مجله علوم پزشکی رازی دوره ۳۲، شماره پیوسته ۹۲، ۲۶ مرداد ۱۴۰۴ https://doi.org/10.47176/rjms.32.92

مقاله پژوهشی

طراحی لام تشخیصی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای شناسایی آنتی‌بادی ضد DNA دو رشته‌ای (Anti-dsDNA)

محمدرضا گونه‌گر: کارشناس ارشد ایمونولوژی؛ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اشکان دهقانی: کارشناس ارشد ایمونولوژی؛ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

امید کیانی قلعه سردی: دکتری تخصصی هماتولوژی و بانک خون؛ گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

محمدعلی عصاره‌زادگان: استاد ایمونولوژی؛ مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران، و گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) assareh.ma@iums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آنتی‌بادی‌های ضد DNA دو رشته‌ای (anti-dsDNA) یکی از نشانگرهای اختصاصی بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) هستند که ارتباط نزدیکی با شدت بیماری، به‌ویژه نفریت لوپوسی دارند. با وجود آنکه روش ELISA به‌طور گسترده برای شناسایی این آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود، احتمال بروز نتایج مثبت کاذب در آن وجود دارد. در مقابل، آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از *Crithidia luciliae* (CLIFT) به دلیل ویژگی بالای خود، می‌تواند به‌عنوان روش تأییدی در تشخیص SLE مورد استفاده قرار گیرد. هدف این مطالعه، طراحی و ارزیابی لام تشخیصی ایمونوفلورسانس غیرمستقیم بر پایه *Crithidia luciliae* برای شناسایی آنتی‌بادی ضد dsDNA و مقایسه عملکرد آن با روش ELISA بود.

روش کار: در این مطالعه، سلول‌های *Crithidia luciliae* در شرایط استاندارد کشت داده شدند. پس از آماده‌سازی و فیکساسیون سلول‌ها بر روی لام‌ها، تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از سرم ۱۰۰ بیمار) ۵۰ نمونه مثبت و ۵۰ نمونه منفی از نظر anti-dsDNA طبق نتایج (ELISA انجام شد. نتایج آزمون CLIFT از نظر حساسیت، ویژگی، ارزش پیش‌بینی مثبت و منفی، دقت کلی و ضریب توافق کاپا با روش ELISA مقایسه و تحلیل آماری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که روش CLIFT دارای ویژگی ۱۰۰٪، حساسیت ۴۶٪، ارزش پیش‌بینی مثبت ۱۰۰٪ و ارزش پیش‌بینی منفی حدود ۶۴.۹٪ بود. دقت کلی آزمون ۷۳٪ و ضریب کاپای کوهن برابر با ۰.۴۶ (توافق متوسط) بود. آزمون فیشر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار بین نتایج دو روش (p= ۰/۰۰۰۱) بود.

نتیجه‌گیری: روش CLIFT با وجود ویژگی بسیار بالا، به‌دلیل حساسیت محدود، نمی‌تواند به‌تنهایی به‌عنوان ابزار غربالگری اولیه مورد استفاده قرار گیرد؛ اما در کنار ELISA و یافته‌های بالینی، می‌تواند به‌عنوان روش تأییدی با ارزش در تشخیص و پایش بیماران مبتلا به SLE به‌کار رود. همچنین بهینه‌سازی فاکتورهایی مانند pH ، قدرت یونی بافر و نفوذپذیری سلولی می‌تواند در افزایش حساسیت این روش مؤثر باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: دانشگاه علوم پزشکی ایران و شرکت دانش بنیان پادیاب طب

کلیدواژه‌ها

لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)، آنتی‌بادی ضد dsDNA، Crithidia luciliae، ایمونوفلورسانس، ELISA، CLIFT

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۱

تاریخ چاپ: ۱۴۰۴/۰۵/۲۶

شیوه استناد به این مقاله:

Gonehgar M, Dehqani A, Kiani Ghalesardi O, Assarehzadegan MA. Design of an Indirect Immunofluorescence Diagnostic Slide for the Detection of Anti ds-DNA Antibody. Razi J Med Sci. 2025(17 Aug);32.92.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en).

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

Razi Journal of Medical Sciences. 2025(17 Aug);32.92. https://doi.org/10.47176/rjms.32.92

Original Article

Design of an Indirect Immunofluorescence Diagnostic Slide for the Detection of Anti ds-DNA Antibody

