

exclusively breast-fed infants[J]. Neonatol, 2010, 97(4): 299-304.

[7] Maria E, Baldassarre, Fanelli M, et al. Fecal calprotectin(FC) in newborns: is it a predictive marker of gastrointestinal and/or allergic disease? [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2010, 33(1): 220-223.

[8] Roug'e C, Butel MJ, Piloquet H, et al. Fecal Calprotectin Excretion in Preterm Infants during the Neonatal Period [J]. PLoS ONE, 2010, 5(6): e11083.

[9] Sipponen T, Kolho KL. Faecal calprotectin in children with clinically quiescent inflammatory bowel disease[J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(7/8): 872-877.

[10] Flagstad G, Helgeland H, Markestad T. Faecal calprotectin concentrations in children with functional gastrointestinal disorders diagnosed according to the pediatric Rome III criteria [J]. Acta Paediatrica, 2010, 99(5): 734-737.

[11] Katashima T, Naruko T, Fujita M, et al. Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients [J]. Circ J, 2010, 74(4): 741-748.

[12] Jensen LJ, Pedersen S. Plasma calprotectin predicts mortality in

patients with ST segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention[J]. J Interventional Cardiol, 2010, 23(2): 123-129.

[13] Hammer HB, Qdegard S, Syversen SW. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(1): 150-154.

[14] Hammer HB, Haavardsholm EA, Kvien TK. Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2008, 37(3): 179-182.

[15] Soyfoo MS, Roth J, Vog T, et al. Phagocyte-specific S100 A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus[J]. J Rheumatol, 2009, 36(10): 2190-2194.

(收稿日期: 2011-02-17)

• 综 述 •

类风湿关节炎自身抗体类风湿因子与抗瓜氨酸化蛋白抗体关系的研究进展

刘彦虹, 卢秀敏 综述, 高 飞 审校

(哈尔滨医科大学附属第二医院检验科 150086)

关键词: 关节炎, 类风湿; 自身抗体; 抗瓜氨酸化蛋白抗体

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 09. 024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)09-0973-03

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的高发病及高致残性的炎症性自身免疫病,病理表现为慢性滑膜炎,侵及下层的软骨和骨,造成关节破坏。早期诊断、早期治疗是阻止病情发展和减少致残率的关键。因此,临床上迫切需要有助于 RA 早期诊断,而且能够预示病情进展、观察疗效的无创性实验室指标。20 世纪 40 年代,有学者先后在 RA 患者血清中发现了类风湿因子(rheumatoid factor, RF),找到了诊断 RA 的“金标准”^[1]。近些年来,抗瓜氨酸化蛋白抗体(anticitrullinated protein antibodies, ACPAs)系列的发现是 RA 诊断领域新的里程碑。

1 RF

RF 是针对 IgG Fc 段抗原表位的一类自身抗体,在 RA 中的阳性率高达 75%,但其特异性差,在其他自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、干燥综合征、多种感染性疾病甚至正常人血清中也都检测到(健康人群阳性率 3%~5%,老年人 10%~30%)^[2]。检测 RF 阴性不能排除 RA,阳性则要结合临床症状进行诊断。

RF 有 IgG、IgA、IgM 等亚型, IgA RF、IgG RF 在 RA 患者血清中出现有一定规律, IgA RF、IgG RF 很少单独出现,而总是伴有 IgM RF 含量的升高^[3]。3 种 RF 同时升高较单一型升高的患者病情严重,在 RA 多关节受累的患者 IgM RF、IgA RF 显著增高, RA 患者关节受累个数与 IgM RF、IgA RF 水平的高低正相关,另外当患者血清中同时有高含量的 IgM RF、IgA RF 时,其病情进展快,易发生骨侵蚀和骨破坏,而血清中 IgM RF、IgG RF 含量持续增高则是预后不良的表现^[4]。

Bobbio-Pallavicini 等^[5]研究发现 RA 患者在使用英夫利昔单抗和抗风湿药联合治疗时, IgM RF、IgA RF 滴度显著地下降,但 IgG RF 没有变化。Bos 等^[6]选取 188 名 RA 患者使用阿达木单抗进行治疗,结果显示, IgM RF 滴度下降并伴随血细胞沉降率和 C-反应蛋白水平下降,因此, IgM RF 可作为炎症活动的标志物。

2 ACPAs

自从 1964 年证实抗核周因子(APF)是 RA 的特异性抗体并可在疾病早期出现后,又陆续发现抗角蛋白抗体(AKA)、抗聚角蛋白微丝蛋白抗体(AFA)以及抗 Sa 抗体都对 RA 诊断具有较高特异性,上述抗体在化学结构上具有相关性,他们的表位都含有瓜氨酸,故称之为抗瓜氨酸化蛋白抗体,在 RA 的发病及发展中起作用。新近发现的 ACPAs 包括抗环瓜氨酸肽抗体(抗 CCP 抗体)、抗瓜氨酸化纤维蛋白原抗体(ACF)、抗突变型瓜氨酸化波形蛋白抗体(抗 MCV 抗体)等。

