

• 临床检验研究论著 •

# 化学发光法检测超敏促甲状腺素分析灵敏度的性能验证

曾令恒,倪永圣,赵艳华,梁欢庆,蔡银凤

(广东省佛山市南海区第三人民医院检验科 528244)

**摘要:**目的 对西门子 Centaur cp 全自动化学发光分析仪测定超敏促甲状腺素(TSH3-Ultra)分析灵敏度的性能进行验证。方法 用促甲状腺素配套稀释液作为空白样品,并以此稀释液对低浓度(浓度值为 0.010 0 mIU/L)的新鲜患者血清进行稀释,配置成低浓度系列样品作为分析灵敏度的实验样品。空白样品批内重复测定 10 次,其他系列样品日间重复测定 10 次,记录每次检测的发光强度(RLUs),计算检测下限、生物检测限、功能灵敏度等。结果 按 99.7% 可信限计算,TSH3-Ultra 检测下限为 0.001 0 mIU/L;按照国际纯粹和化学联合会的规定 TSH3-Ultra 检测下限为 0.001 1 mIU/L,与生产厂家产品说明书声明一致;生物检测限为 0.005~0.006 mIU/L,功能灵敏度为 0.006 mIU/L,低于生产厂家产品说明书声明的功能灵敏度(0.008 mIU/L)。结论 西门子 Centaur cp 全自动化学发光分析仪检测 TSH3-Ultra 分析灵敏度的性能与厂家声明性能基本一致。

**关键词:**促甲状腺素; 化学发光测定法; 检测下限; 生物检测限; 功能灵敏度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1175-02

## Validation of the analytical sensitivity of ultra-sensitive thyroid-stimulating hormone detected by chemiluminescence

Zeng Lingcheng, Ni Yonsheng, Zhao Yanhua, Liang Huanqing, Cai Yin feng

(Department of Laboratory, the Third People's Hospital of Nanhai District, Foshan, Guangdong 528244, China)

**Abstract:** Objective To validate the analytical sensitivity of ultra-sensitive thyroid-stimulating hormone(TSH3-Ultra) detected by SIEMENS Centaur cp system. **Methods** Dilution reagent of TSH was used as a blank sample and used to dilute fresh serum samples with low concentration of TSH(0.010 mIU/L) to prepare a series of low-concentration samples as experiment samples. Blank samples and other samples were repeatedly in-batch or between-batch detected for 10 times, respectively. Light detection values(RLUs) of each detection were recorded and lower limit of detection(LLD), biological limit of detection(BLD) and functional sensitivity(FS) were calculated. **Results** At 99.7% confidence interval, the LLD of TSH3-Ultra was 0.001 0 mIU/L, in accordance with 0.001 1 mIU / L suggested by International Union of Pure and Chemical Association requirements, which was consistent with the value provided by specification. The BLD was 0.005-0.006 mIU/L. The FS was 0.006 mIU/L and lower than 0.008 mIU/L provided by manufacture claim. **Conclusion** The analytical sensitivity of ultra-sensitive thyroid-stimulating hormone detected by SIEMENS Centaur cp system could be consistent with the value provided by manufacture claim.

**Key words:** thyrotropin; chemiluminescent measurements; lower limit of detection; biological limit of detection; functional sensitivity

西门子 Centaur cp 全自动化学发光分析仪检测超敏促甲状腺素(TSH3-Ultra)采用直接化学发光双抗体夹心法,厂家给出的检测下限(low limit of detection, LLD)为 0.001 0 mIU/L,功能灵敏度(functional sensitivity, FS)为 0.008 mIU/L。为得到本实验室 TSH3-Ultra LLD、生物检测限(biologic limit of detection, BLD)以及 FS,建立适合本实验室低值 TSH3-Ultra 定量报告模式,作者参照文献[1-3]进行了本研究,现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 检测仪器** 德国西门子 Centaur cp 全自动化学发光分析仪。

**1.1.2 检测试剂** TSH3-Ultra 定量检测试剂由主试剂包、稀释液、发光试剂和校准品组成,均为由德国西门子公司提供的原装配套试剂,主试剂批号为 114254,校准品批号为 CH54。质控品为美国伯乐公司生产的化学发光质控物,低、中、高值批号分别为 40231、40232、40233。

