

• 论 著 •

应用 EP10-A2 对胶体金免疫层析法测胃蛋白酶原 I 进行方法学评价*

赵 亮¹, 鲁 旭², 肖 虎³, 肖林林^{3△}

(1. 安徽省阜阳市太和县中医院检验科 236600; 2. 贵州医科大学, 贵阳 550000;
3. 上海交通大学附属第六人民医院南院检验科, 上海 201499)

摘 要:目的 用胶体金免疫层析法对胃蛋白酶原 I (PG I) 试剂盒进行方法学初步评价。方法 由美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 制定的《临床定量实验方法的初步评价: 批准指南第二版 (EP10-A2)》提供的方法, 对低、中、高 3 个浓度水平血清连续检测 5 d, 收集相关数据, 分析其离散程度、线性、偏移、精密度等。结果 将 PG I 质控血清 (浓度为 25、50、100 μg/L) 按低、中、高 3 个浓度水平进行测定, 分析得出其线性回归方程为 $Y=0.993\ 9X+0.743\ 3$, $R^2=0.999\ 2$; 决对偏移分别为 0.37、0.77、0.78 μg/L, 总不精密度分别为 3.04%、1.17%、1.08%。结论 PG I 检测试剂盒胶体金免疫层析法的相关技术指标均达到 EP10-A2 文件的标准, 检测结果准确、灵敏度高、稳定性好, 符合临床应用的要求。

关键词:胃蛋白酶原 I; 胶体金免疫层析法; EP10-A2; 方法学评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.019 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)05-0622-03

Application of EP10-A2 for conducting methodological evaluation in pepsinogen I detection by GICA*

ZHAO Liang¹, LU Xu², XIAO Hu³, XIAO Linlin^{3△}

(1. Department of Laboratory, Taihe County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fuyang, Anhui 236600, China;
2. Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the South Area of the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201499, China)

Abstract: Objective To use the colloidal gold immunochromatography (GICA) method to conduct the methodological preliminary evaluation on pepsinogen I (PGI) reagent kit. **Methods** The method provide by the Preliminary Evaluation of Clinical Quantitative Experimental Methods; Approval Guide Second Edition (EP10-A2) formulated according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) was used to continuously detect the low, moderate and high concentrations of serum for 5 d, Then the related data were collected for analyzing the dispersion degree, linearity, offset, precision and so on. **Results** The PG I quality control serum (concentration 25, 50, 100 μg/L) was detected at low, medium and high concentration levels, the linear regression equation obtained by analysis was $Y=0.993\ 9X+0.743\ 3$, correlation coefficient (R^2) = 0.999 2; the offsets were 0.37, 0.77, 0.78 μg/L respectively, total imprecision was 3.04%, 1.17% and 1.08% respectively. **Conclusion** The GICA related technical indicators of PG I reagent kit reach the standards of EP10-A2 document, the detection results are accurate with high sensitivity and good stability, and conform to the requirements of clinical applications.

Key words: pepsinogen I; colloidal gold immunochromatography; EP10-A2; methodological evaluation

胃蛋白酶原 (PG) 是胃蛋白酶的前体, 由泌酸腺的主细胞合成, 在胃腔内经盐酸或已有活性的胃蛋白酶作用变成胃蛋白酶^[1]。根据其生化性质和免疫原性将其分成 2 个亚群, 组分 1~5 的免疫原性相同, 称为 PG I, 主要由胃底腺的主细胞和黏液颈细胞分泌; 组分 6 和 7 被称为 PG II, 除由胃底腺的主细胞和黏液颈细胞分泌外, 贲门腺和胃窦的幽门腺的黏液颈细胞以及十二指肠上段也能产生 PG II^[2-4]。PG I 是检测胃泌酸腺细胞功能的指标之一, 胃酸分泌增多 PG I 升高, 分泌减少或胃黏膜腺体萎缩 PG I 降低; PG II 与胃底黏膜病变的相关性较大 (相对于胃窦黏膜), 其升高与胃底腺管萎缩、胃上皮化生或假幽门腺化生、异型增值有关; PG I / PG II 比值进行性降低与胃黏膜萎缩进展相关^[5-6]。测定血清 PG I、PG II 水平及 PGR / PG II 比值对胃溃疡及胃癌患者的鉴别诊断具有重要的参考意义。临床多采用免疫法测 PG, 如酶免疫测定法 (EIA), 免疫荧光测量分析法 (IFA) 和放射免疫测定法 (RIA) 等, 胶体金免疫层析法是一种新型检测方法, 具有操作简便, 结果准确, 适合样

