

• 论 著 •

血清抗 dsDNA 抗体参考区间的探讨*

董一红, 于洋, 田野, 李卓敏, 王雪, 高莹, 王迎辰, 李格, 刘勃, 韩旭, 张岩[△], 谭延国[▲]
(首都医科大学附属复兴医院检验科, 北京 100038)

摘要:目的 应用美国临床和实验室标准化协会(CLSI)文件 C28-A3, 建立适合该地区人群和检测系统的抗双链 DNA 抗体的参考区间, 为临床医生诊断系统性红斑狼疮(SLE)提供参考。方法 依据美国 CLSI C28-A3 文件关于健康者的原则要求, 分别选择该地区不同年龄段健康男女共 471 例。使用德国 EUROIMMUN 公司的抗 dsDNA-NcX 抗体检测试剂盒以及山东省烟台爱得康公司的 ADDCARE500 全自动酶标仪定量测定血清抗 dsDNA-NcX 抗体水平。采用基于非参数有放回抽样方法(Bootstrap 法)估计参考区间。结果 经统计学分析, 不同性别、年龄的抗 dsDNA-NcX 抗体水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 因此对数据合并性别、年龄后进行分析, 推断的医学参考区间的上限值为 53 IU/mL。结论 初步尝试建立了该地区健康人群血清抗 dsDNA-NcX 抗体的参考区间。

关键词:抗双链 DNA 抗体; CLSI C28-A3; 系统性红斑狼疮; 参考区间

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.23.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)23-3423-03

Study on the reference interval of anti-dsDNA antibody in serum*

DONG Yihong, YU Yang, TIAN Ye, LI Zhuomin, WANG Xue, GAO Xuan, WANG Yingchen,
LI Ge, LIU Qing, HAN Xu, ZHANG Yan[△], TAN Yanguo[▲]

(Department of Clinical Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China)

Abstract: **Objective** To establish reference interval of anti-dsDNA antibody applicable to local population and detection system according to CLSI C28-A3 proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute, so as to provide a reference for clinical diagnose systemic lupus erythematosus(SLE). **Methods** According to guideline of C28-A3, a total of 471 local apparently healthy individuals were enrolled and stratified by gender and age. Anti-dsDNA-NcX antibody level was quantitatively determined using the anti-dsDNA-NcX antibody assay kit(EUROIMMUN, Germany), and the automatic microplate analyzer(ADDCARE500). Non-parametric method(Bootstrap method) was used to analyze the reference interval. **Results** There were no significant difference in anti-dsDNA-NcX antibody level between male and female($P > 0.05$), and no correlation between anti-dsDNA-NcX antibody level and age($P > 0.05$). Therefore, data of different genders and ages were combined and analyzed as a whole. The 97.5 percentile upper limit of the reference interval was inferred to be 53 IU/mL. **Conclusion** The reference interval of serum anti-dsDNA-NcX antibodies based on local population is preliminarily established.

Key words: anti-dsDNA antibody; CLSI C28-A3; systemic lupus erythematosus; reference interval

