

• 论 著 •

两种检测抗双链 DNA 抗体方法的比较及分析

彭 宽¹, 范琳琳^{2△}

(1. 南昌大学第一附属医院检验科, 江西南昌 330006; 2. 南昌大学医学院 10 级医学检验专业, 江西南昌 330006)

摘要:目的 探讨绿荧短膜虫间接免疫荧光(CL-IIF)法和酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测抗双链 DNA(dsDNA)抗体的特点及临床应用价值。方法 采用 CL-IIF 法和 ELISA 法同时检测 85 例系统性红斑狼疮(SLE)患者, 20 例疾病对照和 75 例健康体检者血清中抗 dsDNA 抗体, 评价两种检测方法的诊断效能。结果 两种方法在 SLE 组患者的阳性率明显高于疾病对照组及健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CL-IIF 法和 ELISA 法在 SLE 组的阳性率分别为 72.94% 和 88.24%, 后者的阳性预测值低于前者。同时 ELISA 法检测出 SLE 组、疾病对照组、健康对照组三组的抗 dsDNA 抗体浓度均数差异有统计学意义($P < 0.05$), 各组抗 dsDNA 抗体的浓度均数间呈线性趋势($P < 0.05$)。结论 CL-IIF 法检测 SLE 组的抗 dsDNA 抗体具有很高的特异性, 有助于 SLE 的确诊。ELISA 法可定量检测抗 dsDNA 抗体的浓度, 其浓度与 SLE 疾病活动度呈线性相关, 且方法敏感性高, 可有效筛查 SLE 患者。

关键词: 系统性红斑狼疮; 抗双链 DNA 抗体; 间接免疫荧光法; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)16-2380-03

Comparison and analysis of two detection measures for anti-double stranded DNA antibody

Peng Kuan¹, Fan Linlin^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Medical Laboratory, Medical School, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics and clinical application value of anti-double stranded DNA antibody detected by Crithidia indirect immunofluorescence assay method and enzyme linked immunosorbent assay method. **Methods** Eighty-five patients with systemic lupus erythematosus, 20 disease controls and 75 healthy controls were selected. The serum anti-double stranded DNA antibody was detected simultaneously by the methods of Crithidia indirect immunofluorescence assay and enzyme linked immunosorbent assay and their diagnostic efficacies for detection were compared. **Results** For each method the positive rate in the systemic lupus erythematosus group was significantly higher than that in the disease control group and healthy control group. The difference had statistical significance ($P < 0.05$). The positive rates of Crithidia indirect immunofluorescence assay and enzyme linked immunosorbent assay in the systemic lupus erythematosus group were 72.94% and 88.24% respectively, and the positive predictive value of enzyme linked immunosorbent assay is lower ($P < 0.05$). Meanwhile the anti-double stranded DNA antibody concentrations detected by enzyme linked immunosorbent assay method showed statistically significant difference among the active systemic lupus erythematosus group, the stable systemic lupus erythematosus group and the control group ($P < 0.05$) and presented linear trend. **Conclusion** Using Crithidia indirect immunofluorescence assay method to detect anti-double stranded DNA antibody for the systemic lupus erythematosus group has high specificity and is helpful for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Enzyme linked immunosorbent assay can be used to detect anti-double stranded DNA antibody concentration quantitatively, which is linearly related with systemic lupus erythematosus activity and the method is of high sensitivity, which can effectively screen the patients with systemic lupus erythematosus.

Key words: systemic lupus erythematosus; anti-double stranded DNA antibody; Crithidia indirect immunofluorescence assay; enzyme linked immunosorbent assay

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多器官、多系统的小血管及结缔组织的自身免疫性疾病。患者体内可产生针对核酸、核蛋白和组蛋白的抗核抗体及其他自身抗体。其中抗 dsDNA 抗体是 SLE 患者的特征性标记抗体, 对 SLE 的诊断和病情评估具有重要意义。本研究应用各临床实验室较常用的短膜虫间接免疫荧光(CL-IIF)法和酶联免疫吸附试验(ELISA)法对抗 dsDNA 抗体进行检测, 通过比较不同方法的敏感性、特异性等, 并分析抗体浓度与疾病活动程度的关系, 以将不同方法检测抗 dsDNA 抗体的结果合理应用于 SLE 患者临床诊断与病情监测的解释。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取在南昌大学第一附属医院门诊及住院的 SLE 患者 85 例为 SLE 组, 入选患者均符合 1997 年美国风湿学会(ACR)分类标准^[1]。其中疾病稳定期 20 例, 疾病活动期 65 例, 疾病活动度判断根据 2000 年修订 SLE 疾病活动指数(SLE DAI2000): 小于 10 分表示疾病稳定, 大于等于 10 分表示疾病活动^[2]; 疾病对照组 20 例(类风湿性关节炎 12 例, 干燥综合征 5 例, 其他 3 例, 均符合国际诊断标准), 同时选取 75 例健康体检者作为健康对照组。