本量较少的实验室进行 PG 检测^[7]。

1 材料与方法

1.1 标本来源 利用低、中、高 3 个浓度水平血清作为检测标本。

1.2 仪器与试剂 北京美康基因科学股份有限公司生产的 PG I 定值血清, 低值样本的靶值为 25 μg/L, 中值样本的靶值 50 μg/L, 高值样本的靶值为 100 μg/L。试剂为北京美康基因科学股份有限公司生产的 PG I 试剂盒, PG I 稀释液及检测板, 仪器采用胶体金免疫分析仪 Mokosensor-A300。

1.3 方法

1.3.1 质控及常规操作 用试剂盒配套的校准品校准检测仪器, 按照 SOP 文件进行质控操作, 连续 5 d, 确保质控结果均在控, 方可开始评价试验。

1.3.2 试验样本的测定 根据美国临床和实验室标准协会 (CLSI) EP10-A2 文件相关规定, 按一定顺序 (中、高、低、中、中、低、低、高、高、中) 连续检测 5 d, 其中每天的第 1 个检测用

* 基金项目: 上海市奉贤区科学技术委员会基金青年项目 (20141201)。
作者简介: 赵亮, 男, 主管技师, 主要从事临床生化检验方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: 362389635@qq.com。

于预示系统,不用于统计。若此后 9 个测定结果中出现任何 1 个被拒绝、丢失或未报告,则该批次所有结果均需要重做。

1.3.3 测试结果判读 根据《临床检验质量控制技术》的规定及参照临床实验室室内质评要求,基于当前技术水平目标及参考值制定标准可知^[8]:可允许误差限度(%)=±1/4×[(参考值上限-参考值下限)/参考值均值]×100%。严格按 PG I 检测试剂盒说明书进行结果判断,若 PG I <67 μg/L,表明胃体、胃底黏膜萎缩或受损,可能与萎缩性胃炎等疾病相关;若 PG I >200 μg/L 可能与饮食、药物的刺激或幽门螺杆菌的感染有关;PG I /PG II <7.5,可能与萎缩性胃炎及幽门螺杆菌感染有关;PG I 的 95% 参考范围为 67~200 μg/L,可得试验最大允许误差为 24.9%,而最大允许总不精密度密 $CV_{总} = \sqrt{(CV_{批内}^2 + CV_{批间}^2 + CV_{日间}^2)}$,因此不计批间不精密度,由于批内不精密度应不大于 CLIA 规定总误差(TEa)的 1/4,日间不精密度应不高于 CLIA 规定 TEa 的 1/3,因此 $CV_{总} = \sqrt{(Tea/4)^2 + (Tea/3)^2}$,而且 $TEa = 1.96CV_{总} + Bias$ (95% 允许误差限),可计算最大允许总不精密度(CV%)为 10.13%,最大允许相对偏差为 5.1%。

1.4 统计学处理 试验数据采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。离群检验通过《临床化学方法学评价》中格鲁布斯(Grubbs)检验准则检验,若计算的 G 值大于系数表中相应临界值,则应将异常值舍弃。将检测结果填入预先按 EP10-A2 设计的数据处理表中,然后进行分析,包括每天原始数据汇总、偏倚总结、每天的多元回归计算、不精密度总结、回归系数的 t 检验及多元回归汇总等表。

2 结 果

2.1 图与初步评价

2.1.1 目测离群点 高、中、低 3 个浓度水平各有 15 个(共 45 个)点均绘于图中,显示无离群点,精密度较好,经计算并验证后,没有离群点,见图 1。

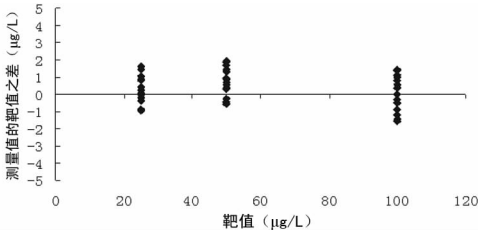


图 1 离群检验

2.1.2 目测线性 将 3 个浓度各 15 个(共 45 个)测定值均标于图上,并以 3 个水平的均值画出测定线以此为基准,既可对线性评价,亦可对偏倚作初评,PG I 测定的线性回归方程为 $Y = 0.993\ 9X + 0.743\ 3$, $R^2 = 0.999\ 2 > 0.95$,线性范围符合要

