

• 论 著 •

比较酶联免疫吸附法与间接免疫荧光法检测抗核抗体的价值

王广杰, 陈 洁, 李士军[△]

(大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁大连 116011)

摘要:目的 比较 ELISA 法和间接免疫荧光(IIF)法诊断自身免疫疾病的价值。方法 系统性红斑狼疮(SLE)组 33 例,非 SLE 自身免疫疾病组 59 例,非自身免疫疾病组 43 例,同期该院体检中心健康体检者 20 例纳入健康对照组。采用 2 种方法检测 4 组研究对象的抗核抗体(ANA),并进行分析。结果 ELISA 法检测 SLE 组、非 SLE 自身免疫疾病组中高效价的 ANA 分别为(2.621±1.700)、(2.248±1.781),IIF 法分别为(2.715±0.730)、(2.544±0.59),但前者测出非自身免疫疾病中的 ANA(1.034±1.050)低于后者 ANA 的效价(2.253±0.691)。结论 ELISA 检测可提高 ANA 的检测效果。

关键词:抗核抗体; 酶联免疫吸附法; 间接免疫荧光法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.19.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)19-2814-03

Clinical significance of enzyme linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence for detection of antinuclear antibody

Wang Guangjie, Chen Jie, Li Shijun[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Liaoning, Dalian 116011, China)

Abstract: Objective To compare the value of ELISA and indirect immunofluorescence (IIF) method in diagnosis for autoimmune diseases. **Methods** A total of 33 patients in systemic lupus erythematosus(SLE)group, 59 patients in other autoimmune diseases group, 43 patients in non-autoimmune disease group, 20 people accepted physical examination in control group. The antinuclear antibody (ANA) in each group were detected by two methods and analyzed. **Results** The high titer ANA detected by ELISA and IIF in SLE group and other autoimmune diseases group were (2.621±1.700), (2.248±1.781); (2.715±0.730), (2.544±0.59). The titer ANA detected by ELISA in non-autoimmune disease group was (1.034±1.050), which was lower than (2.253±0.691) detected by IIF. **Conclusion** ELISA might improve the detection effects of ANA antibody.

Key words: antinuclear antibody; enzyme-linked immunosorbent method; indirect immunofluorescence

抗核抗体(ANA)的检测是自身免疫性疾病的重要筛查指标,ANA不但针对细胞质的自身抗体,而且包括针对细胞质内的各种核酸和核蛋白的所有成分的自身抗体^[1]。现已证明,以喉表皮样癌(Hep-2)细胞为底物的间接免疫荧光(IIF)法的灵敏度好,被认为是检测 ANA 的金标准^[2]。近十多年来,ELISA 法操作更为简单且容易实现自动化,国内外越来越多的实验室开始使用 ELISA 法检测 ANA^[3]。目前,ELISA 法多采用纯化或重组的抗原包被 ELISA 板,通过检测 ELISA 板的吸光度(OD)值,对患者体内的自身抗体浓度进行检测。本研究试图寻找一种操作简单,可以自动化地对大量标本采用 ELISA 法检测自身抗体 ANA,同时与传统的 IIF 法比较,评价其临床诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 10 月至 2012 年 3 月大连医科大学附属第一医院 135 例自身抗体中 ANA、抗可溶性抗原(ENA)抗体、抗双链 DNA(ds DNA)抗体(天然)均为阳性的患者。系统性红斑狼疮(SLE)组 33 例,男 6 例,女 27 例;年龄 13~79 岁,平均(38.5±15.1)岁;均符合 2009 年美国风湿病协会(ACR)修订的 SLE 诊断标准。非 SLE 自身免疫疾病组 59 例,包括干燥综合征、类风湿关节炎、皮炎和混合性结缔组织病等,其中男 11 例,女 48 例;年龄 14~78 岁,平均(51.3±17.3)岁,均符合相关疾病的临床判断标准。非自身免疫疾病组 43 例,为本院非自身免疫疾病住院患者,其中男 9 例,女 34 例;年龄 29~

85 岁,平均(66.3±15.2)岁。同期本院体检中心健康体检者 20 例纳入对照组,男 7 例,女 13 例;年龄 29~83 岁,平均(59.7±12.6)岁;排除妊娠期女性。

1.2 仪器与试剂 IIF 法 ANA 检测试剂盒购自德国欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司,ELISA-ANA 检测试剂盒购自德国欧蒙(杭州)医学实验诊断有限公司,试剂均在有效期内使用。IIF 法采用日本 Olympus BX41 荧光显微镜观察荧光模型。ELISA 法采用奥地利 Tecan Hydro Flex 酶标仪检测酶标板 OD 值。

