

纳米磁微粒化学发光法定量检测抗核抗体谱的临床应用

罗宇维, 全树绿, 张明娇

(南方医科大学第三附属医院风湿免疫科, 广东 广州 510630)

【摘要】 目的 研究全自动、定量纳米磁微粒化学发光法(NM-CLIA)检测抗核抗体谱中10种自身抗体的临床应用价值,为抗核抗体谱检测方法的选择提供参考。方法 收集2016年10月至2018年2月南方医科大学第三附属医院自身免疫性疾病患者血清1 037例,健康体检者血清200例,用NM-CLIA检测血清抗干燥综合征抗原A60(SSA/Ro60)抗体、抗干燥综合征抗原A52(SSA/Ro52)抗体、抗干燥综合征抗原B(SSB/La)抗体、抗双链DNA(ds-DNA)抗体、抗核糖核蛋白(RNP)抗体、抗史密斯(Sm)抗体、抗着丝点蛋白B(CENP-B)抗体、抗核糖体P蛋白(Rib-P)抗体、抗核糖体(Nuc)抗体、抗组蛋白(His)抗体,同时应用线性免疫印迹法(LIA)平行检测以上抗核抗体谱,对检测结果进行统计学分析。结果 NM-CLIA在检测血清中10个常见自身抗体时具有较高特异性,均达95%以上;NM-CLIA与LIA对10个自身抗体具有相当的检出率,与文献报道的疾病抗体发生率一致;两种方法在检测抗SSA60抗体、抗SSA52抗体、抗SSB抗体、抗RNP抗体、抗CENPB抗体、抗Nuc抗体和抗His抗体时,表现出良好的一致性($Kappa>0.75, P<0.05$),而在检测抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗Rib-p抗体时一致性一般($0.4<Kappa<0.75, P<0.05$);抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗Rib-p抗体在两种方法检测中结果不一致的样本经第三方试剂验证结果显示,NM-CLIA与第三方试剂在检测抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗Rib-p抗体时,差异无统计学意义($P>0.05$);LIA与第三方试剂检测结果比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 NM-CLIA检测特定抗核抗体谱时具有良好的特异性及检出率,两种方法在检测抗SSA60抗体、抗SSA52抗体、抗SSB抗体、抗RNP抗体、抗CENPB抗体、抗Nuc抗体和抗His抗体时具有良好的一致性,而在检测抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗Rib-p抗体时一致性一般,NM-CLIA与第三方试剂的检测结果更吻合。由于NM-CLIA具有全自动、简单、快速、定量、特异性好以及随机组合检测项目等优点,更值得临床推广应用。

【关键词】 纳米磁微粒化学发光法;抗核抗体谱;线性免疫印迹法

【中图分类号】 R446.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2018)11—1527—04

Clinical evaluation of magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay in the detection of antinuclear antibody profile. LUO Yu-wei, QUAN Shu-lv, ZHANG Ming-jiao. Department of Rheumatology and Immunology, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical performance of an automated, quantitative magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay (NM-CLIA) on detecting ten antinuclear antibodies profile. **Methods** A total of 1 037 sera samples with autoimmune diseases and 200 healthy subjects were collected from the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University during the period of October 2016 to February 2018. The antibodies to SSA/60, SSA/52, SSB/La, double-stranded DNA (ds-DNA), ribonucleoprotein (rRNP), smith antigen (Sm), centromereprotein B (CENP-B), ribosome P protein (Rib-p), nucleosome (Nuc) and histone (His) were detected by NM-CLIA and line immunoassay (LIA) in parallel. **Results** The specificity of NM-CLIA to ten autoantibodies was all above 95%. NM-CLIA and LIA have a comparable positive detection rate for 10 autoantibodies, which is consistent with the incidences of positive antibodies of autoimmune diseases from reported data. NM-CLIA and LIA showed excellent qualitative coincidence rate in the detection of analyzing anti-SSA/60 antibodies, anti-SSA/52 antibodies, anti-SSB/La antibodies, anti-rRNP antibodies, anti-CENPB antibodies, anti-Nuc antibodies and anti-His antibodies ($kappa>0.75, P<0.05$), but the coincidence rate was generally normal when detecting anti-ds-DNA antibodies, anti-Sm antibodies, and anti-Rib-p antibodies ($0.4<Kappa<0.75, P<0.05$). All the discrepant samples of the two methods were confirmed with the reagents from other manufacturer. The results showed that there was no significant difference in the detection of anti-ds-DNA antibodies, anti-Sm antibodies, and anti-Rib-p antibodies between NM-CLIA and the validation reagent ($P>0.05$), but there was significant difference between LIA and the validation reagent ($P<0.05$). **Conclusion** NM-CLIA showed excellent positive rate and specificity when detecting ten antinuclear antibodies profile. The two methods show the excellent qualitative coincidence rate in the detection of anti-SSA/60 antibodies, anti-SSA/52 antibodies, anti-SSB/La antibodies, anti-rRNP antibodies, anti-CENPB antibodies, anti-Nuc antibodies and anti-His antibodies, but the coincidence rate is generally ordinary when detecting anti-ds-DNA antibodies, anti-Sm antibodies, and anti-Rib-p antibody. NM-CLIA test results have better consistency with the validation reagent among all discrepant samples. NM-CLIA has the advantages of full automatic, simple, fast, quantitative, high specificity and random combination detection items, which is more worthy of clinical application to detect antinuclear antibodies profile.

