

血清肌酸激酶自主研发生化诊断试剂的临床研究^{*}

滕 毅¹, 王惠萱¹, 王蕴峰^{2△}, 贾雄飞¹, 余文婕¹, 朱光旭¹, 李静文¹ (1. 解放军昆明总医院检验科, 昆明 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肌酸激酶(CK)生化诊断试剂自身的性能评价及研发试剂与进口优质 CK 生化诊断试剂对 CK 实验诊断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 CK 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)的诊断试剂为对照组(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 Olympus AU5421 自动生化分析仪上测定血清 CK 含量。标本选择高、中、低值 CK 含量的临床患者血清 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 CK 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 CK 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 $r = 0.999\ 3$ 、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 CK 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 CK 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】 肌酸激酶; 诊断试剂; 临床研究

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.06.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0652-03

Clinical research on independently researched and developed serum creatine kinase biochemical diagnostic reagent^{*}

TENG Yi¹, WANG Hui-xuan¹, WANG Yun-feng², JIA Xiong-fei¹, SHE Wen-jie¹, ZHU Guang-xu¹, LI Jing-wen¹ (1. Department of Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming, Yunnan 500032, China; 2. Zhongsheng Beikong Bioscientific and Technical Co., Ltd, Beijing 100083, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the performance of independently researched and developed serum creatine kinase(CK) biochemical diagnostic reagent and to evaluate its comparability and bias with the imported high quality CK diagnostic reagent to the CK experimental detection and whether it meets the clinical requirement and can be applied in clinic. **Methods** The performance of independently researched and developed serum CK biochemical diagnostic reagent was evaluated, which including the blank absorbance, repeatability and linearity. The comparison and bias of two kinds of reagents were performed in accordance with EP9-A criterion of USA CLSI. The experimental protocol was scientifically designed with the imported biochemical diagnostic reagent of German (Olympus) as the control group(X) and the biochemical diagnostic reagent of domestic Zhongsheng as the experimental group(Y). The serum CK content was detected by Japanese Olympus AU5421 automatic biochemistry analyzer. 100 specimens containing high, middle and low contents of serum CK from clinical patients were selected and each specimen was detected once by positive sequence and reverse sequence. The results were recorded and statistically analyzed. **Results** The detections of blank absorbance, repeatability and linearity of independently researched and developed serum CK biochemical diagnostic reagent conformed to the requirements. The statistical processing for the serum CK detection results of clinical specimen by the reagents of X and Y groups showed the intra-method repeatable inspection: $DX'_i \leq 4 \overline{DX'}$, $DY'_i \leq 4 \overline{DY'}$, the outlier checks $Eij \leq 4 \overline{E}$, $Eij' \leq 4 \overline{E'}$, the linear regression $r = 0.999\ 3$, the systematic errors estimates and the confidence interval $|\hat{B}_{Low}, \hat{B}_{High}| < \text{permissible error}$ and the systematic errors in line with the international standard requirements. **Conclusion** The independently researched and developed CK biochemical diagnostic reagent has better relativity with the recognized high quality imported diagnostic reagent. Its security and effectiveness with high quality performance meet the clinical practice requirement.

【Key words】 serum creatine kinase; diagnostics reagent; clinical research

肌酸激酶(CK)是人体能量代谢中的重要酶类, 可以调节组织细胞的功能, 保证细胞生理活动的需要, 在临床上是诊断急性心肌梗死(AMI)的重要酶学指标之一, 且越来越受到临床

医生的重视, 因此医学实验室希望所用的检验系统是完整、可靠的, 实验室结果和信息是准确、可复现的。所以如何选择品质优秀、价格实惠的生化诊断试剂对实验室来说是非常重要的

^{*} 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: tengjigang@163.com。

的。本研究依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)EP9-A 文件标准^[1],科学设计试验方案,用进口生化诊断试剂和自主研发的 CK 生化诊断试剂对临床血清 CK 的检测结果进行分析和实验比对研究,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 CK 检测的新鲜、无溶血、无黄疸人血清标本,根据实验方案关于样本入选标准和剔除标准:剔除测定值小于线性下限 24 U/L,测定值大于线性上限 2 200 U/L 的标本,在小于或等于 90、90~1 000、≥1 000 U/L 范围共选定 100 份标本,男 67 份,女 33 份,年龄最大 91 岁,最小 5 岁。≤90 U/L 12 份,占 12%,其中 90~1 000 U/L 71 份,占 71%,≥1 000 U/L 17 份,占 17%。

