

• 论 著 •

3 种抗双链 DNA 抗体检测方法比较及其联合检测对系统性红斑狼疮的诊断价值研究*

杨育红¹, 田卫花^{1,2△}, 张邦能¹, 周思彤¹, 邢福军^{1,2}, 马文媛¹, 杨邵华¹

(1. 甘肃省中医院检验科, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃省中医药研究院, 甘肃兰州 730050)

摘要:目的 分析间接免疫荧光法(IIF)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫印迹法(IBT)检测抗双链 DNA(dsDNA)抗体的差异,以及联合检测在系统性红斑狼疮(SLE)诊断中的应用价值。方法 选取 2012 年 1 月至 2015 年 3 月确诊的 SLE 患者 50 例,以及同期其他自身免疫病(AID)患者 100 例和体检健康者 100 例。分别采用 3 种方法检测其血清抗 dsDNA 抗体,比较 3 种方法的灵敏度与特异度,并分析 3 种方法联合检测的灵敏度与特异度。结果 IIF 法特异度(99.5%)最高,ELISA 法灵敏度(74.0%)最高。IIF 与 ELISA 法、IIF 与 IBT 法、ELISA 与 IBT 法检测 SLE 患者抗 dsDNA 抗体的检出率比较,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 11.435、13.994、4.539, $P < 0.05$);且一致性检验的 Kappa 值(κ)分别为 0.411、0.522、0.278。3 种方法串联检测特异度提高到 99.5%,并联检测的灵敏度提高到 82.0%。结论 3 种检测抗 dsDNA 抗体的方法中,IIF 特异度最高,ELISA 灵敏度最高,联合检测可提高检测灵敏度与特异度。

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

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0588-03

Study on comparison of three methods for anti-double-stranded DNA antibody and diagnostic value of joint detection in systemic lupus erythematosus*

Yang Yuhong¹, Tian Weihua^{1,2△}, Zhang Bangneng¹, Zhou Sitong¹,

Xing Fujun^{1,2}, Ma Wenyuan¹, Yang Shaohua¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. Traditional Chinese Medicine Institute of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: Objective To analyse the differences of indirect immuno-fluorescence (IIF), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting technique (IBT) for the determination of anti-dsDNA antibody, and evaluate the value of joint detection of the three methods for diagnosing systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** From January 2012 to March 2015, 50 cases of patients with SLE, 100 cases of patients with other autoimmune disease (AID) and 100 healthy individuals were selected. Serum levels of anti-dsDNA antibody were detected by using IIF, ELISA and IBT respectively. Then, compared the sensitivity and specificity of the three methods, and analysed the sensitivity and specificity of joint detection. **Results** The IIF method had the highest specificity (99.5%), while ELISA had the highest sensitivity (74.0%). There were statistically significant differences in the positive detection rates of serum anti-dsDNA antibody in patients with SLE between IIF and ELISA, IIF and IBT, ELISA and IBT (χ^2 values were 11.435, 13.994 and 4.539; $P < 0.05$), and the Kappa values were 0.411, 0.522 and 0.278 respectively. The specificity of three methods joint in series was increased to 99.5%, and the sensitivity of parallel combined detection of the three methods was increased to 82.0%. **Conclusion** Among the three methods for detecting anti-dsDNA antibody, ELISA has the highest sensitivity, and IIF has the highest specificity. Moreover, joint detection could increase the sensitivity and specificity.

Key words: systemic lupus erythematosus; anti-double-stranded DNA antibody; indirect immuno-fluorescence; enzyme-linked immunosorbent assay; immunoblotting technique

系统性红斑狼疮(SLE)是一种多因素引起的,累及多器官、多系统的慢性自身免疫性疾病,好发于年轻女性,临床表现多样,体内出现多种自身抗体为其重要特征^[1-2]。有研究报道,患者体内存在针对各种核酸、核蛋白和组蛋白的抗核抗体及其他自身抗体,因而实验室诊断 SLE 主要检测抗核抗体(ANA)、抗双链 DNA(dsDNA)抗体、抗 Smith 抗体、抗核糖体 P 蛋白、抗核小体抗体和抗组蛋白抗体等^[3-4]。由于抗 dsDNA 抗体对 SLE 的特异度较高,因此被用于 SLE 的临床诊断^[5]。目前临床实验室检测抗 dsDNA 抗体的方法主要有间接免疫荧光法(IIF)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫印迹法(IBT)和放射

