

· 论 著 ·

# 新一代脂蛋白(a)颗粒单位检测法的性能评价及临床应用

戴婉如, 周 欢, 伍严安

(福建医科大学省立临床医学院, 福建福州 350001)

**摘要:**目的 评价利用国际临床化学和试验医学联合会(IFCC)国际参考试剂(SRM2B)标准化的颗粒单位检测法检测脂蛋白(a)[Lp(a)]及临床意义。方法 评价以 nmol/L 表示 Lp(a)微粒总数量试剂盒的精密度、线性、临床可报告范围、参考区间等指标,并与以 mg/L 表示 Lp(a)总质量的试剂盒进行比较。同时检测受试者血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平,分析 LP(a)与上述指标间的相关性。结果 该方法批内和批间精密度分别小于 1.5%和 2.0%;在 0.6~236.0 nmol/L 范围内线性良好( $r^2=0.9962$ ),可报告范围为 7~720 nmol/L,健康人群的参考范围小于 75 nmol/L;与以 mg/L 表示 Lp(a)浓度的试剂盒相关性良好。Lp(a)与 ALT、AST、TBIL、UREA、CERA、TG、CHOL、HDL-C、LDL-C 的相关系数分别为 -0.120、-0.091、-0.372、-0.096、-0.087、0.056、0.263、0.226、0.159。结论 该检测方法分析性能良好,不受血清 ALT、AST、UREA、CERA、TG、HDL-C、LDL-C 水平的影响,与血清中 TBIL、CHOL 水平有关。可溯源至 IFCC 国际参考方法及参考物质(SRM2B),不受 Lp(a)多态性的影响,真实检测 Lp(a)颗粒数,以 nmol/L 准确表示 Lp(a)蛋白水平,帮助临床评估心血管疾病风险,增加不同临床研究数据间的可比性。

**关键词:**脂蛋白(a); 免疫比浊法; 方法学评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.22.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)22-3257-03

## A new generation of lipoprotein(a) in clinical application and performance evaluation method for the detection of particles per unit

Dai Wanru, Zhou Huan, Wu Yan'an

(School of Clinical Medicine, Fujian Provincial Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the clinical significance of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine international(IFCC) reference reagent(SRM2B) standardized, particles unit method in detecting the lipoprotein(a)[Lp(a)]. **Methods** Precision, linearity, clinical reportable range, reference interval index of total number of particles in the kit expressing Lp(a) by nmol/L were evaluated, and compared with the kit expressed Lp(a) by mg/L. At the same time serum alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), total bilirubin(TBIL), UREA, creatinine(CREA), triglycerides(TG), total cholesterol(CHOL), high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) of all the subjects were detected and the correlations of them between LP(a) were analyzed. **Results** The method with-run coefficient of variation(CV)<1.5%, between-run CV<2.0. Within the scope of 0.6-236.0 nmol/L the linear was good( $r^2=0.9962$ ). Reportable range: 7-720 nmol/L, normal reference range <75 nmol/L. With a total mass(mg/L) said good correlation between content Lp(a) kit. The correlation of Lp(a) and ALT, AST, TBIL, UREA, CERA, TG, CHOL, HDL-C, LDL-C of were -0.120, -0.091, -0.372, -0.096, -0.087, 0.056, 0.263, 0.226, 0.159. **Conclusion** This methods shows good performance, and without interference from serum ALT, AST, UREA, CERA, TG, HDL-C, LDL-C levels, but affected by the levels of serum TBIL and CHOL. It could be traced to the IFCC international reference methods and reference materials(SRM2B), which isn't influenced by Lp(a) polymorphisms, detects Lp(a) particle number really, expressed Lp(a) protein with nmol/L accurately, helps evaluating clinical cardiovascular disease risk, and increases the comparability among different clinical research data.

