

血清肌酐酶法自主研发生化诊断试剂的临床研究^{*}

王惠萱¹, 唐建国^{2△}, 贾雄飞¹, 李雪梅¹, 滕毅¹, 余文婕¹, 朱光旭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 自主研发的血清肌酐(Cr)酶法生化诊断试剂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** 进行自主研发血清 Cr 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(CLSI)EP9-A 文件标准, 科学设计试验方案, 以进口德国 ROCHE(ROCHE)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 Cr 含量。标本选择高、中、低值血清 Cr 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 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 组试剂对临床标本血清 Cr 的检测结果经统计学处理显示: 方法内重复性检查 $DX_i' \leq 4 \overline{DX'}$, $DY_i' \leq 4 \overline{DY'}$, 离群点检查 $Eij \leq 4 \overline{E}$, $Eij' \leq 4 \overline{E'}$, 线性回归 $r=0.999\ 9$ 、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 Cr 生化诊断试剂与公认的优质进口 ROCHE 生化诊断试剂二者间具有良好的相关性; 自主研发的 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; 酶法; 诊断试剂; 临床研究

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0513-03

Clinical study on independently researching and developing serum creatinine biochemical diagnostic reagent by enzymatic assay^{*} WANG Hui-xuan¹, TANG Jian-guo^{2△}, JIA Xiong-fei¹, LI Xue-mei¹, TENG Yi¹, SHE Wen-jie¹, ZHU Guang-xu¹ (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 researched and developed serum creatinine (Cr) biochemical diagnostic reagent by enzymatic 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** The performance of independently researched and developed serum Cr biochemical diagnostic reagent was evaluated, which including the blank absorbance, repeatability and linearity. The comparison and bias evaluation on two kinds of reagents was performed in accordance with EP9-A criterion of USA CLSI. To scientifically design the experiment protocol with the imported biochemical diagnostic reagent of German ROCHE as the control group(X) and the biochemical diagnostic reagent of domestic Zhongsheng as the experimental group(Y). The serum Cr content was detected by the Japanese Olympus AU5421 automatic biochemistry analyzer. 100 specimens containing high, middle and low contents of serum Cr 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 Cr biochemical diagnostic reagent conformed to the requirements. 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: $DX_i' \leq 4 \overline{DX'}$, $DY_i' \leq 4 \overline{DY'}$, the outlier checks: $Eij \leq 4 \overline{E}$, $Eij' \leq 4 \overline{E'}$, the linear regression: $r=0.999\ 9$, the systematic errors estimates and confidence interval $|\hat{B}_{Low}, \hat{B}_{High}| < \text{permissible error}$ and the systematic errors in line with 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; enzymatic assay; diagnostics reagent; clinical research

近年来我国的检验诊断技术经过不懈努力, 缩小了与国际检验诊断技术的差距, 体外诊断试剂的自主创新和发展, 建立了产学研相结合的技术创新体系。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肌酐(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

^{*} 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。

发试剂自身的性能进行实验研究,现将结果报告如下。

1 材料与与方法

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、无黄疸患者血清标本,根据实验方案关于标本入选标准和剔除标准,剔除测定值小于线性低限 $22 \mu\text{mol/L}$ 和测定值大于线性高限 $3\ 000 \mu\text{mol/L}$ 的标本后,在小于或等于 90 、 $90 \sim 1\ 500$ 、 $\geq 1\ 500 \mu\text{mol/L}$ 范围共选定 100 份标本,男 64 份,女 36 份,年龄最大 88 岁,最小 6 岁。其中小于或等于 $90 \mu\text{mol/L}$ 41 份,占 41%; $90 \sim 1\ 500 \mu\text{mol/L}$ 41 份,占 41%; $\geq 1\ 500 \mu\text{mol/L}$ 18 份,占 18%。

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 610217-01,酶法;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 090091,酶法;配套校准品批号为 LOT 080011,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 546 nm (光径 1 cm) 处检测,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 在 $22 \sim 3\ 000 \mu\text{mol/L}$ 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 11 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 两种试剂临床比对和偏倚评估 以进口德国 ROCHE (ROCHE) 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 Cr 含量。

1.4.2.1 定标 分别用 X 和 Y 各自配套定标液进行了试剂定标。

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^[2]。

1.4.2.4 两种试剂检测结果的临床比对和偏倚评估 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。

