

论著 · 临床研究

贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪检测血浆 脂蛋白磷脂酶 A2 的性能验证*

兰庆站, 成士清, 刘义庆[△], 路超, 高琦, 郑妮, 潘翠翠
(山东大学附属省立医院临床医学检验部, 山东济南 250014)

摘要:目的 验证贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪速率法检测血浆脂蛋白磷脂酶 A2(Lp-PLA2)的分析性能。方法 参考美国临床和实验室标准化协会(NCCLS)系列文件和相关文献设计验证方案,对贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪速率法检测 Lp-PLA2 精密度、准确度、分析线性范围、生物参考区间和携带污染率等进行验证及评价。结果 该方法的批内和批间精密度决定系数(CV)值分别为 1.39%~2.67%和 3.00%~3.47%,均小于规定的范围,准确度验证达到相关文件要求,线性范围在 9.63~1 580.87 IU/L 内良好(验证回归系数 a 值在 0.97~1.03, $r^2=0.9996$),生物参考区间及携带污染率均符合要求。结论 贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪速率法检测 Lp-PLA2 分析性能符合临床要求,测定结果灵敏度高,稳定性好,检测范围宽,具有良好的准确性和重复性,适合应用于临床。

关键词:全自动生化分析仪; 精密度; 准确度; 线性范围; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.18.013 **中图法分类号:**R446.6

文章编号:1673-4130(2018)18-2249-04 **文献标识码:**A

Verification of the performance of Backman AU5800 automatic biochemistry analyzer for the detection of plasma lipoprotein phospholipase A2*

LAN Qingzhan, CHENG Shiqing, LIU Yi qing[△], LU Chao, GAO Qi, ZHENG Ni, PAN Cuicui
(Department of Clinical Laboratory, Shandong Provincial Hospital Affiliated to
Shandong University, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: Objective To verify the analytical performance of plasma lipoprotein phospholipase A2 (Lp-PLA2) by Backman AU5800 automatic biochemical analyzer. **Methods** With reference to the NCCLS series and related literature design verification scheme, the Lp-PLA2 precision, accuracy, linear range, biological reference range and carrying pollution rate were tested and evaluated by the rate method of Backman AU5800 automatic biochemical analyzer. **Results** The internal and inter batch precision determination coefficient (CV) values of the method wer 1.39%—2.67% and 3.00%—3.47% respectively, both were less than the specified range, the accuracy was verified to meet the requirements of the relevant documents, and the linear range was good within 9.63—1 580.87 IU/L (the a value of regression coefficient was 0.97—1.03, $r^2=0.9996$), the biological reference interval and the carrying capacity were carried out. The pollution rate was in accordance with the requirements. **Conclusion** Backman AU5800 automatic biochemical analyzer rate method for the detection of Lp-PLA2 analysis performance meets the clinical requirements. The results have high sensitivity, good stability, wide detection range, good accuracy and repeatability. It is suitable for clinical application.

Key words: automatic biochemical analyze; precision; accuracy; linear range; performance verification

脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)又称血浆血小板激活因子乙酰水解酶,是由单核-巨噬细胞、T-淋巴细胞和肥大细胞合成和分泌的反应血管炎症标志物。临床研究表明,Lp-PLA2 可作为独立的心脑血管疾病风险预测指标,不受其他生物因素的影响,其在全身炎症反应中并不升高,而只在血管炎症病变时特异度

升高,它血管特异性的特点在心脑血管疾病的诊断和监测中具有极高的价值^[1-3]。参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)相关实验室认可的条款要求和《医疗机构临床实验室管理办法》的要求,为了保证检验质量,在引入新仪器设备和开展新项目,以及每年需要对仪器设备的性能进行方法学验证,包括精密

* 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2016HM52);山东省临床重点专科建设项目经费资助(鲁卫医字[2013]26 号)。

作者简介:兰庆站,男,技师,主要从事临床生物化学研究。 △ 通信作者, E-mail: yqliu1979@163.com。

本文引用格式: 兰庆站, 成士清, 刘义庆, 等. 贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪检测血浆脂蛋白磷脂酶 A2 的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(18): 2249-2252.

