• 论 著 •

不同方法联合检测 SLE 患者血清中双链 DNA 抗体的性能评估*

田野^{1,2}, 张云聪^{3#}, 冯珍如³, 闫惠平⁴, 张海萍⁴, 李佩²,
郑芳芳², 聂秋燕², 刘晴², 王晓宁², 谭廷国^{2△}, 张国军^{1▲}

(1. 首都医科大学附属北京天坛医院实验诊断中心 100050; 2. 首都医科大学附属复兴医院检验科 100038;
3. 北京大学第一医院检验科 100034; 4. 首都医科大学附属北京佑安医院临床检验中心 100069)

摘要:目的 探讨双链 DNA 抗体(dsDNA 抗体)在常见自身免疫性疾病中的检出情况,评估不同方法联合检测系统性红斑狼疮(SLE)患者血清中 dsDNA 抗体的性能。**方法** 使用 ELISA 法(ELISA1、ELISA2)和间接免疫荧光(IIF)法同时检测 300 例 SLE 和 495 例非 SLE 自身免疫疾病患者,以及 300 例健康体检者血清 dsDNA 抗体,分析单独和联合使用不同方法检测 dsDNA 抗体对 SLE 的诊断效能。**结果** ELISA1、ELISA2 和 IIF 在 SLE 患者中的检出率分别为 42.3%、35.3% 和 38.0%,在非 SLE 自身免疫性疾病患者中最高检出率为 1.2%,在健康体检人群中最高为 0.3%。在 SLE 人群,3 种方法中 ELISA1 和 ELISA2 法,ELISA1 和 IIF 法,以及 ELISA2 和 IIF 法联合 Kappa 值分别为 0.672、0.398 和 0.512($P < 0.05$)。而只有 ELISA1 和 ELISA2 间的检测率差异有统计学意义($P = 0.003$)。ELISA1、ELISA2 和 IIF 法检测 dsDNA 抗体的受试者工作特征曲线下面积(AUC)分别为 0.708、0.672 和 0.687; ELISA1 和 IIF 法的联合检出率最高为 54.7%,AUC 为 0.764;3 种方法同时检测,任何 1 种方法阳性即判断为阳性时,检出率为 57.7%,AUC 为 0.781。**结论** 联合使用 ELISA 法和 IIF 法,可以明显提升 dsDNA 抗体在 SLE 中的检出率。

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

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.19.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)19-2697-03

An assessment on diagnostic efficacy of different methods in combination
for the detection of anti-dsDNA antibody in SLE patients*

TIAN Ye^{1,2}, ZHANG Yuncong^{3#}, FENG Zhenru³, YAN Hui ping⁴, ZHANG Hai ping⁴, LI Pei²,
ZHENG Fangfang², NIE Qiuyan², LIU Qing², WANG Xiaoning², TAN Yanguo^{2△}, ZHANG Guojun^{1▲}

(1. Center for Laboratory Diagnosis, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China;
2. Department of Clinical Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;
3. Department of Clinical Laboratory, First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China;
4. Center for Clinical Laboratory, Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of anti-dsDNA antibody in several autoimmune diseases, and evaluate the diagnostic efficacy of ELISA and indirect immunofluorescence (IIF) techniques for the detection of anti-dsDNA antibody in SLE patients. **Methods** Using commercially available kits based on ELISA (ELISA1, ELISA2) and IIF techniques simultaneously, serum anti-dsDNA antibody was determined in 300 SLE patients, 495 non-SLE autoimmune disease patients, and 300 health controls. The efficacy of anti-dsDNA antibody determined by one method or combined methods for the diagnostic of SLE patients was further evaluated. **Results** The positive rates of anti-dsDNA antibody in SLE patients detected by ELISA1, ELISA2 and IIF kit were 42.3%, 35.3% and 38.0% respectively. An utmost prevalence in the non-SLE patients and health controls were 1.2% and 0.3% respectively. In SLE patients, Kappa values of ELISA1 and ELISA2, ELISA1 and IIF, ELISA2 and IIF were 0.672, 0.398, 0.512 respectively ($P < 0.05$). A significant difference was only observed between ELISA1 and ELISA2 ($P = 0.003$). The area under the receiver operating curve (AUC) of ELISA1, ELISA2 and IIF were 0.708, 0.672 and 0.687 respectively, based on the result obtained from individual method. when ELISA1 kit and IIF kit were used in combination, the highest positive rate and AUC were 54.7% and 0.764 in SLE patients. When three kinds of kits were used in combination, the highest positive rate and AUC were 57.7% and 0.781. **Conclusion** Using ELISA and IIF in combination to detect anti-dsDNA antibody could greatly improve the efficacy for the diagnosis of SLE.

