

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.06.02

❖ 基础研究 ❖

AD7c-NTP 定量检测试剂盒的性能验证及评价

汪光蓉^{1,2,3}, 卢小岚^{1,3}, 杜琴^{1,3}, 姚丽华^{1,3}, 李淑云¹, 王强^{1,2,3}

(川北医学院, 1. 附属医院检验科; 2. 医学检验系; 3. 转化医学研究中心, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 验证及评价深圳市安群生物工程有限公司研发生产的 AD7c-NTP(酶联免疫吸附法)定量检测试剂盒的性能。**方法:** 依据临床实验室标准协会(CLSI)批准的 EP15-A2 文件方法验证精密性及准确度, EP6-A 文件方法验证线性范围, C28-A3 文件方法验证生物学参考区间。**结果:** 精密性方面: 高、低浓度尿液样本批内检测结果 CV 分别为 9.50% 和 4.99%, 批间 CV 分别为 13.54% 和 10.89%, 均小于 15%; 准确度中: AD7c-NTP 阳性质控品 5 次检测均值为 6.512 ng/mL, 标准差为 0.26, CV 为 3.94%; 分析灵敏度方面: 试剂盒低值校准品 A 重复检测 20 次, 浓度均值 $C_{\text{校准品A}+2SD\text{校准品A}}$ 为 0.086 ng/mL, 光密度均值 $OD_{\text{校准品A}+2SD\text{校准品A}}$ 为 0.013, 代入标曲中对应的浓度值为 0.087 ng/mL; 线性范围方面: 高、低浓度混合尿液样本预期值与实测值的相关系数 r 为 0.996; 生物学参考区间方面: 20 份健康人尿样 AD7c-NTP 检测值范围为 0.07 ~ 0.92 ng/mL。**结论:** 深圳市安群生物工程有限公司研发的 AD7c-NTP 定量检测试剂盒的精密性、准确度、分析灵敏度、线性范围和生物学参考范围均达到了临床应用的实验要求, 各性能指标的验证方法均可作为相关实验室提供参考。

【关键词】 检验医学; 性能验证; 酶联免疫吸附法; AD7c-NTP

【中图分类号】 R749.1 **【文献标志码】** A

Performance verification and evaluation of quantitative detection kit for AD7c-NTP

WANG Guang-rong^{1,2,3}, LU Xiao-lan^{1,3}, DU Qin^{1,3}, YAO Li-hua^{1,3}, LI Shu-yun¹, WANG Qiang^{1,2,3}

(1. Department of Laboratory Medicine of Affiliated Hospital; 2. Department of Laboratory Medicine; 3. Center for Translational Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To verify and evaluate the performance of AD7c-NTP (ELISA) quantitative detection kit developed and produced by Shenzhen Anqun Biological Engineering Co., Ltd. **Methods:** The precision and accuracy were verified according to the EP15-A2 document method approved by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the linear range was verified by EP6-A document method, and the biological reference interval was verified by C28-A3 document method. **Results:** The intra-batch precision test results showed that the high and low concentration urine samples were 9.50% and 4.99%, respectively, and the inter-batch CV were 13.54% and 10.89%, respectively, both of which were less than 15%. In terms of accuracy, the average value of AD7c-NTP positive quality control products was 6.512 ng/mL, and the standard deviation was 0.26, CV was 3.94%. In the sensitivity verification of the analysis, the low value calibrator A in the kit was repeatedly tested for 20 times, the detection concentration mean $C_{\text{calibrator A}+2SD\text{ calibrator A}}$ was 0.086 ng/mL, the optical density mean $OD_{\text{calibrator A}+2SD\text{ calibrator A}}$ was 0.013, and the corresponding concentration value in the standard koji was 0.087 ng/mL. In terms of linear range verification, the correlation coefficient between the predicted value and the measured value of high and low concentration mixed urine samples was 0.996. In the biological reference interval verification, the range of AD7c-NTP detection values of 20 healthy urine samples was 0.07 ~ 0.92ng/mL. **Conclusion:** The precision, accuracy, analytical sensitivity, linear range and biological reference range of the AD7c-NTP quantitative detection kit developed by Shenzhen Anqun Biological Engineering Co., Ltd. can meet the experimental requirements of clinical application, and the verification methods of each performance index can provide reference for related laboratories.

