

• 质控与标规 •

定量分析可报告范围评估方案的优化探讨

陶 然¹, 王家健¹, 鲁 勇¹, 冯 景^{2△}

(1. 广州金域医学检验中心有限公司, 广东广州 510330; 2. 上海市奉贤区中心医院 201400)

摘要:目的 在极限浓度值样本来源困难的条件下, 优化现有实验方案, 以获得实验室定量项目的可报告范围。方法 采用 IRC 法对谷丙转氨酶(ALT)、直接胆红素(DBIL)、淀粉酶(AMY)的分析测量范围进行评估, 根据相对稀释浓度、分析测量范围、预期稀释相对浓度进行预期稀释结果的计算, 比较稀释结果和预期结果, 最后根据校准曲线参数和分析测量范围、最大稀释倍数得到可报告范围。结果 ALT、DBIL、AMY 的分析测量范围分别为 6.5~553.5 U/L、1.7~117.1 $\mu\text{mol/L}$ 、27.0~1 260.5 U/L, ALT 和 DBIL 的最大稀释倍数分别为 11 倍和 2 倍, ALT、DBIL、AMY 的可报告范围分别为: 4.0~6 600.0 U/L、1.0~257.6 $\mu\text{mol/L}$ 、13.5~1 386.5 U/L。结论 优化的线性评估、稀释验证、校准验证、极限测试的联合使用对于实验室定量项目可报告范围的制订是非常关键的。

关键词:线性评估; 稀释验证; 校准验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)01-0077-03

Optimization discussions for assessment programmes on quantitative analysis report range

Tao Ran¹, Wang Jiajian¹, Lu Yong¹, Feng Jing^{2△}

(1. Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou, Guangdong 510330, China;

2. Fengxian Central Hospital, Shanghai 201400, China)

Abstract: Objective With the condition of lack limiting concentration sample source, to optimize the existing linearity evaluation, diluted verification, calibration verification and proximity limits plans, and finally get a reportable range of quantitative tests. **Methods** For ALT, DBIL and AMY, the IRC method was used to evaluate its analytical measurement range. The expected dilution results were calculated by using the data of relative concentration, analytical measurement range and expected relative concentration, and the diluted result and expected result were compared. According to the calibration curve parameters, analytical measurement range and maximum dilution, reportable range of ALT, DBIL and AMY were obtained. **Results** The analytical measurement range of ALT, DBIL and AMY were 6.5—553.5 U/L, 1.7—117.1 $\mu\text{mol/L}$, 27.0—1 260.5 U/L respectively. The maximum dilution of ALT and DBIL were 11 and 2 times each. Reportable range of ALT, DBIL and AMY were 4.0—6 600.0 U/L, 1.0—257.6 $\mu\text{mol/L}$, 13.5—1 386.5 U/L respectively. **Conclusion** It is very critical to combine optimal linearity evaluation, diluted verification and calibration verification with proximity limits in making reportable range for quantitative tests.

Key words: linear evaluation; dilution validation; calibration verification

定量项目结果报告的正确与否, 主要取决于可报告范围的选择是否合适。《医学实验室质量和能力认可准则在临床化学检验领域的应用说明》(CNAS-CL38)技术部分 5.5.2 明确要求: 检验方法和程序的分析性能验证内容至少应包括不正确度、不精密度和可报告范围^[1]。其评估包括: 最高值和最低值的准确性测试、极限性测试^[2]和线性评估。实验室还需建立稀释方案, 结果超出或者低于这个范围之后应该如何操作^[3]。

美国病理家协会组织的校准验证和线性验证活动(Calibration Verification/Linearity Program), 包括校准验证、线性验证、稀释范围验证。实验室补充极限测试即可进行评估范围的评估, 但难度较大^[4], 本研究结合国外文献对原有评估方法进行优化, 以 3 个项目的可报告范围的制订过程为例, 作一探讨。

1 材料与方法

1.1 样本来源 所有样本均来自临床送检样本。**1.2 仪器与试剂** ROCHE MODULAR P800; 淀粉酶(AMY, LOT:666501)、谷丙转氨酶(ALT, LOT:666197)、直接胆红素(DBIL, LOT:666177)检测试剂, 罗氏公司原装试剂, 伯

