

• 论 著 •

# 国产尿酸浓缩试剂用于 Olympus AU2700 生化分析仪的可行性研究

程明刚, 刘香萍, 曹建华, 蔡朝民, 叶国强

(广东省深圳市宝安区人民医院/南方医科大学附属宝安医院检验科 518101)

**摘要:**目的 研究国产尿酸(UA)浓缩试剂在 Olympus AU2700 生化分析仪上应用的可行性。方法 将两种 UA 浓缩试剂(广州科方医疗器械有限公司、Olympus 公司)在 Olympus AU2700 生化分析仪上校准后同时使用。结果 国产 UA 试剂测定 40 例临床标本的平均水平显著高于 Olympus 原装试剂,分别为(319.5±144.7) μmol/L 和(312.2±138.7) μmol/L,  $t=19.95, P<0.01$ ,但两方法测定结果的相关性良好( $r=0.999\ 2$ ),国产 UA 试剂在医学决定水平处的相对偏倚低于 CLIA'88 允许误差的一半,其检测低值和高值质控血清 UA 结果的批内、批间和总变异系数(CV)均小于 4.25%(1/4 的 CLIA'88 允许误差)。结论 国产 UA 试剂的精密度较高,虽然与 Olympus 原装 UA 试剂测定结果有差异,但是两者相关性好、相对偏倚小,具有可比性和一致性,可以用国产试剂替代 Olympus 原装试剂。

**关键词:**尿酸; 诊断; 指示剂和试剂; 结果评价(卫生保健)对比研究; 偏倚(流行病学); 精密度评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)06-0638-02

## Evaluation of the application feasibility of homemade uric acid concentrated reagent on Olympus AU2700 biochemical analyzer

Cheng Minggang, Liu Xiangping, Cao Jianhua, Cai Chaomin, Ye Guoqiang

(Department of Clinical Laboratory of Bao'an People's Hospital/The Affiliated Shenzhen Bao'an Hospital of the South Medical University, Guangdong Shenzhen 518101, China)

**Abstract:** **Objective** To study the application feasibility of homemade uric acid(UA)concentrated reagent on Olympus AU2700 biochemical analyzer. **Methods** Two kinds of UA concentrated reagents from Guangzhou Kefang Medical Apparatus & Instruments Co. Ltd. and Olympus were applied on Olympus AU2700 biochemical analyzer. They were all liquid reagent and ready for use and used uricase-linked-peroxidase method. According to the profile EP9-A2 described by the NCCLS, the serum concentrations of UA in 40 clinical samples were determined by Olympus original reagent(comparison method)and Kefang(homemade)reagent(test method), respectively, the results of 40 case samples were collected, Microsoft Office Excel was used for the data analysis, the correlation coefficient and linear equation were calculated, the anticipated bias between the two methods was estimated and the precisions of homemade reagent were also evaluated according to the profile EP5-A described by the NCCLS. **Results** The mean level of UA in 40 clinical samples determined by homemade reagent was significantly higher than that by Olympus original reagent[(319.5±144.7) μmol/L vs (312.2±138.7) μmol/L,  $t=19.95, P<0.01$ ], but there was a better correlation between the results of UA determined by the two reagents( $r=0.999\ 2$ ), the relative bias did not exceed the half of allowable error of CLIA'88 in the different points of medical decision standard and the intra-assay and inter-assay and total coefficient of variation(CV)of homemade reagent were acceptable( $<4.25\%$ ). **Conclusion** There is comparability and coherence of serum UA results determined by Olympus original reagent and homemade reagent. The homemade UA reagent has little relative bias and high precision and can be alternative to Olympus original UA reagent.

