

• 检验仪器与试剂评价 •

酶联免疫吸附法与胶体金免疫层析法检测 抗环瓜氨酸肽抗体方法学的比较和性能评估

瞿国英

(上海市潍坊社区卫生服务中心 200122)

摘要:目的 探讨酶联免疫吸附(ELISA)法与胶体金免疫层析(GICA)法在检测抗环瓜氨酸肽(CCP)抗体的方法学差异,并评估性能差异。**方法** 按照美国风湿病学会于 1987 年定义为类风湿关节炎的依据,筛选 150 例患者。同时选取 150 例健康体检者作为对照。用两种方法学进行检测,结果用统计软件 SPSS 15.0 进行对比分析。计算检测结果的阴性符合率、阳性符合率、总符合率及 Kappa 值。取高、低浓度标本验证 GICA 法重复性。**结果** 两种方法检测结果比较,阴性符合率、阳性符合率、总符合率和 Kappa 值分别为 100.0%、99.33%、99.67% 和 0.96;GICA 法高浓度标本结果阳性数为 10 次,阳性率 100%;低浓度标本结果阳性数为 6 次,阳性率为 60%。**结论** ELISA 法和 GICA 法检测抗-CCP 抗体结果一致性良好,而且 GICA 法操作简单,敏感性和特异性高,整个实验过程仅需 10 min,较为适合大批量的初筛检查。

关键词:酶联免疫吸附测定; 胶体金; 抗环瓜氨酸肽抗体
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.034 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)01-0083-03

**Methodology comparison and performance evaluation of two anticyclic citrullinated peptide
antibody analysis assay by ELISA and gold immunochromatography**
Qu Guoying
(Community Health Center of Weifang, Shanghai 200122, China)

Abstract:**Objective** To study the methodology and performance differences of enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and gold immunochromatography assay(GICA) in the detection of anti-cyclic citrullinated peptide(CCP) antibody, and to assess the performance differences. **Methods** According to the American College of Rheumatology in 1987 defined as rheumatoid arthritis (RA), 150 cases of RA patients, were collected as RA group, and 150 healthy persons were selected as control group in the same period. The results of two methods of detection were analyzed by SPSS 15 Statistical Software. The negative coincidence rate, the positive coincidence rate, the total coincidence rate and Kappa value were calculated. High and low concentration of specimens were used to validate the GICA method. **Results** The negative coincidence rate, the positive coincidence rate, the total coincidence rate and Kappa value of two tests were 100.00%, 99.33%, 99.67%, and 0.96, respectively. GICA high concentration sample results positive count was 10, and the positive rate was 100%. Low concentration sample results positive count was 6, and the positive rate was 60%. **Conclusion** The consistency of the ELISA and GICA for the anti-CCP antibody is good consistency, and the GICA method has the advantages of simple operation, high sensitivity and specificity. The whole experiment processes only need 10 minutes, GICA is more suitable for mass screening.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; gold colloid; anti-cyclic citrullinated peptide antibody

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性全身性自身免疫性疾病,以关节滑膜炎为特征。1858 年英国内科医生 Garrod 首先提出了类风湿关节炎这一病名,并阐述了该疾病是一种以关节病变为主的全身性疾病,主要表现为关节滑膜炎,其次为全身各结缔组织广泛性炎症,造成关节各种组织如软骨、韧带、骨髓和多脏器损害。RA 的发病特征主要表现为关节滑膜炎反复发作,并导致关节软骨及骨质破坏,最终导致关节畸形及其功能障碍^[1]。RA 作为一种较为常见的多发性疾病,好发年龄段为 20~55 岁,我国的发病率为 0.32%~0.36%^[2],且女性发病率高于男性,男女之比约为 1:3^[3]。

RA 在发病两年之内即可出现不可逆的骨关节破坏,造成关节功能丧失^[4],对患者无论在生理和心理上都是极度消极的,其生存质量严重下降。所以能及早发现病情、及时有效地治疗就显得尤为重要了。一旦错过治疗窗口期,则只能缓解症状,很难阻止病情的恶化^[5]。

抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体:1998 年 Schellekens 等根据类风湿关节炎特异相关蛋白抗体识

别表位的必需组成,合成了一种瓜氨酸,并证明该瓜氨酸是 RA 患者血清中相关抗体识别的主要成分。在 2000 年, Schellekens 合成环瓜氨酸肽,并用其为抗原基质检测 RA 患者血清中的抗-CCP 抗体。经多年的试验论证和临床数据显示:抗-CCP 抗体对 RA 的临床确诊具有较高的特异性和敏感性^[6-8]。

