

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.19.1048

·论著·

## 胶乳增强免疫透射比浊法测定 NGAL 的性能评价

李玲, 李从荣

(武汉大学人民医院检验科, 湖北 武汉 430060)

**【摘要】目的** 评价胶乳增强免疫透射比浊法商品化试剂盒测定中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的性能。**方法** 分析商品化 NGAL 胶乳增强免疫透射比浊法试剂盒在全自动生化分析仪上检测的精密度、准确度、线性、抗干扰能力和比对实验等性能。**结果** 检测的准确度较好, 批内精密度(CV)≤10%, 批间精密度(CV)≤15%, NGAL 浓度在 25~2 565 ng/ml 范围内, 理论值与实测值均呈线性相关, 相关系数  $r \geq 0.990$ ; 检测不同浓度干扰物(甘油三酯、胆红素、血红蛋白、抗坏血酸)时, 其干扰程度≤10%, NGAL 试剂盒的检测结果均不受影响。两个不同全自动生化分析仪厂家间比较, 相关系数为 0.996, 线性回归方程为  $y=0.994x-5.388$ , 预期偏差可接受。**结论** 该商品化 NGAL 试剂盒的准确度、精密度、线性范围和抗干扰能力均良好, 可批量测定, 且快速、操作方便、简单, 可作为临床常规 NGAL 测定方法使用。

**【关键词】** 胶乳增强免疫透射比浊法; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; 性能; 评价

**【中图分类号】** R446.61    **【文献标识码】** A    **【文章编号】** 1003-6350(2015)19-2882-03

**Evaluation of the performance of latex-enhanced immunoturbidimetric assay for neutrophil gelatinase-associated lipocalin.** LI Ling, LI Cong-rong. Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, CHINA

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the performance of latex-enhanced immunoturbidimetric assay in the determination of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). **Methods** The precision, accuracy, linearity and anti-jamming performances were evaluated during the tests on a fully automatic biochemical analyzer with the commercialized kit of latex-enhanced immunoturbidimetric assay for NGAL. **Results** A good accuracy was obtained, with the intra specific variation coefficient (CV) of ≤10% and the inter specific variation coefficient (CV) of ≤15%. The measured values were linearly related to the theoretical values when the concentrations of NGAL were in the range of 25~2 565 ng/ml ( $r \geq 0.990$ ). It was observed that the interfering components had no impact on the test results from NGAL kits when different concentrations of the interfering components (such as triglycerides, bilirubin, hemoglobin, ascorbic acid) were presented in the test, with the degree of interference≤10%. Comparison between two different automatic biochemical analyzer manufacturer showed  $r^2=0.996$ ,  $y=0.994x-5.388$ . The bias was acceptable between the two systems. **Conclusion** The accuracy, precision, linearity and anti-interference ability of commercialized kit for NGAL evaluation are excellent. The kit is suitable for a great quantity samples analyzing, and the assay is fast, simple, and can be easily operated, which can be used as a routine clinical method for NGAL determination.

**[Key words]** Latex-enhanced immunoturbidimetric assay; Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; Performance; Evaluation

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)是载脂蛋白家族成员之一, 属于脂质运载蛋白超家族<sup>[1]</sup>。NGAL 早期检测主要采用免疫组化 SP 法和酶联免疫吸附法, 限制了其在临床的常规应用。本试验采用国产商品化试剂盒和日本进口全自动生化分析仪, 用胶乳增强免疫比浊法定量检测 NGAL, 旨在评价 NGAL 检测方法的性能, 为其临床应用提供指导。

### 1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 东芝全自动生化分析仪、日立全自动生化分析仪、武汉市长立生物技术有限责任公司 NGAL 试剂、质控品、校准品。

1.2 研究对象 收集本院门诊 100 例患者新鲜血清, 男性 58 例, 女性 42 例, 年龄 10~65 岁。收集的血清标本均无溶血、黄疸和脂血。分装好后置-20℃冷冻保存, 血清标本在复溶后 24 h 内检测。

