

• 临床检验研究论著 •

免疫印迹法检测抗核抗体谱比对分析

蒋跃根, 应 葳, 王峰来, 蔡秀玲, 李安生

(中国医学科学院皮肤病医院检验科, 江苏南京 210042)

摘 要:目的 比较抗核抗体谱-12S 检测(antinuclear antibody profile, ANA-12S)试剂盒和抗核抗体谱线性免疫分析法检测(antinuclear antibody spectrum linear immunoassay, IMTEC-ANA-LIA)试剂盒对血清抗核抗体谱(antinuclear antibody spectrum, ANAs)检测结果的一致性,从而验证 ANA-12S 检测 ANAs 的有效性。方法 收集于该院就诊的间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)检测抗核抗体(ANA)阳性患者标本 144 例,其中男 21 例,女 123 例;ANA 阴性患者标本 10 例,其中男 2 例,女 8 例。用 IMTEC-ANA-LIA 和 ANA-12S 分别进行 ANAs 检测。比较和分析两种方法所得的检测结果。结果 ANA 阳性标本中两者检测阳性率均为 100%,其中 ANA-12S 法检测阳性项目占 28.8%(497/1 728),IMTEC-ANA-LIA 法检测阳性项目占 27.7%(479/1 728),差异无统计学意义($\chi^2=0.46, P>0.05$),ANA-12S 法与 IMTEC-ANA-LIA 法检测结果总符合率为 97.1%, $Kappa$ 值为 0.929;ANA 阴性标本中两者检测的阴性率均为 70%(7/10),其中 3 例系统性红斑狼疮(SLE)疑似患者抗 SmD1 阳性,阴性项目占 97.5%(117/120),总符合率 100%, $Kappa$ 值为 1。结论 ANA-12S 与 IMTEC-ANA-LIA 的检测结果具有较高符合率和准确性;ANA-12S 试剂盒可以作为快速、简便、经济的检测方法应用于自身抗体的检测。

关键词: 结缔组织疾病; 自身抗体; 抗体,抗核; 免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)01-0039-03

Comparative analysis of antinuclear antibody spectrum by immunoblotting assays

Jiang Yuegen, Ying Wei, Wang Fenglai, Cai Xiuling, Li Ansheng

(Department of Clinical Laboratory, Dermatological Hospital of Chinese

Academy of Medical Sciences, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: Objective To compare the consistency of serum antinuclear antibody spectrum detection by antinuclear antibody profile (ANA-12S) and antinuclear antibody spectrum linear immunoassay (IMTEC-ANA-LIA), which verifies the effectiveness of ANA-12S assay for detecting antinuclear antibody spectrum. **Methods** 144 antinuclear antibody positive specimens detected by indirect immunofluorescence (IIF) were collected from our hospital including 21 males and 123 females, and 10 antinuclear antibody negative specimens were also collected including 2 males and 8 females. The antinuclear antibody spectrum results were then compared and analysed between the IMTEC-ANA-LIA and ANA-12S assays. **Results** The positive rate of ANAs by both assays in antinuclear antibody positive specimens were 100%. Positive projects accounted for 28.8% (497/1728) by ANA-12S assay, and accounted for 27.7% (479/1728) by IMTEC-ANA-LIA assay. There were no statistically significant differences ($\chi^2=0.46, P>0.05$). The total coincident rate of the positive results by ANA-12S assay compared to IMTEC-ANA-LIA was 97.1% and the $Kappa$ value was 0.929. The negative rate of ANAs by both assays in antinuclear antibody negative specimens was 70% (7/10). Three specimens from SLE suspects were detected SmD1 antibodies positive and the negative projects accounted for 97.5% (117/120). The total coincident rate of the negative results was 100% and the $Kappa$ value was 1. **Conclusion** There is a high coincident rate and accuracy between the IMTEC-ANA-LIA and ANA-12S assays. It is a simple, fast and economical method for detecting antinuclear antibody spectrum by ANA-12S assay.

