

## · 检验仪器与试剂评价 ·

## 参照 CLSI EP 方案评价亮氨酸氨基肽酶试剂性能

沃燕波, 邹继华, 黄幸雷, 张桂春

(宁波美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315100)

**摘要:**目的 参照 CLSI EP 方案对自主研发的亮氨酸氨基肽酶(LAP)试剂分析性能进行评价,了解其是否满足临床需求。方法 参照文件测定试剂空白吸光度、检测限、分析灵敏度、精密性、准确度、线性范围、干扰试验和稳定性等技术指标。结果 试剂空白吸光度为 0.05,检测限为 0.065 U/L,分析灵敏度为 0.015,高、低值血清批内变异系数分别为 0.07%和 0.08%,方法比对实验结果  $Y=1.0064X+1.8514$ ,  $r^2=0.9996$ ;线性范围为 0~300 U/L,0.855 mmol/L 结合胆红素,0.855 mmol/L 非结合胆红素,0.3 g/L 维生素 C,9.4 g/L 血红蛋白浓度,14 500 FTU 乳糜对检测结果无干扰,试剂稳定。结论 该试剂分析性能可满足临床实验室的需要。

**关键词:**亮氨酸氨基肽酶; 性能评价; 实验室技术和方法

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.045

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)14-1872-03

亮氨酸氨基肽酶(Leucine aminopeptidase, LAP)是一种蛋白分解酶,广泛分布于肝、胰和肾等组织中<sup>[1]</sup>。研究显示, LAP 对胆汁淤积性肝炎、胆道梗阻及胰腺癌的诊断有价值,也可早期反映肾损害的性质和程度,还可作为妊娠期肝内胆汁淤积症及孕妇和胎儿健康情况动态监测的一项指标<sup>[1-3]</sup>,笔者依照临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制订的评价方案对自主研发的 LAP 试剂在分析性能方面进行了评价,旨在为临床检测应用提供数据参考。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 日立 7180 全自动生化分析仪;购于日本日立公司;岛津 2450 分光光度计,购于日本岛津公司;游离胆红素及结合胆红素:购于百灵威科技有限公司,批号分别为 LK50L19 和 JH10-4286;血红蛋白:购于上海瑞齐生物科技有限公司,批号:20101203;中/长链脂肪乳注射液(C6-C24):购于华瑞制药有限公司,批号:80DH066。LAP 测定试剂盒及标准、质控:购于日本和光公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 检测原理** 样本中的 LAP 催化水解底物 L-亮氨酸-P-硝基苯胺,生成亮氨酸和对硝基苯酚,对硝基苯酚在特定波长(405 nm)处有吸收,通过检测吸光度升高速率可以计算样本中 LAP 活性。

**1.2.2 试剂配制** 试剂 1:100 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.8),0.2 mmol/L NaCl,0.8 g/L  $\text{NaN}_3$ ;试剂 2:100 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.8),5 mmol/L L-亮氨酸-4-硝基苯胺,0.8 g/L  $\text{NaN}_3$ 。

**1.2.3 测试参数** 采用速率法,反应温度为 37 ℃,光径为 1.0 cm,检测主波长 405 nm,样品(校准管以校准品做样品)加 R1 混匀,孵育 5 min 后加入 R2 混匀,反应 2 min 后,监测 3 min 吸光度变化,其中样本用量 15  $\mu\text{L}$ ,试剂 1 用量 240  $\mu\text{L}$ ,试剂 2 用量 60  $\mu\text{L}$ ,根据仪器使用说明及分析参数编制检测程序。

