

## 论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.12.007

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220530.1200.012.html\(2022-05-31\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220530.1200.012.html(2022-05-31))

## 4种检测血清抗环瓜氨酸肽抗体的方法学比较\*

周爱娥, 湛晓琴, 赵世巧, 张娟, 贾双荣<sup>△</sup>

(重庆市中医院检验科/川渝共建感染性疾病中西医结合诊治重庆市重点实验室 400021)

**[摘要]** **目的** 评估4种抗环瓜氨酸肽(抗CCP)抗体检测方法,并筛选出符合临床要求的检测方法。**方法** 分别用酶联免疫法、免疫胶体金法、免疫透色比浊法和化学发光法检测该院有关节炎症状的100例患者血清抗CCP抗体。以国家卫生健康委临床检验中心室间质评采用的定性方法(酶联免疫法)作为参比方法,分别比较其他3种方法与其检测结果的符合率。根据WS/T505-2017指南对符合率较高的方法进行精密度和准确度评价。**结果** 免疫胶体金法、免疫透色比浊法和化学发光法与酶联免疫法的阳性符合率分别为:100.0% [95%CI(83.9%,100.0%)],90.0% [95%CI(69.9%,97.2%)]和100.0% [95%CI(83.9%,100.0%)];阴性符合率分别为:62.5% [95%CI(51.6%,72.3%)],82.5% [95%CI(72.7%,89.3%)]和98.8% [95%CI(93.1%,99.8%)];总体符合率分别为:70.0% [95%CI(60.4%,78.1%)],84.0% [95%CI(75.6%,89.9%)]和99.0% [95%CI(94.4%,99.8%)]; $\kappa$ 值分别为:0.40、0.59和0.97。化学发光法的精密度和准确度满足厂家说明及临床要求。**结论** 化学发光法与酶联免疫法有良好的结果一致性,化学发光法的精密度和准确度满足临床要求,适用于抗CCP抗体的临床检测。

**[关键词]** 抗环瓜氨酸肽抗体;免疫胶体金法;免疫透射比浊法;化学发光法;酶联免疫吸附试验;方法学评价

[中图法分类号] R446.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2022)12-2015-04

## Comparison of four methods for detecting serum anti-cyclic citrullinated peptide antibody\*

ZHOU Aie, ZHAN Xiaojin, ZHAO Shiqiao, ZHANG Juan, JIA Shuangrong<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine/Chongqing Key Laboratory of Sichuan-Chongqing Co-construction for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chongqing 400021, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate four methods for the detection of anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody, and to screen out the detection methods that meet the clinical requirements. **Methods** The serum level of anti-CCP antibody of 100 patients with arthritis symptoms in this hospital was detected by enzyme-linked immunoassay (ELISA), immunogold staining assay (IGSA), transmission turbidimetry immunoassay (TTIA) and chemiluminescence immunoassay (CLIA), respectively. ELISA, a qualitative method adopted by the National Health Commission for Clinical Laboratory for inter-laboratory quality assessment, was used as the reference method, and the determination of anti-CCP by ELISA was compared with the other three assays in coincidence rates. The precision and accuracy of the assays with high coincidence rates were evaluated according to WS/T505-2017 guideline. **Results** Compared with ELISA, the positive coincidence rates of IGSA, TTIA and CLIA were 100.0% [95%CI(83.9%,100.0%)], 90.0% [95%CI(69.9%,97.2%)] and 100.0% [95%CI(83.9%,100.0%)], respectively; the negative coincidence rates were 62.5% [95%CI(51.6%,72.3%)], 82.5% [95%CI(72.7%,89.3%)] and 98.8% [95%CI(93.1%,99.8%)], respectively; the total coincidence rates were 70.0% [95%CI(60.4%,78.1%)], 84.0% [95%CI(75.6%,89.9%)] and 99.0% [95%CI(94.4%,99.8%)], respectively; and the  $\kappa$  values were 0.40, 0.59 and 0.97, respectively. The precision and accuracy of CLIA met the manufacturer's instructions and clinical demands. **Conclusion** There is an excellent concordance between CLIA and ELISA. The precision and accuracy of CLIA meet the clinical de-

\* 基金项目:重庆市科委技术创新与应用示范项目(cstc2018jscx-msyb1277)。 作者简介:周爱娥(1984—),主管技师,硕士,主要从事检验

医学工作。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:317022599@qq.com。

mands, and CLIA can be suitably used for the determination of anti-CCP antibody in clinical practices.

