

人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒行业标准的建立与验证

孙楠, 曲守方, 于婷, 黄杰*, (中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法与标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的: 对人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒行业标准可行性进行验证。方法: 按照拟定行业标准的的要求, 选择不同免疫分析方法的试剂盒进行验证。结果: 外观、空白限、线性、精密度、稳定性等指标符合要求, 准确性项目有1批次试剂盒低浓度的测定结果不在 $\pm 10.0\%$ 范围内, 不符合拟定的行业标准要求。特异性项目中有1批次试剂盒不符合要求。结论: 人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒行业标准制定合理, 有助于规范此类试剂盒的技术要求和试验方法, 从而提高此类试剂盒的产品质量, 并为其监管提供依据。

关键词: 人抗甲状腺球蛋白抗体; 试剂盒; 行业标准

中图分类号: R95; R581 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)04-0454-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.04.013

The Establishment and Verification of Industry Standards for Anti-Tg Ab Assay kits

Sun Nan, Qu Shou-fang, Yu Ting, Huang Jie* (National Institutes for Food and Drug Control, The Key Laboratory of Biotechnology Product Test Method and Its Standardization of The Ministry of Health, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To verify the feasibility of the industry Standards for Anti-Tg Ab assay kits. **Methods:** The kits of different immunoassay methods were selected for validation in accordance with industry Standards. **Results:** The appearance, limit of blank, linearity, accuracy and stability could meet requirements, while the accuracy of the test results of 1 batch of kits with low concentration is not within the range of $\pm 10.0\%$, which does not meet the proposed industry standards. In the specific project, 1 batch of kits did not meet the requirements. **Conclusion:** The establishment of reasonable industry standards for Anti-Tg Ab assay kits is helpful to standardize the experimental methods and technical requirements of such kits so as to improve the product quality, and provide a basis for their supervision.

Keywords: Anti-Tg Ab; kits; industry Standards

甲状腺球蛋白抗体 (Thyroglobulin Antibody, TgAb) 是由淋巴细胞产生的一种自身免疫性抗体。当致病因素存在时, Tg 从甲状腺滤泡内溢入血液, 可作为抗原刺激机体产生 TgAb^[1]。TgAb 可作为自身免疫性甲状腺疾病的特异性指标^[2-3]。近期研究表明, TgAb 还可作为分化型甲状腺癌 (Differentiated Thyroidcarcinoma, DTC) 的血清学肿瘤标志物和 DTC 复发的最初标志^[4-6]。

目前, 在国家药品监督管理局取得医疗器械注册证的人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒约有 65 种, 普遍采用的是标记免疫分析技术, 但是该类没有统一的行业标准, 使得 TgAb 检测的标准化和质量控制难以操作。按照国家局医疗器械标准制修订计划, 中国食品药品检定研究院提出并制定了人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒行业标准^[7], 本研究选择了 7 批次不同方法的人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒, 对拟定标准的技术指标和检验方法进行验证。

1 材料

1.1 仪器

化学发光免疫分析仪, 型号: IDS-isys, 由北京利德曼生化股份有限公司提供; 全自动化学发光免疫分析仪, 型号: ChemLite™1200, 由博奥生物集团有限公司提供; 全自动化学发光免疫分析仪, 型号: ADVIA Centaur XPT, 由西门子医学诊断产品 (上海) 有限公司提供; 电化学发光全自动免疫分析仪, 型号: cobas e411, 由罗氏诊断产品 (上海) 有限公司提供; 全自动免疫分析仪, 型号: ISR54022, 由雅培贸易 (上海) 有限公司提供; 化学发光检测仪, 型号: Lumo, 由郑州安图生物工程股份有限公司提供; 全自动免疫分析仪, 型号: 81600N, 由贝克曼库尔特商贸 (中国) 有限公司提供。

1.2 试剂盒

甲状腺球蛋白抗体 (TgAb) 定量测定试剂盒 (磁微粒化学发光法), 由北京利德曼生化股份有限公司提供; 人甲状腺球蛋白抗体 (TgAb) 测定试剂盒 (磁微粒化学发光法), 由博奥生物集团有限公司提供; 甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒 (化学发光法), 由西门子医学诊断产品 (上海) 有限公司提供; 甲状腺球蛋白抗体检测试剂盒 (电化学发光法), 由罗氏诊断产品 (上海) 有限公司提供;

甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒 (化学发光微粒子免疫检测法), 由雅培贸易 (上海) 有限公司提供; 抗甲状腺球蛋白抗体定量检测试剂盒 (化学发光法), 由郑州安图生物工程股份有限公司提供; 甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒 (化学发光法), 由贝克曼库尔特商贸 (中国) 有限公司提供。上述试剂盒均已取得医疗器械产品注册证。

1.3 标准品

抗甲状腺球蛋白抗体国家标准品, 批号: 150556-200601, 4000 IU/支, 冻干品, 由中国食品药品检定研究院提供。抗甲状腺球蛋白抗体国际标准品, NIBSC 批号: 65/093, 1000 IU/支, 冻干品, 由中国食品药品检定研究院提供。

