

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.10.02

自身免疫病实验室诊断指标与技术的临床应用现状及进展*

詹皓婷^{1,2}, 李永哲^{1,2}(1. 中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100730; 2. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要:自身免疫病实验室诊断指标能够帮助临床早期筛查识别患者, 监测疾病活动与组织器官损伤, 对患者的分型诊断、预后和治疗反应评估意义重大。近年来, 自身免疫病实验室诊断技术向自动化、高通量、智能化方向不断发展, 为疾病的实验室诊断提供了重要平台支撑。该文探讨自身免疫病实验诊断指标与技术的临床应用现状与研究新进展, 并对未来前景作出展望。

关键词:自身免疫病; 诊断; 生物标志物; 实验室技术

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

自身免疫病(autoimmune disease, AID)包含系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)、类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、系统性硬化(systemic sclerosis, SSc)、肌炎等 100 多种临床常见病, 一般累及血液、大脑、骨骼、肌肉等各系统、器官和组织, 通常临床表现具有重叠性、多样性与复杂性。目前, 国际指南所推荐的 AID 诊断标准是以特征性临床表现为判定基础, 并结合特定实验室指标异常^[1-2]。AID 实验室指标与检测技术在其诊断、治疗监测、病情评估、预后和预警具有重要价值。自身抗体是临床上诊断 AID 的重要标志物, 目前国际 AID 诊疗相关自身抗体检测项目有近 300 项, 而国内开展不足百项。重视 AID 基本实验室检测项目的推广普及与技术的质量管理, 开发诊断效能与经济效益更好的疾病早期诊断指标, 能够为临床诊疗提供更好的服务。本文将结合 AID 实验室诊断指标与技术的临床需求及应用展开综述。

1 AID 实验诊断指标的临床需求及应用

人体免疫系统是覆盖全身的防卫网络, 该网络中任何一个环节出现问题均可导致免疫相关疾病。

1.1 补体 补体功能障碍可造成宿主防御和炎症反应的失衡, 导致自身免疫病的发生。在补体水平下降时, 免疫复合物清除不足会使循环免疫复合物增多, 伴随高浓度的凋亡细胞, 触发体液免疫反应

从而导致炎症及组织损伤^[3]。C1q 降低是 SLE 患者常见的实验室表现, 通常具有严重的疾病表型^[4]。抗 C1q 抗体可在 28%~60% SLE 患者体内检出, 并与低 C3、C4 补体、增生性狼疮性肾炎和疾病活动度相关, 该抗体与抗双链 DNA 抗体和低补体联合检测是预测肾脏受累的良好血清学指标^[5]。近 40% 的 C2 缺乏患者会发生症状较轻的 SLE, 该疾病也与补体成分(膜攻击复合物、C5-C9)减少有关^[6]。C4 缺乏与 1 型糖尿病、原发性胆汁性胆管炎密切相关^[7]。值得注意的是, 补体调节因子如补体受体 1 和补体受体 2 在 B 细胞受体诱导细胞增殖、B 细胞向浆母细胞的分化及免疫球蛋白产生中起到关键性作用。目前研究发现, SLE 与 RA 患者 B 细胞的补体受体 1 与 2 表达均减少, RA 关节滑液中补体裂解产物 C3a、C5a、C5b-9 水平明显升高^[7-8], 表明补体系统广泛参与 AID 的致病进程中。

1.2 细胞因子 细胞因子失调引起免疫功能障碍, 最终导致的组织炎症和器官损伤是 AID 的共有特征, 且通常先于临床疾病的进展, 因此, 对于细胞因子水平的早期监测能够预警疾病发生。可溶性细胞因子 IL-5、IL-6 与抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)的联合检测相较于单独检测相应细胞因子, 对 SLE 进展预测效能更为显著; ANA 阴性但 IL-5、IL-6 升高的患者更容易发生狼疮性肾炎^[9]。由此可见, 细胞因子与自身抗体谱共同检测可以作

* 基金项目:国家重点研发计划(2018YFE0207300);国家自然科学基金(81871302);北京市临床重点专科医学检验科卓越项目(ZK201000)。

作者简介:詹皓婷, 1998 年生, 女, 博士研究生, 研究方向:自身免疫病发病机制及实验诊断技术临床应用研究。

通信作者:李永哲, 研究员, 教授, E-mail: yongzhelipumch@126.com。

为预测临床疾病表型和病情严重程度的实验室指标。检测细胞因子谱能够对患者进行疾病活动度分组:疾病活动期患者 IL-10、IL-17、IL-21、IFN- α 、B 细胞激活因子(B-cell activation factor, BAFF)相较于静止期明显升高^[10]。连续 IFN- γ 诱导蛋白 10 (IFN- γ inducible protein 10, IP-10) 水平变化能够在抗双链 DNA 抗体阴性且补体水平不变的情况下提示 SLE 活动状态,因此可作为比标准血清学检测项目更加敏感的监测疾病活动度的标志物^[11]。皮炎(dermatomyositis, DM)患者肌肉和血清中 IL-18 上调,与疾病活动度、抗黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation associated gene 5, MDA5) 抗体相关间质性肺炎(interstitial lung disease, ILD)联系紧密,免疫抑制剂治疗后肌肉组织 IL-18 上调减少^[12],这提示 IL-18 在 DM 中有潜在预后和治疗价值。