【Key words】 Magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay (NM-CLIA); Antinuclear antibody profile; Line immunoassay

抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)是以真核细胞各种细胞成分为靶抗原的器官非特异性自身抗体的总称,抗核内多种物质的特异性抗体谱即为ANA谱^[1]。抗核抗体不仅在多种自身免疫性疾病(autoimmune diseases, AIDs)患者血清中呈不同程度的阳性,并且还存在于在许多疾病如胆汁淤积性肝硬化、糖尿病和某些肿瘤(如卵巢癌、肺癌等)患者的血清中^[2-5]。ANA谱的检测对于自身免疫性疾病诊断、鉴别诊断、疾病活动性判断及疗效评估等具有重要意义。

目前国内实验室对抗核抗体靶抗原确认的方法主要有间接荧光免疫法、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)以及免疫印迹法(line immunoassay, LIA)等,但以上方法尚未能全自动化操作及定量检测^[2]。随着免疫学检测技术的发展,ANA谱的检测已进入定量时代^[6]。具有全自动、定量、随机上样以及检测线性范围宽等优势纳米磁微粒化学发光免疫分析(magnetic nanoparticle chemiluminescence immunoassay, NM-CLIA)检测技术广泛应用于临床样本检测。本研究采用NM-CLIA方法对临床不同疾病组样本进行血清抗干燥综合征抗原A60(anti-Sjogren syndrome A60, SSA60)抗体、抗干燥综合征抗原A52(anti-Sjogren syndrome A 52, SSA52)抗体、抗抗干燥综合征抗原B(anti-Sjogren syndrome B, SSB)抗体、抗双链DNA(double-stranded DNA, ds-DNA)抗体、抗核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)抗体、抗史密斯(Smith, Sm)抗体、抗着丝点蛋白B(centromere protein B, CENPB)抗体、抗核糖体P蛋白(ribosome P protein, Rib-p)抗体、抗核小体(nucleosome, Nuc)抗体以及抗组蛋白(histone, His)抗体检测,探讨其在抗核抗体谱检测中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2016年10月至2018年2月南方医科大学第三附属医院住院和门诊中诊断为AIDs患者的血清1 037例,其中住院732例,门诊305例;男性306例,女性731例。所有入组样本均已明确诊断为AIDs,并且剔除重复样本。同时收集南方医科大学第三附属医院健康体检者血清200例,男性67例,女性133例,所有受检者的具体临床资料见表1。

表1 1 237例受检者的临床资料

组别	例数	男	女	男女比例	年龄(岁)
系统性红斑狼疮	695	89	606	1:6	8~84
干燥综合征	118	98	20	5:1	19~60
类风湿关节炎	97	15	82	1:5	9~73
硬皮病	89	76	13	6:1	9~42
皮炎	38	28	10	3:1	18~68
健康体检者	200	67	133	1:2	20~69

1.2 仪器与试剂 NM-CLIA自身抗体检测系统,包括全自动化学发光分析仪(LumiRay 1260)以及10项抗核抗体谱检测试剂(苏州浩欧博生物医药有限公司)。LIA检测系统,包括ANA谱测定试剂盒(德国殴蒙医学诊断股份公司),殴蒙EUROBlot One免疫印迹仪及EUROBlot判读软件。第三方验证:酶联免疫吸附法检测试剂盒(殴蒙医学诊断股份公司)及BioRad-iMark酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司)。

