# 间接免疫荧光法与ELISA检测抗核抗体、抗双链DNA抗体的比对分析

秦 雪[1],陶 瑕[2],陈志坚[1],蒋杰球[1],徐明辉[3],李若林[3],李泰阶[3],林发全[1],李 山[1](广西医科大学[1]第一附属医院临床医学实验部,[2]2003级医学检验本科,[3]研究生学院,广西 南宁 530021)

**摘要:目的** 探讨间接免疫荧光法(IIFA)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗核抗体(ANA)和抗双链DNA(ds-DNA)抗体的异同。**方法** 抽取确诊或疑为自身免疫性疾病患者血清125例,同时采用IIFA法和ELISA法检测ANA 82例,抗ds-DNA抗体检测57例,其中14例同时检测ANA和抗ds-DNA抗体。对两种方法检测结果不符者采用免疫印迹法复查抗可溶性核抗原(ENA)。**结果** 82例ANA阳性率IIFA法与ELISA法分别为87.8%和73.17%,差别有统计学意义($P<0.01$);57例血清中抗ds-DNA抗体检测阳性率IIFA法与ELISA法分别为77.19%和71.93%,差别无统计学意义($P>0.05$)。采用不同cutoff值时两种方法符合率比较,ANA、抗ds-DNA抗体检测结果差别均有统计学意义($P<0.01$)。两法对一些稀有核型ANA检测符合率较低,而抗ds-DNA抗体的符合率在不同核型上没有差异。ANA检测以1:100为cutoff滴度,抗ds-DNA抗体以弱阳性为cutoff值时,两种方法可获得较高的符合率,但在检测滴度1:100 ANA、弱阳性抗ds-DNA抗体时两种方法存在明显的不一致。**结论** IIFA法检测总ANA、抗ds-DNA抗体的敏感性均高于ELISA法,IIFA法作为ANA的筛查方法,阳性标本再进行ELISA法检测,可在获得荧光核型信息同时观察抗体滴度的变化情况,并且更快捷经济。两种或多种不同方法学原理的实验互相佐证,有助于减少实验误差。

**关键词:**抗核抗体;抗双链DNA抗体;酶联免疫吸附试验;间接免疫荧光法

**中图分类号:**R181 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4254(2009)03-0472-04

## Comparison of indirect immunofluorescence assay and ELISA for detecting antinuclear antibodies and anti-double-stranded DNA antibodies

QIN Xue[1], TAO Xia[2], CHEN Zhi-jian[1], JIANG Jie-qiu[1], XU Ming-hui[3], LI Ruo-lin[3], LI-Tai-jie[3], LIN Fa-quan[1], LI Shan[1]

[1]Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, [2]Laboratory Medicine in Grade 2003, [3]Postgraduate School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

**Abstract: Objective** To compare indirect immunofluorescence assay (IIFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antinuclear antibodies (ANA) and anti-double-stranded DNA antibodies (anti-dsDNA). **Methods** A total of 125 serum samples were obtained from patients with established or suspected autoimmune disease, and 82 samples were used for ANA detection and 57 for anti-dsDNA detection using both IIFA and ELISA. Fourteen samples were examined for both ANA and anti-dsDNA. In cases where discrepancy occurred in the results by the two methods, extractable nuclear antigens were detected using immunoblotting. **Results** The positivity rate of ANA detected by IIFA and ELISA was significantly different (87.8% and 73.17%, respectively, $P<0.01$), but the positivity rate of anti-dsDNA was similar between IIFA and ELISA (77.19% and 71.93%, respectively, $P>0.05$). The percent agreement between the two testing methods with different cutoff values of ANA and anti-dsDNA showed significant differences ($P<0.01$), and for some uncommon patterns, the percent agreement of the two methods was lowered in ANA detection but remained unchanged for anti-dsDNA with different ANA patterns. High percent agreements of the two methods were obtained with the cutoff ANA titer of 1:100 and the cutoff anti-dsDNA value of weak positivity, but they demonstrated a significant difference in testing low-titer ANA and anti-dsDNA. **Conclusion** IIFA is more sensitive than ELISA in detecting the total ANA and anti-dsDNA. ELISA prescreening combined with IIFA can obtain the information of the nuclear pattern and allow the observation of the titer alterations. The combination of two or more testing methods can greatly enhance the accuracy of the results.

