

定量检测人甲状腺过氧化物酶抗体 化学发光酶免疫分析法的临床应用

柴锦燕 方佩华 谭建 李宁

【摘要】 目的 应用人甲状腺过氧化物酶抗体(hTPOAb)的化学发光酶免疫分析(CLEIA)试剂盒,检测正常人及各类甲状腺疾病患者,探讨该试剂盒在临床应用中的价值。**方法** 用该试剂盒共测定 333 例样品血清中的hTPOAb,包括正常人 133 名,各类甲状腺疾病患者 200 例,其中桥本甲状腺炎(HT)94 例,Graves 病 68 例,结节性甲状腺肿 19 例,亚急性甲状腺炎 10 例,单纯性甲状腺肿 9 例。**结果** 确立本试剂盒hTPOAb阳性切限值为3.22 IU/ml, hTPOAb浓度以中位数表示,分别为 HT 5.48 IU/ml,阳性率为91.50%; Graves 病1.88 IU/ml,阳性率为29.40%; 结节性甲状腺肿1.83 IU/ml,阳性率为10.50%,亚急性甲状腺炎2.54 IU/ml,阳性率为20.00%;单纯性甲状腺肿2.21 IU/ml,阳性率为0。HT 患者血清hTPOAb阳性率高于其他患者($\chi^2 = 67.22, 60.13, 35.49, 49.89, P$ 均 < 0.01)。**结论** 该定量检测 hTPOAb 的 CLEIA 试剂盒在 HT 中有很高的阳性率,可作为 HT 有效的诊断手段。

【关键词】 碘化物过氧化物酶; 化学发光酶免疫分析技术; 自身抗体; 桥本甲状腺炎

基金项目:国家临床重点专科建设项目

Clinical application of chemiluminescence enzyme immunoassay to quantitatively detect human thyroid peroxidase antibodies Chai Jinyan, Fang Peihua, Tan Jian, Li Ning. Department of Nuclear Medicine, The General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Corresponding author: Fang Peihua, Email: fangpeihuali@163.com

【Abstract】 Objective To apply chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) kits of thyroid peroxidase antibodies (hTPOAb) on normal and all kinds of patients with thyroid diseases, and explore the clinical value of the kits. **Methods** The hTPOAb kits were used in 333 cases of serum samples, including 133 cases of healthy people, 94 cases of Hashimoto's thyroiditis (HT), 68 cases of Graves' disease (GD), 19 cases of nodular goiter, 10 cases of subacute thyroiditis and 9 cases of simple goiter. **Results** Concentration above 3.22 IU/ml was considered to be positive of the hTPOAb kits. The median concentration of hTPOAb was 5.48 IU/ml in HT (positive ratio was 91.50%), 1.88 IU/ml in GD (positive ratio was 29.40%), 1.83 IU/ml in nodular goiter (positive ratio was 10.50%), 2.54 IU/ml in subacute thyroiditis (positive ratio was 20.00%), and 2.21 IU/ml in simple goiter (positive ratio was 0). The positive ratio of hTPOAb in patients with HT was higher than that of the other patients ($\chi^2 = 67.22, 60.13, 35.49, 49.89$, all $P < 0.01$). **Conclusion** The CLEIA kits of hTPOAb has a high positive rate for HT, and is an effective method in diagnosing HT.

【Key words】 Iodide peroxidase; Chemiluminescence enzyme immuneassay; Autoantibodies; Hashimoto's thyroiditis

Fund program: National Specialty Construction of Clinical Projects

甲状腺过氧化物酶位于甲状腺滤泡上皮顶端细胞膜上,是甲状腺激素合成过程中的关键酶,具有特殊的免疫学活性。自身免疫性甲状腺疾病是临床上常见的一类器官特异性自身免疫性疾病,主要包括

桥本甲状腺炎、Graves 病、产后甲状腺炎等。人甲状腺过氧化物酶抗体(hTPOAb)在自身免疫性甲状腺疾病的发病中发挥重要的作用^[1-3]。本文利用化学发光酶免疫分析(CLEIA)技术构建试剂盒,对正常人及各种甲状腺疾病患者进行临床检测。