1.3 方法 NM-CLIA检测血清10项抗核抗体流程严格按照试剂说明书进行,所有抗体检测试剂均在配套的全自动化学发光分析仪(LumiRay 1260)上开展检测。LIA检测10项抗核抗体:将膜条放入温育槽内,加入1.5 mL样本缓冲液,于室温在摇摆摇床上温育5 min;吸去温育槽中的液体后,在温育槽中分别加入1.5 mL已稀释的血清样本,室温温育30 min;在温育槽中加入1.5 mL已稀释的酶结合物(碱性磷酸酶标记的抗人IgG),于摇摆摇床上室温温育30 min;清洗缓冲液清洗膜条3次,每次5 min;在温育槽中加入1.5 mL底物液,室温温育10 min,吸去槽内液体,用蒸馏水清洗膜条3次,每次1 min。结果判断:将检测膜条放置在结果判定模板中,风干后判断结果。ELISA法将稀释血清(1:100)、阳性对照、阴性对照以及校准品各100 L加入微孔板中,室温温育1 h;清洗缓冲液洗4次,在微孔板中加100 L酶标抗人IgG,室温温育30 min;清洗缓冲液洗4次,在微孔板中加100 L底物液,避光显色15 min;向微孔板中加入100 L终止液,在酶标仪上进行吸光度测量。

1.4 统计学方法 应用SPSS21.0软件进行数据处理。计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。两种方法检测结果一致性分析采用Kappa检验。当 $Kappa<0.4$,一致性强度较差; $0.4<Kappa<0.75$,两者一致性一般; $Kappa>0.75$ 两者一致性较好。当两种方法学检测结果一致性强度较差时,差异样本经第三方试剂验证的结果与NM-CLIA和ELISA检测结果分别采用配对McNemar检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NM-CLIA在健康体检组中的检测特异性 应用NM-CLIA对200例健康体检者的血清进行10种抗核抗体谱检测,结果显示,NM-CLIA对10种抗核抗体的检测均具较好的特异性,且都在95%以上,见表2。

2.2 不同检测方法对AIDs患者ANA谱的检出率比较 应用LIA对1 037例标本进行平行检测,检测结果显示,NM-CLIA和LIA针对抗SSA60抗体、抗SSA52抗体、抗SSB抗体、抗ds-DNA抗体、抗RNP抗体、抗Sm

表2 NM-CLIA 在健康体检组中的检测特异性(n=200)

检测项目	阳性例数	特异性(%)
SSA60	5	97.5
SSA52	7	96.5
SSB	1	99.5
ds-DNA	9	95.5
RNP	4	97.0
Sm	5	97.5
CENP-B	0	100.0
Rib-p	2	99.0
Nuc	4	97.0
His	3	98.5

抗体、抗CENPB抗体、抗Rib-p抗体、抗Nuc抗体、抗His抗的检测具有基本相当的抗体检出率,见表3。

2.3 不同方法检测 AIDs 患者 ANA 谱的符合率

表3 不同检测方法对不同靶抗原患者血清 ANA 检出率比较[例(%)]

靶抗原	NM-CLIA				LIA			
	SLE 阳性	SS 阳性	SSc 阳性	其他阳性	SLE 阳性	SS 阳性	SSc 阳性	其他阳性
SSA60	443 (63.7)	86 (71.2)	44 (42.4)	15 (11.1)	464 (66.8)	84 (67.2)	44 (42.4)	15 (11.1)
SSA52	418 (60.1)	76 (64.4)	23 (25.8)	18 (13.3)	434 (62.4)	75 (63.6)	24 (26.9)	18 (13.3)
SSB	91 (13.1)	46 (38.9)	1 (1.1)	1 (0.1)	94 (13.5)	52 (44.1)	1 (1.1)	1 (0.1)
ds-DNA	289 (41.0)	9 (7.6)	3 (3.4)	2 (1.5)	225 (32.4)	7 (5.9)	3 (3.3)	2 (1.5)
RNP	253 (36.4)	7 (5.9)	5 (5.6)	12 (8.8)	227 (32.7)	7 (5.9)	5 (5.6)	12 (8.8)
Sm	117 (16.8)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.1)	95 (13.7)	1 (0.8)	0 (0)	0 (0)
CENP-B	72 (11.7)	18 (15.3)	11 (12.4)	2 (1.5)	62 (8.9)	16 (13.6)	9 (10.1)	2 (1.5)
Rib-P	139 (18.5)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)	197 (28.3)	0 (0)	1 (0.1)	1 (0.1)
Nuc	218 (31.4)	1 (0.8)	0 (0)	1 (0.1)	199 (28.6)	1 (0.1)	0 (0)	1 (0.1)
His	70 (10.1)	0 (0)	0 (0)	9 (6.7)	85 (12.2)	1 (1.8)	0 (0)	12 (8.9)

