

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2019.03.016

多重微球流式荧光免疫技术检测抗核抗体谱的评价与临床应用^①

尚晓莹 于 腾 孙桂荣 姚 远 张丽君 贺侠琴 刘明军

(青岛大学附属医院检验科, 青岛 266003)

中图分类号 R446.61 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2019)03-0331-04

[摘要] 目的: 分析和评估多重微球流式荧光免疫技术(MBFFI)检测抗核抗体谱的结果和临床应用价值。方法: 同时用MBFFI和免疫印迹技术检测333例自身免疫病患者、44例其他疾病患者和59例健康者血清的抗核抗体谱,进行结果的一致性检验,并用间接免疫荧光技术检测抗核抗体,比较3种方法的灵敏度、特异度。结果: MBFFI与免疫印迹技术检测所有标本抗核抗体谱一致率为83.26%, Kappa值=0.655; 病例组各项目一致率在79.88%至99.40%之间, Kappa值在0.106至0.958之间。对照组各项目一致率在96.61%至100.00%之间,其他疾病组各项目一致率在95.45%至100.00%之间。间接免疫荧光技术诊断自身免疫病的灵敏度最高($P<0.01$), MBFFI诊断自身免疫病的特异度最高($P<0.05$), MBFFI与间接免疫荧光技术联合检测可提高灵敏度($P<0.01$)。结论: 多重微球流式荧光免疫技术检测抗核抗体谱与免疫印迹技术相比,一致性尚可,特异度更高,可以替代免疫印迹技术成为新一代的抗核抗体确认试验检测方法。

[关键词] 抗核抗体谱; 抗核抗体; 多重微球流式荧光免疫技术; 免疫印迹技术; 间接免疫荧光技术;

Evaluation and clinical application of a multiplex bead-based flow fluorescent immunoassay for detection of antinuclear antibody spectrum

SHANG Xiao-Ying, YU Teng, SUN Gui-Rong, YAO Yuan, ZHANG Li-Jun, HE Xia-Qin, LIU Ming-Jun. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China

[Abstract] **Objective:** To analyze and evaluate the results and clinical value of a multiplex bead-based flow fluorescent immunoassay (MBFFI) for the detection of antinuclear antibody spectrum. **Methods:** Serum antinuclear antibodies were tested by multiplex bead-based flow fluorescent immunoassay and immunoblot assay in 333 patients with autoimmune diseases, 44 patients with other diseases and 59 healthy individuals. The consistency of the results was analyzed. Antinuclear antibodies were tested by indirect immunofluorescence assay in all samples. Then sensitivity and specificity of the three methods were compared. **Results:** The overall concordance rate between the antinuclear antibodies results for all samples by MBFFI and immunoblot was 83.26% (Kappa=0.655). The concordance rates between the results of the two assays in the autoimmune disease patients ranged from 79.88% to 99.40%, and Kappa coefficients ranged from 0.106 to 0.958. The concordance rates between the results by two assays in controls ranged from 96.61% to 100.00%, and those in the other diseases were from 95.45% to 100.00%. The sensitivity of indirect immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune diseases was the highest ($P<0.01$), and the specificity of MBFFI was the highest ($P<0.05$). The combination of the two assays improved the sensitivity ($P<0.01$). **Conclusion:** The multiplex bead-based flow fluorescent immunoassay showed comparable results with those by immunoblot for the detection of antinuclear antibody spectrum and higher specificity. It can replace immunoblot as a novel method of antinuclear antibody confirmation test.

