

论著·临床研究

ELISA 法与免疫膜条法检测抗 MDA5 抗体、抗 TIF1 γ 抗体的比对分析*李柳冰¹, 刘晨曦¹, 张艳芳^{1,2}, 程琳琳¹, 晏颂欣¹, 李永哲^{1 Δ}

(1. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730; 2. 吉林大学第一医院检验科, 吉林长春 130021)

摘要:目的 比较酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫膜条法检测抗黑色素瘤分化相关基因 5(MDA5)抗体和抗转录中介因子 1 γ (TIF1 γ)抗体结果的差异性。方法 选取日本 MBL 公司生产的抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体试剂盒(ELISA 法)与德国欧蒙公司抗肌炎抗体谱 IgG 检测试剂盒(免疫膜条法),同时检测 180 例皮肌炎血清样本中的抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体,比较这两种方法的差异性。结果 两种方法检测到的两种抗体阳性率,差异均无统计学意义($P>0.05$)。两种方法检测结果的一致性有统计学意义($P<0.001$),但一致性一般(抗 MDA5 抗体: $Kappa$ 值=0.660;抗 TIF1 γ 抗体: $Kappa$ 值=0.642)。结论 ELISA 法和免疫膜条法检测抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体的一致性程度一般。免疫膜条法有待进一步改善,以提高检测的准确性。

关键词:酶联免疫吸附试验; 免疫膜条法; 抗黑色素瘤分化相关基因 5 抗体; 抗转录中介因子 1 γ 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.09.002

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2019)09-1028-04

文献标识码:A

Comparison analysis of anti-MDA5 antibody and anti-TIF1 γ antibody between ELISA and line blot assays*LI Liubing¹, LIU Chenxi¹, ZHANG Yanfang^{1,2}, CHENG Linlin¹, YAN Songxin¹, LI Yongzhe^{1 Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital,

Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

Abstract: Objective To compare the difference between enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a line blot assay in detecting anti-melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5) antibody and anti-transcriptional intermediary factor 1 γ (TIF1 γ) antibody. **Methods** The anti-MDA5 antibody and anti-TIF1 γ antibody kit (ELISA method) produced by MBL Company of Japan and the anti-myositis antibody spectrum IgG detection kit (line blot method) produced by Omon Company of Germany were selected to detect anti-MDA5 antibody and anti-TIF1 γ antibody in 180 serum samples of dermatomyositis, and the differences between the two methods were compared. **Results** There was no significant difference in the positive rates between ELISA and line blot assays ($P>0.05$). The consistency of the results of the two methods was statistically significant ($P<0.001$), which was moderate for anti-MDA5 antibody ($Kappa$:0.660) and anti-TIF1 γ antibody ($Kappa$:0.642). **Conclusion** A moderate consistency between ELISA and line blot was found for anti-MDA5 antibody and anti-TIF1 γ antibody. The line blot assay should be improved to enhance its accuracy.

Key words: ELISA; line blot; anti-melanoma differentiation-associated protein 5 antibody; anti-transcriptional intermediary factor 1 γ antibody

皮肌炎(DM)是以对称性四肢近端肌无力为特征表现的异质性疾病,女性患者居多^[1]。肌炎特异度自

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81671618,81871302,81501413);中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2017-I2M-3-001);中国医学科学院医学与健康科技创新工程服务一带一路战略先导科研专项资助项目(2017-I2M-B&R-01)。

作者简介:李柳冰,女,博士研究生,主要从事自身免疫性疾病遗传风险因素和诊断标志物研究。 Δ 通信作者, E-mail: yongzhelipumch@126.com。

本文引用格式:李柳冰,刘晨曦,张艳芳,等. ELISA 法与免疫膜条法检测抗 MDA5 抗体、抗 TIF1 γ 抗体的比对分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(9): 1028-1031.

