

## • 检验技术与方法 •

## 应用动力学分析提高透射比浊法检测脂蛋白(a)的精密度

陈 磊, 张静兰, 陈 敏<sup>△</sup>

(南京军区福州总医院检验科/全军检验医学研究所, 福州 350025)

**摘要:**目的 提高脂蛋白(a) [Lp(a)]在 Siemens Dimension RxL Max 全自动生化分析仪上的检测精密度。方法 通过反应动力学分析,选择 Lp(a)的最适检测参数,评价参数修改前后 Lp(a)的检测精密度。结果 改变参数后,在 164、215、299 mg/L 浓度,不精密度从修改前的 55.1%、36.0%、28.2%分别降低到 2.72%、2.56%、1.59%。结论 所选择的分析参数,可大幅提高 Lp(a)的检测精密度,满足临床检测要求。

**关键词:**动力学; 脂蛋白类; 精密度

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.036

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)01-0083-03

脂蛋白(a)[lipoprotein(a), Lp(a)]是人体血液中脂蛋白的成分之一,是一种富含胆固醇的脂蛋白。大量研究表明, Lp(a)是动脉粥样硬化性心脑血管病的一种独立的危险因素,血清中 Lp(a)含量的升高与冠心病、动脉粥样硬化、糖尿病肾病、肾功能衰竭等疾病密切相关<sup>[1-3]</sup>。在临床实验室中早期多常采用免疫散射比浊法进行测定,需要专用的特定蛋白分析仪,检测成本高,限制了其在临床上的广泛应用。近年来,不少试剂公司开发出能在全自动生化分析仪上使用透射比浊法进行检测的试剂盒,大大降低了开展该项目的门槛。本实验室分别在 Olympus AU2700 和 Siemens Dimension RxL Max 全自动生化分析仪应用第三方试剂公司生产的免疫透射比浊试剂盒时发现,若使用推荐参数进行检测, AU2700 的不精密度小于 5%,而 Dimension RxL Max 的不精密度很高,无法满足临床检测要求。为此,通过动力学分析,修改了 Dimension RxL Max 的检测参数,使该试剂盒应用于 Dimension RxL Max 生化仪的检测精密度得到极大提高,现报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** Siemens Dimension RxL Max 全自动生化分析仪; Lp(a)试剂(批号为 MS1211)及其配套定标品(批号为 20100722)均购自宁波美康公司; 脂类质控品(批号为 1854CH、1855CH 和 1856CH)购自英国 Randox 公司。

**1.2 动力学分析** 在仪器主界面选择 F7: Diagnostics, 再选择 F7: Kinetics 进入动力学分析界面,选择实验项目。在一号样品架的一号位装载标本,选择 F1: Start assay, 根据提示放入试剂,选择 Enter。仪器即自动开始进行动力学分析,结束后可查看反应曲线。

**1.3 精密度评价** 按操作说明书对仪器进行维护保养、校准。选择 Randox 公司提供的批号为 1854CH、1855CH、1856CH 的 3 个水平脂类质控品。按标本检验程序,连续检测每个水平质控物 40 次,计算均值、标准差及变异系数。

**1.4 分析测量范围评价** 根据 EP6-A 文件选择低浓度(L)和高浓度(H)患者标本各一份<sup>[4]</sup>,浓度范围覆盖线性范围。H 和 L 按照 20L、19L+1H、18L+2H、16L+4H、14L+6H、12L+8H、10L+10H、8L+12H、6L+14H、4L+16H、2L+18H、20H 配成系列浓度血清。每份血清在检测系统上重复测定 4 次,记录结果。实测值采用多项式回归方法,确定分析测量范围。

**1.5 相关性分析** 参照 EP9-A2 文件<sup>[5]</sup>,以室间质评成绩优秀的 AU2700 作为比较方法(X), Dimension RxL Max 作为实

验方法(Y)。每日收集新鲜血清 8 份,连续 5 d,浓度在分析测量范围内均匀分布,分别于两台生化分析仪上进行测定。测定顺序为 1、2、3、4、5、6、7、8、8、7、6、5、4、3、2、1。所有样本均在 30 min 内完成两种方法的测定。

## 1.6 数据分析

**1.6.1 精密度分析** 采用 EXCEL 2007 软件进行配对数据 *t* 检验。

**1.6.2 相关性分析** 剔除离群值并补足数据,根据相关系数  $r^2 > 0.95$  判断浓度范围对于斜率和截距合适。通过回归方程计算医学决定水平( $X_c$ )下相应的 Y 值( $Y_c$ ),得到医学决定水平的系统误差(SE)。SE 应小于关于临床血脂测定的建议中 TEa 的 1/4,即 2.5%<sup>[6]</sup>。