【Key words】 Laboratory medicine; Performance verification; Enzyme-linked immunosorbent assay; AD7c-NTP

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年性痴呆, 目前世界范围内已超过 2600 万, 预计到 2050 年将超过 1 亿 600 万, 为当今全球的重大公

共卫生问题^[1-2]。但由于该病病因非常复杂, 且缺乏有效的治疗手段^[3], 因此在其发展成轻度症状之前及时给予神经保护药物或进行生活方式的干预非

基金项目: 四川省南充市市校科技战略合作项目(18SXHZ0246)

作者简介: 汪光蓉(1977-), 女, 硕士, 教授。E-mail:610926155@qq.com

通讯作者: 王强。E-mail:wqiang_1981@126.com

常关键^[4]。早发现、早诊断,以争取更多治疗或干预的时间对于延缓病情进展显得十分重要。

阿尔茨海默病相关神经丝蛋白(alzheimer-associated neuronalthread protein, AD7c-NTP)于 1997 年首次在晚期 AD 患者的颞叶脑组织中用抗胰腺丝蛋白抗体分离并命名,是一种分子量为 41 kD 的跨膜磷蛋白,主要在神经元中表达^[5]。有研究^[6]表明,AD7c-NTP 在 AD 发病过程中扮演了重要角色,与 AD 病理表现关系密切,在 AD 患者脑组织、脑脊液、尿液中均可检测出其水平升高,并且升高程度与病情严重程度具有相关性。因此,AD7c-NTP 可以作为 AD 早期诊断的重要生物标志物之一^[7]。

准确、简便的检测人尿液中 AD7c-NTP 水平,对早期筛查 AD 并及时给予药物及生活方式干预,延缓病程进展,减轻社会及家庭负担,有非常重要的意义。本研究依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)批准的 EP15-A2^[8]、EP6-A^[9]及 C28-A3^[10]文件,对深圳市安群生物工程有限公司研制的 AD7c-NTP ELISA 定量测定试剂盒进行精密度、准确度、检测灵敏度、线性范围和生物学参考范围等 5 个主要分析性能的验证,为该试剂盒在临床实验室的应用提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2020 年 6 月至 2020 年 6 月川北医学院附属医院 AD 患者的小便标本 9 例,检测 AD7c-NTP 水平,筛选出阳性高值及低值,用于实验及制备高低值混合标本;另收集健康体检人群小便样本 20 份。试剂 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒由深圳市安群生物工程有限公司研发并提供;Phomo 全自动酶标仪购自郑州安图生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 精密度验证 (1)批内精密度验证:同一批号 20200605 试剂,定标 1 次。取高、低浓度混合小便样本,连续测定 10 次,计算均值(M)、标准差(SD)、变异系数 CV(<15%为合格);(2)批间精密度验证:每天 1 批试剂,每批测定 2 个样本,每个样本复检 5 次,连续检测 4 次。计算 M、SD、CV(<20%为合格)。结果判定时,若质控品失控,则当次数据无效,当>4SD 的离群值个数大于>1 时,应考虑试验方法的稳定性或操作问题。

1.2.2 准确度验证 将阳性质控品测定 5 d,每天重复两次,计算阳性质控品测定结果 M、SD、CV(<15%为合格)。

1.2.3 分析灵敏度验证 用零浓度校准品作为样

本进行检测,重复测定 20 次,计算吸光度值(A)、M 和 SD,得出 M + 2SD 所对应的 A 值。根据试剂盒所用校准品的校准曲线方程,将 M + 2SD 所对应的 A 值代入,求出所对应浓度值,即为最低检测限,结果应符合性能指标要求(<0.25ng/mL)。

1.2.4 线性范围验证 样本要求与待检样本基质一样,取高、低浓度小便样品,按 4 L、3 L + 1 H、2 L + 2 H、1 L + 3 H、4 H 的比例配制成 5 个浓度样本,浓度覆盖已知最低和最高限。每个浓度测定 3 次,1 d 内完成。分别计算每个样本检测结果的 M,排除离群值,用线性检验 $Y = a + bX$ 计算相关系数,预期值与测量值相关系数应 >0.98。

1.2.5 生物参考范围验证 对收集的 20 份健康成人小便样本进行检测,并根据美国 CLSI 批准的 C28-A3682 文件方法进行分析,检测结果均在试剂说明书提供的参考区间内或仅有 1 个标本超出。

2 结果

2.1 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的精密度

高、低两个浓度混合小便样本批内 CV 分别为 9.50% 和 4.99%;批间 CV 分别为 10.89% 和 13.54%,均小于 15%。见表 1。

表 1 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的精密度

小便标本	批内精密度(n=10)			批间精密度(n=20)		
	M(ng/mL)	SD(ng/mL)	CV(%)	M(ng/mL)	SD(ng/mL)	CV(%)
低值	1.508	0.075	4.99	1.55	0.169	10.89
高值	3.043	0.289	9.50	2.93	0.396	13.54

2.2 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的准确度

AD7c-NTP 阳性质控品 5 次检查的均值 C_{QC} 为 6.512 ng/mL,均在 6 ng/mL 偏差 ±15% 范围内。见表 2。

表 2 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的准确度(n=5)