Key words: connective tissue diseases; autoantibodies; antibodies, antinuclear; immunoblotting

自身免疫性结缔组织病(autoimmune connective tissue disease, ACTD)的诊断除依赖于临床症状、体征及相应辅助检查外,很大程度上取决于临床免疫学实验室诊断,特别是自身抗体的检测结果。该类患者血清中可检测到多种自身抗体,且不同病种往往具有其特征性的一种或几种标志性自身抗体,自身抗体在该类疾病的诊断、疗效监测和预后判断中发挥重要作用^[1]。自身抗体的检测方法很多,凡能用于检测抗体的方法均可用于自身抗体的检测。常用的检测方法有间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence method, IIF)、免疫印迹法(immunoblot assay, IB)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫分析法(radio immunoassay, RIA)、乳胶凝集法(latex agglutination, LA)等。由于免疫

印迹法方法在同一载体上作多项特异抗原分析,具有灵敏度高、特异性强、操作简便的特点,是目前临床实验室广泛采用检测抗核抗体谱的方法^[2]。

1 资料和方法

1.1 一般资料 为了对足够的自身抗体血清进行对比分析。(1)收集于本院就诊的已确诊和待诊患者新鲜血样 144 例,包括红斑狼疮(lupus erythematosus, LE)107 例、干燥综合征(sjogren syndrome, SS)21 例、硬皮病(scleroderma)7 例、混合性结缔组织病(mixed connective tissue disease, MCTD)5 例以及皮肌炎(dermatomyositis, DM)4 例,其中男 21 例,女 123 例,年龄 12~73 岁。抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)检测阳性(IIF 法,滴度大于 1:80),IMTEC-ANA-LIA 检测抗核抗

体谱(antinuclear antibody spectrum, ANAs)至少 1 项阳性,再以 ANA-12S 检测上述血样。(2) ANA 阴性患者血样 10 例(IIF 法,滴度小于 1 : 40),其中男 2 例,女 8 例,年龄 8 ~ 54 岁。其中 3 例 SLE 疑似患者,IMTEC-ANA-LIA 检测抗 SmD1 抗体阳性。血清标本于 -86℃ 保存 3 个月。

1.2 方法 ANA 检测方法为 IIF,试剂盒来自于美国 SCI-MEDX CORPORATION 公司,底物片为 Hep-2 细胞。荧光显微镜型号为日本产尼康 55I 型正置荧光显微镜。

ANAs 检测方法为线性免疫印迹法(lineimmunoassay, LIA),比较抗核抗体谱-12S 检测(antinuclear antibody profile, ANA-12S)试剂盒来自于深圳市亚辉龙生物科技有限公司;抗核抗体谱线性免疫分析法检测(antinuclear antibody spectrum linear immunoassay, IMTEC-ANA-LIA)试剂盒来自于德国 IMTEC 公司。2 家试剂条含有相同的 12 个测定项目:抗核小体抗体、抗双链 DNA(dsDNA)抗体、抗组蛋白抗体、抗 SmD1 抗体、抗 U1-snRNP 抗体、抗 SSA/ Ro 60 kD 抗体、抗 SSA/ Ro 52 kD 抗体、抗 SS-B/La 抗体、抗 ScL70 抗体、抗 CENP-B 抗体、抗 J0-1 抗体和抗 P0 抗体。整个操作过程严格按照试剂盒操作说明书进行。

1.4 统计学处理 所有数据录入 Excel 中,建立数据库,以 SPSS15.0 软件进行统计分析。以 IMTEC-ANA-LIA 为比对方法,ANA-12S 与其进行一致性检验,Kappa 值大于 0.75 表示高度一致。率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ANAs 阳性率与阴性率 (1)用 ANA-12S 及 IMTEC-ANA-LIA 法对 ANA 阳性标本检测 ANAs,两者检测的阳性率均为 100%,其中 ANA-12S 共检出阳性项 497 项,占 28.8%(497/1 728),IMTEC-ANA-LIA 共检出阳性项 479 项,占 27.7%(479/1 728),两组差异无统计学意义($\chi^2 = 0.46, P > 0.05$)。(2)用 ANA-12S 及 IMTEC-ANA-LIA 法对 ANA 阴性标本检测 ANAs,两者检测的阴性率均为 70%(3/10),均检出阴性项 117,占 97.5%(117/120),其中 3 例 SLE 疑似患者抗 SmD1 阳性。

