

一定难度。现阶段实验室对结核的诊断主要依靠痰液涂片、结核分枝杆菌 DNA (TB-DNA) 检测、结核抗体及结核分枝杆菌培养。近年来一种诊断结核感染的免疫学新方法—— $\gamma$  干扰素释放分析 (IGRA) 逐渐被推广, 并应用于临床。TB-IGRA 原理是刺激机体, 使 T 淋巴细胞再次活化, 释放  $\gamma$  干扰素, 通过检测特异性抗原刺激  $\gamma$  干扰素的分泌后诊断结核感染。本院 2014 年开展此项目, 下面结合结核分枝杆菌相关  $\gamma$ -干扰素的定量检测结果探讨其在临床的应用。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 542 例患者, 其中确诊结核感染患者 512 例纳入结核组, 健康体检者 30 例纳入对照组, 经严格检查, 排除结核感染和患有其他疾病。结核感染按照《肺结核诊断和治疗指南》确诊<sup>[2]</sup>。两组研究对象基本资料比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

**1.2 仪器与试剂** TB-IGRA 试剂 (北京万泰生物药业股份有限公司)、采血管 (美国 BD 公司提供的无内毒素的肝素抗凝真空采血管)、加样器、温箱、台式离心机、THERMO MK3 酶标仪、RT-3100 洗板机等。

**1.3 方法** 在 2 h 内将采集的全血标本 (不低于 4 mL) 轻轻颠倒混匀后分装到“N”、“T”、“P”3 种培养管中 (每管 1 mL), 然后颠倒混匀放入 37 °C 温箱培养 (22 ± 2) h, 培养后的培养管以 3 000 ~ 5 000 r/min 离心 10 min, 取血浆进行 ELISA 检测。严格按作业指导书操作。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计数资料以率或构成比表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

结核组 TB-IGRA 阳性率明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 74.81, P < 0.05$ )。见表 1。

### • 个案与短篇 •

表 1 两组研究对象 TB-IGRA 阳性率比较

组别	n	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
对照组	30	1	29	3.33
结核组	512	390	122	76.17*
合计	542	391	151	72.14

\* :  $\chi^2 = 74.81, P < 0.05$ , 与对照组比较。

### 3 讨论

结核病属乙类传染病, 是严重危害人类健康的主要传染病之一, 而耐药药结核病的增多, 以及移民和流动人口导致结核病难以控制。因此, 结核病仍然是我国重点控制的主要疾病之一<sup>[3]</sup>。结核在人群中的传染源主要是结核病患者, 通过咳嗽、喷嚏、大笑、大声谈话等方式将含有结核分枝杆菌的微滴排到空气中而传播。而现有的诊断方法存在这样或那样的不足, 临床症状和影像学检查特征有助于疑似患者的发现, 但进一步诊断需要实验室确诊, IGRA 可用于肺结核的辅助诊断、非结核分枝杆菌引起的肺部疾病的鉴别诊断、肺外结核的辅助诊断、抗结核疗效的评估及结核分枝杆菌的潜伏感染等, IGRA 是实验室检测结核的一种较为实用的方法。

### 参考文献

[1] 刘佳文, 康丽军, 翁绳凤, 等. 干扰素体外释放酶联免疫法在结核病诊断中的价值[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33 (9): 600-603.  
 [2] 王荣堂, 陈春梅, 朱晓华, 等. 体外释放酶联免疫法检测结核杆菌  $\gamma$ -干扰素的实验研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(5): 1163-1164.  
 [3] 赵玉贞. 肺结核病区医护人员的职业感染及防护对策[J]. 菏泽医学专科学校学报, 2004, 16(1): 77-78.

(收稿日期: 2015-07-27)

## 对抗中性粒细胞胞浆抗体的理解

郭月丽, 梅序桥, 徐文鑫

(漳州卫生职业学院, 福建漳州 363000)

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.071

文献标识码: C

文章编号: 1673-4130(2016)03-0430-03

1982 年, 在节段性坏死性肾小球肾炎患者血清中, Davies 等首次发现一种 IgG 类性质的抗体, 而这类抗体的靶抗原就是中性粒细胞胞浆抗原, 又将其称为抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA)。1985 年, 在 Wegner 肉芽肿 (WG) 患者血清中, Vander 又发现其存在 ANCA, 他对 ANCA 与 WG 诊断的特异性给予肯定。从此以后, 许多学者致力于其他血管炎与 ANCA 的研究, 如显微镜下多动脉炎 (MPA)、Churg-Strauss 综合征 (CSS) 等, 他们发现 ANCA 与它们都有相关性, 故认为 ANCA 可能是原发性小血管炎的血清标记抗体。随着研究的不断深入, ANCA 在其他疾病中也被发现, 如类风湿关节炎 (RA)、溃疡性结肠炎 (UC)、特发性坏死性新月体性肾小球肾炎 (NCGN)、原发性胆汁性肝硬化 (PBC) 等。