## 2 结 果

### 2.1 推荐参数的检测结果

**2.1.1 推荐参数** 因采用试剂说明书推荐参数时无法成功定标。根据美康公司的建议,选择了美康公司针对 Dimension RxL Max 生化仪的特定参数,该参数与试剂说明书参数略有不同。在标本加入前 60 s(-60 s)加入 R1 265  $\mu$ L、R2 65  $\mu$ L 及水 20  $\mu$ L, 0 s 时加入标本 4  $\mu$ L 及水 10  $\mu$ L, 30 s 读取第一点的浊度值 A1, 330 s 读取第二点的浊度值 A2。A2-A1 为浊度变化值。

**2.1.2 推荐参数的反应曲线** 见图 1。

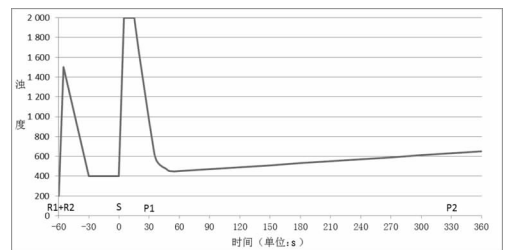


图 1 试剂推荐参数的反应曲线

**2.1.3 试剂推荐参数的精密度** 使用推荐参数进行精密度评价,3 个浓度水平 CV 最大值为 55.1%,最小值为 28.2%,无法满足临床检测要求。结果见表 1。

### 2.2 改良参数的检测结果

**2.2.1 起始与终止时间** 参照反应曲线可知,加入 R2 试剂后,需要一定时间才能达到反应平衡,因此起始时间 P1 的选择尤为关键。通过检测不同浓度标本,根据反应曲线可得到反

应平衡所需时间,见表 2。试剂说明书建议在读取 A1 后 300 s 再读取 A2,结合分析反应曲线,选择起始时间为 150 s,终止时间为 450 s。

表 1 试剂推荐参数的精密度实验

批号	靶值(mg/L)	实验值	
		$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV(%)
1854CH	164	166 ± 91.4	55.1
1855CH	215	252 ± 90.9	36.0
1856CH	299	387 ± 109.0	28.2

2.2.2 标本量及精密度 修改起始与终止时间后,精密度有较大提高,3 个水平质控的不精密度分别为 1854CH:20.2%、1855CH:17.5%、1856CH:12.4%,仍无法达到关于临床血脂测定的建议中不精密度小于 4%的要求<sup>[6]</sup>。根据仪器操作手

册建议,最小反应体积为 350 μL,而推荐参数的总反应体积为 364 μL,仅稍高于最小反应体积。在增加试剂使用量以使读数更稳定的同时选择了不同的标本量,对线性检测范围和精密度同时进行了评价。各标本量所测得的精密度与表 1 数据均差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。当标本量取 12 μL 时,3 个水平质控的不精密度皆小于 3.0%,同时线性检测范围也能满足日常工作需要。结果见表 3。

表 2 各浓度达到反应平衡所需时间

浓度(mg/L)	平衡时间(s)
0	140
300	120
600	100
900	90

表 3 不同标本量的线性检测范围与精密度

标本量(μL)	线性检测范围(mg/L)	1854CH		1855CH		1856CH	
		$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV(%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV(%)	$\bar{x} \pm s$ (mg/L)	CV(%)
8	135.1~884.3	168 ± 14.0	8.36	219 ± 14.1	6.45	306 ± 13.3	4.37
10	96.7~808.6	167 ± 9.8	5.87	218 ± 9.2	4.21	304 ± 7.8	2.56
12	52.4~602.5	163 ± 4.4	2.72	216 ± 5.5	2.56	304 ± 4.8	1.59
15	39.9~399.5	166 ± 3.7	2.23	217 ± 4.1	1.89	297 ± 4.4	1.47
18	24.6~262.8	165 ± 3.2	1.94	215 ± 3.1	1.46	302 ± 3.5	1.15

2.2.3 改良参数 参照前文,确定改良参数为:在标本加入前 60 s(-60 s)加入 R1 300 μL 及水 20 μL,0 s 加入标本 12 μL 及水 10 μL,60 s 加入 R2 70 μL 及水 20 μL。150 s 读取第一点的浊度值 A1,450 s 读取第二点的浊度值 A2。A2 - A1 为反应的浊度变化值。