表 1 ANA-12S 法检测 ANAs 的性能*

项目	灵敏度	特异度	符合率	Kappa 值
抗 dsDNA 抗体	97.0	95.5	95.8	0.887
抗核小体抗体	95.0	97.6	97.2	0.889
抗 SmD1 抗体	98.5	94.9	96.5	0.930
抗 P0 抗体	94.3	97.8	96.5	0.925
抗组蛋白抗体	94.7	98.4	97.9	0.911
抗 U1-snRNP 抗体	95.0	94.2	94.4	0.866
抗 SSA/Ro 60 KD 抗体	98.2	85.3	95.1	0.861
抗 SSA/Ro 52 KD 抗体	96.6	94.7	95.8	0.913
抗 SSB/La 抗体	95.0	96.2	95.8	0.898
抗 ScL170 抗体	100.0	100.0	100.0	1.000
抗 CenpB 抗体	100.0	100.0	100.0	1.000
抗 J0-1 抗体	100.0	100.0	100.0	1.000
全部抗体	96.6	97.3	97.1	0.929

*:ANA 阳性,以 IMTEC-ANA-LIA 为比对方法。

2.2 重复性试验 对临床确诊为 SLE 的 1 例患者的标本进行检测。以 ANA-12S 重复检测 10 次。结果完全一致,即抗 dsDNA 抗体、抗 SmD1 抗体、抗 SSA/Ro 60 kD 抗体、抗 SSA/Ro 52 kD 抗体、抗 P0 抗体为阳性,其他抗体为阴性。

2.3 比对分析 以 IMTEC-ANA-LIA 为比对方法,评价

ANA-12S 与 IMTEC-ANA-LIA 检测结果的相关性。(1)对 ANA 阳性标本比对,见表 1。两种方法共检测 1 728 项,检测结果完全一致为 1 678 项,占 97.1%,检测结果完全不一致为 50 项,占 2.9%。各项 Kappa 值均大于 0.75,显示 ANA-12S 法与 IMTEC-ANA-LIA 法具有较高的一致性。其中抗 ScL170、抗 CenpB 和抗 J0-1 测定结果一致性最好,灵敏度、特异度、符合率均为 100%,Kappa 值为 1.0,其他 9 项检测的符合率均大于 90%。(2)对 ANA 阴性标本比对,见表 2。两种方法共检测 120 项,检测结果完全一致,灵敏度、特异度、符合率均为 100%,Kappa 值为 1.0。

表 2 ANA-12S 法检测 ANAs 的性能*

项目	灵敏度	特异度	符合率	Kappa 值
抗 dsDNA 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗核小体抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 SmD1 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 P0 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗组蛋白抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 U1-snRNP 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 SSA/Ro 60 KD 抗体	100.0	100	100.0	1.0
抗 SSA/Ro 52 KD 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 SSB/La 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 ScL170 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 CenpB 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
抗 J0-1 抗体	100.0	100.0	100.0	1.0
全部抗体	100.0	100.0	100.0	1.0

*:ANA 阳性,以 IMTEC-ANA-LIA 为比对方法。

3 讨 论

自身免疫性结缔组织病诊断标准之一就是检测出特异性或相关性自身抗体。许多自身免疫性疾病都伴有一种或多种特异性抗体。目前国内外实验室检测 ANA 最常用的初筛方法是 IIF 法,是检测自身抗体的金标准。它具有检测灵敏度高、操作方便,且能针对细胞核、细胞浆、细胞骨架、细胞周期等自身抗体,具有检测范围广等优点^[3]。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导致假阳性,基质中部分靶抗原分布不均,含量低,缺乏特异性抗体等原因也会导致假阴性结果^[4-5]。而 LIA 作为 ANAs 的特异性抗体确认实验中的一种,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,结果判读方便,一次可检测多种自身抗体,特异性高的优点^[6-7]。