Mohammadreza Gonehgar: Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Ashkan Dehqani: Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Omid Kiani Ghalesardi: Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Mohammad-Ali Assarehzadegan: Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Diseases, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Department of Immunology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding Author) assareh.ma@iums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic, systemic autoimmune disorder that can affect various tissues and organs including the skin, joints, kidneys, and the central nervous system. The pathogenesis of SLE involves the production of autoantibodies that target nuclear and cytoplasmic antigens, leading to immune complex formation and widespread tissue inflammation. Among these autoantibodies, anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) antibodies are highly specific for SLE and are considered a key biomarker for diagnosis and disease monitoring, especially in lupus nephritis (1,4,5,6,7).
These antibodies may be detected in the serum up to two years before the onset of clinical symptoms (5), and their titers often correlate with disease activity. Rising levels of anti-dsDNA antibodies can serve as an early predictor of disease flare-ups, particularly within six months. Moreover, their presence is associated with increased risk of renal involvement and progressive kidney damage (6).
Multiple laboratory techniques are currently used to detect anti-dsDNA antibodies, each with distinct strengths and limitations. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is widely utilized due to its high sensitivity, ease of use, and capability for high-throughput processing (14). However, ELISA can produce false-positive results due to nonspecific binding of antibodies or cross-reactivity with other nuclear components (10). On the other hand, the Crithidia luciliae immunofluorescence test (CLIFT) offers superior specificity by utilizing Crithidia luciliae, a flagellated protozoan that contains a unique organelle known as the kinetoplast a highly concentrated, circular, double-stranded DNA structure devoid of interfering nuclear proteins (9,10). The kinetoplast's composition provides a highly specific antigenic target for anti-dsDNA antibodies, minimizing the likelihood of cross-reactivity and nonspecific results (11).
Despite this advantage, CLIFT generally exhibits lower sensitivity compared to ELISA. This limitation is primarily due to the inaccessibility of some antigenic epitopes within the compact kinetoplast DNA and the intracellular location of the dsDNA, which may limit binding by low-affinity antibodies (11,14). Given the complementary nature of these two methods, a combined approach may improve diagnostic confidence.
The objective of this study was to design and evaluate a diagnostic immunofluorescence slide using Crithidia luciliae as the substrate for the indirect detection of anti-dsDNA antibodies and to compare its diagnostic performance with that of a commercially available ELISA kit.
Methods: Crithidia luciliae cells were cultured aerobically in RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin. The culture was maintained at 26°C and harvested at the stationary growth phase after approximately 72 hours (13). To improve morphology and antigen exposure, the cells were washed with PBS and treated with 40 mM hydrogen peroxide. A 10 µL aliquot of the suspension (2×10^7 cells/mL) was applied to each slide well, air-dried, and

Keywords
Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Anti-dsDNA Antibody, Crithidia luciliae, Indirect Immunofluorescence, ELISA, CLIFT

Received: 01/03/2025
Published: 17/08/2025

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

fixed using 96% ethanol. Slides were stored at –20°C until use. Microscopic examination confirmed the preservation of cell morphology and the uniform distribution of cells.

A total of 100 human serum samples were analyzed, including 50 samples previously confirmed positive and 50 confirmed negative for anti-dsDNA IgG antibodies using a commercial ELISA kit (Generic Assay, Germany). According to the manufacturer, the kit reports a sensitivity of 94.6% and specificity of 99%.

For the indirect immunofluorescence assay, serum samples were diluted 1:10 in PBS and applied to the prepared slides. Following a 30-minute incubation in a humid chamber, slides were washed with PBST and treated with FITC-conjugated sheep anti-human IgG antibodies. After a second 30-minute incubation, final washes were performed, and slides were mounted with glycerol-PBS before examination under a fluorescence microscope. The presence of specific fluorescence in the kinetoplast region was interpreted as a positive result.

Statistical analysis included calculation of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and overall accuracy. Agreement between CLIFT and ELISA was evaluated using Cohen's Kappa coefficient, and the statistical significance of the differences between methods was assessed using Fisher's exact test.

Results: Microscopic evaluation confirmed intact morphology and even distribution of Crithidia luciliae cells on the diagnostic slides. The kinetoplast, a distinct organelle rich in dsDNA, was clearly visible under high magnification and provided a consistent substrate for antibody detection.

Among the 50 ELISA-negative samples, all tested negative by CLIFT, yielding a specificity of 100%. Of the 50 ELISA-positive samples, only 23 tested positive by CLIFT, resulting in a diagnostic sensitivity of 46%. The test demonstrated a PPV of 100%, an NPV of approximately 64.9%, and an overall accuracy of 73%. Cohen's Kappa coefficient was calculated as 0.46, indicating moderate agreement between the two methods. Fisher's exact test showed a statistically significant difference between CLIFT and ELISA results ($p \approx 0.0001$), confirming that the discrepancy is unlikely to be due to random variation.

Conclusion: The designed CLIFT slide demonstrated excellent specificity but moderate sensitivity in detecting anti-dsDNA antibodies. These findings are consistent with prior studies, which reported similarly high specificity for CLIFT but noted its inability to detect antibodies with lower avidity or reduced access to intracellular DNA targets (11,14). The superior specificity of CLIFT is attributed to the use of kinetoplast dsDNA, which is highly pure and structurally distinct from other nuclear antigens (10).

However, the test's limited sensitivity may restrict its use as a primary screening tool. Instead, CLIFT is better suited as a confirmatory assay, particularly in cases where ELISA yields equivocal or potentially false-positive results. A combined approach involving ELISA and CLIFT—alongside clinical assessment and measurement of disease activity markers such as serum complement levels (C3, C4, CH50, C1q) and complement split products (C3dg, C4d)—is recommended for improving diagnostic reliability in SLE (15,16,17).