(1)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及 Y 方法两次测定值的标准化值并分析。(2)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。(3)线性回归及偏倚分析:通过 EXCEL2003 统计软件计算两种方法检测结果的 r 值,继而

对数据进行分组分析和趋势线分析,用函数 LINEST 和 INTERCEPT 计算斜率和截距。(4)系统误差的估计值及其置信

信区间计算:根据美国 CLIA'88 的方法^[3],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 研发试剂自身的性能研究应用和两种诊断试剂对血清 Cr 测定结果应用统计学软件 SPSS13.0 对测定数据进行分析。

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 试剂空白吸光度 1、2 分别为 0.005 2、0.005 2,结果表明试剂空白吸光度小于或等于 0.200,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%,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 $P < 0.05$,说明最佳拟合为二级曲线,即此试剂的线性呈二阶线性。

2.2 两种试剂的比对和偏倚评估

2.2.1 质量控制 结果均在控,保证了结果的稳定性。

2.2.2 两种试剂的均值结果 X 试剂对血清 Cr 测定结果的均值为 $387.8 \mu\text{mol/L}$; Y 试剂对血清 Cr 测定结果的均值为 $385.1 \mu\text{mol/L}$ 。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 $\overline{DX'} = 0.011\ 7$; Y 方法两次测定值的标准化值的均值 $\overline{DY'} = 0.010\ 9$ 。可以看出:

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

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

$4 \overline{DX'} = 0.047\ 0$, $4 \overline{DY'} = 0.043\ 7$,说明两种方法均重复性好,符合相关性实验要求。

2.2.4 离群点检查 结果显示: $\bar{E} = 6.5$, $\bar{E'} = 0.0516$ 。当 $E_{ij} \leq 4 \bar{E}$, $E'_{ij} \leq 4 \bar{E'}$ ($4 \bar{E} = 25.9$, $4 \bar{E'} = 0.206\ 2$),说明无离群点存在。

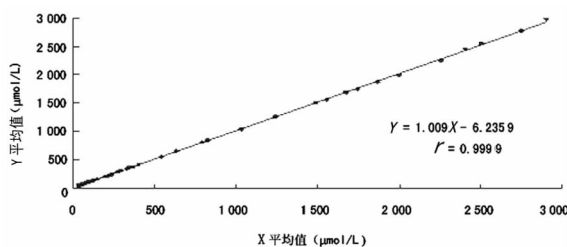


图 1 Y 平均值与 X 平均值线性关系图

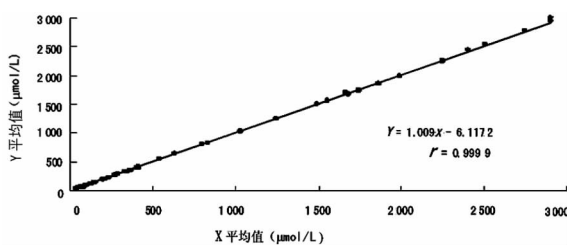


图 2 Y 单个观测值与 X 平均值线性关系图

2.2.5 线性回归及偏倚分析 线性回归显示 $r = 0.999\ 9$ 时,满足 EP9-A 标准 $r \geq 0.975$ (或 $r^2 \geq 0.95$) 的要求^[3]。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 是两种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 Cr 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。

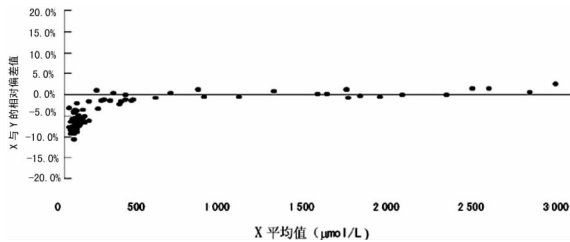


图 3 两方法均值相对偏差的偏置曲线图

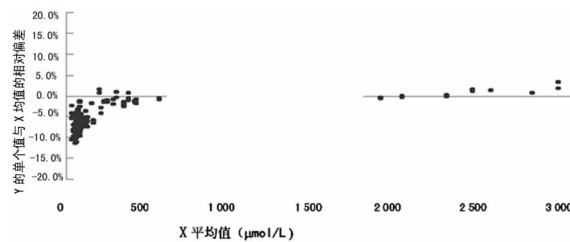


图 4 Y 单个值与 X 均值相对偏差的偏置曲线图

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($|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}|$)计算得到: X_{c1}, X_{c2} 的系统误差的 95% 可信区间 $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}|_1 = [-7.79, -3.09], |\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}|_2 = [-7.74, -3.14]$ 。根据允许误差=±BIAS%×Xc,两个 Xc 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 $|\hat{B}_{Clow}, \hat{B}_{Chigh}|$ 小于允许误差,因此系统误差符合临床要求。

