

## 改良后的长春恒晓脂蛋白 相关磷脂酶 A2 活性检测试剂性能验证\*

王丹晨<sup>1</sup>, 侯立安<sup>1</sup>, 国秀芝<sup>1</sup>, 秦绪珍<sup>1</sup>, 无琮<sup>2</sup>, 刘茜<sup>1</sup>, 刘荔<sup>1</sup>, 高学慧<sup>1</sup>, 夏良裕<sup>1</sup>,

程歆琦<sup>1</sup>, 邱玲<sup>1</sup> (1. 中国医学科学院 北京协和医院检验科,

北京 100730; 2. 内蒙古赤峰学院附属医院检验科, 内蒙古赤峰 024000)

**摘要:**目的 评价改良后的长春恒晓脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)活性检测试剂在 Beckman AU5800 自动生化分析仪上的分析性能。方法 收集 2017 年 9~10 月北京协和医院 110 例患者及 40 例表观健康人临床检测剩余血清, 分别用于 Lp-PLA2 方法学比对及参考区间验证。参考 CLSI 相关文件, 评价精密度、线性范围及常见干扰(结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白和乳糜)。结果 Lp-PLA2 活性测定试剂重复性 CV(%) 和实验室内不精密度 CV(%) 分别为 1.2%~4.4% 和 1.5%~5.1%; 线性范围为 40~550 U/L, 相关系数( $r$ ) 为 0.998。低 Lp-PLA2 活性混合血清在试验浓度内的四种干扰物(乳糜 $\leq 1\ 000$  FTU, 游离胆红素 $\leq 40$  mg/dl, 结合胆红素 $\leq 40$  mg/dl, 血红蛋白 $\leq 8$  g/L)对该试剂无干扰; 高 Lp-PLA2 活性混合血清在试验浓度内的三种干扰物(乳糜 $\leq 3\ 220$  FTU, 游离胆红素 $\leq 38.2$  mg/dl, 结合胆红素 $\leq 38.2$  mg/dl)对该试剂无干扰。方法学比对中回归方程的决定系数  $R^2$  为 0.995, 相关系数( $r$ ) 为 0.997。该实验室初步临床评估建立的 Lp-PLA2 活性的参考区间为 68~374 U/L。结论 改进后的 Lp-PLA2 活性测定试剂的基本性能明显提高。

**关键词:**脂蛋白相关磷脂酶 A2; 冠状动脉粥样硬化; 性能验证

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2018)04-134-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2018.04.037

### Performance Verification of Improved Lipoprotein-associated Phospholipase A2 Detection Reagent of Changchun Hengxiao Co., Ltd.

WANG Dan-chen<sup>1</sup>, HOU Li-an<sup>1</sup>, GUO Xiu-zhi<sup>1</sup>, QIN Xu-zhen<sup>1</sup>, WU Qiong<sup>2</sup>,

LIU Qian<sup>1</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, GAO Xue-hui<sup>1</sup>, XIA Liang-yu<sup>1</sup>, CHENG Xin-qi<sup>1</sup>, QIU-Ling<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Peking Union Medical College Hospital,  
Department of Chinese Academic Medical Science and Peking Union Medical College,  
Beijing 100730, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital  
of Chifeng University, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the analytical performance of modified Changchun Hengxiao lipoprotein associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity reagent on the Beckman AU5800 automatic biochemical analyzer. **Methods** The remaining serum samples of 110 patients and 40 apparently healthy individuals were collected from September to November in 2017 at Peking Union Medical College Hospital. These samples were used for method comparison and reference interval evaluation. According to CLSI documents, the precision, linearity and common interferences (free bilirubin, conjugated bilirubin, hemoglobin and chyle) were accessed. **Results** The repeatability CV (%) and reproducibility CV (%) were 1.2%~4.4% and 1.5%~5.1% respectively. The linear range was 40~550 U/L, the correlation coefficient ( $r$ ) was 0.998. Four interferences (chyle  $\leq 1\ 000$  FTU, free bilirubin  $\leq 40$  mg/dl, conjugated bilirubin  $\leq 40$  mg/dl, hemoglobin  $\leq 8$  g/L) with low Lp-PLA2 mixed serum had no interference. High level of Lp-PLA2 mixed serum had no interference with the three interferences (chylomicrons  $\leq 3\ 220$  FTU, free bilirubin  $\leq 38.2$  mg/dl, conjugated bilirubin  $\leq 38.2$  mg/dl). The determination coefficient  $R^2$  was 0.995, and the correlation coefficient ( $r$ ) was 0.997 in method comparison. The reference interval of Lp-PLA2 activity established by laboratory was 68~374 U/L. **Conclusion** The performance of the improved Lp-PLA2 activity reagent were significantly improved.