**[Key words]** anticyclic citrullinated peptide antibody; Immunocolloidal gold method; immunoturbidimetry; chemiluminescence method; enzyme-linked immunoadsorbent assay; methodological evaluation

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的慢性自身免疫性系统性炎症性疾病,影响全世界0.5%~1.0%的成人<sup>[1]</sup>。为确保RA得到有效治疗,早期诊断至关重要。多项研究显示,抗环瓜氨酸肽(抗CCP)抗体能在症状产生前几年被检测到<sup>[2-3]</sup>,并且比类风湿因子(RF)有更高的诊断特异度<sup>[4]</sup>。2010年美国风湿病学学会/欧洲风湿病联盟将抗CCP抗体的检测纳入了RA的分类标准中<sup>[5]</sup>。目前检测抗CCP抗体的方法有多种,但由于其检测方法缺乏国际参考物质,不同方法的溯源性及试剂采用的环瓜氨酸表位存在差异,可能会导致临床诊断效能存在差异。为了筛选出适合临床实验室应用的方法,本研究以国家卫生健康委临床检验中心室间质评采用的定性方法(酶联免疫法)作为参比方法,比较了免疫胶体金法、免疫透色比浊法和化学发光法与之一致性,供临床医学实验室参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集本院2020年12月至2021年2月门诊和住院有关节炎症状的100例患者血清,其中用胶体金方法检测抗CCP抗体阳性50例,阴性50例。样本保存于-20℃,以备集中检测。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试剂与仪器

胶体金抗CCP抗体检测试剂盒和酶联免疫试剂盒由上海科新生物技术股份有限公司提供(试剂批号:EC210101);免疫透射比浊法试剂和校准品由宁波美康生物科技股份有限公司提供(批号:200714101),检测仪器为德国西门子全自动生化分析仪Advia 2400;化学发光法试剂和校准品由美国雅培公司提供(批号:11072UP00),检测仪器为美国雅培全自动化学发光免疫分析仪i2000 SR。

#### 1.2.2 检测方法

分别严格按照操作手册用免疫胶体金法、免疫透色比浊法、化学发光法和酶联免疫法检测收集的血清抗CCP抗体。胶体金法以肉眼观察质控线和检测线均显色判定为阳性。免疫透射比浊法、酶联免疫法和化学发光法的检测范围分别为25~300、25~1 600、0.5~200.0 U/mL,截断值(cut-off值)分别为45、25、5 U/mL。

### 1.3 统计学处理

采用WS/T505-2017指南<sup>[6]</sup>方案进行定性方法的符合率统计及95%CI计算。采用SPSS21.0统计软件进行统计分析,计数资料用例数或百分比表示,Kappa系数检验验证方法间的一致性, $\kappa > 0.7$ 表示一

致性强, $> 0.4 \sim \leq 0.7$ 表示一致性一般, $\leq 0.4$ 表示一致性弱。变量间的相关性分析采用线性回归分析,并绘制散点图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫胶体金法与酶联免疫法的一致性分析

分别用免疫胶体金法和酶联免疫法检测抗CCP抗体,检测结果见表1。阳性符合率为100.0%(20/20),95%CI(83.9%,100.0%);阴性符合率为62.5%(50/80),95%CI(51.6%,72.3%);总体符合率为70.0%(70/100),95%CI(60.4%,78.1%);两种方法检测结果有明显差异,一致性检验的 $\kappa = 0.40$ ( $P < 0.001$ ),一致性弱。

表1 免疫胶体金法与酶联免疫法检测抗CCP抗体性能比较(n)