**Key words:** lipoprotein(a); immune turbidimetric method; evaluation methodology

脂蛋白(a)[Lp(a)]是一个由载脂蛋白(a)[Apo(a)]与载脂蛋白 B-100 通过二硫键相连而成的低密度脂蛋白颗粒,结构与纤维蛋白溶解酶原相似<sup>[1]</sup>。LP(a)的临床应用不断增加,但缺乏共同的参考物,不同实验室之间精密度不同,结果差异较大,无可比性。精确测定 Lp(a)的主要问题是 Apo(a)分子大小的多态性及缺乏可溯源的校准试剂,需制定可用的参考物,才能使不同分析系统及各实验室检测的 LP(a)值具有可比性<sup>[2]</sup>。由于 Apo(a)在分子大小上具有多态性,要使参考血清的组成与患者的标本一致是不可能的,但可以提出一种参考血清(或校准血清)作为标准化的基础。罗氏公司推出新一代 Lp(a)颗粒单位检测试剂盒,引入了可溯源至国际临床化学和试

验医学联合会(IFCC)国际参考方法的参考试剂(SRM2B)作为校准血清<sup>[3]</sup>,并以 IFCC 推荐的 nmol/L 为单位报告 Lp(a)水平,解决了长久以来困扰临床的问题。本研究对此试剂盒及其临床应用进行了初步评价,现报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 精密度试验血清为罗氏公司两个水平 Lp(a)质控品,浓度分布为 32.8、118 nmol/L。比对试验血清选取 2015 年 1~3 月实验室采集的 86 份血清标本, Lp(a)浓度分布为小于 75 nmol/L 标本 49 份, ≥75 nmol/L 标本 37 份。参考区间验证血清为 20 份合格血清标本,来自于 20 例健康体检者,年龄 16~77 岁,血常规、C 反应蛋白检测在正常参考值范

围内,肝、肾、心脏功能均正常,无急、慢性炎症。

**1.2 仪器与试剂** 罗氏 Cobas8000 全自动生化分析仪,罗氏公司生产的新一代 Lp(a)颗粒检测试剂盒(批号 085813),校准品(批号 084113)和质控品(批号 084213);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)、三酰甘油(TG)、总胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)旧一代质量检测试剂盒(以 mg/L 报告结果),以上试剂均为罗氏公司原装试剂。日本电化生研株式会社的 Lp(a)质量检测试剂盒(以 mg/L 报告结果),Lp(a)质控品采用罗氏公司生产的两个水平 Lp(a)质控品,其余项目质控品采用罗氏多项混合质控品。

**1.3 方法**

**1.3.1 精密度评价** 依据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)EP15-A2<sup>[4]</sup>,取 2 个浓度水平质控品,5 d 试验,每天做一批,每批每个水平 3 次重复测定,计算批内精密度和批间精密度的均值、标准差(s)和变异系数(CV)。

**1.3.2 线性评价** 依据 CLSI EP6-A<sup>[5]</sup>,取患者混合血清 2 份,高值样品(H)位于线性上限,低值(L)位于下限,H 和 L 按比例配制成系列 6 个浓度水平(1L,0.8L+0.2H,0.6L+0.4H,0.4L+0.6H,0.2L+0.8H,1H)。所有标本应在仪器一次运行中或在几次间隔很短的运行中测完,并随机测定。每个样品重复测定 2 次,记录结果。采取平均斜率来确定系列样品应含有的待测物的预期值(X),所有样品重复测定的均值为实测值(Y),将所有结果点在 X-Y 坐标图上,计算回归方程  $Y=bX+a$  和相关系数(r),若相关系数  $r \geq 0.975$ ,并用 t 检验验证 a 是否与 0 差异有统计学意义,如无显著相关,则判断呈线性。

**1.3.3 临床可报告范围评价** 选择 3 个浓度较高的样品(接近线性范围上限或线性范围以上的样品),用厂商提供的稀释液(即日常检测用的稀释液)按照厂商提供的稀释倍数来稀释,然后检测稀释后的样品浓度,3 次重复测定取均值,将检测值

与理论值比较,计算回收率(R),回收率在 90%~110% 范围内,则验证通过。可报告范围是分析线性范围上限乘以最大稀释倍数。 $R = \text{实测结果} / \text{理论结果} \times 100\%$ 。