[Key words] Antinuclear antibody spectrum; Antinuclear antibody; Multiplex bead-based flow fluorescent immunoassay; Immunoblot; Indirect immunofluorescence

抗核抗体(Antinuclear antibodies, ANA)的检测对自身免疫病(Autoimmune disease, AID)的诊断、病情评估与治疗监测等具有重要的临床价值。目前

ANA的检测方法主要为间接免疫荧光法(Indirect immunofluorescence, IIF); 抗核抗体谱的检测方法主要为免疫印迹法(Immunoblot, IB)和ELISA法,均有自动化程度低、仅为定性和半定量检测等局限性。一些自身抗体(如抗dsDNA抗体、抗核小体抗体等)浓度的变化可以反映病情变化或药物疗效情况,而对这些自身抗体浓度变化的监测需要采用定量检测^[1-3]。多重微球流式荧光免疫技术(Multiplex bead-based flow fluorescent immunoassay, MBFFI,简称:流式荧光免疫法)是一种以荧光编码微球为核

①本文受山东省临床重点专科建设项目(鲁卫医学[2013]26号)和山东省医药卫生重点实验室项目(鲁卫科教国合字[2013]49号)资助。

作者简介: 尚晓莹,女,在读硕士,医师,主要从事临床免疫学研究。
通讯作者及指导教师: 刘明军,男,医学博士,教授,主任技师,硕士生导师,主要从事临床免疫学研究, E-mail: jocklmj@163.com。

心,集流式细胞、激光分析、高速数字信号处理等多种技术于一体的多指标并行分析技术平台,可一次同时准确定量检测 100 种不同的生物分子;具有高通量、高灵敏度、高自动化、稳定性好等优点^[4]。本研究是通过流式荧光免疫法检测自身免疫病的抗核抗体谱,并与免疫印迹技术、IIF 等传统检测方法相比较,对流式荧光免疫法检测抗核抗体谱的结果进行分析和评价。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 标本来源 2017 年 11 月至 2018 年 3 月在青岛大学附属医院就诊并临床确诊的自身免疫病患者的血清标本共 333 例,同时选取排除自身免疫病的其他疾病患者血清 44 例(其他疾病组)和健康体检者血清 59 例(对照组)。

1.1.2 材料 流式荧光免疫法所用试剂及 TESMI F3999 全自动加样仪由上海透景生命科技有限公司提供,Luminex[®] 200[™]流式点阵仪为美国 Luminex 公司生产。免疫印迹法试剂及 EUROBlotMaster II 免疫印迹仪购自德国欧蒙公司。间接免疫荧光法所用抗原基质片(靶抗原为 Hep-2 细胞与猴肝组织)及试剂购自德国欧蒙公司。

1.2 方 法

1.2.1 标本采集 受检者空腹采静脉血,离心分离血清,于当天以免疫印迹法检测抗核抗体谱及 IIF 法检测 ANA,另分装一份-36℃冰箱保存,流式荧光免疫法检测前复融至室温。

1.2.2 抗核抗体谱检测 抗核抗体谱包括的项目有:抗线粒体抗体 M2 型(AMA-M2),抗着丝粒抗体(anti-Centromere),抗组蛋白抗体(anti-Histone),抗细胞浆组酰-tRNA 合成酶抗体(anti-Jo-1),抗核小体抗体(anti-nucleosome, anti-Nucl),抗多肽复合体抗体(anti-PM-Scl),抗核糖体 P 蛋白抗体(anti-ribosomal P, anti-Rib-P),抗 Robert 抗原 52 抗体(anti-Ro52),抗干燥综合征 A 抗体(anti-SSA),抗干燥综合征 B 抗体(anti-SSB),抗 DNA 拓扑异构酶 I 抗体(anti-Scl-70),抗双链 DNA 抗体(anti-dsDNA),抗核糖核蛋白抗体(anti-RNP),抗 Smith 抗体(anti-Sm)。流式荧光免疫法检测步骤:血清加载在 TESMI F3999 全自动加样仪后进行样本处理,后进入 Luminex[®] 200[™]流式点阵仪检测和数据处理。dsDNA 的 Cut-off 值为 18 U/ml,其余指标的 Cut-off 值为 1 AI(AI=抗体指数)。免疫印迹法检测步骤:将膜条放入免疫印迹仪的温育槽中,经过 5 min 样

本缓冲液温育后,加入 1:100 稀释的血清,室温温育 30 min 后清洗,再加入酶结合物,温育 30 min 后清洗,加入底物液,温育 10 min 后清洗,风干后放置于扫描仪中,EUROLineScan 软件判读阴阳性结果。