### 1 ANCA 检测方法及其靶抗原的化学性质

间接免疫荧光法 (IIF) 是检测 ANCA 最早采用的方法, 也是临床上最常用的检测法。它是一种筛选试验, 常用的固定剂

是乙醇, 其次是甲醛及 Hep2 细胞。如前文所述, ANCA 主要是 IgG 型。它和抗核抗体谱一样, 是一类针对抗中性粒细胞胞浆抗原的自身抗体总称。中性粒细胞中的髓样颗粒蛋白是这类抗体作用的主要抗原成分。而对中性粒细胞中的髓样颗粒蛋白进行研究分析, 发现其主要的颗粒蛋白有两种, 一种是蛋白水解酶 3 (PR3); 另外一种为髓过氧化物酶 (MPO)。当然除了这两种主要成分, 还包括其他成分, 如乳铁蛋白、弹性蛋白酶、溶酶体、防御素、 $\beta$  葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶 G、 $\alpha$ -烯醇化酶、增加通透性杀菌蛋白 (BPI)、天青杀素、人溶酶体相关膜蛋白 2 (H-LAMP 2) 等。本文重点阐述前两种: 通过免疫荧光方法, 图形表现为 CANCA 的靶抗原, 主要为 PR3<sup>[1]</sup>, 约占 80%。其次还有 BPI、弹力蛋白、组织蛋白 G、天青杀素等<sup>[2]</sup>; 表达 PANCA 的靶抗原主要为 MPO, 其次是溶酶体、LF 及部分天青杀素、BPI 也有表现为 ANCA 的报道<sup>[3]</sup>。针对于上述对 ANCA 靶抗原的研究, 根据不同的靶抗原, ANCA 被分为不同

的亚型。

## 2 ANCA 分型、致病机制及疾病相关性

ANCA 通过 IIF 检测,其阳性荧光染色模型被分为两种类型,一种是胞浆型(CANCA);另外一种则是核周型(PANCA)。这两种类型在荧光显微镜下,呈现的结果不同:在中性粒细胞中,CANCA 呈现粗颗粒,表现为弥散分布,而中央较浓密;PANCA 则是不同的图形,其呈核周围云絮状染色,这样的图形和粒细胞特异性抗核抗体(GS-ANA)类似。IIF 检测 PANCA 的灵敏度为 80%~90%,特异度为 60%~80%。可因技术手段不同而影响实验结果<sup>[4]</sup>。近来有报道一种特殊类型的 ANCA,其表现为一种特殊的荧光谱,是一种更为弥散的胞浆荧光,学者们将它称之为非典型 ANCA(xANCA)。不同类型的 ANCA 常与不同的疾病有关联,又与疾病的活动性有关,它们可能在疾病缓解期,出现浓度下降,甚至消失。