1.2 试剂、标准品和质控品 对照方法(X): Olympus CK 生化诊断试剂,批号为 LOT 7446;速率法;配套校准品批号为 LOT 0113,配套质控品水平 1,批号为 LOT 0025 2010-06-01,水平 2 批号为 LOT 0026 2010-06-01。实验方法(Y):中生 CK 生化诊断试剂,批号为 LOT 090091;速率法;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 方法

1.4.1 方法的选择 以进口德国 Olympus(Olympus)的诊断试剂为对照组(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 Olympus AU5421 自动生化分析仪上测定血清 CK 含量。

1.4.2 仪器的校准 在熟悉评价方案后,分别用 X 和 Y 原装配套的校准品进行校准,保证仪器检测结果的量溯源性。

1.4.3 质量控制 分别用 X 和 Y 原装配套的 2 个浓度质量控制液进行质量控制操作,各重复 3 次。

1.4.4 样品的测定 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。

1.4.4.1 自主研发血清 CK 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。(1)空白吸光度:在波长 340 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 CK 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)。(3)线性:在 24~2 200 U/L 用接近线性范围上限的高浓度和低浓度人血清样本,按比例混合成 10 个稀释浓度。以此为样本,分别用考核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^[4],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 b_2 和 b_3 进行 t 检验。

1.4.4.2 两种试剂的比对和偏倚评估 (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。(3)选取标本:每天选取高、中、低值临床血清标本各 10 份,对挑选的标本进行编号及检测^[2]。(4)两种试剂检测结果的临床比对和偏倚评估: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 CK 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、相对偏差及其平均值。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,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 INTERCEPT 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 的方法^[3],将 CK 的医学决定水平浓度定为 $X_c=200$ U/L,分别计算两种方法的系统误差及其置信区间。

1.5 统计学方法 使用统计学软件 SPSS13.0,按照 EP9-A 文件标准要求,对所有的测定结果数据进行统计学分析。

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 0.133 2、0.132 9,试剂空白吸光度变化率 1、2 分别为:0.000 1、0.000 3。结果表明试剂空白吸光度小于或等于 0.300,试剂空白吸光度变化率($\Delta A/\min$)≤0.002,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 b_2 、 b_3 的 $P<0.05$,二级方程 b_2 的 $P<0.05$,说明最佳拟合为三级曲线,即此试剂的线性呈二阶线性。

2.2 两种试剂的临床比对和偏倚评估

2.2.1 质量控制 结果均在控,保证了结果的稳定性。

2.2.2 两种试剂均值结果 X 试剂对血清 CK 测定结果的均值为 333.1 U/L;Y 试剂对血清 CK 测定结果的均值为 326.3 U/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。

2.2.3 方法内重复性检查 得到 X 方法两次测定值的标准化值的均值 $\overline{DX'}=0.024\ 875$;Y 方法两次测定值 $\overline{DY'}=0.022\ 075$ 。可以看出:

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

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

$4\ \overline{DX'}=0.099\ 5$ 、 $4\ \overline{DY'}=0.088\ 3$,说明两方法均重复性好,符合相关性实验要求。

2.2.4 离群点检查 显示: $\bar{E}=10.3$ 、 $\bar{E'}=0.031\ 3$ 。 $E_{ij}\leq 4\bar{E}$; $E'_{ij}\leq 4\ \bar{E'}$ ($4\bar{E}=41.2$ 、 $4\bar{E'}=0.125\ 3$),说明无离群点存在。

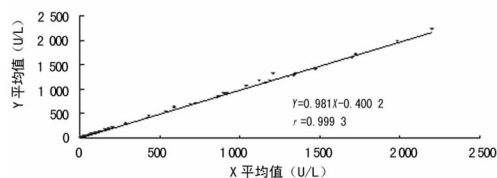


图 1 Y 平均值与 X 平均值线性关系图

2.2.5 线性回归及偏倚分析 通过 EXCEL 2003 统计软件分析,线性回归显示: r 为 0.999 3,满足 EP9-A 文件 $r\geq 0.975$ (或 $r^2\geq 0.95$)的要求^[4]。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 平均值线性关系良好,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 CK 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。

