

胶乳增强免疫比浊法检测脂蛋白相关磷脂酶 A2 的性能分析

涂海霞, 韩忠燕, 李妍, 王安芳

南京医科大学附属逸夫医院病理与临床检验中心, 江苏 南京 211100

摘要: **目的** 对胶乳增强免疫比浊法测定脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 进行实验室性能评估, 并对其临床应用进行评价。**方法** 选取排除心脑血管疾病、炎症疾病的、在过去 90 d 内没有服用降脂药物、年龄 18 ~ 85 岁的健康者 354 例(男、女各 177 例), 采集其空腹血清和血浆; 对配对的血清和 EDTA 抗凝血浆标本, 在室内质控合格的前提下用 Roche Cobas8000/c701 全自动生化分析仪, 采用胶乳增强免疫比浊法测定 Lp-PLA2 浓度, 并对下列参数进行分析: 精密度, 准确度, 线性, 参考区间, 试剂开封稳定性, 试剂批间比较, 特异性分析, 标本类型差异及标本稳定性。**结果** 结果显示, 精密度的平均变异系数 $\leq 4.35\%$ 。正确度平均变异系数 $\leq 2.31\%$ 。检测限平均值为 3.4 ng/ml, 变异系数为 3.89%。不同批次试剂之间相对偏差分别为 3.50% 和 4.56%。一定程度的溶血、脂血、黄疸及类风湿因子 (RF) 对 Lp-PLA2 的测定结果无明显干扰。配对血清 (含凝胶) 和血浆 (EDTA 抗凝) 的结果差异为 2.4% ($\leq 3.0\%$)。在冷藏和冷冻条件下, Lp-PLA2 浓度在上述血清和血浆标本中均可稳定 30 d。冷藏和冷冻的配对血清 (含凝胶) 和血浆 (EDTA 抗凝) 可以分别在 4 个冷藏/复温循环和 2 个冷冻/解冻循环中保持稳定。**结论** 在 Roche Cobas8000/c701 上使用胶乳增强免疫比浊法测定 Lp-PLA2, 表现出准确、精准的性能特征, 可以用于临床。

关键词: 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 胶乳增强免疫比浊法; 血清; 血浆; 性能验证; 变异系数

中图分类号: R 446.11 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)10-1412-05

Performance analysis of latex enhanced immunoturbidimetry for detection of lipoprotein-associated phospholipase A2

TU Hai-xia, HAN Zhong-yan, LI Yan, WANG An-fang

Center of Pathology and Clinical Laboratory, Sir Run Run Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 211100, China

Corresponding author: WANG An-fang, E-mail: 2501071497@qq.com

Abstract: Objective To evaluate the laboratory performance of latex enhanced immunoturbidimetry assay for the determination of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and its clinical application. **Methods** The fasting serum and plasma were collected from 354 healthy persons (177 males and 177 females, aged between 18 and 85 years), who were excluded from cardiovascular and inflammatory diseases and did not take lipid-lowering drugs in the past 90 days. For the matched serum and EDTA anticoagulated plasma samples, the concentration of Lp-PLA2 was determined by latex enhanced immunoturbidimetry using the Roche Cobas8000/c701 automatic biochemical analyzer under the condition of indoor quality control. The following parameters were analyzed: precision, accuracy, linearity, reference interval, stability of reagent unsealing, comparison between reagent batches, analysis of specificity, different sample types and sample stability. **Results** The test results showed that the average coefficient of variation (CV) of precision was less than or equal to 4.35%. The average CV of accuracy was less than or equal to 2.31%. The average detection limit was 3.4 ng/ml with CV of 3.89%. The relative deviations between the different batches of reagents were 3.50% and 4.56%, respectively. A certain degree of hemolysis, lipid blood, jaundice and rheumatoid factor (RF) had no obvious interference with the detection results of Lp-PLA2. The difference between paired serum (containing gel) and plasma (EDTA anticoagulant) was 2.4% ($\leq 3.0\%$). Under both cold and frozen storage conditions, Lp-PLA2 levels remained extremely stable for 30 days in

the above serum and plasma samples. Refrigerated and frozen paired serum (containing gel) and plasma (EDTA anticoagulant) remained stable in 4 and 2 refrigeration/resuscitation cycles, respectively. **Conclusion** Using latex enhanced immunoturbidimetry method by Roche Cobas8000/c701, the detection for Lp-PLA2 is accurate with high precision and can be used in clinical practices.

