

胶乳增强免疫比浊测定抗 CCP 抗体试剂性能验证*

胡江红,袁平宗[△],汤雪彪,张 伟

(内江市第二人民医院检验科,四川内江 641100)

摘要:目的 评价胶乳增强免疫比浊法(PETIA)抗环瓜氨酸肽抗体(抗 CCP 抗体)试剂的检测性能及对类风湿关节炎(RA)患者的临床诊断价值。**方法** 根据测定条件对 PETIA 测定抗 CCP 抗体试剂盒精密度、准确度、线性、稳定性及特异性等进行性能验证评价。选取 63 例血清类风湿因子(RF)阳性的 RA 患者为 RA 患者组,61 例体检健康者为对照组,测定血清抗 CCP 抗体,并对结果进行统计分析。**结果** 日内最大变异系数(CV)为 6.73%,日间最大 CV 为 7.36%;高低不同水平准确性实验,最大偏差绝对值为 6.10%;水平在 0~1 020.00 U/L 间呈线性关系($Y=0.950\ 3X+1.117\ 5, r^2=0.999\ 9$);开瓶第 27 天检测结果绝对偏差 $<10.00\%$;三酰甘油水平为 12.5 mmol/L,胆红素水平为 420 $\mu\text{mol/L}$;血红蛋白水平为 49 g/L 时无显著干扰。RA 患者组血清抗 CCP 抗体水平为 $(52.31\pm 37.53)\text{U/mL}$,对照组血清抗 CCP 抗体水平为 $(20.48\pm 6.48)\text{U/mL}$,对照组阳性率明显低于 RA 患者组阴性率,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PETIA 法测定抗 CCP 抗体重复性好,线性宽,准确性高,抗干扰能力强,其检测结果可作为诊断 RA 的重要依据。

关键词: 抗环瓜氨酸肽抗体; 胶乳增强免疫比浊法; 性能验证; 类风湿因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.21.014

中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2018)21-2645-04

文献标识码:A

Anti-CCP antibody reagent performance verification of latex enhanced immunoassay*

HU Jianghong, YUAN Pingzong[△], TANG Xuebiao, ZHANG Wei

(Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641100, China)

Abstract: Objective To evaluate the detection performance and clinical diagnosis and application of latex enhanced immunoturbidimetry (PETIA) anti-cyclopanine peptide antibody (anti-CCP) reagent and the clinical diagnosis of rheumatoid arthritis (RA). **Methods** The precision, accuracy, linearity, stability and specificity of anti-CCP antibody kit were evaluated by PETIA with reference to measurement conditions. At the same time, 63 RA patients with positive serum rheumatoid factor (RF) were selected as the patient group and 61 healthy people as the control group. The serum anti-CCP antibody was determined and the results were statistically analyzed. **Results** The maximum CV in the day was 6.73% and the maximum CV during the day was 7.36%. The maximum deviation absolute value of experiment on the accuracy of different concentrations was 6.10%. The concentration was linear in 0~1 020.00 U/L ($Y=0.950\ 3X+1.117\ 5, r^2=0.999\ 9$). The absolute deviation of test results in the 27th day test was $<10.00\%$. The level of TG was 12.5 mmol/L, and the level of BIL was 420 $\mu\text{mol/L}$. When the Hb level was 49 g/L, there was no significant interference. The serum anti-CCP antibody level of RA patients was $(52.31\pm 37.53)\text{U/mL}$, and that of control group was $(20.48\pm 6.48)\text{U/mL}$, the positive rate of control group was significantly lower than that of RA patients ($P<0.05$). **Conclusion** PETIA has good repeatability, wide linearity, high accuracy and strong anti-interference ability. The results of PETIA can be used as an important basis for the diagnosis of RA.