1.3 免疫细胞 免疫细胞在 AID 的实验室检查中起关键作用。据报道,RA 患者外周血中 CXCR5⁺ ICOS⁺ CD4⁺ 的 T 滤泡辅助细胞数目与抗瓜氨酸化蛋白抗体(anti-citrullinated peptide antibodies, ACPA)滴度和总体疾病严重程度相关;CD86⁺ B 细胞数量与疾病活动度评分呈正比,在药物治疗 1 个月后占比下降^[13]。我国大约 3% 的 SLE 患者体内含有 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 的 T 细胞,这一细胞亚群与 SLE 全身疾病活动性、抗双链 DNA 抗体滴度以及皮肤、血液及关节受累等临床表现呈正相关^[14]。这提示免疫细胞表面标志物的流式分析对疾病的诊断与预后具有重要意义。近期对于 DM 合并 ILD 的研究显示,患者外周血 CD4⁺ CXCR4⁺ T 细胞明显增加并分泌高水平 IL-21,刺激成纤维细胞的增殖^[15],预示 DM 的肺纤维化进程。

1.4 自身抗体 自身抗体作为特异性标志物是对 AID 诊断和分类标准中临床表现的详实补充。2010 年美国风湿病学会(American College of Rheumatology, ACR)/欧洲抗风湿病联盟(European League Against Rheumatism, EULAR)利用积分的方法对 RA 临床参数进行定量描述^[1],根据血清学 RA 特异性自身抗体 ACPA 和类风湿因子(rheumatoid factor, RF)的存在和滴度最多给予 3 分,若患者总评分 ≥ 6 分且可排除其他原因导致的滑膜炎即可诊断为 RA。2019 年 EULAR/ACR 分类标准是敏感性、特异性最高的组合^[2],其要求 ANA 滴度 $\geq 1:80$ 作为先行诊断标准;对于 ANA 阴性 SLE:低补体 C3/C4 水平和/或 SLE 特异性抗体(抗双链 DNA

抗体、抗 sm 抗体)及抗磷脂抗体[抗心磷脂抗体、抗 β_2 -糖蛋白 I (anti- β_2 -glycoprotein I, β_2 GP I) 抗体、狼疮抗凝物],分别以最高 4 分、6 分和 2 分的权重作为 ANA 替代进入分类标准中。抗 Ro/SSA 抗体检测在 2017 ACR/EULAR 原发性干燥综合征(primary Sjögren's syndrome, pSS)诊断标准中与病理活检金标准占有相等的分数比重^[16],以上均标志免疫学指标检测对于指导 AID 临床诊断的巨大飞跃。

自身抗体在疾病分层分型中亦得到临床重视,致病性抗双链 DNA 抗体能在 70%~80% SLE 患者体内出现,与抗 sm 抗体、抗 C1q 抗体、抗 α -肌动蛋白抗体共同表征狼疮肾炎的出现与发展;抗 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)抗体、抗磷脂抗体分别与脑损伤、凝血障碍和流产风险密切相关^[17]。在 AID 进程中,抗 RNA 聚合酶 III 抗体、抗 Scl-70 抗体和抗核仁抗体(抗 Th/To、抗 U3RNP、抗 PM/scl 抗体)、抗着丝粒抗体的存在分别是 SSs 肾危象与合并肿瘤、严重肺间质病变、肺动脉高压的危险预后因素^[18],因此定期检测疾病特异性抗体在预测疾病严重程度、器官受累与疾病预后评估方面的意义重大。

在疾病预警方面,自身抗体谱(ANA、RF、抗 Ro60/SSA 抗体、抗 Ro52/SSA 抗体和抗 La/SS-B 抗体)可在 pSS 患者临床疾病发作多年前识别高危个体^[19]。近年,自身抗体可用于识别炎症疾病的严重程度与不良预后结局,血清抗心磷脂抗体 IgA、抗 β_2 GP I 抗体 IgA 和 IgG 在重症新型冠状病毒肺炎患者体内一过性升高且伴随脑梗死的发生^[20-21],所以对抗磷脂抗体阳性的新型冠状病毒肺炎患者进行长期随访对监测、预防性治疗血栓并发症具有重要意义。