**Keywords:** lipoprotein associated phospholipase A2; atherosclerosis; performance verification

脂蛋白相关磷脂酶 A2(lipoprotein associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 主要由动脉粥样斑块中的巨噬细胞产生, 与脂蛋白相结合, 产生溶血卵磷脂和氧化游离脂肪酸<sup>[1]</sup>, 产物具有促炎症和促凋亡作用, 可促进动脉粥样硬化形成<sup>[2]</sup>。Lp-PLA2

在动脉粥样硬化发生、发展及斑块破裂中起关键作用, 是心血管疾病的独立危险因素<sup>[3~5]</sup>。目前市售的 Lp-PLA2 检测试剂包括活性和质量两种, 质量检测主要采用免疫学方法, 标本前处理时间长, 不易于大样本检测。而活性测定可直接应用于自动

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81702060)。

作者简介: 王丹晨(1993—), 女, 研究生在读, 临床检验诊断学, E-mail: 895492905@qq.com。

通讯作者: 邱玲, 女, 研究员, E-mail: lingqiubj@aliyun.com。

生化分析仪,操作简便,耗时短,故有利于临床推广。我们既往对中国食品药品监督管理局注册的4种Lp-PLA2活性试剂(上海德赛,长春恒晓,重庆中元,苏州博源)进行性能评价,发现长春恒晓Lp-PLA2活性试剂基本性能与制造商声称存在差异。为此,将结果反馈给制造商并进行相应改进后,再次进行完整性验证。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2017年9~10月北京协和医院患者临床检测剩余血清,制备不同Lp-PLA2活性的混合血清池。精密度验证血清池的浓度约为550 U/L,40 U/L,每份血清池各分装40份,−80℃冻存,试验前室温复融。分析选取浓度约为550 U/L的Lp-PLA2活性混合血清池用于携带污染试验;选取高、低水平的Lp-PLA2混合血清(约270 U/L,约180 U/L)用于干扰实验;收集20例患者血清(分离胶真空采血管)及血浆(包括EDTA、肝素、枸橼酸钠抗凝3种)标本,要求血清和血浆标本必须是同时采集,用于不同标本类型比对;收集110例患者临床检测剩余血清标本用于方法学比对;留取40例表观健康人(肝、肾功能均正常,除外溶血、脂血、黄疸)血清标本,用于参考区间验证;分析选取高、低水平的Lp-PLA2活性混合血清(约247 U/L,约152 U/L)用于试剂上机稳定性验证。本研究已经通过中国医学科学院北京协和医院伦理委员会批准(伦理审查编号:S-K336)。

1.2 试剂和仪器 试剂、质控品、校准品均由长春恒晓、上海德赛各制造商提供。所有测试均在Beckman AU5800全自动生化分析仪上进行检测。严格按照制造商提供的说明书在生化分析仪上设置参数,按照标准化操作程序进行校准和质控。

## 1.3 方法

1.3.1 精密度:参考CLSI EP-15 A2<sup>[6]</sup>方案,同时用两个不同批号的长春恒晓Lp-PLA2活性试剂检测高、低水平的Lp-PLA2活性血清池,每天4次,连续5天测定。计算重复性和实验室内不精密度。