表4 不同方法检测 1 037 份血清 ANA 谱的符合率比较

NM-CLIA	分类	LIA		阳性符合率(95% CI)	阴性符合率(95% CI)	总符合率(95% CI)	Kappa 值	P 值
		阳性	阴性					
SSA60	阳性	565	23	93.1	94.8	94.7	0.89	<0.05
	阴性	42	417	89.0~96.2	93.6~97.0	92.6~96.9		
SSA52	阳性	509	26	92.4	94.7	93.4	0.86	<0.05
	阴性	42	460	90.7~93.1	93.1~95.2	92.9~93.9		
SSB	阳性	122	17	82.4	98.1	95.9	0.83	<0.05
	阴性	26	872	81.7~82.9	97.3~99.0	95.0~96.9		
ds-DNA	阳性	211	92	89.0	88.6	89.6	0.72	<0.05
	阴性	16	718	87.7~91.1	84.5~87.1	86.8~90.0		
RNP	阳性	230	47	91.3	94.0	93.3	0.88	<0.05
	阴性	22	738	90.8~92.3	93.6~95.3	92.8~94.3		
Sm	阳性	79	40	82.2	95.7	94.5	0.64	<0.05
	阴性	17	901	79.2~85.9	94.5~96.8	92.1~96.9		
CENP-B	阳性	91	12	91.9	98.7	98.1	0.90	<0.05
	阴性	8	926	89.3~93.7	97.6~99.4	97.9~99.0		
Rib-p	阳性	125	15	62.8	98.2	90.8	0.52	<0.05
	阴性	74	817	59.9~64.4	95.0~99.8	83.6~97.4		
Nuc	阳性	173	47	86.1	94.3	92.7	0.81	<0.05
	阴性	28	789	85.8~88.0	94.1~96.3	90.0~95.5		
His	阳性	71	8	72.4	99.1	96.4	0.80	<0.05
	阴性	27	921	70.2~76.8	98.6~99.7	93.9~83.2		

比较 两种方法在检测抗 SSA60 抗体、抗 SSA52 抗体、抗 SSB 抗体、抗 RNP 抗体、抗 CENPB 抗体、抗 Nuc 抗体和抗 His 抗体时,表现出良好的一致性(Kappa 值分别为 0.89、0.86、0.83、0.88、0.90、0.81、0.80),而在检测抗 ds-DNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗 Rib-p 抗体时一致性一般(Kappa 值分别为 0.72、0.64、0.52),三种抗体均为 SLE 特异性抗体,见表 4。两种方法在检测抗 ds-DNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗 Rib-p 抗体时,差异样本分别为 108 例、57 例、89 例,针对差异样本进一步采用第三方试剂(ELISA)开展对比验证,结果显示:NM-CLIA 法与 ELISA 在检测抗 ds-DNA 抗体、抗 Sm 抗体、抗 Rib-p 抗体时,检测结果比较差异均无统计学意义($P>0.05$); LIA 法与 ELISA 法在检测以上三种抗体时的结果比较差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

表5 差异样本经ELISA验证结果分析

靶抗原	检测方法	例数	ELISA		P值	
			+	-	NM-CLIA与ELISA比较	LIA与ELISA比较
ds-DNA	NM-CLIA+/LIA-	92	78	14	>0.05	<0.05
	NM-CLIA-/LIA+	16	7	9		
Sm	NM-CLIA+/LIA-	40	33	7	>0.05	<0.05
	NM-CLIA-/LIA+	17	4	13		
Rib-P	NM-CLIA+/LIA-	15	9	6	>0.05	<0.05
	NM-CLIA-/LIA+	74	11	63		

3 讨论

AIDs是由于免疫耐受功能缺失,机体不能区分自身抗原和外源性抗原转而攻击人体正常的组织和细胞产生病理性免疫应答,最终导致全身组织器官损伤的一类疾病^[7]。AIDs的诊断以及病情评估很大程度上依赖于患者血清自身抗体的检测,早期正确的诊断对于降低AIDs患者的死亡率和致残率、提高患者生活质量具有重要的意义。

