

• 论 著 •

儿童抗核抗体不同稀释度检测结果分析*

庞舒尹¹, 陈奕豪¹, 刘海英^{1△}, 陈曲波², 蔡 莉³, 彭小芳¹, 高 飞¹, 代玉梅¹, 刘云锋¹

(1. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心检验科, 广州 510000; 2. 广东省中医院医学资源中心, 广州 510000; 3. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心体检中心, 广州 510000)

摘要:目的 比较不同血清稀释滴度对儿童抗核抗体间接免疫荧光分析(ANA-IIF)结果的影响,探讨降低血清起始稀释度必要性。方法 以间接免疫荧光法检测 110 例健康儿童系列稀释度血清标本抗核抗体(ANA),并与特异性 ANA 线性免疫(ANA-LIA)结果相比较;同时分析一组 ANA-IIF 阴性的临床患儿标本 ANA-LIA 结果。结果 健康组标本随着稀释度从 1 : 80、1 : 40、1 : 20 逐步减低,ANA-IIF 阳性检出率有所上升,分别为 7.3%、9.1%、10.9%,但差异无统计学意义($P>0.05$),弱阳性分别为 7.3%、15.5%、31.8%,差异有统计学意义($P<0.01$)。110 例健康体检儿童中 8 例标本检测出特异性 ANA,阳性率为 7.3%。8 例 IIF 法稀释度 1 : 80 阳性者中,特异性 ANA 阳性者 2 例;稀释度 1 : 40、1 : 20 新增的 4 例荧光 ANA 阳性标本中,有 1 例特异性 ANA 阳性。若视 ANA-IIF(1 : 80)或 ANA-LIA 任一阳性为 ANA 阳性,ANA 阳性率从 7.3%上升到 12.7%。29 例 ANA-IIF(1 : 80)为阴性的自身免疫肝病相关自身抗体检测患儿临床标本中,特异性 ANA-LIA 检测出 5 例阳性(17.2%)。结论 降低儿童血清起始滴度并不能明显提高 ANA-IIF 阳性检出率,反而增加了非特异的弱阳性,因此,临床实验室不需改变儿童 ANA 常规标本稀释滴度,联合特异性 ANA-LIA 的检测有利于 ANA 的发现。

关键词:抗核抗体; 儿童; 间接免疫荧光分析; 自身免疫性肝病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.13.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)13-1772-03

Analysis on detection results of different dilution titers of antinuclear antibodies in children*

PANG Shuyin¹, CHEN Yihao¹, LIU Haiying^{1△}, CHEN Qubo², CAI Li³,

PENG Xiaofang¹, GAO Fei¹, DAI Yumei¹, LIU Yunfeng¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Guangzhou Municipal Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. Medical Resource Center, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 3. Medical Examination Center, Affiliated Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: Objective To compare the influences of different dilution titers on the ANA detection by the indirect immunofluorescence assay(IIF) in children for investigating the necessity of reducing serum initial dilution titer. **Methods** Serum ANA was detected by using the indirect immunofluorescence assay at a serial of dilution titer in 110 healthy controls and the results were compared with the results of specific ANAs by the linear immunoassay (LIA); meanwhile the ANA-LIA results in clinical children patients with ANA-IIF negative were also analyzed. **Results** With the dilution titers gradual decrease from 1 : 80, 1 : 40 and 1 : 20 in the samples of the health group, the positive detection rates of ANA-IIF were risen, which were 7.3%, 9.1% and 10.9% respectively, but the differences were not statistically significant($P>0.05$), the weak-positive rates were 7.3%, 15.5% and 31.8% respectively, the differences were statistically significant($P<0.01$). Among 110 healthy children under going the physical examination, the specific ANA was detected out in 8 samples, the positive rate was 7.3%. Among 8 positive cases at the dilution titer of 1 : 80 by the IIF method, specific ANA was in 2 cases; in 4 added cases of fluorescence ANA positive samples at the dilution titers of 1 : 40 and 1 : 20, specific ANA was in 1 case. If with any positive of ANA-IIF(1 : 80) or ANA-LIA as the ANA positive, the ANA positive rate was risen from 7.3% to 12.7%. In the clinical samples among 29 cases of ANA-IIF(1 : 80) negative autoimmune liver disease related autoantibody detection, the specific ANA-LIA positive was detected in 5 cases (17.2%). **Conclusion** Reducing the initial titer of children serum is unable to obviously increase the ANA-IIF positive detection rate, on the contrary increases the non-specific weak positive. Therefore, clinical laboratory does not change the dilution titer of children routine ANA sample. The detection by combining with the specific ANA-LIA spectrum is conducive to find ANA.

