

• 论 著 •

NcX-ELISA 法检测抗 ds-DNA 在系统性红斑狼疮中的诊断价值

戴伟良, 蔡早育, 郑雪莲

(广东省佛山市第一人民医院检验科 528000)

摘 要:目的 探讨双链 DNA 抗体(抗 ds-DNA)的检测方法,寻找 1 种高特异性、高敏感性的检测方法,为临床诊断及治疗系统性红斑狼疮(SLE)提供可靠的实验依据。方法 分别采用间接荧光免疫法(IIFA)、普通 ELISA 法、放射免疫法(RIA)及 NcX-ELISA 法,测定 50 例 SLE 患者、60 例非 SLE 风湿病患者及 30 例健康对照者血清中抗 ds-DNA。结果 采用 IIFA 法、普通 ELISA 法、RIA 法及 NcX-ELISA 法测定抗 ds-DNA,诊断特异性分别为 96.7%、93.3%、95.0%、98.3%,其中以 NcX-ELISA 法特异性最高,普通 ELISA 法最低;诊断率分别为 71.8%、73.6%、76.4%、86.4%,其中以 NcX-ELISA 法诊断效率最高,IIFA 法最低;检测的敏感性分别为 42.0%、50.0%、54.0%、72.0%,以 NcX-ELISA 法检测敏感性最高,与 RIA 法相比差异无统计学意义($P>0.05$),与普通 ELISA 法比较差异有统计学意义($P<0.05$),与 IIFA 法比较差异有统计学意义($P<0.005$)。结论 普通 ELISA 法特异性低,IIFA 法敏感性低,RIA 法虽然敏感性、特异性较高,但是容易污染环境;NcX-ELISA 法具有高特异性、高敏感性、高诊断率及可批量检测的优点,是检测抗 ds-DNA 的理想方法。

关键词:红斑狼疮,系统性; 敏感性与特异性; 抗 ds-DNA-NcX-ELISA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1043-02

Clinical significance of anti-ds-DNA-NcX-ELISA detection in the diagnosis of systemic lupus erythematosus

Dai Weiliang, Cai Zaoyu, Zheng Xuelian

(Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To investigate suitable method with high sensitivity and specificity for the detection of anti-double stranded DNA(anti-ds-DNA) antibody and provide credible basis for diagnosing and monitoring systemic lupus erythematosus (SLE). Methods Serum anti-ds-DNA antibody in patients with SLE ($n=50$), patients with other autoimmune diseases ($n=60$) and healthy controls ($n=30$) were measured by indirect immunofluorescent assay (IIFA), common enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and anti-ds-DNA-NcX-ELISA respectively. Results The diagnostic specificity of IIFA, common ELISA, RIA and anti-ds-DNA-NcX-ELISA in the detection of serum anti-ds-DNA antibody was 96.7%, 93.3%, 95.0% and 98.3% respectively. The diagnostic efficiency of them was 71.8%, 73.6%, 76.4% and 86.4% respectively. The diagnostic sensitivity of them was 42.0%, 50.0%, 54.0% and 72.0% respectively. The sensitivity of anti-ds-DNA-NcX-ELISA was significantly higher than IIFA ($P<0.005$) and common ELISA ($P<0.05$), but there was no significant difference of diagnostic sensitivity between anti-ds-DNA-NcX-ELISA and RIA ($P>0.05$). Conclusion Among the four methods for the detection of serum anti-ds-DNA antibody, common ELISA is with the poorest specificity, IIFA with poorest sensitivity and RIA would get environment polluted even though it have higher specificity and sensitivity. Anti-ds-DNA-NcX-ELISA can be an ideal method for the detection of serum anti-ds-DNA antibody because of its high sensitivity, specificity and efficiency.

Key words: wpus erychematosus, systemic; sensitivity and specificity; anti-ds-DNA-NcX-ELISA

系统性红斑狼疮(SLE)是 1 种较常见的累及多脏器的自身免疫性疾病。这种疾病的发病机制是由于机体免疫功能紊乱并产生多种过量自身抗体形成免疫复合物,复合物沉积于组织及器官,继而引发组织、器官损害为主要表现的自身免疫性疾病,故检测机体中的自身抗体水平有助于 SLE 的诊断^[1]。抗 ds-DNA 已经被公认为诊断 SLE 的血清学实验中重要标志性抗体,故准确测定血清中抗 ds-DNA 对于协助临床诊断 SLE 意义显而易见^[2]。现阶段检测抗 ds-DNA 方法种类繁多,本文就几种检测抗 ds-DNA 的方法进行深入论证,旨在寻找 1 种高特异性、高敏感性的检测抗 ds-DNA 方法,并报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 2~12 月在本院就诊的 SLE 患者共 50 例,其中女 45 例,男 5 例;年龄 15~60 岁,平均 42.5 岁,全部患者诊断符合 1982 年美国风湿病协会修定的 SLE 诊断标准。非 SLE 风湿病患者组 60 例,均为本院明确诊断为非 SLE 的风湿病住院患者,其中男 25 例,女 35 例。健康对照组 30

