

• 论 著 •

BioPlex 2200 全自动免疫分析仪检测血清中 抗双链 DNA 抗体的临床应用*

刘惠源¹, 张伟¹, 魏雅稚¹, 张允奇¹, 扶忠超², 尹志华¹, 叶志中^{1△}

(1. 深圳市福田区风湿病专科医院风湿免疫实验室, 广东深圳 518040;

2. 深圳市罗湖区人民医院风湿免疫科, 广东深圳 518040)

摘要:目的 分析比较 BioPlex 2200 全自动免疫分析仪和酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清中抗双链 DNA(dsDNA)抗体的灵敏度、特异度及其优缺点。方法 采用 BioPlex 2200 和 ELISA 检测 101 例纳入研究者的血清抗 dsDNA 抗体。纳入研究者中 49 例为临床确诊的系统性红斑狼疮患者, 52 例作为对照(包括 32 例其他结缔组织病患者和 20 例体检健康者)。结果 BioPlex 2200 检测抗 dsDNA 抗体的灵敏度为 57.14%, 特异度为 94.23%; ELISA 检测抗 dsDNA 抗体的灵敏度为 53.06%, 特异度为 96.15%。两种方法总体符合率为 95.05%, χ^2 检验分析, 差异无统计学意义($\chi^2=78.69, P>0.05$), *Kappa* 值评价一致性较好(*Kappa*=0.880)。BioPlex 2200 检测抗 dsDNA 抗体, 3 组抗 dsDNA 抗体水平比较, 差异有统计学意义($F=61.52, P<0.05$)。结论 BioPlex 2200 和 ELISA 检测血清抗 dsDNA 抗体结果有较好的一致性, 检测迅速, 值得临床推广应用。

关键词: 系统性红斑狼疮; 抗双链 DNA 抗体; BioPlex 2200 全自动免疫分析仪; 酶联免疫吸附测定

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.004

中图法分类号: R446.6; R593.24+1

文章编号: 1673-4130(2020)10-1167-04

文献标识码: A

Clinical application of BioPlex 2200 automatic immunoanalyzer to detect anti-double-stranded DNA antibodies in serum*

LIU Huiyuan¹, ZHANG Wei¹, WEI Yazhi¹, ZHANG Yunqi¹,

FU Zhongchao², YIN Zhihua¹, YE Zhizhong^{1△}

(1. Department of Rheumatology Immunology Laboratory, Futian District Rheumatology
Specialist Hospital, Shenzhen, Guangdong 518040, China; 2. Department of Rheumatology

Immunology, Luohu District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518040, China)

Abstract: Objective To analyze and compare the sensitivity, specificity, advantages and disadvantages of the detection of anti-double-stranded DNA (dsDNA) antibodies in serum by BioPlex 2200 automatic immunoassay analyzer and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** The serum anti-dsDNA antibodies of 101 subjects were detected by Bioplex 2200 and ELISA, including 49 patients with clinically confirmed systemic lupus erythematosus and 52 cases as a control (including 32 other connective tissue diseases patients and 20 healthy people). **Results** The sensitivity of BioPlex 2200 to detect anti-dsDNA antibodies was 57.14% and the specificity was 94.23%; the sensitivity of ELISA to detect anti-dsDNA antibodies was 53.06% and the specificity was 96.15%. The overall coincidence rate of the two methods was 95.05%, and the χ^2 test analysis showed no significant difference ($\chi^2=78.69, P>0.05$). The *Kappa* value was consistent (*Kappa*=0.880). The levels of anti dsDNA antibody was detected by Bioplex 2200, the difference was statistically significant ($F=61.52, P<0.05$). **Conclusion** BioPlex 2200 and ELISA have good consistency in the detection of serum anti-dsDNA antibodies, and the detection is rapid, which is worthy of clinical application.

Key words: systemic lupus erythematosus; anti-double-stranded DNA antibody; BioPlex 2200 automatic immunoanalyzer; enzyme-linked immunosorbent assay

* 基金项目: 广东省医学科研基金项目(A2018089); 深圳市福田区公益性科研项目(FTWS2017020、FTWS2018005)。

作者简介: 刘惠源, 女, 主管技师, 主要从事自身免疫性疾病检测相关研究。△ 通信作者, E-mail: yezhizhong@126.com。

本文引用格式: 刘惠源, 张伟, 魏雅稚, 等. BioPlex 2200 全自动免疫分析仪检测血清中抗双链 DNA 抗体的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10): 1167-1170.