标本	C_{QC} (ng/mL)	SD(ng/mL)	CV(%)
阳性质控品	6.512	0.256	3.94

2.3 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的分析灵敏度

校准品 A 重复检测 20 次,浓度(C)均值 $C_{A+2SD} = 0.086 \text{ ng/mL} \leq 0.25 \text{ ng/mL}$; OD 值均值 $OD_{A+2SD} = 0.013$,代入标准曲线中对应的浓度值为 $0.087 \text{ ng/mL} \leq 0.25 \text{ ng/mL}$ 。见表 3。

表 3 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的分析灵敏度(n=20)

零浓度校准品 A	M	SD	C_{A+2SD}
OD 值	0.010	0.0012	0.087
C(ng/mL)	0.0695	0.0083	0.086

2.4 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的线性范围

预期值(L)C:0.20 ng/mL,预期值(H)C:9.62 ng/mL。由L/H计算其他C值:3L+1H:2.55 ng/mL; 2L+2H:4.91 ng/mL;1L+3H:7.26 ng/mL,将其作为预期C值。5个样本重复检测3次,实测值M分别为0.20、2.99、5.50、7.71和9.62 ng/mL。以实测值为纵坐标、预测值为横坐标进行相关回归分析,得到回归方程 $y = 1.0415x$ 。线性范围为0.20~9.62 ng/mL,预期值与实测值的相关系数 $r > 0.98$ 。见图1。

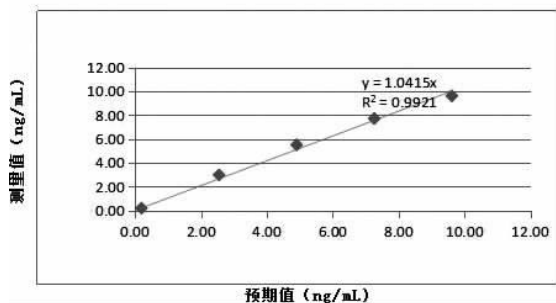


图1 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒检测线性拟合曲线

2.5 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的生物参考范围

20份健康人尿样检测值范围为0.07~0.92 ng/mL,均在AD7c-NTP说明书生物参考范围0~1.5 ng/mL内,满足不超过2例检测值不在参考范围内。见图2。

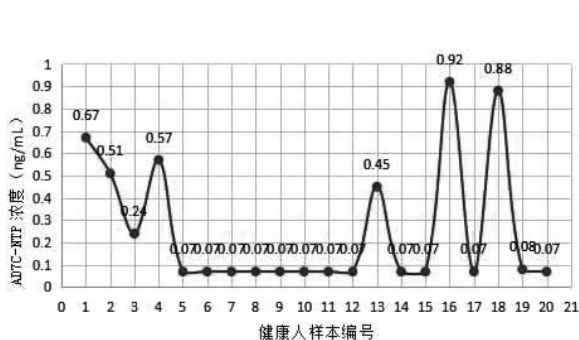


图2 AD7c-NTP ELISA 定量检测试剂盒的生物参考范围

3 讨论

AD诊断中最具特异性的生物标记物是脑脊液 β -淀粉样蛋白类(A β 42)和tau蛋白(总tau蛋白和磷酸化tau蛋白)^[11]。但由于标本获取为有创的脑脊液,患者普遍不能接受而临床应用受限。有研究^[12]证实,AD7c-NTP作为一种新的AD生物学标志物,在尿中的表达水平对早期诊断和病情评估具有重要的参考价值,而且尿AD7c-NTP诊断AD的灵敏度和特异度与脑脊液差别不大^[13],直接以尿液为标本进行检测能为多数患者接受。

目前,AD7c-NTP的检测主要为ELISA双抗体夹心法。本次评价的AD7c-NTP ELISA定量检测试剂盒为改良双抗体夹心法,可以根据已知浓度的校准品绘制出标准曲线,最终算出样本的AD7c-NTP含量。但这种通过ELISA定量检测的结果,不同于临床化学定量分析的特点。因此,非常有必要对试剂盒本身进行精密度、准确度、检测灵敏度、线性范围及生物参考范围等性能指标的验证。