1 对象和方法

1.1 对象及分组 选取天津医科大学总医院 2014

年 6 月至 2014 年 10 月门诊及住院的各类甲状腺疾病患者 200 例。依据病史、临床症状和体征、甲状腺 B 超、病理诊断及实验室检查进行诊断。其中,桥本甲状腺炎患者 94 例,男 14 例,女 80 例,年龄 11~81 岁,平均 (38.15 ± 16.10) 岁;诊断标准:病程数月至数十年,多数有甲状腺功能减退症临床表现,甲状腺肿大,质中、韧或硬,血清甲状腺激素显示低功能状态,甲状腺过氧化物酶抗体和甲状腺球蛋白抗体阳性,B 超提示甲状腺回声欠均匀,呈条索样改变;少数桥本甲状腺炎病例经组织病理学检查确诊。Graves 病患者 68 例,男 14 例,女 54 例,年龄 12~73 岁,平均 (40.34 ± 13.16) 岁;诊断标准:均有高代谢临床表现,甲状腺弥漫性肿大伴或不伴有突眼,血清甲状腺激素显示高功能状态,促甲状腺素受体抗体 (TRAb) 阳性。结节性甲状腺肿患者 19 例,男 3 例,女 16 例,年龄 15~66 岁,平均 (41.14 ± 10.45) 岁;诊断标准:B 超提示有甲状腺结节,血清甲状腺激素显示正常水平,甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体及 TRAb 均为阴性。亚急性甲状腺炎患者 10 例,男 2 例,女 8 例,年龄 20~64 岁,平均 (43.00 ± 12.05) 岁;诊断标准:主要表现为低热,颈部疼痛,B 超提示甲状腺片状低回声区,血清甲状腺激素显示略高于正常水平,甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体及 TRAb 均为阴性。单纯性甲状腺肿患者 9 例,男 1 例,女 8 例,年龄 43~62 岁,平均 (51.90 ± 6.48) 岁;诊断标准:B 超提示甲状腺肿大,血清甲状腺激素显示正常水平,甲状腺过氧化物酶抗体、甲状腺球蛋白抗体及 TRAb 均为阴性。正常人组为 20~30 岁的男性 133 例,甲状腺球蛋白抗体、甲状腺过氧化物酶抗体及 TRAb 均阴性,无甲状腺疾病个人史和家族史,未触及甲状腺肿,均无心脏、肾脏、肝脏疾病病史。

本研究经过受检者知情同意,并通过医院伦理委员会的审批。受检者早晨空腹抽取静脉血并通过 4°C , $4\,000\text{ r/min}$ ($r=5\text{ cm}$), 离心 10 min, 所得血清于 -80°C 冰箱储存。

1.2 试剂和仪器 本室研制的用 96 孔板定量测定 hTPOAb 的 CLEIA 试剂盒。Fluoroskan Ascent FL 化学发光分析仪为美国 Thermo 公司生产,辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗体 IgG 购自北京鼎国生物技术有限公司,其他均为进口或国产优级纯、分析纯试剂,实验用水为超纯去离子水。

1.3 检测方法

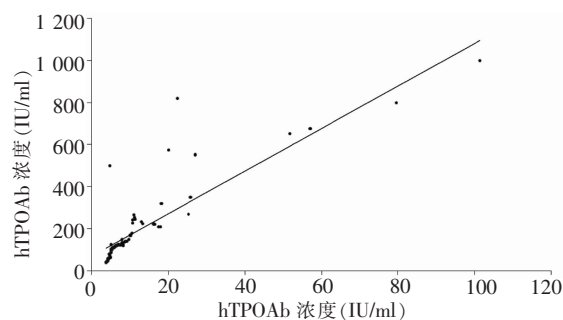
1.3.1 抗原包被 以原核表达系统表达的,经分离纯化所得的人甲状腺过氧化物酶膜外区抗原决定簇热点区基因表达的融合蛋白为包被抗原,以中国药品生物制品检定所的 WHO Anti-hTPOAb RS (66/387) 为对照品,经协作标定后的标准品为本方法的参考标准,通过一系列试验条件优化筛选,建立了用 96 孔板定量测定 hTPOAb 的 CLEIA 技术并组装成试剂盒。96 孔板 4°C 过夜,漂洗封闭后分别加入待测样品和标准品,然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人抗体 IgG,漂洗后加入鲁米诺发光底物,经过 Fluoroskan Ascent FL 仪器测量其发光强度值,根据标准曲线即可以计算出样品中 hTPOAb 的浓度。

1.3.2 相关性分析 采用本室研制的 hTPOAb CLEIA 试剂盒及雅培公司的 AXSYM System 的 Anti-hTPOAb 试剂盒,从上述 200 例甲状腺疾病患者血清中随机抽取 76 份血清进行 hTPOAb 检测,并对检测结果进行相关性分析。

1.4 统计学处理 检测结果经过 Kolmogorov-Smirnov 检验,非正态分布数据,结果以中位数表示,采用秩和检验进行比较(两组之间比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验),率的比较用 χ^2 检验。所用统计软件为 SPSS 17.0。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 相关性分析 本室研制的 hTPOAb CLEIA 试剂盒与雅培公司的 Anti-hTPOAb 试剂盒,这两种检测方法的结果呈正相关($r=0.80$, $P < 0.01$),见图 1。