3 讨论

3.1 临床试验的背景 Cr 是一种低分子质量含氮化合物(相对分子质量为 113.12),属肌酸的终末代谢产物。正常时血 Cr 浓度和尿 Cr 排泄量与体内肌肉总量关系密切;肝脏疾病时,Cr 的合成量会减少,则尿中 Cr 排泄也可减少。Cr 经历持续的肾清除过程,该项目的检测用于肾功能的评价较尿素氮敏感,是反映肾小球滤过功能的较好指标。由于肾小球滤过率(GFR)和血清 Cr 浓度的双曲线效应,直到 GFR 明显下降,Cr 才成为其减退的标志。Cr 产量与肌肉量平行,故也可作为肌肉量的评价指标^[4]。此外,急、慢性肾衰竭,糖尿病,孕期以及药物治疗等均有可能引起的 Cr 浓度变化。目前临床检测 Cr 指标主要使用苦味酸法和酶法。本研究是以酶法为反应原理的试剂。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中的适用性和准确性。

3.2 产品的机制、特点与试验范围 机制:本试剂通过检测 546 nm 波长处的吸光度变化,实现对肌酐浓度的检测。特点:酶法不受胆红素、乳糜、溶血、酮体、治疗药物及高浓度氨的影响^[5-7],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,在本实验室进行人血清或尿液中 Cr 的体外定量分析。

3.3 产品的适应证和功能 Cr 水平增高见于 GFR 降低或肾

血流量减少,如急性肾小球肾炎,慢性肾炎失代偿期,急、慢性肾功能不全等;肌肉量增大,如肢端肥大症等也会造成 Cr 水平升高。Cr 水平减低见于尿崩症、肌肉萎缩、肌营养不良、甲状腺功能亢进症以及妊娠反应等^[8]。本试剂盒在临床上用于检测人血清或尿液中 Cr 的含量,为上述临床疾病的临床诊断提供参考依据。

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,使本品的安全性、有效性进一步被确认。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 生化诊断试剂是生物技术中最早用于疾病诊断的产品,经过多年的发展,生化诊断已经成为体系较为完善的一个门类。而国内自主研发的生化诊断试剂经过多年的创新与发展,试图改观进口产品长期垄断国内市场的局面。本研究结合临床工作实际选择不同血清 Cr 含量的患者新鲜血清标本 100 例,用进口生化诊断试剂和自主研发生化诊断试剂对血清 Cr 的检测结果进行比对及偏倚评估研究。在 Olympus AU5421 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, approved guideline, EP9-A[M]. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 1986: 1-14.
- [2] 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倚评估研究[J].国际检验医学杂志,2010,31(7):763-764.
- [3] 冯仁丰.临床检验管理技术基础[M].上海:上海科学文献出版社,2003.
- [4] 徐静,徐国宾,童清,等.北京市 13 家医院 31 套血清肌酐检测系统测定结果的比对调查及分析[J].中华检验医学杂志,2007,30(11):1288-1292.
- [5] Fossati DF, Pointi M. A step forward in enzymatic measurement of creatinine[J]. Clin Chem, 1994, 40(1): 130-137.
- [6] 石凌波,林允顺,刘书霞.速率 B 法消除胆红素对血清肌酐的干扰[J].临床检验杂志,1997,15(3):145-147.
- [7] 徐国宾,朱立华,夏铁安.用肌酐亚氨水解酶偶联谷氨酸脱氢酶的肌酐酶法鉴定[J].临床检验杂志,2001,19(3): 149-151.
- [8] 贾雄飞,王惠萱,陈忠明,等.2 种生化试剂测定 ALP 的方法对比及偏差评估[J].国际检验医学杂志,2010,31(9): 1045-1046.

(收稿日期:2010-12-31)