**Key words:** uric acid; diagnosis; indicators and reagents; outcome assessment (health care) compstudy; bias(epidemiology); precision

Olympus 原装配套试剂多数是浓缩试剂,本组从 2006 年检测生化常规项目一直使用 Olympus 原装配套试剂,由于 Olympus 原装尿酸(uric acid, UA)试剂不能正常供应(未取得新注册证),为此根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的 EP9-A2 文件<sup>[1]</sup>和 EP5-A 文件<sup>[2]</sup>对广州科方医疗器械有限公司生产(国产)的 UA 浓缩试剂应用于 Olympus AU2700 全自动生化分析仪的可行性进行实验评价。

### 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** 日本 Olympus AU2700 型全自动生化分析仪及原装 UA 试剂(货号:OSR6236,批号:4033,有效期:2010-02-01),使用 Olympus system calibrator 校准品(货号:66300,批号:113A,有效期:2010-10-01)进行校准;广州科方医疗器械有限公司生产的 UA 浓缩试剂(货号:SG05207,有效期:2010-11-05)及校准品(批号:20091029,有效期:2010-10-28)进行校准。质控品:RANDOX 水平 2(货号:601UN,批号:UN1557,

有效期:2012-12)和水平 3(货号:430UE,批号:UE1558,有效期:2012-12)。每日常规工作后收集新鲜血清 8 份分装于带盖的清洁试管内,标本中浓度分布范围参照文献[3],有足够宽的浓度范围。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验前的准备** 实验前对 Olympus AU2700 型生化分析仪进行常规维护与保养,按常规方法输入两种 UA 测定试剂的参数,并用各自的校准品进行校准,校准通过后分别测定各自的质控品,质控在控后,再进行标本测定。

**1.2.2 测定及分析方法试剂** (1)试剂:以 Olympus 原装 UA 试剂为对比方法(X),国产 UA 试剂为实验方法(Y)。临床标本分别用两种 UA 试剂按顺序 1~8,再按相反顺序 8~1 重复测定,重复 5 d,共分析 40 例标本。记录测定结果( $X_{ij}$  和  $Y_{ij}$ ),计算每个样本双份测定结果的均值( $\bar{X}_i$  和  $\bar{Y}_i$ )、每个样本双份测定值间差值的绝对值( $DX_i$  和  $DY_i$ )及两种方法测定结

果均值间的差值( $\bar{Y}_i - \bar{X}_i$ )。(2)离群点检查<sup>[4]</sup>:分别计算对比方法(X)和实验方法(Y)每样本双份测定差值绝对值的均值( $\overline{DX}$ 和 $\overline{DY}$ )和相对差值绝对值的均值( $\overline{DX'}$ 和 $\overline{DY'}$ )。如果同时超出 $\overline{DX}$ 、 $\overline{DX'}$ 或 $\overline{DY}$ 、 $\overline{DY'}$ 值的4倍,即为方法内离群点。计算两方法间平均绝对差值( $\bar{E}$ )和相对的平均绝对差值( $\bar{E'}$ ),如同时超过 $\bar{E}$ 、 $\bar{E'}$ 值的4倍,即为方法间离群点。(3)数据作图:散点图中Y轴为实验方法每样本双份测定的均值;X轴为对比方法每样本双份测定的均值。偏差图中Y轴为每样本双份测定的均值差;X轴为对比方法每样本双份测定的均值,以直线 $X=0$ 为水平中线作图。(4)线性回归方程:实验方法 $Y = bX + a$ 。(5)相关性:用相关系数( $r$ )做对比方法(X)测定范围的粗略估计,如 $r \geq 0.975$ (或 $r^2 \geq 0.95$ ),则认为X的测定范围合适,直线回归计算的斜率、截距可靠<sup>[3]</sup>。若 $r < 0.975$ 或 $r^2 \leq 0.95$ ,则使用配对 $t$ 检验对检测结果进行分析,并计算实验方法和对比方法均值的相对偏差。(6)临床可接受性能判断:根据临床使用要求,将UA给定的医学决定水平 $X_c$ 带入回归方程,计算实验方法(Y)与对比方法(X)之间的预期偏倚( $B_c$ ): $B_c = Y_c - X_c$ 和相对偏倚( $SE\%$ ): $SE\% = |Y_c - X_c| / X_c \times 100\%$ 。以CLIA'88的允许误差为判断依据, $SE\% \leq 1/2$  CLIA'88属临床可接受水平,即不同检测系统间的测定结果具有可比性。(7)精密度评价方法<sup>[2-3]</sup>:选用同一批号的RAN-DOX水平2和水平3质控血清各1瓶,按说明书要求各加5 mL去离子水复溶,分装于带盖的清洁试管内(每管0.4 mL)。每天分两批测定,各批实验至少间隔2 h,每批测定两个浓度水平,每个水平重复两次,共22 d。计算批内、批间和总的精密度。