免疫法(Farr)等,其灵敏度和特异度各有区别。由于 Farr 会造成环境污染,且对人体危害较大,故已逐渐被其他方法取代。因此,本文主要比较前 3 种方法的检测效果并分析其联合检测的意义。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 SLE 组:2012 年 1 月至 2015 年 3 月甘肃省中医院风湿骨病科和肾病科住院 SLE 患者 50 例,男 1 例,女 49 例;年龄 15~50 岁;均符合美国风湿病协会(ACR)2009 年修订的 SLE 分类诊断标准。其他自身免疫病(AID)组:同期该院住院及门诊的其他 AID 患者 100 例,男 20 例,女 80 例;年龄

* 基金项目:甘肃省卫生行业科研计划管理项目(GWGL2013-1)。 作者简介:杨育红,女,主管检验师,主要从事免疫学检验的研究。

△ 通讯作者, E-mail: tianwh05@163.com。

20~70 岁;其中类风湿性关节炎患者 69 例,原发性干燥综合征(pSS)15 例,系统性硬化症 3 例,强直性脊柱炎 13 例,诊断均符合相应的国际诊断标准。对照组:同期在该院做健康体检的健康者 100 例,排除感染、急性性肾炎、急性性肾盂肾炎和各种 AID 患者。

1.2 仪器与试剂 抗 dsDNA 抗体 IIF、ELISA 和 IBT 试剂盒均为德国欧蒙公司产品,均提供质控血清。MK2 洗板机(芬兰雷勃公司),RT-6100 酶标分析仪(美国雷杜公司),TS-8 转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造有限公司),BX43 荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 抽取所有受试者清晨空腹静脉血 3~5 mL,离心后血清标本储存于-70 ℃冰箱。

1.3.2 绿蝇短膜虫(CL)IIF 法检测抗 dsDNA 抗体 按试剂盒操作说明将血清用磷酸盐缓冲液(PBS)-吐温(Tween)进行 1:10 稀释,按照操作说明加入加样板上,并设阴、阳对照,加盖基质片。试验完成后甘油封片,荧光显微镜下观察 CL 动基体有无特异性荧光染色,滴度大于或等于 1:10 判为阳性。

1.3.3 ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体 按试剂盒操作说明将患者血清进行 1:201 稀释,并按照操作说明依次加入 3 个水平的标准血清、阴性及阳性对照、稀释后的患者血清,反应完成后浓度大于或等于 100 IU/mL 判为阳性。

1.3.4 IBT 法检测抗 dsDNA 抗体 按试剂盒操作说明进行试验,反应膜在特定位置出现肉眼可见的与质控条带色泽相同的显示带,判断为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计数资料以例数或百分率表示,不同方法间阳性检出率比较采用配对四格表资料的 χ^2 检验;计算 Kappa 值(κ)做一致性分析, $\kappa\leq 0.40$ 表明一致性较差,0.40< $\kappa\leq 0.60$ 表明中度一致,0.60< $\kappa\leq 0.80$ 表明有较高的一致性, $\kappa>0.80$ 表明有极好的一致性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IIF 法检测抗 dsDNA 抗体阴、阳性 当被检测血清中存在抗 dsDNA 抗体,在荧光显微镜下可观察到 CL 的动基体呈现特异性荧光染色;阴性时 CL 的动基体无特异性荧光染色,但虫体轮廓隐约可见。见图 1~3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 3 种方法检测抗 dsDNA 抗体 用 IIF、ELISA 及 IBT 法对 250 份标本进行检测,ELISA 法的阳性检出率最高(74%),IIF 法的阳性检出率最低(48%)。3 种检测方法检测各组的抗 dsDNA 抗体阳性率,见表 1。以 SLE 组患者例数为基数,对 3 种方法的灵敏度进行评价,以其他 AID 组和对照组例数之和作为基数计算各种方法检测的特异度,见表 2。