1 资料与方法

1.1 入选与排除标准

1.1.1 入选标准

根据美国风湿病学会于 1987 年定义的类风湿关节炎标准:(1)晨僵超过 1 h;(2)3 个或 3 个以上的关节发炎;(3)掌指、手腕和近端指间等关节出现关节炎;(4)对称性的关节炎;(5)类风湿结节;(6)类风湿因子阳性;(7)放射线学(X 线)检测发现关节有侵蚀,达到最少任何以上 4 项情况)进行筛选。

1.1.2 排除标准

患者患有风湿性关节炎,或者其他自身免疫性疾病的应予以排除。

1.2 一般资料

选择 2012 年 1~7 月于本院就诊的,且根据

上述标准,通过筛选、监测和评估合格的,共计 150 例 RA 患者(其中男 60 例,女 90 例)入选此项研究调查,并作为病例组。取同一时间段本院健康体检者 150 例(其中男 60 例,女 90 例)作为对照组,两组一般特征均相同。

1.3 方法

1.3.1 标本收集 素食 3 d 后取空腹静脉血 3 mL,3 000 r/min 高速分离血清置-20 ℃保存待测,防止反复冻融。

1.3.2 检测方法 ELISA 法:(1)ELISA 试剂盒由上海科新生物技术公司出品,均有国家药品生物制品鉴定所批示的检验合格证书。(2)试剂与样本在室温(20~25 ℃)平衡 30 min,将由 1:50 比例稀释的样本取 100 μL 加入反应孔内,室温温育 1 h,同时做好阴、阳性对照;将反应孔内的溶液倒出后洗板,每孔加入洗涤液 300 μL,震荡 1 min 后倒出,将板条拍干,同步骤重复 3 次,每孔加入酶标液 100 μL,室温(20~25 ℃)温育 0.5 h 后再次洗板 5 次;每孔加入显色液 100 μL,避光反应 30 min;最后每孔加入 50 μL 终止液,轻轻震荡混匀,终止反应,并于 20 min 内选 630 nm 波长测吸光度值。GICA 法:(1)GICA 法试剂盒由上海科新生物技术公司提供,均有国家药品生物制品鉴定所批示的检验合格证书。(2)试剂与样本在室温平衡 30 min,用一次性塑料吸管吸取样本,逐滴入 4 滴至加样孔内,5 min 后判读结果。

1.3.3 方法学比较 将两组各 150 例样本严格按照说明书,进行 ELISA 法和 GICA 法检测,将所有检测结果汇总,以 ELISA 法为参考方法,进行 *Kappa* 检验,评价一致性。同时计算两种方法阳性、阴性符合率以及总符合率。

1.3.4 重复性试验 以 ELISA 法作为参考数值分别取高浓度值为 584.9 RU/mL、低浓度值为 53.6 RU/mL 的标本,用 GICA 法连续检测 10 次,严格按照说明书操作(GICA 法临界值为 50.0 RU/mL)。

1.3.5 性能验证标准 两种方法一致性验证标准 *Kappa* 值大于 0.75 表示具有优秀的一致性;*Kappa* 值为 0.4~0.75,认为具有相当好的一致性;*Kappa* 值低于 0.4,表示一致性很差。

1.4 统计学处理 所有数据通过 SPSS 15.0 软件进行统计学处理,采用非参数检验方法,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两均数间的比较用两独立样本资料的 *t* 检验,两种方法一致性比较采用 *Kappa* 值检验。

2 结 果

2.1 一般资料 经统计分析后发现,病例组与对照组在年龄段上差异并无统计学意义($P>0.05$)。针对 RA 的好发年龄段为 20~55 岁,本次试验对象的男性病例组与女性病例组的年龄均值分别为 40.5 岁及 37.5 岁(见表 1),也均符合 RA 的发病年龄段特性。

表 1 两组患者的资料分析

组别	<i>n</i>	性别(男/女, <i>n</i> / <i>n</i>)	年龄(岁)
病例组	150	60/90	40.50±5.35
对照组	150	60/90	35.70±6.23

2.2 两种方法一致性 两种方法检测 300 例血清抗-CCP 抗体结果:ELISA 法检出 150 例阳性,150 例阴性;GICA 法检出阳性 148 例,阴性 152 例。可算出两种方法检测抗-CCP 抗体,阴性符合率为 100.00%,阳性符合率为 99.33%,总符合率为 99.67%。*Kappa* 值等于 0.96,两种方法具有高度的一致性,见表 2。