**1.3 统计学处理** 采用Microsoft Office Excel计算两方法的相关系数( $r$ )、回归方程、医学决定水平( $X_c$ )处的偏倚和精密度,采用SPSS 13.0软件的配对 $t$ 检验分析两方法临床的标本测定结果。

**2 结果**

**2.1 临床标本测定结果** 国产试剂测定40例临床标本UA的平均水平显著高于Olympus原装试剂,分别为(319.5 ± 144.7) μmol/L和(312.2 ± 138.7) μmol/L,  $t = 19.95$ ,  $P < 0.01$ 。两方法所测结果无方法间离群点,实验方法第6号标本双份测定差值绝对值(25.0)和相对的差值绝对值(0.60)均大于4倍的相应平均值(17.07、0.055),因此6号样本的结果为方法内离群点,应予以删除。

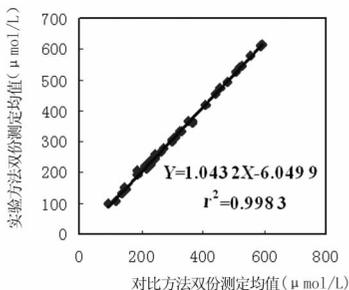


图1 两方法测定UA双份均值散点图

**2.2 两方法临床标本测定结果作图和相关分析** 剔除6号标本的结果后,两方法测定临床标本UA结果的散点图和偏差图见图1、2,可见两方法线性关系良好( $r^2 > 0.95$ ),偏差小。因 $r^2 \geq 0.95$ ,故认为对比方法(X)的测定范围合适,直线回归方程 $Y = 1.0432X - 6.0499$ ( $r = 0.9992$ )计算的斜率 $b$ 、截距 $a$

可靠。

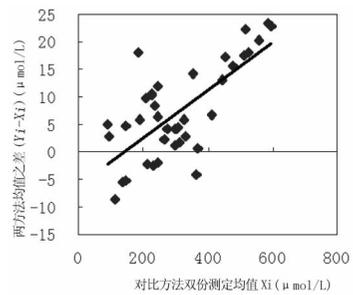


图2 UA测定 $Y_i - X_i$ 对 $X_i$ 偏差图

**2.3 临床可接受性评价** 将UA的医学决定水平 $X_1 = 110$  μmol/L,  $X_2 = 480$  μmol/L,  $X_3 = 640$  μmol/L,分别代入直线回归方程得到相应的Y值,临床可接受。

**2.4 精密度实验** 国产UA试剂测定质控血清的批内、批间、总精密度在CLIA'88允许误差内。

**3 讨论**

检测系统是指完成1个检验项目所涉及的仪器、试剂、校准品、质控品、检验程序、保养计划等内容。在Olympus生化分析仪上采用Olympus原装试剂(包括校准品、质控品、检验程序、保养计划等),这样的固定组合的检测系统即所谓的“封闭系统”,对患者样本进行检验,其检测结果具有溯源性和可比性<sup>[5]</sup>;但“封闭系统”检测成本较高,国内较多实验室未采用,从而不能保证检验结果的溯源性和可比性。

广州科方医疗器械有限公司的UA试剂同Olympus原装UA试剂相似,同样采用尿酸酶-过氧化物酶偶联法和相近的检测波长,也是浓缩的液体双试剂。如在Olympus AU2700型生化分析仪上使用,每毫升R1试剂可有16个测试,接近于普通非浓缩试剂的3倍,与Olympus原装UA试剂相比,试剂成本极大地降低,但是国产UA试剂用于Olympus AU2700生化分析仪,不是“封闭系统”,其UA检验结果的溯源性和可比性值得研究。“检验结果的溯源性和可比性”,在实验室认可的国际标准ISO/IEC17025(检测和校准实验室能力的通用要求)<sup>[5]</sup>和ISO15189(医学实验室质量和能力的专用要求)<sup>[6]</sup>中都提出了明确要求,强调方法学比较实验是实现溯源性和患者标本检验结果可比性的重要途径。因此,在Olympus AU2700生化分析仪上应用国产UA试剂,要保障其检验结果的溯源性和可比性,就必须按照NCCLS标准化文件中的EP系列文件的要求对这一非“封闭”的检测系统进行比对和方法学评价。