度、准确度、线性范围、生物参考区间等^[4-9]。本实验室在贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪上检测 Lp-PLA2,为保证临床结果的准确可靠,本研究对重庆中元生物有限公司生产的 Lp-PLA2 测定试剂盒进行精密度、准确度、分析线性范围、生物参考区间和携带污染率等方法学性能验证,现将验证结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 7 月在山东省立医院东院就诊患者的新鲜血清标本,健康人群组选取本院同时期查体中心体检健康者 20 例,男女各 10 例,年龄 18~76 岁(覆盖各年龄层),上述所有标本均无溶血、无黄疸、无脂血,而且本试验经患者、家属及本院伦理委员会同意。

1.2 仪器与试剂 贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪,检测试剂是由重庆中元生物技术有限公司生产的测定试剂盒(批号 170501),校准品(批号 170501、170401)、质控品(批号 170501)均是试剂厂家提供的原装产品,所有操作均按照仪器和试剂厂商说明书要求的标准操作执行。

1.3 方法

1.3.1 检测原理 Lp-PLA2 水解底物 1-癸酰基-2-(4-硝基苯戊二酰基)磷脂酰胆碱(DNGP)的 Sn-2 位产生 4-硝基苯戊二酰基,4-硝基苯戊二酰基在水溶液中立即释放出 4-硝基苯酚,可引起 405 nm 处吸光度的变化,通过测定一定时间内 405 nm 处吸光度的变化速率,即可计算出样本中 Lp-PLA2 的活性。

1.3.2 精密度验证 根据 NCCLS EP5-A2 和美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP15-A2 文件要求进行精密度验证。批内不精密度按照与临床标本相同的检测方法,取 2 例正常患者新鲜血清(高低值各一个)用相同批号的待检试剂在最短时间内对 2 个水平血清分别重复测定 20 次,计算测定结果的均值($\bar{x}$)标准差(SD)和批内变异系数 $CV(\%)$;批间精密度用相同批号的待检试剂检测高值和低值质控品,2 个水平质控每天重复测试 3 次,连续测试 5 d,统计检测结果,计算出 $\bar{x}$ 、 SD 和批间 $CV(\%)$ 。根据美国临床实验室室间质量评估误差表中评价项目的允许误差范围评价本次结果,以实验数据统计的批内不精密度不超过 CLIA'88 允许最大误差的 1/4,批间不精密度不超过 CLIA'88 允许最大误差的 1/3 作为检测系统不精密度的可接受标准,同时还要满足小于厂商提供的精密度^[10-15]。

1.3.3 准确度验证 根据 NCCLS EP9-A2 文件要求,准确度验证需要进行方法学比对试验或使用不同于当前使用批号的定值校准品检测计算相对偏差,并计算回收率等方案,因为本科室无其他对照方法,所以本次研究使用厂家提供的其他批号的定值校准品进行比对,将本校准品连续测定 15 次,计算检测结果与靶值的相对偏差,相对偏差按以下公式计算,以相对偏差不得超过 CLIA'88 允许最大误差的 1/2 为判断依据,回收率试验采用向一新鲜血清标本中加入不超

过总体积 10%的被测校准品,进行回收率验证,以回收率在 90%~110%内为验证通过。

1.3.4 线性范围验证 根据 EP6-A2 文件的要求,取高值(H)和低值(L)样本各 1 份,且两样本浓度覆盖仪器说明书给出的线性范围,按如下配比(L、5L+3H、4L+4H、2L+6H、H)制备不同浓度的标本共 5 个浓度梯度,每个浓度梯度测定 3 次,记录结果,计算 $\bar{x}$,以理论浓度为纵坐标(Y),实测浓度为横坐标(X)。由统计学软件计算出 r^2 和回归方程式 $Y=aX+b$ 。以 $r^2\geq 0.950 0$,a 在 0.97~1.03 判断为线性范围验证通过。