表 2 300 例血清标本 ELISA 法和 GICA 法检测结果比较(*n*)

方法		ELISA 法		合计
		阳性	阴性	
GICA 法	阳性	148	0	148
	阴性	2	150	152
合计		150	150	300

2.3 GICA 法重复性 由表 3 可见,用 GICA 法重复检测 10 次高浓度值,10 次均为阳性,阳性率为 100%;重复 10 次检测低浓度值,阳性 6 次,阴性 4 次,阳性率为 60%。

表 3 抗-CCP 抗体 GICA 法重复性试验结果

检测项目	阳性(次)	阴性(次)	阳性率(%)	阴性率(%)
高浓度值	10	0	100	0
低浓度值	6	4	60	40

3 讨 论

目前临床上检测抗-CCP 抗体多采用 ELISA 法,其特异性和敏感性都比较高,但 ELISA 法需时较长,其最主要的原因是由于液相中的抗原或抗体需经扩散才能与固相上的抗体或抗原发生反应,此外还有包括标记抗原、抗体过程,进行酶或荧光标记过程等。根据此特性,如果在基层医疗单位、单个应急标本检测或者临床实验室人员配备不足等情况下,ELISA 法就显得操作过程繁琐,检测时间长,不适合常规操作,较难以实行。而 GICA 法具有简单、快速、准确和无污染等优点。可单份测定,特别适合标本量少、人手紧张、设备有限的中小医院广泛使用,便于临床推广。

本研究以 ELISA 法作为参考方法,与 GICA 法进行比较,研究结果显示两种方法一致性良好。此外,GICA 法检测 150 例阳性标本,有 2 例呈弱阳性,ELISA 法检测值分别为 53.6 RU/mL 与 56.7 RU/mL,而 GICA 法未能有效检测出,说明 GICA 法可能有假阴性产生。所以临床应用过程中,要结合临床症状,综合分析。

GICA 法重复性试验显示,高值浓度标本重复性为 100%,说明用该方法检测浓度较高的结果准确性较一致。而对低值浓度的标本,用该方法检测,却不一定能得到一致结果。这也是定性试验的缺陷。临界值附近浓度的标本可出现假阳性或假阴性的结果。自 20 世纪 70 年代初,GICA 法被建立并开始逐步作为一种免疫标记技术在各个领域使用。各种金标检测条、检测卡开始被广泛应用。这说明 GICA 法的特异性、重复性和稳定性均得到广泛认可,只是敏感性较 ELISA 法略差。主要还是因为它们检测限的差异,GICA 法为 1.0 ng/mL,而 ELISA 法可以准确到 0.5 ng/mL,这是造成误差的主要原因之一。

抗-CCP 抗体作为 RA 早期诊断的金标准,在临床上的运用也越来越广泛。大量研究已证实了抗-CCP 抗体对 RA 具有高特异性,有助于与其他风湿性疾病相区别^[9-10]。抗-CCP 抗体不但能及早提示 RA 的发病,且对已明确诊断的 RA 患者,和其他自身免疫性疾病患者,检测抗-CCP 抗体也是有临床意义的,它的阳性可能提示患者易发生或已发生骨侵蚀破坏,治疗时,应注重联合治疗,且预后效果往往较差。因此,常规体检,尤其是中老年人的体检可以在原有血清学检测项目中加入抗-CCP 抗体检测,以达到早筛查、早诊断、早预防(下转第 87 页)

果数据准确,确保有临床实际价值,避免荒诞数据报出。

AMR 必须至少每年验证 2 次,在仪器大修、更换试剂厂家或批号改变时就要求重新验证^[12]。如果验证未通过,应认真总结,分析原因,重做实验,看是否上限不行需要降低或延伸,还是下限不行需要确定系统低值的精密度。若有需要,应寻求技术支持以更好地解决问题。

EP6-A 指南采用多项式回归分析^[13],更优于 EP6-P 方案,是目前公认的分析测量范围评价中最好的统计学方法。EP6-A 指南推荐用高值和低值浓度的样本按比例精确配成等间距的不同浓度样本,但等间距不是必需的,只要知道各样本间的关系,用配成特殊浓度的样本也可以作为验证的材料。

本次实验顺序为最大稀释度试验、功能灵敏度试验、线性试验。用最大稀释倍数去稀释样本来指导功能灵敏度试验、线性试验。本次试验得到的结果为:最大允许稀释度为(1:16),功能灵敏度为(2.0 U/L),分析测量范围在 2.0~1 000 U/L 之间呈良好线性,与厂家声明基本相符,最终得出本实验室的检测系统 CK 项目的临床可报告范围为 2.0~16 000 U/L。

参考文献

[1] 严海忠,王伟佳,张秀明,等. 化学发光免疫法检测 BNP 的分析测量范围和临床可报告范围研究[J]. 现代检验医学,2011,26(1):40-45.