乐公司常规生化质控(LOT:14400), 罗氏原装 CFAS 校准品(LOT:165676)。

1.3 统计及作图工具 SPSS 11.5, Microsoft EXCEL 2007。**1.4 样本检测** 收集厂家声明分析测量范围上限 80%~120%, 下限 100%~150% 附近浓度的患者血清, AMY、ALT 按照 0.167 V 为体积单位配制成 7 个样本, DBIL 配制按照 0.2 V 为体积单位配置成 6 个样本。室内质控在控情况下混匀平行检测 2 次, 若超限, 按最大稀释倍数进行稀释测定。按照《临床化学设备线性评价指南》(WS-T 408-2012)进行线性评估。双侧 P 值小于 0.05 显示差异有统计学意义。

若分析测量范围至少有 4 个连续的点呈线性, 并且最高浓度的点也在分析测量范围内, 即对分析测量范围外的样本进行线性判断: (1) 使用 SPSS 中进行拟合值的计算, 稀释差异的计算见公式: $Bias_d = p(x)_{ex} - y(x)$, 其中 $p(x)_{ex}$ 是测定点拟合曲线经过 Time 过程的推算值, $y(x)$ 是测定点。 $Bias_d$ 的判断限为 $p(x)_{ex}$ 乘以 0.5 倍的该项目最大允许误差; (2) 若两次稀释测定值之间的差异超过 $p(x)_{ex}$ 乘以 0.33 倍的该项目最大允许误差 TEa (medically allowable error) 即为结果不精密; A、B 步

骤中的稀释线性差异及稀释不精密度判断均在允许范围内,稀释验证通过。(3)根据厂家浓度,绘制标准曲线,两点校准(a,b),a 浓度为线性评估的最低点,b 浓度为厂家给定的非零校准值,根据未稀释样本线性评估求得的最佳方程,将 b 作为 Y 值带入得到浓度值 X,这里计为 c;(4)以(0,a)、(c,b)两点求出 $Y=a+bX$ 中的 a、b,得到校准曲线的二元一次方程;(5)每个相对浓度带入 B 步骤得到的二元一次方程,得到所有测定均值基于校准曲线的拟合值;(6)查看测定均值是否拟合值加减最小检测差异或 0.5 倍的该项目最大允许误差 TEa (取大者)的范围内。若在该范围内,校准验证得到通过,否则不通过。(7)得到报告范围(x_1, x_2),厂家报告范围为(y_1, y_2),厂家分析测量范围经过极限延展得到以下区间:下限区间为 $y_1 \pm TEa$,即(y_{1-1}, y_{1-2});上限区间为 $y_2 \pm TEa$,即(y_{2-1}, y_{2-2});若 $x_1、x_2$ 分别位于以上区间内,则厂家分析范围得以通过,否则应以(x_1, x_2)进行扩展,上限扩展 10%,下限扩展 50%,得到分析测量范围。(8)使用上述步骤得出的分析测量范围上限,乘以最大稀释倍数得到可报告范围的上限,结合分析测量范围的下限,得到该项目的可报告范围。

2 结 果

2.1 AMY、ALT、DBIL 样本测定并进行线性拟合,并进行不精密度和 ADL 的计算, σ/\bar{c} 分别为 0.73%、0.86%和 2.83%,AMY 的 ADL 为 1.08%,均通过判断限,测定结果见表 1。

表 1 AMY、ALT、DBIL 测定结果

AMY(U/L)			ALT(U/L)			DBIL(μ mol/L)		
测定 1	测定 2	平均值	测定 1	测定 2	平均值	测定 1	测定 2	平均值
28	26	27.0	6	7	6.5	1.7	1.7	1.7
239	240	239.5	146	145	145.5	61.5	61.5	61.5
457	452	454.5	284	283	283.5	116.2	117.9	117.1
664	664	664.0	417	419	418.0	171.0*	171.0*	171.0*
868	858	863.0	555	552	553.5	218.8*	218.8*	218.8*
1 062	1 057	1 059.5	676*	659*	667.5*	265.0*	266.7*	265.9*
1 262	1 259	1 260.5	776*	788*	782.0*	—	—	—