自身抗体的检测与应用在 AID 的预警、分型诊断、预后方面占据不可替代的临床价值,目前国外临床常规自身抗体检测项目已达 300 种以上,而国内相关检测项目少、普及度低且定性检测多,国际 AID 诊疗指南仅囊括病程中 10% 的自身抗体检测。早期、及时和准确的诊断在 AID 治疗中可以防止或显著减缓疾病进展,挽回无法修复的组织器官损伤,故而亟需在国内基层医院推广普及基本免疫检测项目并完善全国 AID 分级诊疗制度,同时在 AID 诊疗指南、分型标准中加强疾病、器官特异性自身抗体所占权重。

2 自身免疫病实验诊断新指标的临床应用

2.1 补体谱 免疫复合物引起的补体过度活化可能是 AID 发病机制的一部分。既往观点认为:单个补体成分 C1q、C3、C4 的产生先于病情恶化,可以用于鉴别诊断和监测疾病活动;补充检测抗 C1q 抗体和抗 C3 抗体能增添确诊证据。SLE 急性发作时 C3、C4 和 B 因子等成分被消耗,导致溶血功能下降,由此产生的 C3d, g, C3a 和 sC5b5-9 和疾病活动度评分呈正向增加趋势并达峰值^[22]。有学者证明补体旁路途径亦参与 AID 的致病进程:H 因子作为疾病保护因子可以识别狼疮性肾炎病理学类型且与 ANA、抗双链 DNA 抗体负相关;B 因子作为致病危险因子可以特异性辨别活动期狼疮性肾炎^[23]。最近,一项关于抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎补体谱的研究^[24]发现,B 因子、H 因子水平与病程 6 个月的血管损伤指数呈正相关,D 因子则与疾病 6~12 个月的血管损伤程度呈负相关;C5a/C5 比值高的患者中性粒细胞百分比和 IgG 水平升高。利用补体谱进行聚类分析可将 15 种补体聚合为替代途径(B 因子、H 因子)与经典途径(C2、C5a、C3)相关的 2 条病理通路,主成分分析能识别出镜下多血管炎和肉芽肿病合并多血管炎的病理异质性。由此可见,对于 AID 补体谱的分析有助于辨别疾病损伤严重程度和发病机制,结合抗补体成分抗体检测有助于临床对疾病的早期监管及进一步制定个体化治疗方案。目前对于补体变化谱系的研究相对较少,有潜力进一步推广至其他 AID 疾病的实验室诊疗过程中。

2.2 蛋白质标志物 传统血清学自身抗体标志物结合临床症状与影像学证据有助于诊断 AID 患者,然而由于疾病的多样化表现,临床易将早期或血清学阴性的患者误诊、漏诊,此时寻找具有更高敏感性和特异性的标志物有利于提高 AID 诊疗准确性、有效预测疾病转归。免疫蛋白分子因其经济、便于检测,敏感准确地反映早期细胞内代谢状态的优点,被集中开发并广泛应用于 AID 的实验室诊断中。

14-3-3 η 作为新型蛋白质标志物,可在早期 RA 患者关节滑液和血清中被检出,与关节糜烂和疾病进展密切相关,并随非甾体抗炎药和糖皮质激素治疗变化,反映其在监测治疗效果的应用价值^[25-26],所以 14-3-3 η 蛋白不仅可以与其他血清学指标 ACPA、RF 相结合增加 RA 早期诊断效能,也能作为告知临床疾病预后治疗效果的补充诊断指标。基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase 3,

MMP-3) 由关节滑膜成纤维细胞和关节软骨合成,在结缔组织重塑中起到关键作用,是反映 RA 疾病分期、放射学骨损伤与侵蚀、关节外非骨骼器损伤如甲状腺炎、疾病结局和治疗失败的可靠标志物^[27]。

IgG₄ 相关疾病 ANA 滴度低,抗可溶性抗原(extractable nuclear antigen, ENA) 抗体和抗双链 DNA 抗体通常为阴性,这限制了使用自身抗体对该病进行诊断。其最典型实验室表现是约 2/3 患者血清 IgG₄ 升高(>135 mg/dL),其中腹膜后和主动脉表型 IgG₄ 最低,而唾液腺、肾脏和全身受累患者的 IgG₄ 水平最高且与器官受累程度和复发风险相关。IgG₄ 能够以 90% 的敏感性发现 IgG₄ 相关疾病患者,但是由于 IgG₄ 滴度升高通常见于以慢性免疫激活为标志的多种疾病,其诊断特异性较低,仅为 60%。当 IgG₄/总 IgG 或 IgG₄/IgG₁ 比值分别升高(>10% 或 24%) 时,诊断特异性得到了明显的提升^[28-29]。这启示临床研究可以通过比值的差异放大效应来提升实验室指标对疾病的诊断效能。