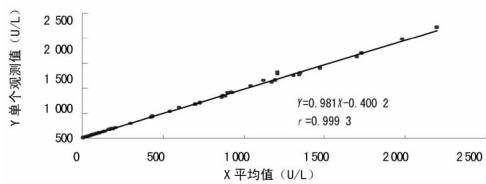


图 2 Y 单个观测值与 X 平均值线性关系图

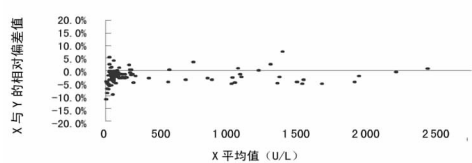


图 3 两方法均值相对偏差的偏置曲线图

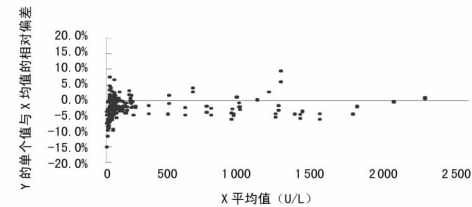


图 4 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线图

2.2.6 系统误差的估计值及其置信区间计算 两种检测法之间的系统误差的估计值($\hat{B}_c$)和置信区间($|\hat{B}_{Close}, \hat{B}_{Chigh}|$)计算得到: X_c 水平下的系统误差的 95%的可信区间 $|\hat{B}_{Close}, \hat{B}_{Chigh}| = [-9.54, 1.17]$,根据允许误差 $= \pm \text{BIAS}\% \times X_c = [-60, 60]$,可见 $|\hat{B}_{Close}, \hat{B}_{Chigh}| < \text{允许误差}$,因此系统误差符合临床要求。

3 讨 论

3.1 临床试验的背景 CK 是人体能量代谢中的重要酶类,可以调节组织细胞的功能,保证细胞生理活动的需要。CK 结构上是由 M(肌肉)型和 B(脑)型两种单体亚单位组成的二聚酶,亚基两两结合形成 3 种同工酶:CK-BB、CK-MB 和 CK-MM。同工酶在各器官中的分布有所不同,总 CK 活性主要见于骨骼肌,绝大多数为 MM 同工酶;心肌中 CK 活性也较高,其中 40%为 MB 同工酶;胃肠道和脑组织则以 BB 同工酶为主。就生理功能而言,CK 为肌肉组织能量代谢酶,可催化肌酸(Creatine)和腺苷三磷酸(ATP)生成磷酸肌酸(CP)和腺苷二磷酸(ADP)的可逆反应,CK 在临床上是诊断急性心肌梗死(AMI)的重要酶学指标之一,也是反映神经肌肉损伤的敏感项目^[5-9]。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 产品的机制、特点与试验范围 机制:在适宜的条件下,血清中的 CK 可以激活串联的酶反应,随后引发 NADP 向 NADPH 的转化。使用生化分析仪检测 340 nm 波长处吸光度的变化,可知被检测血清中的 CK 的活性。特点:液体双试剂,开瓶即用,可应用于全自动生化分析仪。试验范围:用健康人和适量病理值血清样本,在检验室进行人血清中 CK 的体外定

量分析。

3.3 产品的适应证或功能 CK 水平增高主要见于骨骼肌病变和损伤、心肌损伤、脑及神经性疾病或者内分泌疾病^[6];此外肺炎、肺梗死、急性溶血性疾病或者药物和化学品的中毒都可能引起 CK 水平的增高。CK 水平减低主要见于甲状腺功能亢进、SLE、类风湿关节炎或者干燥综合征。对于皮质类固醇治疗、化疗或者长期卧床都有可能降低血清 CK 的水平。本试剂盒在医学临床上用于检测人血清中 CK 的活性,为上述临床疾病的诊断提供参考依据。

3.4 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。

3.5 20 世纪 80 年代,国外的全自动生化分析仪及其相应的生化试剂开始进入中国,引发了临床检验成本的高涨并导致了外汇紧张。为了减轻人民群众的医疗负担,政府和学术界都高度重视生化诊断试剂国产化问题,在民族体外诊断(IVD)技术行业努力多年后,自主研发的生化诊断试剂孕育而生。本文以科学的方法评价了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,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] 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] 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.

[4] 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.

[5] Fleisher GA. Automated method for the determination of serum creatine kinase activity[J]. Clin Chem, 1967, 13(3):233-241.

[6] 陶应贤,王菊莉. 磷酸肌酸在儿科的临床应用[J]. 中国社区医师,2006,22(18):18.

[7] 张秀明,李建斋,魏明竟,等. 临床生化检验学[M]. 北京:人民军医出版社,2003.

[8] 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.

[9] 赵海燕,王蕴峰. 血清肌酸激酶活性测定和临床应用[J]. 中国当代医药,2010,17(5):13-15.