To enhance the performance of CLIFT, further optimization of immunological parameters is warranted. Buffer pH and ionic strength can influence antibody-antigen binding affinity, and strategic adjustment of these conditions may improve test sensitivity. Additionally, the use of permeabilizing agents such as saponin could facilitate antibody access to intracellular dsDNA, though such interventions must be carefully balanced to preserve the structural integrity of Crithidia luciliae cells.

In conclusion, this study supports the use of CLIFT as a valuable adjunct in the serological diagnosis of SLE and provides a foundation for future improvements in immunofluorescence-based detection systems.

Conflicts of interest: None
Funding: Iran University of Medical Sciences (IUMS) and Padyab Teb Company

Cite this article as:
Gonehgar M, Dehqani A, Kiani Ghalesardi O, Assarehzadegan MA. Design of an Indirect Immunofluorescence Diagnostic Slide for the Detection of Anti ds-DNA Antibody. Razi J Med Sci. 2025(17 Aug);32.92.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en).

*This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

مقدمه

آنتی‌بادی‌های ضد DNA دو رشته‌ای (anti-dsDNA) عمدتاً با بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) مرتبط هستند، اما ممکن است در سایر بیماری‌های خودایمنی نظیر سندرم شوگرن، آرتریت روماتوئید، واسکولیت و اسکلرودرمی سیستمیک نیز مشاهده شوند (۱). شیوع جهانی SLE به‌طور قابل توجهی متغیر است و بین ۳/۲ تا ۳۰۰۰ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر گزارش شده است که این اختلاف بسته به عوامل جغرافیایی و نژادی متفاوت است. بالاترین میزان شیوع در کشور کلمبیا و پایین‌ترین آن در اوکراین گزارش شده است. یک مرور سیستماتیک و فراتحلیل، شیوع سالانه متوسط این بیماری را تقریباً ۵ مورد در هر ۱۰۰ هزار نفر اعلام کرده است (۲). برای بررسی و پایش بیماری SLE ، از پنل آنتی‌ژن‌های هسته‌ای قابل استخراج (ENA) جهت شناسایی خودآنتی‌بادی‌هایی که اجزای هسته را هدف قرار می‌دهند، استفاده می‌شود. این تست‌ها می‌توانند بین ۲ تا ۱۱ نوع مختلف آنتی‌بادی را شناسایی کنند که هر یک دارای ارزش‌های تشخیصی و پیش‌آگهی خاص خود هستند (۳). در میان این‌ها، تست آنتی‌بادی ضد dsDNA دارای ویژگی تشخیصی بالایی برای SLE است و ارتباط نزدیکی با فعالیت بیماری دارد، به‌ویژه در موارد مرتبط با نفریت لوپوسی (۴).

نکته قابل توجه آن است که آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA ممکن است تا دو سال پیش از بروز علائم بالینی در سرم شناسایی شوند و افزایش سطح آن‌ها می‌تواند شعله‌ور شدن بیماری را در شش ماه آینده پیش‌بینی کند (۵). همچنین این آنتی‌بادی‌ها با افزایش خطر درگیری کلیوی و آسیب پیشرونده کلیه در بیماران مبتلا به لوپوس مرتبط هستند (۶). آنتی‌بادی‌های IgG ضد dsDNA در حدود ۶۰ تا ۹۰ درصد بیماران مبتلا به SLE یافت می‌شوند و توسط کنسرسیوم بین‌المللی کلینیک‌های لوپوس سیستمیک (SLICC) به‌عنوان نشانگر کلیدی تشخیصی شناخته شده‌اند (۷).

روش‌های مختلفی برای شناسایی این آنتی‌بادی‌ها وجود دارد که هر یک دارای ویژگی‌ها و محدودیت‌های مختص به خود هستند. یکی از این روش‌ها، آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از کریتیدیا لوسیلیا (*Crithidia luciliae indirect flourescence test,CLIFT*) است که یک روش نیمه‌کمی محسوب می‌شود. در این روش، از ساختار کینتوپلاست در *Crithidia luciliae* به‌عنوان بستر استفاده می‌شود. کینتوپلاست، یک اندامک حاوی DNA دو رشته‌ای حلقوی و خالص است. هنگامی که سرم بیمار حاوی آنتی‌بادی ضد dsDNA باشد، این آنتی‌بادی‌ها به DNA موجود در کینتوپلاست متصل می‌شوند و سپس توسط آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه‌شده با FITC شناسایی می‌گردند (۸).

Crithidia luciliae یک انگل تاژک‌دار است که معمولاً در روده مگس خانگی (*Musca domestica*) یافت می‌شود (۹). این ارگانیسم که به خانواده تریپانوزوماتیده (Trypanosomatidae) تعلق دارد، دارای ساختار کینتوپلاست است؛ ساختاری متراکم و سرشار از DNA که آن را به بستری ایده‌آل برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA تبدیل می‌کند. از آنجایی که این ساختار فاقد آنتی‌ژن‌های هسته‌ای انسانی و سایر پروتئین‌هاست، بستر بسیار خالصی محسوب می‌شود و بنابراین آزمون CLIFT دارای ویژگی تشخیصی بالاتری نسبت به ELISA است که ممکن است به دلیل اتصال‌های غیراختصاصی، نتایج مثبت کاذب ارائه دهد (۱۰).