1.3 标本采集 采集所有研究对象空腹静脉血 3 mL,标本常温下静置 2 h,15 000 r/min 离心 10 min 后分离上层血清,-80℃冰箱密封保存备用。试验前室温充分复融,通过 15 000 r/min 离心 10 min,沉淀加以澄清,保证不含有任何颗粒或残存的纤维蛋白。

1.4 检测方法

1.4.1 IIF 法 采用 IIF 法检测 ANA,试验过程中严格按照试剂说明书操作,由 2 位经验丰富的检验师判读结果,保证结果的准确。判断标准:质控正常下,荧光显微镜下观察 Hep-2 细胞和鼠肝脏细胞的荧光染色情况,实验基质没有明显的荧光染色(与阴性对照在同一水平)或没有可以辨认的荧光模型时,为 ANA 阴性;若观察到明显高于阴性对照的特异荧光,且有明显可以辨认的荧光模型,为 ANA 阳性。判断时兼顾 Hep-2 和鼠肝荧光情况,区别非特异性荧光。用肝组织片确定终点

作者简介:王广杰,女,主管技师,主要从事免疫血液学研究。 △ 通讯作者,E-mail:18098877199@163.com。

滴度。

1.4.2 ELISA 法 采用 ELISA 法检测 ANA, 试验盒中每个微孔包被有 10 种混合抗原即 dsDNA、组蛋白、核糖体 P 蛋白、nRNP、Sm、SS-A、SS-B、Scl-70、Jo-1、着丝点。所有操作按照试剂盒说明书要求进行。

1.5 结果判断标准 IIF 法的阳性标准按照欧蒙稀释体系滴度 1:100 判断, ELISA 法的结果超过 $(0.414 + 1.96 \times 0.083)$ 判断为阳性。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 相关分析采用 Pearson 相关。

2 结果

2.1 ELISA 与 IIF 法 2 种方法比较 ELISA 法对 4 组受试者的 ANA 检测结果差异有统计学意义 ($F = 14.21, P < 0.05$); IIF 法对 4 组受试者的 ANA 检测结果差异有统计学意义 ($F = 17.23, P < 0.05$)。ELISA 检测中, 非自身免疫疾病组与对照组 ANA 差异无统计学意义 ($t = 2.772, P > 0.05$), 但 SLE 组、非 SLE 自身免疫疾病组与对照组分别比较差异均有统计学意

义 ($t = 5.907, P < 0.05; t = 4.554, P < 0.05$); IIF 法检测中, SLE 组、非 SLE 自身免疫疾病组、非自身免疫疾病组与对照组 ANA 差异有统计学意义 ($t = 7.133, P < 0.05; t = 7.384, P < 0.05; t = 4.333, P < 0.05$)。在 SLE 组与非 SLE 自身免疫疾病组中, ELISA 检测同 IIF 法均能检测到高效价的 ANA。见表 1。

表 1 ELISA 和 IIF 法 2 种方法比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ELISA 法	IIF 法
SLE 组	33	2.621 ± 1.700*	2.715 ± 0.730*
非 SLE 自身免疫疾病组	59	2.248 ± 1.781*	2.544 ± 0.590*
非自身免疫疾病组	43	1.034 ± 1.050	2.253 ± 0.691*
对照组	20	0.414 ± 0.083	1.555 ± 0.152

*: $P < 0.05$, 与同种方法检测的对照组结果比较。

2.2 ELISA 与 IIF 法检测 ANA 的符合率 2 种方法检测在 SLE 组和对照组中的符合率达到 84.85%, 非 SLE 自身免疫疾病组符合率较低, 但也达到 71.19%, 在非自身免疫疾病组中的符合率最低, 仅为 58.14%。2 种方法在 4 组受试者中的检测的平均符合率为 72.90%。见表 2。

表 2 ELISA 与 IIF 法检测 ANA 的符合率

组别	n	ELISA(+)	ELISA(-)	ELISA(-)	ELISA(+)	符合率 [% (n/n)]
		IIF(+)	IIF(-)	IIF(+)	IIF(-)	
SLE 组	33	28	0	4	1	84.85(28/33)
非 SLE 自身免疫疾病组	59	39	3	17	0	71.19(42/59)
非自身免疫疾病组	43	15	10	15	3	58.14(25/43)
对照组	20	0	18	2	0	90.00(18/20)
合计	155	82	31	38	4	72.90(113/155)