系统性红斑狼疮(SLE)是一种累及多器官、多系统的自身免疫性疾病,好发于青年女性,临床表现复杂^[1]。血清中出现多种自身抗体是其特点之一^[2]。在众多抗体中,抗双链 DNA(dsDNA)抗体几乎仅见于 SLE,是 SLE 的特异性抗体,并且在 SLE 发病机制中亦发挥重要作用^[3],自 1982 年以来一直为 SLE 的诊断标准之一^[4-5]。目前酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测抗 dsDNA 抗体为各实验室的主流方法,商品化试剂盒种类繁多,其中检测抗 dsDNA-NcX 抗体的 ELISA 试剂盒以其较高的灵敏度而得以广泛应用^[6]。我国多数临床实验室使用的进口试剂检测项目,其参考区间大多由试剂生产商提供。本实验室也同样使用试剂盒说明书提供的 100 IU/mL 作为抗 dsDNA-NcX 抗体水平的参考区间,由于该参考区间是基于国外人群所建立,其是否适合我国人群有待进一步验证。鉴于此,本研究依据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)C28-A3 文件建立本地区健康人群抗 dsDNA-NcX 抗体的参考区间,从而为更好地诊断 SLE 提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 1—3 月在首都医科大学附属复兴医院体检中心行健康体检的成年人为研究对象。依据 CLSI C28-A3 文件,使用特定的、明确的标准从群体中选择研究对象。在本研究中,具有下述情况中任何一条者将被排除在研究对象之外:(1)患自身免疫系统疾病者(如 SLE 等);(2)服用影响免疫系统的药物(如免疫抑制剂、糖皮质激素、镇痛抑制剂和生物制剂等);(3)吸烟、饮酒、药物滥用者;(4)怀孕、哺乳期女性;(5)肥胖(体质量指数 $\geq 28 \text{ kg/m}^2$),确诊为恶性肿瘤或糖尿病者;(6)近期手术、输血或献血及住院治疗者;(7)心脏、肝、肾或肺功能不全者,以及血清标本量不足以完成检测或者出现严重溶血或脂血者。经上述标准排除后入选者共 471 例。其中女 245 例,平均年龄(42.17 \pm 15.29)岁;男 226 例,平均年龄(45.03 \pm 18.18)岁。按性别分为男、女两组。依据 CLSI C28-A3 文件,要求每组最少 120 例研究对象,本研究入组例数均大于 200 例,符合要求。

* 基金项目:国家卫生和计划生育委员会医药卫生科技发展研究中心专项课题(28-5-5);首都临床特色应用研究(吴阶平)(Z141107006614008)。

作者简介:董一红,女,主管技师,主要从事医学检验方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: fxjyk@sina.com; [▲] E-mail: tanyanguo61@126.com。

1.2 方法 入组者在标本采集前 1 d 保持日常生活习惯和饮食习惯,避免吸烟和饮酒。清晨空腹采集肘静脉血 5 mL,室温静置 15 min,4 100 r/min 离心 10 min,将分离血清置于冻存管中,注明入组者性别、年龄等参考信息,-80 °C 冻存待检测。标本测定前,从-80 °C 冰箱取出,37 °C 水浴迅速融化至冰水混合物后,平衡至室温并混匀。具体实验由经过培训的资深检验技师按标准操作流程进行操作。

1.3 仪器与试剂 采用德国 EUROIMMUN 公司的抗 dsDNA-NcX 抗体免疫球蛋白 G(IgG) 的 ELISA 检测试剂盒,使用山东烟台爱得康公司的 ADDCARE500 全自动酶标仪测定血清抗 dsDNA-NcX 水平。整个实验过程所用的试剂盒共 4 个批号。

1.4 实验质量控制 保持实验室环境的卫生和清洁、温度和湿度的适宜;ADDCARE500 全自动酶标仪使用前经过校准验证,并定期保养和维护,使仪器性能处于最佳状态;每次实验操作均与标本同时测定试剂盒自带的阳性与阴性对照血清,标准品和内部质控品,且阴阳性对照均在试剂盒规定的范围内,内部质控抗 dsDNA-NcX 抗体水平均在控。

1.5 统计学处理 采用 @RISK5.5 统计学软件,用夏皮罗-威尔克法(Shapiro-Wilk, W 法)检验数据是否符合正态性分布;采用 R3.3.2 统计软件进行分析。非正态分布的计量资料采用中位数和四分位数间距表示 $[M(P_{25}, P_{75})]$,组间比较采用秩和检验。参照美国 CLSI C28-A3 推荐的非参数统计中估计统计量方差进行血清抗 dsDNA-NcX 抗体参考区间的估计。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同性别抗 dsDNA-NcX 抗体检测结果的比较 不同性别健康人抗 dsDNA-NcX 抗体水平见表 1。经正态性检验,参考人群体内抗 dsDNA-NcX 抗体水平为偏态分布,具体数值见表 1。秩和检验结果显示,男性和女性参考人群抗 dsDNA-NcX 抗体水平差异无统计学意义($P = 0.4271$),因此数据可以合并性别后进行分析。

