

## 血清磷自主研发生化诊断试剂的临床研究\*

余文婕, 王惠萱<sup>△</sup>, 贾雄飞, 滕毅, 王珂, 陈忠明, 毕再华(解放军昆明总医院检验科, 昆明 650032)

**【摘要】目的** 进行自主研发的血清磷(P)生化诊断试剂自身的性能评价及研发试剂与进口优质 P 生化诊断试剂对血清 P 实验检测的可比性及偏倚评估, 确认研发试剂是否符合临床要求, 能否应用于临床。**方法** 自主研发血清 P 磷酸盐紫外法生化诊断试剂自身的性能评价: 做空白吸光度、重复性和线性检测。两种试剂的比对和偏倚评估依据美国临床实验室标准化协会 EP9-A 文件标准, 科学设计试验方案, 以进口德国 Olympus(Olympus)诊断试剂为对照组(X), 国内中生北控生物科技公司(中生)诊断试剂为实验组(Y), 在日本奥林巴斯(Olympus) AU5421 自动生化分析仪上测定血清 P 含量。标本选择高、中、低值 P 含量的临床患者血清共计 100 份, 每天 10 份, 每份标本正序、倒序各测定 1 次, 记录测定结果, 作统计学分析。**结果** 自主研发血清 P 生化诊断试剂空白吸光度、重复性和线性检测符合要求, X 组试剂和 Y 组试剂对临床标本 P 的检测结果经统计学处理显示: 方法内重复性检查  $DX'_i \leq 4 \overline{DX'}$ 、 $DY'_i \leq 4 \overline{DY'}$ , 离群点检查  $Eij \leq 4 \overline{E}$ 、 $Eij' \leq 4 \overline{E'}$ 、线性回归  $r=0.9973$ 、系统误差的估计值及其置信区间  $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}| < \text{允许误差}$ , 系统误差符合国际标准要求。**结论** 自主研发的 P 生化诊断试剂与公认的优质进口 Olympus 生化诊断试剂两者间具有良好的相关性; 自主研发 P 生化诊断试剂自身性能良好, 安全性和有效性符合临床应用要求。

**【关键词】** 血清磷; 诊断试剂; 临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.06.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0641-03

**Clinical research on independently developed biochemistry diagnostic reagent of serum phosphorus** SHE Wen-jie, WANG Hui-xuan, JIA Xiong-fei, TENG Yi, WANG Ke, CHEN Zhong-ming, BI Zai-hua. (Department of Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming, Yunnan 650032, China)

**【Abstract】Objective** To evaluate the performance of independently developed biochemistry diagnosis reagent of serum phosphorus(P) and to assess the comparability and bias of the results from the independently developed reagent and the imported high quality P diagnostic reagent. Then figure out if the reagent meets the clinical application requirements. **Methods** The performance evaluation of the independently developed biochemistry diagnostic reagent of P was tested by phosphorus reagent kit, including blank absorbance, repeatability and linearity tests. The comparison and bias evaluation of the two reagents was in accordance with EP9-A, and the experiment was designed properly. We took imported biochemistry diagnostic reagent of German Olympus as the control group(X), and the biochemistry diagnosis reagent from domestic Zhongsheng as the experimental one(Y). We tested the serum P content by Japanese Olympus AU5421 automatic biochemistry analyzer, 100 specimens containing high, middle and low P contents from clinical patients were selected and 10 specimens were taken per day, each specimen was detected by positive sequence and reverse sequence. The results were recorded and statistical analysis was performed. **Results** Blank absorbance, repeatability and linearity of the independently developed biochemistry diagnostic reagent of serum P was in line with the standards. According to the statistic software, the test results of P using X set reagent and Y set reagent respectively showed that: repetitive inspection within methods showed  $DX'_i \leq 4 \overline{DX'}$ 、 $DY'_i \leq 4 \overline{DY'}$ . Outlier test result was  $Eij \leq 4 \overline{E}$ 、 $Eij' \leq 4 \overline{E'}$ . Linear regression  $r=0.9973$ . Systematic errors estimate value and confidence interval  $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}| < \text{permissible error}$ , as a result systematic errors was in line with international standard requirements. **Conclusion** The results of the independently developed biochemistry diagnostic reagent of P and the imported high quality P diagnostic reagent have high degree of correlation. The independently developed biochemistry diagnostic reagent of P presents high quality, and its safety, effectiveness meet the clinical practice requirement.