[2] 姚少羽,孙艳虹,高玲,等. Vitros950 生化检测系统最大稀释度测定[J]. 中国实用医药,2008,34(1):31-34.

[3] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验

医学杂志,2007,30(2):143-145.

[4] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[J]. 2 版. 上海:科学技术文献出版社,2009:115.

[5] CLSI. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures[S]. Wayne,PA:CLSI,2003.

[6] Jhang JS,Chang CC,Fink DJ,et al. Evaluation of linearity in the clinical laboratory[J]. Arch Pathol Lab Med,2004,128(1):44-48.

[7] 李俊立,彭长华,王昌富,等. BACKMAN LX20 生化检测系统 ALT 可报告范围的评价[J]. 现代检验医学杂,2010,25(1):71-73.

[8] 潘超,王文龙. 定量检测分析测量范围(AMR)验证. 论文汇编(第五届全国临床实验室管理学术会议):258-259.

[9] 金丕焕. 医学统计学[M]. 2 版. 上海:复旦大学出版社,2006.

[10] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:58-73.

[11] 张秀明,庄俊华,郑松伯,等. 临床化学发光免疫检测测定 AFP 的分析性能验证与实验方法[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(11):70-765.

[12] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:289-297.

[13] 周琦,李少男,李小鹏,等. 利用美国临床实验室标准化委员会 EP6-A 指南判定线性[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(1):1256-1260.

(收稿日期:2013-10-15)

(上接第 84 页)

防、早治疗及改善预后的目的。

通过对两种方法学的比较,发现 GICA 法检测抗-CCP 抗体,性能可靠,操作简便、快速,完全能够满足对 RA 的初步筛查,值得在临床上推广使用。

4 结 论

GICA 法作为一种简单又有效的方法,能很好地提高临床实验室操作人员的工作效率,并能节约成本。根据本次实验研究发现,GICA 法的敏感性略差,有待进一步提高,同时建议厂家对试剂加以改进,使其受客观因素的影响降到最低,这将更有利于 GICA 法在实际工作中的应用。ELISA 法具有特异性强、敏感性高、可信度高的特性,临床确诊检查应首选 ELISA 法。同时,笔者建议根据实际情况,将两种方法联合起来,特别是在大批量检测时可用 GICA 法作为初筛,对疑似患者或者需要确诊的患者进行 ELSIA 法检查。这样可以大量地节约时间,并且能更快速、准确地为患者服务。

参考文献

[1] Scott DL,Pugner K,Kaarela K,et al. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford),2008,47(2):122-132.

[2] Bukhari M,Harrosiont B,Lunt M,et al. Prospective community-based study[J]. Anhritis Rheum,2001,44(10):1248-1253.

[3] 许亚辉. 免疫学检验现状与发展[J]. 现代中西医结合杂志,2005,

14(19):2609-2611.

[4] Bejarno V,Quinn M,Conaghan PG,et al. Effect of the early use of the anti-tumor necrosis factor adalimumab on the prevention of job loss in patients with early rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,2008,59(10):1467-1474.

[5] 谢其冰,刘钢,王兰兰,等. 抗环瓜氨酸肽抗体在类风湿关节炎诊断中的意义及对关节侵蚀预测的价值[J]. 中华风湿病学杂志,2004,8(6):356-358.

[6] 曾小峰,艾脉兴,甘晓丹,等. 抗环瓜氨酸肽抗体检测在类风湿关节炎中的意义[J]. 中华风湿病学杂志,2008,12(2):281-284.

[7] Schellekens GA,Visser H,de Jong BAW,et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide[J]. Arthritis Rheum,2008,51(2):155-163.

[8] Schellekens GA,de Jong BA, Van den Hoogen FHJ,et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies[J]. J Clin invest,2007,101(2):273-281.

[9] Schellekens GA,Visser H,De Jong BA,et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide[J]. Arthritis Rheum,2008,51(1):155-163.

[10] Bizzaro N,Mazzanti G,Tonutti E,et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis[J]. Clin Chem,2011,47(6):1089-1093.

(收稿日期:2013-09-28)