

· 论 著 ·

免疫比浊法测定抗环瓜氨酸肽抗体的临床应用

陈浩全¹, 曾曼妮²

(1. 广西壮族自治区玉林市中西医结合骨科医院检验科 537000;
2. 广西壮族自治区玉林市第一人民医院检验科 537000)

摘要:目的 评价免疫比浊法检测抗环瓜氨酸肽抗体(CCP)在类风湿关节炎(RA)诊断中的临床价值。方法 收集 195 例 RA、105 例骨关节炎、52 例骨质疏松、42 例结缔组织、40 例系统性红斑狼疮、305 例其他疾病患者,以及 90 例健康对照者的血清标本,分别使用免疫比浊法(Latex)、化学发光微粒子免疫法(CMIA)、酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测 CCP 并比较结果。**结果** Latex 法检测 RA 阳性 141 例(72.30%),关节炎阳性 54 例(51.42%),骨质疏松阳性 15 例(28.84%),结缔组织阳性 15 例(35.71%),系统性红斑狼疮阳性 18 例(45.0%),其他疾病阳性 11 例(3.60%),90 例健康对照者均为阴性。批内变异系数为 1.9%~2.0%,总变异系数为 2.0%~2.1%,Latex 法试剂线性范围为 0.8~100 U/mL。Latex 法、CMIA 法、ELISA 法检测 CCP 的敏感性和特异性差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** Latex 法检测 CCP 的敏感性和特异性好,线性范围宽,可用于临床。

关键词:免疫比浊法; 类风湿关节炎; 抗环瓜氨酸肽抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)20-2857-03

The clinical application to detect the anti cyclic citrullinated peptide antibody by immune Turbidimetry

CHEN Haoquan¹, ZENG Manni²

(1. Department of Laboratory, Orthopaedics Hospital of Yulin City, Yulin, Guangxi 537000, China;

2. Department of Laboratory, the First People's Hospital of Yulin, Yulin, Guangxi 537000, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical application value of anti cyclic citrullinated peptide antibody(CCP) by immune turbidity method for the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The serum of 195 cases of RA patients, 105 cases of osteoarthritis, 52 cases of osteoporosis, 42 cases of connective tissue, 40 patients with systemic lupus erythematosus, 305 cases of patients with other diseases and 90 cases of healthy controls were collected, the CCP were detected by latex CMIA and ELISA. **Results** The CCP positive were 141 cases in RA(72.30%), 54 cases(51.42%) in arthritis, 15 cases in osteoporosis (28.84%), 15 cases in connective tissue(35.71%), 18 cases (45.0%) in systemic lupus erythematosus (SLE), 11 cases (3.60%) in other diseases. There were negative in 90 cases of healthy controls. The variation coefficient was 1.9%~2.0%, and the total coefficient of variation was 2.0%~2.1%. The linear range of Latex method was divided into 0.8~100 U/mL. There were no difference in the sensitivity and specificity of detection to CCP by CMIA, ELISA and Latex. **Conclusion** The sensitivity and specificity of detection to CCP by Latex was good, and there was wide linear range.

Key words: immunoturbidimetry; rheumatoid arthritis; anti cyclic citrullinated peptide antibody

类风湿关节炎(RA)是一种自身免疫疾病,其基本病理改变为滑膜炎,由于关节滑膜炎性和增生,造成关节软骨、骨、滑膜破坏,最终导致关节畸形和功能丧失。关节滑膜的破坏可在 RA 发病 3 个月内出现,若未及时治疗,部分患者可在 2 年内出现不可逆的骨质破坏。因此 RA 的早期诊断极其重要。RA 的诊断依据主要是临床表现、X 光线检查、类风湿因子(RF)检测^[1-2]。但 RA 早期症状隐匿,符合上述标准时患者已出现骨关节损坏,且 RF 在其他自身免疫性疾病中也有一定的阳性率,不利于 RA 的早期诊断和干预治疗。近年来,抗瓜氨酸化蛋白抗体(ACPAs)系列的发现是 RA 诊断领域新的里程碑,ACPAs 在 RA 的鉴别诊断和病情监测中发挥重要作用^[3-4]。在不典型 RA 患者,尤其是早期和老年 RA 患者,ACPAs 具有重要的诊断意义^[5]。目前抗环瓜氨酸肽抗体(CCP)检测多采用实验时间较长的酶联免疫吸附试验法(ELISA)法,现应用免疫比浊法(Latex)测定 CCP 抗体,通过与化学发光微粒子免疫法(CMIA)和 ELISA 法比较,评价其在 RA 中的诊断价值及优势。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取该院 2014 年 2 月至 2016 年 2 月的住院

