

· 临床研究 ·

抗双链 DNA 抗体不同检测方法的比对分析

张春雷¹, 周小梅¹, 张书楠¹, 吕 琪¹, 陈桂冰¹, 李庆宽²

(1. 深圳市中医院医学检验科, 广东深圳 518020; 2. 中南大学湘雅医学院 2005 级医学检验系, 湖南长沙 410078)

摘要:目的 评价间接免疫荧光法(IIFA)、酶联免疫吸附测定法(ELISA)和免疫印迹法(IBT)检测抗双链 DNA(dsDNA)抗体的特点及应用价值。方法 采用 IIFA、ELISA 和 IBT 法对实验组(系统性红斑狼疮患者, $n=70$)及健康对照组(健康人, $n=650$)血清标本进行抗 dsDNA 抗体的检测。结果 经 IIFA、ELISA 法及 IBT 法检测, 实验组抗 dsDNA 抗体的阳性率分别为 34.29%, 54.29% 和 44.29%; 健康对照组抗 dsDNA 抗体的阳性率分别为 0.15%, 4.46% 和 1.54%, ELISA 和 IBT 检出阳性率与 IIFA 方法比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 在血清抗 dsDNA 抗体的检测上, IIFA 法特异性高, 敏感性较低; 而 ELISA 和 IBT 法检测敏感性高, 特异性较差。

关键词: 酶联免疫吸附测定; 荧光免疫测定; 免疫印迹法; 红斑狼疮, 系统性; 抗 dsDNA 抗体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)17-1718-02

Comparative analysis of different detection methods for anti-double stranded DNA antibody

Zhang Chunlei¹, Zhou Xiaomei¹, Zhang Shunan¹, Lü Qi¹, Chen Guibing¹, Li Qingkuan²

(1. Department of Medical Laboratory, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518020;

2. Department of Medical Laboratory Science, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China)

Abstract: Objective To evaluate the characteristics and application value of anti-double stranded DNA(dsDNA) antibody detection by indirect immunofluorescent assay(IIFA), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and immunoblotting test(IBT).

Methods IIFA, ELISA and IBT methods were employed to detect anti-dsDNA antibody in serum sample of experimental group(patients with systemic lupus erythematosus, $n=70$) and healthy control group(healthy people, $n=650$). **Results** Detection by IIFA, ELISA and IBT methods, positive rates of anti-dsDNA antibody in experimental group were 34.29%, 54.29% and 44.29%, respectively, however, the positive rates of that in the healthy control group were 0.15%, 4.46% and 1.54%, respectively. Compared the positive rate detected by IIFA with which detected by ELISA or by IBT methods, there were statistically significant differences($P<0.05$). **Conclusion** Detection of serum anti-dsDNA antibody, IIFA has higher specificity and lower sensitivity, while ELISA and IBT have higher sensitivity and lower specificity.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; fluoroimmunoassay; immunoblotting; lupus erythematosus, systemic; anti-dsDNA antibody

抗双链 DNA(double stranded DNA, dsDNA)抗体是系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者的特征性标志抗体^[1-2], 对于 SLE 的诊断和治疗有着非常重要的作用, 美国风湿病学会已将其列为 SLE 诊断标准之一, 其特异性达到了(95~100)%。抗 dsDNA 抗体滴度的高低与 SLE 的活动密切相关^[3-4], 抗体滴度高提示 SLE 处于活动期。该抗体直接与肾小球细胞中 DNA 结合或与循环血液中 DNA 结合形成免疫复合物, 沉积于肾小球基底膜, 抗 dsDNA 抗体检测是目前 SLE 患者诊断及治疗最常用的指标之一。检测抗 dsDNA 抗体的方法较多, 常用的有间接免疫荧光法(indirect immunofluorescent assay, IIFA)、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫印迹法(immunoblotting test, IBT)等, 本课题将以上 3 种检测方法进行比较, 具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 4 月至 2010 年 4 月在深圳市中医院就诊, 确诊为 SLE 的患者血清标本 70 人份(清晨空腹抽血, 分离血清并置 2~8 °C 冰箱备检)作为实验组, 患者的选择符合美国风湿病学会关于 SLE 的诊断标准, 其中男 12 例, 女 58 例, 年龄 16~70 岁, 平均 34.5 岁。将血常规、肝肾功能检查结