1.3 标本采集 于清晨采集研究对象空腹静脉

血5 ml,15~20 min待血液完全凝固后3 500 r/min离心5 min后分离血清。

#### 1.4 方法

1.4.1 NGAL检测原理 标本中的NGAL与试剂中的NGAL抗体胶乳颗粒反应,产生凝集以致浊度上升,该浊度高低与NGAL浓度呈正比。通过测定特定波长的吸光度值变化,参照校准曲线即可计算出血清中NGAL的含量。

1.4.2 NGAL浓度的检测方法 按试剂生产厂家提供的上机参数进行设置并定标,待定标通过后进行实验。

1.4.3 精密度验证实验 参考CLSI文件EP5-A2<sup>[2]</sup>,实验标本的准备:收集健康人新鲜混合血清和不同浓度的NGAL血清标本,配制成所需要的浓度:高浓度(1 275 ng/ml,H)、中浓度(733 ng/ml,M)、低浓度(98 ng/ml,L)各30套(每套分装300 μl),-20℃冷冻保存。批内精密度测定:取高、中、低值三个不同浓度的血清各一份,分别用试剂盒校准,当天每隔1 h测定一次,重复测定20次,计算平均值(Mean)、标准差(S)和变异系数(CV)。批间精密度测定:用试剂盒单次校准后,每天分别测定一次高、中、低值三个不同浓度的血清,共20 d,计算Mean、S和CV。

1.4.4 准确度验证实验 用批号为14-0121P的校准品校准检测系统后,对同一批号和不同批号(15-0130)校准品进行检测,各重复测定3次,分别计算平均值、绝对偏差和相对偏差。

1.4.5 线性验证实验 参考CLSI文件EP6-A<sup>[3]</sup>,取高值标本(2 565 ng/ml)和低值标本(25 ng/ml)等量混匀后制备中值标本(1 295 ng/ml),中值标本再分别与低、高值标本等量混匀,得两个不同浓度水平的标本(660 ng/ml、1 930 ng/ml),5个不同浓度水平的标本(25 ng/ml、660 ng/ml、1 295 ng/ml、1 930 ng/ml、2 565 ng/ml)分别重复测定4次后求平均值。参考CLSI文件EP6-A进行线性分析。

1.4.6 干扰验证实验 临床化学实验室中常见的干扰来自于血清标本,标本的脂血、黄疸、溶血和抗坏血酸是最常见的干扰因素。本实验选取NGAL为98 ng/ml和1 275 ng/ml的两个浓度水平标本作为基础标本。其中将干扰物质与基础标本按不同比例混合,使其甘油三酯系列干扰浓度为:2 mmol/L、4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L;胆红素系列干扰浓度为:100 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L、400 μmol/L、500 μmol/L;血红蛋白系列干扰浓度为:1.0 g/L、2.0 g/L、3.0 g/L、4.0 g/L、5.0 g/L;抗坏血酸系列干扰浓度为:300 μmol/L、600 μmol/L、900 μmol/L、1 200 μmol/L、1 500 μmol/L。将等体积的生理盐水加入混合血清中,作为无干扰血清,同时测定NGAL浓度

各10次,分别取均值,干扰值=各组均值-未加干扰物相应的均值。按CLSI文件EP7-A2<sup>[4]</sup>进行干扰试验评价。

1.4.7 比对实验 参考CLSI文件EP9-A2<sup>[5]</sup>,每天检测8份临床患者新鲜标本并编号,按照1→8和8→1的顺序分别在东芝全自动生化分析仪和日立全自动生化分析仪上进行检测,连续检测5 d,分别求其均值。组内离群值检查:以绝对差值均值的4倍作为每个检测方法的“可接受”限,以相对差值均值的4倍作为标准化检测界限,如果有一个值超过上述“可接受”限或相对范围的检测界限,检查原因,并从数据组中删除此值。从数据中删除的离群值不得超过一个。数据作图:以日立全自动生化分析仪的结果为X轴,以东芝全自动生化分析仪结果为Y轴作散点图。计算NGAL在两个医学决定水平( $X_c=100 \text{ ng/ml}, 200 \text{ ng/ml}$ )的预期偏差 $B_e$ 和预期偏差95%的可信区间,预期偏差 $B_e$ 公式为 $B_e=a+(b-1)X_c$ 。以1/2CLIA'88允许误差作为临床可接受标准,计算医学决定水平( $X_c$ )的允许误差,评判偏差是否可接受。

