

血清肌酐苦味酸法自主研发生化诊断试剂的临床研究^{*}

夏正武¹, 周 洁^{2△}, 滕 毅¹, 姜昌丽¹, 李雪梅¹, 余文婕¹, 刘 凌¹, 陈忠明¹ (1. 解放军昆明总医院检验科, 昆明 650032; 2. 中生北控生物科技股份有限公司, 北京 100083)

【摘要】 目的 评价自主研发的血清肌酐(Cr)生化诊断试剂苦味酸法自身的性能评价及研发试剂与进口优质 Cr 生化诊断试剂对血清 Cr 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** 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。在设置好各种参数的前提下, 首先作自主研发血清 Cr 生化诊断试剂苦味酸法做自身的性能评价: 空白吸光度、重复性和线性检测; 然后取样本, 在奥林巴斯 5421 型全自动生化仪上进行两种试剂的比对和偏倚评估。**结果** 自主研发血清 Cr 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 Cr 的检测结果经统计学处理显示: 方法内重复性检查 $DX'_i \leq 4 \overline{DX}_i$, $DY'_i \leq 4 \overline{DY}_i$, 离群点检查 $Eij \leq 4\overline{E}$, $Eij' \leq 4\overline{E'}$, 线性回归 $r=0.999\ 8$ 、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 Cr 生化诊断试剂与公认的优质进口 ROCHE 生化诊断试剂间具有良好的相关性, 自主研发 Cr 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】 血清肌酐; 诊断试剂; 苦味酸法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 06. 008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)06-0659-03

Clinical research on independently researched and developed serum creatinine biochemical diagnostic reagent by Jaffe's assay XIA Zheng-wu¹, ZHOU Jie^{2△}, TENG Yi¹, JIANG Chang-li¹, LI Xue-mei¹, SHE Wen-jie¹, LIU Ling¹, CHEN Zhong-ming¹ (1. Department of Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming, Yunnan 50032, China; 2. Zhongsheng Beikong Bioscientific and Technical Co, Ltd, Beijing 100083, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the performance of independently researched and developed serum creatinine (Cr) biochemical diagnostic reagent by Jaffe's assay and to evaluate its comparability and bias with the imported high quality Cr diagnostic reagent to the Cr experimental detection and whether it meets the clinical requirement and can be applied in clinic. **Methods** According to the EP9-A criterion of USA CLST, the experimental protocol was scientifically designed. On the condition of setting various parameters rationally, the performances of biochemical diagnosis reagent for detecting plasma Cr by Jaffe's assay was evaluated, which including the detection of blank absorbency, repeatability and linearity. Then, the assessment of comparison and bias results was performed by the Olympus AU5421 automatic biochemical analyzer. **Results** The detection of the blank absorbance, repeatability and linearity of independently researched and developed serum Cr biochemical diagnostic reagent was up to the mustard. The statistical processing for the serum Cr detection results of clinical specimen by the reagents of X and Y groups showed the intra-method repeatable inspection $DX'_i \leq 4 \overline{DX}_i$, $DY'_i \leq 4 \overline{DY}_i$, the outlier checks: $Eij \leq 4\overline{E}$, $Eij' \leq 4\overline{E'}$, the linear regression: $r=0.999\ 8$, the systematic errors estimates and the confidence interval $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}| < \text{permissible error}$ and the systematic errors in line with the international standard requirements. **Conclusion** The independently researched and developed Cr 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 creatinine; diagnostics reagent; picric acid method