果正常的健康体检者的血清标本 650 人份作为健康对照组, 其中, 男 305 例, 女 345 例, 年龄 20~50 岁。

1.2 主要试剂与仪器 绿蝇短膜虫 dsDNA IIFA 试剂盒(30T)、抗 dsDNA 抗体(IgG)ELISA 检测试剂盒(96T)、抗核抗体谱 IBT 试剂盒(64T)均购自德国欧蒙医学诊断技术有限公司; 主要采用 ZEISS 型荧光显微镜(德国)、TS-8 型转移脱色摇床(上海)及 ELX-800 型酶标仪(美国)进行实验。

1.3 方法 同时采用 IIFA、ELISA 和 IBT 法对实验组及健康对照组血清标本进行抗 dsDNA 抗体的检测。3 种方法严格按照试剂盒使用说明书进行操作, 将试剂盒所带的阳性对照、阴性对照与待测标本同时测量。IIFA 定性检测: 荧光显微镜下观察到试剂盒检测薄片绿蝇短膜虫动基体出现苹果绿荧光为阳性。ELISA 半定量检测: 以标准品 2(浓度 100 IU/mL)为测定临界值, 与待测样本同时测量, 选择酶标仪比色波长为 450 nm, 参考波长为 630 nm, 加终止液后 30 min 之内比色, 其中测定结果大于或等于 100 IU/mL 为阳性, 小于 100 IU/mL 为阴性。IBT 定性检测: 反应膜在特定位置出现肉眼可见的、与质控带颜色相同的显色条带为阳性, 否则为阴性。

1.4 统计学处理 多样本率的比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

健康对照组与实验组检测结果见表 1。实验组 IIFA 法检出的 24 例抗 dsDNA 抗体阳性标本中, ELISA、IBT 法检测均为阳性; IBT 法检测的 31 例抗 dsDNA 抗体阳性标本中, ELISA 法检测也为阳性。ELISA 和 IBT 检出阳性率与 IIFA 方法比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 IIFA、ELISA 及 IBT 法检测实验组与健康对照组中抗 dsDNA 抗体的结果比较[n(%)]

组别	n	IIFA 阳性	ELISA 阳性	IBT 阳性
实验组	70	24(34.29)	38(54.29)*	31(44.29)*
健康对照组	650	1(0.15)	29(4.46)*	10(1.54)*

*: $P < 0.05$, 与 IIFA 比较。

3 讨 论

实验结果提示 ELISA 检测抗 dsDNA 抗体敏感性最高, 可进行半定量检测, 有助于对 SLE 的诊断及病情活动程度的监控^[5-6]。同时, ELISA 检测不需要特殊设备, 适合基层医院及标本量较多的实验室进行筛查, 具有较好的市场前景。本实验健康对照组 ELISA 检测中有 29 例抗 dsDNA 抗体阳性, 而临床追踪调查并未发现有相应的临床表现, 这可能是因为 ELISA 检测的影响因素较多, 譬如标本稀释、抗原板的洗涤、酶标仪的校准等均可造成结果误差; 其次, 由于 ELISA 检测采用生物提取 dsDNA 作为实验基质, 在制备过程中, DNA 的内部结构位点可能存在人为暴露, 会因单链 DNA(ssDNA)抗体的存在而产生非特异性反应^[7-8]。尽管如此, 由于 ELISA 检测的高度敏感性, 结合患者的临床表现, 它仍不失为一种较好的筛查方法。

IIFA 检测抗 dsDNA 抗体是采用绿蝇短膜虫作为抗原基质进行检测的, 其动基体只由高纯度的环状 dsDNA 构成, 除此之外, 不含有其他细胞核抗原, 因此具有高度特异性, 被认为是检测细胞内抗原自身抗体的金标准^[9-10], 是一种较好的确证方法。实验中, IIFA、ELISA 及 IBT 3 种方法均显示抗 dsDNA 抗体阳性的标本有 24 例, 与患者临床跟踪调查结果一致。然而 IIFA 结果的判断有一定的主观性, 易受检测人员技术水平及主观因素影响, 且荧光显微镜价格昂贵, 基层医院难以开展, 本实验提示 IIFA 的敏感性相对较低, 不能准确定量。因此, IIFA 检测在临床诊断和治疗方面, 难以起到准确的监测作用^[11]。