Key words: antinuclear antibodies; children; indirect immunofluorescence assay; autoimmune liver diseases

抗核抗体(ANA)是风湿免疫病诊断、疗效监测和预后的重要指标,在临床医疗工作中发挥着越来越重要的作用。以 HEp-2 细胞为基质的间接免疫荧光分析(IIF)则为临床上最为常用的 ANA 初筛方法。自身抗体检测一般都需要采用稀释

血清,只有在一定的稀释度上的阳性结果才具有临床参考意义,尤其是 IIF,其阳性滴度越高,越表明自身免疫性疾病的可能。传统系统的 ANA 滴度达 1 : 160 阳性才被视为具有诊断意义,而 1 : 80 滴度阳性往往很少发现有诊断相关的特异性

* 基金项目:广东省广州市卫生局西医类重点项目(201102A212023)。

作者简介:庞舒尹,女,技师,主要从事临床医学检验工作。△ 通讯作者, E-mail: xiangliuhaiying@aliyun.com。

ANA, 从而被作为临界线, 相应地, 临床上将血清 1 : 80 稀释度当作 ANA 筛查的起始稀释度^[1]。因此, ANA 的起始稀释度直接决定了结果的阴阳, 影响着临床的判断。目前, ANA 的标本稀释度一般是建立在成人数据基础之上, 这个工作稀释度是否适用于儿童人群有待研究。大多数儿童自身免疫性疾病发生在 3~13 岁, 该年龄段包括免疫系统在内各个系统尚处于发育成熟过程。以自身抗体常见的免疫球蛋白亚类 IgG 为例, 其血液浓度在 5 岁时只达到成人的一半, 8 岁时为 80%, 13 岁以后才接近成人水平^[2-3]。众多临床医生怀疑, 对于自身免疫性疾病患儿, 其血清滴度并不能以成人的水平去要求, 于是有人提出在临床高度疑似患儿, 如常规稀释度(1 : 80 或 1 : 40)为阴性时, 可降低稀释度, 有些还被纳入疾病诊断标准中, 如儿童自身免疫性肝炎, 在其简化积分制诊断标准中将 ANA 阳性滴度降为 1 : 20^[4-5]。尽管目前没有研究数据证明降低稀释度究竟能有多大幅度提高诊断阳性率, 在实际工作中, 也没有评估过降低稀释度对由于非特异染色增高而影响结果判断、带来假阳性的负面干扰^[6]。本研究拟采用健康体检的正常儿童血清标本进行不同稀释度的 ANA 检测, 并结合特异性 ANA 的线性免疫分析, 以探讨为提高儿童 ANA 检测灵敏度而降低工作起始稀释度的必要性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)健康组为 3~13 岁、半年内无疫苗接种、无病毒感染史的学校统一体检或门诊健康体检儿童 110 例, 以 1 岁为 1 个年龄段, 每个年龄段男女各 5 例, 排除患有系统性红斑狼疮、幼年特发性关节炎、川崎病、脉管炎、肾炎、干燥综合征、硬皮病、重症肌无力、幼年皮炎、多发性皮炎、混合结缔组织病、韦格纳肉芽肿等自身免疫性疾病以及发热、关节疼痛等风湿免疫相关临床症状。抽取清晨空腹静脉血, 按常规方法离心分离血清, 剔除有明显浑浊、黄疸、溶血等标本。按时检测, 体检标本则在常规检测完毕后, 及时分装剩余血清储于 -70℃ 待用。每个标本进行 ANA-IIF 和特异性 ANA 线性免疫(ANA-LIA), 试剂盒均购自德国欧蒙实验诊断公司。(2)观察组为住院或门诊进行自身免疫性肝病相关自身抗体检测的患儿标本, 其中自身免疫性肝病相关自身抗体均为阴性的 29 例标本。

