

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2023.04.11

· 质量管理研究 ·

4 种定量检验项目线性范围确认方法的比较*

李洪雷, 王丹晨, 马超超, 徐二木, 侯立安, 夏良裕(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要:目的 比较美国临床和实验室标准协会(CLSI)EP06-Ed2、EP06-A 和平均斜率法、线性稀释回收法在确认定量分析项目线性范围中的应用,为临床实验室选择线性范围确认方法提供依据。方法 以尿总蛋白定量分析项目为代表研究对象。收集低浓度和高浓度尿总蛋白的临床检测剩余样品,采用 EP06-Ed2、EP06-A、平均斜率法、线性稀释回收法确定尿总蛋白线性范围并进行比较。结果 EP06-Ed2 最佳拟合曲线为 $Y=1.025X+0.72$,线性允许偏差(ADL)均在 $\pm 10\%$ 以内,线性范围为 9~3 222 mg/L。EP06-A 法的线性范围为 311~3 222 mg/L。平均斜率法回归方程为 $Y=35.4+1.0X$,决定系数(R^2)为 0.999,线性范围为 9~3 222 mg/L。线性稀释回收试验结果线性范围为 9~3 222 mg/L。结论 EP06-Ed2 克服了 EP06-A 对低浓度线性偏差大的缺陷,统计方法相对简化。平均斜率法、线性稀释回收法评价线性范围结果与 EP06-Ed2 一致,简单易行,适用于常规实验室。

关键词:方法学评价;线性稀释回收法;平均斜率法;线性范围

中图分类号:R446

文献标志码:A

线性范围(linear range)指使实验系统的最终分析结果为可接受的线性浓度范围,此时非线性误差应低于允许误差^[1]。临床实验室常采用平均斜率法^[2]、线性稀释回收法^[2-3]、美国临床和实验室标准协会(CLSI)的 EP06-A 指南^[4]确定检测项目的线性。2020 年 11 月 CLSI 对 EP06-A 进行修订,颁布了 EP06-Ed2^[5]替代 EP06-A,该版本推荐采用加权最小二乘法拟合预测值和检测值之间的线性,而不再采用拟合多项式进行线性验证。本研究以尿总蛋白定量分析项目为代表研究对象,将 EP06-Ed2 方法与 EP06-A、平均斜率法、线性稀释验证法进行比较,为临床实验室选择线性范围确认方法提供依据。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 收集临床检测剩余尿液样品用于本研究。收集尿总蛋白浓度超过试剂说明书检测上限高值样品(H)和尿总蛋白浓度接近检测下限的低值样品(L)。

1.2 仪器与试剂 Beckman AU2700 自动生化分析仪。尿总蛋白试剂盒(RANDOX 公司,批号:408949)。检测原理为焦酚红比色法。按照制造商提供的说明书设置参数,完成校准和质控,在实验开始前检测质控物,结果合格后开始实验。

1.3 样品制备

1.3.1 线性初步评价样品 选择 34 mg/L 低浓度样品(L)和 5 510 mg/L 高浓度样品(H),按照体积比为 10L:9L:1H、8L:2H、7L:3H、6L:4H、5L:5H、4L:6H、3L:7H、2L:8H、1L:9H、10H 制备 11 份样品。从低到高各检测 3 次,记录结果。

1.3.2 线性确定实验样品 根据线性初步评价结果去掉明显偏离直线的的数据点后选择临床样品中已测浓度为 9 mg/L 的低浓度样品(L)和 3 222 mg/L 的高浓度样品(H),按 10L:9L:1H、8L:2H、7L:3H、6L:4H、5L:5H、4L:6H、3L:7H、2L:8H、1L:9H、10H 的比例制备 11 份样品。