با این حال، آزمون CLIFT از نظر حساسیت دارای محدودیت است و در مطالعات مختلف، دامنه حساسیت آن بین ۱۳ تا ۵۵ درصد گزارش شده است (۱۱). با در نظر گرفتن ویژگی‌های مکمل دو روش CLIFT و ELISA، هدف از این مطالعه طراحی و توسعه لام ایمونوفلورسانس غیرمستقیم جدید با استفاده از *Crithidia luciliae* به‌عنوان بستر و ارزیابی دقیق عملکرد تشخیصی آن از نظر حساسیت و ویژگی در مقایسه با یک روش تجاری رایج ELISA برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA در نمونه‌های سرمی بیماران بود.

روش کار

در این مطالعه، از مواد و تجهیزات زیر استفاده شد: محیط کشت RPMI 1640 (شرکت Gibco ، انگلستان)،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

سرم جنینی گاوی(FBS؛ Gibco ، انگلستان)، L-گلوتامین (Gibco، انگلستان)، بافر فسفات سالین (BS؛DNAbiotech، ایران)، توئین ۲۰ (DNAbiotech، ایران)، آنتی‌بادی گوسفندی ضد IgG انسانی کونژوگه با فلورسانس ایزوتیوسیانات (FITC؛ سینا بیوتک، ایران)، و میکروسکوپ فلورسانس BX40 (Olympus) جهت مشاهده نتایج ایمونوفلورسانس.

نمونه‌های سرم: در طراحی این مطالعه، از دستورالعمل مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) برای مقایسه آزمون‌های کیفی آزمایشگاهی استفاده شد. طبق این دستورالعمل، حداقل ۱۰۰ نمونه برای اعتبارسنجی آزمون لازم است (۱۲). بر همین اساس، از ۱۰۰ نمونه سرم انسانی استفاده شد که شامل ۵۰ نمونه مثبت و ۵۰ نمونه منفی برای آنتی‌بادی IgG ضد dsDNA بود. وضعیت مثبت یا منفی این نمونه‌ها پیش‌تر با استفاده از یک کیت ELISA تجاری (Generic Assay، آلمان) تعیین شده بود. این کیت بر اساس اطلاعات شرکت سازنده دارای حساسیت تقریبی ۹۴/۶٪ و ویژگی ۹۹٪ است. انتخاب نمونه‌ها به‌گونه‌ای انجام شد که نتایج مثبت و منفی آن‌ها در ELISA کاملاً قطعی باشد تا به‌عنوان مرجع مطمئن برای مقایسه عملکرد روش جدید مورد استفاده قرار گیرند.

کشت سلولی: سلول‌های *Crithidia luciliae* به‌صورت هوازی و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت RPMI 1640 با pH ۷/۴ کشت داده شدند. محیط کشت با ۱۰٪ سرم جنینی گاوی غیرفعال‌شده (در دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه)، ۱٪ L-گلوتامین و ۱٪ پنی‌سیلین-استرپتومایسین برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی غنی شد. پس از حدود ۷۲ ساعت، زمانی که سلول‌ها به مرحله رشد ایستا رسیدند، با تراکم تقریبی ۲×۱۰^{۷} سلول در میلی‌لیتر برداشت شده و یا برای توسعه بیشتر به محیط تازه منتقل شدند (۱۳).

آماده‌سازی لام‌های ایمونوفلورسانس: سلول‌های برداشت‌شده *C. luciliae* سه مرتبه با PBS شسته شدند و سپس در محلول ۴۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن (H_2O_2) که در آب مقطر تهیه شده بود، بازسوسپانسیون شدند تا نمای ظاهری سلول‌ها بهبود یافته و آنتی‌ژن‌ها بهتر نمایان شوند. از این سوسپانسیون، مقدار ۱۰ میکرولیتر با غلظت ۲×۱۰^{۷} سلول/میلی‌لیتر روی هر ناحیه لام چکانده شد و در دمای اتاق خشک شد. سپس با اتانول ۹۶٪ فیکس شده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. کیفیت مورفولوژی سلول‌ها و توزیع یکنواخت آن‌ها بر روی لام با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰X بررسی و تأیید شد.

آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم: برای انجام تست، نمونه‌های سرم با نسبت ۱:۱۰ در PBS رقیق شده و با ورتکس مخلوط شدند. سپس ۱۵ میکرولیتر از سرم رقیق‌شده روی هر ناحیه از لام چکانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، لام‌ها دو بار با بافر PBSTبه‌آرامی شسته شدند. پس از خشک شدن نسبی (بدون خشک شدن کامل)، ۱۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC به هر ناحیه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه گردید. پس از آن، دو مرحله شستشوی نهایی انجام شد و لام‌ها با مخلوط گلیسرول و PBS مونته شدند. سپس لام‌ها تحت مشاهده میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند.

