

0.997 9,表明两台仪器间具有良好的相关性。从 40 例健康体检者的检测结果分析,其参考个体符合厂家提供的参考区间的比率 $R(\%)=95\%$,说明厂家推荐的参考区间适用。

通过对 Stago STA-R 全自动血凝仪的性能评价,初步确定该仪器采用免疫比浊法检测血浆 D-二聚体具有良好的分析性能,其正确度、不精密度、携带污染率、抗干扰性、线性范围、相关性等均符合质量目标要求,推荐的参考区间也适用,可以满足临床检测要求。

参考文献

[1] NCCLS. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.

[2] NCCLS. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.

[3] NCCLS. EP7-A Interference testing in clinical chemistry: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.

[4] NCCLS. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative analyti-

cal methods: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.

[5] NCCLS. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.

[6] NCCLS. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.

[7] 毕波,吕元. 定量检测系统的方法学性能验证实验结果的评价[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(12): 1332-1335.

[8] 曾秋丽,李明. D-二聚体临床应用价值的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1203-1204.

[9] 周静,孙家瑜,孙加冠,等. 五种 D-二聚体检测方法用于排除可疑静脉血栓栓塞症的临床评价[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(6): 1078-1081.

[10] 许小英,于海涛,周存敏,等. 某型号全自动血凝分析仪的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11): 1361-1362.

(收稿日期: 2012-11-19)

• 检验仪器与试剂评价 •

4 种检测试剂对 350 例临床标本 ENA 多肽抗体谱检测结果分析

刘 春[△], 马 云, 王 彬
(深圳市人民医院, 广东深圳 518020)

摘要:目的 通过 4 种检测试剂对 350 例临床标本 ENA 多肽抗体谱检测结果的对比,探讨最佳检测方案。方法 选取 2012 年 1~6 月,在深圳人民医院、北大深圳医院肾内科、风湿免疫科门诊及住院的患者 ANA 阳性(IIF 法),并疑似自身免疫性疾病的患者,共 350 例,其中男 142 例,女 208 例,年龄 18~70 岁,平均 46.5 岁。采用 4 种不同检测试剂对上述患者血清进行检测。结果 350 例临床标本中,4 种试剂检出的阳性标本数分别为:试剂 1 阳性率为 62.9%(220/350);试剂 2 阳性率为 63.7%(223/350);试剂 3 阳性率为 65.7%(230/350);试剂 4 阳性率为 45.1%(158/350),差异有统计学意义($P<0.05$);4 种试剂一致性最高的为 SSB,83.3%,一致性最低的为 Scl-70,45.5%。结论 4 种检测试剂对这组抗体检测结果均有不一致的情况出现,如果不能对 ENA 自身抗体谱的抗体特征充分了解以及应用多种检测试剂联合互相验证、互相补充势必出现对这组抗体检测结果的错误判断,导致为数不少的患者被误诊、漏诊。

关键词:实验室技术和方法; ENA 多肽抗体谱; 敏感性与特异性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0604-03

ENA 多肽抗体谱是指不含 DNA 和组蛋白,但可被盐水提取的可溶性核抗原的一类核蛋白的总称,主要成分为核酸和蛋白质。ENA 抗体的出现是自身免疫性结缔组织疾病诊断的主要血清学指标,其抗体的存在和滴度通常与疾病的活动性不明显相关,因此它并不代表疾病的严重程度,而常常做为回顾性诊断的重要依据^[1-2]。常用的检测 ENA 抗体的方法有 IBT, ELISA, CIE 及 ID 等,近几年在 IBT 的基础上又区分出斑点印迹、传统免疫印迹两种检测模式的试剂。不同的抗原、不同的检测试剂,会导致不同的检测结果。本文通过两种斑点印迹试剂、一种 ELISA 法试剂和一种传统免疫印迹试剂,四种检测试剂对 350 例临床标本的检测结果进行分析、对比,探讨最佳检测方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1~6 月在深圳人民医院、北大

深圳医院肾内科、风湿免疫科门诊及住院的患者 ANA 阳性(IIF 法),并疑似自身免疫性疾病的患者,共 350 例,其中男 142 例,女 208 例,年龄 18~70 岁,平均 46.5 岁。留取上述患者的空腹静脉血,取血清,体积不少于 150 μ L,排除溶血和高脂血标本, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 方法 用 4 种试剂对抗 ENA 抗体进行检测,包括 UIRNP、Sm、SSA-52、SSB、Scl-70、JO-1、rRNP 7 种。试剂 1 为欧蒙医学实验诊断有限公司生产的抗 ENA 抗体 IgG 检测试剂盒(斑点印迹)。试剂 2 为深圳伯劳特生物制品有限公司提供的风湿病自身抗体检测试剂盒(斑点印迹)。试剂 3 为美国 INOVA, Diagnostics, Inc 公司生产的 ELISA 检测试剂盒。试剂 4 为深圳伯劳特生物制品有限公司提供的风湿病自身抗体检测试剂盒(传统免疫印迹)。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计

[△] 通讯作者, E-mail: 13651407949@126.com.

