CRP 检测结果显示, 手足口病患儿组 AST、LDH、LDH-1、CK 及 CK-MB 活性均明显高于健康对照组, 并且患儿组心肌酶谱升高的比率很高。另外, 心电图检查发现患儿组心电图异常率为 30%, 且心电图检查有异常者其心肌酶改变亦较明显。结果显示心肌酶谱和 hs-CRP 的联合检测能及早发现心肌损伤, 并且也提示 HFMD 患儿切不可认为其是自限性疾病而轻率对待, 对其要仔细询问病史和查体, 一旦出现心慌、气急、嗜睡或发现难以解释的心音低钝、心律不齐和窦性心动过速等心肌受损表现, 应及时进行心肌酶谱检测和心电图检查, 以便及早发现心肌损害, 并早期治疗, 避免造成永久心肌损伤。

参考文献

- [1] Mc Mina PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significant[J]. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26(1): 91-95.
- [2] Ho M. Enterovirus 71: the virus, its infection and outbreaks[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2003, 33(4): 205-209.
- [3] 李爱敏, 孙洪亮, 于慧芹. 手足口病患儿血清心肌酶检测及临床意义[J]. 中国实用儿科杂志, 2004, 19(8): 464.
- [4] Mcmnn P, Lndsay K, Perepra D, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore and Western Australia[J]. Jviriol, 2001, 75(16): 7732-7738.
- [5] 王晓华. 小儿手足口病 1 698 例分析[J]. 中华传染病杂志, 2002, 20(4): 242.
- [6] 肖曙芳, 刘益林, 杨芸凤, 等. 58 例婴幼儿轮状病毒性肠炎心肌酶测定及临床意义[J]. 临床儿科杂志, 1999, 17(4): 224.
- [7] 俞钱, 石冬敏. C 反应蛋白在儿童急性呼吸道感染的应用探讨[J]. 中国血液流变学杂志, 2007, 17(2): 301.
- [8] 李维春, 黄圣东. 心肌肌钙蛋白 I、高敏 C 反应蛋白检测在手足口病患儿心肌损伤中的临床价值[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4): 550-551.

(收稿日期: 2012-05-30 修回日期: 2012-11-11)

(上接第 143 页)

- et al. Sensitivity of the HEp-2000TM substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies[J]. Clin Rheumatol, 2000, 19(2): 291-295.
- [6] Xavier B, Johan F, Ann H, et al. Detection of Anti-SSA Antibodies by Indirect Immunofluorescence [J]. Clin Chem, 2004, 50(13): 2361-2369.
- [7] 蒋明, 朱立平, 林孝义. 风湿病学[M]. 北京: 科学出版社,

1995: 347.

- [8] Alessandra D, Cristiane G, Mariana GS, et al. Redefining the Sc1-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern[J]. Rheumatology, 2009, 48(4): 632-637.

(收稿日期: 2012-05-30 修回日期: 2012-11-16)