

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.006

抗中性粒细胞胞浆抗体荧光模型与其抗体谱对应关系*

刘在栓¹, 刘雨欣¹, 胡 静¹, 罗俐梅¹, 黄卓春¹, 牛 倩¹, 徐 欢¹, 严 冰², 武永康^{1△}

四川大学华西医院:1. 实验医学科;2. 风湿免疫科, 四川成都 610041

摘要:目的 探讨间接免疫荧光法(IIF)检测抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)荧光模型与 ANCA 谱检测结果的对对应关系。方法 回顾性分析 2016 年 1 月至 2017 年 12 月该院 669 例 ANCA 荧光模型阳性患者 ANCA 荧光模型与 ANCA 谱 6 种特异性自身抗体之间的对应关系。ANCA 荧光模型采用 IIF 检测;ANCA 谱中的 6 种特异性抗体采用 ELISA 检测,靶抗原包括杀菌通透性增强蛋白(BPI)抗原、组织蛋白酶 G(CAT-G)抗原、乳铁蛋白(LF)抗原、弹性蛋白酶(EL)抗原、髓过氧化物酶(MPO)抗原、蛋白酶 3(PR3)抗原。结果 核周型(P-ANCA)荧光模型对应的主要抗体为抗 MPO(67.91%)、抗 LF(9.79%)和抗 EL(7.83%);胞浆型(C-ANCA)荧光模型对应的主要抗体为抗 PR3(44.58%)、抗 MPO(25.30%)和抗 BPI(10.84%);不典型(A-ANCA)荧光模型对应的主要抗体为抗 MPO(56.00%)、抗 PR3(13.33%)和抗 LF(12.00%);单纯抗 MPO、抗 EL、抗 LF 阳性时出现 P-ANCA 的概率分别为 84.73%、90.91%、82.35%;单纯抗 PR3、抗 BPI、抗 EL 抗体阳性时出现 C-ANCA 的概率分别为 58.18%、20.69%、9.09%;单纯抗 BPI、抗 LF、抗 PR3 抗体阳性时出现 A-ANCA 的概率分别为 20.69%、17.65%、14.55%;此外,当所有抗体检测为阴性时出现 97 例荧光模型阳性患者,分别为 P-ANCA(69.07%)、C-ANCA(17.53%)、A-ANCA(13.40%)。结论 ANCA 荧光模型可对应出现所有的靶抗体,P-ANCA 对应的抗体主要为抗 MPO;C-ANCA 主要为抗 PR3;A-ANCA 主要为抗 MPO;抗 MPO、抗 EL、抗 LF 主要对应 P-ANCA,抗 PR3 主要对应 C-ANCA,抗 BPI、抗 LF 主要对应 A-ANCA,ANCA 荧光模型结果仅为临床医生对疾病的诊断提供参考,同时为实验室结果双向核对提供依据,具体疾病需参照 ANCA 谱靶抗体进行诊断。

关键词:抗中性粒细胞胞浆抗体; 荧光模型; 抗体谱; 自身抗体**中图法分类号:**R446.6**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)14-1972-04**Relationship between fluorescence model of anti-neutrophil cytoplasmic antibody and anti-neutrophil cytoplasmic antibody spectrum***LIU Zaishuan¹, LIU Yuxin¹, HU Jing¹, LUO Limei¹, HUANG Zhuochun¹,NIU Qian¹, XU Huan¹, YAN Bing², WU Yongkang^{1△}