1.5 统计学方法 应用SPSS17.0软件进行分析。线性范围实验的相关性采用曲线拟合(Curve estimation),回归方程用线性回归分析。

## 2 结果

2.1 精密度实验 不同浓度水平血清的CV在0.82%~3.54%,CV在2.34%~4.27%,与厂家声明的批内精密度和批间精密度一致,见表1和表2。

表1 NGAL批内精密度实验结果

批内精密度	测定次数	Mean(ng/ml)	S	CV(%)
低	20	96.7	3.42	3.54%
中	20	734.1	10.93	1.49%
高	20	1269.5	10.41	0.82%

表2 NGAL批间精密度实验结果

批间精密度	测定次数	Mean(ng/ml)	S	CV(%)
低	20	97.4	4.16	4.27%
中	20	728.6	17.05	2.34%
高	20	1281.2	38.30	2.99%

2.2 准确度实验 两个不同批号校准品的测定均值和靶值的相对偏差在2.16%~4.33%,与厂家声明的准确度一致,见表3。

2.3 线性实验 NGAL线性回归方程为 $y=0.991x-10.49, r=0.999$ ,NGAL在25~2 565 ng/ml范围内呈良好线性,偏倚较小,能满足临床需要。

2.4 干扰实验 甘油三酯≤10 mmol/L,血红蛋白≤5.0 g/L,抗坏血酸≤1 500 μmol/L,胆红素≤500 μmol/L时,试剂盒测定NGAL的结果未受到干扰。

2.5 比对实验 两个系统内和系统间均无离群点;绘制日立生化分析仪和东芝生化分析仪两个系

表 3 NGAL 准确度实验结果

批号	靶值(ng/ml)	测定均值(ng/ml)	绝对偏差(ng/ml)	相对偏差(%)
14-0121P	600	613	13	2.16
15-0130	600	626	26	4.33

统测定 NGAL 的散点图(见图 1)。两个系统的相关性较好, 相关系数  $r^2$  为 0.996, 线性回归方程为  $Y=0.994x-5.388$ 。偏差: 医学决定水平(100 ng/ml、200 ng/ml)的预期偏差分别为 4.8 和 4.2, 预期偏差的 95% 可信区间分别为 94.3~105.7 和 191.3~207.1, 允许误差为 10%。允许误差大于预期偏差的 95% 可信区间的上限, 偏差可以接受。

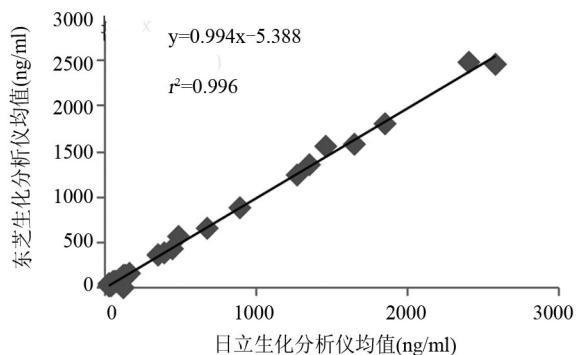


图 1 东芝生化分析仪均值对日立生化分析仪均值的散点图

### 3 讨论

目前, 我们已知的 NGAL 功能可能与免疫炎症反应<sup>[6-7]</sup>、肿瘤发生发展<sup>[8-10]</sup>以及肾脏发育有关<sup>[11]</sup>。大量研究证实 NGAL 是早期检测急、慢性肾功能损伤的重要指标<sup>[12-15]</sup>, 也是诊断急性肾损伤的最有效生物学标志之一<sup>[16]</sup>。有学者发现 NGAL 和中性粒细胞相关载脂蛋白膜受体(Neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor, NGALR)的表达与结直肠癌的发生、浸润和转移相关, 可辅助临床诊断, 并有可能成为结直肠癌临床治疗的新靶点<sup>[17]</sup>。另外研究发现妊娠期高血压患者血液中 NGAL 的含量较正常孕妇也出现显著升高<sup>[18]</sup>。NGAL 新的临床意义正在不断被发现, 因此, NGAL 的检测方法及其性能指标十分重要。