待评价方法 (免疫胶体金法)	比较方法(酶联免疫法)		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	30	50
阴性	0	50	50
合计	20	80	100

### 2.2 免疫透色比浊法与酶联免疫法的一致性分析

分别用免疫透色比浊法和酶联免疫法检测抗CCP抗体,检测结果见表2。阳性符合率为90.0%(18/20),95%CI(69.9%,97.2%);阴性符合率为82.5%(66/80),95%CI(72.7%~89.3%);总体符合率为84.0%(84/100),95%CI(75.6%~89.9%);两种方法检测结果有明显差异,一致性检验的 $\kappa = 0.59$ ( $P < 0.001$ ),一致性一般。

表2 免疫透射比浊法与酶联免疫法检测抗CCP抗体性能比较(n)

待评价方法 (免疫透射比浊)	比较方法(酶联免疫法)		合计
	阳性	阴性	
阳性	18	14	32
阴性	2	66	68
合计	20	80	100

### 2.3 化学发光法与酶联免疫法的一致性分析

分别用化学发光法和酶联免疫法检测抗CCP抗体,检测结果见表3。阳性符合率为100.0%(20/20),95%CI(83.9%~100.0%);阴性符合率为98.8%(79/80),95%CI(93.1%,99.8%);总体符合率为99.0%(99/100),95%CI(94.4%,99.8%);两种方法检测结果无明显差异,一致性检验的 $\kappa = 0.97$ ( $P < 0.001$ ),一致性强。

### 2.4 线性回归分析

分别将化学发光法、免疫透射比浊法与酶联免疫法检测抗 CCP 抗体的定量结果做线性回归分析,剔除超检测范围的数据点后画散点图。化学发光法与酶联免疫法之间呈二次线性相关( $R^2 = 0.954$ ),见图 1;免疫透射比浊法与酶联免疫法、化学发光法均不成线性相关,见图 2、3。

表 3 化学发光法与酶联免疫法检测抗 CCP 抗体性能比较 (n)

待评价方法 (化学发光法)	比较方法(酶联免疫法)		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	1	21
阴性	0	79	79
合计	20	80	100

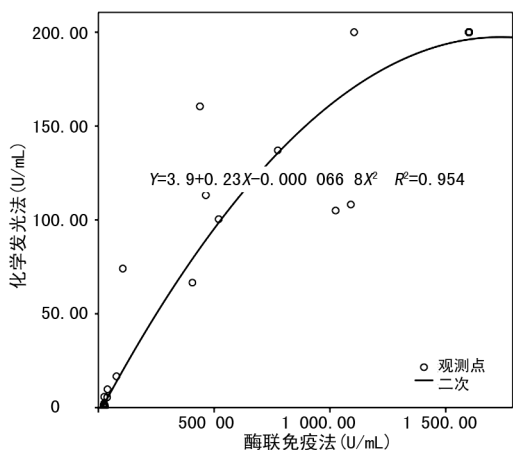


图 1 化学发光法与酶联免疫法检测抗 CCP 抗体的相关性分析

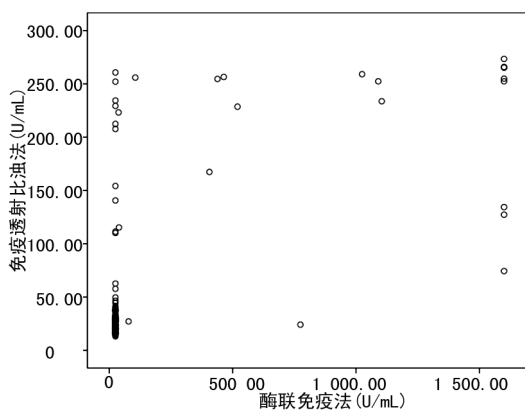


图 2 免疫透射比浊法与酶联免疫法检测抗 CCP 抗体的相关性分析

### 2.5 化学发光法的精密度验证

依据 EP15-A2 文件选取两个水平浓度(4.2、15.8 U/mL)质控品,每天检测 3 次,连续检测 5 d,共计 15 个数据。批内不精密度分别为 4.1%和 3.2%,批间不精密度分别为 5.8%和 3.9%。满足厂家说明及临床要求。另根据 WS/T505-2017 指南选取 50%浓度( $C_{50}$ )±20%(4.2、6.0 U/mL)两个浓度样品。两样