1. Department of Laboratory of Medicine; 2. Department of Rheumatology and Immunology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the fluorescence model of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) detected by indirect immunofluorescence (IIF) and the results of ANCA spectrum. **Methods** A retrospective analysis was used to analyze the correlation between the fluorescence model of 669 positive ANCA cases and six specific autoantibodies of ANCA in West China Hospital from January 2016 to December 2017. ANCA was detected by IIF. Six specific antibodies were detected by ELISA target antigens including bactericidal permeability enhancing protein (BPI), cathepsin G (CAT-G), lactoferrin (LF), elastase antibody (EL), myeloperoxidase (MPO), and protease 3 (PR3) in ANCA spectrum. **Results** The target antibodies including anti-MPO, anti-LF and anti-EL accounted for 67.91%, 9.79% and 7.83% respectively while P-ANCA pattern. The target antibodies including anti-PR3, anti-MPO and anti-BPI accounted for 44.58%, 25.30%, 10.84% respectively while C-ANCA pattern. The target antibodies including anti-MPO, anti-PR3 and anti-LF accounted for 56.00%, 13.33% and 12.00% respectively while A-ANCA pattern. The probability of P-ANCA of anti-MPO, anti-EL and anti-LF alone accounted for 84.73%, 90.91% and 82.35%. The probability of C-ANCA of anti-PR3, anti-BPI and anti-EL were 58.18%, 20.69% and 9.09%. The probability of A-ANCA of anti-BPI, anti-LF and anti-PR3 were 20.69%, 17.65% and 14.55% respectively. Besides, 97 samples specific antibodies were negative but positive by IIF, the pattern were P-ANCA (69.07%), C-ANCA

* 基金项目:四川省应用基础研究计划项目(2016JY0035);四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ326)。

作者简介:刘在栓,男,技师,主要从事免疫研究。△ 通信作者,E-mail:vipwyk@163.com。

(17.53%) and A-ANCA (13.40%). **Conclusion** ANCA fluorescence pattern can correspond to all target antibodies, P-ANCA corresponds mainly to anti-MPO, C-ANCA mainly to anti-PR3, A-ANCA mainly to anti-MPO, anti-MPO, anti-EL, anti-LF mainly corresponds to P-ANCA, anti-PR3 mainly corresponds to C-ANCA, anti-BPI, anti-LF mainly corresponds to A-ANCA, ANCA fluorescence model results only provide reference for clinicians in the diagnosis of diseases at the same time. It can provide a basis for checking ANCA pattern with specific ANCA profiles, ANCA associated disease diagnose need depending on ANCA specific antibodies.

Key words: anti-neutrophil cytoplasmic antibody; fluorescence model; antibody profile; autoantibodies

抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)是针对中性粒细胞胞浆颗粒蛋白的自身抗体^[1]。ANCA 血清学检测有助于一些自身免疫疾病的诊断和监测,如肉芽肿性血管炎(GPA)、急性肾小球肾炎(APG)、结节性多动脉炎(PAN)、溃疡性结肠炎(UC)等疾病^[2-4]。目前,ANCA 的检测主要采用间接免疫荧光法(IIF,以甲醛和乙醇固定中性粒细胞为检测基质)检测,再以 ELISA 检测特异抗体进行确认。在荧光显微镜下 ANCN 阳性标本可以观察到核周型(P-ANCA)、胞浆型(C-ANCA)、不典型(A-ANCA)3 种荧光模型^[5-6],此时 ANCA 阳性只能表明具有针对中性粒细胞胞浆抗原成分的抗体存在,但并不能依据荧光模型准确判断特异性抗体的种类,需进一步检测各亚类特异性的自身抗体,即 ANCA 谱。ANCA 谱是检测针对中性粒细胞胞浆各种特异性抗原所产生抗体的集合。但目前对 ANCA 荧光模型与 ANCA 谱之间的对应关系并不十分明确^[7],本研究通过回顾性分析近两年本院 ANCA 荧光模型类型与 ANCA 特异性抗体谱之间的对应关系,旨在为临床医生对疾病的诊断及实验室结果核对提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 1 月至 2017 年 12 月本院 669 例 ANCA 荧光模型检测为阳性的患者作为研究对象,其中男 262 例,女 407 例,男:女=1.00:1.55,年龄 13~94 岁,平均(54.20±7.91)岁;男性患者发病年龄 14~94 岁,平均(58.10±8.30)岁;女性患者发病年龄 13~91 岁,平均(51.70±9.13)岁。