1.3.2 线性:参考CLSI EP6-A<sup>[7]</sup>方案,将低(L)、高(H)水平混合血清,按照体积比L,0.9L:0.1H,0.8L:0.2H,0.7L:0.3H,0.6L:0.4H,0.5L:0.5H,0.4L:0.6H,0.3L:0.7H,0.2L:0.8H,0.1L:0.9H,H,配制成11个梯度的混合血清。从低到高各检测3次,记录结果。

1.3.3 携带污染:将高水平Lp-PLA2活性混合血清分装30份,−80℃冻存,检测前室温复融。高值血清分别命名为H1,H2和H3,去离子水分别命名为L1,L2和L3,以H1,H2,H3,L1,L2,L3的

顺序进样测量,连续测定5天。携带污染率绝对值<3%认为符合标准。

1.3.4 干扰:参考CLSI EP7-P<sup>[8]</sup>方案并进行部分调整后,制备含有特定干扰物浓度(游离胆红素、结合胆红素、乳糜及血红蛋白)的高、低水平Lp-PLA2活性干扰血清。低水平Lp-PLA2活性的干扰血清中游离胆红素终浓度分别为5,10,20,40 mg/dl,结合胆红素终浓度分别为5,10,20,40 mg/dl,血红蛋白终浓度分别为2,4,6,8 g/L,乳糜的终浓度分别为125,250,500,1 000 FTU。高水平Lp-PLA2活性的干扰血清中游离胆红素终浓度分别为9.6,19.1,28.65,38.2 mg/dl,结合胆红素终浓度分别为9.6,19.1,28.65,38.2 mg/dl,血红蛋白终浓度分别为2.55,5.1,7.65,10.2 g/L,乳糜的终浓度分别为805,1 610,2 415,3 220 FTU。分别测定混合血清各2次,求均值,计算添加干扰物和未添加干扰物血清测定值的预期偏差。以百分偏差超过±10%为标准,判断是否存在干扰。

1.3.5 不同标本类型比对:同时检测20例患者的血清、血浆标本,以制造商推荐的血清作为标准,计算含有不同抗凝剂的血浆与血清标本检测Lp-PLA2活性预期偏差。

1.3.6 与上海德赛Lp-PLA2活性试剂方法学比对:分别检测110例比对用血清Lp-PLA2活性,参考CLSI EP9-A2<sup>[9]</sup>方案,以上海德赛测定结果作为X,长春恒晓测定结果作为Y,绘制散点图,目测评价,显示回归方程 $Y = AX + B$ ,计算截距(intercept)、斜率(slope)以及其95%可信区间(confidence interval,CI)。

1.3.7 参考范围验证:参考CLSI C28-A2<sup>[10]</sup>文件,检测40例验证血清Lp-PLA2活性,以第2.5分位和97.5分位数作为本实验室初步评估建立的参考区间。为验证表观健康人Lp-PLA2酶活性与制造商声称的参考区间的一致性,统计分析了所有体检对象检测结果在制造商声称的参考区间内所占的百分比,评估参考人群测定值中是否有超过90%(36例)的测定值落在制造商声称的参考区间内。

1.3.8 试剂上机稳定性:制备高、低水平Lp-PLA2活性混合血清池,每天两次,连续21天检测Lp-PLA2活性,将第1天检测结果作为Lp-PLA2活性水平的真实值,计算其他时间检测结果与真实值的偏差,以差异≤5%作为标准评估试剂上机21天稳定情况。

1.4 统计学分析 采用Microsoft Excel 2016, SPSS 20.0以及Medcalc 15.0统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。相关性分析

采用 Pearson 相关性检验。采用 Passing Babloke 和 Bland Altman 分析长春恒晓、上海德赛 Lp-PLA2 活性测定试剂的相关性及偏差。

## 2 结果

2.1 精密度评价 见表 1。批号 1 重复性 CV(%) 和实验室内不精密度 CV(%) 分别为 1.4%~4.4%, 1.5%~5.1%; 批号 2 重复性 CV(%) 和实验室内不精密度 CV(%) 分别为 1.2%~3.1%, 1.9%~4.8%。