**1.3.4 参考区间评价** 依据 CLSI C28-A2<sup>[6]</sup>,选择 20 份体检合格的健康人血标本,在检测系统上进行测定,对结果进行统计并对仪器说明书提供的参考区间进行验证,若 20 份标本的检测结果均在仪器说明书提供的参考值范围内或仅有 2 份标本超出参考值范围,则验证通过。否则,进行参考区间确立试验。

**1.3.5 比对试验** 依据 CLSI EP9-A2<sup>[7]</sup>,通过 86 份不同浓度标本分别用新一代颗粒检测试剂盒(以 nmol/L 报告结果)和罗氏原装、日本电化生研株式会社的旧一代质量检测试剂盒(以 mg/L 报告结果)测定,比较两者的相关性。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件和 Excel2003 软件进行数据处理及统计学分析。

**2 结果**

**2.1 精密度** 配套质控品各浓度的 CV 均接近厂家提供的 CV 值,批内精密度  $CV \leq 2.0\%$ 、批间精密度  $CV \leq 2.0\%$ ,显示其精密度良好,可以满足临床应用。见表 1。

**2.2 线性范围评价结果** 将实测值与预期值作比较无明显离群值,所有结果点在 X-Y 坐标图上,获得回归方程  $Y = 0.9678X + 2.8805$  和  $r^2 = 0.9962$ 。进一步 t 检验,显示 a 与 0 差异无统计学意义( $t = 1.094, P > 0.05$ )。表明 LP(a)在 0.6~236.0 nmol/L 范围内具有良好线性关系,与厂家提供线性范围 7~240 nmol/L 相符合。见表 2。

表 1 Lp(a)精密度试验

| Lp(a)浓度(nmol/L) | 批内精密度 |      | 批间精密度 |      |
|-----------------|-------|------|-------|------|
|                 | s     | CV%  | s     | CV%  |
| 32.80           | 0.47  | 1.45 | 0.61  | 1.90 |
| 118.00          | 1.15  | 1.03 | 1.43  | 1.28 |

表 2 6 个稀释浓度标本 Lp(a)结果

| 标本编号 | 加入高值<br>相对量 | 实测<br>值 1 | 实测<br>值 2 | 实测值<br>均值 | 斜率   | 平均<br>斜率 | X(nmol/L)<br>预期值 | Y <sub>1</sub><br>(nmol/L) | Y <sub>2</sub><br>(nmol/L) | Y 实测均值<br>(pmol/L) |
|------|-------------|-----------|-----------|-----------|------|----------|------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1    | 0           | 0.2       | 0.9       | 0.6       | —    | —        | —                | 0.0                        | 0.0                        | 0.6                |
| 2    | 1           | 50.1      | 47.5      | 48.8      | 48.8 | —        | 49.9             | 49.6                       | 47.0                       | 48.3               |
| 3    | 2           | 103.8     | 101.6     | 102.7     | 51.4 | —        | 99.7             | 103.3                      | 101.1                      | 102.2              |
| 4    | 3           | 154.3     | 154.7     | 154.5     | 51.5 | 49.9     | 149.6            | 153.8                      | 154.2                      | 154.0              |
| 5    | 4           | 201.0     | 201.4     | 201.2     | 50.3 | —        | 199.4            | 200.5                      | 200.9                      | 200.7              |
| 6    | 5           | 236.6     | 236.4     | 236.5     | 47.3 | —        | 249.3            | 236.1                      | 235.9                      | 236.0              |

—:无数据。

**2.3 临床可报告范围评价** 选取的 3 份标本浓度分别为 253.73、330.17、460.27 nmol/L,按照厂商提供的可稀释倍数 3 倍来稀释标本,检测稀释后的样品浓度,3 次重复测定取均值,稀释后浓度实测均值分别为 87.90、112.73、158.93 nmol/L。计算 R,分别为 103.9%、102.4%、103.6%,R 均在 90%~110% 范围内,表明 Lp(a)稀释倍数为 3 倍,临床可报告范围范围为:7~720 nmol/L。