涎液化糖链抗原(Krebs von den Lungen-6, KL-6) 是一种在 II 型肺泡上皮细胞和细支气管上皮细胞中表达的高分子量黏液糖蛋白,参与促进肺纤维细胞的存活、迁移与增殖过程,由于 KL-6 的分子量较 SP-D 大,其很难在疾病早期被肺泡毛细血管清除。血清 KL-6 作为非特异性纤维化标志物在各种肺间质疾病(自身免疫病、特发性肺纤维化、放射性肺炎、药物性肺炎) 中升高,因此其在风湿免疫科、呼吸科、肿瘤科监测以肺泡上皮损伤为特征的疾病时具有极大应用前景。在 SSc 合并 ILD 中, KL-6 血清水平可以用于肺损伤严重程度和功能评估, KL-6>500 U/mL 识别患者敏感性、特异性分别为 79% 和 93%; KL-6>1 000 U/mL 的患者 5 年内死亡率明显上升; KL-6>2 000 U/mL 对糖皮质激素和环磷酰胺治疗应答较差^[30]。实现 KL-6 指标在病程中的连续监测能够反映患者肺功能、肺损伤的动态变化,减少患者因多次放射检查引发的健康与经济负担。

虽然国际诊疗指南已对上述蛋白质标志物的诊断效能实施认可:2016 年,日本就已经将 MMP-3 写入 RA 诊疗指南中。血清 IgG₄>135 mg/dL 被写入 2012 年 Umehara 等提出的 IgG₄ 相关疾病的综合诊断标准^[31]。日本呼吸学会、风湿病学会已认可 KL-6 在间质性肺炎、药物性肺炎用药前中后监测、甲氨蝶呤用药前筛查与服药后监测等的应用价值。

2018 年中国结缔组织病相关间质性肺病诊断和治疗专家共识亦推荐 KL-6 用于不同结缔组织病相关间质性肺病的早期筛查、诊断、病情和疗效评估中。但是现行仍需要评估多种蛋白质标志物如 14-3-3 η 、铁蛋白、补体谱、细胞因子等在 AID 早期筛查、诊断、病情和疗效评估及预后判断中的地位,推动 AID 及高频并发症如 ILD 的精准诊疗。

2.3 自身抗体标志物 自身抗体与疾病本身或疾病的临床表型显著相关且具有一定的排他性,不仅能帮助临床了解疾病的不同病理生理过程,而且有助于疾病的筛查和早期诊断、预后预测和治疗决策。尽管各种疾病相关自身抗体已经被学者广泛研究,但只有少数几种进入诊疗指南并在临床上应用,实践中亟需填补依指南血清阴性患者的抗体检测空缺,开发出更多高敏感性、高特异性的抗体标志物。

抗氨基甲酰化蛋白(carbamylated protein, CarP)抗体存在于 38%~73% 的早期 RA 患者,可作为 RA 更严重损伤与进展的预测因子,并可能与更严重的病程和死亡结局相关。不仅如此,这种新型抗体还能作为内皮功能障碍的指标,显示关节外亚临床动脉粥样硬化的发病风险^[32]。但由于该抗体检测缺乏标准化规制,限制了该抗体的临床解释与应用。抗肽酰基精氨酸脱亚氨酶 4(peptidylarginine deiminase type 4, PAD4)抗体是一种与抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibody, anti-CCP)关联的早期诊断工具,对识别 RA 患者具有很高的特异性(91%~99%)且体现关节侵蚀程度,但敏感性低(25%~50%)^[33]。相似地,一项荟萃分析表明:抗瓜氨酸化 α -烯醇酶肽(citrullinated α -enolase peptide, CEP)抗体亦具有敏感性低(44%, 95%CI: 38%~51%)但特异性高(97%, 95%CI: 96%~98%)的特点,与骨侵蚀和 ILD 风险增加相关^[34]。这突出了上述抗体作为排他标志物补充应用于诊断和预后检测的价值。联合抗 PTX3 抗体和抗 DUSP11 抗体可以提高 ACPA 阴性 RA 患者的诊断效能(敏感性 38%, 特异性 88.72%),这种理想有效的联合检测方法有潜力改善 RA 患者的早期治疗和干预^[35]。