1.2 ANA-IIF 筛查 采用包含 HEp-2 细胞和鼠肝组织冰冻切片等 2 种抗原基质。遵循试剂盒说明书的血清标本起始稀释度, 按照操作步骤进行实验。结果判读采用试剂盒说明书推荐的定性判断, 细胞核无特异性荧光视为阴性, 有弱的特异性荧光模型为弱阳性, 呈现中等强度清晰可辨的荧光模型时则为阳性, 呈现强荧光模型为强阳性。根据核型的荧光强弱, 检测结果报告为弱阳性、阳性或强阳性。除常规检测外, 另采用试剂盒标本稀释液对血清进行系列稀释(1 : 20, 1 : 40, 1 : 80), 之后操作、判断均同前述。

1.3 特异性 ANA-LIA 采用可同时检测 12 种常见特异性抗体(nRNP/Sm、Sm、SS-A、Ro-52、SS-B、Scl-70、Jo-1、CENP B、dsDNA、核小体、组蛋白、核糖体 P 蛋白)膜条。按照试剂盒说明书进行实验操作和检验结果解释判断, 在相应抗原线处出现明显蓝紫色条带为阳性反应, 根据抗原带着色的深浅将结果报告为阴性、临界阳性(弱阳性)、阳性、强阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 健康体检者不同稀释滴度阳性检出率的比较采用 R×C 表的 χ^2 检验, 两组间率的比较则采用四格表 Pearson 或 Fisher's 精确 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健康组 ANA-IIF 检测结果 110 例健康体检儿童中, 血

清稀释滴度为 1 : 80 时, 阳性 8 例(颗粒型、核仁型各 4 例), 弱阳性 8 例(颗粒型 1 例、胞浆颗粒型 7 例); 稀释滴度为 1 : 40 时, 阳性 10 例(颗粒型 5 例、核仁型 4 例、胞浆颗粒 1 例), 弱阳性 17 例, 新增 9 例弱阳均为胞浆颗粒型; 稀释滴度为 1 : 20 时, 阳性 12 例(颗粒型 5 例、核仁型 4 例、胞浆颗粒 3 例), 弱阳性 35 例, 新增 19 例弱阳胞浆颗粒型。标本随着稀释度从 1 : 80、1 : 40、1 : 20 逐步提高, 阳性检出率分别为 7.3%(8/110)、9.1%(10/110)、10.9%(12/110), 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.88, P > 0.05$), 而弱阳性的检出率分别为 7.3%(8/110)、15.5%(17/110)、31.8%(35/110), 差异有统计学意义($\chi^2 = 23.1, P < 0.01$)。

2.2 健康组 ANA-LIA 检测结果 110 例健康体检儿童中 8 例标本检测出特异性 ANA, 阳性率为 7.3%, 具体为抗组蛋白 2 例、抗 dsDNA 2 例、抗 nRNP 1 例、抗 Sm 1 例、抗 SSB 1 例、抗 Ro-52 1 例。8 例 IIF 法稀释度 1 : 80 阳性者中, 特异性 ANA 阳性者 2 例(颗粒型/抗组蛋白、核仁型/抗组蛋白); 稀释度提高的 1 : 40、1 : 20 新增的 4 例阳性标本中, 仅有 1 例 1 : 20 胞浆颗粒阳性/抗 nRNP; 其余 IIF 阳性者特异性 ANA 均为阴性, 余下 5 例特异性 ANA 阳性者其 IIF 法在不同稀释度呈弱阳性。若视 IIF 法 1 : 80 或特异性 ANA 任一阳性为 ANA 阳性, 则阳性检出率从 7.3% 上升到 12.7%, 差异无统计学意义($\chi^2 = 3.655, P > 0.05$)。

2.3 观察组线性免疫检测结果 29 例 IIF-ANA 1 : 80 为阴性的临床患儿标本中, 特异性 ANA-LIA 检测出 5 例阳性(17.2%), 分别为抗-组蛋白 1 例、抗 dsDNA 1 例、抗 SSA 2 例、抗核糖体 P 蛋白 1 例。