表 1 精密度评价

批号	标本	均值 (U/L)	重复性		实验室内不精密度	
			标准差	CV(%)	标准差	CV(%)
批号 1	低值样本	151	2.1	1.4	2.3	1.5
	高值样本	247	4.4	1.8	5.1	2.1
批号 2	低值样本	143	2.4	1.6	3.8	2.6
	高值样本	249	3.1	1.2	4.8	1.9

2.2 线性评价 见图 1。

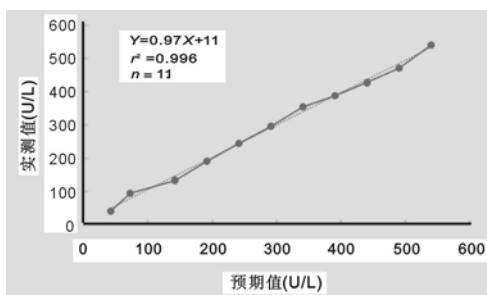
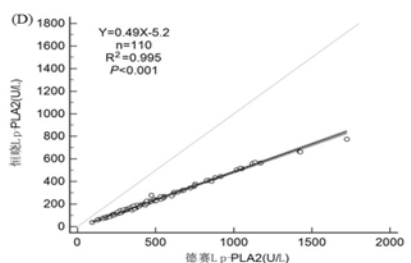
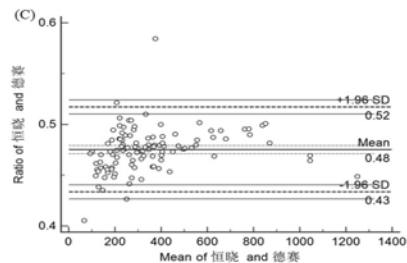
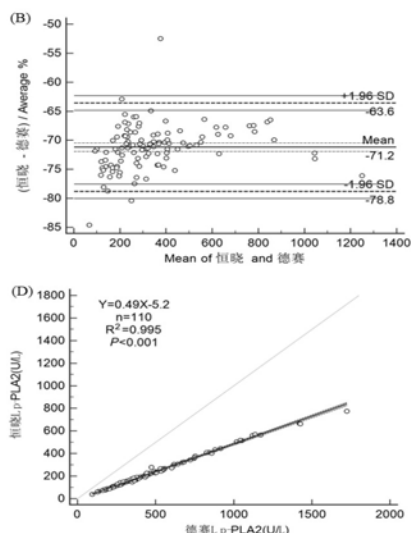
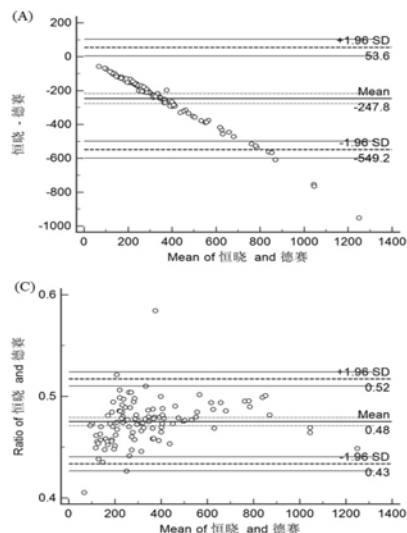


图 1 Lp-PLA2 活性测定试剂线性评价



注: (A) 长春恒晓与上海德赛方法学比对 Bland-Altman 图 (差值对均值); (B) 长春恒晓与上海德赛方法学比对 Bland-Altman 图 (差值百分比对均值); (C) 长春恒晓与上海德赛方法学比对 Bland-Altman 图 (比值对均值); (D) 长春恒晓与上海德赛方法学比对 Passing Bablok 图。

图 2 长春恒晓和上海德赛方法学比对结果

回归方程的截距 (intercept) 和斜率 (slope) 分别为 -4.6 (95% CI: -4.2~3.3) 和 0.49 (95% CI: 0.48~0.49), 决定系数  $R^2$  为 0.995, 相关系数 ( $r$ ) 为 0.997 (95% CI: 0.996~0.998)。两方法间差值 (绝对偏倚) 的平均值为 -247.8 U/L, 而所有差值分布的  $\pm 1.96s$  为 -549.2, 53.6 U/L。两方法间