1.2 仪器与试剂 CL-IIF 检测试剂盒购自欧盟医学实验诊断

有限公司, ELISA 检测试剂盒购自上海科新生物技术股份有限公司。试验严格按照试剂盒使用说明书操作。

1.3 方法 将试剂盒所带阳性对照、阴性对照与待测标本同时检测。CL-IIF 测定结果以动基体显示均匀荧光或有时边缘增强荧光为阳性, 细胞核或鞭毛基体出现荧光不为阳性; ELISA 测定结果以大于等于 100 IU/mL 为阳性, 小于 100 IU/mL 为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件分析, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 用描述性统计分析, ELISA 法各组抗 dsDNA 抗体浓度均数比较采用单因素方差分析并进行线性趋势检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CL-IIF 法检测结果组间比较 如表 1 所示, 以 CL-IIF 检测 SLE 组的 85 例患者, 检出结果呈阳性者有 62 例, 阳性率为 72.94%, 在疾病对照组仅有 1 例风湿性关节炎患者呈阳性结果, 健康对照组中无阳性患者。SLE 组患者阳性率明显高于疾病对照组及健康对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 SLE 组、疾病及健康对照组中抗 dsDNA 抗体的阳性率比较 (CL-IIF 法)

组别	例数(n)	CL-IIF 阳性[n(%)]
SLE 组	85	62(72.94)
疾病对照组	20	1 (0.05)
健康对照组	75	0 (0.00)

2.2 ELISA 法检测结果组间比较 如表 2 所示, 以 ELISA 法检测 SLE 组的 85 例患者, 检查结果呈阳性者有 75 例, 阳性率为 88.24%, 在疾病对照组和健康对照组中各有 3 例阳性结果, 3 例疾病对照组患者为类风湿性关节炎患者。SLE 组患者阳性率明显高于疾病对照组及健康对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 SLE 组、疾病及健康对照组中抗 dsDNA 抗体的阳性率比较 (ELISA 法)

组别	例数(n)	ELISA 阳性[n(%)]
SLE 组	85	75(88.24)
疾病对照组	20	3 (0.15)
健康对照组	75	3 (0.04)

2.3 两种方法检测结果的阳性率比较 CL-IIF 法检测结果的阳性率为 72.94%, ELISA 法检测结果的阳性率为 88.24%, 二者差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 CL-IIF 法和 ELISA 法的检测结果(n)

CL-IIF 法	ELISA 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	59	4	63
阴性	22	95	117
总计	81	99	180

2.4 两种方法诊断 SLE 的效能评价 如表 4 所示, CL-IIF 检测抗 dsDNA 抗体的特异性、阳性预测值均高于 ELISA 法, 而敏感性和阴性预测值均低于 ELISA 法。

2.5 各组抗 dsDNA 抗体浓度比较及线性趋势检验 如表 5 所示, ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体, 三组 (SLE 组、疾病及健

康对照组) 抗 dsDNA 抗体浓度均值及总体均值比较, 差异有统计学意义 ($F=110.550, P<0.05$)。各组抗 dsDNA 抗体浓度均值的线性趋势检验结果显示 ($F_{未加权}=196.256, F_{加权}=170.233, P<0.05$), SLE 疾病活动度与各组抗 dsDNA 抗体的浓度均数间呈线性趋势 ($P<0.05$)。

表 4 两种抗 dsDNA 抗体检测方法的诊断效能评价 (%)

	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
CL-IIF	72.94	98.95	98.41	80.34
ELISA	88.24	93.68	92.59	89.90

表 5 ELISA 法各组抗 dsDNA 抗体浓度均数比较及线性趋势检验

组别	例数(n)	抗 dsDNA 抗体浓度均值(IU/mL)	P
SLE 活动组	65	365.5	—
SLE 稳定组	20	102.6	<0.05
健康及疾病对照组	95	18.7	<0.05

3 讨 论

在 SLE 患者血清中, 存有各种自身抗体, 对疾病的发生发展、临床诊断与治疗、病程转归与预后均发挥着至关重要的作用^[3]。其中, 抗 dsDNA 抗体作为 SLE 的标志性抗体已有 50 多年的历史^[4], 美国风湿学会 (ACR) 1997 年修订的 SLE 分类诊断标准已将其阳性列为 SLE 的诊断标准之一。