品经连续检测 40 次均分别得出 100%阴性和 100%阳性结果。4.2~6.0 U/mL 区间落在阳性率为 5%~95%的浓度区间( $C_5 \sim C_{95}$  区间)内,说明灰区范围窄,精密度良好。

### 2.6 化学发光法准确度验证

用化学发光法检测国家卫生健康委临床检验中心 2021 年第 1 次抗 CCP 抗体室间质评 5 个样品(202111~202115),结果依次为阳性、阳性、阴性、阴性、阳性,成绩为 100%通过。

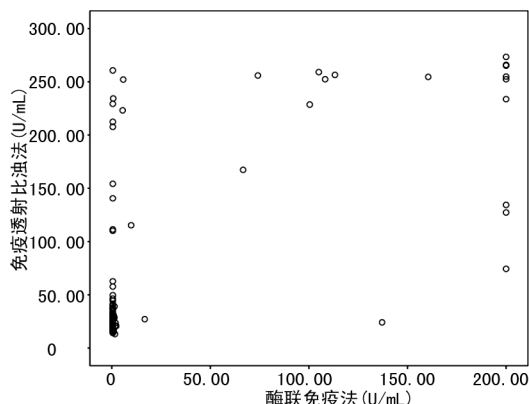


图 3 免疫透射比浊法与化学发光法检测抗 CCP 抗体的相关性分析

## 3 讨论

1998 年,SCHELLEKENS 等<sup>[7]</sup>首先发现瓜氨酸蛋白异常积累于类风湿关节中,人体免疫系统以该蛋白作为攻击靶标,产生相应的抗体,提示与 RA 发病机制有关。由于抗 CCP 抗体诊断和预测 RA 的特异度高,弥补了 RF 特异性差的缺点,二者结合检测提高了 RA 诊断准确率<sup>[8]</sup>。检测抗 CCP 抗体的方法目前已发展到第 3 代。第 1 代以大鼠重组的含瓜氨酸残基的丝氨酸为抗原,检测人体血清中的抗体,但由于结合率差,其灵敏度较低。第 2 代和第 3 代采用人工合成的环瓜氨酸肽<sup>[9]</sup>,比第 1 代检测有更高的灵敏度和特异度<sup>[10]</sup>。研究发现,第 2 代与第 3 代检测在灵敏度和特异度上无明显差别<sup>[11]</sup>,但第 3 代 CCP 抗原由于提供了新的抗原表位,在 RA 风险分层中起到了新的作用<sup>[12]</sup>。

本研究以基于酶联免疫法的第 2 代抗 CCP 抗体检测方法作为比较方法,比较其他几种方法(均采用第 2 代抗 CCP 抗原)是否适合于临床实验室。免疫胶体金法检测抗 CCP 抗体是通过肉眼判读的定性方法,无需特殊仪器,有利于条件有限的实验室快检。但是通过本实验结果发现,免疫胶体金法与酶联免疫法的总体符合率为 70.0%,阴性符合率仅为 62.5%,有 30 份样品检测阳性而酶联免疫法检测为阴性。免疫胶体金法易受加样、判读时间、层析板工艺批次不一致等因素影响,不易进行质量控制,易导致假阳性结果,干扰临床医生的判断,因此建议实验室使用灵敏度高、特异度好的定量检测方法。

采用大型生化分析仪(免疫透射比浊法)检测抗 CCP 抗体有许多优势。由于其自动化程度高,精密度高,可以实现大样本的快速检测,试剂稳定也易进行质控。但是,本研究中免疫透射比浊法与酶联免疫法比较发现总体符合率为 84.0%,阳性符合率和阴性符合率均不高,这可能与使用的抗原不纯或抗原表位不一致有关。