数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,并计算方法一致性 *Kappa* 值。

2 结 果

2.1 350 例 ANA(IIF 法)阳性标本的核型 颗粒型占 67.1% (235/350)、核均质型占 17.1% (60/350)、核仁型占 7.14% (25/350)、核点型和着丝点型占 8.57% (30/350)。

2.2 4 种试剂检测一致性比较 最高的是 SSB,一致性为 83.3%,最低的是 Scl-70,一致性为 45.5%,见表 1。U1RNP:共计 35 例 ELISA 阳性,传统免疫印迹阴性的标本。35 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳性 8 例,阴性 15 例,其余 12 例标本,试剂 1 出现 5 份阳性,试剂 2 出现 7 份阳性。Sm:共计 6 例 ELISA 阳性,传统免疫印迹阴性的标本。6 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳性 3 例,阴性 1 例,其余 2 例标本,试剂 1 出现 1 份阳性,试剂 2 出现 1 份阳性。SSA-52:共计 25 例 ELISA 阳性,免疫印迹阴性的标本。25 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳性 8 例,阴性 12 例,其余 5 例标本,试剂 1 出现 2 份阳性,试剂 2 出现 3 份阳性。SSB:共计 12 例 ELISA 阳性,传统免疫印迹阴性标本。12 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳

性 2 例,阴性 7 例,其余 3 例标本,试剂 1 出现 1 份阳性,试剂 2 出现 2 份阳性。Scl-70:共计 12 例 ELISA 阳性,传统免疫印迹阴性标本。12 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳性 5 例,阴性 5 例,有 2 例标本,试剂 1 出现 1 份阳性,试剂 2 出现 1 份阳性。JO-1:共计 5 例 ELISA 阳性,传统免疫印迹阴性标本。5 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳性 1 例,阴性 2 例,有 2 例标本,试剂 1 出现 1 份阳性,试剂 2 出现 1 份阳性。rRNP:共计 10 例 ELISA 阳性,传统免疫印迹阴性标本。10 例标本中,两种斑点印迹试剂共同阳性 1 例,阴性 6 例,有 3 例标本,试剂 1 出现 2 份阳性,试剂 2 出现 1 份阳性。

2.3 4 种试剂检测阳性标本数 见表 2,由大到小依次为试剂 3、试剂 2、试剂 1、试剂 4,最高的阳性率为 65.7% (230/350),最低阳性率为 45.7% (158/350)。前三种试剂阳性率明显高于后一种试剂,符合 ELISA 法、免疫印迹法与对流免疫电泳法检测抗 ENA 抗体的比较中,ELISA 法检测敏感性最高的相关文献报道^[5],差异有统计学意义 ($P < 0.05$);各单项中,尤以 U1RNP、Scl-70、JO-1,这 3 项中前 3 种试剂阳性率明显高于后一种试剂,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 4 种试剂检测结果一致性比较

ENA 抗体	U1RNP	Sm	SSA-52	SSB	Scl-70	JO-1	rRNP
结果一致例数(<i>n</i>)	75	34	115	50	10	10	32
总例数(<i>n</i>)	110	40	140	62	22	15	42
总符合率(%)	68.2	82.5	82.1	83.3	45.5	66.7	76.2

表 2 350 例标本 ENA 多肽抗体谱检测结果 [*n*(%)]

<i>n</i>	U1RNP	Sm	SSA-52	SSB	Scl-70	JO-1	rRNP
试剂 1	220(62.9)	39(11.1)	128(36.5)	55(15.7)	19(5.42)	14(4.00)	38(10.8)
试剂 2	223(63.7)	38(10.9)	130(37.1)	57(16.2)	18(5.14)	14(4.00)	36(10.3)
试剂 3	230(65.7)	40(11.4)	140(40.0)	62(17.8)	22(6.28)	15(4.28)	42(12.0)
试剂 4	158(45.1)	34(9.7)	115(32.9)	50(14.3)	10(2.85)	10(2.85)	32(9.14)