表 1 3 种方法检测各组抗 dsDNA 抗体的阳性率[n(%)]				
组别	n	IIF 法	ELISA 法	IBT 法
SLE 组	50	24(48.0)	37(74.0)	28(56.0)
其他 AID 组	100	1(1.0)	9(9.0)	15(15.0)
对照组	100	0(0.0)	3(3.0)	6(6.0)

2.3 3 种方法检测 SLE 患者抗 dsDNA 抗体的相关性与一致性比较 IIF 法与 ELISA 法阳性检出率比较差异有统计学意义($\chi^2=11.435, P<0.05$),两种方法中度一致($\kappa=0.411$);IIF 法与 IBT 法阳性检出率比较差异有统计学意义($\chi^2=$

13.994, $P<0.05$),两种方法中度一致($\kappa=0.522$);ELISA 法与 IBT 法阳性检出率比较差异有统计学意义($\chi^2=4.539, P<0.05$),两种方法一致性较差($\kappa=0.278$)。见表 3~5。

表 2 3 种方法检测抗 dsDNA 抗体的效能				
检测方法	灵敏度(%)	特异度(%)	阳性预测值	阴性预测值
IIF 法	48.0	99.5	0.96	0.88
ELISA 法	74.0	94.0	0.76	0.94
IBT 法	56.0	89.5	0.57	0.89

表 3 SLE 组 IIF 与 ELISA 法检测抗 dsDNA 抗体比较(n)			
IIF 法	ELISA 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	23	1	24
阴性	14	12	26
合计	37	13	50

表 4 SLE 组 IIF 与 IBT 法检测抗 dsDNA 抗体比较(n)			
IIF 法	IBT 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	4	24
阴性	8	18	26
合计	28	22	50

表 5 SLE 组 ELISA 与 IBT 法检测抗 dsDNA 抗体比较(n)			
ELISA 法	IBT 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	24	13	37
阴性	4	9	13
合计	28	22	50

2.4 3 种方法联合检测抗 dsDNA 抗体的效能 3 种方法串联检测抗 dsDNA 抗体的特异度提高到 99.5%,但灵敏度下降为 38.0%;而 3 种方法并联检测的灵敏度提高到 82.0%,特异度下降为 86.0%。3 种方法联合检测抗 dsDNA 抗体结果,见表 6。

表 6 3 种方法联合检测抗 dsDNA 抗体的效能(n)					
组别	n	3 种方法串联检测		3 种方法并联检测	
		阳性	阴性	阳性	阴性
SLE 组	50	19	31	41	9
其他 AID 组	100	1	99	20	80
对照组	100	0	100	8	92

3 讨 论

1957 年 Ceppellini 等^[6]报道 SLE 患者血清中存在 DNA 反应的成分。目前抗 dsDNA 抗体是公认的 SLE 高度特异性抗体,特异度可达 95%~100%,被列为 SLE 的诊断标准之一,与疾病活动性关系密切,其抗体效价随疾病的活动而上升,缓解而下降,可用于监测 SLE 的病情变化、判断疾病活动期及观察

药物治疗效果等^[7]。

目前,临床实验室应用于检测抗 dsDNA 抗体的方法多样,主要包括 IIF、ELISA、IBT 和 Farr 法,且各有利弊。其中 Farr 法出现最早,具有只结合高亲和力抗体的独特优势,其特异性好,曾被列为检测抗 dsDNA 抗体的金标准。但是,该方法具有放射性、检测周期长,易受到血清中高亲和力免疫球蛋白 M(IgM)的干扰且不能自动化,现在已经很少采用^[8-10]。本研究选择了 IIF、ELISA 和 IBT 法对 250 份血清标本进行了抗 dsDNA 抗体检测,并对其检测效能进行了分析。其中,IIF 法特异度(99.5%)最高,灵敏度(48.0%)最低;ELISA 法灵敏度高,可达 74.0%;IBT 法的特异度和灵敏度均不高。