-: 阴性; +: 阳性。

2.3 ELISA 与 IIF 法相关分析 对 2 种方法 ANA 检测结果进行 Spearman 相关分析显示, 这 2 种方法的检测结果呈正相关 ($r = 0.673, P < 0.05$)。

3 讨论

国内外关于自身抗体检测及诊断价值方面的研究较多^[4-5], 但由于方法学和实验设计的不同, 不同的评价研究得到的结果也不相同。如夏勇等^[6]研究表明采用 IIF 法检测 ANA 的血清稀释倍数与 ELISA 所检测的 ANA 血清浓度具有一定的相关性, ELISA 法灵敏度明显高于 IIF 法。ELISA 法自身抗体的检测技术在实验室诊断中应用越来越多。随着免疫技术的进步, 自身特异性靶抗原的发现, ELISA 法检测的特异性自身抗体种类也随之增加, 灵敏度和特异度得到改善。此方法优点是自动化程度较高, 操作简便, 操作者技术水平要求较低^[7], 利于检测标准化及质量控制。常规 ANA 的检测采用 Hep-2 细胞的 IIF 法, 由于该方法良好的灵敏度和可靠性所以是检测 ANA 的金标准方法。但是另一方面, IIF 法通过检测滴度来表示 ANA 的浓度, 5%~20% 健康人可以阳性, 区分病理性和生理性自身抗体效果不佳^[8]; 并且 IIF 法主观性强, 需要专业培训人员; 长期以来受 ANA 抗原基片来源不一, 荧光抗体质量等因素影响, 不利于标准化和质量控制。与之相比, ELISA 法可以克服 IIF 法以上缺点, 客观性强和改良性好且具有较好特异度, 区分生理性和病理性自身抗体的能力较好。Maguire 等^[9]研究的结果表明 ELISA 法比 IIF 法具有更高的

灵敏度。

ANA 谱的检测是自身免疫疾病重要检测项目之一, 广泛用于自身免疫疾病的筛查。存在高滴度的 ANA 是自身免疫疾病的特点, 由于自身免疫疾病的 ANA 是在自身抗原长期反复刺激之下优选出的抗体类型, 每位患者应用 IIF 法检测 ANA 时往往是一种特定的荧光模式, 且基本保持不变, 滴度往往较高^[10-11], 并且该方法检出 ANA 阳性结果的患者, 不管该患者治疗与否, 是否为病情复发, ANA 结果总是呈现阳性, 即 IIF 法阳性结果不会因为治疗或者疾病的复发而变化^[12]。但是, ELISA 法检测会在治疗后不再显示阳性, 实验者和临床医生都要清楚这一点。分析其原因在于不同方法选择的抗原不同。ELISA 包含 10 种自身特异性靶抗原, 当患者经过治疗或者疾病复发时, 其特异性自身抗体结果可能降低或者升高, 如 ds-DNA。所以 ELISA 结果会变化。而 IIF 法检测采用 Hep-2 细胞的所有抗原, 当患者经过治疗时, 虽然特异性的自身抗体会降低, 但是仍然有其他 Hep-2 细胞成分会与患者血清反应。对于初次检测的患者或未经治疗的患者而言, ELISA 方法具有与 IIF 法一致的灵敏度和可靠性^[13-15]。本研究结果显示, ELISA 与 IIF 法检测结果的 Spearman 相关系数为 0.673。夏勇等^[6]研究结果表明 2 种方法的 Spearman 相关系数为 0.499。由于方法学和实验设计的不同, 不同研究的结果不相同。本研究说明二者具有较好的相关性。另外, 本研究结果显示 ELISA 与 IIF 法在 4 组受试者中的检测结果平均符合率为

72.90%；SLE 组和对照组符合率达到 84.85%，非 SLE 自身免疫疾病符合率较低，但也达到 71.19%，符合率最低的是非自身免疫疾病组，仅 58.14%。综上所述，ELISA 检测具有较好的灵敏度和特异度。

本研究使用的 ELISA 试剂盒，仅包含 10 种特异性的自身抗体，不能代表所有 Hep-2 细胞能检测的抗体，所以会漏掉某些自身抗体，ANA 阳性率会降低，若增加抗原种类将会使 ANA 检测漏诊率更低，更适合临床筛查自身免疫疾病的要求。对于 ANA 的检测，经典的 IIF 法由于具有良好的灵敏度，仍是筛查 ANA 的金标准方法，但是 ELISA 法操作简单，利于标准化，其检测特异度好，随着临床的应用，检测的灵敏度和特异度提高，在疾病的诊断中的价值会逐渐被认可。本研究的方法如果增加免疫条带法，进行多种特异性自身抗体的检测如抗 ENA 抗体的免疫印迹，可为疾病诊断提供更多的线索。原因是抗 ENA 抗体试剂现已同时检测 14 种抗体 (RNP 68、RNP A、RNP C、SmB、SmD、SsA 60、SSA 52、ssB、Po、PCNA、CENP-B、Scl-70、Jo-1 和组蛋白)。

综上所述，ELISA 检测可提高对 ANA 检测的灵敏度和特异度。

参考文献

- [1] Nossent H, Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope? [J]. Scand J Rheumatol, 2001, 30(3):123-128.
- [2] Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, et al. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay[J]. Am J Clin Pathol, 1996, 105(22):468-473.
- [3] Bernardini S, Infantino M, Bellincampi L, et al. Screening of antinuclear antibodies: comparison between enzyme immunoassay based on nuclear homogenates, purified or recombinant antigens and immunofluorescence assay[J]. Clin Chem Lab Med, 2004, 42(10):1155-1160.
- [4] 彭玲, 王开正. 自身抗体临床应用及实验诊断研究进展[J]. 国际

检验医学杂志, 2015, 36(10):1425-1428.