酶联免疫法是第 2 代抗 CCP 抗体的基础检测方法,虽然有着很好的表现,但很难自动化,检测时间长,检测结果易受到人为操作偏差的干扰。本研究对比酶联免疫法与化学发光法检测结果发现,二者有着很高的总体符合率[95%CI(94.4%,99.8%)],但酶联免疫法有 2 例假阳性结果是通过 2 次复查排除的,分析原因可能是洗板污染造成。此外,二者定量结果存在二次线性相关性。刘国瑞等<sup>[13]</sup>比较雅培 i2000 SR(化学发光法)与德国欧蒙试剂(酶联免疫法)检测的结果发现二者相关性良好,但化学发光法的临床诊断特异度、阳性预测值及诊断一致率要高于手工酶联免疫法。化学发光法与酶联免疫法定量检测结果虽然呈二次线性相关,但是结果不具有可比性,因此临床在监测抗体水平变化时,建议患者在同一实验室采用同一种方法检测,便于结果的比较。性能验证试验显示,化学发光法有着良好的精密度和准确性,能够满足临床需求。虽然检测抗 CCP 抗体的化学发光试剂厂商众多,标准化困难,但目前相关报道显示化学发光的方法学表现优异。徐雪亮等<sup>[14]</sup>研究显示,罗氏电化学发光法和德国欧蒙手工酶联免疫法的检测结果一致率可达 96.7%。CHO 等<sup>[15]</sup>验证了西门子 Atellica 化学发光试剂的检测灵敏度和特异度达到 80.3%和 97.2%。

综上所述,由于化学发光仪器自动化程度高,检测时间短,能有效避免交叉和携带污染,准确度更高,试剂稳定易于质量控制,更适合实验室日常开展。

## 参考文献

- [1] HSIEH P H, WU O, GEUE C, et al. Economic burden of rheumatoid arthritis: a systematic review of literature in biologic era [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(6): 771-777.
- [2] VAN VENROOIJ W J, VAN BEERS J J, PRUIJN G J. Anti-CCP antibody, a marker for the early detection of rheumatoid arthritis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1143: 268-285.
- [3] ATES A, KARAASLAN Y, AKSARAY S. Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with early arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2007, 26(4): 499-504.
- [4] WHITING P F, SMIDT N, STERNE J A, et al. Systematic review: accuracy of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosing rheumatoid arthritis[J]. *Ann Intern Med*, 2010, 152: 456-464.
- [5] 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.
- [6] 国家卫生和计划生育委员会. 定性测定性能评价指南: WS/T505-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [7] SCHELLEKENS G A, DE JONG B A, VAN DEN HOOGEN F H, et al. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(1): 273-281.
- [8] SUN J, ZHANG Y, LIU L, et al. Diagnostic accuracy of combined tests of anti cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis: a meta-analysis [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2014, 32(1): 11-21.
- [9] VAN VENROOIJ W J, ZENDMAN A J. Anti-CCP2 antibodies: an overview and perspective of the diagnostic abilities of this serological marker for early rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008, 34(1): 36-39.
- [10] DOS ANJOS L M, PEREIRA I A, D'ORSI E, et al. A comparative study of IgG second- and third generation anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) ELISAs and their combination with IgA third-generation CCP ELISA for the diagnosis of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(2): 153-158.
- [11] MATHSSON A L, FOUNTAIN D L, CADWELL K K, et al. The performance of anti-cyclic citrullinated peptide assays in diagnosing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36(1): 144-152.
- [12] DI MATTEO A, MANKIA K, DUQUENNE L, et al. Third-generation anti-cyclic citrullinated peptide antibodies improve prediction of clinical arthritis in individuals at risk of rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(11): 1820-1828.
- [13] 刘国瑞, 常林, 郑田, 等. 两种方法检测血清抗 CCP 抗体在 RA 诊断中的比较[J]. *现代检验医学杂志*, 2014, 29(1): 83-84, 87. (下转第 2023 页)