**【Key words】** serum phosphorus; diagnostics reagent; clinical research

体内的磷(P)主要以磷酸盐的形式参与许多对生命活动非常重要的物质代谢过程和能量代谢过程。临床应用中, 血清 P 是急诊和危重患者重要的检测指标, 是医生诊治疾病的重要

依据, 因此诊断试剂的性能关系着检测数据的及时、准确, 但长期使用进口试剂, 不仅费用昂贵, 而且依赖性强, 因此自主研发生化诊断试剂势在必行, 本研究依据美国临床实验室标准化协

会(CLSI)EP9-A 文件标准<sup>[1]</sup>用 Olympus P 生化诊断试剂和中生 P 生化诊断试剂,对临床血清 P 的检测结果进行分析和实验比对研究及对自主研发试剂自身的性能进行实验研究,现将结果报道如下。

### 1 材料与方 法

1.1 标本 本研究收集成都军区昆明总医院日常进行 P 检测的新鲜、无溶血、无黄疸患者血清标本,根据标本入选标准和剔除标准:剔除测定值小于线性下限 0.1 mmol/L 和测定值大于线性上限 5.0 mmol/L 的标本,在小于或等于 0.9、0.9~1.5、≥1.5 mmol/L 3 个范围内共选定 100 份标本,男 50 份,女 50 份,年龄最大 94 岁,最小 7 岁。其中小于或等于 0.9 mmol/L 21 份,占 21%,0.9~1.5 mmol/L 30 份,占 30%,≥1.5 mmol/L 49 份,占 49%。

1.2 试剂、标准品和质控品 对照方法(X):Olympus P 生化诊断试剂,批号为 LOT 7532;磷钼酸紫外法;配套校准品批号为 LOT 0113,配套质控品:水平 1,批号为 LOT 50025 2010-06-01,水平 2 批号为 LOT 0026 2010-06-01。实验方法(Y):中生 P 生化诊断试剂,批号为 LOT 090091;磷钼酸紫外法;配套校准品批号为 LOT 08011;配套质控品水平 1 与水平 2 批号均为 LOT 090081 201008。

1.3 仪器 日本 Olympus AU5421 自动生化分析仪。

#### 1.4 研发试剂的原理、主要成分与特点

1.4.1 原理 本法为磷钼酸紫外法。酸性条件下钼酸铵同血清清里无机磷反应,形成非还原性磷钼酸化合物,在 340 nm 测量吸光度,吸光度增加与血清无机磷成正比,与同样处理的校准品比较,可求得样本中无机磷的含量。

1.4.2 主要成分 钼酸铵。

1.4.3 特点 液体双试剂,开瓶即用,可应用于全自动生化分析仪。

1.5 检测方法 由专业技术人员严格按照本实验室的标准操作规程进行实验。

#### 1.5.1 自主研发试剂盒临床性能评价

1.5.1.1 空白吸光度 在波长 340 nm(光径 1 cm)处检测,以纯水为检测样本,重复测定 2 次,计算吸光度。

1.5.1.2 重复性 用 P 试剂盒重复测定两个浓度水平的血清样本各 20 次,计算不同样本测定值的均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ )。

1.5.1.3 线性 在 0.1~5.0 mmol/L 用接近线性范围上限的高浓度人血清样本和生理盐水,按比例混合成 5 个以上稀释浓度。以此为样本,分别用 P 测定试剂盒测定每个浓度样本,重复测定 3 次,应用统计学软件 SPSS13.0 对测定数据进行多项式拟合,得到一级、二级和三级方程及对应的相关系数( $r$ ),对拟合曲线非线性系数 b2 和 b3 进行  $t$  检验。

1.5.2 两种试剂临床比对和偏倚评估 (1)定标:分别用 X 和 Y 各自配套定标液进行试剂定标。(2)质量控制:分别用 X 和 Y 的配套 2 个浓度质控液进行质控操作,各重复 3 次,结果都在控。(3)对挑选的标本进行编号及检测<sup>[2]</sup>。每天选取高、中、低值临床血清标本各 10 份,分别用两种诊断试剂以 1-10 号顺序进行 P 测定,再按相反顺序 10-1 号重复测定,检测在 2 h 内完成,以上步骤重复 10 d,共检测 100 份标本。方法内重复性检查:计算 X 和 Y 两方法各两次测定值之差、Y 方法两次

测定值之差与 X 方法两次测定值之差的平均值、Y 方法两次测定值之差的平均值、X 方法两次测定值的标准化值、Y 方法两次测定值的标准化值。离群点检查:计算两种方法之间的绝对偏差及其平均值、两种方法之间的相对偏差及其平均值。进行线性回归及偏倚分析:通过 EXCEL 2003 统计软件分析计算两种方法检测结果的相关系数,继而对数据进行分组分析和趋势线分析,在 EXCEL 2003 软件上分别用函数 LINEST 和 IN-TEPCEPTA 计算斜率和截距。系统误差的估计值及其置信区间计算:根据美国 CLIA'88 允许变异,Y 方法与 X 方法的偏倚要求应该小于 1/2 CLIA'88 允许差<sup>[3]</sup>,将 P 的医学决定水平浓度定为  $X_c=1.45$  mmol/L,代入回归方程后,计算两检测法之间的系统误差的估计值( $\hat{B}_c$ )和置信区间( $|\hat{B}_{low}, \hat{B}_{high}|$ )。