二十余种新型肌炎相关自身抗体(myositis-specific autoantibody, MAA)与肌炎特异性自身抗体(myositis-specific autoantibody, MSA)被广泛证明与特定临床表现相关并帮助肌炎患者进行更详细的临床分型:抗合成酶抗体综合征与抗 Ha、Jo-1、Zo、

OJ、PL12、KS、PL7、EJ 抗体密切相关;抗 PM/scl、U1RNP、Ro52、Ku、TIF-1 γ 抗体确定关联恶性肿瘤存在。抗 MDA5 抗体显示临床不良预后和 ILD 的发生;抗 HMGCR 抗体阳性患者对免疫治疗反应良好但停药后有复发趋势^[36-37],因此,肌炎抗体谱还可能有助于预测其他临床并发症和治疗反应。然而由于抗原与塑料平板的结合会导致某些构象表位的丢失,目前商用的 ELISA 试剂盒只能检测到数量有限的 MSA/MAA。

自身抗体谱在各种神经系统自身免疫病的诊断与预测作用亦不容小觑,针对胞内抗原(Hu、Ma2、GAD)、突触受体(NMDA、AMPA、GABAB、mGluR5)及离子通道和其他细胞表面蛋白(LGI1、AQP4、MOG)的抗体可用于诊断自身免疫性脑炎和预警并发的副瘤综合征(如小细胞肺癌、卵巢畸胎瘤、胸腺瘤和淋巴瘤等)^[38]。抗 NF155、NF140/186、CNTN1 抗体谱中任一阳性患者常发生周围神经受累症状,同时体现对于静脉用免疫球蛋白、糖皮质激素或利妥昔单抗的治疗反应性^[39-40]。重症肌无力患者中,抗 AChR 抗体阳性率最高(80%~85%),与疾病严重程度相关,伴发胸腺异常和胸腺瘤;抗 Musk 抗体反映疾病活动度;抗 Kv1.4 抗体能预测临床严重症状、心脏受累与肌无力危象;抗 Agrin 抗体有望成为监测治疗反应的标志物^[41]。这提示抗体谱检测对于神经系统脱髓鞘疾病及副瘤综合征的临床应用前景。

在 1 型糖尿病中,胰岛自身抗体在疾病发作前形成,通常用于识别具有发病风险的个体。抗锌转运子 8(ZnT8)自身抗体作为其中之一,可以对胰岛素自身抗体(insulin autoantibodies, IAA)、抗谷氨酸脱羧酶抗体(anti-glutamic acid decarboxylase antibody, GADA)、酪氨酸磷酸酶 2 抗体(anti-tyrosine phosphatase 2 antibody, IA-2A)单独阳性的个体进行早期风险分层^[42];其与胰腺移植后迅速发生的高血糖和最终的移植功能丧失相关,使其成为预测 β 细胞丢失和胰岛素分泌功能丧失的有效标志物^[43],但其在普通人群中对 1 型糖尿病的预测价值尚未充分评估。抗四跨膜蛋白 7(tetraspanin 7, TSPAN7)自身抗体的应用受到阳性率低的影响,该抗体的测定对儿童早期 1 型糖尿病患者体内存在的 β 细胞自身抗体的诊断附加价值有限,故不能辅助患者风险分层;相反地,抗 TSPAN7 抗体阳性与低 C 肽水平相关^[44-45],表明其对预测成人隐性糖尿病的 β 细胞功能下降有价值。由于 TSPAN7 表

位的复杂性和疏水性,目前很难找到一种平衡抗 TSPAN7 抗体敏感性和特异性的检测方法。

在 AID 发病之前,通常会出现一个无临床症状但免疫功能紊乱的阶段,自身抗体的检测为识别临床极早期阶段与风险划分、研究疾病的发病机制及预防和治疗提供了一个机会。抗体谱的测定可以平衡各种抗体的优劣,为疾病临床分型、治疗分组、预后监测提供思路。需要注意的是,虽然新型标志物不断涌现,但因为某些抗体的复杂表位与空间构象令其难以简单使用商用试剂盒进行批量检测,开发兼具敏感性和特异性的检测手段、推广新型抗体的临床应用势在必行。