注:横坐标为本室研制的 hTPOAb CLEIA 试剂盒检测的浓度,纵坐标为雅培公司 AXSYM System 的 hTPOAb 试剂盒检测的浓度;hTPOAb:人甲状腺过氧化物酶抗体

图 1 两种检测试剂盒相关性分析

2.2 精密度 本室研制的 hTPOAb CLEIA 试剂盒测定阳性、阴性对照血清的批内变异分别为 5.32%、13.17%;批间变异两个月连续测定 6 次,阳性、阴性对照血清的批间变异分别为 7.53%、14.87%。

2.3 hTPOAb 阳性切限值的建立 以正常人组血清 hTPOAb 浓度值为代表,结果显示 hTPOAb 为正偏态分布($P < 0.01$),因此,所得结果以百分位数表示,以其 hTPOAb 浓度高于 95 百分位即 3.22 IU/ml 为阳性。

2.4 hTPOAb 试剂盒检测结果 测定结果以中位数表示,桥本甲状腺炎为 5.48 IU/ml; Graves 病为 1.88 IU/ml; 结节性甲状腺肿为 1.83 IU/ml; 亚急性甲状腺炎为 2.54 IU/ml; 单纯性甲状腺肿为 2.21 IU/ml。桥本甲状腺炎患者血清 hTPOAb 阳性率高于其他患者,见表 1。

表 1 各类甲状腺疾病患者血清 hTPOAb 检测结果

病种	例数	阳性率[$n(\%)$]	χ^2 值 ^a	P 值
桥本甲状腺炎	94	86(91.50)	-	-
Graves 病	68	20(29.40)	67.22	<0.01
结节性甲状腺肿	19	2(10.50)	60.13	<0.01
亚急性甲状腺炎	10	2(20.00)	35.49	<0.01
单纯性甲状腺肿	9	0(0)	49.89	<0.01

注:^a:桥本甲状腺炎患者 hTPOAb 阳性率与其他患者分别比较的值;hTPOAb:人甲状腺过氧化物酶抗体

3 讨论

我国 hTPOAb 的测定开始于 20 世纪 80 年代,主要是定性测定,经历了放射免疫分析法测定甲状腺微粒体抗体(TMAb),该方法本身存在的缺点使得它逐渐被新的无放射污染的方法所替代,同时由于该法测定的是 TMAb,并非纯的 hTPOAb,因此 TMAb 检测技术的特异性低于 hTPOAb 的检测。

近年来,国内临床上检测 hTPOAb 多引进国外定量测定试剂盒,其是以提取的高纯度甲状腺过氧化物酶为抗原,但是由于甲状腺过氧化物酶是一种膜蛋白,纯化困难,提取时可能会混杂其他甲状腺自身抗原(如甲状腺球蛋白)的污染,会影响结果的可靠性。虽然后来提取工艺得到了改善,与以前粗提的甲状腺微粒体抗原相比减少了其他混杂的甲状腺抗原的干扰几率,但是来源仍然有限。目前国内、外各个商家生产的 hTPOAb 发光免疫技术的试剂盒测定仪器昂贵,检测费用较高,在国内进一步推广较难。此外,每个商品试剂盒的阳性切限值均为生产厂家自行确定,尚无统一的标准并且相差很大,范围在 4~60 IU/ml^[4-5]。

本研究以人甲状腺过氧化物酶膜外热点区基因表达产物,并经纯化的融合蛋白 GST-人甲状腺过氧化物酶为抗原,建立 CLEIA 方法对常见的甲状腺疾病进行检测,由于重组甲状腺过氧化物酶来源几乎

不受限制,且又无其他甲状腺抗原污染,特异性好,所以可以更好地应用于 hTPOAb 的检测,但至今尚未见用基因工程产品为抗原的定量检测 hTPOAb 商品试剂盒的报道。

本实验室前期的研究已经建立了荧光酶免疫分析法检测 hTPOAb^[6]。荧光是一种光致发光现象,必须提供光源去激发分子产生能级跃迁,进而发光。化学发光是利用化学反应产生的能量促使产生能级跃迁,从而发光^[7-9]。使用上述两种方法进行免疫分析时,其区别很明显,化学发光无需外加光源,背景干扰小;而荧光则需要外加光源,由于血清样品中的蛋白质、氨基酸等分子也会产生背景荧光,需要选择合适的荧光试剂减少非特异性吸附蛋白的影响。荧光酶免疫分析法对酶催化的荧光底物有着严格的要求,而且在加入荧光底物后,如果不加任何干预,酶所催化的反应过程很难达到稳定的状态,测量随时间延长结果变化较大,所以还得加入终止液 EDTA,1 h 之内测定,这样使得测定的时间延长。

本化学发光法与荧光酶免疫分析法检测 hTPOAb 相比,对桥本甲状腺炎检测阳性率更高(91.5% vs. 85.7%),说明本法比荧光酶免疫分析法更灵敏^[6]。在 Graves 病、结节性甲状腺肿、亚急性甲状腺炎患者中也有一定的阳性率,与荧光酶免疫分析法报道一致。