1.2 方法

1.2.1 ANCA 荧光模型检测方法 采用以甲醛和乙醇固定中性粒细胞为检测基质的 IIF 检测;将血清按 1:10 稀释,按试剂说明书操作,在荧光显微镜下观察

特异性荧光模型。试剂盒购自德国欧蒙公司,检测显微镜为日本 EURO Star III Plus。

1.2.2 ANCA 抗体谱检测方法 采用 ELISA 检测 ANCA 特异性抗体。试剂盒包含 6 种不同抗原,包括杀菌通透性增强蛋白(BPI)抗原、组织蛋白酶 G(CAT-G)抗原、乳铁蛋白(LF)抗原、弹性蛋白酶(EL)抗原、髓过氧化物酶(MPO)抗原、蛋白酶 3(PR3)抗原。第 1 次温育时,稀释后的标本在微孔中反应,如果标本含有相应抗体,特异性抗体与抗原结合;在第 2 次温育时加入酶标抗人 IgG 抗体(酶结合物)进行第 2 次温育。最后加入酶底物,发生颜色反应。颜色深浅与抗体水平呈正比,加入终止液,在波长为 450 nm 下测定患者吸光度,最后得出比值,比值<1 为阴性,≥1 为阳性。

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,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ANCA 荧光模型与 6 种特异性自身抗体的关系 669 例 ANCA 荧光模型检测为阳性的患者中 C-ANCA 占 12.41%,P-ANCA 占 76.38%,A-ANCA 占 11.21%,同时应用 ELISA 分别对阳性患者标本 6 种特异性自身抗体(抗 BPI、抗 CAT-G、抗 LF、抗 EL、抗 MPO、抗 PR3)进行检测,理论上当 1 种或 1 种以上的抗体为阳性时,其对应的荧光模型检测为阳性,实际检测发现当 6 种抗体均为阴性时,出现了 97 例荧光模型检测为阳性的患者,其中 P-ANCA 占 69.07%,C-ANCA 占 17.53%,A-ANCA 占 13.40%。见表 1。

表 1 ANCA 荧光模型与 6 种特异性抗体的关系[n(%)]

ANCA 荧光模型	<i>n</i>	抗 PR3	抗 MPO	抗 BPI	抗 LF	抗 EL	抗 CAT-G	抗体全阴	χ^2	<i>P</i>
P-ANCA	511	34(6.65)	347(67.91)	38(7.44)	50(9.79)	40(7.83)	3(0.59)	67(13.11)	363.32	<0.05
C-ANCA	83	37(44.58)	21(25.30)	9(10.84)	1(1.20)	4(4.82)	1(1.20)	17(20.48)	6.78	<0.05
A-ANCA	75	10(13.33)	42(56.00)	7(9.33)	9(12.00)	0(0.00)	0(0.00)	13(17.33)	30.14	<0.05
合计	669	81(12.11)	410(61.29)	54(8.07)	60(8.97)	44(6.58)	4(0.60)	97(14.50)	461.76	<0.05

注:由于 ANCA 荧光模型阳性时对应的抗体可能出现 1 种或 1 种以上的情况,所以出现抗体数量总和大于 ANCA 荧光模型例数且百分数总数大于 100%的情况; χ^2 及 *P* 为特异性自身抗体最高频率与次高频率构成比的比较

2.2 单一的特异性自身抗体与 ANCA 荧光模型间的结果对应关系 为了进一步探索每一种特异性自身抗体对应的 ANCA 荧光模型,避免其他抗体对结果的干扰,本研究仅分析单纯 1 种自身抗体阳性时与荧光模型的结果对应关系,见表 2。

表 2 单一特异性自身抗体与 ANCA 荧光模型的对应关系[n(%)]

单一抗体阳性	n	P-ANCA	C-ANCA	A-ANCA	χ^2	P
抗 MPO	347	294(84.73)	18(5.19)	35(10.08)	387.68	<0.05
抗 PR3	55	15(27.27)	32(58.18)	8(14.55)	10.74	<0.05
抗 LF	34	28(82.35)	0(0.00)	6(17.65)	28.47	<0.05
抗 BPI	29	17(58.62)	6(20.69)	6(20.69)	8.72	<0.05
抗 EL	22	20(90.91)	2(9.09)	0(0.00)	29.46	<0.05
抗 CAT-G	1	1(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	—	—