1.2.3 ANA 检测 采用间接免疫荧光法。血清 1:100 稀释,滴加 25 μl 于抗原基质片上,温育 30 min 后清洗,再滴加 25 μl FITC 标记的荧光二抗于抗原基质片上,温育 30 min 后清洗,封片,荧光显微镜下判读阴阳性结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS24.0 统计学软件进行统计学分析。两种检测技术结果的一致性行 Kappa 检验,Kappa 值≤0.4 表明一致性差,0.4<Kappa 值≤0.7 表示一致性一般,0.7<Kappa 值表示一致性高。灵敏度、特异度的比较行配对 χ² 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 流式荧光免疫法与免疫印迹法检测所有标本的总体一致性比较 以 MBFFI 或 IB 法检测抗核抗体谱的各指标中有一项及以上为阳性者,判为此标本的抗核抗体检测阳性;各指标均为阴性,判为此标本的抗核抗体检测阴性,并由此计算 MBFFI 或 IB 法检测 ANA 的灵敏度、特异度^[5-7]。用两种方法对总共 436 例标本进行检测,两种方法的一致率为 83.26%,Kappa 值=0.655,结果见表 1。

2.2 流式荧光免疫法与免疫印迹法检测各组各项目的一致性比较 病例组中各项目一致率在 79.88% 至 99.40% 之间,Kappa 值在 0.106 至 0.958 之间,其中抗 Centromere 一致性最好(Kappa 值=0.958),抗 Scl-70 一致性最差(Kappa 值=0.106)。对照组中各项目一致率在 96.61% 至 100.00% 之间,其他疾病组中各项目一致率在 95.45% 至 100.00% 之间。结果见表 2、3。

2.3 三种方法诊断自身免疫病的灵敏度、特异度比较 间接免疫荧光法的灵敏度最高,免疫印迹法、间接免疫荧光法分别与流式荧光免疫法比较,灵敏度的差异有统计学意义(P<0.01,P<0.01)。流式

表 1 所有标本流式荧光免疫法与免疫印迹法检测结果(n)
Tab.1 Results for all samples by MBFFI and immunoblot (n)

		IB		Total
		Positive	Negative	
MBFFI	Positive	223	19	242
	Negative	54	140	194
	Total	277	159	436

荧光免疫法的特异度最高,免疫印迹法、间接免疫荧光法分别与流式荧光免疫法比较,特异度的差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。流式荧光免疫法与间接免疫荧光法联合检测的灵敏度比流式荧光免疫法单独检测高,差异有统计学意义($P<0.01$)。免疫印迹法与间接免疫荧光法联合检测的灵敏度比免疫印迹法单独检测高,差异有统计学意义($P<0.01$),结果见表4。流式荧光免疫法、免疫印迹法、流式荧光免疫法与间接免疫荧光法联合检测及免疫

印迹法与间接免疫荧光法联合检测的约登指数分别为0.686、0.660、0.706及0.633。

3 讨论

抗核抗体检测对AID的诊断、病情评估和疗效监测具有重要价值,多种抗核抗体检测已列入AID的诊断标准或指南中^[8-11],如抗dsDNA抗体、抗Sm抗体已列入SLE的诊断标准^[8];抗SSA、SSB抗体已列入干燥综合征的诊断标准^[9]。目前抗核抗体及抗核抗体谱的检测方法:IIF、免疫印迹法和ELISA,均有一定的局限性。IIF因为对核型和滴度的鉴定有主观性,使得各实验室之间的结果很难取得一致性,且自动化程度低,仅为定性检测。免疫印迹法及ELISA主要用于特异性抗体的鉴定,但均为定性或半定量检测且自动化程度不高。流式荧光免疫法可

表2 病例组流式荧光免疫法与免疫印迹法检测各项目比较

Tab.2 Comparison of results for each item by MBFFI and immunoblot in AID patients