精密度和准确度是反映检测系统的重要性能指标, 其中良好的精密度是进行其他性能指标实验的前提。根据 CLSI 文件 EP5-A2 评价方案的实验结果确认, NGAL 的批内精密度和批间精密度均可接受; 在此基础上进行准确度实验, 采用两个不同批号 NGAL 校准品评价检测系统的准确度, 两个不同批号校准品的验证值与靶值的相对偏差在 2.16%~4.33%, 可接受。线性验证显示 NGAL 在 25~2 565 ng/ml 范围内呈良好线性; 血清标本中甘油三酯浓度≤10 mmol/L、胆红素浓度≤500 μmol/L、血红蛋白浓度≤5.0 g/L、抗坏血酸浓度≤1 500 μmol/L 时, NGAL 结果未受到干扰; 东芝全自动生化分析仪与日立全自动生化分析仪检测同一

商品化 NGAL 试剂相关性较好, 相关系数  $r^2=0.996$ 。

综上所述, 胶乳增强免疫透射比浊法试剂盒测定 NGAL 的性能较好, 在全自动生化分析仪上可批量检测、速度快、样品用量少、操作方便、简单, 可作为临床常规的 NGAL 检测方法使用。

### 参 考 文 献

- Chakraborty S, Kaur S, Guha S, et al. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826(1): 129-169.
- CLSI EP5-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline-second edition [S]. CLSI, 2004.
- CLSI EP6-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; a statistical approach; approved guideline [S]. CLSI, 2003.
- CLSI EP7-A2. Interference testing in clinical chemistry, approved guideline-second edition [S]. CLSI, 2005.
- CLSI EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples, approved guideline-second edition [S]. CLSI, 2010.
- Bratt T, Ohlson S, Borregaard N, et al. Interactions between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and natural lipophilic ligands [J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1472: 262-269.
- Jones DE, Bevins CL. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene [J]. J Biol Chem, 1992, 267 (32): 23216-23225.
- Bartsch S, Tschesche H. Cloning and expression of human neutrophil lipocalin cDNA derived from bone marrow and ovarian cancer cells [J]. FEBS Lett, 1995, 357(3): 255-259.
- Furntani M, Arii S, Mizumoto M, et al. Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancers using a modified signal sequence trap method [J]. Cancer Lett, 1998, 122(1-2): 209-214.
- Stoesz SP, Friedl A, Haag JD, et al. Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers [J]. Int J Cancer, 1998, 79 (6): 565-572.
- Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin [J]. Mol Cell, 2002, 10(5): 1045-1056.
- 王彩纹, 王小中. 急性肾损伤早期的分子标志物——NGAL[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(2): 125-128.
- 薛志强, 童俊容. 慢性肾脏疾病血清和尿液 NGAL 的改变及临床意义[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(5): 440-441.
- 彭兰芳, 邓任堂, 张少丰, 等. NGAL 和 KIM-1 在重症监护室危重患者早期急性肾损伤中的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10 (18): 2356-2358.
- 赵元明. 血清和尿液 NGAL 在急、慢性肾损伤中的变化及临床价值[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(3): 484-486.
- Bolignano D, Donato V, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage [J]. Am J Kidney Dis, 2008, 52(3): 595-605.
- 李亚玲, 门占康, 张煦, 等. 结直肠癌中 NGAL 和 NGALR 的表达及其临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(3): 269-272.
- 靳瑾, 余艳红, 王晨红. 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白在妊娠期高血压疾病中的表达及意义[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2011, 27(4): 300-301.

(收稿日期:2015-03-16)