注:均为单一 ANCA 特异性抗体阳性病例,排除 2 个或 2 个以上抗体同时阳性的病例,因此少于 669 例病例,总例数为 488 例; χ^2 及 P 为不同荧光模型最高频率与次高频率的构成比比较;—表示无数据

3 讨 论

ANCA 作为小血管炎症发病机制的关键分子,近年来受到越来越多的关注,遗传学研究,以及动物和体外模型研究表明,多种因素诱导 ANCA 的产生^[8],目前 ANCA 检测已成为自身免疫疾病一项非常重要的常规检测项目。ANCA 检测方法有多种,如 IIF、ELISA、放射免疫法(RIA)、免疫印迹法(IBT)、免疫沉淀法(IP)和流式细胞术(FCM)等^[9],《国际检测和报告 ANCA 共识声明》建议在检测 ANCA 相关血管炎时,结合 IIF 和 ELISA 检测 ANCA,以提高对疾病诊断的特异度^[10-11]。但由于 ANCA 自身抗体包含的种类复杂,抗体检测对疾病诊断的特异度不高,相关研究也有限,常常困扰临床医生对疾病的诊断。本研究分析了 ANCA 荧光模型与 ANCA 特异性抗体间的关系,从表 1 可以看出,3 种荧光模型对应目前临床最常检测的 6 种特异性自身抗体均可出现阳性,所有荧光模型阳性中又以抗 MPO、抗 PR3、抗 LF 检出较多,由此说明这 3 类抗体的出现对 ANCA 相关疾病的诊断具有十分重要的意义,与文献^[12-13]报道一致。P-ANCA 阳性标本中常出现抗 MPO、抗 LF、抗 EL 阳性,其中以抗 MPO 为主;C-ANCA 阳性标本中常出现抗 PR3、抗 MPO、抗 BPI 阳性,其中以抗 PR3 为主;A-ANCA 阳性标本中常出现抗 MPO、抗 PR3、抗 LF 阳性,其中以抗 MPO 为主。由此表明,当出现相关荧光模型的 ANCA 结果时,可以推测其最有可能的靶抗原,在一定程度上有助于疾病的诊断,但这存在很大风险,毕竟本研究所测的 6 种靶抗原抗体均会出现在目前临床应用较多的两种荧光模型(P-ANCA、C-ANCA)中,对于临床并不关注的 A-ANCA,也有 4 种靶抗原抗体出现在这种荧光模型中,这可能与荧光模型判读人员的主观认知有关,也可能与试剂生产商固定中性粒细胞时靶抗原分布的特点不均一有关,因

此,荧光模型结果并不具有特异性,对疾病诊断的价值有限。

为了研究单一自身抗体阳性与荧光模型间的关系,排除其他自身抗体的影响,本研究进行了进一步的统计,从表 2 可以看出,单纯抗 MPO、抗 BPI、抗 LF、抗 EL 阳性时荧光模型以 P-ANCA 为主,分别占 84.73%、58.62%、82.35%、90.91%,明显高于其他荧光模型,差异有统计学意义($P<0.05$),即抗 MPO、抗 BPI、抗 LF、抗 EL 与 P-ANCA 有关;单纯抗 PR3 阳性时,荧光模型以 C-ANCA 为主,占 58.18%,明显高于其他荧光模型,差异有统计学意义($P<0.05$),即抗 PR3 与 C-ANCA 有关。以上研究结果高于罗清等^[14]的研究,这是由于去除了其他抗体影响的结果,其他抗体的出现会导致 P-ANCA 荧光模型,两种荧光模型混合在一起会引起 C-ANCA 的误判,极易判读为 P-ANCA 或 A-ANCA。临床上 PR3-ANCA 与 GPA 相关^[15],由于抗 PR3 与 C-ANCA 的相关性较高,因此 C-ANCA 对 GPA 预测价值较高。抗 MPO 与 P-ANCA 相关^[16],ANCA 虽不是诊断显微镜下多血管炎(MPA)的金标准试验,但大多数 MPA 患者在诊断时 P-ANCA(65%~90%)呈阳性^[17],因此 P-ANCA 对 MPA 诊断有一定的指向意义,但仅依据荧光模型进行诊断仍有一定风险,毕竟仍有部分靶抗体会出现 C-ANCA、P-ANCA。此外,ANCA 荧光模型检测阳性还可出现于系统性红斑狼疮、间质性肺炎、类风湿关节炎和甲状腺功能亢进等疾病^[18-20],因此,仅依据荧光模型进行疾病诊断特异度不佳,特异性靶抗原抗体检测才能对疾病诊断提供更加精准的实验诊断依据。