Key words: Lipoprotein-associated phospholipase A2; Latex enhanced immunoturbidimetry assay; Serum; Plasma; Performance evaluation; Coefficient of variation

Fund program: Natural Science Research Project of College and University of Jiangsu Province (18KJB310006)

脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2), 原称血小板活化因子乙酰水解酶, 由血管内膜中的巨噬细胞、T 细胞和肥大细胞分泌。动脉粥样硬化斑块中 Lp-PLA2 表达上调, 主要与低密度脂蛋白结合, 生成脂类促炎物质。研究发现 Lp-PLA2 是具有血管特异性的炎症标志物, 是冠心病和缺血性卒中的独立危险因素^[1]。因此, Lp-PLA2 的测定可作为传统心血管危险因素测量的辅助指标, 用于识别心血管疾病事件风险较高的个体^[2]。目前, 检测 Lp-PLA2 水平往往多采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 及免疫层析法 (金标法)^[3], 但这些方法学有一定缺陷。其中 ELISA 法手工繁琐, 易受 Lp-PLA2 分析前变异的影响; 金标法稳定性好, 但灵敏度较低, 只能定性, 不能定量。与二者比较, 胶乳增强免疫比浊法测定操作简单。因此, 本研究对使用乳胶强免疫比浊法测定 Lp-PLA2 浓度进行实验室性能评价, 以期选择结果稳定、重复性更好的方法。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取无糖尿病、心肌梗死、中风、高血压、自身免疫疾病、肾脏疾病、肝病、营养不良、癌症史, 排除结节病、甲状腺功能亢进症、淀粉样变性等疾病, 且在过去 90 d 内未服用降脂药物, 年龄 18 ~ 85 岁的 354 例健康者 (男、女各 177 例) 的血清、血浆标本作为受试对象。

1.2 仪器和试剂 (1) 仪器: Roche Cobas8000/c701 全自动生化分析仪 (德国罗氏); (2) 试剂: Lp-PLA2 检测试剂盒 (诺唯赞生物科技, 南京), 使用三种不同批号试剂 (G180301112、G180302112、J180301112), 质控品批号 [水平 1: 180601207, 浓度为 (169.3 ± 25.4) ng/ml; 水平 2: 180601207, 浓度为 (309.6 ± 46.4) ng/ml]; 脂乳剂使用华瑞制药生产的 20% 脂肪乳注射液 (批号为 80mc064)。

1.3 标本采集与检测 采集 354 例健康者空腹血清和血浆; 对配对的血清和 EDTA 抗凝血浆标本, 在室内质控合格的前提下在 Roche Cobas8000/c701 全自动生化分析仪上, 使用 Lp-PLA2 检测试剂盒通过胶

乳增强免疫比浊法测定 Lp-PLA2 浓度。

1.4 检测方法及性能验证

1.4.1 精密度和正确度 参考 WS/T 492-2016 文件, 精密度是每天重复测定 3 次含高、低两个浓度质控品的 Lp-PLA2 浓度, 连续测定 5 d, 计算各浓度水平的均值和变异系数 [CV (%)] 值。使用 Lp-PLA2 校准品评价其正确度, 重复测定 5 d, 每天测量 2 次, 计算均值和 CV (%) 值。

1.4.2 线性范围 通过系列回收研究确定线性, 将高值样本 H (1 000 ng/ml) 和生理盐水 L 按比例配制成为系列线性样本, 比例为 0: 50、10: 40、20: 30、30: 20、40: 10、50: 0, 每个比例测定 2 次, 将测量结果与理论的计算结果进行比较, 计算决定系数。

1.4.3 最低检出限 最低检测限是指分析方法的最小检出量, 参考 CLSI EP17-A, 按 1: 1、1: 2、1: 3 依次倍比稀释浓度最低的患者标本 8.06 ng/ml, 直至最低可检出倍数 1: 2, 重复测定 20 次该稀释倍数下的标本, 取 20 次平均值, 并计算 CV (%) 值。

1.4.4 参考区间验证 参考 CLSI C28-2 文件, 为验证表现健康人 Lp-PLA2 酶活性与试剂商标注的参考区间的一致性, 本实验统计分析 354 例健康体检者的检测结果在试剂商标注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 95% (337 例) 的测定值落在试剂商标注的参考区间内^[4]。参考区间的建立采用 Dixon 法剔除离群值。当某个观测值的 $D \geq 1/3R$ 时, 该值应当作为离群值被剔除。D 为极大或极小值与相邻值之间的绝对差值, R 为所有观测值的全距 (即极大值与极小值之间的差值)^[5], 以 95% 置信区间 (CI) 确立为其参考区间。