例,其中男 20 例,女 10 例,均来源于本院保健科健康体检者。上述各组人群于清晨空腹抽取静脉血 3.5 mL,分离血清于一 20℃ 保存待用。

1.2 仪器及试剂 仪器主要为日本 Olympus B60 荧光显微镜,EL808 半自动酶标分析仪, XH-6010r 放射免疫分析仪,汇松 PW960 全自动洗板仪。抗 ds-DNA-NcX-ELISA 法、间接荧光免疫法(IIFA)试剂由德国欧蒙公司提供;普通 ELISA 法试剂由德国 AESKU Diagnostics 公司提供;放射免疫法(RIA)试剂由原子高科股份有限公司提供。

1.3 方法 各组血清分别采用抗 NcX-ELISA 法、IIFA 法、普通 ELISA 法及 RIA 法测定抗 ds-DNA,并同步作阴、阳性对照及质控,按照试剂盒及仪器说明书严格进行操作。

1.4 统计学处理 组与组之间的统计学比较采用配对 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 4 种方法检测健康对照组、非 SLE 风湿病患者组抗 ds-

DNA 结果比较,见表 1。表 1 结果显示,采用 IIFA 法、普通 ELISA 法、RIA 法及 NcX-ELISA 法测定抗 ds-DNA 中,NcX-ELISA 法特异性最高(98.3%),普通 ELISA 法特异性最低(93.3%)。而健康对照组中,上述 4 种方法均未检出阳性患者。

表 1 4 种方法检测健康对照组、非 SLE 风湿病患者组抗 ds-DNA 阳性结果比较[n(%)]

方法	健康对照组	非 SLE 风湿病患者组
NcX-ELISA	0(0.00)	1(1.67)
普通 ELISA	0(0.00)	4(6.67)
RIA	0(0.00)	3(5.00)
IIFA	0(0.00)	2(3.30)

2.2 4 种方法检测 SLE 患者抗 ds-DNA 情况比较,见表 2。

表 2 4 种方法检测 SLE 患者抗 ds-DNA 情况比较

方法	阳性 (n)	敏感性 (%)	各组与 NcX-ELISA 法比较	
			χ^2 值	P 值
NcX-ELISA	36	72	—	—
普通 ELISA	25	50	4.762	<0.05
RIA	27	54	2.783	>0.05
IIFA	21	42	9.333	<0.005

—:无数据。

表 2 结果显示,采用 IIFA 法、普通 ELISA 法、RIA 法及 NcX-ELISA 法测定抗 ds-DNA 中,其检测敏感性分别为 42.0%、50.0%、54.0%、72.0%,以 NcX-ELISA 法敏感性最高,IIFA 法敏感性最低。就敏感性来说,NcX-ELISA 法与其他各法统计学比较显示,与 RIA 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与普通 ELISA 法比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与 IIFA 法比较差异有统计学意义($P<0.005$);4 种方法测定抗 ds-DNA 的诊断率分别为 71.8%、73.6%、76.4%、86.4%,其中以 NcX-ELISA 法诊断率最高,达 86.4%,IIFA 法诊断率最低,为 71.8%。

3 结 论

SLE 是 1 种较常见的累及多脏器的自身免疫性疾病,并在疾病的发生、发展过程中产生多种自身抗体。这种疾病临床表现错综复杂,早期症状不典型,依据临床表现很难作出特异的诊断,其发病原理在于免疫复合物的形成和沉积,致病因素主要包括激素、环境与遗传三方面^[3]。其中 I 型干扰素(IFN)在 SLE 的发病机制中起着重要作用^[4]。故以自身抗体的检测来作为诊断 SLE 是当今临床诊断 SLE 的重要手段。

抗 ds-DNA 即抗双链(天然)DNA,抗双链 DNA 能与肾小球的 DNA 相结合而生成免疫复合物,这些免疫复合物沉积在肾小球毛细血管壁或血管外,从而引起炎症的产生,且抗 ds-DNA 与疾病活动度,特别是与活动性狼疮性肾炎密切相关^[5]。在 SLE 缓解期,抗 DNA 可转阴或滴度减低,如果健康人血清中检测到抗 ds-DNA,其中 85% 的人在 5 年内有可能发展为 SLE,为 SLE 的监控及治疗提供有效的依据^[6]。故测定抗 ds-DNA 可以作为 SLE 诊断和疗效观察的 1 项指标,其对于选择 1 种合适的方法学测定抗 ds-DNA,提高检测的敏感性 & 特异性意义显而易见。抗 ds-DNA 的检测已被公认为诊断 SLE 最重要的标志性自身抗体,美国风湿病学会将抗 ds-DNA 阳性列