**Key words:** antinuclear antibodies; anti-dsDNA; enzyme-linked immunosorbent assay; indirect immunofluorescent assay

抗核抗体(ANA)是抗细胞内所有抗原成分的自身抗体的总称[1]。将ANA作为自身免疫疾病的筛查检测项目早已得到公认。抗双链DNA(ds-DNA)抗体与细胞核的反应位点在于DNA(外围区)脱氧核糖磷酸框架上,被认为是红斑狼疮的重要诊断依据。虽然有多种方法来检测自身抗体的存在,但IIFA法为这两种抗体最常用的检测方法。其中,ANA的检测常用核质丰富的培养细胞Hep-2为抗原,而抗ds-DNA抗体则多用马疫锥虫或绿蝇短膜虫为基质抗原。目前国内有不少实验室开始使用ELISA法进行ANA和抗ds-DNA的检测。不同检测方法必定导致实验室间检

**收稿日期:**2008-09-05

**基金项目:**广西卫生厅科研课题(z2008158)

**作者简介:**秦 雪(1963-),女,博士,主任技师,E-mail:qinxue919@163.com

**通信作者:**李 山,男,教授,E-mail:lis8858@163.com

测结果的差异,而对弱阳性标本的检测结果更是成为争议的焦点。为客观评价 IIFA 法与 ELISA 法检测 ANA 和抗 ds-DNA 抗体的异同，本文对确诊或疑为自身免疫性疾病(AID)的患者血清 125 例,同时用 IIFA 法与 ELISA 法检测 ANA,ds-DNA,现报告如下。

## 1 对象和方法

### 1.1 标本来源

2007 年 1 月至 3 月到我院确诊或疑为 AID 患者 125 例,男性 19 例,女性 106 例,年龄 7~80 岁,平均 35.5 岁。清晨空腹抽取患者血液,离心分离血清,当日检测，同时采用 IIFA 法和 ELISA 法检测 ANA 82 例,抗 ds-DNA 抗体检测 57 例,其中 14 例同时检测 ANA 和抗 ds-DNA 抗体。

### 1.2 方法

1.2.1 仪器和试剂　ZEISS 型荧光显微镜,TS-8 型转移脱色摇床,Thermo 型酶标仪;IIFA 法试剂盒购自德国欧蒙公司,批号:F070204Fe;ELISA 法试剂盒购自美国 Zeus 公司,批号:E070120BL。试剂均在有效期内使用。ENA 试剂盒购自德国欧蒙公司，批号:D070104AU。

1.2.2 检测方法　同时采用 IIFA 法和 ELISA 法检测 ANA 82 例,抗 ds-DNA 抗体检测 57 例,其中 14 例同时检测 ANA 和抗 ds-DNA 抗体。对两种方法检测结果不符者采用免疫印迹法复查抗可溶性核抗原(ENA)。每种方法都严格按照说明书操作完成。

### 1.3 结果判断

1.3.1 IIFA 法判读 ANA 结果　荧光显微镜下 HEp-2 细胞无荧光染色为阴性；荧光较弱则可判为弱阳性,即滴度 1:100；有荧光染色并可辨荧光模型则判为阳性,阳性血清按 1:320、1:640、1:1000 滴度系统报告抗体最终滴度及荧光模型。