2 方法

按照行业标准《人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒》进行验证。验证的技术指标包括外观、空白限、线性、准确度、批内精密度、批间精密度、特异性。

2.1 外观

在自然光下以正常视力或矫正视力目视检查, 一般由制造商应根据自己产品的包装特点规定适当的外观要求。一般应有试剂盒各组分组成、性状; 内外包装、标签清晰等的要求。

2.2 空白限

用零浓度校准品或样本稀释液作为样本进行检测, 重复测定 20 次, 计算信号值的平均值 (M) 和标准差 (SD), 根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-信号值结果进行两点回归拟合得出一次方程, 将 M+2SD 的信号值带入上述方程中, 求出对应的浓度值, 即为空白限。要求应不高于 15.0 IU·mL⁻¹。

2.3 线性

将接近线性区间上限的高值样本按一定比例稀释为至少 5 个浓度, 其中稀释的最低浓度样本须接近线性区间的下限。对每一浓度的样本至少重复测定 2 次, 计算其平均值, 将测定浓度的平均值与理论浓度或稀释比例用最小二乘法进行直线拟合, 并计算线性相关系数 r 。要求下限不高于 20 IU·mL⁻¹, 上限不低于 1000 IU·mL⁻¹, 相关系数 (r) 应不低于 0.9900。

2.4 准确度

准确度可选择如下试验方法之一:

1) 将抗甲状腺球蛋白抗体国家(或国际)标准品配制成最终浓度约为 $50 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (允许其浓度偏差为 $\pm 20\%$)和 $500 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (允许其浓度偏差为 $\pm 20\%$)的准确度样品进行检测,重复3次,计算相对偏差,其测量结果的相对偏差应在 $\pm 10.0\%$ 范围内。

2) 将浓度约为 $800 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (允许其浓度偏差为 $\pm 20\%$)的抗甲状腺球蛋白抗体样品(A)加入到血清或其他相应基质的样品B中,所加入A的体积不宜超过总体积(A+B)的10%,计算回收率。回收率应在(85.0%~115.0%)范围内。

2.5 精密度

2.5.1 批内精密度

在试剂盒的剂量-反应曲线范围内,设置2~3个不同浓度的质控品,手工操作试剂盒测定结果的变异系数(CV)应不高于10.0%,全自动操作试剂盒测定结果的变异系数(CV)应不高于8.0%。

2.5.2 批间精密度

在3个不同批次产品之间,在试剂盒的剂量-反应曲线范围内,设置2~3个不同浓度的质控品,测定结果的变异系数(CV)应不高于15.0%。

2.6 特异性

测定浓度不低于 $1000 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ IgG样本,其测定结果应不高于参考值。

2.7 稳定性

可对效期稳定性和热稳定性进行验证。效期稳定性:生产企业应规定产品的有效期。取到效期后一定时间内的产品检测试剂空白限、线性、准确度、批内精密度。热稳定性:试剂盒在 37°C 条件下放置一定时间,检测试剂空白限、线性、准确度、批内精密度。

3 结果

选取7家取得注册证的试剂盒对行业标准(以下简称行标)进行验证。外观均符合规定;各试剂盒的空白限均低于行标的要求($15.0 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$);试剂盒均能满足拟定行标线性区间的要求(下限不高于 $20 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$,上限不低于 $1000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$),其中A试剂盒线性区间范围上限可达 $4000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$;各试剂盒相关系数均大于拟定行标的要求(0.9900),有多家试剂盒相关系数可以达到0.9990,表明在试剂盒剂量-反应曲线的线性范围内,量效关系反应良好。批内精密度指标验证中选取了高、低两个浓度,变异系数均小于8.0%,有3家试剂盒对批间精密度进行了验证,变异系数均小于15.0%,符合行标的要求,表明各试剂盒重现性较好。6家试剂盒对特异性进行验证,除1家试剂盒不符合要求外,测定结果均小于各自的参考值,说明该浓度下的IgG不影响Anti-Tg的测定。结果详见表1。

表1 Anti-Tg 测定试剂盒部分验证结果

试剂盒	空白限 / ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性范围 / ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关 系数	批内精度 /%		批间精密度 /%		特异性 / ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
				质控品 1	质控品 2	质控品 1	质控品 2	参考值	测定结果
A	-721.34	10.0~4000	0.9955	4.4	4.0	/	/	115	108.1
B	0.46	0~1200	0.9993	4.9	7.8	10.9	5.0	35	8.8
C	0.039	3.0~1000	0.9995	6.9	2.4	/	/	4.11	21.3
D	0.07	0.9~2500	0.9998	4.9	5.1	/	/	/	/
E	1.85	5~1000	0.9996	2.7	2.0	0.04	0.03	48	1.9
F	14.3	15~1600	0.9981	4.9	3.4	/	/	60	4.1
G	7.0	11~2000	0.9997	5.7	2.9	6.3	4.9	75	14.9

