

血清胆固醇自主研发生化诊断试剂的临床研究^{*}

贾雄飞¹, 吴乐斌^{2△}, 王惠莹¹, 李雪梅¹, 滕毅¹, 余文婕¹, 陈忠明¹ (1. 解放军昆明总医院检验科 650032; 2. 中生北控生物科技有限公司, 北京 100083)

【摘要】 目的 进行自主研发的血清胆固醇 (CHO) 生化诊断试剂自身的性能评价及与进口优质 CHO 生化诊断试剂对血清 CHO 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** 自主研发的血清 CHO COD-PAP 法生化诊断试剂自身的性能评价做空白吸光度、重复性和线性功能评价。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, 以进口日本 Olympus 诊断试剂为对照组 (X), 国内中生北控生物科技有限公司 (中生) 诊断试剂为实验组 (Y), 在奥林巴斯 (Olympus) AU5421 自动生化分析仪上测定血清 CHO 含量。标本选择高、中、低值血清 CHO 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, 做统计学分析。**结果** 自主研发血清 CHO 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 组试剂对临床标本血清 CHO 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 $r^2 = 0.995$ 、系统误差的估计值及其置信区间 $|\hat{B}_{Low}, \hat{B}_{High}|$ 小于允许误差, 系统误差符合国际标准要求。**结论** 自主研发的 CHO 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; 自主研发的 CHO 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】 血清胆固醇; 诊断试剂; 临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.06.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0644-03

Clinical research of serum cholesterin biochemistry diagnostic reagent by independent research and development JIA Xiong-fei¹, WU Le-bin^{2△}, WANG Hui-xuan¹, LI Xue-mei¹, TENG Yi¹, SHE Wen-jie¹, CHEN Zhong-ming¹. (1. Department of Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Zhongsheng Beikong Bioscientific and Technical Co, Ltd, Beijing 100083, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the performance of independently developed serum cholesterin (CHO) biochemistry diagnostic reagent and to evaluate the comparability and bias of the results between the independently developed reagent and the imported high quality CHO diagnostic reagent. Then figure out if the reagent meets the clinical application requirements. **Methods** The performance evaluation of the independently developed of biochemistry diagnostic reagent of CHO was tested by COD-PAP method; measuring blank absorbance, repeatability and linearity. To evaluate the contrast and bias of two reagents in accordance with EP9-A^[1], the experiment was designed properly. Take imports the biochemistry diagnosis reagent of Japanese Olympus as the control group (X), the biochemistry diagnosis reagent of domestic Zhongsheng as the experimental group (Y). To measure the serum CHO content on Olympus AU5421 automatic biochemistry analyzer. 100 specimens containing high, middle and low contents of serum CHO 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 independently researched and developed serum CHO biochemistry diagnosis reagent was in line with the standards. Through an examination for the clinical specimen with the X set reagent and the Y set reagent CHO, getting results, by using statistic software showed that: methods with in the repetitive inspection $DX'_i \leq 4 \overline{DX'}$, $DY'_i \leq 4 \overline{DY'}$, outlier checks $Eij \leq 4\overline{E}$, $Eij' \leq 4\overline{E'}$, linear regression $r^2 = 0.995$, systematic errors estimates and confidence interval $|\hat{B}_{Low}, \hat{B}_{High}| < \text{permissible error}$, systematic errors in line with International standard requirements. **Conclusion** The independently developed CHO biochemistry diagnosis reagent and the recognized high quality imported diagnostic reagent both have the good relevance. High quality performance of independently researched and developed CHO biochemistry diagnostic reagent is safe, effective and meets the clinical practice requirement.

【Key words】 serum cholesterin; diagnostics reagent; clinical research

血清胆固醇 (CHO) 浓度增加见于动脉粥样硬化、肾病综合征、胆总管阻塞及黏液性水肿, 是脂类代谢的标志, 对糖尿病

患者预后具有重要意义, 临床中糖尿病昏迷患者几乎都存在血清 CHO 浓度的增加情况^[1]。随着检验医学的快速发展, 为患者

^{*} 基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”重点课题 (2006AA020901)。 [△] 通讯作者, E-mail: bjzhsh@public3.bta.net.cn。

提供更加低廉更加实惠的检测项目成为自主研发生化诊断试剂的目标之一。本研究依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP9-A 文件标准^[2]用 Olympus CHO 生化诊断试剂和中生 CHO 生化诊断试剂对临床血清 CHO 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血清 CHO 检测的新鲜、无溶血、无黄疸患者血清标本,根据样本入选标准和剔除标准:剔除测定值小于线性低限 1.29 mmol/L 和测定值大于线性高限 12.93 mmol/L 的标本,在小于或等于 3.9 mmol/L,3.9~6.5 mmol/L,6.5~9.1 mmol/L 和大于或等于 9.1 mmol/L 范围共选定 100 份标本,其中男 53 份,女 47 份,年龄最大 89 岁,最小 1 岁。 ≤ 3.9 mmol/L 30 份,占 30%, $3.9 \sim 6.5$ mmol/L 40 份,占 40%, ≥ 9.1 mmol/L 30 份,占 30%。