Key words: anti-dsDNA antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; indirect immunofluorescence; systemic lupus erythematosus

双链 DNA 抗体(dsDNA 抗体)是系统性红斑狼疮(SLE) 的临床诊断指标之一^[1],但是诊断标准中未对检测方法进行限定,而不同方法对 dsDNA 抗体的检测能力相差悬殊,各临床实验室间 dsDNA 抗体检测结果的可比性差^[2-3]。目前临床实

* 基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2013-3-052);首都临床特色应用研究(吴阶平)基金项目(Z1411020060000)。

作者简介:田野,男,主管技师,主要从事自身免疫性疾病相关研究。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: tanyanguo61@126.com。 ▲ 共同通讯作者, E-mail: tiantanzgj@163.com。

实验室检测 dsDNA 抗体的检测策略有,单独使用 ELISA 法、单独使用间接免疫荧光(IIF)法,以及联合 ELISA 法和 IIF 法进行检测。不同的检测策略对 dsDNA 抗体的检出能力如何,尚缺乏大样本数据的支持。同时,在非 SLE 的其他自身免疫性疾病人群中,dsDNA 抗体的分布情况如何,也缺乏大样本、多疾病谱的相关研究^[3-4]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 5 月至 2015 年 6 月于北京大学第一医院、首都医科大学附属复兴医院和首都医科大学附属北京佑安医院诊治的 SLE 患者 300 例纳入 SLE 组,非 SLE 自身免疫性疾病患者 495 例纳入非 SLE 自身免疫疾病组,其中干燥综合征(SS)100 例,类风湿关节炎(RA)98 例,原发性胆汁性肝硬化(PBC)100 例,小血管炎(SV)100 例,其他自身免疫性疾病(OAID)97 例,包括结缔组织病、克罗恩病、特发性血小板减少性紫癜等。300 例健康体检者纳入健康对照组。SLE 的诊断依据 1997 年美国风湿病协会(ACR)的标准进行^[1]。其他自身免疫性疾病的诊断分别按相关指南进行。

1.2 仪器与试剂 ELISA1 试剂盒购自德国欧蒙公司,ELISA2 试剂盒购自上海科新公司,IIF 法试剂购自德国欧蒙公司。全自动酶标仪为山东烟台爱得康公司 ADDCARE500,荧光显微镜为日本 Olympus CX40。

1.3 方法 所有研究对象均抽取非抗凝静脉全血,分离血清后置于-80℃冰箱保存待检。采用 ELISA1、ELISA2、IIF 法同时检测样本中 dsDNA 抗体,并按照试剂盒要求定性判断结果。检测前标本与试剂盒提前取出放置至室温,同时保证实验室环境、仪器处于最佳状态。所有操作均严格按试剂盒要求进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析。多组间计数资料的比较采用行×列表 χ^2 检验,两两比较采用行×列表分割。方法间的一致性比较采用 Kappa 检验进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 dsDNA 抗体在不同人群中的检出情况 非 SLE 自身免疫性疾病患者中检出的 12 例 dsDNA 抗体阳性患者中,有 8 例为 1 种或 2 种 ELISA 方法阳性,其余 4 例为 IIF 法单独或与 ELISA 法同时阳性。对于任何 1 种 dsDNA 抗体的检测方法,在 3 组人群中的检出率总体上差异均有统计学意义($P = 0.000$)。3 组人群检出率两两比较显示,SLE 组检出率明显高于非 SLE 自身免疫疾病组及健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),非 SLE 自身免疫疾病组与健康对照组检出率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 dsDNA 抗体在不同人群中检出率情况[n(%)]

组别	n	不同方法检出率		
		ELISA1	ELISA2	IIF
SLE 组	300	127(42.3)	106(35.3)	114(38.0)
非 SLE 自身免疫疾病组	495	6(1.2)*	6(1.2)*	4(0.8)*
健康对照组	300	0(0.0)*	1(0.3)*	0(0.0)*
χ^2		353.100	279.500	318.600
P		0.000	0.000	0.000