和门诊患者,所有病例均符合 1987 年美国风湿病学学会(ACR)的 RA 分类诊断标准。RA 患者 195 例,骨关节炎患者 105 例,骨质疏松患者 52 例,结缔组织患者 42 例,系统性红斑狼疮患者 40 例,其他疾病患者(无自身免疫性疾病及风湿病史)305 例。健康对照者 90 例,均为该院体检中心体检健康者,且无自身免疫性疾病及风湿病史。

1.2 仪器与试剂 采集所有研究对象的血清标本,2~8 °C 保存,1 周内完成检测。Latex 法采用德国西门子 ADVIA 2400 自动生化仪及宁波美康试剂盒;ELISA 法使用北京普朗酶标仪及德国欧蒙生物酶联免疫试剂盒;CMIA 法应用美国雅培 i2000 自动化学发光仪及雅培配套试剂盒。

1.3 检测方法

1.3.1 3 种检测方法判断标准 Latex 法检验结果大于或等于 35 U/mL 为阳性,小于 35 U/mL 为阴性。ELISA 法 OD < 0.8×OD 临界质控为阴性;0.8×OD 临界质控:OD > 1.2×OD 临界质控为可疑,OD > 1.2×OD 临界质控为阳性。CMIA 法检验结果大于或等于 5 U/mL 为阳性,小于 5 U/mL 为阴性。

1.3.2 精密度评价 依据 CLSI EP15-A 文件标准^[6],Latex

法试剂分别测定高、低2个水平(浓度约11、85 U/mL)的混合血清,连续检测5 d,第5天测4次。计算各水平的批内及总变异系数(CV%),并确认其不精密度范围是否与厂商标注的相符合。

1.3.3 线性范围 采用1例低浓度混合血清(L)和1例高浓度混合血清(H)及生理盐水(S),按0.25L;0.75S;0.5L;0.5S、1.0L、0.1H;0.9L、0.2H;0.8L、0.3H;0.7L、0.4H;0.6L、0.5H;0.5L、0.6H;0.4L、0.7H;0.3L、0.8H;0.2L、0.9H;0.1L、1.0H,配成13个浓度梯度的混合血清。其预期浓度按公式: $X=(CL\times VL+CH\times VH)/(VL+VH)$ 计算。使用Latex法试剂对混合血清按浓度从低到高各测3次,记录结果。按照CLSI EP6-A文件标准初步检查数据^[7],检查离群值,判断重复性,进行多元线性回归,将结果分别拟合1、2、3次多项式,并绘制散点图进行评价。

表1 3种方法检测 CCP 抗体的敏感性和特异性结果比较[n(%)]

疾病分类	n	Latex 法		CMIA 法		ELISA 法	
		阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)
类风湿关节炎	195	54(27.69)	141(72.31)	53(27.17)	142(72.83)	55(28.20)	144(71.80)
关节炎	105	51(48.58)	54(51.42)	48(45.71)	57(44.29)	50(47.62)	55(42.38)
骨质疏松	52	37(71.16)	15(28.84)	41(78.85)	19(21.15)	39(75.00)	17(25.00)
结缔组织病	42	27(64.29)	15(35.71)	29(69.05)	13(30.95)	30(71.43)	12(28.57)
红斑狼疮	40	22(55.00)	18(45.00)	24(60.00)	26(40.00)	23(57.50)	27(42.50)
其他疾病	305	294(96.39)	11(3.61)	296(97.04)	9(2.96)	292(95.74)	13(4.26)
健康对照	90	84(93.30)	6(6.70)	88(97.70)	2(2.30)	85(94.40)	5(5.60)

2.3 精密度试验 Latex法试剂的实测精密度小于试剂盒标注的精密度,变异较小,可满足临床应用。见表2。

表2 Latex法试剂的精密度试验

标本	重复 次数	平均检测值 (U/mL)	批内		批间		总 CV (%)
			SD	CV(%)	SD	CV(%)	
低值血清	20	11.0	0.21	1.9	0.23	2.1	2.0
高值血清	20	85.0	1.7	2.0	1.87	2.2	2.1
试剂盒声明							
低值					2.3	2.5	
高值					2.5	2.7	