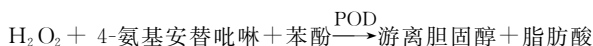
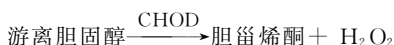
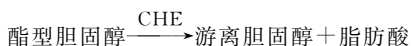
1.2 试剂和标准品质控品 对照方法(X):Olympus CHO 生化诊断试剂,批号为 LOT 7886;COD-PAP 法;配套校准品批号为 LOT 0013;配套质控品:水平 1,批号为 LOT 50025 2010-06-01,水平 2,批号为 LOT 0026 2010-06-01。实验方法(Y):中生 CHO 生化诊断试剂,批号为 LOT 090091;COD-PAP 法;配套校准品批号为 LOT 08011;配套质控品水平 1 与水平 2 批号均为 LOT 090081 201008。

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 COD-PAP 法。胆固醇约 1/3 为游离胆固醇,2/3 为与脂肪酸结合的胆固醇酯。胆固醇酯被胆固醇酯酶(CEH)水解成游离胆固醇,后者被胆固醇氧化酶(COD)氧化成 Δ^4 -胆甾烯酮,并产生过氧化氢(H_2O_2), H_2O_2 再经过氧化物酶(POD),4-氨基安替吡啉(4-AAP)与酚(三者合称 PAP)反应,生成红色醌亚胺色素,醌亚胺的最大吸收在 500 nm 左右,吸光度与标本中总胆固醇含量成正比。

反应式:



1.4.2 主要成分 胆固醇酯酶(CEH),胆固醇氧化酶(COD),过氧化物酶(POD),4-氨基安替吡啉(4-AAP),苯酚。

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 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)空白吸光度:在主波长 505/540 nm(500~540 nm)(光径 1 cm)处,以纯水为检测样本,重复测定 2 次,计算吸光度。(2)重复性:用 CHO 试剂盒重复测定两个浓度水平的血清样品各 20 次,计算不同样品测定值的均值($\bar{x}$)和标准差(s)。(3)线性:在 1.29~12.93 mmol/L 用接近线性范围上限的高浓度和低浓度人血清样品,按比例混合成 11 个稀释浓度。将此作为样品,分别用 CHO 测定试剂盒测定每个浓度样品,重复测定 3 次,应用统计学软件 SPSS13 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 第一步定标:分别用 X 和 Y 各自配套定标液进行试剂定标;第二步做质量控制: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。最后对挑选的标本进行编号及检测。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 号顺序进行血清 CHO 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,将所得结果、整理打印进行后续分析。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 统计软件计算两种方法检测结果的相关系数,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 INTEPCEPTA 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,实验 Y 方法与 X 方法的偏倚要求应该小于 $1/2CLIA'$ 88 允许差,因此将 CHO 的医学决定水平浓度定为 5.18 mmol/L($X_c = 5.2$ mmol/L)^[3],将 X_c 代入回归方程,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($|\hat{B}_{c_{low}}, \hat{B}_{c_{high}}|$)。

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 CHO 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 自主研发试剂盒临床性能评价结果

2.1.1 空白吸光度 实测结果 试剂空白吸光度 1、2 分别为 -0.000 4、-0.0010,结果表明试剂空白吸光度小于或等于 0.02,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 3%,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 CHO 测定结果的均值为 5.5 mmol/L;Y 试剂对血清 CHO 测定结果的均值为 5.4 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 $\overline{DX'} = 0.009 875$;Y 方法两次测定值的标准化值的均值 $\overline{DY'} = 0.012 275$ 。可以看出:

$$DX'_i = \frac{|x_{i1} - x_{i2}|}{x_i} \leq 4 \overline{DX'}, DY'_i = \frac{|y_{i1} - y_{i2}|}{y_i} \leq 4 \overline{DY'}$$

$4\overline{E} = 0.039 5$, $4\overline{E'} = 0.049 1$,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: $\overline{E} = 0.115$, $\overline{E'} = 0.023 625$ 。 $E_{ij} \leq 4\overline{E}$, $E_{ij'} \leq 4\overline{E'}$ ($4\overline{E} = 0.46$, $4\overline{E'} = 0.0945$),说明无离群点存在。

2.2.4 进行线性回归及偏倚分析 线性回归显示: r^2 为 0.995,满足 EP9-A 文件 $r \geq 0.975$ (或 $r^2 \geq 0.95$)的要求^[4]。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 CHO 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。