目前国内大多数临床实验室采用LIA检测ANA谱,该法为定性检测、检测项目绑定、结果判读主观性强且很难实现随机上样,因此限制了ANA谱检测的临床应用价值^[8]。近年来,随着免疫学检测技术的发展,具有全自动、定量、随机上样以及检测线性范围宽等优势的全自动纳米磁微粒化学发光(NM-CLIA)检测技术广泛应用于临床样本检测,这是目前使用的其他检测方法望尘莫及的^[9-10]。

本研究结果显示NM-CLIA在检测血清中10个常见自身抗体时具有较高特异性,均达95%以上,并与LIA具有相当的检出率,以往文献报告相关抗体的发生率及特异性基本一致;两种方法在检测抗SSA60抗体、抗SSA52抗体、抗SSB抗体、抗RNP抗体、抗CENPB抗体、抗Nuc抗体和抗His抗体时,表现出良好的一致性(Kappa>0.75),而在检测抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗Rib-p抗体时一致性一般(0.4<Kappa<0.75),针对差异样本进一步采用第三方试剂(ELISA)开展对比验证,结果显示NM-CLIA与ELISA在检测抗ds-DNA抗体、抗Sm抗体、抗Rib-p抗体时具有可比性(P>0.05),而LIA则相反。以上结果可能是由于^[11]:(1)反应原理的不同所引起结果差异:与LIA方法学相比较,NM-CLIA中采用了生物素-亲和素放大系统保证了抗原的包被效率,小分子抗原经生物素化后,与亲和素修饰的纳米级磁微粒结合,使小分子抗原的三维结构充分展现出来,提高了检测敏感度;(2)反应体系的不同所导致的检测性能差异:LIA法将多种靶抗原同时包被在一条硝酸纤维膜上,在同一反应体系中

无法保证抗原抗体最充分的结合;而NM-CLIA为均一液相反应体系,具备更好的反应效率以及更彻底的清洗步骤,从而提高反应体系的特异性。与NM-CLIA相似,ELISA具有独立的反应体系,能保证反应充分完成。

综上所述,随着NM-CLIA的不断成熟,其在自身免疫性疾病诊断方面的应用,必将大大加快对各种自身抗体谱的检测速度和提高检测结果的准确性。

参考文献

- [1] Yoo IY, Oh JW, Cha HS, et al. Performance of an automated fluorescence antinuclear antibody image analyzer [J]. *Ann Lab Med*, 2017, 37(3): 240-247.
- [2] Birtane M, Yavuz S, Taştekin N. Laboratory evaluation in rheumatic diseases [J]. *World J Methodol*, 2017, 7(1): 1-8.
- [3] Amin K, Rasool AH, Hattem A, et al. Autoantibody profiles in autoimmune hepatitis and chronic hepatitis C identifies similarities in patients with severe disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(8): 1345-1352.
- [4] Tan L, Zhang Y, Jiang Y, et al. The clinical significance of anti-mitotic spindle apparatus antibody (MSA) and anti-centromereantibody (ACA) detected in patients with small cell lung cancer (SCLC) [J]. *Am J Clin Exp Immunol*, 2017, 6(2): 21-26.
- [5] Chatterjee M, Hurley LC, Levin NK, et al. Paraneoplastic antigens as biomarkers for early diagnosis of ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol Rep*, 2017, 20(4): 1-19.
- [6] 仲人前, 杨再兴. 自身抗体检测进入定量检测时代[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(8): 561-563.
- [7] Nagy G, Huszthy PC, Fossum E, et al. Selected aspects in the pathogenesis of autoimmune diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015(3): 351732.
- [8] Hanly JG, Su L, Farewell V, et al. Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol Methods*, 2010, 358(1-2): 75-80.
- [9] Zafrir Y, Gilburd B, Carrasco MG, et al. Evaluation of an automated chemiluminescent immunoassay kit for antinuclear antibodies in autoimmune diseases [J]. *Immunol Res*, 2013, 56(2-3): 451-456.
- [10] Bentow C, Lakos G, Rosenblum R, et al. Clinical performance evaluation of a novel, automated chemiluminescent immunoassay, QUANTA Flash CTD Screen Plus [J]. *Immunol Res*, 2015, 61(1-2): 110-116.

(收稿日期:2017-11-27)