系统性红斑狼疮(SLE)是一种自身免疫介导的, 以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病, 本病好发于育龄期女性, 临床表现多样, 多种自身抗体的出现是 SLE 的重要特征。其中抗双链 DNA(dsDNA)抗体是公认的与 SLE 病情活动相关的指标, 其特异度为 95%, 灵敏度为 70%^[1], 抗体效价随疾病活动度缓解而下降, 甚至转阴。抗 dsDNA 抗体常用于监测疾病活动性、药物治疗效果及评价预后。检测方法多种,《抗核抗体谱检测的临床应用专家共识 2018 年》指出抗 dsDNA 抗体检测常用的方法包括使用绿蝇短膜虫为实验基质的间接免疫荧光法(IIF)、放射免疫法和酶联免疫吸附测定(ELISA), 若其他方法检测抗 dsDNA 抗体阳性与临床表现不相符时, 建议采用 IIF 或放射免疫法进行进一步确认^[2]。目前, 发达国家及中国香港早已开始使用 BioPlex 2200 全自动免疫分析仪检测自身抗体^[3-6]。其检测原理为流式点阵荧光免疫分析技术, 在国内的应用还处于初始阶段, 只有少数大型医院引进该实验检测技术检测自身抗体。其特点是快捷、准确地为临床危急、重症患者提供早期诊断及评估病情活动度的实验室依据。本研究同时采用 BioPlex 2200 与 ELISA 检测抗 dsDNA 抗体, 通过与 ELISA 的比较, 旨在为 BioPlex 2200 的推广应用提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 3 月至 2019 年 1 月在深圳市福田区风湿病专科医院住院及门诊确诊的 SLE 患者 49 例(SLE 组), 其中男性 2 例, 女性 47 例, 年龄 17~50 岁, 平均(30.63±7.68)岁, 均符合美国风湿病学会 1997 年推荐的 SLE 分类标准。活动期 29 例, 非活动期 20 例, 疾病活动度判断根据 2000 年修订的 SLE 疾病活动指数。选取同期非 SLE 患者 52 例(非 SLE 组), 包括 32 例其他结缔组织病患者(类风湿关节炎 15 例, 未分化结缔组织病 8 例, 干燥综合征 6 例, 混合结缔组织病 3 例)和 20 例体检健康者, 男性 4 例, 女性 48 例, 年龄 18~52 岁, 平均(31.38±8.48)岁。均排除合并严重心、肝、肾损害及血液、内分泌系统疾病, 孕妇、哺乳期妇女、急慢性感染、既往有活动性结核病史及恶性肿瘤患者。2 组性别、年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经过深圳市福田区风湿病专科医院伦理委员会批准, 并与研究对象签订知情同意书。

1.2 仪器与试剂 BioPlex 2200 全自动免疫分析仪及配套试剂盒(批号 300867)、校准品(批号 50597)、质控品(批号 50475/50478)均购自美国 Bio-Rad 公司, 该试剂盒可定量检测 dsDNA。技术原理是采用多通路磁珠同时检测多种分析物。这些磁珠包被不

同种类的荧光染料, 每种磁珠包被配基捕获标本中相应的检测物, 再通过特殊反应进行检测, 目标物被吸附在磁珠表面形成相应免疫复合物而被检测, 运用每种染料激发光谱和发射光谱之间的波长差来检测每种分析物和质控磁珠, 产生结合物被用作荧光报告基团。系统软件以内标珠固有荧光为标准将信号转换成相对荧光强度值, 再将其转换为荧光比率。将荧光率与特定校准曲线来比较, 从而得出抗体指数来表示分析物水平。ELISA 检测采用抗 dsDNA 抗体检测试剂盒(购自中国杭州医学实验诊断有限公司, 批号 E180108CG), 应用酶标仪(购自中国汇松公司, 型号 MB-580)读取结果。所有试剂均在有效期内使用, 并严格按照试剂说明操作。