اعتبارسنجی و تحلیل آماری: کیت طراحی‌شده از نظر حساسیت تشخیصی، ویژگی، تکرارپذیری (Repeatability) و بازتولیدپذیری (Reproducibility) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تحلیل آماری شامل محاسبه پارامترهای حساسیت، ویژگی، دقت کلی (Accuracy) ارزش پیش‌بینی مثبت (Positive Predictive Value, PPV)، و ارزش پیش‌بینی منفی (Negative Predictive Value, NPV) بود. همچنین برای ارزیابی میزان توافق بین دو روش ELISA وCLIFT ، ضریب کاپای کوهن (Cohen's Kappa) محاسبه شد. تفاوت بین نتایج دو روش نیز با استفاده از آزمون دقیق بررسی گردید.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

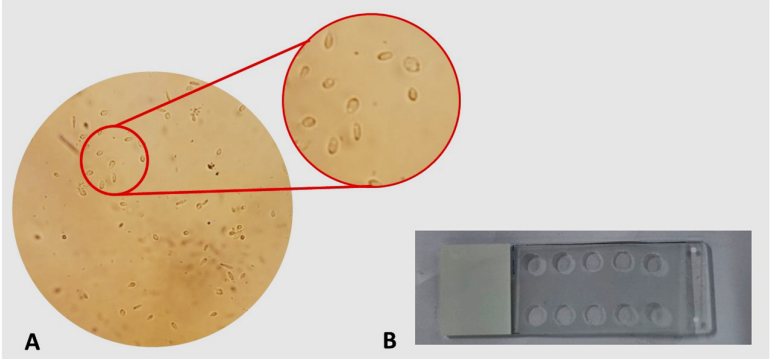
یافته‌ها

مورفولوژی Crithidia luciliae: پس از گذشت ۷۲ ساعت از آغاز کشت، سلول‌های *C. luciliae* به فاز ایستای رشد رسیدند و برای تهیه لام برداشت شدند. مورفولوژی مناسب سلول‌ها برای ارائه مؤثر آنتی‌ژن و دقت در شناسایی فلورسانس بسیار حائز اهمیت است. بدین منظور، یک لام از کشت تهیه شده و در بزرگ‌نمایی ۴۰X با میکروسکوپ نوری بررسی شد. در این بررسی، کینتوپلاست، که اندامکی مملو از DNA دو رشته‌ای و هدف اصلی آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA است، به‌وضوح مشاهده شد و ساختار مناسبی داشت، که نشان‌دهنده آمادگی مناسب سلول‌ها برای استفاده در آزمون ایمونوفلورسانس بود (شکل ۱).

تأیید سوسپانسیون سلولی آماده‌شده: پس از تیمار سوسپانسیون سلولی با آب مقطر و پراکسید هیدروژن، مورفولوژی سلول‌ها مجدداً با میکروسکوپ نوری بررسی شد تا از حفظ تمامیت ساختاری سلول‌ها پس از مراحل آماده‌سازی اطمینان حاصل شود. نتایج نشان داد که سلول‌ها ساختار خود را حفظ کرده‌اند و تراکم یکنواختی دارند (شکل ۲A). پس از تأیید، این سلول‌ها به‌طور یکنواخت روی لام‌های مخصوص چکانده شده، در دمای اتاق خشک شده و با اتانول ۹۶٪ فیکس شدند. تصویر نهایی لام ایمونوفلورسانس آماده‌شده در شکل ۲B نشان داده شده است. توزیع یکنواخت سلول‌ها بر روی لام‌ها برای به‌دست آوردن نتایج دقیق و قابل تکرار در آزمون‌ها بسیار حیاتی است.

آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم و تحلیل آماری: در آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم انجام‌شده بر روی ۱۰۰ نمونه سرم) شامل ۵۰ نمونه

شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های *Crithidia luciliae* در فاز ایستای رشد (بزرگ‌نمایی ۴۰X)؛ (A) کینتوپلاست؛ ساختار اختصاصی حاوی DNA دو رشته‌ای که محل اتصال آنتی‌بادی ضد dsDNA است (B) هسته سلول