目前对抗 dsDNA 抗体的检测方法多样, 包括放射免疫分析 (RIA)、ELISA、间接免疫荧光法 (IIF)、斑点免疫金渗滤法 (DIGFA) 和免疫印迹法 (IBT) 等等, 各方法各有优劣, 尚缺少统一的参考标准, 对检测结果的临床解释也各有差别。本研究针对 SLE 组、疾病对照组和健康对照组的血清抗 dsDNA 抗体分别采用临床实验室较常用的 CL-IIF 法和 ELISA 法进行检测, 两种方法的检测结果经分析均表明 SLE 组检出阳性率明显高于疾病对照组和健康对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。因此测定血清抗 dsDNA 抗体已成为 SLE 诊断一项有价值的客观指标^[5]。

绿蝇短膜虫的动基体只由高纯度的环状 dsDNA 构成, 除此外通常不含有其他细胞核抗原, 抗原性较特异, 故以绿蝇短膜虫为基质的 CL-IIF 法检测患者血清中的抗 dsDNA 抗体特异性较高。本研究中 CL-IIF 法检测抗 dsDNA 抗体的特异性为 98.95%, 高于 ELISA 法 93.68%。ELISA 法检测试剂盒应用的是重组质粒 DNA, 相较于从小牛胸腺或鲑鱼精子中提取的天然 ds-DNA, 有更高的纯度和稳定性, 故 ELISA 法对抗 dsDNA 抗体的检测具有一定的特异性。

ELISA 法将脱氧核糖核酸包被在聚乙烯板上, 可检测出低亲和力的抗 dsDNA 抗体; 当抗 dsDNA 抗体浓度较低, 临近于 100 IU/mL 界值时, CL-IIF 法荧光判断结果受操作者的主观因素和技术水平的影响, 可能观察不到荧光而判定为阴性结果, 在 ELISA 法却可通过精准定量及细微的数值变化反映出此低值, 本研究中 ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体的阳性率明显高于 CL-IIF 法, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 但其阳性预测值较低, 易出现假阳性。ELISA 法检测试剂盒的实验基质 ds-DNA 在制备过程中, 可能因少部分人为暴露的 DNA 内部结构位点而产生 ssDNA。抗 DNA 抗体存在广(下转第 2383 页)

3 讨 论

肾炎是一种免疫性疾病,是肾免疫介导的炎性反应,是不同的病原微生物感染人体后,产生不同的抗体,结合成不同的免疫复合物,沉积在肾脏的不同部位,造成病理损伤,形成不同的肾炎类型,反映在生化指标上是 Npt、Cr、BUN 水平的改变,并且病情越严重,Npt 水平升高的越早,程度越明显。Npt 是反映肾功能受损的早期变化的理想指标,且与 Cr、BUN 水平成正相关。

Npt 是人体体液中最重要的一种嘌呤类复合物,是三磷酸鸟苷、生物嘌呤通路的一种中间代谢产物,由活化的巨噬细胞合成和释放,是一种细胞介导免疫激活的炎性标志物^[3]。Npt 是一种细胞介导免疫激活的敏感标志,与疾病感染、移植排斥、自身免疫性疾病等关系密切^[4]。由于干扰素是巨噬细胞的主要激活因子,而 Npt 主要由激活的巨噬细胞分泌,故二者水平能间接反映巨噬细胞功能。巨噬细胞可产生多种蛋白酶及炎性反应介质、活性氧、一氧化氮,造成固有细胞损伤,引起肾小球炎性反应、新月体形成及纤维化,导致蛋白尿^[5],导致肾炎发生。

本研究发现,急性肾炎和慢性肾炎组中 Npt、Cr、BUN 三项指标明显高于对照组,但急性肾炎和慢性肾炎比较,差异不具有统计学意义,但是病情越严重,Npt 升高的越快,相应的检测值就越高。提示肾炎的发生与炎症和免疫系统的活化有密切关系。Npt 水平的升高反映了 T 细胞介导免疫参与肾炎的发生和发展。近来很多证据证明,细胞免疫参与慢性肾病的发生、发展,尤其微小病变肾病^[6]。从引起蛋白尿来看,微小病变

肾病以 T 细胞介导免疫功能为主,以 B 细胞介导免疫功能为辅。而增生性肾炎则以体液免疫为主,细胞免疫为辅。Npt 作为一种可以反映体内细胞免疫的标志物具有稳定性好、持续时间长、不易失活或降解等优点,检测其变化有助于肾炎的诊断及疗效评估。