1.4.5 试剂开封稳定性 用同一试剂盒 (批号: G180301112) 对 2 种浓度的质控品 [水平 1: (169.3 ± 25.4) ng/ml; 水平 2: (309.6 ± 46.4) ng/ml] 进行连续 30 d 分析, 计算均值和 CV (%) 值, 通过 1 个月内质控的稳定性 (试剂说明书要求: 批间 CV ≤ 10%) 来评价已开封试剂在分析仪上的稳定性。

1.4.6 试剂批间比对 使用三种不同批号试剂 (G180301112、G180302112、J180301112) 对 20 份标

本进行检测,将批次 2 和批次 3 分别与批次 1 的测定结果相比较,计算决定系数。

1.4.7 特异性分析 通过添加潜在干扰物质[血红蛋白、脂类、胆红素和类风湿因子(RF)]来评估分析特异性,在 Cobas8000 上对 3 份受试者不同血清的 Lp-PLA2 浓度值进行测定,以获得各种溶血(H-指数)、血脂(L-指数)、黄疸(I-指数)和 RF 的干扰性。

(1)通过添加实验室制备的血红蛋白(10 g/L)对 3 个样品(124.21、177.30 和 250.32 ng/ml)进行不同浓度的 H-指数测定。(2)通过增加脂乳剂(20% 脂肪乳剂)对 3 个样品(122.37、160.84 和 343.27 ng/ml)进行脂质含量(L-指数)增加的测定。(3)通过增加胆红素(0.3 g/L)测定 3 个样品(128.99、181.34 和 332.94 ng/ml)的黄疸指数。(4)添加 RF(1 000 IU/ml),测定 3 个样品(164.7、260.2 和 336.2)^[6],按比例将干扰物质与样本混合配制成为系列线性样本,比例为 0:50、10:40、20:30、30:20、40:10、50:0,此时 RF 的终浓度分别为 0 IU/ml、200 IU/ml、400 IU/ml、600 IU/ml、800 IU/ml。每种重复测试 3 次,计算 H-指数、L-指数、I-指数超过参考范围后所对应检测结果与理论值相对偏差的平均值,计算每种浓度梯度对应的检测值与理论值相对偏差的平均值,计算 RF 每种浓度对应的检测值与理论值相对偏差的平均值,观察检测结果相对偏差的 CV 是否在 15% 以内,而判定干扰物对样本测试是否有干扰。

1.4.8 样本类型差异 通过采集 20 份配对血清(含凝胶)和血浆(EDTA 抗凝)进行样本类型比较,计算决定系数。

1.4.9 样本稳定性 采集 20 份配对血清(含凝胶)和血浆(EDTA 抗凝),在收集后 2 h 内离心后分离,分别在室温、冷藏和冷冻(-80℃)温度下储存,评估三种储存条件下的稳定期。为了评估室温、冷藏/复温、冷冻/解冻条件下的稳定性,每个循环室温为 1 h,冷藏及冷冻时间为 24 h(范围 120~226 ng/ml),每循环检测 1 次,计算循环数。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计分析软件。使用 Kolmogorov-Smirnov 检验进行正态分布分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;偏态分布资料用中位数(第 5 百分位数,第 95 百分位数)[$M(P_5, P_{95})$]表示;年龄和检测结果之间的分析采用 Spearman 秩检验;不同性别之间的差异使用 Mann-Whitney 检验;线性范围、不同批次比较、不同标本类型比较使用回归方程,若 $P < 0.05$,建立线性回归方程 $y = ax + b$,决

定系数以 R^2 表示;变异系数用百分数(%)表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度和正确度 结果显示,在所有 Lp-PLA2 浓度值下,平均 CV $\leq 5\%$ 。正确度结果,平均 CV $\leq 2.5\%$ 。

2.2 线性范围 线性决定系数 $R^2 > 0.99$ 。见图 1。

2.3 最低检出限 最低检出限平均值为 3.4 ng/ml, CV 为 3.89%(表 1)。

2.4 参考区间验证 在 354 例健康受试者中,共有 350 例(98.9%) Lp-PLA2 检测结果落在试剂商标注的参考区间内。不同年龄、性别的 Lp-PLA2 浓度无统计学意义($P > 0.05$)。全部受试者中 Lp-PLA2 浓度为 [75.05 (27.06, 148.01)] ng/ml, 95% CI 为 75.53~84.57 ng/ml(见表 1 参考区间)。