1.3.5 生物参考区间验证 参照 CLSI SC28-A3 文件^[16],收集 20 例,男女各 10 例,年龄 18~78 岁(覆盖各年龄层)本院查体中心体检健康者血清标本在贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪上检测,若所有检测结果均在引用的参考区间内,又或者仅有 5%的结果超出引用的参考区间,表示该生物参考区间验证通过,否则为不通过。

1.3.6 携带污染率试验 分别选取高浓度和低浓度质控血清,连续测定 3 次高浓度质控血清(结果记为 H1、H2、H3)后,立即连续测定 3 次低浓度质控血清(结果记为 L1、L2、L3),按公式 $(L1-L3)/(H3-L3)\times 100\%$ 计算携带污染率,以携带污染率 $\leq 5\%$ 为验证通过。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件和 Excel2003 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 精密度验证结果 批内精密度 CV 值在 1.39%~2.67%,批间不精密度 CV 值 3.00%~3.47%,均小于 CLIA'88 规定的范围。具体数据见表 1~3。

表 1 Lp-PLA2 批内精密度水平 1 结果			
检测次数	检测结果(IU/L)	检测次数	检测结果(IU/L)
1	675.9	11	675.6
2	689.8	12	695.6
3	675.6	13	688.3
4	689.8	14	677.9
5	685.8	15	696.8
6	694.1	16	703.5
7	677.3	17	684.7
8	700.5	18	682.8
9	688.3	19	681.8
10	676.4	20	689.0
$\bar{x}$	684.90	SD	9.54
CV	1.39%		

表 2 Lp-PLA2 批内精密度水平 2 结果			
检测次数	检测结果(IU/L)	检测次数	检测结果(IU/L)
1	541.9	11	540.4
2	535.0	12	538.5
3	531.5	13	533.4
4	538.1	14	513.2
5	533.0	15	524.1

续表 2Lp-PLA2 批内精密度水平 2 结果

检测次数	检测结果(IU/L)	检测次数	检测结果(IU/L)
6	533.2	16	525.2
7	535.7	17	542.6
8	527.9	18	529.8
9	544.1	19	541.0
10	539.2	20	515.0
$\bar{x}$	533.75	SD	14.25
CV	2.67%		

2.2 准确度验证结果在仪器运行正常且精密度通

表 3批间水平 1、2 测试结果

批间水平 1	第 1 次测试(IU/L)	第 2 次测试(IU/L)	第 3 次测试(IU/L)	批间水平 2	第 1 次测试(IU/L)	第 2 次测试(IU/L)	第 3 次测试(IU/L)
第 1 天	529.8	541.0	515.0	第 1 天	682.8	681.8	689.0
第 2 天	556.4	537.1	547.6	第 2 天	719.5	739.7	704.4
第 3 天	584.5	565.0	574.0	第 3 天	744.8	730.8	723.7
第 4 天	530.2	536.4	522.7	第 4 天	700.2	710.1	703.1
第 5 天	552.2	550.5	547.3	第 5 天	741.4	724.2	737.8
$\bar{x}$	545.98			$\bar{x}$	715.55		
SD	18.92			SD	21.47		
CV	3.47%			CV	3.00%		

2.3 线性范围验证结果线性范围在 9.63~1 580.87 IU/L 内良好(验证回归系数 a 值在 0.97~1.03, $r^2=0.999\ 6$),线性符合 NCCLS EP6-A2 文件及试剂厂家 10~1 500 IU/L 的要求,验证通过。线性统计结果见表 4,线性回归方程曲线见图 1。

表 4Lp-PLA2 线性统计结果

稀释梯度	第 1 次测试(IU/L)	第 2 次测试(IU/L)	第 3 次测试(IU/L)	均值(IU/L)	理论值(IU/L)
L	11.5	10.8	6.6	9.63	9.63
5L+3H	589.5	622.7	589.7	600.63	592.82
4L+4H	820.2	805.4	820.7	815.43	795.29
2L+6H	1 164.1	1 186.5	1 188.9	1 179.83	1 188.06
H	1 574.4	1 596.2	1 572.0	1 580.87	1 580.87