*:表示结果经稀释后测定得到。—:未测定。

2.2 对超出线性的 ALT 和 DBIL 数据推算拟合值,结果显示不精密度和偏倚均达标,见表 2。

2.3 根据校准品给出的非零校准值和验证的线性低限求得校准曲线的二元一次方程,并将校准验证浓度带入二元一次方程,将拟合值及偏倚进行结果判断,均通过,见表 3。

2.4 结合厂家提供的分析测量范围及实验评估范围决定最终

的分析测量范围,并根据最大稀释倍数得到可报告范围,见表 4。

表 2 最大稀释倍数测定结果的稀释验证结果

项目名称	相对浓度	稀释倍数	拟合推算值	重复差值	允许不精密度	偏倚	允许偏倚
ALT(U/L)	0.833	11	691	17	±46	—23	±69
	1.000	—	828	12	±55	—46	±82
DBIL(μ mol/L)	0.6	2	176.5	5.5	±12.8	—6	±19.4
	0.8	—	234.6	15.8	±17.1	—16	±25.8
	1.0	—	292.7	26.8	±32.1	—27	±21.3

—:无数据。

表 3 基于校准曲线和相对浓度的校准验证结果

项目名称	校准验证浓度	校准曲线方程	实测偏倚 1 (%)	实测偏倚 2 (%)	偏倚界限 (%)
AMY	27 U/L	$Y=27+1\ 295.08X$	1	—1	5.00
	243 U/L		—1.8	—1.3	12.50
	458 U/L		—0.3	—1.4	12.50
	674 U/L		—1.6	—1.6	12.50
	890 U/L		—2.6	—3.7	12.50
	1 105 U/L		—4.0	—4.4	12.50
	1 322 U/L		—4.5	—4.8	12.50
ALT	7 U/L	$Y=7+831.42X$	—1	0	5.00
	145 U/L		0.1	—0.6	10
	283 U/L		0.0	—0.3	10
	422 U/L		—1.4	—0.9	10
	561 U/L		—1.2	—1.7	10
	699 U/L		—3.4	—5.8	10
	838 U/L		—7.4	—6.0	10
DBIL	2.0 μ mol/L	$Y=2+291.41X$	—0.3	—0.3	5.13
	60.2 μ mol/L		2.0	2.0	11
	118.5 μ mol/L		—2.0	—0.6	11
	176.8 μ mol/L		—3.3	—3.3	11
	235.1 μ mol/L		—6.9	—6.9	11
	293.4 μ mol/L		—9.7	—9.1	11

表 4 厂家极限验证及可报告范围

项目名称	极限拓展范围	实验评估范围	厂家极限验证结果	分析测量范围	可报告范围
AMY(U/L)	0.0~8.0	27.0~1 260.5	未通过	13.5~1 386.5	13.5~1 386.5
	1 313.0~1 687.5				
ALT(U/L)	0.0~9.0	6.5~553.5	通过	4.0~600.0	4.0~6 600.0
	540.0~660.0				
DBIL(μ mol/L)	0.0~6.8	1.7~117.1	未通过	1.0~128.8	1.0~257.6
	152.2~189.8				

3 讨 论

可报告范围的建立过程见图 1。

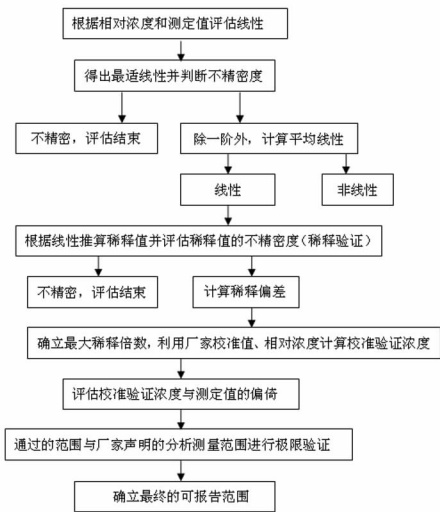
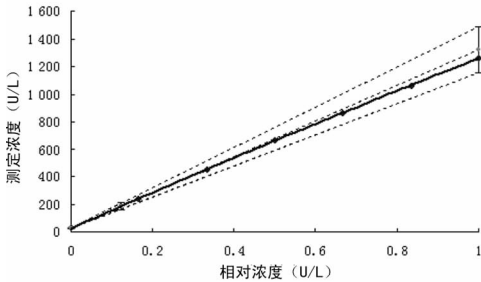