另外,本研究中 97 例荧光模型检测阳性的病例所有靶抗原抗体检测结果均为阴性,这是由于可能存在靶抗原抗体未进行检测的情况,可溶酶体抗体是 ANCA 的另一重要靶向抗体^[21],但在本研究未进行检测,因此可能造成靶抗体漏检。

总之,ANCA 荧光模型与其抗体谱之间的对应关系特异性较差,P-ANCA、C-ANCA、A-ANCA 对应的抗体主要为抗 MPO、抗 PR3、抗 MPO;P-ANCA 主要对应抗 MPO、抗 EL、抗 LF,C-ANCA 主要对应抗 PR3,A-ANCA 主要对应抗 BPI、抗 LF,ANCA 荧光模型检测结果所提供的信息有限,对于疾病诊断最好依据靶抗体,再结合影像学、病理学检测结果进行联合诊断。

参考文献

[1] BINDA V, MORONI G, MESSA P. ANCA-associated vasculitis with renal involvement[J]. J Nephrol, 2018, 31(2): 197-208.

[2] MARRA A M, BARILARO G, VILLELLA V, et al. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA) and PRES: a case-based review of literature in ANCA-associ-

ated vasculitides[J]. Rheumatol Internat, 2015, 35(9): 1591-1595.

[3] ABU-FREHA N, BADARNA W, SIGAL-BATIKOFF I, et al. ASCA and ANCA among Bedouin Arabs with inflammatory bowel disease, the frequency and phenotype correlation[J]. BMC Gastroenterol, 2018, 18(1): 153.

[4] HUANG S, SHEN Q, YANG R, et al. An evaluation of the 2010 histopathological classification of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis: a Bayesian network meta-analysis [J]. Internat Urol Nephrol, 2018, 50(10): 1853-1861.

[5] VAN BEERS J, VANDERLOCHT J, ROOZENDAAL C, et al. Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) by indirect immunofluorescence[M]. //HOUEN G. Autoantibodies. New York: Humana Press, 2019: 47-62.

[6] 张秀琴. 抗中性粒细胞胞质抗体 抗髓过氧化物酶 抗蛋白酶 3 在系统性血管炎和其他自身免疫病中的临床意义[J]. 实用医技杂志, 2017, 24(5): 478-480.

[7] BINDA V, MORONI G, MESSA P. ANCA-associated vasculitis with renal involvement[J]. J Nephrol 2018, 31(2): 197-208.

[8] RAMIREZ G A, MANFREDI A A. Pathogenic role of ANCA in small vessel inflammation and neutrophil function[M]//DAMMACCO F, RIBATTI D. Systemic vasculitides: Current status and perspectives. Berlin: Springer, 2016: 43-50.

[9] VANDERLOCHT J, VAN BEERS J, LIMBURG P C, et al. Antigen-specific detection of autoantibodies against myeloperoxidase (MPO) and protein ase 3 (PR3)[M]//HOUEN G. Autoantibodies. New York: Humana Press, 2019: 153-176.

[10] BELEM J M, SAVIOLI B, DE SOUZA A W. Search for autoantibodies in systemic vasculitis; is it useful? [M]//DAMMACCO F, RIBATTI D. Systemic vasculitides: Current status and perspectives. Berlin: Springer, 2016: 29-41.

