

溶血对电化学发光法检测血清抗环瓜氨酸肽抗体的干扰探讨

姜伟超¹ 余志杰¹ 袁斌² 王晓蓓¹

[摘要] 目的:探讨溶血标本对电化学发光法检测血清抗环瓜氨酸肽抗体(Anti-CCP)的干扰作用。方法:依据美国临床实验室标准化委员会制定 EP7-P 文件标准程序,取 10 例正常人新鲜血液分离血清及其红细胞,配对后配制成不同浓度的溶血模型,检测血红蛋白浓度与溶血指数之间的关系。分析溶血指数与电化学发光法检测血清 Anti-CCP 的关系,并且检测 56 例类风湿关节炎(RA)患者、35 例其他风湿性疾病患者及 30 名健康对照者血清中的 Anti-CCP,观察标本血清 Anti-CCP 检测结果的分布。结果:血红蛋白浓度与溶血指数在临床标本溶血范围内呈良好的线性关系, $Y_{(\text{溶血指数})} = 108.4X_{(\text{血红蛋白浓度})} - 4.1, R^2 = 0.9906$ 。24 例正常人标本的不同溶血程度对 Anti-CCP 检测结果产生正干扰。RA 患者血清 Anti-CCP 水平显著高于健康对照者,并且 Anti-CCP 临界值少见。结论:溶血干扰电化学发光法检测血清 Anti-CCP 结果,且 Anti-CCP 是观察判断 RA 患者一项较好的参考指标。

[关键词] 电化学发光;Anti-CCP;溶血;类风湿关节炎

[中图分类号] R593.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2013)10-0680-04

Effect of hemolysis on detection of Anti-CCP by electrochemiluminescence

JIANG Weichao¹ YU Zhijie¹ YUAN Bin² WANG Xiaobei¹

(¹Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: WANG Xiaobei, E-mail: windflowerinsun@126.com

Abstract Objective: To evaluate the interference effect of hemolysis on Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (Anti-CCP) tested by electrochemiluminescence. **Method:** According to the document EP7-P set by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 10 fresh blood samples from health adults were collected and the isolated erythrocytes and serum were prepared to hemolytic models with multistep levels of concentration. The relationship between the concentration of Hb and hemolytic index (HI) was analyzed. The interference effect of IH on Anti-CCP by means of Electrochemiluminescence was evaluated. The serum level of Anti-CCP in 56 patients with rheumatoid arthritis (RA), 35 other rheumatic disease and 30 health adults were compared, and the distribution of Anti-CCP level was analyzed. **Result:** There was a good linear correlation between Hb concentration and IH in the clinical specimen hemolysis range, $Y(IH) = 108.4X(\text{Hb concentration}) - 4.1, R^2 = 0.9906$. Different hemolysis levels of specimens from 24 health adults had a positive interference on Anti-CCP results. The serum Anti-CCP level of RA patients was significantly higher than that of health adults. **Conclusion:** Hemolysis would interfere the detection of Anti-CCP by Electrochemiluminescence and Anti-CCP would be a reference index for RA patients.

Key words electrochemiluminescence; Anti-CCP; hemolysis; rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种最常见的自身免疫性疾病,临床确诊患者多数已是 RA 的进展期或晚期^[1-2]。因此,及早诊断 RA 并进行药物治疗,对控制病情非常重要^[2]。抗环瓜氨酸肽抗体(anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, Anti-CCP)是检测 RA 新的高特异性血清标志物^[3]。近年来,检测 Anti-CCP 的方法有多

种,特别是化学发光用于 Anti-CCP 的定量检测,具有很好的敏感性和特异性^[3-4]。但此方法的缺点是检测结果易受多种因素的干扰,其中标本溶血是否对检测结果产生影响未见报道。本文检测 RA 患者血清 Anti-CCP 水平,并探讨溶血标本对电化学发光法检测血清 Anti-CCP 的干扰。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2010—2012 年本院门诊及住院 RA 患者 56 例(RA 组),男 21 例,女 35 例,平均年龄(43±17)岁;其他风湿性疾病患者 35 例(对照组),男 20 例,女

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)

²华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科

通信作者:王晓蓓, E-mail: windflowerinsun@126.com

15 例,平均年龄为(44±12)岁,包括 15 例强直性脊柱炎、6 例系统性红斑狼疮、5 例骨关节炎、3 例系统性硬化症、2 例干燥综合征、2 例多发性肌炎或皮肌炎、2 例痛风;健康对照者 30 例(正常组),男 15 例,女 15 例,平均年龄(39±15)岁。RA 临床诊断主要依据美国风湿病学会 1987 年修订的 RA 分类标准^[5],其他疾病的诊断均符合有关诊断标准^[6]。