2.5 试剂开封稳定性 两个质控水平在 30 d 内检测结果 CV $\leq 6.1\%$ ($\leq 10\%$)(表 1、图 2)。在测试高 Lp-PLA2 浓度的标本(分别为 343.27、256.32 和 250.47 ng/ml)以后,另外测定了水空白,其浓度为 0 ng/ml,即空白样品未发生携带污染。

2.6 试剂批间比对 使用 3 个试剂批次,进行了分析试剂批间比较,均值分别为 250.4 ng/ml、246.8 ng/ml、250.3 ng/ml,批次 1 与批次 2 批间差异平均 CV 为 4.56%,批次 1 与批次 3 批间差异平均 CV 为 3.5%(图 3、4)。

2.7 特异性分析 观察到溶血、血脂、黄疸和 RF 的干扰,但直到干扰物质血红蛋白 > 10 g/L、脂肪 > 11.3 mmol/L、胆红素 > 0.3 g/L、RF > 600 IU/ml,才会产生 $> 15\%$ 的显著偏差。

2.8 样本类型差异 配对血清(含凝胶)和血浆(EDTA 抗凝)结果比较,差异平均为 2.4%,即实际使用时,血浆和血清标本可直接比较(图 5)。

2.9 样本的稳定性 Lp-PLA2 在血清和 EDTA 血浆中的浓度在以下条件下都是稳定的:室温保存 4 h,冷藏 31 d,冷冻(-80℃)至 30 d,及最多 3 个冻结/解冻周期。血浆或血清在收集后室温下每小时检测 1 次,4 h 内均变化不大(最大平均差异:13.7%),无论是冷藏还是冷冻,长期保存都不会改变 Lp-PLA2 的浓度,降低幅度不大于 5.2%,但超过 4 次冷藏/复温循环可使血清和血浆的酶浓度下降 15% 以上,超过 2 次冷冻/解冻循环可使血清和血浆的酶浓度下降 15% 以上。

表 1 Lp-PLA2 浓度测定的分析性能特征

参数	试剂说明书		研究成果		
精密度	批内:CV ≤ 5.0%	批内:平均值 (SD;CV)	批间:平均值 (SD;CV)		
	批间:CV ≤ 10.0%	水平 1 155.97 ng/ml(6.78;4.35%) 水平 2 353.19 ng/ml (6.88;1.95%)	水平 1 155.97 ng/ml (6.08;3.9%) 水平 2 353.19 ng/ml(10.8;3.06%)		
正确度	相对偏差:R ≤ 10.0%	2 个水平 (质控品) (n = 10) 水平 1 CV:2.31%; 水平 2 CV:1.48%。			
线性	20 ~ 1 000 ng/ml R ² ≥ 0.9900	按比例配制成为系列线性样本。见图 1。 y = 0.9996x + 0.1986; R ² = 0.9996			
最低检出限	未说明	倍比稀释浓度最低的患者标本,直至最低可检出倍数,重复测定 20 次该稀释倍数下的标本,取 20 次平均值;3.4 ng/ml, CV:3.89%。			
参考区间	0 ~ 175 ng/ml	n = 354 (男 177 例,女 177 例),年龄:18 ~ 85 岁,范围 8.06 ~ 343.27ng/ml 符合试剂商标注的参考区间要求。 95% CI(75.53,84.57)ng/ml; [M(P ₅ ,P ₉₅)]:[75.05(27.06,148.01)ng/ml]			
试剂稳定性	未说明	2 个水平 (质控品),每天一次,共 30 d。见图 2。			
		水平 1	水平 2		
批间比对	未说明	2 个水平 (质控品) (n = 20) [水平 1:(169.3 ± 25.4)ng/ml,水平 2:(309.6 ± 46.4)ng/ml] 在 3 批试剂上进行测试(批次 1 ~ 3),斜率和截距分别与批次 1 进行比对,见图 3、图 4。			
		水平 1	水平 2		
		平均值 (ng/ml):	159.3	351.5	
		CV:	6.1%	2.6%	
特异性分析	干扰	浓度	干扰	浓度	最大%差
	溶血	5 g/L	溶血	10 g/L	-16.9%
	脂血	10 mmol/L	脂血	11.3 mmol/L	-17.9%
	黄疸	未说明	黄疸	0.3 g/L	-15.4%
样本类型差异	RF	500 IU/ml	RF	600 IU/ml	-17.1%
	可接受:	配对血清 (含凝胶) 和血浆 (EDTA 抗凝) (n = 20; 范围:8.06 ~ 181.34 ng/ml)。见图 5。			
	- 血浆 (EDTA 抗凝)	差异的平均值和范围:3.0% (0.3% ~ 6.8%)			
- 血清 (含凝胶)	y = 0.9588x + 1.2433; R ² = 0.9929				