Antigen	Positive rate		Concordance rate	Kappa coefficient
	MBFFI	IB		
AMA-M2	12.91%	2.40%	88.29%	0.203
Centromere	7.51%	8.11%	99.40%	0.958
Histone	22.52%	13.21%	79.88%	0.324
Jo-1	1.50%	2.40%	98.50%	0.608
Nucl	11.41%	16.52%	92.49%	0.689
PM-Scl	7.51%	3.90%	90.39%	0.112
Rib-P	9.31%	11.41%	96.70%	0.822
Ro-52	43.84%	48.35%	93.09%	0.861
SSA	36.64%	43.84%	91.59%	0.826
SSB	13.51%	14.11%	93.99%	0.748
Scl-70	14.41%	2.40%	85.59%	0.106
dsDNA	21.92%	9.31%	83.78%	0.403
RNP	17.72%	20.72%	88.59%	0.633
Sm	12.31%	7.51%	93.99%	0.666

表4 流式荧光免疫法、免疫印迹法及间接免疫荧光法灵敏度、特异度比较

Tab.4 Comparison of sensitivity and specificity between MBFFI, IB and IIF

Methods	Sensitivity(%)	Specificity(%)
IB	79.6 ¹⁾	86.4 ²⁾
MBFFI	70.3	98.3
IIF	92.8 ¹⁾³⁾	76.3 ¹⁾
MBFFI+IIF	94.3 ¹⁾	76.3 ¹⁾
IB+IIF	95.5 ³⁾	67.8 ³⁾

Note: Compared with MBFFI, 1) $P<0.01$, 2) $P<0.05$; compared with IB, 3) $P<0.01$.

表3 对照组及其他疾病组流式荧光免疫法与免疫印迹法检测各项目比较

Tab.3 Comparison of results for each item by MBFFI and immunoblot in controls and other diseases

Antigen	Controls			Other diseases		
	Positive rate		Concordance rate	Positive rate		Concordance rate
	MBFFI	IB		MBFFI	IB	
AMA-M2	0.00%	0.00%	100.00%	2.27%	0.00%	97.73%
Centromere	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%
Histone	0.00%	1.69%	98.31%	4.55%	0.00%	95.45%
Jo-1	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%
Nucl	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%	0.00%	100.00%
PM-Scl	0.00%	3.39%	96.61%	0.00%	0.00%	100.00%
Rib-P	0.00%	0.00%	100.00%	0.00%	2.27%	97.73%
Ro-52	0.00%	3.39%	96.61%	4.55%	2.27%	97.73%
SSA	0.00%	0.00%	100.00%	2.27%	2.27%	95.45%
SSB	0.00%	0.00%	100.00%	2.27%	0.00%	97.73%
Scl-70	1.69%	1.69%	96.61%	4.55%	0.00%	95.45%
dsDNA	0.00%	0.00%	100.00%	4.55%	0.00%	95.45%
RNP	0.00%	3.39%	96.61%	0.00%	2.27%	97.73%
Sm	0.00%	1.69%	98.31%	0.00%	0.00%	100.00%

弥补上述方法的不足,且可定量检测特异性自身抗体,从而可评估某种特异性自身抗体对 AID 病情变化、疗效监测的价值。本研究中,流式荧光免疫法与免疫印迹法总体一致性一般。病例组中大部分项目两种检测方法的一致性较高(14 项中 9 项的 Kappa 值在 0.6 以上,5 项在 0.7 以上)。一致性最好的为抗 Centromere,一致性最差的为抗 Scl-70。抗 Scl-70 被认为是系统性硬化病的标记性抗体^[12]。本研究没有具体统计各病种的抗 Scl-70 阳性率,可能系统性硬化病两种检测方法的阳性率差异大致相同,而其他自身免疫病的两种检测方法的阳性率差异较大导致的一致率差。AMA-M2 是原发性胆汁性肝硬化的血清诊断标志抗体,其一致性差的可能原因同抗 Scl-70^[13]。抗 PM-Scl 的一致性亦较差,可能两种方法检测此项的阳性率均很低所致。对照组及其他疾病组两种方法一致性很高且阳性率很低。