肌酐(Cr)的检测用于肾功能的评价较尿素敏感, 是临床反映肾小球滤过功能的较好指标, 也可作为肌肉量的评价指标^[1], 常用进口诊断试剂确保血清 Cr 检测的准确性, 但价格昂贵。近年来, 国内自主研发生化诊断试剂的突飞猛进, 不但促进了国内产、学、研的发展, 而且成为了进口试剂强有力的竞争对手。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], 科学设计试验方案, 用进口生化诊断试剂和中生 Cr 生化诊断试剂, 对临床血清 Cr 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 Cr 检测的新鲜、无溶血、无黄疸人血清标本, 根据标本入选标准和剔除标准: 剔除测定值小于线性下限 $22\ \mu\text{mol/L}$ 和测定值大于线性上限 $2\ 200\ \mu\text{mol/L}$ 的标本后, 在小于或等于 90 、 $90\sim1\ 000$ 、 $\geq 1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ 范围共选定 100 份标本, 男 60 份, 女 40 份, 年龄最大 95 岁, 最小 8 岁。其中小于或等于 $90\ \mu\text{mol/L}$ 59 份, 占 59%, $90\sim1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ 29 份, 占 29%, $\geq 1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ 12

^{*} 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: 43JYK@163.com。

份,占 12%。

1.2 试剂/标准品和质控品 对照方法(X): ROCHE Cr 生化诊断试剂,批号为 LOT 607477-01,苦味酸法;配套校准品批号为 LOT 181259-03;配套质控品中值,批号为 LOT 178985-01,高值批号为 LOT 180667-04。实验方法(Y): 中生 Cr 生化诊断试剂,批号为 LOT 090092;苦味酸法;配套校准品批号为 LOT 080012;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 自主研发试剂的空白吸光度、重复性和线性测定。

1.4.1.1 空白吸光度 在波长 505 nm(480~520 nm)(光径 1 cm)处,以纯水为检测样本,重复测定 2 次。

1.4.1.2 重复性 用 Cr 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)。

1.4.1.3 线性测定 在 22~2 200 $\mu\text{mol/L}$ 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 9 个稀释浓度。以此为样本,分别用 Cr 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 b_2 和 b_3 进行 t 检验。

1.4.2 两种试剂的临床比对和偏倚评估

1.4.2.1 定标 分别用 X 和 Y 各自配套定标液进行试剂定标。

1.4.2.2 质量控制 分别用 X 和 Y 配套的 2 个浓度质控液进行质控操作,各重复 3 次。

1.4.2.3 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^[3]。

1.4.2.4 临床比对和偏倚评估方法 分别用两种诊断试剂以 1—10 号顺序进行血清 Cr 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。

均值的比较:按公式 $\bar{X} = \frac{\sum X_{ij}}{N}$ 、 $\bar{Y} = \frac{\sum Y_{ij}}{N}$ 分别计算均值后比较。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,分析。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,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 的方法^[4],将 Cr 的医学决定水平浓度定为 $X_{c1} = 88.4 \mu\text{mol/L}$ 、 $X_{c2} = 265.2 \mu\text{mol/L}$,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 应用统计学软件 SPSS13.0 对研发试剂自身的性能研究和两种诊断试剂测定血清 Cr 的结果数据进行分析。

2 结 果

2.1 自主研发试剂盒临床性能研究结果

2.1.1 空白吸光度 实测结果:试剂空白吸光度 1、2 分别为 0.013 7、0.013 5,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 0.500,试剂空白吸光度变化率($\Delta A/\text{min}$) ≤ 0.005 ,符合试剂盒的设计要求。

2.1.2 重复性试验 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 线性测定 三级方程 b_2 、 b_3 的 $P > 0.05$,二级方程 b_2 的 $P < 0.05$,说明最佳拟合为二级曲线,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,保证结果的稳定性。

2.2.2 两种试剂的均值结果 X 试剂对血清 Cr 测定结果的均值为 340.2 $\mu\text{mol/L}$;Y 试剂对血清 Cr 测定结果的均值为 336.3 $\mu\text{mol/L}$ 。两均值无明显差异。

2.2.3 方法内重复性检查 X 方法两次测定值的标准化值的均值 $\overline{DX'} = 0.019 4$;Y 方法两次测定值的标准化值的均值 $\overline{DY'} = 0.022 1$ 。可以看出:

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

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

$4 \overline{DX'} = 0.077 7$ 、 $4 \overline{DY'} = 0.088 2$,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: $\bar{E} = 12.9$ 、 $\bar{E'} = 0.039 9$ 。 $E_{ij} \leq 4\bar{E}$ 、 $E'_{ij} \leq 4\bar{E'}$ ($4\bar{E} = 51.6$ 、 $4\bar{E'} = 0.159 7$),说明无离群点存在。

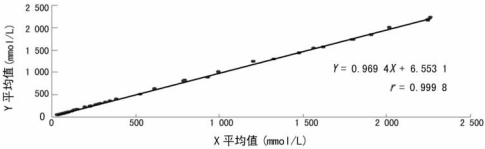


图 1 X 平均值与 Y 平均值线性关系图

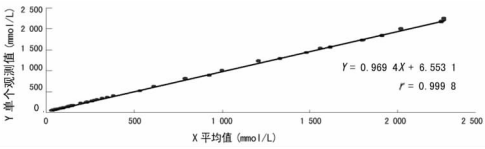


图 2 Y 单个观察值平均值与 X 平均值线性关系图

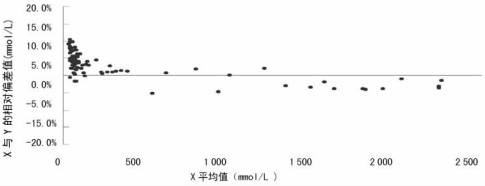


图 3 两方法均值相对偏差的偏置曲线图

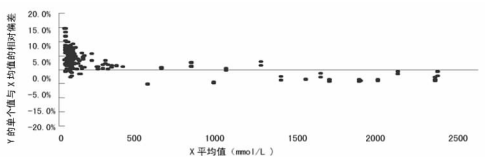


图 4 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线图

2.2.5 进行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 8,满足 EP9-A 标准 $r \geq 0.975$ (或 $r^2 \geq 0.95$)的要求^[5]。数据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 $\times 100\%$],显示两种方法对同一份血清 Cr 的测定均值差值较小,分布较合理,图 4 是 Y 单个值与 X 平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 $\times 100\%$],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。

2.2.6 系统误差的估计值及其置信区间计算 两检测法之间的系统误差的估计值(B_C)和置信区间($|B_{Clow}, B_{Chigh}|$)计算得到: X_{c1}, X_{c2} 水平下的系统误差的 95% 的可信区间 $|B_{Clow}, B_{Chigh}|_1 = [0.39, 7.32], |B_{Clow}, B_{Chigh}|_2 = [0.46, 7.25]$ 。根据允许误差 $=\pm \text{BIAS}\% \times X_c$,两个 X_c 下的允许误差分别为:允许误差 1= $(-26.52, 26.52)$ 、允许误差 2= $(-39.78, 39.78)$ 。可见 $|B_{Clow}, B_{Chigh}| < \text{允许误差}$,因此系统误差符合临床要求。

3 讨 论

Cr 是肌酸代谢的最终产物,它是由磷酸肌酸通过脱磷酸基并闭环成环而形成的内脱水物。Cr 是肌肉组织代谢产物的废物,它仅仅由肾小球排泄,不被肾小管重吸收。血清 Cr 浓度和尿中 Cr 排泄量,正常时主要与体内肌肉总量关系密切^[6]。测定血清 Cr 浓度及根据血清 Cr 与 Cr 浓度计算所得的 Cr 清除率,可作为肾小球滤过率受损的指标^[7],深受临床重视。因此,血 Cr 测定是肾功能检测的重要常规生化指标^[8]。