身抗体(MSAs)与疾病临床分型、临床特征相关,可有效辅助皮损的诊断和预后评估^[2-4]。免疫膜条法能有效快速地进行多个自身抗体的检测,在临床检测中的应用越发广泛。然而,有研究指出^[5],采用免疫膜条法检测自身抗体,会出现以下情况:(1)多个自身抗体出现假阳性;(2)免疫膜条法对自身抗体(如抗 Jo-1 抗体)的检测结果与其他方法(如免疫沉淀法)得到的检测结果存在较大不一致情况。基于此,本文分别用酶联免疫吸附试验(ELISA)法和免疫膜条法检测皮损患者血清中的两种 MSAs:抗黑色素瘤分化相关基因 5(MDA5)抗体和抗转录中介因子 1 γ (TIF1 γ)抗体,探讨这两种方法检测抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体结果的差异性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究纳入的 180 例皮损患者,来源于北京协和医院和卫生行业科研专项资助下的多家医院。其中男 59 例,女 121 例,年龄 2~76 岁,平均(43.40 \pm 18.64)岁。皮损炎中包括经典皮损炎(CDM)100 例,无肌病性皮损炎(CADM)11 例,幼年型皮损炎(JDM)29 例,皮损炎合并恶性肿瘤(CAM)40 例。CDM 和 JDM 患者均符合 1975 年 Bohan/Peter 诊断标准^[6-7],且 JDM 的发病年龄 < 18 岁。CADM 患者符合 Sontheimer 诊断标准^[8]。CAM 患者中对于恶性肿瘤的诊断均符合相应临床诊断标准。同时,排除合并其他自身免疫性疾病的皮损炎患者。本研究已获得北京协和医院伦理委员会批准。

1.2 仪器和试剂 日本 MBL 公司抗 MDA5 抗体(批号:7873)和抗 TIF1 γ 抗体(批号:7853)ELISA 检测试剂盒;TECAN 酶联免疫检测仪;德国欧蒙公司抗肌炎抗体谱 IgG 检测试剂盒(批号:DL1530-1601-4G);欧蒙印记法自动操作仪;EUROLineScan 欧蒙印记法判读软件。

1.3 方法 本研究采用的抗 MDA5 抗体 ELISA 试剂盒、抗 TIF1 γ 抗体 ELISA 试剂盒及抗肌炎抗体谱 IgG 检测试剂盒分别是同批号试剂。血清标本于一 80 $^{\circ}$ C 低温保存并避免了反复冻融。实验过程中严格按照试剂说明书进行操作并对实验条件、检测仪器、实验人员等因素进行严格质量控制。

1.3.1 ELISA 法 按照抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体 ELISA 检测试剂盒说明书要求,用样本稀释液 101 倍稀释血清样本。在相应微孔中分别加入 100 μ L 标准品 1、标准品 2、阳性对照、阴性对照和稀释过的血清样本。室温(20 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C)温育 30 min,洗板 4 次,加入 100 μ L 酶结合物,温育 30 min,洗板 4 次后加入 100 μ L 底物,温育 15 min 后加入 100 μ L 终止液。于 TECAN 酶联免疫检测仪波长在 450 nm 处检测各孔吸光度值。待测样本的浓度值(U/mL)=(待

测样品吸光度值-标准品 1 吸光度值)/(标准品 2 吸光度值-标准品 1 吸光度值) \times 100。样本浓度 > 32 U/mL 为阳性。

1.3.2 免疫膜条法 抗肌炎抗体谱 IgG 检测试剂盒包含抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体。将检测膜条放入温育槽中,并在每槽中加入 1.5 mL 样本缓冲液,摇床温育 5 min。吸去缓冲液,在每槽中加入 1.5 mL 经 101 倍稀释血清样本。摇床温育 30 min 后,清洗 3 次,每次 5 min。随后,在每槽中加入 1.5 mL 酶结合物,摇床温育 30 min 后清洗 3 次。再在每槽中加入 1.5 mL 底物,摇床温育 10 min 后,吸去液体,蒸馏水清洗 3 次。于欧盟印记法自动操作仪(EUROBlot-Master)检测结果。着色强度 > 15 为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。同时进行 Kappa 一致性分析,以 $P < 0.01$ 认为两种方法的一致性具有统计学意义。Kappa 值 ≥ 0.75 ,为一致性好;Kappa 值在 0.40~<0.75,为一致性一般;Kappa 值 < 0.40 为一致性差。

