

非配套脂蛋白试剂的使用性能验证*

何 谦, 杨锐华, 王 琪 (西安交通大学医学院第二附属医院检验科, 西安 710004)

摘要:目的 对4种应用于自动生化分析仪的免疫透射比浊法检测血脂蛋白(a)[LP(a)]试剂进行分析性能验证,并初步应用于临床。方法 在Olympus AU5800自动生化分析仪上对英国RANDOX、浙江夸克、北京利德曼和北京九强公司生产的免疫透射比浊法LP(a)试剂(标为A,B,C,D)进行性能验证,对4种试剂的精密度、线性范围、准确度、干扰因素(VC,胆红素、血红蛋白、乳糜)进行评估。结果 试剂A,B,C,D的批内CV分别为0.64%~1.18%,3.59%~4.75%,1.33%~3.05%和1.43%~2.01%,批间CV分别为1.04%~1.7%,3.81%~4.93%,2.16%~4.76%和2.33%~3.21%,均小于试剂盒声明不精密密度;线性范围分别为82~923 mg/L($r^2=0.997$),130~935 mg/L($r^2=0.9964$),120~1025 mg/L($r^2=0.9921$)和117~943 mg/L($r^2=0.9995$),线性相关均良好。试验浓度内的4种干扰物($VC\leq 10$ mg/dl, $Hb\leq 200$ mg/dl, $TBIL\leq 40$ mg/dl, $TG\leq 500$ mg/dl)对试剂A和试剂D无显著干扰(偏差 $\leq \pm 10\%$),但是 $VC\geq 5$ mg/dl, $TG\geq 250$ mg/dl对试剂B有干扰, $TG\geq 250$ mg/dl对试剂C有干扰。4种试剂检测测定值血脂质控品,与靶值偏差分别为-8.07%,1.34%, -8.05%和7.38%,可满足临床需求。结论 应用于自动生化分析仪的4种测定LP(a)试剂盒,具有较高的精密度,可满足临床测试要求,但抗干扰能力存在一定差异。

关键词:脂蛋白(a);免疫透射比浊法;自动分析

中图分类号:R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)01-125-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.036

Performance Verification of LP(a) Reagents in Clinical Laboratory

HE Qian, YANG Rui-hua, WANG Qi (Department of Clinical Laboratory,

the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710004, China)

Abstract: Objective To validate the analytical performance of four LP(a) reagents with Immunoturbidimetry method used on the automatic biochemistry analyzer for preliminary clinical application. **Methods** The performance of four LP(a) reagents (labeled as A, B, C, D) with method from RANDOX, Zhejiang Kuake Co., Beijing Leadman Co. and Beijing Jiuqiang Co. on Olympus AU5800 automatic biochemistry analyzer were assessed. The precision, linearity range, accuracy, disturbance (vitamin C, bilirubin, hemoglobin, TG) were assessed. **Results** The within-run CVs of the four reagents (A, B, C and D) were 0.64%~1.18%, 3.59%~4.75%, 1.33%~3.05% and 1.43%~2.01% respectively. The between-run CVs in A, B, C and D were 1.04%~1.7%, 3.81%~4.93%, 2.16%~4.76% and 2.33%~3.21% respectively, lower than the stated. The linearity range was 82~923 mg/L ($r^2=0.997$), 130~935 mg/L ($r^2=0.9964$), 120~1025 mg/L ($r^2=0.9921$) and 117~943 mg/L ($r^2=0.9995$) in the four reagents, which demonstrated a sound linear correlation. For interference tests, no remarkable interferences ($< \pm 10\%$) of reagent A and reagent D were detected when Vitamin C ≤ 10 mg/dl, hemoglobin ≤ 200 mg/dl, bilirubin ≤ 40 mg/dl and $TG\leq 500$ mg/dl. Interference of reagent B was found when $VC\geq 5$ mg/dl, $TG\geq 250$ mg/dl and when $TG\geq 250$ mg/dl reagent C was interfered significantly. The four LP(a) reagents were used to detect the lipid control, and the deviations of the target value were -8.07%, 1.34%, -8.05% and 7.38% respectively. **Conclusion** When used in automatic biochemical analyzer, the four LP(a) reagents showed high precision. The four reagents are all able to meet clinical test requirements, nevertheless, anti-interference capability were different.