IIFA 法判读抗 ds-DNA 抗体结果:荧光显微镜下绿蝇细胞短膜虫动基体无荧光染色为阴性;荧光弱则判为弱阳性;动基体均质或部分有荧光染色则判为阳性。

1.3.2 ELISA 法判读 ANA、抗 ds-DNA 抗体结果　酶标仪测定反应板 OD 值,计算标本的 OD 值 /(标准液平均 OD 值×校正因子),≤0.9 判为阴性,≥1.1 判为阳性,0.91~1.09 判为可疑。

1.3.3 免疫印迹法判读 ENA 结果　对照评价手册,根据膜条上条带标记位置判断结果。与非抗原包被区相比，阳性反应将在相应的抗原处呈现蓝紫色条带,抗原位置出现白色条带判为阴性。

### 1.4 统计学分析

使用 SPSS14.0 统计软件分析,对 ANA、抗 ds-DNA 抗体不同 cutoff 值时两种方法符合率比较采用 $\chi^2$ 检验。两种方法的阳性检出率比较采用配对 McNemar 检验。

## 2 结果

### 2.1 IIFA 和 ELISA 检测结果

ANA 阳性率 IIFA 法与 ELISA 法分别为 87.8% 和 73.17%,差别有统计学意义($P<0.01$);抗 ds-DNA 抗体检测阳性率 IIFA 法与 ELISA 法分别为 77.19% 和 71.93%，差别无统计学意义（$P>0.05$);ANA、抗 ds-DNA 抗体 IIFA 法弱阳性标本中分别有 74.42%和 84.62%的血清 ELISA 法检测为阳性。

### 2.2 IIFA 和 ELISA 结果符合情况

不同 cutoff 值两组间两种方法符合率比较,ANA 检测结果差别有统计学意义($P<0.01$)。抗 ds-DNA 抗体检测结果差别有显著统计学意义($P<0.01$,表 1)。

**表 1 不同 cutoff 值时两种方法检测结果符合情况**

| 项目 | $n$ | Cutoff 值为阳性 * | | | Cutoff 值为弱阳性 # | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 符合例数 | 不符例数 | 符合率 | 符合例数 | 不符例数 | 符合率 |
| ANA | 82 | 47 | 35 | 57.32% | 68 | 14 | 82.93% |
| 抗 ds-DNA 抗体 | 57 | 32 | 25 | 42.11% | 50 | 7 | 91.23% |

*IIFA法 ANAcutoff 滴度 =1:320,抗 ds-DNA 抗体 IIFA 法的 cutoff 值为阳性;

#IIFA 法 ANAcutoff 滴度 =1:100,抗 ds-DNA 抗体 IIFA 法的 cutoff 值为弱阳性

### 2.3 IIFA 和 ELISA 结果不符分析

两种方法不符合的标本进行 ENA 复检,1 例IIFA 法检测 ANA 与抗 ds-DNA 抗体均为阴性的标本 ELISA 法检测两种抗体均为阳性,其 ENA 检测 SS-A 抗体阳性。两种方法不符结果 ENA 检测结果见表 2。

### 2.4 IIFA 法检测不同荧光模型与 ELISA 法检测结果分析

ANA 检测 cutoff 滴度为 1:100,抗 ds-DNA 抗体临界值判断水平定为弱阳性时不同荧光模型与 ELISA 法检测结果,见表 3。

## 3 讨论

### 3.1 IIFA 法与 ELISA 法的特点

IIFA 法已逐渐成为国内外实验室检测 ANA、抗

表 2 两种方法不符结果 ENA 检测结果

| 不符情况 | ANA | | 抗 ds-DNA 抗体 | |
|---|---|---|---|---|
| | 例数 | ENA阳性例数 | 例数 | ENA阳性例数 |
| IIFA(+)ELISA(-) | 2 | 1 | 0 | 0 |
| IIFA(+/-)ELISA(-) | 11 | 3 | 4 | 2 |
| IIFA(-)ELISA(+) | 1 | 1 | 2 | 0 |