2000 年国外首次报道根据聚丝蛋白(filaggrin)的 cDNA 序列合成一条含瓜氨酸的环肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)并用于 ELISA 检测,发现其对 RA 诊断特异性为 98%,敏感性是 68%,可视为 RA 新的血清标志物。抗 CCP 抗体阳性是侵蚀性关节损害的一个重要标志及危险因素,联合检测 IgM RF 和抗 CCP 抗体能够提高 RA 的诊断水平^[7]。研究证实抗 CCP 抗体对 RA 诊断有极高的特异性,尤其在疾病早期或 RF 阴性的 RA 患者中。抗 CCP 抗体除早期诊断外,对疾病的预后评估也有重要意义^[8]。Nishimura 等^[9]在其发表的一项 Meta 分析中指出,抗 CCP 抗体与 IgM RF 相比对 RA 诊断

的特异性更高,且能够较好地预测关节骨侵蚀。

Perez 等^[10]对抗瓜氨酸化纤维蛋白原抗体(ACF)在早期 RA 中的诊断和预后价值进行研究,证实 ACF 在 RA 诊断中的敏感性(55.8%)和特异性(92.6%)与抗 CCP 抗体相近,而且对 RA 早期诊断的敏感性高于 IgM RF,并与 RA 的影像学进展相关。国内 Zhao 等^[11]报道,ACF 对 RA 的敏感性、特异性分别为 67.21% 和 84.84%,并与血细胞沉降率、抗 CCP 抗体、AKA 相关,ACF 阳性患者更易出现影像学改变,且在 IgM RF、AKA 和 APF 阴性患者中 ACF 具有较高的阳性率。提示 ACF 检测对于 RA 相关抗体阴性的患者具有辅助诊断的价值。

另一重要的发现是抗 MCV 抗体,波形蛋白是重要的细胞骨架蛋白,经由肽酰精氨酸亚氨酶(PAD)的瓜氨酸化后蛋白结构发生变化,增加了潜在的抗原决定簇,抗 MCV 抗体因其有多个潜在抗原决定簇而优于抗 CCP 抗体。Bang 等^[12]应用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 1 151 例 RA 患者血清抗 MCV 抗体,结果显示,抗 MCV 抗体在 RA 患者中的特异性为 95%、敏感性为 82%,提示波形蛋白的抗原特性由突变和瓜氨酸化决定。同时,发现抗 MCV 抗体滴度与疾病活动性相关,在诊断准确性及预后判断上都占有优势。Soos 等^[13]研究证实抗 MCV 抗体特异性和敏感性与抗 CCP 抗体相近,具有类似的诊断价值。国内 Liu 等^[14]最近研究显示,抗 MCV 抗体在早期 RA 患者中敏感性为 78.2%、特异性为 93.4%,具有广泛的临床应用和研究前景。

3 RA 患者 RF 与 ACPA 的关系

3.1 RF、ACPA 在 RA 潜伏期出现 多项回顾性研究显示,在 RA 发病前几个月或几年内患者血清中出现 RF 和(或)ACPA^[15]。当两者同时出现时,RA 病情发展的最快,当发病时抗体滴度升高,发病前 3 年内自身抗体由阴转阳。但一部分患者在发病初期才发生一种或两种自身抗体由阴转阳。因为实验选取的样本多是确诊的 RA 患者血样,尚需要前瞻性的研究来评估这些自身抗体与疾病发生的关系。

3.2 RF、ACPA 与 RA 患者不同的临床症状有关 研究证实 RF 与 RA 患者出现关节外病变有关,但 ACPA 却与之无关^[16]。最近研究显示,伴发间质性肺炎的 RA 患者和先天性间质性肺炎患者的肺组织出现瓜氨酸化,但是 ACPA 只出现在 RA 患者中。

3.3 RF、ACPA 分别与关节损坏有关 前瞻性研究显示 RF、ACPA、人类白细胞抗原(HLA)-DRB1 共同表位(shared epitope,SE)基因与 RA 进展有关。RF 是已知 RA 的危险因素之一,多项研究证实 RF、ACPA 是独立的关节损坏的危险因子。van der Woude 等^[17]评估了 RA 患者影像学进展与 RF、ACPA、SE 基因的关系。发现 ACPA、RF 与关节损坏有各自独立的关系。有趣的是,SE 基因与关节损坏有关这一现象只存在于 RF 阴性患者中,推测 SE 基因发挥作用与 ACPA 有关。