注:与 SLE 组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 不同方法检测 SLE 患者血清 dsDNA 抗体符合情况 对 SLE 患者进行 3 种方法测定 dsDNA 抗体,对任意 2 种方法间

检测效能进行比较,只有 ELISA1 和 ELISA2 之间检测结果比较,差异有统计学意义($P = 0.003$)。经一致性检验,ELISA1 和 ELISA2 法,ELISA1 和 IIF 法,以及 ELISA2 和 IIF 法之间,Kappa 值分别为 0.672、0.398 和 0.512($P < 0.05$)。见表 2、3。

表 2 ELISA1 法检测 SLE 患者血清 dsDNA 抗体与其他 2 种方法的符合情况(n)

ELISA1	ELISA2		IIF	
	+	-	+	-
+	93	34	77	50
-	13	160	37	136
χ^2	8.510		1.940	
P	0.003		0.198	

表 3 ELISA2 法与 IIF 法检测 dsDNA 抗体方法间的符合情况(n)

ELISA2	IIF	
	+	-
+	76	30
-	38	156
χ^2	0.940	
P	0.396	

表 4 单独使用 3 种方法对 dsDNA 抗体检测的效能分析

方法	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC
ELISA1	42.3	99.2	0.708
ELISA2	35.3	99.0	0.672
IIF	38.0	99.5	0.687

表 5 联合使用 2 种方法在不同检测策略下对 dsDNA 抗体检测的效能分析

策略	灵敏度(%)	特异度(%)	AUC
同时使用 2 种方法(任意方法结果为阳性时判为阳性)			
ELISA1+IIF	54.7	98.9	0.764
ELISA1+ELISA2	46.6	98.6	0.725
ELISA2+IIF	48.0	98.7	0.734
同时使用 2 种方法(2 种方法结果皆为阳性时判为阳性)			
ELISA1+IIF	25.7	99.9	0.624
ELISA1+ELISA2	31.0	99.7	0.650
ELISA2+IIF	25.3	99.9	0.624
先使用 ELISA 结果为阳性时再用 IIF 法(IIF 法阳性时判为阳性)			
ELISA1+IIF	25.7	99.9	0.624
ELISA1+ELISA2	31.0	99.7	0.650
ELISA2+IIF	25.3	99.9	0.624

2.3 不同检测策略对 dsDNA 抗体检测的效能分析 单独使用 3 种方法在 SLE 人群中对 dsDNA 抗体的灵敏度、特异度及受试者工作特征曲线下面积(AUC)见表 4。分析同时使用 2 种方法,任何 1 种方法结果显示阳性即判断为阳性时,ELISA1

和 IIF 法联合时的检出率最高(54.7%),AUC 最大(0.764),而 ELISA1 法和 ELISA2 法联合时检出率(46.6%)和 AUC(0.725)则最小。分析 3 种方法同时检测,任何 1 种方法结果为阳性即判断为阳性时,检出率为 57.7%,AUC 为 0.781。而分析联合 2 种或 3 种方法,只有各方法同时阳性方可判断为阳性时,其检出率和 AUC 均有非常明显地降低,但特异度均有不同程度的提升。见表 5、6。

表 6 联合使用 3 种方法(ELISA1+ELISA2+IIF)对 dsDNA 抗体检测的效能分析

策略	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC
同时使用 3 种方法(任意方法阳性时判为阳性)	57.7	98.5	0.781
同时使用 3 种方法(3 种方法同时阳性时判为阳性)	22.3	100.0	0.612

3 讨 论

本研究显示,dsDNA 抗体在 SLE 人群中的检出率在所有人群中最高,而其他人群很少检出,可见该抗体对 SLE 患者具有非常高的特异性。虽然 dsDNA 抗体在其他自身免疫性疾病中很少被检出,且非 SLE 自身免疫性疾病组 dsDNA 抗体的检出率与健康对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但一旦检出,说明该患者发展为 SLE 的风险非常大^[5-6]。所以有必要对重点人群定期检测 dsDNA 抗体^[7]。研究证明,dsDNA 抗体对 SLE 的发病具有重要的预警价值^[8-9]。Arbuckle 等^[10]发现 dsDNA 抗体于 SLE 临床症状出现前 9.3 年即可被检出。本研究发现,对于非 SLE 自身免疫性疾病组中检出的 dsDNA 抗体阳性患者,以 ELISA 法单独阳性的为主,而在 SLE 人群中,ELISA 法单独阳性的患者所占比例要低得多,这提示两组人群 dsDNA 抗体的构成可能具有本质的差异。可能是 ELISA 法对低亲和力类型的 dsDNA 抗体检测灵敏度更高的缘故。但具体机制如何,需要进一步进行探讨。