Keywords: LP(a); immunoturbidimetry; autoanalysis

脂蛋白(a)[LP(a)]是一种复合脂蛋白颗粒,结构类似于低密度脂蛋白,前瞻性研究已证实升高的血浆LP(a)是冠脉疾病的预测指标,可以作为心血管疾病的风险因子^[1~3]。本室拟开展此项目,故在Olympus Au5800自动生化分析仪上对4种免疫透射比浊检测法LP(a)试剂盒的精密度、线性范围、正确度、抗干扰能力进行了分析评价,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验样本

1.1.1 精密度验证混合血清:将已知LP(a)浓度的患者血清混合,制备高、低浓度两份混合血清,各分装20份于-20℃冻存用于精密度试验。

1.1.2 干扰试验血清:收集患者混合血清用于干扰试验。

1.2 试剂和仪器

1.2.1 仪器:Olympus AU5800全自动生化分析仪。

1.2.2 主要试剂:试剂A:英国RANDOX公司出品的LP(a)试剂(批号325276)及其配套校准品;

* 作者简介:何 谦(1971-),女,博士,主任技师,从事临床生化和免疫学研究, E-mail: heqian1971@163.com。

试剂 B:浙江夸克有限公司出品的 LP(a)试剂(批号 141215)及其配套校准品;试剂 C:北京利德曼生物技术有限公司出品的 LP(a)试剂(批号 412101k)及其配套校准品;试剂 D:北京九强生物技术有限公司出品的 LP(a)试剂(批号 15-0204)及其配套校准品。干扰物 VC 由 Sigma 公司提供(批号 080M0097V),Hb 由 Merck 公司提供(批号 D00121602),TBIL 由 Frontier Scientific 公司提供(批号 JH12-6936),TG 由华瑞制药提供(批号 80GK041)。

1.3 方法

1.3.1 批内不精密度:用 4 种试剂分别测定低值、高值两份临床新鲜血清样本,重复 20 次,计算各试剂各水平的批内变异,并确认其不精密度范围是否与厂商的名义标注不精密度符合。

1.3.2 批间不精密度:依据 CLSI EP15-A 文件^[4]所提供方案,使用室内质控物,两个水平,每天测 4 次,连续测 5 天,计算批间变异,并确认其不精密度范围是否与厂商的名义标注不精密度符合。

1.3.3 线性范围评价:根据 NCCSL EP6-A 文件^[5]选择接近线性范围上限值的血清标本 2~3 份,接近下限的血清标本 2~3 份,分别混匀,得到本实验所需的低值标本(L)和高值标本(H)。按照 L,0.8L+0.2H,0.6L+0.4H,0.4L+0.6H,0.2L+0.8H,H 的配方配制混合样本。每个标本连续测定 3 次并求平均值。判定结果:计算均值与计算理论值的差异,并将均值曲线与理论曲线进行相关分析,若 $r^2>0.95$,b 在 0.97~1.03 范围内,则可直接判断测定方法在实验所涉及的浓度范围内呈线性。

1.3.4 干扰试验:参考 CLSI EP7-P 文件^[6]提供的方案并进行部分调整后,将干扰物进行配制,在病人混合血清中加入一定体积的干扰物,干扰物浓度梯度 1,1/2,0,按照比例在病人血清中加入 VC、血红蛋白、胆红素、三酰甘油;用试剂 A,B,C,D 分别测定每个浓度混合血清,计算添加干扰物后测量的偏差。以超过±10%为标准判断是否存在干扰。

1.3.5 正确度验证:根据“临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证”这一行业标准^[7],检测 Bio-Rad 提供的定值血脂质控品,计算偏差。以超过±10%为标准判断存在偏差。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。相关性分析采用 Pearson 相关分析,线性回归采用单因素线性回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 批内不精密度试验 见表 1。用 AU5800 全自动生化分析仪测定高、低浓度两份混合血清,4 种 LP(a)试剂的实测精密度均小于厂家声称的 5%~10%。