1.6 统计学方法 研发试剂自身的性能研究应用统计学软件 SPSS13 对测定数据进行分析,两种诊断试剂对血清 P 测定结果的统计分析在 EXCEL 2003 上编制程序进行分析。

## 2 结 果

### 2.1 自主研发试剂临床性能评价结果

2.1.1 空白吸光度 实测结果:试剂空白吸光度 1、2 分别为 0.426 6、0.414 6,结果表明试剂空白吸光度小于或等于 0.800,符合试剂盒的设计要求。

2.1.2 重复性 重复测定结果的变异系数(CV)均小于或等于 5%,表明符合试剂盒的设计要求。

2.1.3 线性 三级方程 b2、b3 的  $P>0.05$ ,二级方程 b2 的  $P<0.05$ ,说明最佳拟合为二级曲线,即此试剂的线性呈二阶线性。

### 2.2 两种试剂临床比对和偏倚评估

2.2.1 两种试剂的均值结果 X 试剂对血清 P 测定结果的均值为 1.680 mmol/L;Y 试剂对 P 测定结果的均值为 1.650 mmol/L(公式: $\bar{X}=\frac{\sum X_{ij}}{N}, \bar{Y}=\frac{\sum Y_{ij}}{N}$ )。两均值无明显差异。

2.2.2 方法内重复性检查 X 方法两次测定值的标准化值的均值  $\overline{DX'}=0.024 9$ ;Y 方法两次测定值的标准化值的均值  $\overline{DY'}=0.019 7$ 。可以看出: $DX'_i = \frac{|x_{i1}-x_{i2}|}{x_i} \leq 4 \overline{DX'}$ 、 $DY'_i = \frac{|y_{i1}-y_{i2}|}{y_i} \leq 4 \overline{DY'}$ 、 $4 \overline{DX'}=0.099 6$ 、 $4 \overline{DY'}=0.078 6$ ,说明两方法均重复性好,符合相关性实验要求。

2.2.3 离群点检查 显示: $\bar{E}=0.048 1, \overline{E'}=0.034 1$ 。  $E_{ij} \leq 4\bar{E}$ ;  $E'_{ij} \leq 4\overline{E'}$  ( $4\bar{E}=0.192 4, 4\overline{E'}=0.136 5$ ),说明无离群点存在。

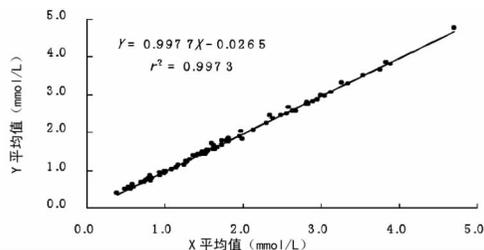


图 1 Y 平均值与 X 平均值线性关系

2.2.4 进行线性回归及偏倚分析 通过统计软件分析,线性回归显示: $r$  为 0.997 3,满足 EP9-A 标准  $r \geq 0.975$  (或  $r^2 \geq$

0.95)的要求<sup>[4]</sup>。继而对数据进行分组分析和趋势线分析,结果见图 1~4。图 1 显示 Y 平均值与 X 均值线性关系良好,图 2 显示 Y 单个观测值与 X 平均值线性关系良好,图 3 是两方法均值相对偏差的偏置曲线图[相对偏差=(Y 平均值-X 平均值)/X 平均值×100%],显示两种方法对同一份血清 P 的测定均值差值较小,分布较合理,图 4 是 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线图[相对偏差=(Y 单个观测值-X 平均值)/X 平均值×100%],显示 Y 方法测定单个值与 X 均值相比偏差较小,分布较合理。