同时,笔者对 IIF 与 ELISA 法、IIF 与 IBT 法、ELISA 与 IBT 法检测 SLE 患者抗 dsDNA 抗体的检出率进行了比较分析,结果显示差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 11.435、13.994、4.539, $P < 0.05$)。对 3 种方法进行一致性分析,结果显示 IIF 与 ELISA 法、IIF 法与 IBT 法呈现中度一致,而 ELISA 与 IBT 法一致性较差。这可能与抗 dsDNA 抗体存在高亲和力和低亲和力两种特异性抗体有关。低亲和力抗 dsDNA 抗体除存在于 SLE 患者体内外,也存在于其他 AID 患者体内,对 SLE 的诊断价值低;而高亲和力抗 dsDNA 抗体对 SLE 有较好的特异性。各种检测方法对上述两种抗 dsDNA 抗体的检测适应性不同。ELISA 法适宜检测低亲和力抗 dsDNA 抗体,IIF 法适宜检测高亲和力抗 dsDNA 抗体^[11-12]。本研究还显示,3 种方法串联检测抗 dsDNA 抗体的特异度提高,但灵敏度下降;而 3 种方法并联检测的灵敏度提高,特异度下降。

综上所述,3 种方法单独检测抗 dsDNA 抗体均存在不足之处,且 3 种方法的相关性与一致性不是很理想,而 3 种方法联合检测对 SLE 诊断具有重要的临床意义,可以提高检测特异度与灵敏度,从而很大程度上避免误诊与漏诊的发生。

参考文献

[1] 刘艳慧,王爱雪,孟新艳,等. 抗核小体抗体、抗双链 DNA 抗体和抗超敏双链 DNA 抗体与系统性红斑狼疮的相关性研究[J]. 临床内科杂志,2013,30(7):453-455.

[4] 沈萍,魏泽庆,陈云波,等. Mohnarin 2010 年度报告:ICU 细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):5477-5481.

[5] Shorr AF. Epidemiology of Staphylococcal resistance[J]. Clin Infect Dis,2007,45(Suppl 3):S171-S176.

[6] 李光辉,朱德妹,汪复,等. 2011 年中国 CHINET 血培养临床分离菌的分布及耐药性[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(4):241-247.

[7] Schouls LM, Spalburg EC, van Luit M, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of Staphylococcus aureus: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing[J]. PLoS One,2009,4(4):e5082.

[8] Strandén A, Frei R, Widmer AF. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis[J]. J Clin Microbiol,2003,41(7):3181-3186.

[9] 陶晓霞,崔志刚,刘国栋,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MLVA

[2] Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosis[J]. N Engl J Med,2008,358(9):929-939.

[3] 杨艳丽,任健康,李亚娥,等. 蛋白芯片技术联合检测抗 dsDNA 抗体、抗 Smith 抗体和抗 Rib-P 抗体对 SLE 诊断价值分析[J]. 现代检验医学杂志,2012,27(2):55-56.

[4] 彭赛蛟,陶锡东,王敏. 不同自身抗体联合检测在系统性红斑狼疮中的诊断价值[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(6):831-833.

[5] 李珍,刘洋,王俊芳. 间接荧光法(IIF)和酶联免疫吸附法(ELISA)对抗双链 DNA 的检测结果比较[J]. 医药前沿,2014,4(8):262.

[6] Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffusos[J]. Proc Soc Exp Biol Med,1957,96(3):572-574.

[7] 王兰兰,吴健民. 临床免疫学与检验[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007:331-332.

[8] Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, et al. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test [J]. Lupus,2010,19(8):906-912.

[9] Hillebrand JJ, Bernelet Moens HJ, Mulder AH. Changes in Farr radioimmunoassay and EliA fluorescence immunoassay anti-dsDNA in relation to exacerbation of SLE[J]. Lupus,2013,22(11):1169-1173.

[10] 谭太昌,王婷,张航烽,等. 抗双链 DNA 抗体检测策略研究[J]. 成都医学院学报,2014,9(2):128-133.

[11] 蒋明,张奉春. 风湿病诊断与诊断评析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:30-33.

[12] Peter JB, Shoenfeld Y. Autoantibodies[M]. Amsterdam: Elsevier, 1996:227-236.

(收稿日期:2015-11-26)



(上接第 587 页)

分型研究[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(2):81-83.

[10] Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, et al. Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for Staphylococcus aureus genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value[J]. J Clin Microbiol,2009,47(10):3121-3128.

[11] Delaney JA, Schneider-Lindner V, Brassard P, et al. Mortality after infection with methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) diagnosed in the community[J]. BMC Med,2008,6(1):1-8.

(收稿日期:2015-12-16)