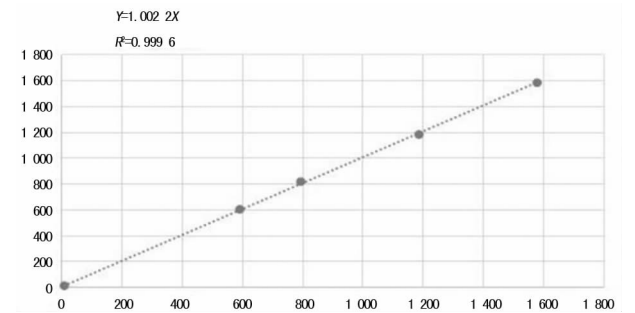


图 1Lp-PLA2 检测线性回归方程曲线

2.4 生物参考区间验证试剂厂家提供的生物参考区间 0~659.0 IU/L,本次验证的 20 份健康体检者血清结果最低值为 397.0 IU/L,最高值为 711.1 IU/L,均值为 539.0 IU/L,仅有 1 例在厂商提供的生物参考区间的范围之外,符合 CLSI SC28-A3 文件全部或仅有 5%的结果超出引用的参考区间的要求,说明该生

过的前提下对不同于当前使用批号的定值校准品(靶值 515 IU/L)连续检测 15 次,计算均值为 530.4 IU/L,带入相对偏差公式得到相对偏差为 2.99%,小于 1/2CLIA'88 允许最大误差范围(<5%)。再向 1 mL 新鲜血清中分别加入 20、50、100 μ L 的本验证校准品,进行回收试验,对校准品的回收率分别是 95.3%、108.6%、103.5%,都在规定范围内,说明正确度验证通过。

物参考区间适用于本实验室。具体数据见表 5。

表 5Lp-PLA2 生物参考区间验证

标本号	检测结果(IU/L)	标本号	检测结果(IU/L)
1	638.7	11	512.4
2	508.3	12	618.6
3	711.1	13	397.0
4	503.0	14	519.1
5	567.8	15	562.2
6	456.5	16	446.8
7	544.5	17	563.3
8	560.9	18	462.0
9	619.6	19	649.0
10	410.7	20	529.4
$\bar{x}$	539.00	SD	82.20
最低值	397.00	最高值	711.1

2.5 携带污染率试验结果通过携带污染率公式计算本实验的携带污染率为 1.023%,小于 5%的要求。

3 讨论

精密度是定量测定中最基本的性能指标,反映检测结果的重复性,体现了检测系统的随机误差,根据 NCCLS EP5-A2 文件的要求对贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪检测 Lp-PLA2 精密度进行验证,从而客观的评价本仪器的工作性能。本实验测定的 Lp-PLA2 的批内精密度 CV 值为 1.39%~2.67%,小于规定的范围,即批内 CV 值小于 1/4 CLIA'88 允许最大误差。批间精密度 CV 值为 3.00%~3.47%,符合批间 CV 值小于 1/3 CLIA'88 允许最大误差,同时符合厂商要求,说明仪器重复性好,结果稳定。准确度是多次测量结果的均值与真值的接近程度^[17],可通过对定值的质控品或校准品进行多次检测,将检测结果

与厂方提供的靶值进行比较,计算结果的相对偏差,本次验证相对偏差为 2.99%,符合相关标准,说明该检测系统准确性高,可应用于临床。线性评价也称为分析测量范围评价,是评价试剂检测性能的重要指标,根据 NCCLS EP6-A 文件的要求对贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪检测 Lp-PLA2 线性进行验证, Lp-PLA2 线性范围验证回归系数 a 值为 1.002 2 在 0.97~1.03 范围内; r^2 值为 0.999 6 大于 0.950 0,线性符合要求,验证通过。根据试剂说明书建议,每个实验室应建立自己的生物参考区间,而实际情况中,实验室验证采用厂商提供的生物参考区间的居多。本研究严格按照 CLSI SC28-A3 文件和文献[18]的要求,在本检测系统精密度和准确度均符合临床要求的情况下对厂商提供的 Lp-PLA2 生物参考区间进行验证,在贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪正常工作及室内质控在控的情况下对验证组 20 例体检健康者标本进行检测,记录检测结果,通过计算 R 值为 95%,符合 $R \geq 95\%$ 的验证要求,因此,本实验室采用试剂厂家提供的 0~659 IU/L 的生物参考区间。携带污染率是指不同浓度标本之间连续测定时的相互影响,一般是高浓度标本对低浓度标本的影响,携带污染率越低说明标本之间相互影响越小,检测结果越准确。本实验 Lp-PLA2 的携带污染率为 1.023%,小于 5% 的要求。