**1.2.4 性能评价测定方案** 有关试剂空白吸光度、检测限、分析灵敏度、精密性、准确度、线性范围、干扰试验和稳定性等评价指标参照相关 EP 文件及国内外惯用方法进行<sup>[4-7]</sup>。

空白吸光度:在波长 405 nm(光径 1.0 cm)处检测,以蒸馏水为样本,重复测定 2 次。

检测限:以蒸馏水为样本,用试剂重复测定 20 次。

分析灵敏度:以 20 U/L 标本为样品,用试剂测定,记录在试剂规定参数下产生的吸光度改变,换算为吸光度变化率。

精密性按 EP-5A2 文件评价<sup>[4]</sup>:取高值和低值的患者混合血清各 1 份,测定 20 次,计算批内精密性。

准确度试验按 CLSI EP9-A2 文件评价<sup>[5]</sup>:采用 40 例临床样品对试剂进行测试,并将结果与 Randox 试剂进行数据统计分析。

线性评价按 EP-6A 文件评价<sup>[6]</sup>:取 LAP 高、低值血清标本各一份。将高值和低值血清分别按不同比例混合稀释成不同浓度梯度的样本,并将这些样本随机排列进行测定,各个浓度重复测定 3 次,取其均值为测定值,与预期值做线性对比。

干扰实验按照 CLSI EP-7A2 文件评价<sup>[7]</sup>:测定加入干扰物的混合血清。

试剂热稳定性通过将试剂置于 37 ℃水浴,分别于水浴前及水浴 1、3、7 d 后对高、低浓度的 LAP 标本及试剂线性范围进行测定;试剂开口稳定性实验通过将试剂定标后,开口放置于生化分析仪的试剂仓,分别在开口 0、3、7、14、21、30 d,对高、低浓度的 LAP 标本及试剂线性范围进行不定标检测,比较开口前后的检测结果偏差。

**1.3 统计学处理** 所有数据用 Excel 软件进行统计处理、作图分析。

## 2 结 果

**2.1** 在 37 ℃,405 nm 波长,试剂空白吸光度为 0.05,不大于 0.7,符合试剂设计要求。

**2.2 检测限** 结果显示最低检测限为 0.065 U/L。

**2.3 分析灵敏度** 20 U/L 样本吸光度变化率为 0.015,大于 0.006 5,符合试剂设计要求。

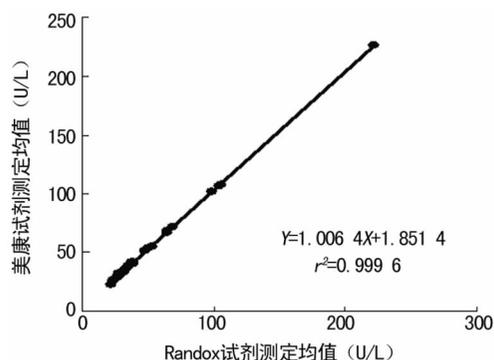


图 1 LAP 重复测定均值的散点图

**2.4 精密性** 结果显示,该试剂对高、低值血清的批内变异系

数分别为 0.07% 和 0.08%。

**2.5 准确度** 测定临床标本 40 例, 将测定结果与 Randox 试剂测定结果进行相关回归分析, 结果见图 1, 计算出相关方程和相关系数为  $Y=1.0064X+1.8514$  和  $r^2=0.9996$ 。

**2.6 线性范围测定** 结果如图 2 所示, 相关方程及相关系数分别为  $Y=1.0105X-0.2656$  和  $r^2=0.9999$  (浓度范围 0~300.0 U/L)。

**2.7 干扰实验** 以相对偏差大于或等于 10% 作为有明显干扰的评判指标, 结果显示, 0.855 mmol/L 结合胆红素, 0.855 mmol/L 非结合胆红素, 0.3 g/L 维生素 C, 9.4 g/L 血红蛋白浓度, 14 500 FTU 乳糜对 LAP 样本检测结果均无干扰, 见图 3。