**1.1.3 样品制备** 以 TSH3-Ultra 的配套稀释液作为空白样品,编号为 S0。收集 20 例本院门诊和住院患者 TSH3-Ultra 检测浓度为 0.010 0 mIU/L 的新鲜混合血清,重复检测 5 次,去除最高值和最低值计算其均值( $\bar{x}$ )为该血清的 TSH3-Ultra

浓度值,用稀释液进行系列稀释,最终组成预测值为 0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.010 mIU/L 的系列低水平实验样本,各自分装成 10 管,依次编号为 S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10,放 -20 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 样品测定** 按标准操作规程对仪器进行维护保养、校准和质控。空白样品批内重复测定 10 次;稀释后的系列低浓度实验样品日间重复测定 10 次,记录其发光强度(RLUs),计算各组 RLUs 的  $\bar{x}$ 、标准差( $s$ )。

**1.2.2 LLD** 按 99.7% 可能性定义 LLD,  $LLD = \text{空白} + 3s_{\text{空白}}$  [4]。按照国际纯粹和应用化学联合会规定测量置信水平为 99.7% 时,LLD 由下式算出:  $LLD = 3s_{\text{空白}} / \text{标准曲线斜率}$  [5]。

**1.2.3 BLD** BLD 以 LLD 加 3 倍 LLD 样品  $s$  的方式,确定检测系统可定量报告分析物的最低浓度。以 TSH3-Ultra 的 LLD 的 RLUs 为界,在其系列低浓度结果中,某浓度下的 RLUs 均值减去 3 倍该样品 RLUs 的  $s$ ,仍大于、并与 LLD 的 RLUs 最接近的对应的浓度为 BLD。即  $3s$  检测响应量均比空白检测响应量大时的对应浓度即为 BLD [4]。

**1.2.4 FS** 以日间重复变异系数(CV)为 20% 时对应检测限样品具有的平均浓度,确定检测系统可定量报告分析物的最低

浓度。TSH3-Ultra 系列低浓度日间重复测定 RLU<sub>s</sub> 均值减去空白样品 RLU<sub>s</sub> 均值后, CV 为 20% 或最接近 20% 的对应浓度即为 FS<sup>[4,6]</sup>。

1.3 数据处理 应用 Excel2003 软件进行数据分析。

表 1 TSH3-Ultra 分析灵敏度实验结果(RLU<sub>s</sub>)

项目	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
第 1 天	138.1	178.9	189.9	195.5	198.9	272.1	272.6	275.4	313.0	346.8	349.0
第 2 天	140.2	145.5	145.6	189.7	199.3	223.2	298.0	243.0	303.2	338.3	356.7
第 3 天	119.6	137.8	146.2	153.2	233.5	261.1	301.2	289.6	308.8	324.5	366.2
第 4 天	132.1	197.7	173.2	169.0	189.9	231.4	243.5	277.2	303.1	321.7	346.2
第 5 天	129.0	201.4	182.3	182.0	221.2	208.9	250.8	288.7	312.8	327.6	382.1
第 6 天	139.8	137.6	160.3	256.3	298.9	280.0	238.9	297.7	334.5	324.5	368.5
第 7 天	132.1	145.6	158.7	172.8	253.0	199.9	225.0	296.5	293.8	313.5	322.2
第 8 天	123.5	156.9	224.3	199.6	273.3	264.5	252.3	310.0	267.5	284.1	368.7
第 9 天	132.4	193.5	231.0	246.6	173.3	199.5	262.8	322.1	265.2	346.8	359.8
第 10 天	143.5	143.5	153.2	179.8	235.6	299.9	235.5	247.7	256.3	348.9	325.0
$\bar{x}$	133.0	163.8	176.5	194.5	227.7	244.1	258.1	284.8	295.8	327.7	354.4
<i>s</i>	76.2	261.6	306.9	329.7	393.7	360.1	257.3	250.3	250.8	195.8	192.7