3.4 RA 治疗过程中 RF 比 ACPA 下降的多 Bos 等^[6]研究发现 RA 患者在使用西沙必利治疗后,RF 水平显著下降,但 ACPA 则没有。使用利妥昔单抗治疗有效的患者血清中 ACPA、RF 水平出现显著下降,病情缓解后恢复至正常水平。

4 小 结

RF、ACPA 是目前 RA 诊断中 2 种最具有标志性的自身抗体,为 RA 的诊断、治疗、预后判断提供信息。由于 ACPA 与 RF 相比,具有更高的敏感性和特异性,ACPA 比 RF 更有诊

断价值。RF、ACPA 可以预示关节损坏,RF 还与关节外病变有关。并且,这 2 种抗体在治疗过程中不同的变化反映了他们在 RA 发病中具有不同的参与机制,有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] Rose HM, Ragan C. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1948, 68(1): 1-6.
- [2] Sokka T, Pincus T. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, or rheumatoid factor are normal at presentation in 35% - 45% of patients with rheumatoid arthritis seen between 1980 and 2004: analyses from Finland and the United States[J]. J Rheumatol, 2009, 36(7): 1387-1390.
- [3] Zavala-Cerna MG, Nava A, Garcia-Castaneda E, et al. Serum IgG activity against cyclic citrullinated peptide in patients evaluated for rheumatoid factor correlates with the IgM isotype[J]. Rheumatol Int, 2008, 28(9): 851-857.
- [4] van Tuyl LH, Lems WF, Kerstens PJ, et al. IgM-rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide decrease by 50% during intensive treatment in early rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(10): 1652-1653.
- [5] Bobbio-Pallavicini F, Caporali R, Alpini C, et al. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2007, 66(3): 302-307.
- [6] Bos WH, Bartelds GM, Wolbink GJ, et al. Differential response of the rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies during adalimumab treatment in patients with rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2008, 35(10): 1972-1977.
- [7] Barra L, Pope J, Bessette L, et al. Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review[J]. Rheumatology(Oxford), 2011, 50(2): 311-316.
- [8] Predeteanu D, Varzaru L, Balaescu A, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies—activity markers in rheumatoid arthritis[J]. J Med Life, 2009, 2(1): 36-41.
- [9] Nishimura K, Suqiyama D, Koqata, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2007, 146(11): 797-808.
- [10] Perez ML, Gomara MJ, Ercilla G, et al. Antibodies to citrullinated human fibrinogen synthetic peptides in diagnosing rheumatoid arthritis[J]. J Med Chem, 2007, 50(15): 3573-3584.
- [11] Zhao Y, Tian X, Li Z. Prevalence and clinical significance of antibodies to citrullinated fibrinogen(ACF) in Chinese patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Rheumatol, 2007, 26(9): 1505-1512.
- [12] Bang H, Egerer K, Gauliard A, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(8): 2503-2511.
- [13] Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, et al. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentin by ELISA in rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2007, 34(8): 1658-1663.
- [14] Liu X, Jia R, Zhao J, et al. The role of anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in the diagnosis of early rheumatoid arthritis[J]. J Rheumatol, 2009, 36(6): 1136-1142.
- [15] Whiting PF, Smidt N, Sterne JAC, et al. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2007, 146(7): 456-464.

[16] Korkmaz C, Tercan US, Kasifoglu T, et al. Anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies in patients with long-standing rheumatoid arthritis and their relationship with extra-articular manifestations[J]. Clin Biochem, 2006, 39(10):961-965.

[17] van der Woude D, Swersen SW, van der Voort EI, et al. The AC-

PA isotype profile reflects long-term radiographic progression in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 69(6):1110-1116.

(收稿日期:2011-01-03)

• 综 述 •

血凝分析仪的性能评估方法的研究进展

胡丽涛¹综述, 王治国^{2△}审校

(1. 北京协和医学院研究生院 100730; 2. 卫生部北京医院卫生部临床检验中心 100730)

关键词: 研究; 血凝分析仪; 性能评估

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.09.025

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)09-0975-03

随着血凝仪的发展,关于血凝的评估方法也在更新。实验室应参照临床实验标准化协会 (CLSI) H57-A^[1] 及相关文件^[2-10] 并根据实际情况来对仪器进行评估和使用。仪器的性能评估内容包括精密度、准确度、参考区间、可比性、携带污染率等。在仪器评估之前应该为整个评估过程制订一个评估计划。

1 标本选择

用于血凝仪性能评估的标本应该严格按照 CLSI 提供的指南进行收集、处理、运输和保存。血凝检测适用标准血浆,其钠浓度必须与实验室标本相同。标本类型包括冰冻血浆、冻干血浆、新鲜标本和基质。除在 4 h 内完成的平行检测外,评估分析最好使用冰冻或者冻干血浆,其中冰冻又优于冻干血浆。如果使用冰冻血浆,应保存在 -70 ℃ 以下,在 -20 ℃ 保存超过 2 周即可使某些凝血因子失活,其结果不能和新鲜血浆比较。