2.2.4 改良参数的反应曲线 见图 2。

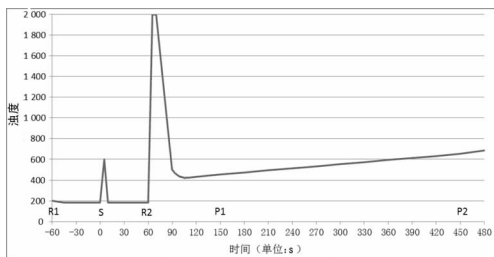


图 2 改良参数的反应曲线

2.3 相关性分析

2.3.1 两个检测系统相关性回归分析 对两个检测系统测定结果进行相关性回归分析,  $Y = 0.999 6X - 0.954 5$  ( $r^2 = 0.996 3$ ),见图 3。

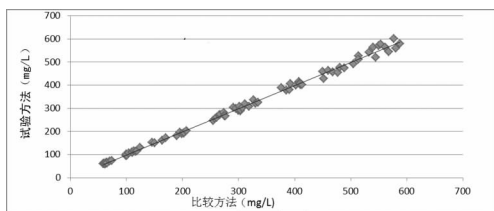


图 3 相关性分析

2.3.2 医学决定水平的系统误差 目前 Lp(a)尚无明确的医

学决定水平,大部分文献和试剂盒将 Lp(a)值在 300 mg/L 以上定为病理性增高<sup>[6]</sup>。该水平处的系统误差(SE)为 0.36%,两种方法具有可比性。

3 讨论

血清 Lp(a)浓度主要由基因调控,不受性别、年龄、体质量、适度体育锻炼和降胆固醇药物的影响<sup>[7]</sup>。现实实验室中多用免疫透射比浊法测定 Lp(a),这类方法可以全自动分析大批量标本,缺点是此类方法大都没有考虑到 Lp(a)颗粒大小的多态性及结构的复杂性,以致测定结果受抗体特性及定标血清中 Lp(a)颗粒大小的影响很大<sup>[8]</sup>,颗粒大小不同的 Lp(a)会产生不一致的光散射与光吸收,而且受标本中基质影响明显<sup>[9]</sup>。卫生部临检中心 2010 年第 1、2 次及 2011 年第 1 次脂类室间质评回报小结提示:Lp(a)所采用方法重复性较差,随机误差影响了结果的准确性。本实验室使用的 Siemens Dimension RxL Max 的比色杯系统、混匀系统、光路系统等采用与其他生化仪不同的独特设计,使用推荐参数时,3 个浓度水平不精密度最大为 55.1%,远远超出关于临床血脂测定的建议中 Lp(a)不精密度小于 4%的建议<sup>[6]</sup>,不能满足临床检测需求。本研究通过动力学分析查看反应曲线,从四个方面对检测参数进行了修改。(1)起始与终止时间:根据图 1、2,当加入标本或者试剂后,浊度在短时间内大幅度升高再逐渐回落。这是由于 Dimension RxL Max 生化仪的混匀系统是通过加样针传导超声发射器产生的超声波对反应液进行混匀,所以无论是样本针还是试剂针都必须深入反应杯底部进行加样后混匀。这样会使试剂和标本在比色杯底部的光路通路中被加入,瞬间在光路中形成高浊度,之后逐渐分散。根据图 1,当仪器在 30 s 读点时,反应曲线还处于试剂分散的浊度下降阶段,未达到反应平衡,不宜作为初始浊度。根据表 4,Lp(a)浓度越高,达到反应平衡

阶段所需要的时间越短。使用生理盐水测试时,大约在 140 s 达到反应平衡,将起始与终止时间确定为 150、450 s。(2)增加标本量:只修改起始与终止时间,不精密度依然较高,仍无法满足要求。增加检测标本量,会降低不精密度,缺点是会降低项目的最大检测上限。标本量为 12  $\mu\text{L}$  时,有最佳的不精密度和线性检测范围。(3)增加标本量与试剂量:根据仪器操作手册建议,最小反应体积为 350  $\mu\text{L}$ ,推荐参数的总反应体积为 364  $\mu\text{L}$ ,仅稍高于最小反应体积。而在免疫比浊法测定中,要求在抗体中等过量的前提下进行<sup>[10]</sup>。增加标本量与试剂量增大了反应体积使读数更加稳定,也能保持反应中的抗体过量。(4)单试剂改为双试剂:免疫比浊测定中,pH 及离子种类也对反应结果影响很大,由于该仪器的特殊混匀方式,将单试剂改为双试剂使用。这样能保证每次加样完成后,有足够的时间使试剂或者标本均匀分布于反应液中。