为 SLE 诊断标准之一^[7]。

普通 ELISA 法其靶抗原 ds-DNA 是通过多聚左旋赖氨酸或硫酸鱼精蛋白连接在固相表面,但是传统的 ELISA 法通过多聚左旋赖氨酸或硫酸鱼精蛋白连接在固相表面,这些物质是碱性蛋白质,它与人组蛋白有交叉抗原性。当被检测血清中含有抗组蛋白时容易产生非特异性反应,故导致检测结果的特异性降低^[8]。研究显示,传统的 ELISA 法检测抗 ds-DNA 的特异性为 93.3%,是 4 种检测方法中特异性最低的,甚至低于相关报道,或许与标本的取材有关^[9]。

国外研究表明,经过对核小体的长期研究,发现其与塑料表面有明显的黏附性并对纯化 ds-DNA 有高亲和力^[10]。这种新型 ELISA 法即是本文所研究的内容,本法正是利用核小体的这种特性连接 DNA 与微孔板结合,NcX-ELISA 法特殊的结构确保了 ds-DNA 主要表达的正确显现,并能最小程度减少假阳性反应,使 NcX-ELISA 法对诊断 SLE 的敏感性 & 特异性达到最高,从而有可能替代 Farr-RIA 和绿蝇短膜虫间接免疫荧光法(IFA)及传统的 ELISA 法(靶抗原 ds-DNA 通过多聚左旋赖氨酸或硫酸鱼精蛋白连接在固相表面)。本文研究显示,在 4 种方法测定抗 ds-DNA 中,以 NcX-ELISA 法特异性最高,达 98.3%。

在敏感性方面,4 种方法测定抗 ds-DNA,以 NcX-ELISA 法敏感性最高,高于其他文献报道^[11]。把 NcX-ELISA 法敏感性分别与另外 3 种方法进行 χ^2 检验,可以看出与 RIA 法比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。而 RIA 法使用放射标志物,检测后废物对环境会造成一定的污染,故近年已经很少被使用^[12];与普通 ELISA 法比较,差异有统计学意义($P<0.05$);与 IIFA 法比较,差异有统计学意义($P<0.005$),且 IIFA 法操作繁琐,对于结果的判断要有丰富的临床经验,否则容易造成人为的结果偏差,对于大批量标本检测耗时长,不适合批量检测^[13]。故通过上述的研究,可以看出 NcX-ELISA 法具有高特异性、高敏感性 & 诊断率高的优点,且操作简便,既可以手工操作,适合标本量较少的基层医院,又适合标本量大的医院批量操作。

参考文献

[1] 方小娟,方苗廖,胡君,等. 117 例系统性红斑狼疮患者 ANA、抗 ENA 抗体、抗 ds-DNA 抗体检测[J]. 实用医技杂志,2008,15(1): 46-47.

[2] 张玲,李慧源,赵安敏,等. 自身抗体检测在系统性红斑狼疮诊断中的价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(2):116-117.

[3] 吴谨滨,周厚清,李卓成,等. 3 种自身抗体检测在 SLE 诊断中的意义[J]. 深圳中西医结合杂志,2010,20(4):221-222,225.

[4] 曾庆娣,潘玉琴,王书奎. 系统性红斑狼疮与 I 型干扰素关系[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(11):1019-1021.

[5] 黄清水,成北华,乐爱萍,等. 多种自身抗体检测在狼疮肾炎中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(4):298-300.

[6] 马东来,张少静,文夫瑞德. 斯特克. 自身抗体及其免疫荧光模式[M]. 北京:北京科学技术出版社,2000:39-40.

[7] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:东南大学出版社,2006:660.

[8] 徐兵,陈怡,黄毅,等. 鱼精蛋白和肝素预处理 ELISA 检测抗双链 DNA 抗体的研究[J]. 临床检验杂志,2008,26(5):351-352.

[9] 陈滢,张迎梅,陆俊忠,等. 自身抗体联合检测在自身免疫性疾病诊断中的应用价值[J]. 检验医学与临床,2008,5(24):1494-1496.