2 结果

2.1 ELISA 法和免疫膜条法的检测结果 如表 1 所示,抗 MDA5 抗体用 ELISA 法和免疫膜条法检测的阳性率分别为 29.44% 和 27.78%,差异无统计学意义($P = 0.726$)。抗 TIF1 γ 抗体用 ELISA 法和免疫膜条法检测的阳性率分别为 28.33% 和 20.56%,差异无统计学意义($P = 0.086$)。

表 1 两种方法检测抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体阳性率的比较

抗体类型	ELISA 法			免疫膜条法			P 值
	阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)	阳性 (n)	阴性 (n)	阳性率 (%)	
抗 MDA5 抗体	53	127	29.44	50	130	27.28	0.726
抗 TIF1 γ 抗体	51	129	28.33	37	143	20.56	0.086

2.2 ELISA 法和免疫膜条法对抗 MDA5 抗体检测结果的符合情况 如表 2 所示,180 例样本中,ELISA 法检测出 53 例抗 MDA5 抗体阳性皮损炎患者,其中有 39 例免疫膜条法检测结果与 ELISA 法相符,阳性符合率为 73.58%(39/53),阴性符合率为 91.34%(116/127)。两种方法对于抗 MDA5 抗体检测结果的总符合率为 86.11%(155/180)。Kappa 一致性检验:Kappa 值 = 0.660($P < 0.001$),认为两种方法对抗 MDA5 抗体的检测结果的一致性有统计学意义,但一致性一般。

2.3 ELISA 法和免疫膜条法对抗 TIF1 γ 抗体检测结果的符合情况 如表 3 所示,180 例样本中,ELISA 法检测出 51 例抗 TIF1 γ 抗体阳性皮损炎患者,其中有 32 例免疫膜条法检测结果与 ELISA 法相符,阳性

符合率为 62.75% (32/51), 阴性符合率为 96.12% (124/129)。两种方法对于抗 TIF1 γ 抗体检测结果的总符合率为 86.67% (156/180)。Kappa 一致性检验: Kappa 值=0.642 ($P < 0.001$), 认为两种方法对抗 TIF1 γ 抗体的检测结果的一致性有统计学意义, 但一致性一般。

表 2 两种方法对抗 MDA5 抗体检测结果的比较 (n)

免疫膜条法	ELISA 法		总计
	阳性	阴性	
阳性	39	11	50
阴性	14	116	130
总计	53	127	180

表 3 两种方法对抗 TIF1 γ 抗体检测结果的比较 (n)

免疫膜条法	ELISA 法		总计
	阳性	阴性	
阳性	32	5	37
阴性	19	124	143
总计	51	129	180

3 讨 论

抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体均为皮炎炎特异度抗体, 对皮炎炎的诊断具有重要意义。抗 MDA5 抗体最先于日本皮炎炎患者的血清中发现, 该抗体阳性患者具有典型的皮肤受累如手掌丘疹、皮肤溃疡, 且发生快速进展型肺间质病变的风险增加^[9]。靶抗原 MDA5 是一种维甲酸诱导基因 I 样受体, 参与抗病毒先天免疫防御, 可识别出柯萨奇病毒、鼻病毒、登革热病毒和牛痘病毒等病毒类型^[9]。LI 等^[10]对 628 例皮炎炎患者组与 221 例健康对照组进行 meta 分析, 结果发现抗 MDA5 抗体与皮炎炎相关, 尤其是与 CADM 密切相关。抗 MDA5 抗体对 CADM 诊断的合并灵敏度是 62% (95% CI: 52%~70%), 合并特异度是 100% (95% CI: 97%~100%), 综合受试者工作特征曲线下面积是 0.94。抗 TIF1 γ 抗体最早于 2006 年报道, 在成年皮炎炎患者中的阳性率是 20%~30%, 在 JDM 患者中的阳性率为 30%~40%^[11-12]。靶抗原 TIF1 γ 发挥转录调节、肿瘤抑制、DNA 损伤修复等功能^[13]。抗 TIF1 γ 抗体与皮炎炎合并恶性肿瘤密切相关, 抗 TIF1 γ 抗体阳性患者中, 超过 50% 患者会出现恶性肿瘤^[3, 14]。可见抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体是皮炎炎诊断和鉴别诊断不可忽视的辅助手段。