**2.1 PR3-ANCA** PR3 主要是 CANCA 的抗原。在中性丝氨酸蛋白酶家族中,它是其中的一员,它由 228 个氨基酸组成,相对分子质量为  $27 \times 10^3$ 。PR3 作用于血管壁成分,如弹力蛋白及其他细胞外基质,作用的结局可将其进行降解及消化。CANCA 主要见于 WG(阳性率占 80%,且与病程、严重性和活动性有关),是其特异性抗体。80 年代,通过应用 IIF 进行检测发现 ANCA 对活动性 WG 诊断的灵敏度和特异度可高达 90%以上<sup>[5]</sup>,所以,环磷酰胺(CTX)治疗曾被一些学者建议在 ANCA 阳性,并有 WG 临床症状的患者中。随后一些研究表明,在组织病理证实的 WG 患者中,ANCA 灵敏度仅为 59%~69%<sup>[6]</sup>。但在诊断 WG 的特异度方面,ANCA 具有重要作用,表现其被用在 WG 的活动期和未应用皮质类固醇激素治疗的病例上。除此以外,有人发现 ANCA 滴度的改变,和 WG 疾病活动有一定的关联。例如 Jayne 等<sup>[7]</sup>报道 7 例用静脉注射免疫球蛋白、激素和免疫抑制剂治疗的病例,当疾病稳定后,ANCA 滴度也下降。尽管 ANCA 阳性在 WG 活动期有很高的价值,但由于 ANCA 在其他疾病也可被检出,所以存在 25%的假阳性<sup>[8]</sup>。如在其他原发性血管炎中,类似变态反应性肉芽肿<sup>[9]</sup>、过敏性紫癜<sup>[10]</sup>等中可被检出。有文献指出,ANCA 对一些疾病具有致病作用。如前文所述,PR3 位于中性粒细胞浆嗜苯胺蓝颗粒中,是一种丝氨酸蛋白水解酶,且具有前炎症因子作用,又能够受到  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶( $\alpha 1$ -AT)抑制。如果 PR3-ANCA 与 PR3 结合,则 PR3 与  $\alpha 1$ -AT 形成复合物的途径就会受到抑制。然而,PR3-ANCA 与 PR3 这种结合方式是可逆的,在炎症部位,该复合物可以被分解,在分解过程中 PR3 起着水解作用,同时血管内皮被损伤。这不仅是 PR3-ANCA 唯一的致病机制,它还有可能利用像白细胞介素-1、肿瘤坏死因子(TNF)、转移生长因子等前炎症因子来激活中性粒细胞。上述因子是中性粒细胞细胞膜表面表达的一些活性物质,能刺激中性粒细胞进行脱颗粒,并同时释放氧自由基,激活酶系统,这一系列的反应最终使组织损伤。另外,PR3-ANCA 还有一定的诱导作用,它能诱导一些细胞因子释放,如 TNF,它与血管炎发生有相关性。因此,PR3-ANCA 可能与血管炎发生有关。ANCA 对呼吸道有亲和性,致上、下呼吸道坏死,肉芽肿形成。当然,在一些文献中提到,在少数 MPA、CSS、PBC、系统性红斑狼疮(SLE)、过敏性紫癜等中也可以发现 ANCA。

**2.2 MPO-ANCA** MPO 是 MPO-ANCA 主要抗原物质。MPO 相对分子质量为  $(133 \sim 155) \times 10^3$ ,它由两条重链和两条轻链组成,是中性粒细胞内浓度最高的蛋白质。MPO 具有催化作用,体现在中性粒细胞的氧爆炸或产生超氧阴离子过程。

MPO-ANCA 与显微镜下多动脉炎相关。但它的相关性不及 PR3-ANCA 与 WG 的相关性那样密切。MPO-ANCA 还在其他一些疾病,如变态反应性肉芽肿、特发性坏死性增生性肾小球肾炎、RA、感染性肠病、自身免疫性肝病中出现<sup>[11]</sup>。MPO-ANCA 与 RA 的关节外损伤及血管损伤有相关性<sup>[12]</sup>。IIF 相关研究表明,对 UC 患者进行血清学分析,发现其 PANCA 阳性率达 49%~83%,而且 UC 进展型患者 ANCA 阳性率更高<sup>[13]</sup>。克隆病患者中 PANCA 的阳性率达 19%~40%;慢活肝患者中 PANCA 阳性率为 22%~75%;PBC 为 60%~85%。定位于中性粒细胞嗜苯胺蓝颗粒内,它是一种高阳离子化蛋白质,相对分子质量  $146 \times 10^3$ 。在参与氧自由基释放上,MPO 也具有一定的作用。有研究认为,由于一定原因激活中性粒细胞后,中性粒细胞将释放,游离的 MPO 在肾小球基底膜处与其结合,结合后二者相互作用,而该相互作用对肾脏造成了一定损伤。对 SLE 患者进行研究,发现大概有 15%患者存在特异性的 MPO-ANCA 或弹力蛋白-ANCA,那么考虑 MPO-ANCA 对 SLE 患者的肾损伤是不是有一定的促进作用;如果对 SLE 患者进行血清学检测,结果出现 ANCA 阳性,是不是这类患者更容易罹患系统性血管炎? Jennette 等对约 10%的抗肾小球基底膜抗体介导的肾小球肾炎患者进行血清学分析,发现 ANCA 阳性,而绝大多数患者又伴有系统性坏死性动脉炎。有报道抗肾小球基底膜抗体阳性的肾小球肾炎患者中大概有约 30% 检出 ANCA 阳性。所以,MPO-ANCA 与肾及坏死性血管炎有相关性,其关系有待进一步研究。在诊断特异性方面,PANCA 不如 CANCA,其主要表现与 MPA 相关,也可见于 CSS、PAN、SLE、RA、系统性硬化症(SSc)等。可以说,PANCA 患者的血管炎病变程度重,常会有多系统的损伤。其他慢性炎症对应的荧光模型及靶抗原见表 1。