表 1 4 种试剂的批内不精密度(n=20)

试剂	$\bar{x}\pm s$ (mg/L)		批内 CV(%)	
	低值血清	高值血清	低值血清	高值血清
试剂 A	161.90±1.03	340.45±4.02	0.64	1.18
试剂 B	220.60±7.92	392.60±18.64	3.59	4.75
试剂 C	199.75±2.66	408.85±12.47	1.33	3.05
试剂 D	195.15±2.79	431.40±8.67	1.43	2.01

2.2 批间不精密度试验 见表 2。4 种试剂的实测批间精密度均小于各自试剂盒标注的 5%~10%,可满足临床应用。

表 2 4 种试剂的批间不精密度(n=20)

试剂	$\bar{x}\pm s$ (mg/L)		批内 CV(%)	
	低值血清	高值血清	低值血清	高值血清
试剂 A	205.00±2.13	408.85±6.95	1.04	1.70
试剂 B	268.00±10.21	420.20±20.72	3.81	4.93
试剂 C	256.20±5.53	412.50±19.64	2.16	4.76
试剂 D	256.15±5.97	480.95±15.43	2.33	3.21

2.3 线性范围的评价 试剂 A,B,C,D 评价的样品浓度范围分别为 82~923,130~935,120~1 025,117~943 mg/L,预期值与实测值拟合相关方程 $Y=bX+a$ 中 b 分别为 1.016 3,1.006 7,0.986 4,1.001 7;a 分别为 -25.194,-22.924,-25.134,2.419 5,a 与 0 无显著差异(P 值分别为 0.191,0.274,0.427,0.730), r^2 分别为 0.997,0.996 4,0.992 1,0.999 5,试剂 A,B,C,D 的线性范围均良好。

2.4 干扰试验 结果见表 3。试验浓度内的 4 种干扰物($VC\leq 10$ mg/dl, $Hb\leq 200$ mg/dl, $TBIL\leq 40$ mg/dl, $TG\leq 500$ mg/dl)对试剂 A 和试剂 D 无显著干扰($<\pm 10\%$),但是 $VC\geq 5$ mg/dl, $TG\geq 250$ mg/dl 对试剂 B 有干扰, $TG\geq 250$ mg/dl 对试剂 C 有干扰,各试剂抗干扰能力存在一定差异。

试剂	Vc(mg/dl)		Hb(mg/dl)		TBIL(mg/dl)		TG(mg/dl)	
	10	5	200	100	40	20	500	250
A	-2.03	-2.70	4.23	4.93	3.39	0.85	-3.77	-3.77
B	13.37	13.95	3.13	9.38	-8.93	-2.19	58.99	37.52
C	-9.29	0.44	-9.31	1.35	-5.77	-3.85	-39.23	-32.04
D	-5.24	-5.24	2.87	5.17	3.33	-0.67	3.08	2.31