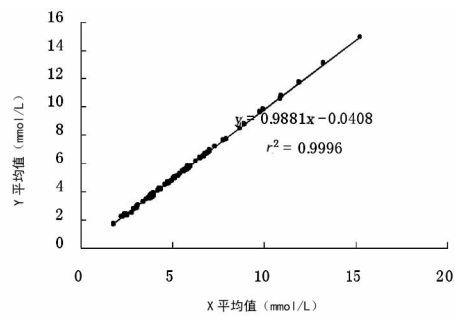


图 1 Y 平均值与 X 平均值线性关系

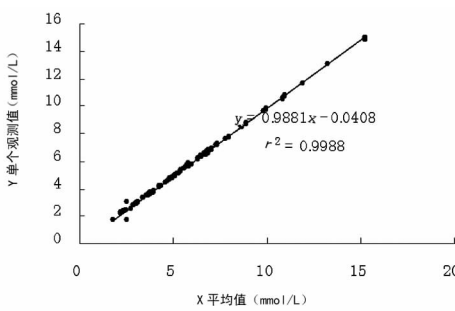


图 2 Y 单个观测值与 X 平均值线性关系

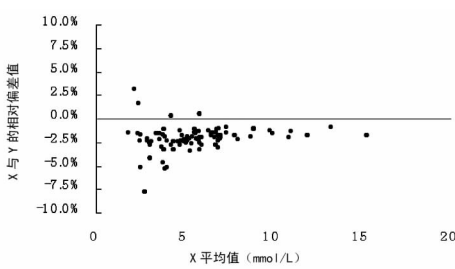


图 3 两方法均值相对偏差的偏置曲线

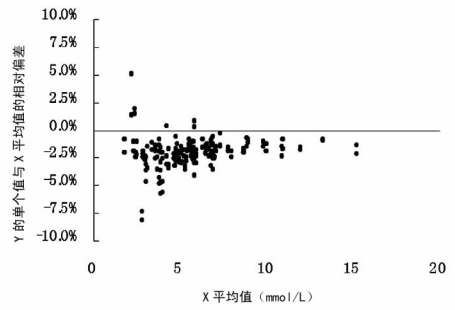


图 4 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线

2.2.5 系统误差的估计值及其置信区间计算 Y 方法相对于 X 方法系统误差的估计值为0.257 202;Xc 水平下的系统误差的 95%的可信区间| $\hat{B}_{Clow}$, $\hat{B}_{Chigh}$ |= [0.06, 0.22],根据允许误差=±BIAS%×Xc=[-0.518, 0.518],可见| $\hat{B}_{Clow}$, $\hat{B}_{Chigh}$ | 小于允许误差,因此系统误差符合临床要求^[5]。

3 讨 论

3.1 临床试验的背景 CHO 的合成在体内普遍存在,它是组成细胞膜和脂蛋白的主要成分,是合成类固醇激素和胆汁酸的前体。血浆中 25%~40% 的胆固醇是游离的,其余是被不饱和脂肪酸所酯化的(C16 和 C18 脂肪酸)结合型,这两种通常作为总胆固醇一起检测^[5]。测定胆固醇指征为早期辨认动脉粥样硬化的危险性和使用降脂药治疗后的检测反应。本研究根据《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求,为了验证该试剂盒在临床应用上的适用性和准确性,开展临床验证工作。

3.2 产品的适应证或功能 血清 CHO 浓度可作为脂类代谢的标志,并对糖尿病患者预后有重要意义,糖尿病昏迷的患者几乎都有血清 CHO 浓度的增加。CHO 增加还见于动脉粥样硬化、肾病综合征、胆总管阻塞及黏液性水肿;在恶性贫血、溶血性贫血以及甲状腺功能亢进时,血清 CHO 含量降低;其他如在感染、营养不良等情况下,CHO 总量常见减低^[6]。本试剂盒在医学临床上用于检测人血清中 CHO 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 本研究根据 EP9-A 有关文件,结合临床工作实际情况选择不同 CHO 浓度的患者新鲜血清标本 100 例,在 Olympus AU5421 生化分析仪上,评价了国内自主研发生化诊断试剂与进口生化诊断试剂临床测定值的相符性,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,结果显示自主研发生化试剂与进口生化诊断试剂测定值相符,说明自主研发生化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] 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.

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

[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] 王惠萱,贾雄飞,滕毅,等.不同试剂检测总蛋白结果的可比性及偏移评估研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(7):763-764.

[5] 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.

[6] 卫吉明,张慧丽,徐秀云.两种低密度脂蛋白胆固醇测定方法的比较[J]. 医技与临床,2009,9(13):827-828.