Key words: anti cyclic citrullinated peptide antibody; latex enhanced immunoturbidimetric assay; performance verification; rheumatoid factor

类风湿关节炎(RA)是以关节滑膜慢性炎症为主的自身免疫性疾病,早期诊断、对症治疗对 RA 患者

* 基金项目:国家高技术研究发展计划“863 计划”资助项目(2014AA023304)。

作者简介:胡江红,女,副主任技师,主要从事临床生化检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: ypz123@126.com。

本文引用格式:胡江红,袁平宗,汤雪彪,等.胶乳增强免疫比浊测定抗 CCP 抗体试剂性能验证[J].国际检验医学杂志,2018,39(21):

意义重大^[1-3],后期致残率较高,会导致关节畸形及功能丧失^[4-5]。2010 年美国风湿病学会(ACR)和欧洲抗风湿联盟(EULAR)共同将抗环瓜氨酸肽抗体(抗 CCP 抗体)列入 RA 诊断标准之列^[6-7]。目前,临床实验室检测抗 CCP 抗体的方法主要有酶联免疫吸附试验、胶乳增强免疫比浊法(PETIA)、化学发光法、免疫荧光分析法及电化学发光法等^[8],不同检测方法间存在较大差异。本研究根据笔者所在实验条件,采用 PETIA 在贝克曼 AU5811 生化分析仪上进行抗 CCP 抗体测定,并对其检测性能进行评价。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 RA 患者组选取 2017 年 8—12 月该院 RA 患者 63 例,男 19 例,女 44 例,年龄 22~85 岁,平均(55.06±14.03)岁;对照组选用同期体检健康者 61 例,男 20 例,女 41 例,年龄 23~85 岁,平均(53.23±14.82)岁。所有研究对象抽取空腹血 4.0 mL,3 000 r/min 离心 5 min 取血清进行上机检测。

1.2 RA 诊断标准 ACR/EULAR 2009 年的 RA 诊断标准^[9]:受累关节数及大小情况,血清学类风湿因子(RF)、CCP 抗体反应,滑膜炎持续时间,急性时相反应物 C 反应蛋白(CRP)、红细胞沉降率(ESR)反应等 4 方面打分,总得分 6 分以上可确诊 RA。

1.3 试剂及校准品 抗 CCP 抗体试剂盒由宁波美康生物科技股份有限公司提供,校准品批号:20170328,水平分别为:0、125、250、500、1 000 U/mL。

1.4 仪器 贝克曼 AU5811 生化分析仪,测定参数按试剂盒使用说明书设置。

1.5 性能验证

1.5.1 精密度评价 参照美国临床和实验室标准协会(CLSI) C28-A2 方案^[10],批内精密度:取高、低水平新鲜血清各重复测定 20 次,计算其标准差(SD)、变异系数(CV)值。日间精密度:取高、低临床新鲜血清重复测定 2 次直至 20 d;计算其 SD、CV 值。混合血清需-20℃冰冻保存,使用前置于室温融化后并彻底混匀后使用。

1.5.2 准确度评价^[11] 采用回收实验进行准确度评价。

1.5.3 线性评价 参照 CLSI EP-6 方案^[12]。取高水平样本,通过稀释模式(生理盐水)制备成一系列水平样本。最高水平应超过或等于范围的限值,水平个数不少于 5 个。每个水平的样本进行测定,重复 2 次,测得的水平平均值与对应理论水平进行线性回归分析,求相关系数 r 。

1.5.4 特异性评价 参照 CLSI EP7-P 方案^[13],取 1 份抗 CCP 抗体水平为 125 U/mL 标本分成 3 份,分别加入高水平三酰甘油(TG)、血红蛋白(Hb)、胆红素(BIL)等干扰物,用本法测定。

1.5.5 参考范围验证 参照 CLSI EP7-P 方案^[14],收集 20 例以上非 RA 患者进行验证,最多只能有

10%的结果落在 0~35 U/mL 范围以外。

1.5.6 稳定性评价 试剂开瓶第 1 天,试剂进行校准后对高、低值质控品或临床混合血清同时测定 10 次,并分别确定高、低值质控品的均值。然后按确定的时间测定样本,直至连续 3 次的结果超出均值的±10%。混合血清需-20℃冰冻保存,使用前置室温融化后并彻底混匀后使用。判断开瓶稳定性指标:以高、低临床样本连续 3 次结果超出均值±10%的第 1 次超出为失控天数。