**2.3 xANCA** xANCA 与 PANCA、CANCA 不容易区别,并且它的主要靶抗原目前研究仍不清楚,所以在临床上很多实验室将 xANCA 与 PANCA 归为一类,以此进行分析。xANCA 检测阳性见于 UC、自身免疫性肝炎、自身免疫性肝炎和慢性炎症疾病,在前两者中阳性率分别为 49%~83%和 22%~75%。

表 1 慢性炎症对应的 IIF 荧光模型及靶抗原

疾病	荧光模型	特异性靶抗原
WG	CANCA、PANCA(少见)	PR3(85%)、MPO(10%)
MPA	CANCA、PANCA	PR3(45%)、MPO(45%)
NCGN	PANCA、CANCA(少见)	PR3(25%)、MPO(65%)
CSS	PANCA、CANCA(少见)	PR3(10%)、MPO(60%)
SLE	PANCA	LF、HEL、MPO(少见)
RA	PANCA、aANCA	LF、MPO(少见)
UC	PANCA、aANCA	LF、其他
PBC	PANCA、aANCA	LF、HEL、其他
感染	PANCA、aANCA	PR3、MPO、BPI、其他

## 3 小 结

在原发性小血管炎患者血清中,人们最早发现 ANCA。现已公认 ANCA 与 WG、MPA 和 CSS 存在一定联系,所以人们把 WG、MPA、CSS 这 3 种疾病称为“抗中性粒细胞胞浆抗体相关性小血管炎”。随着对 ANCA 研究的深入,发现与 ANCA 相关的疾病也越来越多。必须指出,在临床上用 IIF 法检测的 ANCA 阳性并非就意味着血管炎,非血管炎性疾病也可检测出 ANCA 阳性,包括肺部炎症性疾病、自身免疫性肝胆疾病、RA 等。然而上述 ANCA 相关疾病的 ANCA 特异性靶抗

原却不是 PR3 和 MPO,而是如 BPI、蛋白酶、组蛋白酶 G、乳铁蛋白、天青杀素和防御素等其他类型的特异性抗原成分。尽管出现这样的现象,但是除了抗 PR3 和抗 MPO 这两种以外,上述的其他特异性自身抗体多与临床疾病活动性无关,其在疾病中的机制都不是很明朗,所以目前研究较多还是抗 PR3 和抗 MPO 自身抗体。已有研究证明上述两种抗体与小血管炎发病机制有关,所以,中性粒细胞能被抗 PR3 和抗 MPO 自身抗体激活,激活后进行脱颗粒,同时产生一些物质,如大量有害的蛋白水解酶及释放氧自由基,一系列的反应将损伤小血管壁,最终导致血管炎形成。迄今为止,在 ANCA 研究领域内,原发性小血管炎性疾病仍是与其联系最密切的临床疾病,最重要的诊断依据则是对抗 PR3 和抗 MPO 自身抗体的检测。对于临床上怀疑的原发性小血管炎患者,应尽快进行 ANCA 检测。单纯 IIF 下 ANCA 阳性,并没有单一的诊断价值,所以对怀疑原发性小血管炎的患者,除了相应的检查外,还应进一步对 ANCA 所作用的特异性抗原成分进行检测,尤其是 PR3 和 MPO。

参考文献

[1] Hauschild S, Schmitt WH, Csernok E, et al. ANCA in Wegener's granulomatosis and related vasculitides[J]. Adv Exp Med Biol, 1992, 49(8): 875-876.  
 [2] Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 99(1): 49-56.  
 [3] By E, Christiaan H, Bart E, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: a review of the antigens involved, the assays, and the clinical and possible pathogenetic consequences[J]. Blood, 1993, 81(8): 1996-2002.  
 [4] Oudkerk PM, Ellerbroek PM, Ridwan BU, et al. Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly

associated with ulcerative colitis[J]. Gut, 1993, 34(1): 46-50.  
 [5] Specks V, Wheatley CL. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis[J]. Mayo Clin Proc, 1989, 64(5): 28-36.  
 [6] Hagen EC. Development and standardization of solid-phase assays for the detection of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) for clinical application: report of a large clinical evaluation study[J]. Clin Exp Immunol, 1995, 101(Suppl 1): 29.  
 [7] Jayne DR, Davies MJ, Fox CJ, et al. Treatment of systemic vasculitis with pooled intravenous immunoglobulin[J]. Lancet, 1991, 337(8750): 1137-1139.  
 [8] Rao JK, Allen NB, Feussner JR, et al. A prospective study of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) and clinical criteria in diagnosing Wegener's granulomatosis [J]. Lancet, 1995, 346(8980): 926-931.  
 [9] Guillevin L, Visser H, Noel LH, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody in systemic polyarteritis nodosa with and without hepatitis B virus infection and Churg-Strass syndrome: 62 patients[J]. J Rheumatol, 1993, 20(5): 1345-1349.  
 [10] Ronda N, Esnault VL, Layward L, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) of IgA isotype in adult Henoch-Schlein purpura[J]. Clin Exp Immunol, 1994, 95(1): 49-55.  
 [11] Peter HH, Metzger D, Rump A, et al. ANCA in disease other than systemic vasculitis[J]. Clin Exp Immunol, 1993, 93(Suppl 1): 12-14.  
 [12] Juby A, Johnston C, Davis P, et al. Antinuclear and antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in the sera of patients with Felty's syndrome[J]. Br J Rheumatol, 1992, 31(3): 185-188.  
 [13] Broekroelofs J, Mulder AH, Nelis GF, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in sera from patients with inflammatory bowel disease (IBD)[J]. Dig Dis Sci, 1994, 39(3): 545-549.

(收稿日期: 2015-11-25)

• 个案与短篇 •

## 多种抗凝剂引起血小板假性减低 1 例报道

徐 阳<sup>1</sup>, 刘莉君<sup>2</sup>, 张 磊<sup>1</sup>, 张彦平<sup>1</sup>, 王金华<sup>1</sup>

(西安交通大学医学院第二附属医院: 1. 检验科; 2. 肿瘤科, 陕西西安 710054)

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.072

文献标识码: C

文章编号: 1673-4130(2016)03-0432-02

乙二胺四乙酸(EDTA)作为国际血液学标准化委员会(ICSH)推荐的抗凝剂,在临床上获得认可,已得到广泛的应用。但临床有报道称 EDTA 可诱导血小板(PLT)聚集,使 PLT 的计数假性减低,即临床所诊断的 EDTA 依赖性假性 PLT 减少症(EDTA-PTCP)<sup>[1]</sup>,严重影响 PLT 计数的准确性。EDTA-PTCP 发病率较低,约为 0.1%,临床主要表现为重型假性 PLT 减少症,但患者并无出血现象<sup>[2]</sup>。在平时工作中,如果检验工作者没有引起足够重视,或是由于经验不足,此种 PLT 假性减低很容易被误认为 PLT 减少症,造成临床的误诊,给患者诊断带来严重影响。本院检验科近期发现 1 例在乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)作用下,PLT 出现聚集的情况,采用枸橼酸钠和肝素重新抽血检测,仍发现有少量聚集,因临床少有报道,现总结如下,以供各临床医生和检验工作者参考。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 患者女,53 岁。近半年因进食量少、头晕、全

身乏力、面色苍白来院就诊。查血常规:白细胞(WBC)6.2×10<sup>9</sup>/L,红细胞(RBC)2.8×10<sup>12</sup>/L,血红蛋白(Hb)80 g/L,PLT 26×10<sup>9</sup>/L,门诊拟诊断为缺铁性贫血,入住本院血液科。患者既往无出血史,当地查血常规,取指尖末梢血,均未发现有 PLT 计数减少。凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)(109 mmol/L 枸橼酸钠抗凝)均在正常参考范围内。查体:全身皮肤黏膜无黄染,无皮疹分布、无出血点分布、鼻腔及牙龈无渗血。

1.2 检测仪器 血常规检测仪器为 Sysmex XE-2100 五分类血细胞分析仪,试剂为 Sysmex 原装试剂;推片机 Sysmex SP1000i;染液为瑞-姬氏染液,由珠海贝索生物技术有限公司提供;阅片机为 Cellavision DM96;采血管使用 EDTA-K<sub>2</sub> 血常规管,浏阳市三力医用品有限公司生产。

### 2 结 果

在血常规检测中发现 EDTA 抗凝状态下有(下转插 II)