表 3 不同荧光模型与 ELISA 法检测结果分析

| IIFA 荧光模型 | ANA | | | 抗 ds-DNA 抗体 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | IIFA 法阳性例数 | ELISA 法阳性例数 | 符合率 | IIFA 法阳性例数 | ELISA 法阳性例数 | 符合率 |
| 颗粒型 | 31 | 27 | 87.10% | 6 | 6 | 100% |
| 胞浆型 | 11 | 10 | 90.91% | 6 | 6 | 100% |
| 均质型 | 16 | 12 | 75% | 20 | 18 | 90% |
| 其他型 | 12 | 6 | 50% | 11 | 9 | 81.82% |

其他型包括着丝点、高尔基、核仁、核膜和两种以上的混合核型

ds-DNA抗体最常用的方法，被认为是检测细胞内抗原自身抗体的金标准[1,2]。IIFA 法筛查 ANA 的优点是：实验基质制备容易；基质(HEp-2 细胞和猴肝片)中含抗原谱完整；特异性高，产生特征性的荧光模型；但 IIFA 法读片耗时，而且结果的正确性和精确度很大程度上取决于阅片人的知识技术。ELISA 法以 OD 值代替滴度，以特异性抗体取代荧光模式。相对而言，ELISA 法更客观、快捷、易于自动化。不少学者认为这种现已投放市场的检测方法有望填补 IIFA 法的空缺，甚至取而代之[3,4]。

### 3.2 IIFA 法与 ELISA 法符合情况分析

武永康等[2]报道 ELISA 法检测 ANA 具有较高的检测效能，与 IIFA 法检测结果的符合率较高。ANA 滴度大于 1:100，尤其在小于 40 岁女性人群中具有临床意义[5]。而抗 ds-DNA 抗体滴度和疾病活动度相关，该抗体弱阳性为监控治疗提供了有效的依据[6]。在此意义上，将 ANA 检测 cutoff 滴度定为 1:100，抗 ds-DNA 抗体临界值判断水平定为弱阳性时两种方法在本次研究中获得较高的符合率。但我们发现两种方法检测结果符合率不能一概而论。ANA 检测中滴度为 1:100 时两种方法检测的结果符合率较低。并且，采用不同 cutoff 值两组间符合率比较，ANA、抗 ds-DNA 抗体检测结果差别有统计学意义，说明两种方法在检测血清中弱阳性 ANA 和抗双链 DNA 抗体时结果存在不一致。在本研究中，我们还发现抗 ds-DNA 抗体的检测也出现两种方法检测低滴度标本时符合率低的结果。表 1 结果显示：IIFA 法检测 ANA 阳性率高于 ELISA 法；IIFA 法检测抗 ds-DNA 抗体与 ELISA 法比较，差别无统计学意义。IIFA 法检测 ANA、抗 ds-DNA 抗体的弱阳性标本中，而采用 ELISA 法检测阳性率分别是 74.42%、84.62%，说明 IIFA 法较 ELISA 法敏感，更容易检出血清中总的 ANA 和抗 ds-DNA 抗体。这些可能与 IIFA 法使用的 Hep-2 细胞、绿蝇短膜虫细胞所含抗原种类、抗原量及其对应的 ELISA 法不匹配有关。

两种方法不符合的标本进行 ENA 检测，一例 IIFA 法检测 ANA 与抗 ds-DNA 抗体均为阴性的标本 ELISA 法检测两种抗体均为阳性，其 ENA 检测 SS-A 抗体阳性。ENA、抗 ds-DNA 抗体属于 ANA 众多组分中的一部分，理论上 ENA 或抗 ds-DNA 抗体检测为阳性时，ANA 也应该为阳性。然而 IIFA 法 ANA 阴性的病人血清进行抗 ds-DNA 抗体、ENA 分析，或以不同底物的荧光法筛查时可出现阳性结果[7]，并且 IIFA 法检测 ANA 抗 Jo-1 抗体和抗 SS-A/Ro 抗体方面敏感性欠佳[8, 9]，而 ELISA 法因包被抗原种类不同可能因其较 IIFA 法敏感而检出其中的 SS-A 抗体。另外，大多数具有临床价值的 ANA 为 IgG 型，低亲和力的 IgM、IgA 可在健康个体中检测到，其检测通常无意义。当部分患者的抗核抗体表现为 IgM 或 IgA 型时，IgG 荧光二抗就无法与其结合而产生假阴性或弱阳性。这些都可能成为两法检测低滴度标本时符合率低的原因。