2.4 基因标志物伴随诊断 AID 患者在使用免疫抑制抑制剂或其他生物制剂进行治疗时,其治疗有效性和安全性受到患者单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点、多态性和基因突变差异不同程度的影响。不同亚甲基四氢叶酸还原酶(5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)基因多态性的 RA 患者对于甲氨蝶呤的治疗反应性大不相同。一项荟萃分析表明, *MTHFR C677T* 多态性与甲氨蝶呤在 RA 患者中的毒性增加有关,但与疗效无关;在东亚和高加索患者群体中, *MTHFR 677TT* 基因型反映总体甲氨蝶呤毒性,在患者补充叶酸后毒副风险显著增加^[46]。因此, *MTHFR C677T* 多态性可作为预测 RA 患者服用小剂量甲氨蝶呤毒性的指标。他克莫司作为免疫抑制剂应用于预防和治疗排斥反应中:与不表达 *CYP3A5* 的患者比较,表达 *CYP3A5* 的个体他克莫司的剂量调整谷浓度低,巨大的药物代谢动力学差异可能导致目标血药浓度的延迟出现,需要增加他克莫司的治疗剂量^[47]。所以,建议在已知 *CYP3A5* 基因型的情况下,使用 *CYP3A5* 基因型指导他克莫司的初始治疗。别嘌醇是大多数痛风患者的一线降尿酸疗法,总体来说耐受性良好,但 *HLA-B*5801* 与别嘌醇相关严重皮肤不良反应的风险显著增加相关,美国风湿病学会建议在开始别嘌醇治疗前进行筛查以防止皮肤不良反应的发生^[48]。

发展药物基因组学,识别影响药物代谢与不良反应的基因标志物在 AID 患者的伴随诊断中意义重大,不仅有利于临床医生跟随诊断结果因人而异、量体择药,更有助于开发出精准预测、预警、预防药物毒副反应的策略。

3 自身免疫病实验检测技术临床应用

3.1 AID 标志物检测方法的发展 目前 AID 标志物的检测方法学已经完成了由定性到定量,由手工到自动化检测的过程。以抗体检测为例,总抗体检测已被更具临床应用价值的针对抗原表位的特异性抗体检测所取代。自身抗体检测技术也由 70 年代的人工单重检测方法(间接荧光法、western blot 法)逐步过渡到全自动多通道检测,发展为全自动微珠免疫法。抗 sm 抗体在 SLE 中具有重要诊断价值,根据 AID 诊断中抗体检测方法的推荐意见,建议直接采用化学发光免疫分析、酶联免疫分析、线性免疫分析检测靶抗原或先使用间接免疫荧光法进行初筛再确认靶抗原^[49]。2019 年全球 507 家实验室参与抗 sm 抗体室间质评项目评估,其中微珠免疫法占 40.2%,而依赖人工操作的线性/条带印迹法仅占 5.3%。这标志着临床实验室需求更加倾向高敏感性、高特异性、全自动、高通量的检测手段。随着微流控技术的沿革,微流控芯片逐步发展为可以融合样本处理纯化、反应标记及检测等涵盖多个实验步骤的功能化检测平台。开展自身抗体检测定量、高通量及智能化检测将进一步提高我国自身抗体检测效能。

3.2 临床应用现状 如今国内 ANA、ENA 抗体检测仍然以手工定性方法间接免疫荧光和免疫印迹法为主(>90%),室间检测结果差异较大,易受检测试剂、方法、仪器及实验室人员主观因素的影响。受检测医院经济因素的掣肘,利用间接免疫荧光定性筛查 ANA 后是否开展 ANA 靶抗原特异性抗体定量检测,大部分机构没有严格采取指南推荐的规范化检测程序^[49]。所以,需要完善与巩固我国与国际社会接轨的自身抗体检测标准化方法指南。同时,大量商品化试剂盒的出现使临床自身抗体检测需要规范化与标准化制约,质量控制工作得到了重视。然而,国内各试剂厂家检测抗体的抗原来源不同,国际主流产品占有量低,缺乏国际标准品与权威国产第三方质控品与产品之间大规模的性能比对与验证实验。高级别医院通常自建体系,自配质控品,开展质量控制活动。基层医院没有条件进行大规模、高频次质控,这使质量控制活动无法得到下沉普及。自身抗体检测质量尚不能满足临床需求,国内专业机构针对自身抗体检测的室内质控工作亟需加强。因此,推进我国 AID 诊疗检验项目标准化及质量管理至关重要。通过制定 AID 检测行业诊断标准,研发检测项目标准物质和室内、室

内质控品,可进一步推动实验室开展 AID 检测项目互认和标准化质量管理工作,提高我国 AID 诊疗检验项目的水平,为 AID 诊治提供支持。

随着越来越多 AID 自身抗体的涌现,疾病非特异性自身抗体、生理性及疾病前期存在自身抗体的临床解读为其实际应用带来困难。某些自身抗体如抗 TSPAN7 抗体抗原表位的复杂性、肌炎抗体谱会因固定方式不当带来表位丧失^[44],不同检测方法及检测程序对此类自身抗体的检测质量也存在假阳性或假阴性变异。为加强自身抗体的临床推广与应用,需要检验人员对不同临床表型的疾病检验项目的选择提出合理意见,选择合适实验手段严格按照专家意见或推荐指南进行检测,做好室内质控与室间质评,并对检验结果的临床意义为临床提供合理的解读指导。