本研究选择 IIF 检测 ANA 阳性标本 144 例,以及 ANA 阴性标本 10 例,比较 LIA 试剂盒 ANA-12S 和 IMTEC-ANA-LIA 检测 ANAs 的结果。ANA-12S 法和 IMTEC-ANA-LIA 法检测原理、检测项目、操作规程和结果判读几乎完全一样,反应后的膜条具有良好的稳定性,原始结果可以长期保存。研究结果显示,两者对 ANA 阳性标本的检测阳性率均为 100%,其中 ANA-12S 检测阳性项目占 28.8%,IMTEC-ANA-LIA 检测阳性项目占 27.7%,差异无统计学意义;两者对 ANA 阴性标本的检测阴性率均为 70%,阴性项目占 97.5%,结果完全一致。对 ANA 阳性标本比对,两种方法共检测 1 728 项,检测结果完全一致为 1 678 项,占 97.1%,检测结果完全不一致为 50

项,占 2.9%。各项符合率均大于 90%, $Kappa$ 值均大于 0.75,说明两者检测结果具有较好的一致性。其中抗 ScL170、抗 CenpB 和抗 J0-1 抗体检测结果的灵敏度、特异度、符合率均为 100%, $Kappa$ 值为 1.0,准确性很好。但由于阳性病例数少,抗 ScL170 抗体测定结果有 10 例阳性,阳性率为 6.9%,抗 CenpB 抗体和抗 J0-1 抗体测定结果各 1 例阳性,阳性率为 0.7%,其灵敏度的比对还有待进一步观察和研究予以完善。对 ANA 阴性标本比对,两种方法共检测 120 项,检测结果完全一致。灵敏度、特异度、符合率均为 100%, $Kappa$ 值为 1.0,准确性很好。其中两者均检出 3 例 SLE 疑似患者抗 SmD1 阳性。可能的解释是,由于大部分 SLE 患者中的 Sm 自身抗体直接和一个隐蔽的多肽结合,当使用整个 Sm 分子作抗原时,很难与之结合。SmD1 是最重要的 Sm 抗原,线性免疫印迹法以 SmD1 多肽序列(aa83~119)取代整个 Sm 分子作为抗原,可以将 SLE 患者的抗 Sm 抗体阳性检出率提高至 70%^[8-9]。所有抗 Sm 抗体阳性的患者抗 SmD1 抗体均阳性,而抗 Sm 抗体阴性的患者中有 61.4%的患者抗 SmD1 抗体阳性,而在抗 SmD1 抗体阴性患者中抗 Sm 抗体则均为阴性,进一步肯定了 SmD1 在整个 Sm 分子中的重要免疫学作用。因此线性免疫印迹法对 SLE 的早期诊断有重要的临床意义。