### 3.3 IIFA 法不同荧光核型与 ELISA 法检测结果的分析

不符的 ANA 血清中，1 例 IIFA(+)ELISA(-)血清其荧光模型为着丝点型，滴度 1:320。以 ENA 抗体谱进行复查，检测结果为着丝点 B 蛋白阳性。表 5 结果也显示，“其他型” 统计中包括了一些不常见核型，ANA 检测结果中“其他型”的两种方法符合率均低于颗粒型、胞浆型、均质型核型。人工重组所有细胞抗原极其困难，某些人工抗原因不具备天然构象而无抗原性或抗原性很弱[1]。因此，ELISA 法检测某些稀有核型 ANA 的标本时可能出现假阴性。而本次使用的 ELISA 法反应板所包被抗原中的着丝点蛋白有可能缺乏或不足。

含有均质型的高滴度的 ANA 标本检出的抗 ds-DNA 抗体机率高，含量与荧光强度成正比[11]，本次检测的抗 ds-DNA 抗体标本中也有 46.51%的标本 ANA 检测其荧光核型为均质型，高于其他核型。但未发现检测抗 ds-DNA 抗体时两法符合率在不同核型上的明显差异。对于 ELISA 这种平面抗原包被方法，抗原种类超过十种以上，则会产生抗原位点相互遮蔽，从而影响检测的敏感性。可能因为抗 ds-DNA 抗体所使用的 ELISA 抗原板理论上只包被有单一抗原，其检测的抗体单一，故符合率较 ANA 的检测结果要好。

### 3.4 总结

自身抗体的检测由于缺少适合的参考标准物而使实验室间的标准化极差,而对于临界滴度标本的检测最具争议。IIFA 法结果的主观解释标准、荧光片洗涤、荧光二抗的浓度、荧光显微镜的光强和分辨率都对结果产生重要影响。ELISA 法的标本稀释、抗原板的洗涤,酶标仪的校准等方面也可造成结果差异。本次研究证实 ELISA 法和 IIFA 法在检测临界滴度 ANA、抗 ds-DNA 抗体方面的确存在不一致。上述分析原因都可能导致这两种方法结果的差异。ELISA 优点是实验要求不高,但缺点是由于所能包被的抗原有限,不能检测到全部的 ANA。IIFA 法具有较好的敏感性,可以作为主要几种 ANA 成分的筛查方法,阳性标本再进行 ELISA 法检测，在获得荧光核型信息同时观察抗体滴度的变化情况,并且更快捷经济。而抗 ds-DNA 抗体通常存在高、低亲和力的两种,一种方法学的检测不利于抗 ds-DNA 抗体的检出,不同实验室之间对同一项目采用不同的检测方法必定会导致检测结果的差异。因此,两种或多种不同方法学原理的实验互相佐证,有助于减少实验误差。对于 IIFA 法的研究，寻找含有更丰富抗原的细胞底片将是提高 IIFA 法检出能力的方向，有学者提出使用人活化的淋巴细胞而作为底物检测 ANA 可能比瘤细胞具有更多优越性[13]。而更丰富、更接近天然抗原的 ELISA 抗原板将具有更高的使用价值。

**参考文献：**


[1] 李永哲. 抗核抗体(ANA)临床意义及检测方法[J]. 中国检验医学与临床, 2000, 1(4): 183-4.