[11] FENG Z, LIU P, LI Z Y, et al. Clinical relevance of anti-PR3 capture ELISA in diagnosing Wegener's granulomatosis[J]. J Clin Lab Anal, 2008, 22(1): 73-76.

[12] ELENA C, JULIANE M, BERNHARD H. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA): Recent methodological advances-Lead to new consensus recommendations for ANCA detection[J]. J Immun Meth, 2018, 456: 1-6.

[13] 谭立明, 焦安君, 冯晓晶, 等. 抗中性粒细胞胞浆抗体检测对系统性血管炎的临床价值[J]. 检验医学, 2018, 33(2): 101-105.

[14] 罗清, 鞠北华. 18 258 例抗中性粒细胞胞浆抗体检测的临床分析[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(2): 223-226.

[15] SCHREIBER A, CHOI M. ANCA-associated vasculitis and the mechanisms of tissue injury[M]//DAMMACCO F, RIBATTI D. Systemic vasculitides: Current status and perspectives. Berlin: Springer, 2016: 141-158.

[16] NOONE D, HEBERT D, LICHT C. Pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitis-a role for complement[J]. Pediat Nephrol, 2018, 33(1): 1-11.

[17] SUWANCHOTE S, RACHAYON M, RODSAWARD P, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and their clinical significance[J]. Clin Rheumatol, 2018, 37(4): 875-884.

[18] NISHIMURA S, NAKAO K, TAKEDA M, et al. Anti-thyroid drug-associated MPO-ANCA-positive tubulointerstitial nephritis in a type 2 diabetes patient: a case report[J]. CEN Case Rep, 2017, 6(1): 22-28.

[19] 谭少珍. 抗甲状腺药物引起的 ANCA 相关性血管炎的研究进展[J]. 现代医院, 2018, 18(11): 1628-1630.

[20] 汪海玥, 谷慧敏, 杨云娇, 等. 类风湿关节炎合并 ANCA 相关性血管炎 5 例临床特点分析[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(10): 1448-1451.

[21] PESCHEL A, BASU N, BENHARKOU A, et al. Autoantibodies to hLAMP-2 in ANCA-negative pauci-immune focal necrotizing GN[J]. J American Soc Nephrol, 2014, 25(3): 455-463.

(收稿日期: 2019-01-18 修回日期: 2019-04-10)

(上接第 1971 页)

[13] LU B, WANG D, ZHOU H, et al. Distribution of pilus islands and alpha-like protein genes of group B Streptococcus colonized in pregnant women in Beijing, China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(6): 1173-1179.

[14] 沈定树, 周雪艳. 无乳链球菌的研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2008, 20(5): 518-519.

[15] 闫津津, 王子璇. 孕 35~37 周女性无乳链球菌携带状况及不同方法检出情况分析[J]. 中国药物经济学, 2017, 12(6): 112-114.

[16] 胡利春, 邹洁洁, 陈海燕. 晚期孕妇生殖道感染无乳链球菌与新生儿感染的相关性研究[J]. 中国微生物学杂志, 2014, 26(7): 836-838.

[17] 胡发龙. 孕晚期女性无乳链球菌感染与耐药性情况及对新生儿的影响[J]. 中国微生物学杂志, 2016, 28(5): 598-600.

[18] 杨淋, 赵德军. 某地区 1 082 例孕妇生殖道无乳链球菌筛查及耐药性分析[J]. 中国现代医药杂志, 2016, 18(2): 90-91.

[19] 张树琛, 王杉, 朱凤霞, 等. B 群链球菌显色培养基在孕产妇 B 群链球菌筛查中的性能评价[J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(5): 680-683.

[20] 胥志超, 张波, 钟婉莹, 等. 无乳链球菌毒力基因的分布及其与耐药性和 MLST 的关系[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(11): 1216-1220.

[21] 卫叶林, 陈航列. 本院孕妇生殖道无乳链球菌带菌感染情况和耐药性分析[J]. 中国乡村医药, 2018, 35(1): 41-42.

(收稿日期: 2019-01-12 修回日期: 2019-04-04)