长春恒晓 Lp-PLA2 活性测定试剂的线性范围为 40~550 U/L, 回归决定系数  $R^2$  为 0.996, 相关系数  $r$  为 0.998, 预期值和实测值的平均百分偏差均为 2.82%。

2.3 携带污染 该试剂携带污染为 1.56%, 小于 3%, 符合临床检测要求。

2.4 干扰试验 见表 2。低水平 Lp-PLA2 活性混合血清在试验浓度内的四种干扰物 (乳糜  $\leq 1000$  FTU、游离胆红素  $\leq 40$  mg/dl, 结合胆红素  $\leq 40$  mg/dl, 血红蛋白  $\leq 8$  g/L) 对该试剂无干扰; 高水平 Lp-PLA2 活性混合血清在试验浓度内的三种干扰物 (乳糜  $\leq 3220$  FTU, 游离胆红素  $\leq 38.2$  mg/dl, 结合胆红素  $\leq 38.2$  mg/dl) 对该试剂无干扰。但高 Lp-PLA2 活性混合血清在试验浓度内的血红蛋白均对该试剂存在干扰。

表 2 干扰评价 (百分偏差 %)

干扰物	低值标本 (180 U/L)	高值标本 (270 U/L)
乳糜	-1.54~0.53	-0.75~0.56
游离胆红素	-0.28~0.31	-5.08~-3.63
结合胆红素	-3.03~0.66	-3.41~1.52
血红蛋白	-4.67~2.41	-42.34~-21.90

2.5 不同标本类型比对 与血清相比, EDTA, 枸橼酸钠、肝素抗凝的血浆标本 Lp-PLA2 活性的百分偏差分别为 -0.2%, -16.3% 和 -3.1%。

2.6 与上海德赛方法学比对 见图 2。

差值百分比的平均值为 -71.2%, 而所有差值百分比分布的  $\pm 1.96s$  为 -78.8%, -63.6%。两方法间比值 (相对偏倚) 的平均值为 0.48, 而所有比值分布的  $\pm 1.96s$  为 0.43, 0.52。

2.7 参考范围验证 本实验室初步临床评估建立的 Lp-PLA2 活性参考区间为 68~374 U/L。40

例标本检测结果中,共有20例(50%)Lp-PLA2活性检测结果落在制造商声称的参考区间内。

2.8 试剂上机稳定性 试剂开瓶放置于自动生化分析仪器内,连续21天检测低、高混合血清的Lp-PLA2浓度,均与第1天检测结果相比,平均百分偏差分别为4.5%,1.1%。

3 讨论 本实验室于2017年对长春恒晓Lp-PLA2活性试剂盒进行性能验证,发现该试剂活性存在以下两个问题:①校准品稳定性较差,不同批号间校准品、质控品不可通用;②抗干扰(血红蛋白、游离胆红素、结合胆红素、乳糜)能力较差<sup>[11]</sup>。故将结果反馈给制造商,制造商对Lp-PLA2活性测定试剂盒的参数盒试剂进行了调整。具体修改的方案如下:①将原参数R1:75  $\mu$ l, R2:15  $\mu$ l,样本量:15  $\mu$ l调整为R1:75  $\mu$ l, R2:15  $\mu$ l,样本量:2  $\mu$ l,提高试剂抗干扰能力,同时在保证精密度的前提下提高试剂的准确性和线性范围;②在校准品中加入酶保护剂延长了校准品的保存时间;③在R2试剂中加入稳定剂,由于R2试剂溶剂为乙醇,试剂开瓶上机后,水分易挥发,加入稳定剂后,使得挥发减慢,提高试剂稳定性。