目前有关 Lp-PLA2 的测定方法很多,国内外主要采用液相色谱-串联质谱测定法、放射免疫测定法、酶联免疫吸附试验等。传统的放射免疫测定法检测的是游离 Lp-PLA2、结合型 Lp-PLA2 和基因相关肽前体的混合物,而不能区分上述 3 种物质,而且该法检测耗时长(19~22 h),并且有放射性元素的污染使用受到限制;液相色谱-串联质谱测定法虽然有较高精密度、准确度、稳定性,但是也有灵敏度低和容易受到内源性物质的干扰等缺点;酶联免疫吸附试验法虽然有较好的线性但是操作繁琐、耗时较长、成本较高,不利于临床大面积筛查。临床急需一种快速、准确、成本低的 Lp-PLA2 检测方法,速率法检测 Lp-PLA2 活性具有操作简便、方法可靠、灵敏度高等特点,适用于各种生化分析仪,可满足临床大批量检测的要求,并且成本较低,减轻了患者的经济负担,适合临床大面积推广。

4 结 论

本研究对 Lp-PLA2 测定试剂盒检测的精密度、准确度、线性范围、生物参考区间、携带污染率进行验证,其各性能指标均符合相关文件的要求,对本实验室检测的 Lp-PLA2 提供了详实、准确、可靠的理论依据。

参考文献

[1] 程清. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 和同型半胱氨酸水平与动脉

粥样硬化性心脑血管疾病关系的研究[J]. 检验医学, 2015, 30(1): 40-43.

- [2] 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.
- [3] 赵茜, 张小宁, 张涛, 等. 血清脂蛋白相关磷脂酶 A2、同型半胱氨酸和血脂水平联合检测在脑梗死诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(10): 1341-1343.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples: EP9-A2[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline-second edition: EP5-A2. [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2004.
- [6] Clinical And Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness; approved guideline-second edition: EP15-A2[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: EP6-A2[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.
- [8] International Organization for Standardization. Medical laboratories-Requirements for quality and competence: ISO15189[S]. International Organization for Standardization, 2012.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床实验室管理办法: 卫医发[2006]73 号[EB/OL]. (2006-03-06) [2018-01-02]. <http://www.moh.gov.cn/monhyzs/S3577/200804/18468.shtml>.
- [10] 梅丽春, 王凡, 蒋红君, 等. 电化学发光法检测甲胎蛋白的精密度验证[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(2): 250-251.
- [11] 徐春芝, 吴继明, 刘贵建, 等. 临床实验室检测系统精密度验证方法比较及应用体会[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2304-2305.
- [12] 陈海斌. 化学发光免疫分析技术及其进展[J]. 中国医学装备, 2011, 8(5): 56-59.
- [13] 杨丽, 何叶莉, 王晗, 等. 罗氏 Cobas6000 全自动电化学发光分析仪检测 AFP, CEA 的性能验证[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 127-130.
- [14] 方宏罡. 罗氏 Modular 全自动生化分析仪酶指标精密度验证[J]. 医学信息, 2014, 15(9): 138-139.
- [15] 王强, 王东生, 凡瞿明, 等. LIAISON XL 免疫分析仪检测性能验证及评价[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(4): 132-134.
- [16] CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline: SC28-A3[S]. 3rd ed. Wayne, PA: CISI, 2008.
- [17] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 164.
- [18] 沈隽韦, 宋斌斌, 潘柏申. 间接法建立生物参考区间[J]. 检验医学, 2015, 23(4): 391-396.

(收稿日期: 2018-01-15 修回日期: 2018-04-17)