- [5] 王广杰, 刘辉. 自身抗体检测新技术及其临床应用[J]. 医学与哲学, 2014, 35(8):65-69.
- [6] 夏勇, 李齐光, 唐希才, 等. 间接免疫荧光法与酶联免疫吸附试验检测抗核抗体对比分析[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(13):2449-2451.
- [7] 田卫花, 马文媛, 李莎莎. ELISA 与胶体金免疫层析法检测血清抗 CCP 抗体在 RA 诊断中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(11):1528-1529.
- [8] Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, et al. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific auto antibodies to nuclear antigens[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(4):71-81.
- [9] Maguire GA, Ginawi AA, Lee J, et al. Clinical utility of ANA measured by ELISA compared with ANA measured by immunofluorescence[J]. Rheumatology, 2008, 47(2):98.
- [10] 张弢, 陈宝平, 张健君, 等. 抗核抗体的荧光模式图文报告的应用[J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33(4):332.
- [11] 王莉, 任丽玲, 高宇, 等. 抗核抗体荧光模型与抗核抗体谱对应关系研究[J]. 华西医学, 2015, 30(1):84-88.
- [12] Faria AC, Barcellos KS, Andrade LE. Longitudinal fluctuation of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2005, 32(7):1267-1272.
- [13] 谢丽华, 张浩, 彭萍. 间接免疫荧光法和酶联免疫吸附法检测抗双链 DNA 抗体的比较[J]. 实用预防医学, 2011, 18(11):2173-2175.
- [14] 王艳, 刘晓辉, 张学智, 等. 间接免疫荧光法和酶联免疫吸附法检测抗线粒体抗体的分析与比较[J]. 中日友好医院学报, 2015, 29(3):154-157.
- [15] 徐吟亚. 核抗体荧光免疫检测质量控制方法的建立和应用研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(2):245-246.

(收稿日期:2015-06-18)

(上接第 2813 页)

这个项目后与临床进行沟通方面和指导临床进行诊断治疗方面都起着重要作用。本研究根据文件获得了本室实际条件下的可报告范围为 TBIL:6.57~428.83 $\mu\text{mol/L}$, Bu:4.5~320.1 $\mu\text{mol/L}$, Bc:4.5~364.9 $\mu\text{mol/L}$, 从结果可见, 本室胆红素可报告范围均能覆盖临医学决定水平浓度点, 且线性较宽能满足临床检验室常规检测的要求。

当技术性能评价达到要求后, 应该进一步对常用的诊断性能指标(如参考区间等)进行实用性验证。因为, 本院检验科准备使用的强生干化学系统为美国进口产品, 仪器和原装试剂盒说明书给出的生物参考区间是否适合中国人群? 其次, 本院检验科使用分离胶促凝管采集标本, 与说明书上标本采集方法有区别, 是否会影响参考区间? 而且同一检验项目, 即使使用同一检测系统, 不同实验室的参考区间也可能存在差异, 所以, 临床实验室为所开展的新检验项目确定可靠的参考区间是其重要任务之一, 也为指导临床诊疗提供切实可行的指标打下了坚实的基础。

综上所述, 临床对检验结果有两方面的要求, 首先, 要求得到准确的结果, 同时要求这些结果对临床的诊疗起指引性作用, 所以对每一个新的检测系统既要进行技术性能的评估, 也

要进行诊断性能的验证, 这样才能真正满足临床一线的需求。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 Verification of performance for precision and trueness[S]. Wayne, PA, USA: CLIS, 2006.
- [2] 林佳媛. 胆红素代谢及其调节的研究进展[J]. 复旦学报: 医学版, 2014, 41(3):405-411.
- [3] 崔玲. 干化学法与湿化学测定血清胆红素的比较[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(1):78-79.
- [4] 冯琪. 新生儿胆汁淤积症[J]. 中国新生儿科杂志, 2013, 28(2):73-75.
- [5] 邢宝宝. 强生 VITROS350 干式生化仪胆红素测定的结果分析及临床应用价值[J]. 中国保健营养, 2013, 24(1):47.
- [6] 徐建华, 庄俊华, 郑松柏, 等. 常规方法检测血清总胆红素的正确度评价[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(12):946-949.
- [7] 张秀明. 临床生化检验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 603-605.

(收稿日期:2015-06-25)