1.2 Anti-CCP 检测

患者、对照者治疗前及健康对照者清晨空腹抽取肘静脉血 4 ml,3 000 r/min 离心 10 min,取血清,采用 cobase 601 全自动电化学发光免疫分析仪(罗氏公司,德国),检测各组 Anti-CCP 水平。

1.3 标本溶血模型的制备及检测

血红蛋白原液的制备:参考 EP7-A2 标准程序^[7],取新鲜 EDTA-K2 抗凝血,离心取上清,不同标本的红细胞分别加入等体积等渗生理盐水,离心洗涤 3 次(3 500 r/min×10 min)最后离心后弃去上层生理盐水,加入等体积去离子水,-20℃ 冷冻过夜。解冻后以相同条件离心,取上层血红蛋白液为血红蛋白原液。

溶血模型的制备^[8]:采用原管稀释方法,即将血红蛋白原液按不同体积分别加回到原管血清中,制备不同浓度的标本溶血模型。每个血红蛋白原液稀释比例如下:各取原液 5、10、20、30、40、50 μl,用 0.9% 的生理盐水稀释至 1 ml 制备溶血模型,见表 1(10 个血红蛋白原液浓度梯度,稀释配成 70 个溶血模型)。

1.4 溶血模型的检测

选用 AREOSET 2000 全自动生化分析仪对溶血指数进行检测,溶血指数检测的参数、波长根据仪器的操作说明书进行设定,选用的试剂为体积分数为 0.9% 的生理盐水。运用 4 对波长对其进行检测,分别为:A₁=500/524 nm,A₂=572/604 nm,A₃=628/660 nm,A₄=524/804 nm。

$$\text{溶血指数 } H = M \times (a_{05} \times A_1 + a_{06} \times A_2 + a_{07} \times A_3 + a_{08} \times A_4)$$

M=试剂用量+样本用量×标本稀释比/标本量。

a₀₅,a₀₆,a₀₇,a₀₈ 为常数,由厂家设定。

1.5 溶血指数与 Anti-CCP 检验结果的关系

取 10 个新鲜正常人血清标本,分别测定原始血清的溶血指数和 Anti-CCP 的原始值,然后按 1.3 方法原管稀释,配制成 70 个不同浓度的溶血标本模型(表 1),随机抽取其中 20 个标本,每个标本重复检测 3 次,取平均值,计算溶血对 Anti-CCP 检测结果的影响及其与溶血指数的关系。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个独立组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 Anti-CCP 检测结果

RA 组血清 Anti-CCP 水平显著高于对照组和正常组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。各组 Anti-CCP 检测结果见表 2。

2.2 血红蛋白浓度与溶血指数之间的关系

随机检测 20 个不同溶血程度标本模型,其血红蛋白浓度与溶血指数成良好线性关系,血红蛋白 0~10 g/L,溶血指数 0~1000,线性回归方程式为:Y_(溶血指数) = 108.4X_(血红蛋白浓度) - 4.1,R² = 0.9906 (图 1)。

2.3 溶血指数与 Anti-CCP 检验结果的关系

由于各标本有其溶血指数的本底值,通过下面的公式计算溶血指数对 Anti-CCP 检验结果的影响:变化的溶血指数=溶血标本模型的溶血指数-原始标本的溶血指数,Anti-CCP 检验结果的变化值=溶血标本模型测定结果值-原始标本的测定结果值。

结果显示,溶血对 Anti-CCP 检验结果产生正干扰趋势(图 2)。

3 讨论

瓜氨酸是自身抗体的一种靶抗原,类似于抗核周因子、抗角蛋白抗体、抗丝集蛋白抗体等。Anti-CCP 是环状聚丝蛋白的多肽片段,是以 IgG 型为主的抗体,Anti-CCP 检测对 RA 疾病的诊断具有较高的特异性和敏感性(68%~75%),即使是 RA 早

表 1 溶血模型的稀释制备

1 ml NS 中原液 体积/μl	血红蛋白原液浓度/(μg·ml ⁻¹)									
	0.112	0.136	0.087	0.114	0.123	0.107	0.119	0.101	0.133	0.124
5	0.560	0.680	0.435	0.570	0.615	0.535	0.595	0.505	0.665	0.620
10	1.120	1.360	0.870	1.140	1.230	1.070	1.190	1.010	1.330	1.240
20	2.240	2.720	1.740	2.280	2.460	2.140	2.380	2.020	2.660	2.480
30	3.360	4.080	2.610	3.420	3.690	3.210	3.570	3.030	3.990	3.720
40	4.480	5.440	3.480	4.560	4.920	4.280	4.760	4.040	5.320	4.960
50	5.600	6.800	4.350	5.700	6.150	5.350	5.950	5.050	6.650	6.200
60	6.720	8.160	5.220	6.840	7.380	6.420	7.140	6.060	7.980	7.440