1.3 方法 BioPlex 2200 全自动免疫分析仪按照试剂盒操作说明书和仪器 BioPlex 2200 检测系统要求进行定标和质控后, 再进行标本检测。所有研究对象均空腹采集静脉血 3 mL, 离心后血清标本储存于一 80 ℃冰箱。所有血清标本一次性溶解恢复室温后上机检测, 水平 ≥ 10 IU/mL 定义为阳性, 线性范围为 1~300 IU/mL。ELISA 检测按试剂盒操作说明将所有血清标本恢复室温后进行 1:201 稀释, 并按照操作说明依次加入 1~3 号标准品、阴性、阳性对照, 根据标准品检测值绘制出参数曲线, 计算结果, 水平 >100 IU/mL 定义为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料用例数表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 通过计算 $Kappa$ 值进行一致性评估; 采用单因素方差分析比较各组 dsDNA 抗体水平, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检测抗 dsDNA 抗体的性能比较 BioPlex 2200 检测抗 dsDNA 抗体的灵敏度为 57.14%(28/49), 特异度为 94.23%(49/52); ELISA 检测抗 dsDNA 抗体的灵敏度为 53.06%(26/49), 特异度为 96.15%(50/52)。BioPlex 2200 检测的阳性预测值低于 ELISA, 阴性预测值高于 ELISA。见表 1。

表 1 两种方法检测抗 dsDNA 抗体的性能比较(%)

检测方法	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
BioPlex 2200	57.14	94.23	90.32	70.00
ELISA	53.06	96.15	92.85	68.49

2.2 两种方法检测抗 dsDNA 抗体的结果一致性分析 两种方法共检测 101 份血清标本。两种方法检测均为阳性 27 例, 均为阴性 69 例, 不一致 5 例, 两种

方法总体符合率为 95.05%(96/101)。通过 χ^2 检验评估两种检测方法的差异性,差异无统计学意义($\chi^2=78.69, P=0.375$);通过 *Kappa* 值进行一致性评价, *Kappa* =0.880,说明两种方法一致性较好。见表 2。

表 2 两种方法检测抗 dsDNA 抗体的结果一致性评估 (n)

ELISA	BioPlex 2200		合计
	阳性	阴性	
阳性	27	1	28
阴性	4	69	73
合计	31	70	101

2.3 BioPlex 2200 检测各组抗 dsDNA 抗体水平比较 通过单因素方差分析比较各组抗 dsDNA 抗体水平, BioPlex 2200 检测抗 dsDNA 抗体, 3 组(SLE 组活动期组、SLE 非活动期组、非 SLE 组)抗 dsDNA 抗体水平比较, 差异有统计学意义($F=61.52, P<0.05$)。SLE 活动期组与 SLE 非活动期组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); SLE 活动期组与非 SLE 组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); SLE 非活动期组与非 SLE 组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 BioPlex 2200 检测各组抗 dsDNA 抗体水平的比较

组别	n	dsDNA 水平($\bar{x}\pm s$, IU/mL)
SLE 活动期组	29	62.41±42.66
SLE 非活动期组	20	11.55±3.50 ^a
非 SLE 组	52	4.96±2.24 ^a

注:与 SLE 活动期组比较, ^a $P<0.05$ 。

3 讨 论

SLE 是一种多系统损害的自身免疫性疾病,好发于育龄女性。常伴有重要器官的受累,如肾脏、肺部、神经系统、血液系统及关节、皮肤等,危重症患者常危及生命,早期诊断和及时治疗对控制疾病发展及预后至关重要。抗 dsDNA 抗体自 1957 年就被公认为是 SLE 的诊断标志物^[7]。BARNADO 等^[8]研究表明,与其他自身抗体相比,抗 dsDNA 抗体在评估患者主要 SLE 表现的预后方面可能是最相关的,研究确定抗 dsDNA 抗体是 SLE 主要器官受累的驱动因素,对主要器官损害的参与程度最大,抗 dsDNA 抗体水平对 SLE 临床表现的影响比自身抗体总体水平更显著。抗 dsDNA 抗体的检测方法多种多样,国内大多数医院检验科或实验室采用 IIF、ELISA、免疫印迹法检测抗 dsDNA 抗体。其中 IIF、ELISA 手工操作比较繁琐,一般需要 2~3 h 才得到结果,人为干扰因素较多且不可避免。免疫印迹法可减少人力资源及外界干