1.6 结果判断 血清抗 CCP 抗体 PETIA 法 >45 U/mL 为阳性,36~45 U/mL 为可疑。

1.7 统计学处理 采用 SPSS21.0 及 EXCEL 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验,计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度 取含抗 CCP 抗体水平为 10.09、123.91 U/mL 2 个水平的血清各 2 份,其中 1 份 1 d 内连续重复测定 20 次,另一份血清重复测定 2 次直至 20 d。不精密度在厂家允许范围 <10.00% 内。其结果见表 1。

表 1 不精密度实验测定结果(%, $n=20$)

血清水平(U/mL)	批内 CV	批间 CV
10.09	6.73	7.36
123.91	5.75	6.76

2.2 准确性 将把抗 CCP 抗体水平为 152.00 U/mL 血清分成 3 份,分别加入含抗 CCP 为 65.00、204.00、325.00 U/mL 的血清(按原血清与加入血清比 9:1 混合)用本法重复 5 次测定,回收率分别为 93.7%、103.1%、106.1%。在厂家允许偏差绝对值 <20.00% 内。见表 2。

表 2 回收实验测定结果

加入血清水平(U/mL)	加入后水平(U/mL)	回收水平(U/mL)	回收率(%)
62.00	143.00	134.00	93.7
204.00	157.20	162.10	103.1
325.00	169.30	179.60	106.1

2.3 线性 将抗 CCP 抗体水平为 1 020.00 U/mL 新鲜标本分装成 5 份与生理盐水,分别按 0:1、1:3、1:1、3:1、1:0 比例配制成 0.00、127.50、255.00、510.00、1 020.00 U/mL 等 5 个不同水平,从低水平到高水平顺序检测 1 次,再从高水平到低水平顺序检测 1 次,计算 2 次平均值,结果显示,抗 CCP 抗体水平在 1 020.00 U/mL 以内具有良好的线性,以 X 作为理论值, Y 作为测定值进行回归分析, $Y=0.950 3X+1.117 5$, $r^2=0.999 9$ 。结果见图 1。

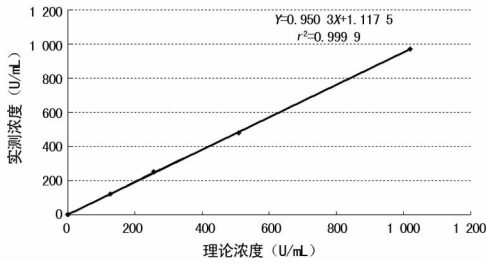


图 1 PETIA 法检测抗 CCP 抗体线性范围验证图

2.4 特异性 取一份抗 CCP 抗体水平为 125.00 U/mL 标本分成 3 份,分别加入含 TG 12.5 mmol/L, Hb 48 g/L, BIL 420 μmol/L 的标本,用本法测定。结果表明当 TG ≤ 12.5 mmol/L, Hb ≤ 48 g/L, BIL ≤ 420 μmol/L 时,对检测结果均无显著干扰 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

表 3 抗 CCP 抗体测定干扰试验测定结果

干扰物质	干扰物水平	测定结果 (U/mL)	干扰物偏差 (%)	<i>t</i>	<i>P</i>
TG (mmol/L)	12.5	134.8	7.84	5.34	<0.05
Hb (g/L)	48	117.9	-5.68	6.53	<0.05
BIL (μmol/L)	420	130.2	4.16	15.36	<0.05

2.5 稳定性 将抗 CCP 抗体水平为 10.32 U/mL 的标本分装 30 份,试剂开瓶后每天检测 1 份,重复做 2 次,计算平均值,至第 27 天检测结果偏差均小于 -10.00%,第 28、29、30 天的检测结果偏差为 -10.05%、-10.53%、-11.42%,均在厂家允许偏差绝对值 < 20.00% 内。