本研究结果显示,改进后的Lp-PLA2抗干扰能力有所提高,其性能参数与之前研究结果相符<sup>[11]</sup>。长春恒晓Lp-PLA2活性测定试剂改良后的基本性能较之前有所提高,能够满足临床需求。本实验室初步临床评估建立的参考区间为68~374 U/L,制造商标注的参考范围为 $\leq 220$  U/L,与初步评估结果相差较多,建议各实验室根据就诊人群建立符合各自实验室的参考范围。本研究进一步证实了EDTA抗凝的血浆、肝素抗凝的血浆对于Lp-PLA2活性检测无差异。开瓶的长春恒晓Lp-PLA2活性测定试剂可在自动生化分析仪上稳定21天,可以保证检测结果的可靠性。通过用户反馈,改进后的长春恒晓Lp-PLA2活性测定试剂的基本性能明显提高。大量研究表明Lp-PLA2是一种新型的炎症标志物,在动脉粥样硬化过程中发挥重要的作用。李薪等<sup>[12]</sup>研究发现,Lp-PLA2参与2型糖尿病及其并发症的发生发展过程,定期监测Lp-PLA2对于预防、治疗和减少糖尿病并发症的发生有着重要的临床意义。

此外,刘玥等<sup>[13]</sup>研究发现,脑微出血患者的Lp-PLA2水平明显高于正常人群。因此,保证Lp-PLA2检测结果的可靠性及准确性,可以为临床疾病预防、诊断、鉴别诊断及预后监测提供有力的保障。

参考文献:

[1] Tellis CC, Tselepis AD. Pathophysiological role and

clinical significance of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) bound to LDL and HDL [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(40): 6256-6269.

[2] Lavi S, McConnell JP, Rihal CS, et al. Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: Association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans [J]. *Circulation*, 2007, 115(21): 2715-2721.

[3] 文关良, 刺梅. 脂蛋白相关磷脂酶A2在颈动脉斑块性脑梗死中的临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(2): 117-118, 122.

Wen GL, La M. Clinical study of Lp-PLA2 in carotid plaques cerebral infarction patients [J]. *J Mod Lab Med*, 2017, 32(2): 117-118, 122.

[4] Li D, Wei W, Ran X, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risks of coronary heart disease and ischemic stroke in the general population: A systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 471: 38-45.

[5] Garg PK, McClelland RL, Jenny NS, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of incident cardiovascular disease in a multi-ethnic cohort: The multi ethnic study of atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 241(1): 176-182.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP-15-A: User demonstration of performance for precision and accuracy, Approved Guideline [S]. Wayne, PA, CLSI EP-15-A, 2001.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP6-A: Evaluation of linearity of quantitative measurement procedures [S]. Wayne, PA, CLSI EP6-A, 2003.

[8] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP7-P: Inference testing in clinical chemistry, Proposed Guideline [S]. Wayne, PA, CLSI EP7-P, 1986.

[9] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP9-A2: Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne, PA, CLSI EP9-A2, 2002.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI C28-A2: How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory, Approved Guideline [S]. Wayne, PA, CLSI C28-A2, 2000.

[11] 王丹晨, 侯立安, 邱玲, 等. 4种脂蛋白相关磷脂酶A2活性测定试剂的性能评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(3): 208-213.

Wang DC, Hou LA, Qiu L, et al. The performance evaluation of four Lp-PLA2 activity assays [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2018, 41(3): 208-213.

[12] 李薪, 魏力强. 2型糖尿病患者血清中脂蛋白相关磷脂酶A2检测的临床意义[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(6): 85-88.

Li X, Wei LQ. Clinical significance of detection of lipoprotein associated phospholipase A2 in serum of patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(6): 85-88.

[13] 刘玥, 刘西玲, 张欣, 等. Lp-PLA2, Hcy, HbA1c和LDL-C水平与脑微出血相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(6): 35-38.

Liu Y, Liu XL, Zhang X, et al. Study on the relationship between lipoprotein-related phospholipase A2, homocysteine, beta-N-1-deoxy fructosyl component of hemoglobin and cerebral microbleeds [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2017, 32(6): 35-38.

收稿日期: 2018-02-09

修回日期: 2018-06-14