图 1 可报告范围建立路线图

进行线性评估的方法有多种,IRC 法被 CAP 的设备资源委员会 (Instrumentation Resource Committee, IRC) 所采用作为 LN 系列的线性评价方法^[5]。实验室使用该方法进行线性评估时,若一次评估为非线性,会有 20% 的假阴性率^[6],建议重新测定后再进行评价,若两次评价均为非线性,概率小于 4%,实验室需进行原因查找。建议评价的时候,将所有的测试值输入 SPSS 中,否则最适多项式的阶数及拟合值的变化,犯 II 类错误的概率增加。另外,CAP 给出了简便的不精密度判断方法:各测定值与拟合值的百分差异应小于不精密度系数乘以该项目的最大允许总误差,10 次和 12 次测定的不精密度系数分别为 0.31 和 0.34。

线性评价浓度的选取有如下建议:厂家声明分析测量范围上限 10% 以内、下限 50% 附近的患者血清,但不绝对,下限的 100%~150% 都可选择,前提是变异不影响结果解释。另外,若用相对浓度作为 X 轴判断线性可避免使用实际理论值带来的偏倚,同时最大稀释倍数的验证也一并评估。关于浓度个数,本研究使用了 6~8 个点,重复 2 次测定,这样非稀释的样本至少会有 4~5 个,有利于曲线拟合。见图 2。



以 AMY 为例,以上的实线为测定数据的线性,虚线为校准曲线及其允许偏倚,构成校准验证允许范围。

图 2 基于校准曲线和相对浓度的校准验证

校准验证是用来检查方法是否能够在分析测量范围内进

行可靠报告,至少每 6 个月进行一次并使用 3 个样本,校准验证是单个有意义点的准确性确认,而线性是整个范围内的比例确认,两方面结合,才能得出完整、有效的可报告范围^[6]。但不是每个项目都能方便地找到能够“挑战”目前分析测量范围的样本,本研究使用了 Marquis 的基于校准曲线和相对浓度的校准验证,该方法运用相对浓度这一中间桥梁,计算校准品所示浓度的相对浓度,从而将线性曲线与校准曲线联系起来,最终以校准曲线设立校准验证允许范围,来比较线性曲线的哪些测定点在此范围内,最终得到确认的分析测量范围。

进行校准验证判断时,实验室应对每个项目设置系统误差和随机误差分量,系统误差分量建议设置在 25%~50% 之间,随机误差分量设置在 16%~25% 之间。结果判断要求两次结果的差异应该小于随机误差分量,单次结果引起的偏倚不应超过总误差,单个浓度均值不应超过系统误差的分量。

2012 年 CAP 关于临床化学的检查条款中,对临床可报告范围再不做新增要求:实验室要有如何进行稀释的方案,实验室应制订出最小稀释体积及如何稀释,最小稀释体积建议为 50~100 μ L,对如何稀释,若在 SOP 中不详细说明,可能会造成误解,可理解为 1 份样本加入 9 份稀释液,或 1 份样本加入 10 份稀释液,目前两种解释市场说明书中均有出现。

对于极限测试,对于厂家声明的分析测量范围若是没有达到,可以对验证的分析测量范围进行浓度扩展,CAP 推荐对上限进行 10% 的拓展,下限进行 50% 的拓展,实验室也可以根据室内变异自行对其范围进行适当拓展,所有拓展的依据都应该明确列入标准操作规程中并经实验室主任批准后使用。

确立合适的可报告范围对于定量结果的准确报告是非常重要的,而线性验证、稀释效果验证、稀释点浓度的确认、最大稀释倍数的验证、基于校准品和相对浓度的校准验证都是实际工作中可能遇到的,实验室应对每个项目有针对性地建立相应的参数并对人员进行操作、使用的培训,只有确保可报告范围各要素的实施,才能确保结果的可靠性。

参考文献

[1] CNAS-CL38:2012,医学实验室质量和能力认可准则在临床化学检验领域的应用说明(Guidance on the Application of Accreditation Criteria for the Medical Laboratory Quality and Competence in the Field of Clinical Chemistry)[S].
[2] Rhoads DG. Lab Statistics Fun and Easy, A Practical Approach to Method Validation[J]. Fifth Edition, 2009, Appendix C.
[3] Emancipator K, Kroll MH. A quantitative measure of nonlinearity[J]. Clin Chem, 1993; 39(5): 766-772.
[4] Kroll MH, Emancipator K. A theoretical evaluation of linearity [J]. Clin Chem, 1993; 39(3): 405-413.
[5] Kroll MH. Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies [J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124 (9): 1331-1338.
[6] Jhang JS. Evaluation of linearity in the clinical laboratory [J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(1): 44-48.

(收稿日期:2013-09-24)