本研究根据NCCLS EP9-A2<sup>[1]</sup>文件和EP5-A<sup>[2]</sup>文件,以Olympus原装UA试剂为对比方法,对国产UA浓缩试剂应用于Olympus AU2700全自动生化分析仪的可行性进行比对、偏倚评估和精密度评价。本组结果显示,国产UA试剂与Olympus原装UA试剂同时检测40例临床标本,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );如果以 $r \geq 0.975$ (或 $r^2 > 0.95$ )为判断标准,两者测定结果的相关性很好( $r = 0.9992$ ),以Olympus原装UA试剂为比较,国产UA试剂测定的相对偏差均小于1/2 CLIA'88的允许范围,测定结果临床可接受,而且其测定低值、高值质控血清结果的批内、批间和总CV均小于4.25%(1/4的CLIA'88允许误差)。

综上所述,虽然国产UA试剂与Olympus原装UA试剂测定40例临床标本结果有差异,但是两者具有可比性和一致性,因此,对比方法具有溯源性,根据准确度传(下转第641页)

小于 0.5 IU/mL 血清 33 份, 0.5 IU/mL  $\leq X < 1.0$  IU/mL 血清 25 份,  $X \geq 1.0$  IU/mL 血清 42 份, 其中 1.0 IU/mL  $\leq X < 2.0$  IU/mL 血清 16 份,  $X \geq 2.0$  IU/mL 血清 26 份。对两种方法检测结果进行相关性分析, 相关系数  $r = 0.504$ ,  $P < 0.01$ , 按照  $\alpha = 0.05$  水准可认为两种方法检测结果之间具有相关关系, 但关联程度不高, 回归方程  $Y = 2.320 + 0.333X$ 。

**2.2 两种方法定性结果一致性分析** RFFIT 检测值大于或等于 0.5 IU/mL 可判定为阳性结果, 竞争性 ELISA 检测结果大于或等于 0.5 IU/mL 可判定为阳性结果, 两种方法检测 100 份人血清样品的定性结果一致率为 73%。以 RFFIT 结果为标准, ELISA 法假阴性率为 28.36% (19/67), 假阳性率为 24.24% (8/33), 即阳性符合率为 71.64% (48/67), 阴性符合率为 75.76% (25/33)。经卡方检验两种方法阳性检出率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 3.70$ ,  $P > 0.05$ ), 且两种检测方法检测结果之间有相关性 ( $\chi^2 = 16.50$ ,  $P < 0.05$ )。

**2.3 RFFIT 不同检测值范围 ELISA 检测定性结果一致性分析** 将 100 份人血清样品 RFFIT 检测值分为 4 层, 分别计数各层 ELISA 检测定性结果, 分析各层间阳性检出率差异, 经 Scheffé 可信区间法分析, 各层 95% 可信区间均包含 0, 故认为各层阳性检出率之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。以 RFFIT 结果为标准,  $X < 0.5$  IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 24.24% (8/33), 0.5 IU/mL  $\leq X < 1.0$  IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 32.00%, 1.0 IU/mL  $\leq X < 2.0$  IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 37.50%,  $X \geq 2.0$  IU/mL 层内 ELISA 检测假阴性率为 19.23%。

### 3 讨论

ELISA 检测在一般实验室就可进行, 操作简单, 单流程数小时即可完成, 适合批量样品检测, 价格低廉, 是适合大范围狂犬病病毒抗体筛查的方法<sup>[4]</sup>。ELISA 检测法包被抗原为狂犬病病毒全病毒、糖蛋白/核蛋白抗原, 测定的不仅是狂犬病病毒中和抗体, 也包括一些非中和抗体, 用等价单位 EU/mL 表示<sup>[5]</sup>。