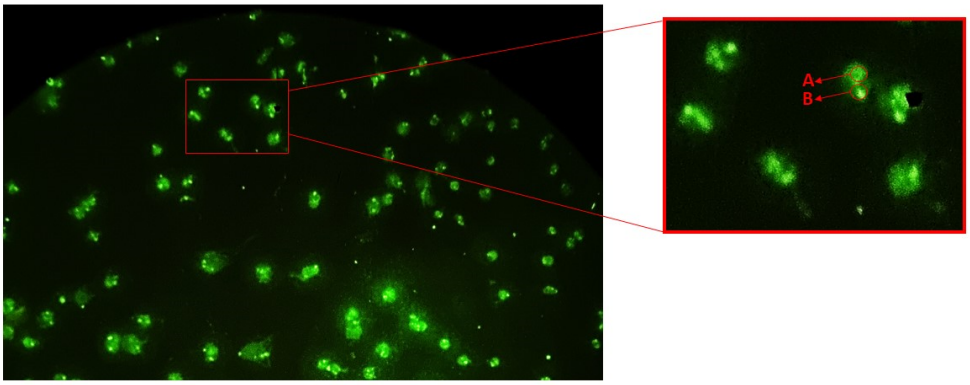
شکل ۱- (A) سوسپانسیون سلول‌های *Crithidia luciliae* پس از انجام مراحل آماده‌سازی (شامل تیمار با آب مقطر و پراکسید هیدروژن)، که حفظ کامل ساختار سلولی و توزیع یکنواخت را نشان می‌دهد (بزرگ‌نمایی ۴۰X).(B) نمایی از لام ایمونوفلورسانس آماده‌شده شامل سلول‌های فیکس‌شده و توزیع‌شده به‌صورت یکنواخت بر روی نواحی لام، آماده برای کاربرد تشخیصی.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

جدول ۱- نتایج آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از کریتیدیا لوسیلیا (*Crithidia luciliae indirect flourescence test, CLIFT*) و روش مرجع

نتایج روش CLIFT	نتیجه مثبت CLIFT	نتیجه منفی CLIFT	مجموع
نتایج مثبت روش مرجع	۲۳	۲۷	۵۰
نتایج منفی روش مرجع	۰	۵۰	۵۰
مجموع	۲۳	۷۷	۱۰۰



شکل ۳- نتیجه مثبت آزمون ایمونوفلورسانس (بزرگ‌نمایی ۴۰X)؛ (A) هسته سلول (B) کینتوپلاست دارای فلورسانس، نشان‌دهنده حضور آنتی‌بادی ضد dsDNAدر نمونه سرم

مثبت و ۵۰ نمونه منفی تأییدشده با (ELISA، تمامی ۵۰ نمونه منفی در روش ELISA نیز در آزمون ایمونوفلورسانس منفی بودند (جدول ۱، شکل ۳) که نشان‌دهنده ویژگی ۱۰۰ درصدی روش CLIFT بود. در مقابل، تنها ۲۳ مورد از ۵۰ نمونه مثبت در ELISA در آزمون ایمونوفلورسانس نیز مثبت شناسایی شدند، که نشان‌دهنده حساسیت ۴۶ درصدی روش طراحی‌شده است. تکرارپذیری و بازتولیدپذیری آزمون به‌صورت کامل (۱۰۰٪) تأیید شد. تحلیل آماری نشان داد که مقدار ارزش پیش‌بینی مثبت (PPV) آزمون برابر با ۱۰۰٪ و ارزش پیش‌بینی منفی (NPV) آن تقریباً ۶۴/۹٪ بود، در حالی که صحت آزمون ۷۳٪ محاسبه شد. همچنین ضریب کاپای کوهن برابر با ۰/۴۶ به‌دست آمد که نشان‌دهنده توافق متوسط بین روش CLIFT و ELISA است. براساس آزمون دقیق فیشر، اختلاف بین نتایج دو روش از نظر آماری معنادار بود (p= ۰/۰۰۰۱) که بیانگر وجود تفاوت واقعی در عملکرد این دو روش در شناسایی آنتی‌بادی ضد dsDNA است و لزوم تفسیر نتایج در کنار یافته‌های بالینی و سایر آزمایش‌ها را برجسته می‌سازد.

بحث

در این مطالعه، یک کیت تشخیصی مبتنی بر ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از *Crithidia luciliae* به‌عنوان بستر طراحی و مورد ارزیابی قرار گرفت. عملکرد این روش با استفاده از نمونه‌های سرمی که وضعیت آن‌ها از طریق کیت مرجع ELISA تعیین شده بود، بررسی شد. نتایج نشان داد که روش CLIFT توسعه‌یافته دارای ویژگی تشخیصی بسیار بالا (۱۰۰٪) ولی حساسیت نسبتاً پایین (۴۶٪) است. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پیشین مانند مطالعه Janyapoon و همکاران (۲۰۰۳) هم‌راستا هستند که در آن نیز ELISA دارای حساسیت بالاتر (۶۱٪ تا ۶۴٪) در مقایسه با CLIFT (۲۹٪ تا ۳۹٪) گزارش شد، در حالی که CLIFT ویژگی بالای خود (تا ۱۰۰٪) را حفظ کرده بود (۱۴).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]
[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

در این مطالعه، ELISA به‌عنوان روش مرجع برای تعیین وضعیت مثبت و منفی نمونه‌ها انتخاب شد و دلایل منطقی متعددی برای این انتخاب وجود دارد. از جمله مزایای ELISA می‌توان به حساسیت بالا آن اشاره کرد که امکان شناسایی گسترده‌تر آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA، از جمله آنتی‌بادی‌های با افینیتی پایین‌تر را فراهم می‌کند. همچنین، این روش دارای ظرفیت بالای پردازش نمونه و مقبولیت وسیع در آزمایشگاه‌های بالینی است. استفاده از چنین روش معتبر و با حساسیت بالا به‌عنوان مرجع، پایه‌ای محکم برای بررسی عملکرد CLIFT ایجاد می‌کند.