[10] Suer W, Dahnrich C, Schlumberger W, et al. (下转第 1046 页)

表 1 不同乙肝两对半模式患者血清 HBV-LP 和 HBV DNA 检测比较

模式 HBV M	n	HBV DNA		HBV-LP	
		阳性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阳性率(%)
HBsAg(+),HBeAg(+),抗-HBc(+)	42	40	95.23	38	90.48
HBsAg(+),HBeAg(+)	11	8	72.72	11	100.00
HBsAg(+),抗-HBe(+),抗-HBc(+)	67	49	73.13	53	79.10
HBsAg(+),抗-HBc(+)	25	12	48.00	13	52.00
抗-HBs(+),抗-HBe(+),抗-HBc(+)	35	0	0.00	0	0.00
抗-HBs(+),抗-HBc(+)	19	0	0.00	0	0.00
合计	199	109	54.77	115	57.79

表 2 HBeAg 阳性、阴性组中 HBV-LP 和 HBV DNA 的检测情况

组别	HBV DNA		HBV-LP	
	阳性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阳性率(%)
HBeAg 阳性	48	90.57	49	92.45
HBeAg 阴性	61	39.10	66	42.31

3 讨 论

ELISA 法一直是临床上用于 HBV 感染的血清检测手段,传统认为乙肝两对半中 HBeAg 阳性表明 HBV 复制活跃,传染性较强^[7]。研究显示,在 53 例 HBeAg 阳性患者中,HBV-LP 阳性率(92.45%)与 HBV DNA 的阳性率(90.57%)一致,经过 χ^2 验证,差异有统计学意义。结果表明,HBV-LP 与 HBV DNA 的检出具有良好的一致性,能够准确地反映出乙肝患者体内病毒的复制情况。过去临床上认为,乙肝患者出现 HBeAg 阴转是 HBV 复制转弱、传染性降低和预后良好的象征。但研究显示,在 156 例 HBeAg 阴性患者中,HBV DNA 与 HBV-LP 的阳性率分别为 39.10%和 42.31%,可能是免疫清除不全或是 HBV 基因前 C 区变异所致^[8]。转氨酶是判断肝内炎性反应活动度的可靠指标,临床上通常将血清转氨酶水平变化作为乙肝患者病情转归的 1 个重要指标。研究显示,HBV-LP 阳性患者的转氨酶水平明显高于阴性患者($P<0.05$),说明 HBV-LP 阳性患者较阴性患者肝组织损伤严重,这与 HBV-LP 阳性代表存在 HBV 复制相符合,表明 HBV-LP 可用于观察临床疗效和估计预后。

目前,HBV DNA 的检测是 HBV 复制最直接的指标,但此方法对实验室条件要求严格,不易推广,特别是广大基层医疗卫生单位还难以开展。乙肝两对半的血清免疫学标志物可反映乙肝患者的病情和传染性,现已作为常规检查项目开展。

不过,由于其方法灵敏度、特异性的限制以及 HBV 为逃避宿主的免疫反应常发生变异,导致检测结果失真。而使用酶联免疫定量法检测 HBV-LP 与 HBV DNA 有良好一致性,是反映 HBV 复制活跃的可靠指标,可以作为 HBV 感染、复制和乙肝患者诊断、治疗和预后的重要标志物,具有较高的临床应用价值^[9]。

参考文献

[1] 梁晓峰,陈园生,王晓军,等. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志,2005,26(3):655-658.

[2] 孙颖,辛绍杰,雷厉,等. 乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定 HBV DNA 复制的意义[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(3):354-357.

[3] Lambert C,Mann S. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins[J]. General Virology,2004,85(4):1221-1225.

[4] 彭建明,李金明. 病毒样颗粒在免疫测定中的应用研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2005,11(2):214-216.

[5] 赵蕊,李鲁平. 乙肝病毒外膜大蛋白的临床检测及其意义[J]. 中国热带医学,2008,10(2):1851-1852.

[6] 王晓东,李秀全,李凤焕,等. 慢性乙肝血清标志物与 HBV DNA 水平的关系[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(4):1070-1072.

[7] 谢志贤,谭爱国,董莹. 血清中乙型肝炎 5 项标志表现模式与乙型肝炎病毒 DNA 含量的关系[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(2):81-83.

[8] Hamasaki K,Nakata K,Nagayama Y,et al. Changes in the prevalence of HBeAg-negative mutant hepatitis B virus during the course of chronic hepatitis B[J]. Hepatology,1994,20(4):8-14.

[9] 赵辉,李凤英. HBV 血清标志物与前 S1 抗原、HBV DNA 的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(2):1129-1130.

(收稿日期:2011-02-12)

(上接第 1044 页)

Autoantibodies in SLE but not in scleroderma react with protein-stripped nucleosomes[J]. J Autoimmun.2004,22(4):325-334.

[11] 王梅芳. 抗 ds-DNA 抗体在系统性红斑狼疮中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(3):606-607.

[12] 吕世静,刘若英,蒋黎华,等. 临床免疫学检验[M]. 北京:中国医

药科技出版社,2004:240-241.

[13] 金卫东,贾敬年,俞晓洁,等. 系统性红斑狼疮疾病活动性的血清学指标的评价[J]. 中国实验诊断学,2007,11(9):1156-1159.

(收稿日期:2011-04-05)