3 讨论

无论是 1999 年积分诊断系统, 还是 2008 年简化诊断标准, ANA 一直被纳为自身免疫性肝病(AIH)诊断中的一项重要积分依据^[4-5]。50%~70% 的 I 型 AIH 患者 ANA 阳性, 均质型、斑点型为 AIH 最为常见的荧光模型, 但都不具备 AIH 特异性, 目前为止尚未发现特异性 ANA, 其主要靶抗原为单链 DNA(57%~85%)、双链 DNA(0~50%)、组蛋白(25%~40%)、染色质(39%)、核糖体核蛋白(20%~58%)等。I 型 AIH 中 ANA 阳性率 70%, 其中与 SMA 共同阳性 60%, 另有 15% 仅为 ANA 阳性^[7]。ANA 滴度对可疑患者是可能或确定的 AIH 诊断积分有用。ANA 也在其他肝脏疾病中存在, 如病毒性肝炎、药物性肝炎、酒精性肝病、肝细胞肝癌以及某些肝外疾病。抗 Ro52 在 I 型 AIH 中阳性率达 77%^[7]。

ANA 最常用以及最常规的方法是大鼠肝、肾、胃组织的冰冻切片, 筛查方法可为 HEp-2 细胞基质片, 而诊断积分则组织切片的价值要高。AIH 诊断的积分系统是否适用于儿童 AIH 的诊断标准, 有学者提议了专门用于儿童 AIH 诊断标准, 采用了基于包括临床、生化、免疫和组织学的积分系统, 其中自身抗体滴度要比成人低 1 个稀释度, 如成人 ANA 或 SMA 临界值为 1 : 40, 而儿童则为 1 : 20^[8-9]。尽管如此, 有研究评价得到现用的简化标准其灵敏度低而特异性稍高。美国临床和实验室标准协会提出, 对于 IIF, 在每个实验室建立自己的参考区间后, 应以适当的质控和参考物确立筛查稀释度; 并且, 结果分析需综合荧光模型、抗体水平和患者年龄。老年人, 尤其女性, 易于产生低滴度(低于 1 : 80)的自身抗体但没有临床自身免疫性疾病症状, 而对于年幼患者, 筛查稀释度可降至 1 : 40^[10]。

IIF 筛查稀释度的高低与试验特异性、敏感性存在辩证关系, 非特异荧光干扰随血清稀释度减小而增加, 当筛查稀释度越大时, 敏感性降低而特异性增加, 当稀释度越小, 敏感性增加

但特异性降低。因此,排除不必要的非特异干扰,实验室必须确定正确的稀释度,在大多数健康人群血清标本检测时呈阴性结果,又能保证患者群众最低稀释度的特异性自身抗体,对阳性结果判断和平衡敏感性、特异性方面具有重要价值。本研究比较了健康儿童不同稀释滴度的 IIF 检测结果,显示随着稀释度的提高,阳性检出率从 7.3% 提高到 10.9%,差异无统计学意义($P>0.05$);但是,由稀释度提高导致弱阳性的胞浆颗粒染色而导致非特异干扰却明显加强(31.8%)。因此,提高患儿 ANA 检测稀释度,提高阳性检出率有限,反而大大增加了结果观察的干扰。