IIF 检测 ANA 的荧光核型具有一定的提示作用,但一种自身抗体可出现不同的荧光核型,不同的自身抗体也可出现相同的荧光核型,不能仅从荧光核型来推断特异性自身抗体种类^[3]。免疫印迹法所用的抗原必须是纯化的抗原,才能保证被测定抗体的准确性和特异性,但目前许多自身抗体的确切抗原不明确且不易被纯化,仅有少部分抗原有纯化的产品能用于特异性检测^[14]。专家共识建议:临床应用可先用 IIF 法检测 ANA,若为阳性,需进一步检测特异性自身抗体^[3]。本研究显示,流式荧光免疫法的诊断灵敏度虽然低于免疫印迹法与 IIF 法,但特异度高于后两者,而 IIF 法检测 ANA 的灵敏度高于其余两方法。本研究中流式荧光免疫法与 IIF 法不一致的结果中 5.88% 为流式荧光免疫法阳性且 IIF 法阴性,与 Nifli 等^[7]的研究不一致,其为 77.04%。原因是本研究所用流式荧光免疫法的试剂不再添加 Hep-2 抗原成分,Hep-2 为 IIF 靶抗原,从而降低了灵敏度但提高了特异度。流式荧光免疫法与 IIF 法联合检测的灵敏度比流式荧光免疫法单独检测高。这恰好提示:IIF 检测 ANA 作为初筛试验目前仍是最好的,而流式荧光免疫法可替代免疫印迹法检测 ANA 作为确认试验。

综上所述,流式荧光免疫法检测抗核抗体谱与传统的免疫印迹法相比,一致性尚可,特异度更高,与 IIF 组合应用更符合临床需求。且流式荧光免疫法自动化程度更高,检测速度更快,对某些特异性自身抗体可定量检测从而监测病情变化。流式荧光免疫法可替代免疫印迹法成为新一代的特异性自身抗体确认试验检测方法。

参考文献:

- [1] Sui M, Lin Q, Xu ZZ, *et al.* Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone antibodies is a marker for more severe lupus nephritis [J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33 (2): 378-387.
- [2] Li T, Prokopec SD, Morrison S, *et al.* Anti-nucleosome antibodies outperform traditional biomarkers as longitudinal indicators of disease activity in systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54(3): 449-457.
- [3] 中国医师协会风湿免疫科医师分会自身抗体检测专业委员会. 抗核抗体检测的临床应用专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(4): 275-280.
- [4] 鞠少卿, 王旭东, 王跃国, 等. 悬浮阵列技术在研究与临床中的应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(5): 393-396.
- [5] Pi D, de Badyn MH, Nimmo M, *et al.* Application of linear discriminant analysis in performance evaluation of extractable nuclear antigen immunoassay systems in the screening and diagnosis of systemic autoimmune rheumatic diseases [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(4): 596-603.
- [6] Bruner BF, Guthridge JM, Lu R, *et al.* Comparison of autoantibody specificities between traditional and bead-based assays in a large, diverse collection of patients with systemic lupus erythematosus and family members [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(11): 3677-3686.
- [7] Nifli AP, Notas G, Mamoulaki M, *et al.* Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 311(1-2): 189-197.
- [8] Yu C, Gershwin ME, Chang C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review [J]. *J Autoimmun*, 2014, 48-49: 10-13.
- [9] Goules AV, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. Classification criteria of Sjögren's syndrome [J]. *J Autoimmun*, 2014, 48-49: 42-45.
- [10] Hudson M, Fritzler MJ. Diagnostic criteria of systemic sclerosis [J]. *J Autoimmun*, 2014, 48-49: 38-41.
- [11] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: the diagnosis and management of patients with primary biliary cholangitis [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(1): 145-172.
- [12] 杨海, 梁宗夏, 张慧娟, 等. 抗 Scl-70 抗体检测与临床应用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(4): 533-534.
- [13] 刘金涛. 自身抗体在临床自身免疫性肝病中的作用和诊断意义 [J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(6): 669-672.
- [14] 王兰兰. 自身抗体检测的应用与质量保障原则 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(10): 17-20.

[收稿 2018-05-31 修回 2018-08-28]
(编辑 张晓舟)