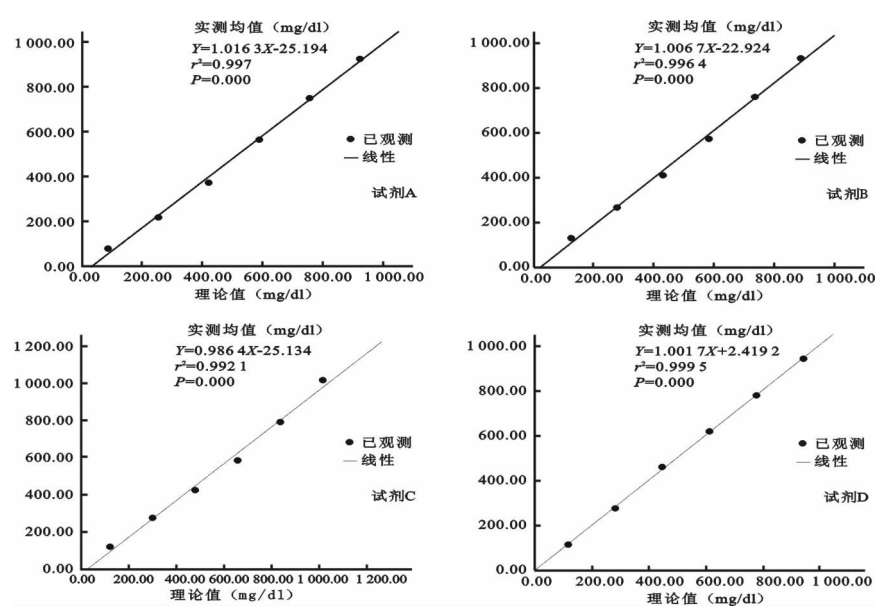


图1 试剂 A,B,C,D 线性评价

2.5 准确性验证 4 种试剂检测定值血脂质控品,与靶值偏差分别为 - 8.07%, 1.34%, - 8.05%, 7.38%,可满足临床需求。

3 讨论 ISO15189 要求临床实验室在选择测定项目的试剂盒之前,须确定其最低性能。我国“医疗机构临床实验室管理办法”也要求,临床实验室在正式使用选购的商品试剂盒之前,应对厂家声称的相关指标进行验证,以保证所选用的试剂盒达到临床实验室要求的分析性能的要求,但并不需要对厂家声明的全部分析性能进行验证。CLIA’88 明确提出临床实验室可只对正确度、精密度和可报告范围进行验证。为证实 4 种 LP(a)定量试剂盒基本性能的可靠性,我们依据 CLSI EP15-A 文件、NCCSL EP6-A 文件及“临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证”要求,对其进行了上述主要分析性能的验证。通过实验,4 种 LP(a)定量试剂盒精密、正确度和可报告范围的验证结果均在厂家标注的范围内,可满足临床检测需求。

本室还参考 CLSI EP7-P 文件对 4 种 LP(a)试剂的抗干扰能力进行了分析评价。本研究使用外源添加的 VC, TBIL, Hb 及 TG 4 种常见干扰物对 LP(a)试剂进行了干扰测试,结果显示 4 种试剂的抗干扰能力不一。TBIL 和 Hb 对 4 种试剂的干扰均较小,而 VC 和 TG 会在一定程度上干扰某些试剂的测定,尤其是 TG 引起的乳糜浊度增高干扰较大。因此,临床上测定的 LP(a)标本,应尽量避免使用乳糜血标本。由于 4 种试剂的检测原理均为透射比浊法,血浆的乳糜浊度会直接影响检测本底,理论上会对结果产生负干扰。添加外源乳糜试验发现试剂 A 和试剂 C 符合负干扰,试剂 B 和试剂 D 呈正干扰,试剂 A, D 抗干扰能力较强(偏差

均小于±10%),而试剂 B, C 抗干扰能力较弱。是否能通过高速离心的方式减少乳糜对 LP(a)测定的影响还需进一步验证。

参考文献:

[1] Malaguarnera M, Vacante M, Russo C, et al. Lipoprotein(a) in cardiovascular diseases[J]. Bio Med Res Int, 2013(2013):650989.

[2] Gurdasani D, Sjouke B, Tsimikas S, et al. Lipoprotein(a) and risk of coronary, cerebrovascular, and peripheral artery disease; the EPIC-Norfolk prospective population study[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(12):3058-3065.

[3] Lamon-Fava S, Marcovina SM, Albers JJ, et al. Lipoprotein(a) levels, apo(a) isoform size, and coronary heart disease risk in the Framingham off-spring study[J]. J Lipid Res, 2011, 52(6):1181-1187.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute EP15-A2: User demonstration of performance for precision and accuracy Approved Guideline[S]. Wayne: PA. CLSI EP15-A, 2001.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute EP6-A: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A Statistical Approach[S]. Wayne: PA, NCCLS EP6-A, 2003.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute EP7-P: Interference testing in clinical chemistry Approved Guidelin[S]. Wayne: PA, CLSI EP7-9, 1986.

[7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证[S]. 北京: WS/T 420-2013.

WS/T 420-2013, National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Verification of analytical performance of quantitative kit by clinical laboratory[S]. Beijing: WS/T 420-2013.