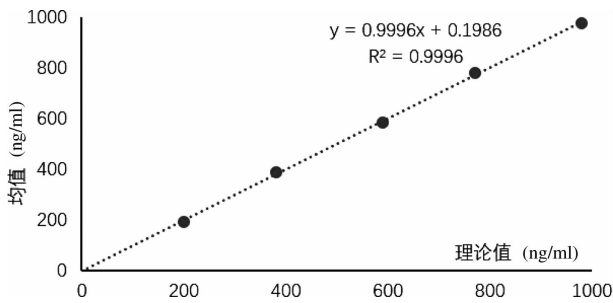


图 1 线性范围

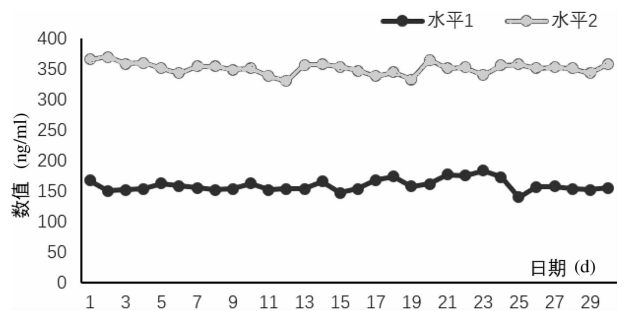


图 2 试剂稳定性

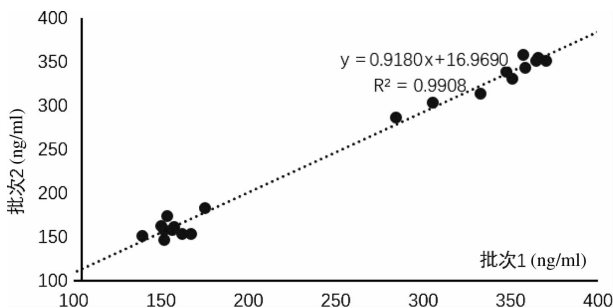


图 3 批次 1 和批次 2 比对结果

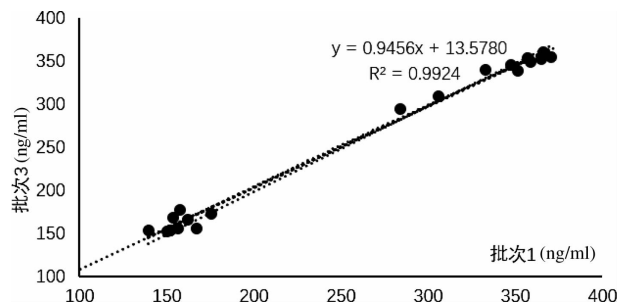


图 4 批次 1 和批次 3 比对结果

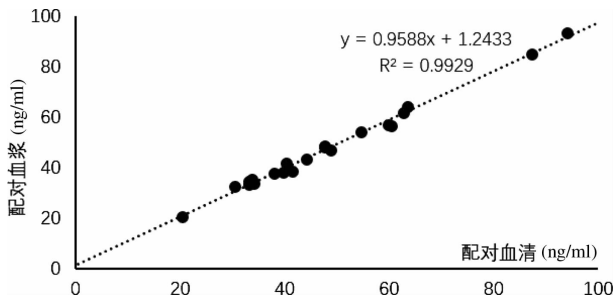


图 5 配对血清和血浆比对结果

3 讨论

冠心病及其急性并发症是全世界主要的发病和死亡原因之一。Lp-PLA2 水平与心脑血管疾病呈正相关性,是炎症的独立预测因子,因此对心脑血管栓塞性疾病的预测、治疗和预后的判断具有重要意义^[3]。现不少研究认为高效 C 反应蛋白及 Lp-PLA2 联合检测可用于短暂性脑缺血发作患者风险分层的前瞻性研究^[7-10]。