表 2 TSH3-Ultra 分析灵敏度计算结果

项目	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
$\bar{x}$ (RLU <sub>s</sub> )	308	434	614	947	1 110	1 250	1 518	1 628	1 946	2 214
<i>s</i> (RLU <sub>s</sub> )	216.6	306.9	329.7	393.7	360.1	257.3	250.3	250.8	195.8	192.7
CV(%)	84.9	70.6	53.7	41.6	32.4	20.6	16.5	15.4	10.1	8.7
$\bar{x}-3s$	-477	-486	-375	-235	30	478	767	875	135.9	163.6

2.3.1 按 99.7% 可信限计算 LLD。LLD = 空白 + 3*s*<sub>空白</sub> = 1 330 + (3 × 76.2) = 1 558.6。实际上若以 S0 组 RLU<sub>s</sub> 为检测的起点 0, 每次只做一个空白时那么有 99.7% 可能性, 出现最高的空白 RLU<sub>s</sub> 较该空白 RLU<sub>s</sub> 高 3*s*, 这些 RLU<sub>s</sub> 相当于样品中具有的 TSH3-Ultra 量即为 LLD。本实验中空白样品 3*s* 为: 3 × 76.2 = 228.6, 现在 S0 组扣除空白后  $\bar{x}$  为 2 214, 若 TSH3-Ultra 含量与 RLU<sub>s</sub> 间呈线性相关, 则 228.6 相当于: 0.010 × (228.6 / 2 214) = 0.001 0 mIU/L, 即 TSH3-Ultra 的 LLD 为 0.001 0 mIU/L。

2.3.2 按照国际纯粹和应用化学联合会规定测量置信水平为 99.7% 时方法的 LLD 由下式算出: LLD = 3*s*<sub>空白</sub> / 标准曲线斜率。对 TSH3-Ultra 浓度值和其对应的 RLU<sub>s</sub> 进行回归分析, 得出回归方程为: Y = 210.058X + 41.66, *r*<sup>2</sup> = 0.992 2。以实验测得的 RLU<sub>s</sub> 为纵坐标, TSH3-Ultra 预期浓度为横坐标, 绘制 TSH3-Ultra 系列浓度与 RLU<sub>s</sub> 回归曲线, 结果显示 LLD = 228.6 / 210.058 = 0.001 1 mIU/L。

2.4 由表 2 计算得出, 0.005 实验样品的 RLU<sub>s</sub> 减 3*s* 后 RLU<sub>s</sub> 为 30, < 228.6; 而 0.006 实验样品的 RLU<sub>s</sub> 减 3*s* 后 RLU<sub>s</sub> 为 478, > 228.6, 故 BLD 为 0.005 ~ 0.006 mIU/L。

2.5 绘制浓度与 CV 关系曲线图, 以 TSH3-Ultra 预期浓度为 X 轴, 各浓度 CV 为 Y 轴, 结果显示当 CV 为 20% 时对应的 TSH3-Ultra 浓度约为 0.006 mIU/L, 即本检测系统测定 TSH3-Ultra 的 FS。

## 2 结 果

2.1 空白样品与系列低浓度样品检测 10 d 的 RLU<sub>s</sub> 见表 1。

2.2 分析灵敏度计算结果见表 2。

2.3 LLD

## 3 讨 论

血清促甲状腺激素(TSH)测定方法已经历了 4 个阶段: (1)第 1 代 TSH 测定主要采用放射免疫测定(RIA)技术, 灵敏度较差(1~2 mIU/L), 可以诊断原发性甲状腺功能减退症(原发性甲减), 但无法区别甲状腺功能亢进(甲亢)和健康者。(2)第 2 代 TSH 测定以免疫放射法(IRMA)为代表, 敏感性和特异性明显提高, 灵敏度达 0.1~0.2 mIU/L, 称为敏感 TSH (sensitive TSH, sTSH)测定。该方法已经能够诊断甲亢, 但仍不能诊断部分亚临床甲亢。(3)第 3 代 TSH 测定以免疫化学发光法(ICMA)为代表, 灵敏度为 0.01~0.02 mIU/L。在甲亢的诊断中第 3 代 TSH 测定已基本可以取代促甲状腺素释放激素(TRH)兴奋试验和 T3 抑制试验。(4)第 4 代 TSH 测定以时间分辨免疫荧光法(TRIFA)为代表, 灵敏度可达 0.001 mIU/L。第 3、4 代 TSH 测定方法称为超敏感 TSH (ultrasensitive TSH)测定。目前本科采用的为第 3 代超敏感 TSH 化学发光法(TSH3-Ultra), 经厂家改进试剂配方后 TSH3-Ultra LLD 为 0.001 0 mIU/L, FS 为 0.008 mIU/L, 良好的分析灵敏度以及宽广的分析范围(0.008~150 mIU/L)足可满足临床对甲状腺功能判断的要求。