- and monocyte-to-lymphocyte ratio in Guillain-Barré syndrome[J]. *Int J Neurosci*, 2018, 128(8):729-735.
- [19] TUNÇ A. Early predictors of functional disability in Guillain-Barré syndrome [J]. *Acta Neurol Belg*, 2019, 119(4):555-559.
- [20] SHAHRIZAILA N, LEHMANN H C, KUWABARA S. Guillain-Barré syndrome[J]. *Lancet*, 2021, 397(10280):1214-1228.
- [21] HASHIM N A, MOHAMED W S, EMAD E M. Neutrophil-lymphocyte ratio and response to plasmapheresis in Guillain-Barré syndrome: a prospective observational study[J]. *Egyptian J Neurol Psy Neur*, 2020, 56(1):17.
- [22] HIRAHARA T, ARIGAMI T, YANAGITA S, et al. Combined neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio predicts chemotherapy response and prognosis in patients with advanced gastric cancer[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):672.
- [23] LI X T, FANG H, LI D, et al. Association of platelet to lymphocyte ratio with in-hospital major adverse cardiovascular events and the severity of coronary artery disease assessed by the Gensini score in patients with acute myocardial infarction[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(4):415-423.
- [24] ALTINTAS O, ALTINTAS M O, TASAL A, et al. The relationship of platelet-to-lymphocyte ratio with clinical outcome and final infarct core in acute ischemic stroke patients who have undergone endovascular therapy [J]. *Neurol Res*, 2016, 38(9):759-765.
- [25] TECER D, SEZGIN M, KANIK A, et al. Can mean platelet volume and red blood cell distribution width show disease activity in rheumatoid arthritis? [J]. *Biomark Med*, 2016, 10(9):967-974.
- [26] HAO X, LI D, WU D, et al. The relationship between hematological indices and autoimmune rheumatic diseases (ARDs), a meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10833.
- [27] ETHEMOGLU O, CALIK M. Effect of serum inflammatory markers on the prognosis of adult and pediatric patients with Guillain-Barré syndrome[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, 14:1255-1260.
- [28] GAO K, ZHU W, LIU W, et al. Diagnostic value of the blood monocyte-lymphocyte ratio in knee osteoarthritis[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(9):4413-4421.
- [29] NISSEN S K, SHRIVASTAVA K, SCHULTE C, et al. Alterations in blood monocyte functions in parkinson's disease[J]. *Mov Disord*, 2019, 34(11):1711-1721.
- [30] SIERZEGA M, LENART M, RUTKOWSKA M, et al. Preoperative neutrophil-lymphocyte and lymphocyte-monocyte ratios reflect immune cell population rearrangement in resectable pancreatic cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(3):808-815.
- [31] LIU H, ZHAN F, WANG Y. Evaluation of monocyte-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio and monocyte-to-lymphocyte ratio in ischemic stroke [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(7):300060520933806.
- [32] BROADLEY J, WESSELINGH R, SENEVIRA TNE U, et al. Australian autoimmune encephalitis consortium. peripheral immune cell ratios and clinical outcomes in seropositive autoimmune encephalitis: a study by the Australian autoimmune encephalitis consortium [J]. *Front Immunol*, 2021, 11:597858.
- [33] NING P, YANG B, YANG X, et al. Lymphocyte-based ratios for predicting respiratory failure in Guillain-Barré syndrome[J]. *J Neuroimmunol*, 2021, 353:577504.

(收稿日期:2021-11-28 修回日期:2022-03-03)

(上接第 2018 页)

- [14] 徐雪亮, 缪怡, 张琦. 电化学发光法检测抗环瓜氨酸肽抗体的方法学评估[J]. *中国医学检验杂志*, 2009, 10(4):232-233.
- [15] CHO J, JY P, FADRIQUELA A, et al. Comparison of the analytical and clinical perform-

ances of four anti-cyclic citrullinated peptide antibody assays for diagnosing rheumatoid arthritis[J]. *Clin Rheumatol*, 2021, 40(2):565-573.

(收稿日期:2021-11-13 修回日期:2022-03-19)