在 ANA-12S 检测结果中,抗 SmD1 抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 P0 抗体和抗核小体抗体的阳性率较高,分别为 47.2%、25.7%、36.1%和 15.2%,其余均为 SLE 标志性抗体。其中抗 SmD1 抗体与张永锋等^[10]报道的在 SLE 患者中的阳性率 47.7%接近。该研究认为,抗 SmD1 抗体阳性率远高于抗 Sm 抗体,在 SLE 的诊断中有更高的灵敏度。抗 dsDNA 抗体的水平与 SLE 疾病的活动程度相关,该抗体水平的动态测定为监控治疗提供了有效的实验室手段^[11]。抗组蛋白抗体的阳性率为 3.9%,其对于药物诱导红斑狼疮的诊断极为重要。抗 SSA/Ro 60 KD 抗体、抗 SSA/Ro 52 KD 抗体和抗 SSB/La 抗体的阳性率分别为 78.5%、60%和 29.2%。抗 SSA/Ro 抗体和抗 SSB/La 抗体是干燥综合征最常见的自身抗体,尤其是抗 SSB/La 抗体对诊断干燥综合征非常重要^[12]。抗 U1-snRNP 抗体阳性率为 30.6%,高滴度的抗 U1-snRNP 抗体可作为混合性结缔组织病标志性抗体,无论在疾病的活动期或是缓解期均可持续存在。抗 ScL170 抗体的阳性率为 6.9%,其几乎仅在进展性系统性硬化症(progressive systemic sclerosis, PSS)的患者中检出,是 PSS 标志性抗体。抗 J0-1 抗体阳性率为 0.7%,其对诊断多发性肌炎和皮肌炎具有特异性^[13]。因此,这些与疾病相关的自身抗体作为客观的血清学资料,有助于临床医师对疾病作出更准确的诊断、疗效监测和预后判断。

(上接第 38 页)

- [4] Assicot M, Gendrel D, Cabin H, et al. High serum, procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection[J]. Lancet, 2008, 341: 515-518.
- [5] American College of Chest Physicians, Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. CRIT Care MED, 2007, 40(6): 864-874.
- [6] Müller B, White JC, Nylen E, et al. Ubiquitous expression of the calcitonin-I gene in multiple tissues in response to sepsis[J]. J Clin

综上所述, ANAs 检测的临床应用,特别是近年来应用免疫印迹技术检测 ANAs,为特征性自身抗体提供了敏感度高、特异性强、重复性好、操作简便、快捷的检测手段,提高了检测阳性率,降低了漏检率。ANA-12S 法与 IMTEC-ANA-LIA 法检测结果具有较高的符合率, ANA-12S 免疫印迹检测试剂盒可以作为快速、简便、经济的检测方法应用于自身抗体的检测。

参考文献

- [1] 李本忠, 光辉, 陈家东. 抗核抗体谱在自身免疫性疾病中的临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(4): 260-262.
- [2] 王兰兰, 柳永和. 临床免疫学和免疫检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [3] 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]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(1): 71-81.
- [4] 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]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1212-1217.
- [5] 何蕊, 徐兰峰, 宋秀军, 等. 抗核抗体谱检测的临床诊断意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(9): 1017-1018.
- [6] 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]. 内科, 2008, 3(4): 546-547.
- [7] 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, 26(3): 340-347.
- [8] 张志斌, 陶娟, 朱锦英. 抗 SmD1 抗体在系统性红斑狼疮诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 265-267.
- [9] 段京明, 李茂胜, 李志军, 等. 抗 SmD1 抗体测定对系统性红斑狼疮的诊断意义[J]. 临床医学, 2006, 31(3): 255-256.
- [10] 张永锋, 郑毅. SmD1 抗体检测在系统性红斑狼疮诊断中的意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2007, 11(7): 397-401.
- [11] 王红, 金笛, 肖红霞. 自身抗体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, 2012, 33(22): 2795-2796.
- [12] 韦三华, 刘昕, 张婧, 等. 123 例干燥综合征患者自身抗体及免疫球蛋白和补体检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 648-652.
- [13] 邹敏, 李珉珉, 高尚宝, 等. 丙肝病毒感染患者血清抗核抗体与 IL-21 的检测[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(5): 471-472.

(收稿日期: 2013-10-21)

Endocrinol Metab, 2001, 86(2): 396-404.

- [7] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒血症定义及诊断的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(3): 321-324.
- [8] 胡如雪. 降钙素原(PCT)的临床应用价值[J]. 江西医学检验, 2005, 23(3): 244-259.
- [9] Mirjam CC, Dalana S, Roland B, et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia [J]. Am J Nespirat Critic Care Med, 2006, 174(1): 84-93.

(收稿日期: 2013-08-30)