**2.8 稳定性观察** 试剂经 7 d 热破坏 (37 °C) 和试剂仓开口

(2~8 °C) 30 d 后, 高、低值标本和线性实验测定结果与热破坏及开口前相比无显著偏差, 结果见图 4。

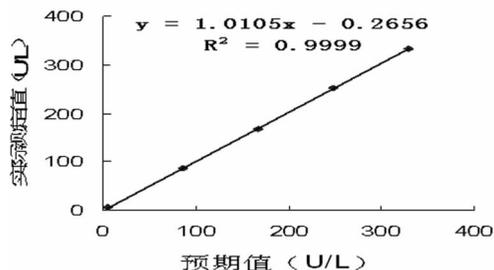
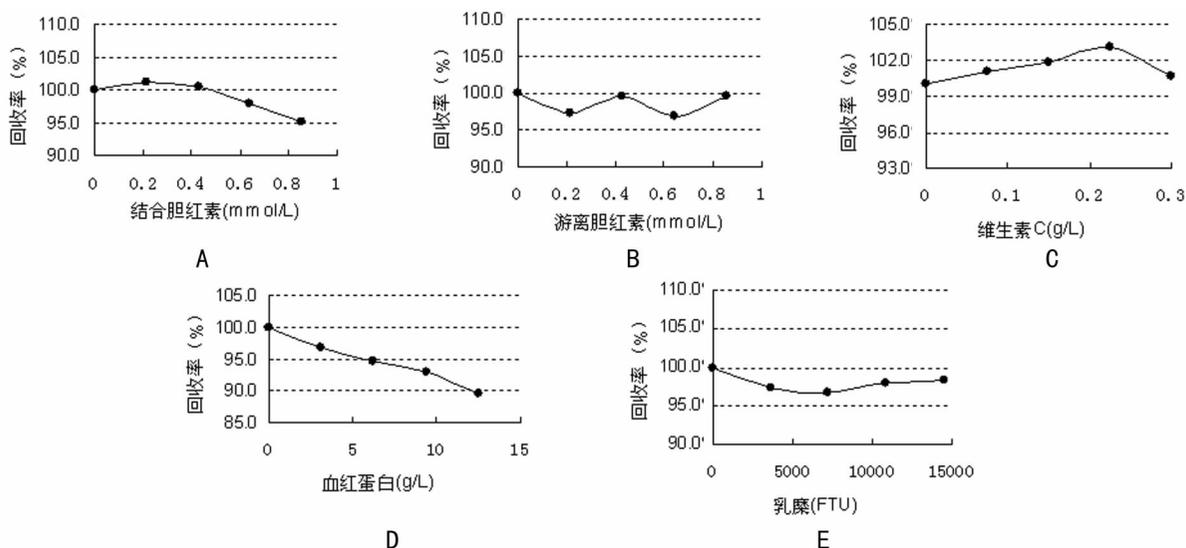
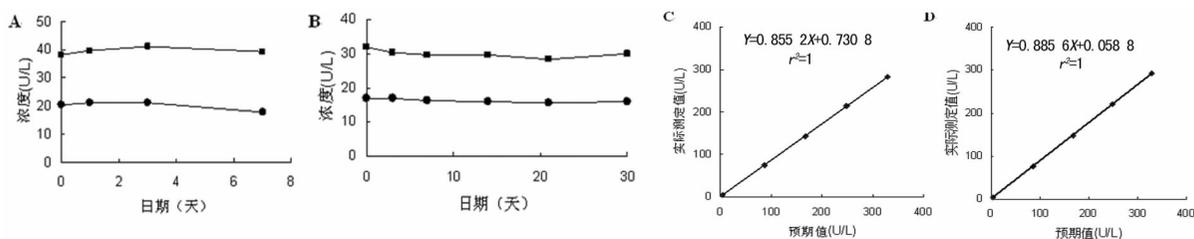


图 2 试剂线性范围实验结果



A: 试剂抗结合胆红素干扰结果; B: 试剂抗游离胆红素干扰结果; C: 试剂抗维生素 C 干扰结果; D: 试剂抗血红蛋白干扰结果; E: 试剂抗乳糜干扰结果。