2.6 参考范围 厂家提供的参考值范围: > 45 U/mL 为阳性, 36 ~ 45 U/mL 为可疑。收集 61 例体检健康人群进行验证,最多只能有 10.00% 的结果落在此范围以外,根据 61 例参考人群检测结果,有 58 例结果在 0 ~ 35 U/mL, 3 例在 36 ~ 45 U/mL。其医学决定水平,临床医生应根据实验结果、临床资料及其他检查综合分析为准。

2.7 RA 患者与对照组阳性率比较 RA 患者组血清抗 CCP 抗体水平为 (52.31 ± 37.53) U/mL, 对照组血清抗 CCP 抗体水平为 (20.48 ± 6.48) U/mL, 对照组阳性率明显低于 RA 患者组阳性率,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其结果见表 4。

表 4 RA 患者与对照组阳性率比较

组别	<i>n</i>	阳性 (<i>n</i>)	阴性 (<i>n</i>)	阳性率 (%)
RA 患者组	63	60	3	95.23
对照组	61	5	56	8.20*

注: RA 患者组与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

实验室使用新检测系统检测患者标本前,必须在实验室的具体条件下,验证检测系统分析性能。只有

检测系统分析性能与厂家提供资料一致,各项性能指标在允许范围内才可以用于临床常规检测。本试剂盒采用 PETIA 法,更新了试剂配方,在 AU5811 生化分析仪上测定抗 CCP 抗体水平在 1 020.00 U/mL 以内具有良好的线性 ($r^2 = 9.999$),线性从原来的 100.00 U/mL 增加至 1 020.00 U/mL; 准确度实验偏差 6.10%,在试剂厂家允许偏差绝对值 < 20.00% 范围内; 高低 2 种水平日内和日间不精密度最高为 7.36%,小于试剂厂家允许 $CV < 10.00%$; 试剂开瓶后 30 d 检测最大偏差为 -10.82%,在厂家允许偏差绝对值 < 20.00%,开瓶 1 个月内稳定性较好; 当加入含 TG 12.5 mmol/L、Hb 48 g/L、BIL 420 μmol/L 干扰物时,其测定结果均无显著干扰 ($P > 0.05$)。

4 结论

PETIA 法是以血清中的抗 CCP 抗体与 CCP 抗原胶乳颗粒发生抗原抗体反应产生浊度,通过测定其浊度变化对照校准曲线算出血清中抗 CCP 抗体水平。本法准确性好,线性宽,重复性佳,特异性高,检测速度快,操作方便,自动化程度高。

参考文献

- [1] 张梅,黄延峰,梁大立,等. 抗 CCP 抗体、RF、CRP 和 ESR 检测在 RA 诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(4): 447-449.
- [2] 徐瑞香,刘喙,王文灏,等. 滑液多种抗体检测诊断类风湿关节炎的临床价值[J]. 中华风湿病学杂志, 2015, 19(4): 246-248.
- [3] 吕志文,谢雄, GPI, 抗 CCP 联合检测在类风湿关节炎诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(19): 2765-2767.
- [4] 刘童,李兴锐,徐胜前. 抗环瓜氨酸肽抗体和类风湿因子双阳性类风湿性关节炎患者临床资料分析[J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(22): 9967-9971.
- [5] 贾淑芳,周琳瑶,裴莉,等. 探讨抗 CCP 抗体在类风湿关节炎诊断中的临床价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(3): 420-422.
- [6] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN A J, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9): 1580-1588.
- [7] 夏文娟,刘月秋,丛玲,等. 抗环瓜氨酸肽抗体 (Anti-CCP) 与类风湿因子 (RF) 在类风湿关节炎诊断中的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(20): 2837-2839.
- [8] 田卫花,马文媛,李莎莎. ELISA 与胶体金免疫层析法检测血清抗 CCP 抗体在 RA 诊断中的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(11): 1528-1529.
- [9] SMOLEN J S, LANDEWE R, BREEDVELD F C, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(6): 964-975.