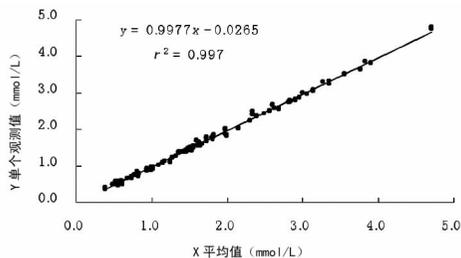


图 2 Y 单个观测值与 X 平均值线性关系

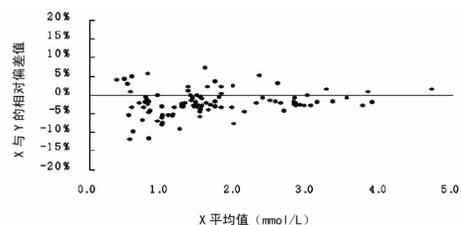


图 3 两种方法均值相对偏差的偏置曲线

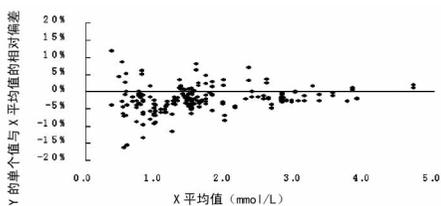


图 4 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线

**2.2.5 系统误差的估计值及其置信区间计算** 根据  $\hat{B} = a + (b-1)X_c$  得到 Y 方法相对于 X 方法系统误差的估计值为  $-0.029835$ ;  $X_c$  水平下的系统误差的 95% 的可信区间  $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}| = [0.013, 0.023]$ , 根据允许误差  $= \pm \text{BIAS}\% \times X_c = [-0.134, 0.134]$ , 可见  $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}| < \text{允许误差}$ , 因此系统误差符合临床要求<sup>[5]</sup>。

### 3 讨论

**3.1 临床试验的背景** 人体内的磷主要以磷酸盐的形式参与许多对生命活动非常重要的物质代谢过程和能量代谢过程。血液中的磷可分为 4 部分:(1)无机磷,以  $H_2PO_4^-$  及  $HPO_4^{2-}$  的形式存在;(2)有机磷或磷酸酯,如甘油磷酸酯、磷酸核苷酸等;(3)含磷脂类,如卵磷脂、脑磷脂等;(4)少量的其他磷化物。血液中的磷和骨骼中的磷维持动态平衡。血中钙和磷浓度之间有一定关系,健康人血钙升高则血磷降低,主要收维生素 D、甲状旁腺素和降钙素调节。磷水平的控制在某种程度上由肾的排泄调节<sup>[5]</sup>。本研究根据《体外诊断试剂临床研究技术指导

原则》的要求,验证该试剂盒在临床应用上的适用性和准确性。

**3.2 产品的适应证或功能** 血清无机磷增高可见于:(1)甲状旁腺功能减退症;(2)假性甲状旁腺功能减退症;(3)维生素 D 过多症;(4)肾功能不全或衰竭;(5)多发性骨髓瘤和骨折愈合期。高磷血症常无症状,但常伴有不同程度低钙的有关症状。血清无机磷降低可见于:(1)甲状旁腺功能亢进(甲亢);(2)肾小管变性病变,尿磷排泄增多;(3)甲亢伴骨代谢异常;(4)肝硬化等;(5)某些药物也可使血磷下降<sup>[6]</sup>。本试剂盒在医学临床上用于检测人血清中无机磷的含量,为上述临床疾病提供临床诊断参考依据。

**3.3 临床试验的项目内容和目的** 将本试剂盒与已经通过 SFDA 认证或经 CE 认证的试剂盒(对照)作比较,对本品的安全性、有效性进一步确认。使用对照试剂盒和受试试剂盒对同一批血清样本进行检测,比较检测结果,来验证该试剂盒与对照试剂盒是否实质性等效,以及是否对临床检测具有同样的安全性和有效性。

**3.4 随着我国医改扩容,体检市场的恢复,诊断试剂作为医学检验重要的组成部分,得到了大力的发展,其对人类疾病预防、临床诊断、治疗日益重要。因此国内自主研发的生化诊断试剂也在不断地发展和创新,与同类进口试剂相比,价格低廉,大幅度提升我国体外诊断试剂的国产能力和国际竞争能力。本研究本着支持民族产业发展,进行了自主研发试剂的临床试验评价。根据 EP9-A 文件,结合临床工作实际情况选择不同血清 P 浓度的患者新鲜血清标本 100 例,用进口生化诊断试剂和国内自主研发的生化诊断试剂对血清 P 的检测结果进行比对及偏倚评估研究及对自主研发试剂的性能进行实验研究。以方法学比对评估的系统误差小于 1/2 CLIA'88 的允许误差范围属临床可接受水平,在 Olympus AU5421 生化分析仪上,评价了自主研发生化和进口生化诊断试剂临床测定值的相符性,说明自主研发生化诊断试剂在临床应用方面具有相同的应用价值,且自身性能良好,安全性和有效性符合临床应用要求。**

### 参考文献

[1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples. EP9-A2 [M]. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2002.

[2] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2004:111-123.

[3] 刘月芳,刘正洁. 国产与进口生化试剂的分析与比较[J]. 中国医药导刊,2009,11(2):286-287.

[4] 张艳. 两检测系统测定血清电解质的比对试验[J]. 淮海医药,2008,26(2):153-154.

[5] 殷昌斌,刘巍,李家伟,等. 非配套检测系统的溯源性和可比性[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(4):122-124.

[6] 刘斌剑,郑淑辉,胡俊,等. 不同检测系统生化指标测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 中华医学杂志,2007,31(1):13-16.