参考文献

- [1] Wachter H, Fuchs D, Hausen A, et al. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: Immunological basis and clinical application[J]. Adv Clin Chem, 1989, 27(1): 81-141.
- [2] Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, et al. Immune-response associated production of neopterin-release from macrophages primarily under control of interferon-gamma[J]. J Exp Med, 1984, 160(1): 310-316.
- [3] De Rosa S, Cirillo P, Pacileo M, et al. Neopterin: from forgotten biomarker to leading actor in cardiovascular pathophysiology[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2011, 9(2): 188-199.
- [4] 谢荣盛, 富路. 血清新喋呤水平与急性冠脉综合征的关系[J]. 心血管病学进展, 2005, 26(5): 464-466.
- [5] 张雪光, 师锁柱, 陈香美, 等. 巨噬细胞移动抑制因子在 IgA 肾病中的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(3): 313-318.
- [6] 林善铤. 当代肾脏病学[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 2001: 395-400.

(收稿日期: 2015-05-23)

(上接第 2381 页)

泛的交叉反应性,大多数 SLE 患者体内的 DNA 抗体除能识别 dsDNA 外,也可与 ssDNA、磷脂、多糖发生交叉反应;同时由于在固相载体上包被 DNA 比较困难,采用不同的包被方法增加 DNA 的吸附时可能会把其他抗原带入 ELISA 系统,也将引起交叉反应,导致假阳性增多^[6-7]。此外,ELISA 法检测操作步骤繁杂,标本稀释、抗原板洗涤、酶标仪的校准等影响因素都可造成结果误差。尽管 ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体受到诸多限制,但其高敏感性对 SLE 患者的筛查不可或缺,实为一种有效方法。采用两种方法分别检测疾病对照组的抗 dsDNA 抗体,CL-IIF 法检出 1 例阳性患者,ELISA 法检出 3 例,患者均属于类风湿性关节炎病例,自身免疫性疾病患者体内会产生各种自身抗体,部分类风湿关节炎患者体内存有抗 dsDNA 抗体,检测抗 dsDNA 抗体能作为类风湿性关节炎的过筛实验之一。

SLE 患者血清中的自身抗体可损伤到全身多器官系统,在发生肾损害中,抗 dsDNA 抗体可形成免疫复合物随血液循环沉积于肾小球基底膜上,或直接作用于肾脏固有抗原,从而造成肾脏的病理性损害。本研究显示 ELISA 法检测得 SLE 疾病活动组抗 dsDNA 抗体浓度均数明显要高于 SLE 稳定组与健康及疾病对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),并且各组抗 dsDNA 抗体浓度均数线性趋势检验。这表明 SLE 患者血清中的抗 dsDNA 抗体浓度与疾病活动度有相关性,SLE 患者在疾病稳定期或病情好转时,抗 dsDNA 抗体浓度可能趋于降低或者转阴,故对患者体内抗 dsDNA 抗体浓度进行监测即是对患者病情变化的密切观察。根据抗体浓度升降变化有助于判断疾病活动度。

ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体具有高通量、快速、客观的特点,易于实现自动化,其定量检测以浓度值的微小改变反映病情变化,且方法敏感性高,可有效筛查 SLE 患者;CL-IIF 法操作要求有经验的技术人员,检测结果单一粗略,对病情区分度低,但其特异性高,有助于 SLE 患者确诊。两种方法联合检测,互补优劣,综合判断,对 SLE 患者临床诊断与病情监测极有价值。

参考文献

- [1] Hochberg MC. Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(1): 1725.
- [2] Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000[J]. J Rheumatol, 2002, 29(2): 288-291.
- [3] 骆丹, 周炳荣. 系统性红斑狼疮自身抗体的临床意义[J]. 中华皮肤科杂志, 2013, 46(1): 3-5.
- [4] Anon D, Isenberg DA, Manson JJ, ehrenstein Mr, rahman a; fifty years of anti-dsDNA antibodies; are we approaching journey's end [J]. Rheumatology (Oxford), 2007, 46(1): 1052-1056.
- [5] 张宏, 汪国生, 李向培, 等. 2 种方法检测抗双链 DNA 抗体的比较及临床意义[J]. 安徽医学, 2012, 33(11): 1430-1432.
- [6] 陈兆鹏. 抗双链 DNA 抗体测定方法及存在的问题[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1997, 5(5): 218-219.
- [7] 梁结玲, 刘健, 蔡健梅, 等. 联合检测对类风湿性关节炎的诊断及临床意义[J]. 医学检验与临床, 2012, 23(3): 48-49.

(收稿日期: 2015-04-12)