扰因素。YI 等^[9]研究显示,线性免疫印迹抗核抗体 17 项(ANA-17s)检测结果与欧盟免疫印迹检测结果比较,最常见的抗体几乎完全一致,然而免疫印迹法只有定性结果,传统的检测方法正在被自动化高通量检测方法所取代。

近年来,随着免疫学检测技术的发展,国外已经应用 BioPlex 2200 全自动免疫分析检测技术检测临床标本^{〔3-7〕}。BioPlex 2200 运用悬浮芯片技术检测多项自身抗体,包括抗 dsDNA 抗体、抗可溶性抗原(ENA)抗体及抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体等。检测系统完全自动化、智能化、高通量,而且具有很高的分析效率,检测快速、简单、便捷、结果准确、特异度高、灵活性好^[7,10]。国外对 BioPlex 2200 的检测性能方面做了不少对比研究,在检测抗 dsDNA 抗体方面, BioPlex 2200 检测的结果与传统 ELISA 检测结果具有可比性,可用于临床实验室对自身免疫性疾病的筛查^[4]。此外,对水痘带状疱疹病毒、梅毒病毒及人类免疫缺陷病毒急性感染的检测都有较好的性能^{〔11-13〕}。BOSE 等^[14]研究显示, BioPlex 2200 检测的抗染色质抗体对诊断 SLE 有较高的特异性,但对区分 SLE 和混合性结缔组织病或未分化结缔组织病没有帮助。国内除了香港学者 AU 等^[6]使用 BioPlex 2200 检测抗 dsDNA 抗体的相关报道外,暂未见其他相关报道。

本研究是同时运用 BioPlex 2200 和 ELISA 检测抗 dsDNA 抗体,研究结果显示,101 例研究对象中 BioPlex 2200 和 ELISA 有 5 例检测抗 dsDNA 抗体结果不一致,其中有 4 例 BioPlex 2200 阳性, ELISA 阴性,有 1 例 BioPlex 2200 阴性, ELISA 阳性,通过 χ^2 检验评估两种检测方法的差异性,差异无统计学意义($P>0.05$),即认为两种检测方法的检测效能相同。KIM 等^[4]研究显示, ELISA 检测抗 dsDNA 抗体阳性的 79 例标本中,使用 BioPlex 2200 检测有 78 例(98.7%)血清抗 dsDNA 抗体阳性,这两种方法只有 1 例患者的抗 dsDNA 抗体检测结果存在差异,一致性好。本研究中 ELSIA 检测抗 dsDNA 抗体阳性 28 例, BioPlex 2200 检测阳性 31 例,与 KIM 等^[4]结果不一致,考虑可能与本研究检测的标本量有关,然而 BioPlex 2200 通常比其他方法具有更高的灵敏度,但其特异度较低^[6]。因此尚需要更大样本量的多中心研究进行进一步的评估。

通过 *Kappa* 值进行一致性评价, *Kappa* 值越大,表明一致性越好,若 *Kappa* ≥ 0.750 ,表明一致性较好, *Kappa* < 0.400 ,说明一致程度不够理想。本研究结果显示, *Kappa* =0.880 >0.700 ,说明两种方法一致性较好,证明该检测系统增加了创新性和方便性,而其检测的效能与传统方法不相上下,可以更好

地为临床服务。BioPlex 2200 检测灵敏度为 57.14%，特异度为 94.23%，ELISA 灵敏度为 53.06%，特异度为 96.15%，与 BIRTANE 等^[15]报道的抗 dsDNA 抗体检测在 SLE 中具有 97.4% 的特异度和 57.3% 的灵敏度较相符。ALMEIDA 等^[16]提出，检测抗 dsDNA 抗体最有效的方案是同时结合两种定量方法，使结果更加精准。因此临床中需要首先使用方便、快捷的检测方法对抗 dsDNA 抗体进行初步检测，与临床表现不符时需要用另一种方法再次检测。比较了 BioPlex 2200 检测抗 dsDNA 抗体在不同组的水平，除 SLE 非活动期组与非 SLE 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)外，其余组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)，说明抗 dsDNA 抗体不仅为 SLE 的诊断提供重要依据，对临床病情活动的判断亦有重要价值。