本实验显示,胶乳增强免疫比浊法 Lp-PLA2 的浓度测定结果准确、可靠,线性可接受,分析的精确性很高,无论是在血清中还是在血浆中都能得到稳定的类似的结果。研究中观察到性别差异不具有统计学意义,这与其他研究^[5]不完全一致,可能是由于患者群体的差异、样本容量不足或者不同厂家试剂及不同方法学等原因所致。当然,是否需要针对不同性别的人群进行风险预测,这将是未来研究的一个重要领域。此外,明显增高的 RF 会引起胶乳增强免疫比浊法测定 Lp-PLA2 出现假阳性,当超过干扰最大允许浓度时,可以使用生理盐水进行稀释后检测,常规生化稀释倍数的限制一般为不超过 5 倍,但该项目具体能如何稀释还需进一步研究。样品在测试前的存储条件对 Lp-PLA2 浓度的结果影响不大,在可接受范围。此外,据以往报道,ELISA 方法浓度测定结果有很大的偏差,这可能导致一批测量的结果与另一批测量的结果大不相同^[11]。本实验使用胶乳增强免疫比浊法对几个批号试剂进行了浓度检测的比较,结果没有发生漂移。

对 Lp-PLA2,目前一般应用的是检测其活性或者浓度,活性检测方法是基于底物的方法,而质量的检测方法是基于单克隆抗体的方法,但由于 Lp-PLA2 检测缺乏公认的参考物质和参考方法,故目前 Lp-PLA2 检测尚未实现标准化,这阻碍了该项目进一步扩大研究及临床的广泛应用。有研究报道,将活性与浓度的检测结果分别与质谱相比较,浓度检测得到的

数值表现出较好的一致性,而活性检测一致性较差^[12]。

综上所述,为了更好的帮助鉴别将来可能发生心脑血管疾病的患者,帮助心脑血管栓塞性疾病的预测、治疗和预后,胶乳增强免疫比浊法浓度测定 Lp-PLA2 具有相当的优势,可以成为患者检查的首选。

参考文献

- [1] Maiolino G, Bisogni V, Rossitto G, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 prognostic role in atherosclerotic complications [J]. World J Cardiol, 2015, 7(10): 609-620.
- [2] Dallmeier D, Koenig W. Strategies for vascular disease prevention: the role of lipids and related markers including apolipoproteins, low-density lipoproteins (LDL)-particle size, high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and lipoprotein(a) (Lp(A)) [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2014, 28(3): 281-294.
- [3] 谢海涛, 汤永平, 解巧丽, 等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 免疫荧光层析法的建立及临床应用 [J]. 中南医学科学杂志, 2017, 45(5): 523-527.
- [4] 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.
- [5] 丰睿捷, 胡晓晨, 赵莉芳, 等. 表观健康人群血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 参考区间的建立 [J]. 检验医学, 2017, 32(6): 495-499.
- [6] 覃志永, 吴甲文. 类风湿因子引起免疫比浊法测定肌钙蛋白 I 假阳性的分析与对策 [J]. 医药前沿, 2013(28): 131-132.
- [7] 赵振强, 胡兰, 蔡美华, 等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 和 C 反应蛋白与短暂性脑缺血发作患者风险分层的研究 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(4): 365-368.
- [8] 齐宏, 黄珊, 马祥生, 等. 同型半胱氨酸、高敏 C 反应蛋白及胱抑素 C 和脂蛋白相关磷脂酶 A2 与冠心病的相关性 [J]. 广东医学, 2014, 35(14): 2253-2256.
- [9] Rosenson RS, Vracar GM, Helenowski I. Lipoprotein associated phospholipase A2 inhibition reduces generation of oxidized fatty acids: Lp-LPA2 reduces oxidized fatty acids [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2008, 22(1): 55-58.
- [10] 陈绮映, 王丽丽, 罗颖, 等. 血浆脂蛋白相关磷脂酶 A2 活性与冠状动脉粥样硬化性心脏病血管病变支数的关系 [J]. 岭南心血管病杂志, 2017, 23(4): 373-376.
- [11] 何利娜. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lp-PLA2) 试剂盒的性能评价 [C]//中国医学装备协会第 26 届学术与技术交流年会论文集, 北京: 中国医学装备杂志社, 2017: 166-171.
- [12] Topbas C, Swick A, Razavi M, et al. Measurement of lipoprotein-associated phospholipase A2 by use of 3 different methods: exploration of discordance between ELISA and activity assays [J]. Clin Chem, 2018, 64(4): 697-704.