NSCLC 患者制订个性化的治疗方案均具有积极意义,但基于检测方法灵敏度更高、操作更简便的最优原则,ARMS-PCR 法在临床实践中更具优势。因此, Sanger 测序法适合兼具教学及科研任务的实验室开展,而 ARMS-PCR 似乎更适合以临床应用为主的检测单位使用。值得注意的是,当前高通量测序技术及市场应用愈发成熟,同时可以为临床医生提供更全面的患者基因数据支撑,代表了肿瘤精准检测的发展方向之一。

参考文献

[1] FADI S, WISSAM H. Targeted therapies in non-small cell lung carcinoma; what have we achieved so far[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2013, 5(4): 249-270.

[2] BENNETT C W, BERCHEM G, KIM Y J, et al. Cell-free DNA and next-generation sequencing in the service of personalized medicine for lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 71013-71035.

[3] WANG J, WANG B C, CHU H L, et al. Intrinsic resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutations [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 3711-3726.

[4] MORGENZSTERN D, CAMPO M J, DAHLBERG S E, et al. Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(1 Suppl 1): S1-63.

[5] SCHMID-BINDERT G, WANG Y S, JIANG H B, et al. EBUS-TBNA provides highest RNA yield for multiple biomarker testing from routinely obtained small biopsies in non-small cell lung cancer patients - a comparative study of three different minimal invasive sampling methods[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e77948.

[6] DRAGOWSKA W H, WEPPLER S A, WANG J C, et al. Induction of autophagy is an early response to gefitinib and a potential therapeutic target in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76503.

[7] BENLLOCH S, BOTERO M L, BELTRAN-ALAMILLO J, et al. Clinical validation of a PCR assay for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: retrospective testing of specimens from the EURTAC trial[J].

PLoS One, 2014, 9(2): e89518.

[8] SHI X H, WU H W, LU J L, et al. Screening for major driver oncogene alterations in adenosquamous lung carcinoma using PCR coupled with next-generation and Sanger sequencing methods[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22297.

[9] ALTIMARI A, DE BIASE D, DE MAGLIO G, et al. 454 next generation-sequencing outperforms allele-specific PCR, Sanger sequencing, and pyrosequencing for routine KRAS mutation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 1057-1064.

[10] COSTANZO R, PICCIRILLO M C, SANDOMENICO C, et al. Gefitinib in non small cell lung cancer[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 815269.

[11] TISEO M, BARTOLOTTI M, GELSOMINO F, et al. Emerging role of gefitinib in the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2010, 4(1): 81-98.

[12] KIM H R, CHO B C, SHIM H S, et al. Prediction for response duration to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutated never smoker lung adenocarcinoma[J]. *Lung Cancer*, 2014, 83(3): 374-382.

[13] WEI W E, MAO N Q, NING S F, et al. An analysis of EGFR mutations among 1 506 cases of Non-Small cell lung cancer patients in Guangxi, China [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168795.

[14] DEARDEN S, STEVENS J. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer; meta-analyses by ethnicity and histology (mutmap) [J]. *Ann Oncol*, 2013, 24(9): 2371-2376.

[15] YANO M, SASAKI H, KOBAYASHI Y, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutation and computed tomographic findings in peripheral pulmonary adenocarcinoma [J]. *J Thorac Oncol*, 2006, 1(5): 413-416.

[16] ZHOU Q, ZHANG X C, CHEN Z H, et al. Relative abundance of EGFR mutations predicts benefit from gefitinib treatment for advanced non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(24): 3316-3321.

(收稿日期: 2018-03-02 修回日期: 2018-06-21)

(上接第 2647 页)

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. User demonstration of performance for precision and accuracy; approved guideline: EP15-A[S]. Wayne, PA: CLSI, 2001.

[11] 张葵. 定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法 [J]. *临床检验杂志*, 2009, 27(5): 321-323.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: EP6-A[S]. Wayne, PA: CLSI, 2003.

[13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; proposed guideline: EP7-P [S]. Wayne, PA: CLSI, 1986.

[14] Clinical and Laboratory Standards Institute. HOW to define and determine reference intervals in the clinical Laboratory; approved guideline: C28-A2 [S]. 2nd ed. Wayne, PA: CISI, 2000.

(收稿日期: 2018-02-18 修回日期: 2018-05-20)