当然,儿童免疫系统发育尚未完全,血循环免疫球蛋白水平与成人有一定差距,这也是降低稀释滴度提高阳性检出率的客观依据。但是,这并不是提高 ANA 阳性检出率、避免漏诊的唯一手段。近年来,随着研究的不断深入,ANA 所针对的靶抗原逐一得到鉴别,在其基因工程重组抗原基础上发展了灵敏度更高、特异性更强的特异性 ANA 检测方法,如酶免疫测定(EIA)、LIA。ANA 特异性抗体的 EIA 法可自动化、成本效益比高,是国外实验室首选方法。LIA 因技术、设备要求低、可肉眼判断结果,在我国应用较为广泛。特异性 ANA 检测是 IIF 的补充,许多 IIF 阴性患者,其特异性 ANA 可检出阳性。因此对于临床疑似 AID 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,但是各种特异性抗体的确认试验不能完全替代筛查试验。当然这也与 IIF-ANA 选取的基质有关,如果选用转染了 Ro60 cDNA 的 HEp-2000 细胞为基质则可提高检测灵敏度,从而减少 IIF-ANA 阴性与 LIA-ANA 阳性不符的发生。在健康组 LIA-ANA 阳性率与 IIF-ANA 一致,不过阳性者不完全重叠,而 29 例临床标本 IIF-ANA 为阴性的患儿中,17.2% LIA-ANA 阳性。因此研究提示,不需提高抗体滴度,增加特异性 ANA 的检测也可以提高 ANA 的阳性检出率,这也符合 ANA 检测中“临床高度怀疑时无论 ANA 结果如何,建议医生申请 ENA 特异性抗体检测”国内外专家共识及建议。

参考文献

[1] Sack U, Conrad K, Csernok E, et al. Autoantibody detec-

(上接第 1771 页)

原进行定性和定量测定可作为抗-C 阳性患者应用直接抗人球蛋白实验及自身对照,其意义在于筛选临床以外的免疫现象,以判断是否存在自身抗体而与真正由特异性抗体引起的相区别。此外,可以检测近期输血免疫反应早期表现,尤其是近期形成的同种抗体被输入红细胞完全吸收而检测不出的病例,尤其是多次输血的肿瘤患者。单纯由于自身抗体引起的阳性结果时,交叉配血中选择比自身凝集反应弱的成分血液进行输注。凝聚胺实验可能会漏检一些特异性抗体,所以要采用更加灵敏的方法以保障实验准确性。在输血科要建立此类患者检测结果的可追溯资料,为患者日后诊疗提供参照,保障输血安全。

参考文献

[1] Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens; a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database[J]. Hum Mutat, 2004, 23(1): 8-16.

tion using indirect immunofluorescence on HEp-2 cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1173(14): 166-173.

[2] Jiang ZY, Yf L, Guan QH, et al. Detection and reference interval determination for serum immunoglobulin of 1-8 years old children of Guangzhou[J]. J Trop Med, 2009, 9(11): 1259-1261.

[3] Coffin CM, Hamilton MS, Pysher TJ, et al. Pediatric laboratory medicine: Current challenges and future opportunities[J]. Am J Clin Pathol, 2002, 117(5): 683-690.

[4] Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International autoimmune hepatitis group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis[J]. J Hepatol, 1999, 31(5): 929-938.

[5] Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis[J]. Hepatology, 2008, 48(1): 169-176.

[6] Mieli-Vergani G, Vergani D. Paediatric autoimmune liver disease[J]. Arch Dis Child, 2013, 98(12): 1012-1017.

[7] Liberal R, Grant CR, Longhi MS, et al. Diagnostic criteria of autoimmune hepatitis[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(4/5): 435-440.

[8] Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, et al. Autoimmune hepatitis[J]. J Pediatr Gastroenterol Nuri, 2009, 49(10): 158-164.

[9] Hiejima E, Komatsu H, Sogo T, et al. Utility of simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis in children[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011, 52(4): 470-473.

[10] Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(1): 17-23.

(收稿日期: 2016-02-10 修回日期: 2016-04-22)

[2] Evdokiou A, Webb GC, Peters GB, et al. Localization of the human growth arrest-specific gene (GAS1) to chromosome bands 9q21. 3-q22, a region frequently deleted in myeloid malignancies[J]. Genomics, 1993, 18(3): 731-733.

[3] 孙晓春, 龚道元. 临床输血检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 143.

[4] 吕鹏, 王培华. 最新输血技术学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 219-225.

[5] Lin CM, Broadberry RE, Chang FJ. The distribution of blood group antigens and alloantibodies among Chinese in Taiwan[J]. Transfusion, 1988, 28(4): 350-352.

[6] 杨天楹. 临床输血学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993: 68.

[7] 林甲进, 朱碎永, 张瑛, 等. 输血前受血者血清抗体筛选及临床价值[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(1): 24.

(收稿日期: 2016-02-27 修回日期: 2016-05-08)