本实验对AD7c-NTP ELISA定量检测试剂盒验证结果表明,低、高值尿样标本检测批内CV分别为4.99%和9.50%;批间分别为10.89%和13.54%,均小于15%,表明试剂盒精密度较好。试剂盒的准确度方面,一般用反映不准确度的偏差和偏差系数来表示。AD7c-NTP阳性质控品5次检测的均值 C_{QC} 为6.512 ng/mL,均在6 ng/mL偏差 $\pm 15\%$ 范围内,表明准确度较好。采用试剂盒中的低值校准品重复检测,算出检测浓度均值或OD均值代入标准曲线中得到对应的浓度值分别为0.086 ng/mL和0.087 ng/mL,均小于试剂盒本身规定的0.25 ng/mL,表明分析灵敏度较好。采用L(低值)~H(高值阳性尿液)进行重复检测,拟合计算出样本预期值与实测值的相关系数 r 为0.996,大于试剂盒要求的0.98,表明线性较好。20例健康人群尿液检测值介于0.07~0.92 ng/mL,均在说明书生物参考范围0~1.5 ng/mL。

综上所述,深圳安群生物工程有限公司研发生产的AD7c-NTP ELISA定量检测试剂盒的精密度、准确度、分析灵敏度、线性范围及生物学参考区间经方法学验证,产品性能符合要求。该试剂盒有检测结果准确可靠,重复性好,变异系数小,线性范围较宽等优点,可能为AD的早期诊断和病情评估提供快速便捷、可操作性强、无侵入性的重要生物学标记物检测手段。但由于标本获取受限,本实验尚存在一些不足,如对阳性样本的验证偏少、欠缺对处于医学决定水平的样本验证、未对浓度梯度的标本进行验证等。而且,关于AD7c-NTP在AD发病过程中产生表达的具体机制研究还不明确,该试剂盒对于AD早期诊断和病情评估价值的探讨尚缺乏大样本多中心数据支持,有待后续的进一步研究。

参考文献

- [1] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimer's Dement*, 2007, 3(3):186-191.
- [2] The Lancet. A global assessment of dementia, now and in the future [J]. *Journal*, 2015, 9997:931.
- [3] Mantzavinos V, Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer's disease diag-

- nosis[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(11):1149-1154.
- [4] Dekosky ST, Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders[J]. *Science*, 2003, 302(5646):830-834.
- [5] Perrin RJ, Craig-Schapiro R, Malone JP, et al. Identification and validation of novel cerebrospinal fluid biomarkers for staging early Alzheimer's disease[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1):e16032.
- [6] De La Monte SM, Garner W, Wands JR. Neuronal thread protein gene modulation with cerebral infarction[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(10):623-635.
- [7] De La Monte SM, Wands JR. Alzheimer-associated neuronal thread protein-induced apoptosis and impaired mitochondrial function in human central nervous system-derived neuronal cells[J]. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, 2001, 60(2):195-207.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2. User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline[S]. 2nd ed. Wayne, PA:CLSI, 2005.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guidelin[S]. EP6-A, CLSI, 2005.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-third edition[S]. EP28-A3c, CLSI, 2010.
- [11] Clark CM, Xie S, Chittams J, et al. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid; how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses[J]. *Arch Neurol*, 2003, 60(12):1696-1702.
- [12] 刘凯, 田立, 刘晓婷, 等. 尿 AD7c-NTP 表达水平对阿尔茨海默病早期诊断和病情评估价值的探讨[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2017, 34(8):684-686.
- [13] 严峰, 肖世富. 尿 AD7c-NTP 水平在阿尔茨海默病早期诊断及轻度认知功能障碍诊断中的研究进展[J]. *世界临床药物*, 2016, 37(5):356-359.
- (收稿日期:2020-09-22 修回日期:2020-12-03)

(上接第 684 页)

- [14] Jung O, Lee J, Lee YJ, et al. Timosaponin AIII inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and β -catenin signaling pathways[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(16):3963-3967.
- [15] Kapelko-Słowik K, Słowik M, Szaliński M, et al. Elevated serum concentrations of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in patients with Graves' orbitopathy[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(1):99-103.
- [16] Cao C, Xu N, Zheng X, et al. Elevated expression of MMP-2 and TIMP-2 cooperatively correlates with risk of lung cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46):80560-80567.
- [17] Meder L, Schuldt P, Thelen M, et al. Combined VEGF and PD-L1 blockade displays synergistic treatment effects in an autochthonous mouse model of small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15):4270-4281.
- [18] Xiang GL, Zhu XH, Lin CZ, et al. 125I seed irradiation induces apoptosis and inhibits angiogenesis by decreasing HIF-1 α and VEGF expression in lung carcinoma xenografts[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5):3075-3083.
- [19] Zhao L, Zhong Y, Liang J, et al. Effect of astragalus polysaccharide on the expression of VEGF and EGFR in mice with Lewis transplantable lung cancer[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2019, 29(4):392-394.
- [20] Deng Y, Yang Y, Yao B, et al. Paracrine signaling by VEGF-C promotes non-small cell lung cancer cell metastasis via recruitment of tumor-associated macrophages[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 364(2):208-216.
- (收稿日期:2020-12-03 修回日期:2021-01-09)