表 2 各组 Anti-CCP 检测结果 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	Anti-CCP/(U · ml ⁻¹)
RA 组	56	645.15 ± 43.17 ¹⁾
对照组	35	45.09 ± 6.54
正常组	30	7.15 ± 4.26

与正常组和对照组比较,¹⁾P<0.01。

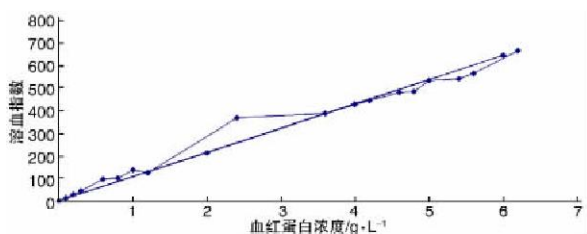


图 1 血红蛋白浓度与溶血指数间的关系图

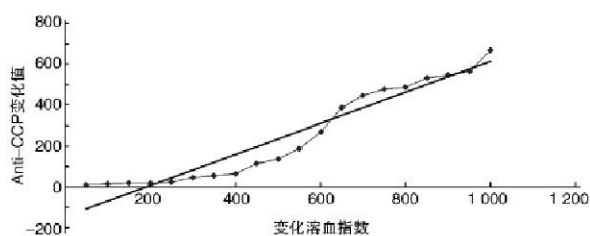


图 2 溶血指数与 Anti-CCP 检验结果的关系图

期患者,敏感度也有 40%~60%^[2,9]。有学者认为, Anti-CCP 不仅是 RA 早期诊断指标,而且是鉴别侵蚀性和非侵蚀性 RA 的灵敏指标,因为 Anti-CCP 阳性者较 Anti-CCP 阴性者更容易发生或发展成更严重的关节骨质破坏^[9-10]。本文结果显示, RA 患者血清 Anti-CCP 水平显著高于健康对照者和其他风湿性疾病患者(P<0.01),再次验证了血清 Anti-CCP 水平升高可作为诊断 RA 的特异性指标。

电化学发光法原理是进行待测物质浓度与光量子数之间的换算,标本颜色变化不可能影响待测物浓度。该法检测 Anti-CCP 是使用一组环瓜氨酸肽的第二代检测方法。使用多重的瓜氨酸肽的第二代检测大大提高了其临床性能。虽然电化学发光与酶联免疫吸附试验(ELISA)结果有着较好的一致性(特异性相同),但是前者具有更宽的检测限(即更高的灵敏度)和稳定性^[11-12]。所以电化学发光可用于临床对 ELISA 阴性的临床 RA 表征阳性的患者进行二次筛查。ELISA 的优点在于成本较低,此外,该方法全自动化检测程度高,速度快,节省人力资源,易于标准化,适合推广。对于罗氏的电化学发光和雅培的微粒发光法比较,电化学发光具有更高的检测灵敏度,而微粒法在检测蛋白质,病毒抗原等大分子方面具有较高的反应特异性^[13]。每种方法都各有优缺点,提示临床及科研

工作时应根据实际情况选择合适的检测方法。

本研究旨在分析溶血对血清 Anti-CCP 测定值的影响。结果显示溶血对 Anti-CCP 的测定结果有显著干扰,且有增加 Anti-CCP 的检测结果的趋势(图 2)。这可能是由于溶血导致血红蛋白释放,影响或改变了血红蛋白的空间构型,导致对结果呈现正干扰。因此进行血清 Anti-CCP 检测时应采用新鲜无溶血标本,以保证检测结果的准备可靠。

参考文献

- [1] RAPTOPOULOU A, SIDIROPOULOS P, KAT-SOURAKI M, et al. Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2007, 44: 339-363.
- [2] NISHIMURA K, SUGIYAMA D, KOGATA Y, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of Anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis[J]. Ann Intern Med, 2007, 146: 797-808.
- [3] VOSSENAAR E R, RADSTAKE T R D, VAN DER HEIJDEN A, et al. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages[J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63: 373-381.
- [4] 徐雪亮, 缪怡, 张琦. 电化学发光免疫测定法检测抗环瓜氨酸肽抗体的方法比较[J]. 诊断学理论与实践, 2011, 10(3): 260-262.
- [5] 赵金霞, 王志敏, 栗占国. 以抗环瓜氨酸肽抗体改进对 1987 年美国风湿病学会关于类风湿关节炎分类标准的探讨[J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 14(4): 236-239.
- [6] 叶任高. 内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 877-944.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry[J]. EP7-A2, CLSI, 2005.
- [8] 刘一鸣, 姚少羽, 喻雄文, 等. 临床生化重要检验项目溶血干扰的量化研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2008, 29(4s): 112-115.
- [9] ZENDEMAN A J, van VENROOIJ W J, PRUIJIN G J. Use and significance of Anti-CCP autoantibodies in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology, 2006, 45: 20-25.
- [10] NIELEN M M, van SCHAAARDENBURG D, REESINK H W, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50: 380-386.
- [11] 白伊娜, 宋宁, 李永哲, 等. 电化学发光免疫测定与酶联免疫吸附试验检测抗环瓜氨酸多肽抗体比较[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6(4): 241-246.