表 1 不同性别健康人抗 dsDNA-NcX 抗体水平(IU/mL)

性别	n	最小值	P_{25}	M	P_{75}	最大值
男	245	0.00	0.00	0.00	13.78	76.1
女	226	0.00	0.00	0.00	21.44	71.43
合计	471	0.00	0.00	0.00	18.62	76.1

2.2 合并性别后年龄因素与抗 dsDNA-NcX 抗体水平相关性分析 根据年龄及对应抗 dsDNA-NcX 抗体检测值绘制散点图。依据所绘制散点图的特征,抗 dsDNA-NcX 抗体检测值与年龄的分布未见明显的相关趋势,故无需对年龄进行分组。

2.3 合并性别与年龄后对抗 dsDNA-NcX 抗体参考区间的确定

2.3.1 抗 dsDNA-NcX 抗体数据分布规律的统计学分析 采用 W 法进行正态性检验,全体研究对象抗 dsDNA-NcX 抗体水平不符合正态分布($P = 2.2 \times 10^{-16}$);数据以 10 为底进行对数转换后,分布亦显著偏离正态分布($P = 2.2 \times 10^{-16}$)。

2.3.2 抗 dsDNA-NcX 抗体参考区间的确定 抗 dsDNA-NcX 抗体检测值只有上限具有临床意义。依据美国 CLSI C28-A3 文件,采用 97.5% 的置信区间作为其上限值。由于 W 法统计分析提示抗 dsDNA-NcX 抗体的分布不符合正态或对数正态分布,因此本研究采用美国 CLSI C28-A3 文件推荐的非参数有放回的抽样方法(Bootstrap 法)进行统计分析,结果提示当每次抽样达到 1 000 个检测值,抽取 100 次以上,推断

的检测值的第 97.5 百分位数达到稳定。未经转换前,数据推断的医学参考区间的上限值为 52.904 2;当以 10 为底进行对数转化,转换后为 1.726 3(反对数转换后为 53.247 6),见表 2。

表 2 采用 Bootstrap 法估计的抗 dsDNA-NcX 抗体参考区间的上限值(IU/mL)

迭代×拟合次数	未转换	以 10 为底的对数转换后
100×10	45.175 7	1.689 8
100×100	54.180 2	1.741 9
100×200	62.959 6	1.806 3
1 000×10	62.967 6	1.805 6
1 000×100	52.904 2	1.726 3
1 000×200	53.596 5	1.729 1

2.4 对参考上限进行验证 本研究得到抗 dsDNA-NcX 抗体参考值上限取整数为 53 IU/mL,利用该上限值及试剂盒给定的参考上限值 100 IU/mL,对本科室之前研究中收集到的 SLE 患者共 300 例进行阳性率的比较,结果显示,界值为 53 IU/mL 对 SLE 的检出率为 54.3%,显著高于试剂盒给定的界值 100 IU/mL 的检出率(42.3%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

抗 dsDNA 抗体定量检测是 SLE 诊断、治疗、病情评估等更为有效的、特异性实验室指标^[7-9]。抗 dsDNA 抗体传统的 ELISA 检测方法,是通过多聚左旋赖氨酸或硫酸鱼精蛋白将包被抗原 dsDNA 连接到固相微孔的表面,但这些连接物容易产生非特异性反应。研究发现利用核小体与聚苯乙烯表面有很好黏附性并与纯化的 dsDNA 抗原有很高亲和力的特点,将核小体作为 dsDNA 和微孔板的连接物,定量检测抗 dsDNA 抗体,可以提高 SLE 检测的灵敏度。Robert 等^[10]基于这种原理建立了新的 ELISA 方法,即抗 dsDNA-NcX 抗体的 ELISA 法,由其检测到的抗 dsDNA 抗体即为抗 dsDNA-NcX 抗体。李晶等^[11]的研究结果显示,抗 dsDNA-NcX 抗体诊断 SLE 的灵敏度比其他方法检测的抗 dsDNA 抗体高。因此,抗 dsDNA-NcX 抗体作为敏感且特异性的实验室指标,可辅助 SLE 患者的诊断,并用于评估其疾病的活动性。