**2.4 参考区间验证结果** 20 份健康人血清标本浓度均在仪器说明书提供的参考区间内,符合试剂说明书提供参考范围,无结果超出所验证的参考范围,参考范围通过验证,表明健康人群参考范围为小于 75 nmol/L。

**2.5 比对试验结果** 86 份标本用新一代颗粒检测试剂盒(以 nmol/L 报告结果)、与罗氏原装旧一代质量检测试剂盒(以 mg/L 报告结果,简称罗氏)及日本生研的质量检测试剂盒(简称生研)同时检测,获得新一代颗粒检测试剂盒与罗氏的相关方程为  $Y = 0.1798X - 4.5674, r = 0.8961 (P < 0.01)$ ;与生研的相关方程为  $Y = 0.2112X - 5.4600, r = 0.9274 (P < 0.01)$ 。 $r$  均大于 0.85,表明新旧两代试剂相关性良好。同时发现新旧单位之间存在一定的转换因子:1 nmol/L × 4.167 = 1 mg/L。

**2.6 Lp(a)与其他检测项目相关性分析** 将全部试验标本的 Lp(a)(5.4~479.1 nmol/L)与 ALT(5.4~479.1 nmol/L)、AST(8~411 U/L)、TBIL(1.9~25.3 μmol/L)、UREA(3.5~

21.9 mmol/L)、CREA(29~199 μmol/L)、TG(0.47~5.67 mmol/L)、CHOL(2.8~10.9 mmol/L)、HDL-C(0.51~2.45 nmol/L)、LDL-C(1.3~8.39 nmol/L)做相关分析。结果显示

与 TBIL、CHOL 有显著相关( $P<0.05$ ),与其余项目无显著相关( $P>0.05$ ),即 Lp(a)检测不受 ALT、AST、UREA、CERA、TG、HDL-C、LDL-C 影响,仅受 TBIL、CHOL 影响,见表 3。

表 3 Lp(a)与其他检测项目相关性分析

| 统计指标     | ALT    | AST    | TBIL   | UREA   | CREA   | TG    | CHOL  | HDL-C | LDL-C |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| <i>r</i> | -0.120 | -0.091 | -0.372 | -0.096 | -0.087 | 0.056 | 0.263 | 0.226 | 0.159 |
| <i>P</i> | 0.363  | 0.487  | 0.003  | 0.464  | 0.509  | 0.670 | 0.042 | 0.083 | 0.225 |

### 3 讨 论

Lp(a)是富含胆固醇的脂蛋白,在肝脏中不依赖于 TG 合成,且不受年龄和饮食影响。Lp(a)水平主要由 6 号染色体上的 Apo(a)基因决定,Apo(a)的大小为 187~662 kb,不同个体间和种族间有着不同的水平。目前使用的 LP(a)试剂盒多以总质量(mg/L)表示 Lp(a)水平,采用针对 Lp(a)分子上这个可变区域内的抗体检测,如果标本中 Apo(a)颗粒小于校准品中使用的 Apo(a)分子时,就会得到低于标本实际 Lp(a)水平的结果;如果标本中 Apo(a)颗粒大于校准品中使用的 Apo(a)分子时,就会得到高于标本实际 Lp(a)水平的结果;造成评估心血管风险中会存在过高或过低评估<sup>[8]</sup>。由于 Lp(a)分子大小的异质性,使得以总质量(mg/L)表示 Lp(a)测量结果变得毫无意义。基于上述原理的各种测定方法表现出了很强的变异性和程度各异的标准水平,造成临床上难以比对不同研究之间的 Lp(a)结果<sup>[2]</sup>。只有采用与 Apo(a)颗粒大小无关的,可识别每一个颗粒上的一份 Lp(a)抗体的方法测定 Lp(a),才能对测定进行标准化,得到正确的结果。罗氏公司推出的新一代 Lp(a)颗粒单位检测试剂盒,利用了 IFCC 国际参考试剂 SRM2B,它的定值可溯源至 Lp(a)的协同参考系统,采用了与 Apo(a)分子大小无关的,针对 Apo(a)上 2 种不同的独特表位有特异性的单克隆抗体来测定 Lp(a),实现了测定的标准化,为临床不同研究之间的结果提供了标准化<sup>[9]</sup>。研究发现 Lp(a)的绝对分子数量水平对心血管疾病的风险预测能力远高于 Lp(a)质量情况,因此用 nmol/L 报告结果表示的 Lp(a)微粒的总数量更能准确地预测心血管疾病的风险情况<sup>[10]</sup>。