LLD 是指样品单次检测可以达到的非空白检测响应量对应的分析物量。检测系统或方法小于或等于 LLD 的分析物量只能报告“无分析物检出”。通常以  $\bar{x}$ <sub>空白</sub> + 2*s*<sub>空白</sub> 和  $\bar{x}$ <sub>空白</sub> + 3*s*<sub>空白</sub> 来分别估计 95.0% 和 99.7% 两种可能性。(下转第 1178 页)

病为表现的代谢性疾病。糖尿病患者空腹血糖和 TG 是促进 G-LDL 形成的重要因素。TG 主要存在于  $\beta$ -脂蛋白(极低密度脂蛋白)中<sup>[4]</sup>。 $\beta$ -脂蛋白可以在血浆中转化为 LDL,故可以视为糖化反应的前体。另外糖尿病患者除有高血糖、高脂血症表现外,还常伴高胆固醇血症。究其成因,目前认为是高胰岛素血症促进了  $\beta$ -羟  $\beta$ -甲戊二酰还原酶的合成<sup>[5]</sup>,进而加速胆固醇的合成。有研究表明,G-LDL 与胆固醇具有一定相关性,也可以推断由于 G-LDL 影响了胆固醇的正常代谢而导致高胆固醇血症。

糖尿病患者体内糖化反应多为非酶促性糖基化反应<sup>[6]</sup>。G-LDL 的形成是葡萄糖和载脂蛋白中的赖氨酸或精氨酸残基结合构成 Schiff 碱,经重排后形成比较稳定的 Amadori 产物即氨基酮和半缩酮,用于临床诊断糖尿病患者的指标糖化血红蛋白就为 Amadori 产物。目前人体内发现的 20 多种 Amadori 产物中,糖尿病患者的含量普遍高于健康者 2~3 倍<sup>[7]</sup>。如果在体内长期留存多余的糖分子,Amadori 产物会进行醛化,重新排列生成衍生物结构,该结构能与许多不同大分子化合物不可逆结合,生成糖基化终产物<sup>[8-9]</sup>,在糖尿病患者慢性疾病的发生、发展中起重要作用。

糖尿病致死因素中很大一部分是由于慢性并发症而导致患者死亡<sup>[10]</sup>。在糖尿病慢性并发症中较为常见的是冠状动脉粥样硬化。G-LDL 与冠状动脉粥样硬化的关系是 LDL-糖基化后容易形成氧化性 LDL(ox-LDL)<sup>[11]</sup>,G-LDL 和 ox-LDL 均为脂蛋白,从而加重动脉粥样硬化的发生。本研究结果显示,糖尿病患者 G-LDL 水平明显升高,检测 G-LDL 作为诊断和评价糖尿病的生化指标具有重要指导意义。

参考文献:

[1] Brawnlee M. Glycation products and the pathogenesis of complica-

tions[J]. Diabets Care,2009,15(12):1835.  
 [2] 祝继华,邱大为,肖勤,等. 糖尿病大鼠低密度脂蛋白糖化率与动脉壁胶原含量变化的关系[J]. 重庆医学,2000,29(3):214-215.  
 [3] Kor tlandt W, Benchop C, Erkelens PW et al. A simple method for the measurement of total and glycated apolipoprotein B and its relevance to apolipoprotein-B metabolism in diabetes mellitus[J]. Clin Chim Acta,2008,186(1):109.  
 [4] 樊华英. 血清内源性分泌型糖基化终产物受体与 2 型糖尿病颈动脉粥样硬化的相关性研究[D]. 苏州:苏州大学,2008.  
 [5] 韩璟辰. 60 例糖尿病患者糖化血红蛋白与低密度脂蛋白水平分析[J]. 中外医疗,2011,30(12):97.  
 [6] 郭海阁. 2 型糖尿病患者糖化血红蛋白与血脂水平的相关性分析[J]. 中国误诊学杂志,2010(16):21-23.  
 [7] 孟岩,王翀,郝彦平. 糖化血红蛋白测定应用于糖尿病心血管系统并发症的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(13):1489-1490.  
 [8] 李岚岚,涂干卿. 糖化血红蛋白对糖尿病的诊断价值分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(12):1326-1327.  
 [9] 倪剑红,张明洁. 尿微量清蛋白、糖化血红蛋白及尿酸检测对糖尿病早期肾小球损害的意义[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(12):1369-1370.  
 [10] 孙颖,单忠艳,姜雅秋. 中国医科大学附属第一医院 1991 至 2010 年住院糖尿病患者死亡原因调查[J]. 中国医科大学学报,2011,40(10):949-951.  
 [11] 张清松,苏衍卿. 血糖、C-肽及糖化血红蛋白间相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(10):1259-1260.

(收稿日期:2011-10-08)

(上接第 1176 页)

BLD 定义为某样品单次检测可能具有的最小响应量刚大于空白 LLD 响应量,该样品内含有的分析物浓度或其他量值为生物 LLD。度量时,以 LLD 加 2 或 3 倍检测限样品的方式确定检测系统或方法可定量报告分析物的最低浓度或其他量值的限值。FS 又称临床灵敏度(clinical sensitivity),是指以日间重复 CV 为 20% 时对应检测限样品具有的平均浓度,这是检测系统或方法可定量报告分析物的最低浓度或其他量值的限值。该值一般比 LLD 高,由于其反映了实际检测中的灵敏度,所以更具有临床价值。Westgard 和 Ph<sup>[7]</sup>对方法学确认中的分析灵敏度包括了 LLD、BLD 和 FS。

本研究按 99.7% 可能性估计 LLD 为 0.001 0 mIU/L。按照国际纯粹和应用化学联合会规定测量置信水平为 99.7% 时 LLD 为 0.001 1 mIU/L,两种方法计算出的 LLD 均与生产厂家声明的 0.001 0 mIU/L 一致。BLD 值为 0.005~0.006 mIU/L,FS 为 0.006 mIU/L,低于生产厂家声明的 0.008 mIU/L,可能与实验室仪器状态、环境情况、实验人员对仪器的操作情况以及实验样本存在差异有关。

需要注意的是直接读出浓度单位的检测系统对于低于零的检测将报告零,其分布不是正态的,浓度的  $\bar{x}$  和  $s$  均不能如实反映分析灵敏度的真实情况。因此,本实验均使用检测响应的初始值即 RLUs 来计算  $\bar{x}$  和  $s$ ,然后再转换为浓度单位。对

于 TSH3-Ultra 的定量报告,实验室应建立或确认其定量检测限(BLD 或 FS)才能更准确、及时地为临床诊断和治疗提供更有价值的信息。

参考文献:

[1] 张亚松,谢秋燕. HITACHI7170、7600 以及 ROCHE Cobas C501 全自动生化分析仪分析灵敏度的评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(9):993-995.  
 [2] 李丽,王建新. 肌钙蛋白 I 检测系统评价及临床应用[J]. 检验医学与临床,2010,7(13):1299-1300.  
 [3] 阳莘,周秀娥,张莉萍,等. 罗氏 MODULAR E170 全自动电化学发光免疫分析仪性能验证[J]. 重庆医学,2009,38(19):2395-2397.  
 [4] 杨永业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:142-152.  
 [5] 孙蕾,郑松柏,徐建华,等. 化学发光免疫法检测 AFP 的分析灵敏度核实实验及评价[J]. 现代检验医学杂志,2007,22(3):61-62.  
 [6] 李飞,王伟佳,温冬梅,等. 化学发光免疫法检测 B 型利钠肽的检测限值和功能灵敏度研究[J]. 检验医学与临床,2011,8(18):2185-2188.  
 [7] Westgard JO, Ph D. Basic Method Validation, 3rd edition[EB/OL]. 2009-2-25. <http://www.westgard.com>.

(收稿日期:2011-10-08)