本实验室在临床工作中使用的是德国 EUROIMMUN 公司生产的抗 dsDNA-NcX 抗体 IgG 检测试剂盒(ELISA 法),采用的参考值为其推荐的上限值 100 IU/mL。在实际工作中发现,部分诊断为 SLE 患者的抗 dsDNA-NcX 抗体值低于该上限值,考虑到欧盟推荐的上限值为欧洲人群的界值,故有必要建立适合本地区人群的参考值上限。本研究依据 CLSI C28-A3,建立了适合本地区和检测系统的抗 dsDNA-NcX 抗体的参考区间,其上限值为 53 IU/mL,明显低于试剂盒给定的 100 IU/mL,这与日本 Ohnuma 等^[12]使用相同的试剂盒得出的 44 IU/mL 参考区间上限值非常接近。使用本参考区间,对本实验室先前所收集的已确诊为 SLE 的 300 例患者血清抗 dsDNA-NcX 抗体水平重新进行了评估。结果显示,基于 53 IU/mL 上限值,抗 dsDNA-NcX 抗体在 SLE 患者中的检出率显著高于基于 100 IU/mL(试剂盒提供)所得到的阳性率(54.3% vs. 42.3%, $P < 0.05$),提高阳性检出率达 10%左右。由于抗 dsDNA 抗体对于 SLE 患者的特殊意义,建立适合本地区的参考区间,可以更好地为 SLE 患者的诊断和病情评估提供依据。

参考文献

[1] 周珣. 免疫学检验联合检测应用于系(下转第 3247 页)

校正公式。这一方法是否受仪器 CRP 检测线性范围等因素的影响,还需进一步论证。与其他校正公式的推导方法相比,本研究采用相对较大的样本量,基于各种参数的实际测定值推导了校正公式,而且拟合度非常高,说明本方法更为科学合理。

应用 50 例全血标本对校正公式进行验证显示,校正后的结果与作为参照方法的 IMMAGE 800 检测结果具有很好的一致性,而未校正结果则与其不一致。IMMAGE 800 特定蛋白分析仪是封闭检测系统,其准确性可以溯源到 BCR470,是公认的、性能比较好的 CRP 检测系统^[8]。故本文选择其为参照检测系统能够保证较高的公正性和客观性。另外本文在进行一致性检验时,使用了 Bland-Altman 分析法^[9],此方法同时考虑了检测过程中的随机误差及系统误差,是非常严格的一致性评价方法。本文得到的校正后结果与参照检测系统 CRP 结果具有一致性的结论,也说明本研究得到的校正公式具有很好的校正能力。

在实际工作中会遇到 HCT 明显升高或降低的标本,如脱水、真性红细胞增多症和继发性红细胞增多症等导致的 HCT 升高,以及各种贫血等造成 HCT 显著降低的情况。对这些标本,除了可以采取上述方法实时校正外,还可以测定其血清或血浆 CRP 水平作为最终依据。另外,由于不同海拔地区、不同人群 HCT 的分布范围存在差异^[10],加之各实验室所用的检测系统不同,故应该建立适合各实验室的校正公式,以保证检测结果的准确性及与其他检测系统结果的可比性^[6,11]。当然,本实验也存在不足之处,即入组的样本量不够多,没有涵盖非常大范围的 HCT 和 CRP 水平,故本实验得出的数据不宜直接应用于临床,需加大样本量对此科学问题进行更深入的探讨。

综上所述,鉴于 HCT 值对全血 CRP 水平具有非常显著的影响,临床实验室需使用校正公式对全血 CRP 检测结果进行实时校正,以保证结果的准确性。

参考文献

[1] Park HE, Cho GY, Chun EJ, et al. Can C-reactive protein

predict cardiovascular events in asymptomatic patients? Analysis based on plaque characterization[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 224(1): 201-207.

[2] Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells LA, et al. C-Reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction[J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(14): 1310-1320.