4 展望

建立 AID 实验室指标的标准化检测和质量控制的方法指南与共识,推进实验室检测技术的自动化、高通量、多元化发展,通过新技术、多组学方法筛选诊断自身抗体以及其他新型标志物并促进临床转化应用,利用机器深度学习加速临床精准诊断与治疗将为 AID 实验室诊断提供新的支持。未来的 AID 检验实验室应该是兼具定性检测手段(间接免疫荧光法)、定量检测方法(酶联免疫、化学发光法)与高通量检测自身抗体(多重免疫微珠法),兼具流式细胞平台(T/B/NK 细胞亚群、细胞因子)和特种蛋白检测平台(IgG4、KL-6、MMP3)于一体的新型临床导向实验室。

5 参考文献

- [1] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9): 2569-2581.
- [2] Aringer M, Costenbader K, Daikh D, *et al.* 2019 European league against rheumatism/American college of rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2019, 71(9): 1400-1412.
- [3] Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, *et al.* Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency 2015[J]. *J Clin Immunol*, 2015, 35(8): 696-726.
- [4] Bossi F, Tripodo C, Rizzi L, *et al.* C1q as a unique player in angiogenesis with therapeutic implication in wound healing[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(11): 4209-4214.
- [5] Yin Y, Wu X, Shan G, *et al.* Diagnostic value of serum anti-C1q antibodies in patients with lupus nephritis: a meta-analysis[J]. *Lupus*, 2012, 21(10): 1088-1097.
- [6] Lintner KE, Wu YL, Yang Y, *et al.* Early components of the complement classical activation pathway in human systemic autoimmune diseases[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 36.
- [7] Conigliaro P, Triggianese P, Ballanti E, *et al.* Complement, infection, and autoimmunity[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2019, 31(5): 532-541.
- [8] Trouw LA, Pickering MC, Blom AM. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(9): 538-547.
- [9] Munroe ME, Lu R, Zhao YD, *et al.* Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75(11): 2014-2021.
- [10] Reynolds JA, McCarthy EM, Haque S, *et al.* Cytokine profiling in active and quiescent SLE reveals distinct patient subpopulations[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1): 173.
- [11] Kong KO, Tan AW, Thong BY, *et al.* Enhanced expression of interferon-inducible protein-10 correlates with disease activity and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 156(1): 134-140.
- [12] Yang Y, Yin G, Hao J, *et al.* Serum interleukin-18 level is associated with disease activity and interstitial lung disease in patients with dermatomyositis[J]. *Arch Rheumatol*, 2017, 32(3): 181-188.
- [13] Wang J, Shan Y, Jiang Z, *et al.* High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(2): 212-220.
- [14] Yin ZJ, Ju BM, Zhu L, *et al.* Increased CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T cells in Chinese systemic lupus erythematosus: correlate with disease activity and organ involvement[J]. *Lupus*, 2018, 27(13): 2057-2068.
- [15] Wang K, Zhao J, Chen Z, *et al.* CD4⁺CXCR4⁺T cells as a novel prognostic biomarker in patients with idiopathic inflammatory myopathy-associated interstitial lung disease[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 58(3): 511-521.
- [16] Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, *et al.* 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: a consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 69(1): 35-45.
- [17] Kiriakidou M, Ching CL. Systemic lupus erythematosus[J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(11): ITC81-ITC96.
- [18] Simms RW. Expert perspectives on clinical challenges; expert perspectives: challenges in Scleroderma[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(9): 1415-1426.
- [19] Jonsson R, Theander E, Sjöström B, *et al.* Autoantibodies present before symptom onset in primary Sjögren syndrome[J]. *JAMA*, 2013, 310(17): 1854-1855.
- [20] Zhang Y, Xiao M, Zhang S, *et al.* Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with covid-19[J]. *N Engl J Med*,