图 3 试剂抗干扰结果



A: 试剂 7 d 热破坏结果; B: 试剂开瓶 30 d 检测结果; C: 试剂 7 d 热破坏后线性; D: 试剂开瓶 30 d 后线性。

图 4 试剂稳定性观察结果

### 3 讨论

血清 LAP 最初被认为是一种对胰腺癌的诊断有很高价值的酶, 其敏感性较高, 但特异性不高, 限制了其在该领域的应用<sup>[1]</sup>。随着对其基础及临床研究的不断深入, 人们发现其浓度在肝胆系统疾病中普遍升高, 不同肝病其活性增高程度不同, 因此, LAP 作为肝癌鉴别诊断的一项初步指标, 值得推广<sup>[1]</sup>。此外, 由于 LAP 不像其他肝功能酶, 只能检测血液样本, 其还可以检测尿液, 在一些病例中可以不必采血而进行检验, 因此应用起来十分方便<sup>[8]</sup>。随着对 LAP 研究的不断深入, 其生理功能及在病理情况下的功能也将得到进一步的阐明, 为临床的诊断和治疗提供新的方向。本研究参考 CLSI EP 系列文件<sup>[4-7]</sup>, 对自主研发的 LAP 试剂进行分析性能的系统评价, 结

果表明自主研发的 LAP 试剂空白吸光度为 0.05, 检测限为 0.065 U/L, 分析灵敏度为 0.015, 高、低值血清批内变异系数分别为 0.07% 和 0.08%, 线性范围为 0~300 U/L, 抗干扰能力较强, 与 Randox 试剂在分析性能上无显著差异, 与其比对实验结果  $r^2=0.9996$ , 可替代 Randox 试剂应用于临床实验室。

### 参考文献

[1] 纪晓霞, 陈林. 亮氨酸氨基肽酶的基础研究及临床应用[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 175-177.  
 [2] Ito N, Nomura S, Iwase A, et al. Ultrastructural localization of aminopeptidase A/ angiotensinase and placental leucine aminopeptidase/oxyoeinase in ehorionic villi of human placenta[J].

Early Hum Dev, 2003, 71(1): 29-37.

[3] Masuda S, Hattori A, Matsumoto H, et al. Involvement of the V2 receptor in vasopressin-stimulated translocation of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in renal cells[J]. Eur Biochem, 2003, 270(9): 1988-1994.

[4] NCCLS. EP5-A2 Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 1999: 41-49.

[5] NCCLS. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods; A statistical approach; Approved guideline [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003: 41-46.

[6] NCCLS. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002: 49-52.

[7] NCCLS. EP9-A2 Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002: 100-107.

[8] 孙爱丽, 关广聚, 胡晓燕, 等. 尿胞外体亮氨酸氨基肽酶及二肽酶在糖尿病肾病中的变化[J]. 中华病理生理杂志, 2011, 27(4): 775-778.

(收稿日期: 2013-01-02)

• 检验仪器与试剂评价 •

# 某种国产 Anti-HIV-ELISA 试剂批内板间变异

刘冬<sup>1</sup>, 田方<sup>1</sup>, 彭冬菊<sup>1△</sup>

(湖北十堰市中心血站, 湖北十堰 442000)

**摘要:**目的 探讨血站用国产 Anti-HIV-ELISA 试剂的批内板间变异。方法 随机抽取 12 块板, 每块板上随机抽取 1 条共 12 条组成 1 板, 按照常规标本方式做室内质控和阳性对照, 计算其 CV。结果 室内质控和阳性对照 CV 均小于 10%, 36 孔 Anti-HIV-2 型阳性对照中有 5 孔 OD < 0.8。结论 Anti-HIV-ELISA 试剂批内板间变异小, 生产厂家需要调整 Anti-HIV-2 型阳性对照浓度。