本实验室在罗氏 Cobas8000 全自动生化分析仪上,参考 CLSI 文件进行部分调整后,对新一代 Lp(a)颗粒单位检测试剂盒的精密性、线性范围、可报告范围和参考范围等进行了分析评价<sup>[11]</sup>。研究结果显示,在 Cobas8000 全自动生化分析仪上 LP(a)测定的精密性达到了厂家的检测声明,批内和批间精密性都小于 2%。线性评价采用简便的平均斜率法,LP(a)的浓度在 0.6~236.0 nmol/L 范围内具有良好线性关系,与厂家提供线性范围 7~240 nmol/L 相符合。可报告范围达到 7~720 nmol/L,可满足临床需要。参考区间的验证选择 20 份体检合格的健康人血清标本,全部通过验证。目前 Lp(a)的参考值因为不同的种族、地区、检测方法而有较大差异,只有解决了 Lp(a)测定的标准化问题,才能为临床提供可靠的数据,颗粒单位检测法很好地解决了这一问题,但还需要更多的临床试验来证明。比对试验中,分别与罗氏原装试剂盒、日本电化生研株式会社的旧一代质量检测试剂盒(以 mg/L 报告结果)比较,测定结果显示与两者均有良好相关性,*r* 分别为 0.896 1 和 0.927 4,并且新旧单位之间存在一定的转换因子:1 nmol/L×4.167=1 mg/L,这为不同研究之间的结果统一提供了依据,但由于本试验样本数不够,还应该通过更大量的样本来验证这一转换因子。本试验还发现 Lp(a)测定结果不受标本中

ALT、AST、UREA、CERA、TG、HDL-C、LDL-C 的水平影响,仅与 TBIL、CHOL 水平呈现相关性,这可能与 Lp(a)结构有关,它是富含胆固醇的脂蛋白,所以 CHOL 水平影响 Lp(a)的结果,而 TBIL 水平影响 Lp(a)结果的原因有待进一步探讨,这也说明了 Lp(a)结果不受饮食、肝功能、肾功能、TG 等因素的影响,对临床心血管疾病的诊断是一个相对独立的因素。

综上所述,笔者认为新一代 Lp(a)颗粒单位检测试剂盒有良好的性能指标,实现了测定的标准化和溯源性,且不受血清中大多数项目的影响,能较好地反映标本中 Lp(a)水平。Lp(a)测定的标准化将在心血管疾病早期诊断中作出贡献,为不同临床研究结果的准确性、可比性提供保障。

### 参考文献

- [1] Loscalzo J. Lipoprotein(a), a unique risk factor for atherothrombotic disease[J]. Arteriosclerosis, 1990, 10(5): 672-679.
- [2] 史光华,冯静. 血清脂蛋白(a)测定方法及其与疾病的关系[J]. 中国医药导刊, 2009, 11(2): 292-294.
- [3] Dati F, Tate JR, Marcovina SM, et al. First WHO/IFCC international reference reagent for lipoprotein (a) for Immunoassay—Lp(a) SRM 2B[J]. Clin Chem Lab Med, 2004, 42(6): 670-676.
- [4] Clinical and Laboratory Standard Institute. EP15-A2 User verification of performance for precision and trueness[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C28-A2 How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.
- [8] Marcovina SM, Albers JJ, Scanu AM, et al. Use of a reference material proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a)[J]. Clin Chem, 2000, 46(12): 1956-1967.
- [9] Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation[J]. Clin Chem, 1986, 32(3): 470-475.
- [10] Hopewell JC, Seedorf U, Farrall M, et al. Impact of lipoprotein(a) levels and apolipoprotein(a) isoform size on risk of coronary heart disease[J]. J Intern Med, 2014, 276(3): 260-268.
- [11] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.