目前, 检测皮炎炎自身抗体多采用 ELISA 法和免疫膜条法。免疫膜条法由于具有简便快速等优势, 越来越多地应用于临床检测中。然而, 文献报道指出, 免疫膜条法存在一些弊端。HAMAGUCHI 等比

对免疫沉淀法和免疫膜条法对抗 OJ 抗体检测结果的差异性^[15]。9 例用免疫沉淀法证实有抗 OJ 抗体存在的血清, 用免疫膜条法的检测结果均为阴性; 52 例用免疫沉淀法证实不存在抗 OJ 抗体的血清, 用免疫膜条法的检测结果均为阴性。免疫膜条法对抗 OJ 抗体的灵敏度为 0%, 特异度为 100%。CAVAZZANA 等比对免疫沉淀法和免疫膜条法对抗 Mi-2 α 、Mi-2 β 、TIF1 γ 、MDA5、NXP2、SAE、Ku、PM-Scl75、PM-Scl100、SRP、PL-7、PL-12、EJ、OJ、Jo-1 抗体检测结果的一致性^[5]。研究显示, 两种方法对抗 TIF1 γ 抗体、抗 MDA5 抗体和抗 NXP2 抗体检测的一致性较好, 对抗 Mi-2 α/β 抗体和抗 EJ 抗体检测的一致性一般, 对抗 Jo-1 抗体检测的一致性差。

前期, 本研究采用的抗 TIF1 γ 抗体 ELISA 试剂盒的检测方法与金标准免疫沉淀法进行了对比^[16], ELISA 法的敏感度和特异度均为 100%。本文采用 ELISA 法和免疫膜条法检测皮炎炎患者血清中的抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体, 并对两种方法的检测结果进行对比分析, 结果表明, ELISA 法和免疫膜条法对抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体检测的一致性一般。本研究及前期研究结果显示, 免疫膜条法与 ELISA 法、免疫沉淀法的检测符合度并不十分一致。可见, 尽管这 3 组方法都能检测自身抗体, 相对于操作要求不高, 省时快捷的免疫膜条法, ELISA 法和免疫沉淀法检测结果更准确。因此, 当遇到免疫膜条法检测的自身抗体结果和患者临床特征不符的情况时, 可采用 ELISA 法或免疫沉淀法对患者血清标本进行重新检测, 从而确认检测结果, 更好发挥自身抗体检测对临床的价值。

在本研究中, ELISA 法和免疫膜条法结果不完全一致可能是由于免疫膜条法本身的缺陷所致, 如膜条法上重组抗原纯度不够或者失效, 导致免疫膜条法假阴性结果的出现; 此外, 也可能是由于实验环境因素 (如温度) 的影响。有研究指出^[17], 免疫膜条法对温度敏感, 尤其是对于弱阳性和阴性的标本, 随着实验环境温度的升高, 膜条的显色加深, 从而导致假阳性结果的出现。基于此, 当采用免疫膜条法进行实验时, 应先评价该方法的准确性, 探讨周围环境对实验结果的影响, 从而保证检测结果的准确性。

4 结 论

本研究结果表明, ELISA 法和免疫膜条法检测抗 MDA5 抗体和抗 TIF1 γ 抗体的一致性程度一般。虽然免疫膜条法能有效节约时间, 但仍需不断进行改善, 以提高其检测的准确性。

参考文献

[1] HOOGENDIJK J E, AMATO A A, LECKY B R, et al. 119th ENMC international workshop: trial design in adult

- idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis, 10-12 October 2003, Naarden, The Netherlands[J]. *Neuromuscul Disord*, 2004, 14(5): 337-345.
- [2] 李柳冰. 肌炎特异性自身抗体研究进展[J]. *中华内科杂志*, 2017, 12(56): 958-961.
- [3] MCHUGH N J, TANSLEY S L. Autoantibodies in myositis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(5): 290-302.
- [4] LUNDBERG I E, DE VISSER M, WERTH V P. Classification of myositis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(5): 269-278.
- [5] CAVAZZANA I, FREDI M, CERIBELLI A, et al. Testing for myositis specific autoantibodies: comparison between line blot and immunoprecipitation assays in 57 myositis sera[J]. *J Immunol Methods*, 2016, 433: 1-5.
- [6] BOHAN A, PETER J B. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts)[J]. *N Engl J Med*, 1975, 292(8): 403-407.
- [7] BOHAN A, PETER J B. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts)[J]. *N Engl J Med*, 1975, 292(7): 344-347.
- [8] SONTHEIMER R D. Would a new name hasten the acceptance of amyopathic dermatomyositis (dermatomyositis sine myositis) as a distinctive subset within the idiopathic inflammatory dermatomyopathies spectrum of clinical illness[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 46(4): 626-636.
- [9] MOGHADAM-KIA S, ODDIS C V, AGGARWAL R. Anti-MDA5 antibody spectrum in western world[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2018, 20(12): 78.
- [10] LI L, WANG Q, YANG F, et al. Anti-MDA5 antibody as a potential diagnostic and prognostic biomarker in patients with dermatomyositis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26552-26564.
- [11] RIDER LG, NISTALA K. The juvenile idiopathic inflammatory myopathies: pathogenesis, clinical and autoantibody phenotypes, and outcomes[J]. *J Intern Med*, 2016, 280(1): 24-38.
- [12] BETTERIDGE Z, MCHUGH N. Myositis-specific autoantibodies: an important tool to support diagnosis of myositis[J]. *J Intern Med*, 2016, 280(1): 8-23.
- [13] WOLSTENCROFT P W, FIORENTINO D F. Dermatomyositis clinical and pathological phenotypes associated with myositis-specific autoantibodies[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2018, 20(5): 28.
- [14] FUJIMOTO M, WATANABE R, ISHISUKA Y, et al. Recent advances in dermatomyositis-specific autoantibodies[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2016, 28(6): 636-644.
- [15] HAMAGUCHI Y, KUWANA M and TAKEHARA K. Comparison of anti-OJ antibody detection assays between an immunoprecipitation assay and line blot assay[J]. *Mod Rheumatol*, 2017, 27(3): 551-552.
- [16] FUJIMOTO M, MURAKAMI A, KUREI S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of anti-transcriptional intermediary factor-1 gamma and anti-Mi-2 autoantibodies in dermatomyositis[J]. *J Dermatol Sci*, 2016, 84(3): 272-281.
- [17] RONNELID J, BARBASSO HELMERS S, STORFORS H, et al. Use of a commercial line blot assay as a screening test for autoantibodies in inflammatory myopathies[J]. *Autoimmun Rev*, 2009, 9(1): 58-61.

(收稿日期: 2018-09-14 修回日期: 2018-11-02)

(上接第 1027 页)

- cells and their interactions in thrombus formation during sepsis[J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(2): 231-241.
- [5] KOCAADAM B, SANLIER N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(13): 2889-2895.
- [6] KARIMIAN M S, PIRRO M, MAJEED M A. Curcumin as a natural regulator of monocyte chemoattractant protein-1[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 33: 55-63.
- [7] SHI X, ZHENG Z, LI J, et al. Curcumin inhibits A β -induced microglial inflammatory responses in vitro; Involvement of ERK1/2 and p38 signaling pathways[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 594: 105-110.
- [8] WOJCIK M, KRAWCZYK M, WOJCIK P, et al. Molecular mechanisms underlying curcumin-mediated therapeutic effects in type 2 diabetes and cancer[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 9698258.
- [9] AHMAD I, SHARMA S, GUPTA N, et al. Antithrombotic potential of esculin 7, 3', 4', 5', 6'-O-pentasulfate (EPS) for its role in thrombus reduction using rat thrombosis model[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 119: 360-368.
- [10] HASAN M, LATIFI S, KAHN C J, et al. The positive role of curcumin-loaded salmon nanoliposomes on the culture of primary cortical neurons[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(7): 218.
- [11] 肖志勇. 姜黄提取物对小鼠肝纤维化的影响[J]. *生物技术通讯*, 2018, 29(4): 516-520.
- [12] 周丽娟, 赵军宁, 徐海波, 等. 不同来源姜黄提取物的抗肝损伤药效学研究[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(2): 55-57.
- [13] 周丽娟, 赵军宁, 徐海波, 等. 不同商品规格, 等级姜黄提取物抗氧化作用比较研究[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(1): 110-112.

(收稿日期: 2018-09-18 修回日期: 2018-11-06)