求。线性良好,偏倚较小,符合预期,见图 2。

2.2 数据分析

2.2.1 偏倚分析 见表 1。

2.2.2 不精密度分析 合并批内方差:由于每天都有相同的数据点,可简单以批内方差的平均值表示每个水平所有可接受的合并批内方差。均值的日间方差:用表 1 中的均值计算每个水平的均值日间方差。校正的日间方差:若校正的日间方差 < 0,则设为 0。见表 2。

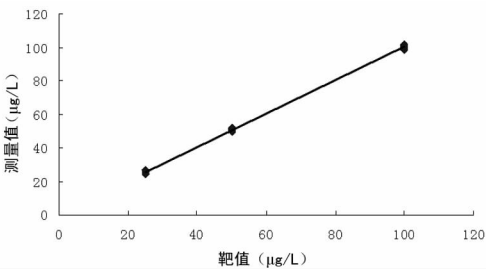


图 2 线性分析

2.2.3 多元回归分析 采用符号检验,如果所有参数的估计值有相同的符号,斜率减 1,在 $P = 0.06$ 水平时,符号检验有统计学意义。见表 3。

表 1 不同浓度水平标本连续 5 d 测定的偏倚(μg/L)

项目	低值	中值	高值
总均值	25.37	50.77	100.78
设定值	25.00	50.00	100.00
偏移	0.37	0.77	0.78
允许偏移	±2.00	±2.00	±2.00
接受或拒绝	接受	接受	接受

表 2 不同浓度水平标本连续 5 d 测定的总不精密度

项目	低值	中值	高值
合并批内方差	0.47	0.50	0.90
均值的日间方差	0.07	0.24	0.07
校准的日间方差	0.13	0.09	0.28
总不精密度方差	0.60	0.59	1.18
总不精密度标准差(μg/L)	0.77	0.77	1.09
总均值(μg/L)	25.37	50.77	100.78
总不精密度(%)	3.04	1.17	1.08
允许不精密度(%)	10.13	10.13	10.13
接受或拒绝	接受	接受	接受

表 3 不同浓度水平标本连续 5 d 测定的多元回归分析

时间 (d)	截距		斜率		交叉污染		非线性		漂移	
	数值	t	数值	t	数值	t	数值	t	数值	t
1	15.16	45.48	1.48	3.58	-1.85	-4.48	0.02	0.03	0.07	0.51
2	15.84	47.1	1.49	89.2	-1.06	-2.55	0.02	15.8	0.05	0.38
3	15.89	42.99	1.49	81.4	1.77	-3.86	-0.02	0.04	0.02	0.13
4	16.8	47.02	1.51	103	-0.73	-1.65	0.02	18.9	0.08	0.53
5	15.61	55.98	1.49	108	-0.15	-0.44	0.02	20.5	0.25	2.28
有意义否	有		有		无		无		有	

3 讨 论

EP10-A2 主要用于评价自动化仪器、试剂盒、手动程序或其他体外诊断仪器设备的线性、偏倚、不精密度、标本携带污染和漂移。按照一定顺序重复检测的 10 个样本得出的数据,进一步通过绘图及执行简单运算提供初步估计来确定设备的最终可接受性^[9]。

PG I 测定的低、中、高浓度的绝对偏倚均在允许的偏倚范围内。PG I 测定的线性良好,偏倚较小,符合预期。(1)截距和斜率有统计学意义,回归线截距反映恒定系统误差大小,斜率反映比例系统误差的大小,相关系数 r 可以帮助判断测定浓度范围对斜率和截距的评估是否合适,而不能用于判断方法是否可接受。(2)交叉污染和非线性没有统计学意义,说明试验中标本携带污染对偏移的影响在可接受范围内,且该试验具有良好的线性关系。(3)漂移有统计学意义,说明对不准确度的影响在可接受范围。PG I 测定的低,中,高 3 个浓度水平的总不精密度均小于最大允许总不精密度,均在可接受范围内且 3 个浓度水平的总补精密度均较小,说明此试验重复性很好,符合总精密度的初步评价。试验中,样本来源于厂家提供的定值质控血清,与临床实际样本血清存在差异,未将基质效应考虑入试验中,实际操作中应考虑溶血、血脂、黄疸等对结果的干扰并应进一步评价其影响因素及应对措施^[10]。