**关键词:**批内变异; 室内质控; 试剂盒, 诊断; 酶联免疫吸附测定

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 14. 046

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)14-1874-02

依据《血站技术操作规程》(2012 版)血液检测规定, 血站可以采用不同生产厂家的两种 ELISA 试剂进行 HBSAg、Anti-HCV、Anti-TP 和 Anti-HIV 检测<sup>[1]</sup>, 本站按照规定开展无偿献血者血液检测工作。今年本站在启用 A 厂家 Anti-HIV-ELISA 试剂时发现, 同一批号的 Anti-HIV-2 型阳性对照在做同一批号的不同板时会出现 OD 值低于 0.8 的情况, 根据该试剂说明书判断实验是无效的, 但室内质控结果在控, 血液标本检测结果与另一厂家试剂的检测结果也相吻合, 重新打开一盒 A 厂家试剂, 实验条件不变的情况下 Anti-HIV-2 型阳性对照 OD ≥ 0.8, 室内质控、血液筛查标本检测结果也无明显变化。本组认为: (1) 抗 HIV-ELISA 试剂存在批内板间变异较大的问题。(2) Anti-HIV-2 型阳性对照浓度偏低。现将 A 厂家抗 HIV-ELISA 的批内变异实验进行统计分析, 报道如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** A 厂家 Anti-HIV-1 型阳性对照、Anti-HIV-2 型阳性对照、1NCU/ML 抗-HIV 质控血清。

**1.2 试剂与仪器** A 厂家人类免疫缺陷病毒抗体试剂盒 (Anti-HIV-1/HIV-2), 试剂批号为 2010120908, 中国药品生物制品检定所批批检合格。北京康彻斯坦生物技术有限公司抗-HIV 质控品, 批号为 201102001 浓度为 1NCU/ML。澳斯邦公司 STAR 前加样系统和 FANE24/20 后处理系统, 仪器在校验期内。

**1.3 方法** 从 105 盒抗 HIV-ELISA 试剂中随机抽取 12 盒, 每盒试剂里的酶标板上随机抽取 1 条, 拼成 12 条 (8 孔) 组成 1 板。每条上做室内质控 2 孔, Anti-HIV-2 型阳性对照 3 孔, Anti-HIV-1 型阳性对照 1 孔, 阴性对照 2 孔, 严格按照试剂说

明书操作。

## 2 结 果

抗 HIV-ELISA 试剂盒批内板间变异小于 10%; 其中质控血清 CV 是 5.86%; Anti-HIV-1 型阳性对照 CV 是 3.07%; Anti-HIV-2 型阳性对照 CV 是 6.7%; 但 Anti-HIV-2 型阳性对照 S/CO 值小于 3.47 的值有 5 个, 其 OD 值均小于 0.8, Anti-HIV-2 型阳性对照浓度明显低于 Anti-HIV-1 型阳性对照, 见表 1。

**表 1 同批不同板之间质控血清、Anti-HIV-2 型阳性、Anti-HIV-1 型阳性对照 S/CO 值**

项目	质控血清 (24 孔)		Anti-HIV-2 型 阳性对照 (36 孔)		Anti-HIV-1 型 阳性对照 (12 孔)	
S/CO	5.60	5.57	3.67	3.70	3.79	10.65
	5.46	5.53	3.36	3.67	3.36	10.87
	4.76	5.38	3.63	3.86	3.40	11.43
	5.15	5.04	4.16	3.87	3.92	10.73
	4.71	4.98	4.04	3.86	3.90	10.86
	5.03	5.29	3.88	3.55	3.60	11.23
	4.99	4.97	3.70	4.00	4.07	10.52
	4.88	5.15	3.41	3.57	3.72	10.58
	4.85	4.97	4.02	3.79	3.88	11.35
	4.55	5.06	3.78	4.03	3.53	10.67
	4.74	5.02	3.14	3.85	4.34	10.47
	4.67	4.74	3.50	3.70	3.70	10.69
CV	5.86%		6.70%		3.07%	

△ 通讯作者, E-mail: 410468372@qq.com.