- 2020, 382(17): e38.
- [21] Xiao M, Zhang Y, Zhang SL, *et al.* Antiphospholipid antibodies in critically ill patients with COVID-19 [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(12): 1998-2004.
- [22] Nilsson B, Ekdahl KN. Complement diagnostics: concepts, indications, and practical guidelines [J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 962702.
- [23] Wang FM, Song D, Pang Y, *et al.* The dysfunctions of complement factor H in lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2016, 25(12): 1328-1340.
- [24] Fukui S, Ichinose K, Sada KE, *et al.* Complement profile in microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis; analysis using sera from a nationwide prospective cohort study [J]. *Scand J Rheumatol*, 2020, 49(4): 301-311.
- [25] Carrier N, Marotta A, de Brum-Fernandes AJ, *et al.* Serum levels of 14-3-3 η protein supplement C-reactive protein and rheumatoid arthritis-associated antibodies to predict clinical and radiographic outcomes in a prospective cohort of patients with recent-onset inflammatory polyarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 37.
- [26] Verschueren P, De Cock D, Corluy L, *et al.* Methotrexate in combination with other DMARDs is not superior to methotrexate alone for remission induction with moderate-to-high-dose glucocorticoid bridging in early rheumatoid arthritis after 16 weeks of treatment; the CareRA trial [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(1): 27-34.
- [27] Lerner A, Neidhöfer S, Reuter S, *et al.* MMP3 is a reliable marker for disease activity, radiological monitoring, disease outcome predictability, and therapeutic response in rheumatoid arthritis [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2018, 32(4): 550-562.
- [28] Perugino CA, Stone JH. IgG4-related disease: an update on pathophysiology and implications for clinical care [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(12): 702-714.
- [29] Lanzillotta M, Mancuso G, Della-Torre E. Advances in the diagnosis and management of IgG4 related disease [J]. *BMJ*, 2020, 369: m1067.
- [30] Bonhomme O, André B, Gester F, *et al.* Biomarkers in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease: review of the literature [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, 58(9): 1534-1546.
- [31] Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, *et al.* Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011 [J]. *Mod Rheumatol*, 2012, 22(1): 21-30.
- [32] Giacomelli R, Afeltra A, Alunno A, *et al.* Guidelines for biomarkers in autoimmune rheumatic diseases-evidence based analysis [J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(1): 93-106.
- [33] Reyes-Castillo Z, Muñoz-Valle JF, Llamas-Covarrubias MA. Clinical and immunological aspects of anti-peptidylarginine deiminase type 4 (anti-PAD4) autoantibodies in rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(2): 94-102.
- [34] Li HL, Li LB, Liu CX, *et al.* Diagnostic value of anti-citrullinated α -enolase peptide I antibody in patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Rheum Dis*, 2021, 24(5): 633-646.
- [35] Li KT, Mo WX, Wu LJ, *et al.* Novel autoantibodies identified in ACPA-negative rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80(6): 739-747.
- [36] McHugh NJ, Tansley SL. Autoantibodies in myositis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(5): 290-302.
- [37] Damoiseaux J, Vulsteke JB, Tseng CW, *et al.* Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: Clinical associations and laboratory evaluation by mono- and multispecific immunoassays [J]. *Autoimmun Rev*, 2019, 18(3): 293-305.
- [38] Graus F, Titulaer MJ, Balu R, *et al.* A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(4): 391-404.
- [39] Pascual-Goñi E, Martín-Aguilar L, Querol L. Autoantibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy [J]. *Curr Opin Neurol*, 2019, 32(5): 651-657.
- [40] Lehmann HC, Burke D, Kuwabara S. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: update on diagnosis, immunopathogenesis and treatment [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019, 90(9): 981-987.
- [41] Gilhus NE, Tzartos S, Evoli A, *et al.* Myasthenia gravis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 30.
- [42] Yu L, Boulware DC, Beam CA, *et al.* Zinc transporter-8 autoantibodies improve prediction of type 1 diabetes in relatives positive for the standard biochemical autoantibodies [J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(6): 1213-1218.
- [43] Wan H, Merriman C, Atkinson MA, *et al.* Proteoliposome-based full-length ZnT8 self-antigen for type 1 diabetes diagnosis on a plasmonic platform [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(38): 10196-10201.
- [44] Walther D, Eugster A, Jergens S, *et al.* Tetraspanin 7 autoantibodies in type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(9): 1973-1976.
- [45] Shi X, Huang G, Wang Y, *et al.* Tetraspanin 7 autoantibodies predict progressive decline of beta cell function in individuals with LADA [J]. *Diabetologia*, 2019, 62(3): 399-407.
- [46] Shao W, Yuan Y, Li Y. Association between MTHFR C677T polymorphism and methotrexate treatment outcome in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2017, 21(5): 275-285.
- [47] Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guidelines for CYP3A5 genotype and tacrolimus dosing [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2015, 98(1): 19-24.
- [48] Stamp LK, Chapman PT. Allopurinol hypersensitivity: Pathogenesis and prevention [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2020, 34(4): 101501.
- [49] 中华免疫学会临床免疫分会专家组. 自身免疫病诊断中抗体检测方法的推荐意见 [J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(9): 878-888.

(收稿日期:2021-08-20)

(本文编辑:刘群)