注: / 代表该试剂盒未对该项指标进行验证。

准确度项目中,有7家试剂盒按照相对偏差方法进行验证,有1家试剂盒低浓度的测定结果不在±10.0%范围内,不符合拟定的行标要求,其它

各试剂盒的高、低浓度结果均在规定范围内。有3家试剂盒按照回收率方法进行验证,回收率均在(85.0%~115.0%)范围内。结果详见表2。

表2 Anti-Tg 测定试剂盒准确度项目验证结果

试剂盒	相对偏差 /%		回收率 /%
	50 / IU · mL ⁻¹	500 / IU · mL ⁻¹	
A	6.8	-1.9	/
B	7.7	8.7	/
C	7.2	6.9	/
D	-14.1	-5.4	/
E	1.8	7.8	104.0
F	6.4	-2.9	104.0
G	6.5	7.3	111.7

注: /代表A、B、C、D试剂盒未对准确度项目的回收率进行验证。

稳定性项目中,由1家试剂盒对效期稳定性进行了验证,空白限、线性、准确度、批内精密度均

符合拟定行标的要求。结果详见表3。

表3 Anti-Tg 测定试剂盒稳定性项目验证结果

试剂盒	空白限 / IU · mL ⁻¹	相关系数	批内精度 /%		相对偏差 /%		回收率 /%
			质控品 1	质控品 2	50 / IU · mL ⁻¹	500 / IU · mL ⁻¹	
G	4.62	0.9999	7.8	2.8	7.3	7.9	94.3

4 讨论

体外诊断技术的新进展对甲状腺癌管理发挥了重要作用,近年来,随着血清Tg、TgAb水平检测的准确性、方便性、安全性的日益提高,也受到越来越多的国内外学者的关注,并有取代诊断性131I-WBS的趋势^[8]。通过总结归纳近几年的最新研究成果,2015年美国甲状腺学会《成人甲状腺结节与分化型甲状腺癌诊治指南》进一步对DTC术后及131I治疗后的随访进行了补充和完善,增加对Tg和TgAb的监测^[9]。因此,试剂盒的可靠的准确性、线性范围内良好的相关性、重复检测时较小的变异系数尤为重要。

在本次标准验证中,外观、最低检测限、线

性、精密度、特异性、质控品的测定值、稳定性等指标均能达到标准要求,可操作性强,指标设置科学合理,能够满足临床使用的要求。

在前期的调研中,多数企业没有特异性指标。在标准起草中,我们考虑抗甲状腺球蛋白抗体(Ag-Ab)以IgG类为主,为排除其相关干扰,因此,制备了浓度为1000 mg · dL⁻¹ IgG样本供该项目验证使用。IgG样本验证试验中各厂家结果差距较大,这是由于试剂中Tg蛋白的纯度和表位特异性不同造成的,很难规定一个统一的值,因此,要求测定结果应不高于参考值。除一家不符合规定外,其他均符合要求。

参考文献：

- [1] 汪兰英, 李芳巍, 秦恺. TgAb 在 PTC 治疗随访中的价值[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (78) : 74-75.
- [2] Chou KM, Huang BY, Chen CH, et al. Correlation and Presentation of Thyroid Functional Status with Thyroid Autoantibodies in Long-term Follow-up of Autoimmune Thyroiditis: A Study of 116 Cases[J]. J Formos Med Assoc, 2015, 114 (11) : 1039-1046.
- [3] 马玲, 陈钰琼, 杜娟, 等. 桥本甲状腺炎自身抗体与甲状腺功能的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志, 2018, (28) 17: 94-97.
- [4] Spencer CA. Clinical Review: Clinical Utility of Thyroglobulin antibody (TgAb) Measurements for Patients with Differentiated thyroid Cancers (DTC) [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96 (12) : 3615-3627.
- [5] Alicia Algeciras-Schimnich. Thyroglobulin Measurement in the Management of Patients with Differentiated Thyroid Cancer[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2018, 55 (3) : 205-218.
- [6] Qin J, Yu Z, Guan H, et al. High Thyroglobulin Antibody Levels Increase the Risk of Differentiated Thyroid Carcinoma[J]. Dis Markers, 2015 (17) : 648670.
- [7] 中国标准化委员会. YY/T1594-2018 人抗甲状腺球蛋白抗体测定试剂盒[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 5.
- [8] 张文杰, 邓候富, 潘明志, 等. 分化型甲状腺癌患者内源性TgAb 对血清Tg 测定值、Tg 阳性率的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2013, 11 (4) : 131-135.
- [9] HAUGEN B R, ALEXANDER E K, BIBLE K C, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines For Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer[J]. Thyroid, 2016, 26 (1) : 1-133.

(收稿日期 2019年6月27日 编辑 邹宇玲)