ISO15189 要求当同一实验室用两套及以上检测系统检测同一项目时,需有比对数据证明其检测结果的一致性<sup>[11]</sup>。本实验室有两台生化分析仪用于 Lp(a)检测,为保证不同检测系统结果的一致性,需要进行对不同仪器的结果进行比对。本研究参考 EP9-A2 文件,以 AU2700 作为比较方法,比对结果表明,两种方法内、间无离群点,在相应医学决定水平浓度处的预期偏倚小于 2.5%,说明两检测系统的预期偏倚较小,结果具有可比性。

全自动生化仪种类繁多,原理和检测方式也区别很大,而试剂厂家在无法取得所有生化仪的情况下,对于市场占用量较少的仪器,试剂厂家有时只能简单复制其他生化仪的参数,造成同样的试剂在不同仪器上的检测性能差别巨大,甚至无法成功定标。本研究通过对试剂参数的调整大幅改善了 Lp(a)在 Siemens Dimension RxL Max 生化仪的检测精密度,检测结果也与 AU2700 比对良好,满足了临床检测的要求,也为修改不适宜的检测参数提供了参考。

#### • 检验技术与方法 •

## 三种血清学实验方法对肺炎支原体抗体检测的比较

俞善春,张宏侠,尹 敢,王 慧

(安徽省宣城市人民医院检验科 242000)

**摘要:**目的 通过比较三种血清学实验方法检测肺炎支原体抗体(MP-IgM)的阳性率,寻求适合于各级医院的肺炎支原体抗体检测方法。方法 选择 284 例典型症状高度符合肺炎支原体感染的患儿血清,采用酶联免疫法(ELISA)、被动凝集法、胶体金法分别检测肺炎支原体抗体,并进行统计学处理。结果 284 例标本中,ELISA 法阳性率最高,为 96.8%;其次为被动凝集法,为 94.7%;胶体金法最低,为 83.1%。ELISA 法与被动凝集法、胶体金法与另外两种方法阳性率之间差异有统计学意义。三种方法检测男、女患儿,ELISA 法阳性率分别为 98.7%、94.4%,被动凝集法阳性率分别为 95.6%、93.6%,胶体金法阳性率分别为 85.4%、80.2%。经统计学处理,不同性别之间阳性率差异无统计学意义。结论 ELISA 法和被动凝集法可作为肺炎支原体感染的首选血清学实验方法,采用胶体金法检测肺炎支原体抗体阴性的患儿,临床医师应结合症状,及时进行复查,避免漏检。

**关键词:**酶联免疫吸附测定; 胶体金被动凝集; 肺炎支原体抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)01-0085-02

肺炎支原体是人类支原体肺炎的病原体,尤其是以引起学龄前儿童和青少年肺炎或支气管炎为多见。肺炎支原体由于缺乏细胞壁,对一般的抗菌剂耐药,为达到早期诊断、早期治疗的目的,选用一种高灵敏、高特异、快速、经济的方法诊断肺炎支原体感染显得尤为重要。本文采用了酶联免疫法(ELISA)、被动凝集法、胶体金法三种目前临床上常见的血清学实验检测

#### 参考文献

- [1] 项国谦,卢忠. 脂蛋白(a)在甘油三酯、胆固醇检测结果正常标本中水平分析和临床探讨[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(11):1373-1374.
- [2] 彭玉芳,汪宏良. 血脂及载脂蛋白检测在心血管病中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(5):592-594.
- [3] 刘光明,黄小兵,陈世豪. 2 型糖尿病肾病患者血清脂蛋白(a)和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的变化及相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(4):455-459.
- [4] Clinical Laboratory and Standards Institute. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures;a statistical approach, approved guideline[S]. Wayne, PA:CLSI,2003.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne, PA:NCCLS,2002.
- [6] 中华医学会检验学会血脂专家委员会. 关于临床血脂测定的建议[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(3):182-184.
- [7] 胡俊萍,毛美娇,梁燕,等. 血脂检测方法评价及影响因素研究[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(5):585-587.
- [8] Albers JJ, Marcovina SM. Lp(a) quantification; comparison of methods and strategies for standardization[J]. Curr Opin Lipidol, 1994,5(5):417.
- [9] 董军,陈文祥. 血浆脂蛋白(a)检测的研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(11):1035-1037.
- [10] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:560.
- [11] 阳莘,张莉萍,肖勤. 实验室内不同检测系统比对周期及比对方案探讨[J]. 重庆医学,2011,40(3):253-255.

(收稿日期:2011-07-09)

肺炎支原体抗体,并根据实验结果对三种方法的诊断效果与价值进行分析评价,并报道如下。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 来自 2010 年 10 月至 2011 年 4 月在本院儿科住院的 284 例血清标本,典型症状符合《实用儿科学》7 版关于支原体感染的诊断标准<sup>[1]</sup>,高度疑似肺炎支原体感染的急性