单独使用 1 种方法检测效能最高的是 ELISA1,但检出率也只有 42.3%,这显然无法满足临床的需求。而联合 ELISA1 与 IIF 法(任意 1 种方法结果为阳性即判断为阳性)检测,检出率可提升至 54.7%,具有大幅度的提升效果。而此时特异度并无明显变化(只降低了 0.3%)。另有观点认为,使用 ELISA 法检测 dsDNA 抗体,其灵敏度高于 IIF 法,而其特异度却较低^[11]。基于以上观点,ELISA 法经常被用作筛查 dsDNA 抗体的方法,阳性后用 IIF 法复核,复核阳性方报告为阳性^[12]。但本研究发现,ELISA1、ELISA2 对 dsDNA 抗体的检出率分别与 IIF 法相比,差异均无统计学意义($P>0.05$),而且 3 种检测方法单独检测的特异度非常接近(分别为 99.2%、99.0%、99.5%)。本研究显示,使用上述检测策略,会漏掉一部分 IIF 法单独检测阳性的患者,会大大地降低对 dsDNA 抗体的阳性检出率。虽然联合 3 种方法可最大程度提高 dsDNA 抗体的检出率,但联合使用 3 种检测试剂盒显然不现实。而使用 1 种检出率较高的 ELISA 方法,再联合 IIF 法,仍然可以较大幅度地提高检出率,是临床实践中较为切实可行的方案,而且这种检测策略目前也正在被少数临床实验室采用。

基于以上分析,笔者认为 dsDNA 抗体是 SLE 患者特异性非常高的诊断指标,在其他人群中非常少见,但是一旦检出,应予以足够的重视。选择适当的 ELISA 法,再联合 IIF 法同时检测 dsDNA 抗体,任意 1 种方法阳性即报告阳性,可非常明显地提高 dsDNA 抗体在 SLE 患者中的检出能力。

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(9): 1725.
- [2] Yang JY, Oh EJ, Kim Y, et al. Evaluation of Anti-dsDNA antibody tests: Crithidia luciliae immunofluorescence test, immunoblot, enzyme-linked immunosorbent assay, chemiluminescence immunoassay[J]. *Korean J Lab Med*, 2010, 30(6): 675-684.
- [3] 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.
- [4] 史晓敏, 阎振林, 隋宝环, 等. 两种检测抗双链 DNA 抗体方法对系统性红斑狼疮的诊断价值比较[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(8): 742-745.
- [5] Giles BM, Boackle SA. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Immunol Res*, 2013, 55(1/2/3): 10-21.
- [6] Wichainun R, Kasitanon N, Wangkaew S, et al. Sensitivity and specificity of ANA and anti-dsDNA in the diagnosis of systemic lupus erythematosus; a comparison using control sera obtained from healthy individuals and patients with multiple medical problems[J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 2013, 31(4): 292-298.
- [7] Heidenreich U, Mayer G, Herold M, et al. Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2009, 18(14): 1276-1280.
- [8] Nossent JC, Huysen V, Smeenk RJ, et al. Low avidity antibodies to dsDNA as a diagnostic tool[J]. *Ann Rheum Dis*, 1989, 48(9): 748-752.
- [9] Stamouli M, Skliris A, Reppa D, et al. Detection of antinuclear antibodies (ANA), antibodies to double stranded DNA (anti-dsDNA) and antibodies to extractable nuclear antigens (anti-ENA) in Greek patients [J]. *Clin Lab*, 2013, 59(3/4): 283-291.
- [10] Arbuckle MR, Kohlhase KF. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. *Scand J Immunol*, 2001, 54(1/2): 211-219.
- [11] Zigon P, Lakota K, Cucnik S, et al. Comparison and evaluation of different methodologies and tests for detection of anti-dsDNA antibodies on 889 Slovenian patients' and blood donors' sera [J]. *Croat Med J*, 2011, 52(6): 694-702.
- [12] 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.