3 讨 论

ENA 是可提取核抗原总称,属非组蛋白的核蛋白,为酸性蛋白抗原。依赖细胞功能的不同状态存在于细胞核和细胞浆内,由许多小分子 RNA 与各自对应的特定蛋白质组成的核糖蛋白颗粒,分子中不含 DNA。主要功能是参与细胞内 DNA 的复制、转录以及蛋白的翻译合成^[2]。不同的自身免疫性疾病可产生不同的抗 ENA 抗体,因此抗 ENA 抗体的检测为自身免疫系疾病的协助诊断、鉴别诊断、疗效观察提供了重要依据^[3]。ENA 抗体的检测以前常采用对流免疫电泳法(CIE)和免疫双向扩散法(ID)法,随着分子生物学和基因工程技术的飞速发展和应用,免疫印迹技术(IBT)和酶联免疫测定法(ELISA)被较多应用^[4],而在免疫印迹技术的基础上又衍生出两种检测方法:斑点印迹和传统免疫印迹。传统免疫印迹是在抗原不同表位,从分子水平识别各种抗体所作用的抗原在蛋白多肽分子量上的差别,从抗原的蛋白多肽水平上识别不同抗核抗体的方法。EISA 和斑点印迹方法则建立在基因重组抗原的基础上,因此非常依赖于抗原制备的纯度,抗原纯化程度往往影响其检测的特异性^[5]。

抗 U1RNP 抗体:抗 U1RNP 抗体是混合性结缔组织病(MCDT)的重要血清学特征。U1RNP 是 U1RNA 和蛋白质组成,U1RNP 抗体所针对的主要多肽表位在 Mr73 000、Mr32 000和 Mr17 500 以及 Mr29 000/Mr28 000 多肽上。其中以 Mr73 000 或者 73 000 和(或)32 000、17 500 的组合与 ID 法的符合率较高,对判断抗 U1RNP 抗体最特异^[6]。本研究四种检测试剂一致性为 68.2%,偏低的原因可能为:U1RNP 抗体最具多态性,4 个抗原表位可以不同排列组合的连接,也说明在自身免疫中是多克隆、多位点的。采用部分抗原表位连接会出现假阴性,而连接抗原表位过多会出现假阳性。

抗 Sm 抗体:Sm 抗体是诊断系统性红斑狼疮(SLE)的特异性指标。在 SLE 中阳性率为 20%~30%。它和 U1RNP 属于同一分子复合物中的不同位点,因此常与 U1RNP 抗体共存^[2]。由 5 个 URNA(U1、2、4、5、6RNA)和多肽组成,抗原表位在 Mr29 000、Mr28 000 和 Mr13 500 多肽上,从与 ID 法检测结果所对应的多肽条带来看,以 28 000、29 000、13 500 三条带的阳性符合率最高。而 Mr29 000、Mr28 000 则与 U1RNP 抗体存在交叉反应,并非是 Sm 抗体的标记条带^[4,6]。本研究

四种检测试剂一致性为 82.5%。试剂 1 单独出现的一份阳性标本中,试剂 2 和试剂 3 均为阴性,线性印迹则仅出现 Mr13 500 阳性,说明试剂 1 中 Sm 抗原的构建是单以 Mr13 500 为主,也会造成假阳性结果。

抗 SSA 抗体;抗 SSA/SSB 抗体为干燥综合征(SS)主要指标。SS 是一种自身免疫病,主要侵犯外分泌腺体,其中泪腺和唾液腺受累最为常见,形成干燥性角膜炎和口腔干燥症,同时也可累及其他器官形成多种临床表现^[7]。国内张乃峥等报道发病率为 0.33%~0.77%^[8]。SSA 抗原组分中最重要的是分子质量为 52×10^3 和 60×10^3 的两种蛋白,为抗体识别的靶点。 52×10^3 与 60×10^3 在 SS 及 SIE 患者血清中出现的频率不同。SLE 倾向于抗 60×10^3 抗体阳性,而 SS 倾向于抗 52×10^3 抗体阳性。线性印迹由于采用兔胸腺丙酮粉为抗原,而分子质量为 60 000 多肽上的 SSA 抗原为天然构象表位,因此线性印迹并不能检出抗 SSA-60 抗体^[9-10]。本研究四种检测试剂一致性为 82.1%。

SSB 抗原属于 SnRNP,抗原表位在分子质量为 45 000、47 000 和 48 000 多肽上,其中分子质量为 45 000、47 000 是检测抗 SSB 抗体最主要的蛋白条带^[4,6]。目前各种检测方法中抗 SSB 抗体总是和抗 SSA 抗体伴随出现,未见单独出现的纪录。对临床而言,抗 SSB 抗体在 SS 的诊断中较 SSA 抗体更为特异^[11]。本研究四种检测试剂一致性为 83.3%。

DNA 拓扑异构酶-1,抗 Scl-70 抗体是硬化症(SSc)标记性抗体。在 SSc 中阳性率为 25-75%,而且抗 Scl-70 抗体阳性者较阴性者肺间质变的发生增加 10 倍^[11]。本研究四种检测试剂一致性为 45.5%。偏低的原因可能为:(1)从抗 Scl-70 抗体检测结果所对应的多肽条带来看,除了分子质量为 86 000、70 000 条带均阳性之外,在这两条带之间还会出现分子质量为 75 000、78 000 条带均阳性,则四种试剂检测一致性最高。不同的试剂采用不同的四种蛋白多肽组合,导致检测结果的差异。(2)抗 U1RNP 抗体有一个多肽表位在 Mr73 000,重组抗原构建过程中不排除混入这一序列,则导致假阳性结果。