[3] 白彩娟, 吉尚戎. C-反应蛋白研究进展及热点争议[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2013, 49(3): 361-376.

[4] 杜豪伟, 栗朋辉, 蒋晓. 两种方法检测 C-反应蛋白结果的可比性分析[J/CD]. *临床医药文献电子杂志*, 2015, 2(19): 3898.

[5] 蒋玲丽, 唐大海, 张健, 等. 5 种 C 反应蛋白快速检测系统检测性能比较[J]. *检验医学*, 2016, 31(4): 293-298.

[6] 曾凤群, 丘仲柳, 利雯秀, 等. 全血与血浆标本 CRP 检测的对比分析[J]. *中外医学研究*, 2016, 14(20): 4-6.

[7] 隆维东, 李坚, 刘万彬. 不同红细胞压积对全血 CRP 测定的影响及校正措施[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(1): 107-109.

[8] 曹科, 马东礼, 罗小娟, 等. 3 种不同检测系统 C 反应蛋白测定结果的偏倚评估和可比性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(9): 1108-1109.

[9] 谭延国, 刘楠, 田野, 等. 不同化学发光法系统测定血清人生长激素水平的现状分析[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(2): 161-163.

[10] 宋晓萍, 傅新文. 血液分析仪对不同年龄组红细胞压积参照值分析[J]. *实验与检验医学*, 2008, 26(2): 207.

[11] 卓兰云, 黎小琼, 何敏, 等. POCT 仪器与全自动生化分析仪 C 反应蛋白检测结果的比对[J]. *广东医学*, 2014, 35(1): 110-111.

(收稿日期:2017-05-16 修回日期:2017-07-28)

(上接第 3424 页)

统性红斑狼疮诊断价值研究[J]. *临床和实验医学杂志*, 2015, 14(1): 48-51.

[2] 季娜, 李立, 于箭, 等. 五种特异性自身抗体联合检测在系统性红斑狼疮诊断中的意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(9): 1263-1264.

[3] Ktona E, Barbullushi M, Backa T, et al. Evaluation of thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus and correlation with different organs damages[J]. *Mater Sociomed*, 2014, 26(2): 122-124.

[4] 何晶晶, 乔永霞, 王艳茹, 等. 系统性红斑狼疮诊断与治疗[J]. *临床荟萃*, 2016, 31(5): 475-481.

[5] Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(8): 2677-2686.

[6] 刘艳慧, 武丽君, 李彩萍. 抗双链 DNA 抗体、抗核小体抗体、抗 dsDNA-NcX 抗体在系统性红斑狼疮中的研究进展[J]. *新疆医学*, 2013, 43(2): 9-12.

[7] 田野, 张云聪, 冯珍如, 等. 不同方法联合检测 SLE 患者血清中双链 DNA 抗体的性能评估[J]. *检验医学与临床*,

2016, 13(19): 2697-2699.

[8] 刘玉枝, 代荣琴, 陈洋, 等. 自身抗体对系统性红斑狼疮的诊断价值[J]. *热带医学杂志*, 2016, 16(1): 39-41.

[9] Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies as a classification criterion and a diagnostic marker for systemic lupus erythematosus: critical remarks[J]. *Clin Exper Immunol*, 2015, 179(1): 5-10.

[10] Robert B, Cornelia D, Anke R, et al. Anti-dsDNA-NcX ELISA: dsDNA-loaded nucleosomes improve diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus[J]. *Arthr Res Ther*, 2011, 13(1): 1-9.

[11] 李晶, 贾汝琳, 李春, 等. 抗 dsDNA-NcX 抗体测定对 SLE 的诊断意义[J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(6): 456-457.

[12] Ohnuma K, Hayashi N, Fukuzumi N, et al. Evaluation of cut-off value for autoantibodies against double-stranded DNA-complexed nucleosomes based on enzyme linked immunosorbent assay[J]. *Rinsho Byori*, 2014, 62(3): 223-230.

(收稿日期:2017-04-29 修回日期:2017-07-28)