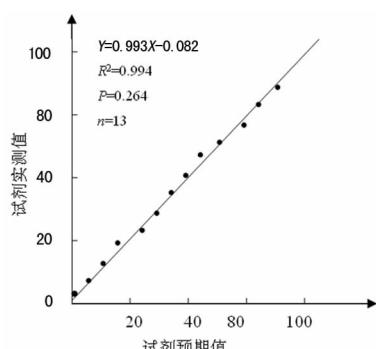


图1 Latex法试剂线性范围评价(U/mL)

2.4 线性范围评价 Latex法检测标本浓度范围为0.8~100 U/mL,无明显离群值数据,最佳拟合为一次多项式。Pearson相关性分析显示,预期值与实测值拟合相关方程中b值为

1.4 统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较使用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3种方法检测的符合率结果比较 30例确定为阳性的标本(印迹法确认),Latex法检测阳性28例(93.3%),CMIA法检测阳性29例(96.6%),ELISA法检测阳性27例(90.0%)。30例确认阴性的标本,Latex法检测阴性28例(93.3%),CMIA法检测阴性29例(96.7%),ELISA法检测阴性28例(93.3%)。3种方法的符合率为90.0%。

2.2 3种方法检测 CCP 抗体的敏感性和特异性结果比较 3种方法检测抗 CCP 抗体的敏感性和特异性比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

0.95~1.02,a 与 0 无显著性差异, $P=0.264$,相关系数(R^2)为0.994,均大于0.975,线性范围良好。见图1。

3 讨论

Schellekens将1条由19个氨基酸残基组成的瓜氨酸肽链中的2个丝氨酸替换为半胱氨酸,形成与 β -转角具有相似结构的二硫键,合成CCP。抗 CCP 抗体阳性率仅略高于 RF,可能是由于环瓜氨酸多肽是在微丝蛋白及其他类似于波形蛋白结构的基础上人工合成的多肽抗体,比波形蛋白小20倍,抗原决定簇较少,减弱其抗原性,但其特异性可达95%以上^[8]。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^[9]。本研究应用Latex法检测 CCP 抗体,通过与 CMIA 法和 ELISA 法比较,其敏感性及特异性差异无统计学意义($P>0.05$),3种方法的符合率为90.0%,Latex法试剂精密度高,批内变异系数为1.9%~2.0%,总变异系数为2.0%~2.1%;线性范围宽(0.8~100 U/mL),能在全自动生化仪上进行快速检测,值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 叶荻庆,唐静.67例临床标本ANA和RF测定结果分析[J].现代医药卫生,2003,19(12):1517-1518.
- [2] 鲁然.风湿性关节炎的实验室研究与进展[J].中国误诊学杂志,2004,4(6):846-847.
- [3] Cordonnier C,Meyer O,Palazzo E,et al. Diagnostic value of antiRA33 antibody antikeratin antibody,antiperinuclear factor and antinuclear antibody in early (下转第2861页)

辐射等不良生活环境下的时长;不良体质指数等均有关系^[9]。

有研究显示,3%的健康者和12%不育患者存在UU生殖道感染^[10]。目前关于UU引起生殖道感染的研究较多,而较标本量针对生育前UU感染对精液质量影响的研究较少,大多研究发现UU感染引起的生殖道炎性影响精液质量,是引起不育的重要病因^[11-14]。这可能与其能够附着在精子表面,能从形态学上改变从而使精子的活力、运动能力降低及精子畸形率上升而引发不育有关^[15]。本研究43.55%有UU生殖道感染,而UU阳性组的精液酸碱度、精浆锌、精子浓度、精子总数、活动精子总数、A级精子率、A+B级精子率、精子总活力、精浆酸性磷酸酶、精浆 α -糖苷酶及精浆果糖均显著低于UU阴性组($P<0.01$)。提示UU生殖道感染显著影响男性生育力,除了其通过自身途径影响精子,还可能会破坏附属性腺、降低精浆酶活性、降低精浆锌含量,而这些都与精液质量相关^[16]。说明UU生殖道感染可能同时通过破坏附属性腺功能、降低精浆酶活性、降低精浆锌的途径进一步影响男性生育力。