JO-1 是组氨酰 tRNA 合成酶,抗 JO-1 抗体为皮肌炎和多发性肌炎(PM/DM)的标记抗体,在 PM/DM 中阳性率为 25%,在合并肺间质变的 PM/DM 患者中抗 JO-1 抗体阳性率可以高达 70%^[2]。在多肽抗体检测中,抗 JO-1 抗体显示为抗分子质量为 55 000 条带,而在部分肺纤维化的患者中常出现抗分子质量为 55 000 条带合并抗分子质量为 52 000 条带阳性^[11]。本研究四种检测试剂一致性为 66.7%。偏低的原因:差异化的检测结果均出现在低值标本上,因此对低值标本的检测结果应反复确认。

抗 rRNP 抗体是诊断系统性红斑狼疮(SLE)的特异性指标,在 SLE 中阳性率为 10%~30%。抗 rRNP 抗体常与 dsDNA 相关并且伴有 SLE 患者肾脏损害^[12]。抗原表位在大亚基上的 Mr38 000,Mr16 500 和 Mr15 000 上,从与 ID 法检测结果所对应的多肽条带来看,以 38 000、16 500、15 000 3 条带都阳

性符合率最高^[4,6]。本研究中 4 种检测试剂一致性为 76.2%。

随着风湿免疫疾病研究的不断深入,ENA 多肽抗体谱的检测已经纳入到常规检测中来,而使用不同的抗原构建、不同的检测方法学、不同的检测模式,都将使检测结果存在一定差异。检测试剂在个别关键指标上检测的一致性略差,更加提示临床检验中对某项异常检测结果必要时该应用多种方法联合加以互相验证、互相补充。采用高敏感性试剂初筛联合高特异性的试剂复核确认,互相弥补,综合评判,确保检测结果可靠性的同时提高风湿免疫疾病的实验室诊断水平,使之更好的配合临床诊断。当然任何时候都不能孤立地看待某个检测或者检查结果。而应将其置于临床指征或病情中综合分析和全面衡量,以免本末倒置,这也是临床医疗应遵循的基本原则。

参考文献

- [1] 黄文辉,陶怡. ELISA 法和免疫印迹法检测抗 ENA 抗体的比较[J]. 广州医学院学报,1999,27(3):27-29.
- [2] 肖征宇. 抗核抗体谱检测在风湿性疾病中的意义[J]. 实用医学杂志,2002,18(2):121-122.
- [3] 刘军锋,贾克刚,刘运德. 免疫印迹法检测在自身免疫性疾病 ENA 多肽抗体谱及临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(7):669-670.
- [4] 兰庆萍. 免疫印迹技术检测抗 ENA 抗体谱的应用现状及技术进展[J]. 现代检验医学杂志,2003,18(5):22-24.
- [5] 黄文辉,陶怡. ELISA 法,免疫印迹法与对流免疫电泳法检测抗 ENA 抗体的比较[J]. 中华风湿病学杂志,1999,3(2):92-94.
- [6] 陆瑜,叶萍,沈霞,等. 免疫印迹法检测可提取核抗原多肽抗体谱的临床应用分析[J]. 上海医学检验杂志,2002,17(4):227-229.
- [7] 颜宏华,张新伟,解茂阳,等. 九项自身抗体联合检测在系统性红斑狼疮诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(19):2207-2209.
- [8] 张乃峥,施全胜. 原发性干燥综合征的流行病学调查[J]. 中华内科杂志,1993,32(8):522-523.
- [9] 李倩,高扬,倪安平,等. 人干燥综合征 A 抗原克隆表达与重组蛋白及其临床应用研究[J]. 标记免疫分析与临床,2008,15(2):99-105.
- [10] Itoh Y, Itoh K, Frank MB, et al. Autoantibodies to the Ro/SSA autoantigen are conformation dependent. II: Antibodies to the denatured form of 52 kD Ro/SSA are a cross reacting subset of antibodies to the native 60 kD Ro/SSA molecule[J]. Autoimmunity, 1992,14(2):89-95.
- [11] 高玉洁,郭鹤,赵高阳,等. 免疫印迹法检测 ENA 及其在自身免疫性疾病中的诊断价值分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(5):427-429.
- [12] Kiss E, Shoenfeld Y. Are anti-ribosomal P protein antibodies relevant in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2007,32(1):37-46.

(收稿日期:2012-11-23)