已经报道的 ELISA 检测法包括竞争法、双抗夹心法、间接法等, 成功的 ELISA 法检测的灵敏度和特异性均应在 85% 以上<sup>[6-7]</sup>。本研究的竞争性 ELISA 与 Clique 和 McElhinney<sup>[2]</sup> 报道的竞争性 ELISA 相似, 但后者检测兽用狂犬病疫苗免疫的狗或猫血清中狂犬病病毒中和抗体效价与 FAVN 检测结果相关性很高 ( $r = 0.98$ ), 假阴性率 (2.13%) 和假阳性率 (3.65%) 较低, 适合大量免疫动物血清的筛查; Feysaguet 等<sup>[7]</sup> 报道的 PLATELIATM RABIES II ELISA 试剂盒采用狂犬病病毒糖

蛋白包被检测板, 与 RFFIT 检测比较灵敏度为 98.6%, 特异度为 99.4%, 几乎可以替代 RFFIT 进行狂犬病病毒中和抗体检测。

近年来, 国内狂犬病病毒抗体 ELISA 检测试剂盒研发取得了一定进展, 间接法 ELISA 试剂盒在全病毒抗原包被基础上已发展到采用纯化狂犬病病毒糖蛋白作为包被抗原, 同样的技术可以移植到竞争性 ELISA。国内相继开发的一系列人源或鼠源狂犬病病毒中和性单克隆抗体经酶标可尝试用于竞争性 ELISA 检测狂犬病病毒抗体, 由于竞争者为中和性抗体, 检测结果与真实的中和抗体水平可能更接近。下一步拟在包被抗原和竞争抗体方面进行改进, 探索利用基因工程表达狂犬病病毒糖蛋白包被检测板和应用酶标狂犬病病毒中和性单克隆抗体作为竞争抗体, 以期进一步提高该方法的灵敏度和特异度。

### 参考文献

- [1] 扈荣良. 狂犬病理论与防治[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 227-229.
- [2] Cliquet F, McElhinney LM. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus specific antibodies from vaccinated dogs and cats[J]. J Virol Methods, 2004, 9(117): 1-8.
- [3] World Health Organization. WHO Expert consultation on Rabies, 2004, First Report; WHO technical report series # 931[M]. Geneva, Switzerland; WHO, 2005.
- [4] 孙招金, 薛素强, 刘晓慧, 等. ELISA 与 FAVN 方法检测犬狂犬病抗体的比较[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(3): 204-206.
- [5] Sugiyama M, Yoshiki R, Tatsuno Y, et al. A new competitive enzyme linked immunosorbent assay demonstrates immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1997, 18(6): 727-730.
- [6] 徐葛林. 国内外狂犬病毒实验室检测与诊断技术的研究及进展[J]. 中国计划免疫, 2005, 4(11): 147-150.
- [7] Feysaguet M, Dacheux L, Audry L, et al. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIATM RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test on human samples from vaccinated and non-vaccinated people[J]. Vaccine, 2007, 20(25): 2244-2251.

(收稿日期: 2010-08-18)

(上接第 639 页)

递的原理, 实验方法(国产 UA 试剂)的检验结果也可具有溯源性, 故可以用国产 UA 试剂替代 Olympus 原装 UA 试剂。

### 参考文献

- [1] The National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples[S]. Approved Guideline, Second Edition, 2002.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP5-A Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved guideline[S]. NCCLS, 1999.
- [3] 杨昌国, 许叶. 精密评价和方法学比较中 NCCLS 评价方案的应用[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(1): 47-49.

- [4] 张凤川, 刘松坚, 卿翠莲. NCCLS EP9-A 在仪器评价中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 359-362.
- [5] 张秀明, 郑松柏, 孙蕾, 等. 应用 Westgard 方法评价决定图判断生化检测系统性能的可接受性[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(1): 86-90.
- [6] 国家质量技术监督局. GB/T15481-2000 idt ISO17025:1999. 检测和校准实验室能力的通用要求[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 1-15.
- [7] 魏昊, 丛玉隆. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2004: 72-75.

(收稿日期: 2010-08-12)