[2] 武永康, 王兰兰, 唐江涛, 等. 抗核抗体不同检测方法的对比分析[J]. 中华风湿病学杂志, 2006, 10(10): 610-4.

[3] Kern P, kron M, Hiesche K. Measurement of antinuclear antibodies: assessment of different test systems [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(1): 72-8.

[4] Gniewk RA, Stites DP, Mchugh TM, et al. Comparison of antinuclear antibody testing methods:Immunofluorescence assay versus enzyme Immunoassy[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 4(2): 185-8.

[5] 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): 987-90.

[6] 王兰兰. 临床免疫学及免疫检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 191-3.

[7] 武永康, 王兰兰, 张瑞薇, 等. 两种抗体阳性对抗核抗体阴性的确证试验价值探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(4): 237.

[8] 吴 庆. 抗可提取性核抗原抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 679-80.

[9] 邓学新, 曲昌华. 818 例自身免疫病抗 ENA 抗体与抗核抗体的对照分析[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(4): 302-3.

[10] Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE[J]. J Clin Pathol, 2000, 53(6): 424-32.

[11] 蔡逸婷, 谢松业, 丁莉莉. 系统性红斑狼疮的抗核抗体荧光核型与抗双链 DNA 抗体的关系[J]. 中华现代临床医学杂志, 2004, 2(05B): 685-7.

[12] Solomon DH, Kavanaugh A, Schur PH. Evidence-bases guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing [J]. Arthritis Rheum, 2002, 47(4): 434.

[13] 吴厚生, 储以微, 熊思东. 抗核抗体启动原新观点的学术意义[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(9): 593-5.


(上接 471 页)

倍,且气道峰压超过 22 $cmH_2O$,P-V 环曲线斜率向右明显移位,F-V 环体面积减少，应怀疑 Mallinckrodt 右 DLT 管端过深，在 $SpO_2$ 下降前以 FOB 观察 DLT 管端位置,使 FOB 的应用时机提前,增加老年患者行肺隔离的安全性。

**参考文献：**


[1] 刘幼硕, 吴春华. 老年人呼吸系统解剖生理学改变与呼吸系统疾病[J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23(8): 598-600.

[2] 叶 靖, 欧阳葆怡. 右双腔支气管导管管端位置与吸气峰压和肺顺应性变化的关系[J]. 中华综合医学月刊, 2004, 2(5): 429-32.

[3] 欧阳葆怡, 温晓晖, 梁丽霞. 双腔支气管导管型号选择分析[J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(6): 366-7.

[4] 欧阳葆怡, 温晓晖, 梁丽霞. 双腔支气管导管插管深度与身高的关系[J]. 临床麻醉学杂志, 2002, 18(7): 348-50.

[5] Campos JH, Massa FC, Kernstine KH. The incidence of right upper-lobe collapse when comparing a right-sided double-lumen tube versus a modified left double-lumen tube for left-sided thoracic surgery[J]. Anesth Analg, 2000, 90(3): 535-40.

[6] 侯会文, 欧阳葆怡. 双腔支气管导管管端位置对肺隔离和通气效果的影响[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(5): 576-8.

[7] 史誉吾. 旁气流通气监测法[J]. 临床麻醉学杂志, 1993, 9(4): 262-4.

[8] Simon BA, Hurford WE, Alfille PH, et al. An aid in the diagnosis of malpositioned double-lumen tubes[J]. Anesthesiology, 1992, 76(5): 862-3.

[9] Bardoczky GI, Levarlet M, Engelman E, et al. Continuous spirometry for detection of double-lumen endobronchial tube displacement[J]. Br J Anaesth, 1993, 70(5): 499-502.

[10] Benumof JL. Monitoring. In: Anesthesia for thoracic surgery. 2nd edn[M]. London: W.B. Saunders Company, 1995: 250.