对于一种检测方法来说,阳性切限值的确立非常重要。笔者按照美国国家临床生化协会指南推荐的以年龄低于 30 岁、血清促甲状腺激素浓度在 0.5~2.0 mIU/L、无甲状腺肿大、无个人及家族甲状腺病史且无其他自身免疫疾病的男性青年为入选标准,筛选了 133 例基本符合上述条件的健康男性的血清标本作为正常对照组^[10]。30 岁以下的男性青年血清抗体滴度最低,因为在该组健康人群中仅有少数出现 hTPOAb 大于 3.22 IU/ml 属于阳性,而且滴度都较低(hTPOAb 在 3.5~4.0 IU/ml 之间),所占比例也不多(阳性率为 5.26%)。所以以其测定值来制定阳性切限值,可以提高自身抗体的检出率。

综上所述,本技术用重组的人甲状腺过氧化物酶膜外区蛋白为抗原建立的 96 孔板的定量 CLEIA 来检测 hTPOAb,桥本甲状腺炎组 hTPOAb 水平与其他几组甲状腺疾病比较,其阳性率显著升高($P < 0.01$)。因此,对桥本甲状腺炎的诊断也具有特异的临床意义^[11]。由于重组的人甲状腺过氧化物酶抗原纯、来源稳定、可靠,方法灵敏、特异、简便,便于推广,可常规用于临床。

参 考 文 献

- [1] Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto's thyroiditis: clinical and diagnostic criteria[J]. Autoimmunity Rev, 2014, 13 (4-5):391-397. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.007.
- [2] Rho MH, Kim DW, Hong HP, et al. Diagnostic value of antithyroid peroxidase antibody for incidental autoimmune thyroiditis based on histopathologic results[J]. Endocrine, 2012, 42 (3): 647-652. DOI: 10.1007/s12020-012-9695-y.
- [3] Pradhan M, Anand B, Singh N, et al. Thyroid peroxidase antibody in hypothyroidism; it's effect on pregnancy[J]. J Maternal Fetal Neonatal Med, 2013, 26 (6): 581-583. DOI: 10.3109/14767058.2012.745498.
- [4] Rodriguez AJ, Jicha GA, Steeves TD, et al. EEG changes in a patient with steroid-responsive encephalopathy associated with antibodies to thyroperoxidase (SREAT, Hashimoto's encephalopathy) [J]. J Clin Neurophysiol, 2006, 23(4): 371-373.
- [5] La'ulu SL, Slev PR, Roberts WL. Performance characteristics of 5 automated thyroglobulin autoantibody and thyroid peroxidase autoantibody assays[J]. Clin Chim Acta, 2007, 376(1-2): 88-95.
- [6] 柴锦燕, 方佩华, 李宁, 等. 荧光酶免疫分析技术测定人甲状腺过氧化物酶抗体[J]. 中华核医学杂志, 2010, 30(2): 80-83. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2010.02.003.
- [7] Han J, Gao H, Wang W, et al. Time-resolved chemiluminescence strategy for multiplexed immunoassay of clenbuterol and ractopamine[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 48: 39-42. DOI: 10.1016/j.bios.2013.03.033.
- [8] Tao X, Jiang H, Yu X, et al. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and florfenicol amine in ham sausage with a hybrid chemiluminescent immunoassay[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013, 30 (5): 804-812. DOI: 10.1080/19440049.2013.781685.
- [9] 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 3-10. DOI: 10.3724/SP.J.1096.2012.10765.
- [10] Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease[J]. Thyroid, 2003, 13(1): 3-126.
- [11] Müssig K, Künle A, Säuberlich AL, et al. Thyroid peroxidase antibody positivity is associated with symptomatic distress in patients with Hashimoto's thyroiditis[J]. Brain Behav Immun, 2012, 26 (4): 559-563. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.01.006.

(收稿日期: 2015-07-04)

· 消息 ·

《国际内分泌代谢杂志》第三届编委会名单

总 编 辑 方佩华

副总编辑 冯 凭 矫叔华 曾正陪 陈祖培

顾 问 陈家伦 史铁繁 潘长玉

编 委 (按姓氏笔画排列):

于德民 王 坚 邓华聪 宁 光 白悦心 吴从愿 李光伟 李江源 李秀钧 杨文英 杨立勇
 杨明功 邱明才 邹大进 单忠艳 周智广 孟迅吾 林丽香 罗 敏 施秉银 胡 玲 胡仁明
 项坤三 倪安民 徐焱成 贾伟平 高 妍 高 硕 高 鑫 傅祖植 程 桦 董砚虎 廖二元
 谭 建 樊继援

本刊编辑部