EP9-A 文件是美国临床实验室标准化委员会在 1995 年出台的标准化系列文件之一,用患者血清标本,按 EP9-A 特定的测试顺序,不同浓度间相互交错,浓度选择覆盖检测线性范围,更接近临床标本的真实情况,适用同一标本于不同仪器、方法、试剂的检测结果对比分析和偏差评估,评价结果真实可靠。本研究根据 EP9-A 文件,结合临床工作实际情况选择不同 Cr 浓度的患者新鲜血清标本 100 例,将自主研发生化诊断试剂与进口生化诊断试剂进行比对,在 Olympus AU5421f 生化分析仪上,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,评价了国产与进口生化诊断试剂临床测定值的相符性,验证了自主研发 Cr 生化诊断试剂的产品

质量和综合性能,安全性和有效性均符合临床应用要求,说明自主研发生化诊断试剂可取代进口生化诊断试剂应用于临床。

在实际的临床应用中,由于目标人群和地域的不同,将可能影响到检测试剂的有效性,如国内人群血脂正常参考值低于欧洲人群,所以进口产品中的参考范围可能不适用于临床的实际应用,而国内自主研发的生化诊断试剂,将能为国内的临床使用提供更科学、客观和实际的检验诊断。

参考文献

- [1] 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.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples, approved guideline, EP9-A2A[M]. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 1986:1-14.
- [3] 吴立翔,林一民,沈德华. 不同分析系统检测 AST、ALT、BUN、CRE、GLU 的偏倚分析及应用[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(11):992-993.
- [4] 贾雄飞,王惠莹. 两种生化试剂测定 GGT 的方法对比及偏差评估[J]. 中国实验诊断学,2010,14(3):334-336.
- [5] 郑菲,韩波,石启洋. 不同生化分析系统血清肌酐、尿素测定结果的偏倚评估[J]. 临床和实验医学杂志,2007,6(4):88-89.
- [6] 张秀明. 现代临床生化检验学[M]. 北京:人民军医出版社,2001:1-71.
- [7] 陈文彬,王友赤. 诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:380-381.
- [8] 林其燧. 临床化学诊断方法大全[M]. 北京:北京大学出版社,1990:8.

(收稿日期:2010-08-22)

(上接第 658 页)

- [2] Nguyen P, Olszak I. Myeloperoxidase detection by three color flow cytometry and by enzyme cytochemistry in the classification of acute leukemia[J]. Am J Clin Pathol, 1998,110(2):163-169.
- [3] Imamura N. Sensitive detection technique of myeloperoxidase precursor protein by flow cytometry with monoclonal antibodies[J]. Am J Hematol, 1998,58(3):241-243.
- [4] Konikova E, Glasova M. Intracellular markers in acute myeloid leukemia diagnosis[J]. Neoplasma, 1998,45(5):282-291.
- [5] Groeneveld K, Marvelde J. Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes[J]. Leukemia, 1996,10(8):1383-1389.
- [6] Knapp W, Strobl H. Flow cytometric analysis of cell surface and intracellular antigen in leukemia diagnosis[J]. Cytometry, 1994,18(4):187-198.
- [7] Baker E, Gerard D. HL-60 cell growth conditioned medium is an effective inducer of myeloperoxidase expression in K-562 human leukemia cells[J]. Leuk Res, 2002,26

(11):1017-1025.

- [8] Kappelmayer J, Gratama W. Flow cytometric detection of intracellular myeloperoxidase, CD3 and CD79a[J]. J Immunol Methods, 2000,242(1-2):53-65.
- [9] Liu YR, Yu H. Detection of cytoplasmic antigens by flow cytometry and its implication for leukemia immunophenotyping[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2002,10(1):17-21.
- [10] Latorraca A, Lanza F. Diagnostic value of MPO and lysozyme antibodies in acute leukemia. Implications for the definition of FAB subtypes using a flow cytometric approach in combination with different permeabilising methods[J]. Eur J Histochem, 1997,41(Suppl 2):27-28.
- [11] Lanza F, Latorraca A. Comparative analysis of different permeabilization methods for the flow cytometry measurement of cytoplasmic myeloperoxidase and lysozyme in normal and leukemic cells[J]. Cytometry, 1997,30(3):134-144.

(收稿日期:2010-09-27)