ویژگی بالای CLIFT را می‌توان به استفاده از DNA طبیعی موجود در کینتوپلاست *Crithidia luciliae* نسبت داد؛ این DNA کاملاً دو رشته‌ای و فاقد آنتی‌ژن‌های هسته‌ای یا پروتئین‌های مداخله‌گر (مانند پروتامین سولفات) است، که در برخی کیت‌های ELISA ممکن است موجب نتایج مثبت کاذب شوند. با این حال، حساسیت پایین‌تر مشاهده‌شده در CLIFT که در این مطالعه با شناسایی فقط ۲۳ مورد از ۵۰ نمونه مثبت ELISA مشهود بود، یکی از محدودیت‌های مهم این روش در غربالگری اولیه بیماران به شمار می‌رود.

دلیل اصلی برای حساسیت پایین‌تر CLIFT به ماهیت آنتی‌ژن در این روش برمی‌گردد؛ DNA موجود در کینتوپلاست *Crithidia* ساختاری متراکم و فشرده دارد که ممکن است برخی اپی‌توپ‌ها را از دسترس آنتی‌بادی خارج کند. همچنین، این DNA درون سیتوپلاسم قرار دارد و ممکن است دسترسی فیزیکی آنتی‌بادی‌های با افینیتی پایین را محدود نماید. این عوامل در مجموع باعث کاهش حساسیت تشخیص می‌شوند. در مقابل، روش ELISA از DNA خالص و پوشش‌داده‌شده بر سطح جامد استفاده می‌کند که اپی‌توپ‌های بیشتری را در دسترس قرار می‌دهد و در نتیجه امکان شناسایی طیف وسیع‌تری از آنتی‌بادی‌ها را فراهم می‌سازد، اگرچه ممکن است با کاهش ویژگی همراه باشد. به همین دلیل، روش CLIFT اغلب به‌عنوان آزمون تأییدی (Confirmatory) مورد استفاده قرار می‌گیرد نه آزمون غربالگری اولیه.

برای بهبود حساسیت روش CLIFT ، بهینه‌سازی برخی پارامترهای ایمونولوژیک بسیار حائز اهمیت است pH بافر یکی از فاکتورهای کلیدی است که می‌تواند ساختار و بار الکتریکی آنتی‌بادی و DNA را تحت تأثیر قرار داده و در نتیجه بر افینیتی اتصال تأثیر بگذارد. تنظیم دقیق pH می‌تواند برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن را تقویت کرده و منجر به شناسایی حتی آنتی‌بادی‌های با افینیتی پایین‌تر شود.

از طرف دیگر، قدرت یونی بافر نیز در این تعاملات نقش دارد؛ کاهش قدرت یونی بافر می‌تواند نیروهای دافعه بین مولکول‌ها را کاهش داده و اتصال بهتری ایجاد کند. مطالعه‌ای توسط Karsten Conrad و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که تغییرات در بافر واکنش می‌تواند به‌طور معناداری حساسیت CLIFT را افزایش دهد (۱۱).

از آنجایی که DNA مورد هدف در CLIFT درون سیتوپلاسم سلول قرار دارد، افزایش نفوذپذیری سلولی نیز یک استراتژی مناسب برای بهبود حساسیت است. استفاده از موادی مانند ساپونین (Saponin) می‌تواند با ایجاد منافذ موقت در غشای سلولی، امکان دسترسی بهتر آنتی‌بادی‌ها به کینتوپلاست را فراهم کند. با این حال، تمامی این تغییرات باید با دقت فراوان و در غلظت‌های بهینه صورت گیرند تا ساختار سلولی *Crithidia* و ویژگی بالای تست حفظ شود. بنابراین، یافتن تعادل بین افزایش حساسیت و حفظ ویژگی بالا، یکی از چالش‌های مهم در بهینه‌سازی این آزمون محسوب می‌شود.

علاوه بر تغییرات تکنیکی، برای افزایش دقت تشخیص در بیماری SLE، لازم است نتایج CLIFT همراه با دیگر داده‌های آزمایشگاهی و بالینی تفسیر شوند. این شامل ارزیابی شاخص‌های مکمل سرم مانند C3، C4، CH50 و C1q است که معمولاً در فاز فعال بیماری کاهش می‌یابند (۱۵). همچنین اندازه‌گیری فرآورده‌های تجزیه‌ای کمپلمان مانند iC3b ، C3dg، C3d و C4d می‌توانند در پایش فعالیت بیماری مفید

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

باشد (۱۶).

از طرف دیگر، شاخص‌های بالینی مانند پروتئینوری، عملکرد کلیوی و علائم بیمار نیز در تفسیر نتایج آزمایش بسیار اهمیت دارند. ترکیب این داده‌ها با یافته‌های ایمنی‌شناسی، زمینه را برای تشخیص دقیق‌تر و پیگیری بهتر بیماران مبتلا به SLE به‌ویژه با درگیری کلیه فراهم می‌سازد (۱۷).