IBT 检测抗 dsDNA 抗体操作简便、省时、特异性好、用血量少、无需特殊设备、重复性好, 可同时完成对 14 种自身抗体的识别和过筛, 对提高自身免疫疾病的诊断水平有很大的帮助, 适合于各大医院推广应用。然而 IBT 检测中, 由于一张硝酸纤维膜上有数种成分显示, 多个条带相距很近, 每次电泳时不同蛋白质在凝胶中迁移的速率不同以及蛋白质区带在电泳时形成的斜率, 给这些条带的识别带来一定困难, 特别是对临界阳性的标本, 不同操作者对结果的判断也不尽相同, 很容易造成误判或假阳性, IBT 试剂在生产过程中可能发生抗原转印不充分或转印时发生抗原丢失, 影响结果判定, 导致假阴性^[12]。

在临床工作中, 根据实际情况采用联合检测^[13], 并结合患者的临床表现来判断结果。同时, 提高 ELISA 检测的特异性以及 IIFA 检测的敏感性是当前研究的重点, 目前利用荧光 PCR 检测 dsDNA 含量的方法受到了越来越多的重视^[14-15], 在

今后的检验工作中将扮演越来越重要的角色。

参考文献:

- [1] Aganovic-Musinovic I, Prljaca-Zececic L, Subasic D. The incidence of ANA and ETI-dsDNA detected by enzyme immunoassays and indirect immunofluorescence assay (IFA) [J]. *Med Arh*, 2010, 64(2): 68-70.
- [2] Almogren A. Anti-double stranded antibody. Association with titers and fluorescence patterns of anti-nuclear antibody in systemic lupus erythematosus [J]. *Saudi Med J*, 2010, 31(1): 32-36.
- [3] 牟君成, 陈联, 王文昕, 等. ANA、抗 ENA 抗体联合检测对自身免疫病诊断的意义 [J]. *重庆医学*, 2009, 38(18): 2334-2337.
- [4] 姜友珍, 莫碧媛. SLE 患者 ANA、抗 ds-DNA 及 ENA 联合检测的对照分析 [J]. *广西医学*, 2006, 28(4): 524-525.
- [5] Villalta D, Bizzaro N, Corazza D, et al. Evaluation of a new automated enzyme fluoroimmunoassay using recombinant plasmid dsDNA for the detection of anti-dsDNA antibodies in SLE [J]. *Clin Lab Anal*, 2002, 16(5): 227-232.
- [6] Radice A, Sinico RA. A new oligonucleotide-based ELISA for the detection of anti-double-stranded DNA antibodies [J]. *Autoimmunity*, 2006, 39(2): 113-119.
- [7] Makowski GS, Ramsby ML. Selective detection of autoimmune antibodies to single- and double-stranded DNA by enzyme immunoassay [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2003, 33(2): 142-148.
- [8] 王毅, 肖华勇, 傅仕俊. ELISA 定量检测 dsDNA、ssDNA、Histone 抗体的初步评估 [J]. *重庆医学*, 2003, 32(3): 353-354.
- [9] 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): 610-614.
- [10] Conrad K, Ittenson A, Reinhold D, et al. High sensitive detection of double-stranded DNA autoantibodies by a modified Crithidia luciliae immunofluorescence test [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1173: 180-185.
- [11] Almogren A. Anti-double stranded antibody. Association with titers and fluorescence patterns of anti-nuclear antibody in systemic lupus erythematosus [J]. *Saudi Med J*, 2010, 31(1): 32-36.
- [12] 马东来, 张少静, Stocker W. 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: 2-3.
- [13] 汪国生, 钱龙, 张宏, 等. 联合检测 C1q 抗体、双链 DNA 抗体对系统性红斑狼疮的诊断价值 [J]. *中国综合临床*, 2006, 22(5): 411-414.
- [14] 刘歆, 徐根明, 郭江锋, 等. 基于 SYBR Green I 的双链 DNA 定量方法 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(1): 55-60.
- [15] 谢飞, 马雪梅. SYBR Green I 荧光检测法测定双链 DNA 含量 [J]. *医药导报*, 2007, 26(11): 1357-1359.