综上所述,应用 EP10-A2 对胶体金免疫层析法测 PG I 进行方法学评价,可以对 PG I 试剂盒的胶体金检测方法的线性、偏倚、总不精密度、抗交叉污染和漂移等进行初步了解,符合临床应用要求^[11]。临床联合 PG II 检测,更有助于提高诊断的灵敏度。胶体金免疫法是一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术,具有简便、省时、样本用量少、不需大型仪器、结果易判读等优点,易于临床使用^[12-13]。

参考文献

[1] Buyruk A,Osma Ü,Yilmaz MD,et al. Pepsinogen identification in the middle ear fluid of children with otitis media with effusion[J]. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg, 2016,26(2):73-78.

[2] Iguchi M,Kato J,Yoshida T,et al. Serum pepsinogen lev-

els can quantify the risk of development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection[J]. Int J Cancer, 2016,139(5):1150-1156.

[3] Kim EH,Kang H,Park CH,et al. The optimal serum pepsinogen cut-off value for predicting histologically confirmed atrophic gastritis[J]. Dig Liver Dis,2015,47(8): 663-668.

[4] 张慧,郑勇,陈卫刚,等. 肝硬化门静脉高压性胃病患者血清胃蛋白酶原水平变化及意义[J]. 山东医药,2016,56(10):44-45.

[5] 闫敏,闫华林,李明. 几种不同方法学检测胃蛋白酶原 I、II 临床应用探讨[J]. 安徽医药,2016,20(7):1334-1337.

[6] 顾红. 老年胃食管反流病患者血清胃蛋白酶原的变化及其与反流症状评分的关系[J]. 中国老年学杂志,2016,36(6):1390-1391.

[7] 刘立明,杨杰,周力,等. 胃泌素、胃蛋白酶原与肝损伤的相关性研究[J]. 贵阳医学院学报,2016,41(3):314-317.

[8] 刘春兴. 上海地区胃蛋白酶原参考值的建立及临床应用[J]. 现代检验医学杂志,2015(1):121-122,125.

[9] 高玲,颜绵生,冯品宁,等. 胃蛋白酶原 I 乳胶增强免疫比浊分析方法学评价[J]. 实用医学杂志,2011,27(12): 2249-2251.

[10] 孙鹏,毛朝明,蒋茜,等. 胃部疾病患者组织和血清中白细胞介素 23 和胃蛋白酶原 1 的变化及临床意义[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2016,32(4):523-526.

[11] Eybpoosh S,Talebkhani Y,Saberi S,et al. Age-Specific gastric cancer risk indicated by the combination of helicobacter pylori Sero-Status and serum pepsinogen levels [J]. Iran Biomed J,2015,19(3):133-142.

[12] 胡利勇,代诗翠. 血清胃蛋白酶原与脂肪酸合酶联合检测在胃癌诊断中的意义[J]. 国际检验医学杂志,2015(8): 1092-1093.

[13] 钱磊,陈为军. 血清胃蛋白酶原在胃癌早期诊断中的应用意义及价值评析[J]. 中国实验诊断学,2016(2):243-245.

(收稿日期:2016-09-18 修回日期:2016-11-10)

(上接第 621 页)

[4] Pierce Campbell CM,Menezes LJ,Paskett ED,et al. Prevention of invasive cervical cancer in the United States: past,present,and future[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2012,21(9):1402-1408.

[5] 顾彩珑,王玉萍,党秋红,等. 薄层液基细胞学检测诊断宫颈癌及癌前病变的价值[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2012,26(9):890-892.

[6] Solomon D,Naya R. The Bethesda system for reporting cervical cytology[M]. 2ed ed. New York:Springer,2004: 21-23.

[7] Tavassoli F,Devilee P. WHO classification of tumours;

pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs[M]. Lyon:IARC Press,2003:31-40.

[8] 李景然,孙玉秀,朱健生. HPV DNA 和 TCT 在宫颈癌变中的应用价值[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(3):192-195.

[9] 叶波,宋晓玉. 高危型人乳头瘤病毒检测联合薄层液基细胞学检查在宫颈疾病筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(16):2358-2362.

[10] 劳芝英. HPV、TCT 及阴道镜对宫颈癌筛查的意义[J]. 实用癌症杂志,2014,29(7):826-828.

(收稿日期:2016-08-18 修回日期:2016-10-20)