BioPlex 2200 检测的整体性能与传统 ELISA 技术相似，但具有检测速度较高和人力资源消耗较少的优点^[6]。BioPlex 2200 系统具有自动化与智能化的特点，血清直接上机检测，45 min 即可得到检测报告，可随时添加标本，支持急诊检测，对急危重症 SLE 患者的早期诊治具有重大意义。

4 结 论

综上所述，BioPlex 2200 全自动免疫分析仪检测抗 dsDNA 抗体与传统的 ELISA 相比，检验效能具有较高的一致性，而且其简便、快捷、人工干预少，值得临床上推广应用。

参考文献

[1] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊断及治疗指南中华医学会风湿病学分会[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(5): 342-346.

[2] 中国医师协会风湿免疫科医师分会自身抗体检测专业委员会. 抗核抗体检测的临床应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4): 275-280.

[3] SHOVMAN O, GILBURD B, BARZILAI O, et al. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen: analysis of 510 healthy subjects: incidence of natural/predictive autoantibodies[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1050(1): 380-388.

[4] KIM Y, PARK Y, LEE E Y, et al. Comparison of automated multiplexed bead-based ANA screening assay with ELISA for detecting five common anti-extractable nuclear antigens and anti-dsDNA in systemic rheumatic diseases [J]. Clinica Chimica Acta, 2012, 413(1/2): 308-311.

[5] DESPLAT-JEGO S, BARDIN N, LARIDA B, et al. Evaluation of the BioPlex 2200 ANA screen for the detection of antinuclear antibodies and comparison with convention-

al methods[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1109(1): 245-255.

[6] AU E Y, IP W K, LAU C S, et al. Evaluation of multiplex flow immunoassay versus conventional assays in detecting autoantibodies in systemic lupus erythematosus[J]. Hong Kong Med J, 2018, 24(3): 261-269.

[7] INFANTINO M, MANFREDI M, MERONE M, et al. Analytical variability in the determination of anti-double-stranded DNA antibodies: the strong need of a better definition of the old and new tests[J]. Immunol Res, 2018, 66(3): 340-347.

[8] BARNADO A, CARROLL R J, CASEY C, et al. Phenome-wide association study identifies dsDNA as a driver of major organ involvement in systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2019, 28(1): 66-76.

[9] YI A, LEE C H, MOON H W, et al. Evaluation of the LIA-ANA-Profile-17S for the detection of autoantibodies to nuclear antigens[J]. Clin Biochem, 2018, 55(1): 75-79.

[10] HANLY J G, SU L, FAREWELL V, et al. Comparison between multiplex assays for autoantibody detection in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol Methods, 2010, 358(1/2): 75-80.

[11] MCLACHLAN E, SCHOLZ H, BOLOTIN S, et al. Calibration and evaluation of quantitative antibody titers for varicella-zoster virus using the BioPlex 2200 [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57 (8): 296-299.

[12] ROURK A R, LITWIN C M. Evaluation of the BioPlex 2200 syphilis total screen (IgG/IgM) with reflex to an automated rapid plasma regain test[J]. J Clin Lab Anal, 2019, 5(12): e22878.

[13] ESHLEMAN S H, PIWOWAR-MANNING E, SIVAY M V, et al. Performance of the BioPlex 2200 HIV Ag-Ab assay for identifying acute HIV infection[J]. J Clin Virol, 2018, 99 (1): 67-70.

[14] BOSE N, WANG X, GUPTA M, et al. The clinical utility of anti-chromatin antibodies as measured by BioPlex 2200 in the diagnosis of systemic lupus erythematosus versus other rheumatic diseases[J]. Int J Clin Exp Med, 2012, 5 (4): 316-320.

[15] BIRTANE M, YAVUZ S, TASTEKIN N. Laboratory evaluation in rheumatic diseases[J]. World J Methodol, 2017, 7 (1): 1-8.

[16] ALMEIDA G D, ROCES V A, GONZÁLEZ V A, et al. Anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: a combination of two quantitative methods and the ANA pattern is the most efficient strategy of detection[J]. J Immunol Methods, 2015, 427(1): 30-35.