2 检测项目选择

基本的评估项目包括凝血筛查试验 I 期凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 和凝血酶时间 (TT) 和 (或) Clauss 法测纤维蛋白原,评估范围取决于每个实验室的检测范围和标本类型。大规模方法评估需包括正常和病理的血浆,检测方法包括凝固法 (也称生物学方法)、发色底物法 (用于出血或血栓倾向筛查)、自动免疫比浊法以及监测抗凝检测。评估一台凝血仪所有凝血因子以及发色底物法检测项不太实际,合理的组合能够较好地评估仪器的性能:一个基于 PT 的凝血因子 (如 V 因子活性)、一个基于 APTT 的凝血因子 (如 VIII 因子活性)、直接显色反应 (如蛋白 C 活性)、间接显色反应 (如抗凝血酶活性) 和免疫反应 (如 vW 因子抗原)。D-二聚体没有统一标准,不适宜用于方法比较。

3 试剂选择

条件有限的实验室通常用新的仪器和试剂与使用中的方法进行对比。如果允许,筛选方法的试剂和仪器应该与参考试剂和仪器 (通过室内质量评估计划评估) 相比较。由于筛选试剂的成分已知,经常用含相似物质的试剂进行比较。促凝血酶原激酶试剂应该与含有相同类型组织因子的试剂比较,如重组人源试剂与重组人源试剂、含兔脑组织试剂与含兔脑组织试剂,至少要有相同的国际敏感度指数 (ISI)。如有需要,APTT 的激活物也应该相匹配。

4 主要性能指标

4.1 精密度 推荐方法:将同批两水平浓度各 3 份相同标本

作重复测定,持续 5 个工作日。若一批内出现失控数据,舍去这个批次的数据,重新再测定另外一批。每一批应该由 2~3 份不同浓度的血浆组成,一般是 1 份正常和 1 份高值异常血浆作 PT、APTT 和 TT,也可以是 1 份正常和 2 份不同浓度的异常血浆作定量检测。至少有 1 份异常血浆的浓度接近医学决定水平 (如抗凝血酶正常参考范围的低限)^[11]。不精密度的可接受限随实验室的不同而不同,实验室可咨询仪器制造商来确定各自的正常和异常标本不精密度的可接受水平,比较测得的不精密度与仪器制造商的重复性声明。如果厂家的重复性是用 CV 表示,通过下面的公式将 CV 转换成 $s: s = CV\%$ ^[12-14]。如果测得的 s 小于厂家声明的 s 说明厂家实现了重复性声明^[12-14]。

4.2 准确度 准确度是指测量结果与被测量真值之间的一致性^[15-16]。真值的概念在血凝检测特别是筛查检测中不常用。国际标准化比率 (INR)^[17] 给了一定的标准,但是 PT, APTT 和 TT 都没有标准。即使有些检测如 VIII 因子、纤维蛋白原、抗凝血酶有 WHO 的国际标准,但是其评估方法和参考方法都取决于所使用的方法学、其他凝血因子的浓度和抗凝物质的存在情况。

4.3 参考区间 实验室希望能够在血凝仪的评估过程中为各项检测建立参考区间。这可能特别适用于 PT/INR,通过其计算 PT 的几何平均值。但是为血凝仪所有的检测建立参考区间的工作有一部分属于仪器的使用阶段。需要使用 20 份健康人的血浆标本来建立和验证血凝仪的参考区间^[18-20],并且需考虑性别、药物、激素情况、饮食等对结果的影响 (如蛋白 S、APC 抵抗)。检测条件应该和实验室平时工作的条件一致。例如,很多医院的标本用新鲜血浆,性能评估时也应该用新鲜血浆。样本应该在短时间内完成检测 (室温 4 h 内),或者 -70 ℃ 保存。冰冻血浆样本应该用 37 ℃ 水浴,温和混匀目快速检测。

4.4 可比性 由于真值的概念不适用于大多数血凝检测。在这种情况下,可比性可以代替准确度。PT 和 APTT 应包含在任何可比性评估过程中^[21-22]。

4.4.1 PT/INR 的可比性评估 PT/INR 的可比性评估至少需要 40 份接受维生素 K 拮抗剂治疗的患者标本。这些标本应该覆盖了整个可报告范围,包括 30 份标本的 INR 范围在 2.0~4.5 之间,5 份标本 $INR < 2.0$, 5 份标本 $INR > 4.5$ 。只有 INR 值在 1.5~4.5 之间才有效。理论上,INR 值大于 4.5 的精密度和准确度未知,然而实际工作中,临床医生以 $INR > 4.5$ 作为干预的依据。可接受度可定义为大于 85% 的治疗范

△ 通讯作者, E-mail: zhiguo_w@hotmail.com.