精液检查是评价男性生育能力的重要评估手段,尤其处于非20~29岁、长期暴露在不良生活环境、生活习惯低下的男性,特别需要重视。除了精液常规检查外,UU感染不容忽视,一旦发现其治疗便成为恢复男性生育功能的重要前提。夫妻双方孕前检查对于我国优生优育工作有着重要作用,如何更好、更精准地提供男性生育保健服务,这需要更多大标本、纵向研究提供依据,这可能也是今后研究的方向之一。

参考文献

- [1] 张树成,王洪毅.1981~1996年我国有生育力男性精液质量的变化分析[J].生殖与避孕,1999,19(1):27-33.
- [2] 李维娜,朱文兵,唐章明,等.16 835例中国不育男性的精液质量分析[J].中南大学学报(医学版),2014,39(2):157-160.
- [3] 黄春研,姚陈均,王春,等.1985~2008年间我国正常男性精液质量变化分析[J].中华男科学杂志,2010,16(8):684-688.
- [4] Iams JD,Berghella V. Care for women with prior preterm birth[J]. Am J Obstet Gynecol,2010,203(2):89-100.
- [5] 童传良,范国华,曹长生,等.上海地区535例孕前检查正常男性精液质量调查[J].中国男科学杂志,2010,24(1):

(上接第2858页)

- rheumatoid arthritis comparison with rheumatoid factor [J]. Br JR heumato,1996,35(7):620-624.
- [4] Youinou P, Serre G. The antiperinuclear factor and antikeratin antibody Systems[J]. Int Arch Allergy Immunol,1995,107(4):508-518.
- [5] Vangaaen FA. Testing for antibodies to cyclic citrullinated peptides and Rheumatoid factor-what is best for early RA[J]. Nat Clin Pract Rheumatol,2007,3(9):488-489.
- [6] CLSI. EP15-A User demonstration of performance for preaccuracy[S]. Wayne,PA:CLSI,2001.
- [7] CLSI. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures[S]. Wayne,PA:CLSI,2003.

31-34.

- [6] 杨东,鲜红,腾文顶,等.836例成都市育龄男性精子质量分析[J].四川医学,2009,30(12):1887-1889.
- [7] 阮衍泰,潘连军,赵丹,等.南京市孕前健康体检男性精液质量及其影响因素的初步调查分析[J].中华男科学杂志,2015,21(2):144-148.
- [8] Buck-Louis GM, Sundaram R, Schisterman EF, et al. Semen quality and time to pregnancy: the Longitudinal Investigation of Fertility and the Environment Study[J]. Fertil Steril,2014,101(2):453-462.
- [9] 卢慧,施文博,刘勇,等.上海地区正常生育力男性精液参考值初探[J].中华男科学杂志,2012,18(5):400-403.
- [10] Zeighami H, Peerayeh SN, Safarlu M. Detection of Ureaplasma urealyticum in semen of infertile men by PCR [J]. Pak J Biol Sci,2007,10(21):3960-3963.
- [11] Salmeri M, Valenti D, La Vignera S, et al. Prevalence of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in unselected infertile men[J]. J Chemother,2012,24(2):81-86.
- [12] Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples[J]. J Androl,2008,29(2):198-206.
- [13] Wang Y, Liang CL, Wu JQ, et al. Do ureaplasma urealyticum infections in the genital tract affect semen quality [J]. Asian J Androl,2006,8(5):562-568.
- [14] 陈欣欣,周弛,寸金涛.1 621例不孕不育患者生殖道分泌物支原体感染及药敏分析[J].云南医药,2014,35(6):635-638.
- [15] 黄茂萍,吴爱娟,钟备.探讨男性不育症患者解脲支原体、沙眼衣原体感染与精子质量的关系[J].检验医学与临床,2013,10(2):37-40.
- [16] 王瑞,张卫星,郑涛,等.不育男性精浆酸性磷酸酶和锌与精液参数分析[J].中华男科学杂志,2006,12(1):36-38.

(收稿日期:2016-03-27 修回日期:2016-05-22)

-
- [8] Coenen D, Verschueren P, Westhovens R, et al. Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis[J]. Clin Chem,2007,53(3):498-504.
 - [9] Barra L, Pope J, Bessette L, et al. Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anticyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review[J]. Rheum Atiology (Oxford),2011,50(2):311-316.

(收稿日期:2016-03-12 修回日期:2016-06-21)