全自动血型分析仪在血型鉴定中的应用

陆贤吉¹ 马幼丽¹

[摘要] 目的:探讨伽利略全自动血型分析仪在血型鉴定中的应用。方法:采用伽利略全自动血型分析仪(仪器法)对7 266例样本进行ABO、RhD血型鉴定,同时用试管法作对照试验。结果:7 266例样本,仪器法ABO、RhD一次判读成功率分别为98.3%(7 145/7 266)、98.7%(7 172/7 266)。一次判读成功的ABO、RhD血型鉴定结果均与试管法相符,正确率100%。仪器法和试管法一次检测64个样本所需时间分别为35、55 min。结论:伽利略全自动血型分析仪鉴定ABO、RhD血型具有自动、快速、结果可靠,原始数据可长期保存,易于查询和举证等优点,适合大批量样本的处理。

[关键词] 伽利略全自动血型分析仪;ABO血型;RhD血型

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2013)10-0683-02

Application of Galileo automated instrumentation systems in blood group testing

LU Xianji MA Youli

(Department of Blood Transfusion, Ningbo Medical Center Li Huili Hospital, Ningbo, 315040, China)

Corresponding author: LU Xianji, E-mail: lxjweiyu@163.com

Abstract Objective: To research the application of Galileo automated instrumentation systems for blood group testing. **Method:** Seventy-two thousand and sixty-six cases were collected. ABO and RhD blood group were tested by Galileo automated instrumentation systems (instrument method) and tube method. **Result:** First successful interpretation of ABO and RhD blood group testing by instrument method were 98.3% (7 145/7 266) and 98.7% (7 172/7 266) respectively. The results were consistent with the tube method, and the accuracy rates were 100%. Time of testing 64 samples by instrument method and tube method was 35 and 55 minutes, respectively. **Conclusion:** Galileo automated instrumentation systems could perform in blood group testing automatically, rapidly, accurately and easily to store and quote the data, which would be suited for batch testing.

Key words Galileo automated instrumentation systems; ABO blood group; RhD blood group

准确快速的血型鉴定是临床安全用血的有力保证。全自动血型分析仪因检测自动、灵敏、操作过程易标准化,已为不少医院和血站采用^[1-3]。本院自2011年8月起使用伽利略全自动血型分析仪进行ABO、RhD血型鉴定,现将应用情况报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

2011-08-2012-06本院外科手术及内科需输血治疗的住院患者7 266例,于入院时抽取EDTA-K₂抗凝静脉血4~5 ml,3 000 r/min,离心5 min。

1.2 试剂与仪器

美国伽利略全自动血型分析仪。仪器法单克隆抗-A、抗-B、抗-D标准血清、正定型阴性对照血

清、A、B试剂红细胞由美国Immucor公司生产,试管法单克隆抗-A、抗-B、抗-D标准血清由上海血液生物医药有限责任公司生产,A、B、O 3%试剂红细胞自配。

1.3 方法

所有样本同时用仪器法和试管法进行ABO、RhD血型鉴定。

1.3.1 试管法 按照《全国临床检验操作规程》第3版操作。

1.3.2 仪器法 伽利略全自动血型仪应用微孔板红细胞凝集技术。每块微孔板有96孔,可同时检测16个样本,检测格局从左到右依次为抗-A、抗-B、Ac、Bc、抗-D、阴性对照。样本经条码扫描后,仪器自动完成样本和试剂吸取、孵育、离心、CCD图像分析、结果判读以及数据传输和保存。仪器凝集强度判读设置见表1。

¹宁波市医疗中心李惠利医院输血科(浙江宁波,315040)
通信作者:陆贤吉,E-mail:lxjweiyu@163.com

[12] ESALATMANESH K, JAMALI R, JAMALI A, et al. Serum Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies may predict disease activity in rheumatoid arthritis [J]. Rheumatol Int, 2012, 32: 3799-3805.

[13] 何洁文,王勋松.罗氏电化学发光检测法与微粒子酶免疫法检测泌乳素的比较[J].海南医学,2010,2(1): 106-106.