نتیجه‌گیری

در نتیجه با توجه به ویژگی بسیار بالای روش CLIFT، این آزمون باید به‌عنوان ابزار تأییدی (نه به‌عنوان روش غربالگری اولیه) در کنار دیگر روش‌ها و یافته‌ها به کار گرفته شود. هرچند CLIFT قادر به شناسایی همه موارد مثبت نیست، اما توانایی آن در اجتناب از نتایج مثبت کاذب، آن را به ابزاری ارزشمند در روند تشخیص لوپوس تبدیل می‌کند. زمانی که این روش همراه باELISA، نشانه‌های بالینی و شاخص‌های آزمایشگاهی دیگر تفسیر شود، می‌تواند باعث افزایش اعتماد تشخیصی و بهبود مدیریت بیماران شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی ایران بابت تأمین زیرساخت‌های پژوهشی و از شرکت پادیاب طب بابت تأمین مواد آزمایشگاهی و پشتیبانی فنی لازم برای اجرای موفق پژوهش، صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

همه مراحل این مطالعه بر اساس موازین اخلاقی و پس از کسب تأییدیه از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IUMS.FMD.REC.1402.526 انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

محمدرضا گونه گر، انجام آزمایشات عملی، مشارکت در نگارش و مرور و ویراستاری پیش‌نویس مقاله، اشکان دهقانی، کمک در انجام آزمایشات عملی و مشارکت در جمع‌آوری داده؛ دکتر امید کیانی، مشاور فنی و مشاور علمی پروژه؛ دکتر محمد علی عصاره زادگان، طراحی متدولوژی، سوپروایزر پروژه، نگارش، مرور و ویراستاری نهایی مقاله.

References

1. Förger F, Matthias T, Oppermann M, Becker H, Helmke K. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. Lupus. 2004 Jan 2;13(1):36–44.
2. Fatoye F, Gebrye T, Mbada C. Global and regional prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in low-and-middle income countries: a systematic review and meta-analysis. Rheumatol Int. 2022 Aug 25;42(12):2097–107.
3. Chan EKL, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, et al. Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. Lupus. 2016 Jul 31;25(8):797–804.
4. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73(1):17–23.
5. Pan N, Amigues I, Lyman S, Duculan R, Aziz F, Crow M, et al. A surge in anti-dsDNA titer predicts a severe lupus flare within six months. Lupus. 2014 Mar 6;23(3):293–8.
6. Artim-Esen B, Çene E, Şahinkaya Y, Ertan S, Pehlivan Ö, Kamali S, et al. Cluster Analysis of Autoantibodies in 852 Patients with Systemic Lupus Erythematosus from a Single Center. J Rheumatol. 2014 Jul;41(7):1304–10.
7. Dema B, Charles N. Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors. Antibodies. 2016 Jan 4;5(1):2.
8. Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies — quintessential biomarkers of SLE. Nat Rev Rheumatol. 2016 Feb 19;12(2):102–10.
9. Jenkins Dw. Pathogens, Parasites And Predators Of Medically Important Arthropods. Annotated List And Bibliography. Bull World Health Organ. 1964;30(Suppl):SUPPL:1-150.
10. Donelson JE, Gardner MJ, El-Sayed NM. More surprises from Kinetoplastida. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999 Mar 16;96(6):2579–81.
11. Conrad K, Ittenson A, Reinhold D, Fischer R,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]

Roggenbuck D, Büttner T, et al. High Sensitive Detection of Double-Stranded DNA Autoantibodies by a Modified Crithidia luciliae Immunofluorescence Test. Ann N Y Acad Sci. 2009 Sep;1173(1):180–5.

12. Clark LW. User protocol for evaluation of qualitative test performance : approved guideline. NCCLS; 2002. 32 p.

13. Hall ST, Hillier CJ, Gero AM. Crithidia luciliae:Regulation of Purine Nucleoside Transport by Extracellular Purine Concentrations. Exp Parasitol. 1996 Aug;83(3):314–21.

14. Janyapoon K, Jivakanont P, Choosang K, Surbrsing R, Charoenying V, Baithong S. Comparative study of anti-double stranded DNA detection by ELISA and Crithidia luciliae immunofluorescence. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2003 Sep;34(3):646–50.

15. Ayano M, Horiuchi T. Complement as a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus. Biomolecules. 2023 Feb 15;13(2):367.

16. Troldborg A, Jensen L, Deleuran B, Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Jensenius JC. The C3dg Fragment of Complement Is Superior to Conventional C3 as a Diagnostic Biomarker in Systemic Lupus Erythematosus. Front Immunol. 2018 Mar 26;9.

17. Asif S, Khan A, Zahoor S, Lashari N, Haroon M, Khanum A. Correlation Between Quantitative Anti-dsDNA Levels with Severity of Proteinuria in Systemic Lupus Erythematosus Patients. Reumatología Clínica (English Edition). 2022 Oct;18(8):464–8.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-29]

[DOI: 10.47176/rjms.32.92]