1.4 线性范围验证方法 分别采用 EP06-Ed2、EP06-A、平均斜率法及线性稀释回收法确定尿总蛋白的线性范围。

1.4.1 EP06-Ed2 法确定线性 采用高、低浓度的样品混合制备线性评估样品,保证混合后的浓度在线性范围内;线性范围内的每个样品检测 3 次取平均值;采用散点图剔除离群值;每个浓度样品检测的平均浓度与预期浓度确定最佳的拟合直线回归方程;每个浓度样品的平均值与最佳拟合直线的拟合值的偏差均在线性允许偏差(allowable deviation from linearity, ADL)范围内,则证明该线性可接受。

1.4.2 EP06-A 法确定线性 以样品号为 X,实测值的均值为 Y,绘制散点图。初步检查数据,剔除

* 基金项目:北京市临床重点专科医学检验科卓越项目(ZK201000)。

作者简介:李洪雷,1989 年生,男,主管技师,大学本科,研究方向为临床生物化学。

通信作者:夏良裕,副主任技师,E-mail:xlypumch@dingtalk.com。

离群值,判断重复性,进行多项式回归分析,并绘制散点图进行评价。测量数据拟合为一次多项式($Y=b_0+b_1X$)、二次多项式($Y=b_0+b_1X+b_2X^2$)、三次多项式($Y=b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$)。采用统计学计算每个非线性系数斜率的标准误 SE_i ,然后采用 t 检验,判断非线性系数与 0 差异是否有统计学意义,即 $P<0.05$ 代表非线性系数与 0 差异有统计学意义。最终求得临床可接受的最佳拟合多项式。

1.4.3 平均斜率法确定线性

1.4.3.1 线性初步评价 参考 CLSI EP06-A^[4] 方案,将 11 份样品按浓度由低到高依次编号,每个样品重复测定 3 次。以样品号为横坐标(X),该样品号对应的检测结果的均值为纵坐标(Y),绘制散点图,根据分布情况目测离群值,初步判定检测上限。

1.4.3.2 平均斜率法确定线性 线性确认样品各重复测量 3 次,记录结果。以预期值为 X ,实测值的均值为 Y 绘制散点图,计算直线回归方程 $Y=a+bX$ 、相关系数(r)及回归决定系数(R^2)。若 $R^2>0.995$,斜率(b)的 95%可信区间包含 1,截距(a)的 95%可信区间包含 0,即可确定呈线性,若上述任何一项不满足条件,则去掉最高点数据重新确定。

1.4.4 线性稀释回收法 根据高、低样品配制的比例关系,计算每个样品的理论值,将试剂检测结果作为实测值,以理论值作为 X ,实测值作为 Y ,进行直线回归分析,若 $R^2\geq 0.975$, b 的 95%可信区间包含 1(b 与 1 差异无统计学意义), a 的 95%可信区间包含 0(a 与 0 差异无统计学意义),则可判断为线性,然后计算稀释回收率,可接受范围为 90%~110%,则可确定实验所选的浓度即为线性范围。若上述任何一项不满足条件,则去掉最高点数据重

新确定。

1.5 统计学分析 用 Excel2016 和 MedCalc15.0 进行统计学分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线性初步评价结果 线性评价散点图见图 1。目测从第 6 个样品(实测浓度为 3 308 mg/L)开始,测量结果偏低,初步判断线性上限在 3 300 mg/L。

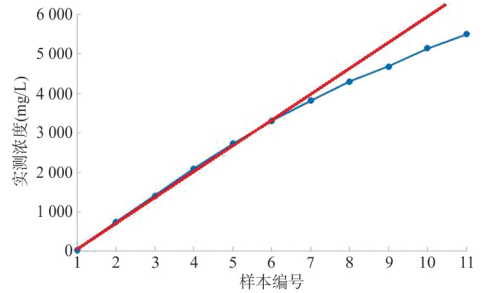


图 1 线性初步评价散点图

2.2 EP06-Ed2 法确定线性^[5] 目测法观察离群值:尿总蛋白重复检测浓度及相对浓度(relative concentrations, RCs)散点图显示所有重复检测结果均包括在线性范围内,故不需要剔除离群值。不精密度验证:每个样品重复检测 3 次,重复性以 CV 表示,为 0.3%~6.2%。采用加权最小二乘法(weighted least squares regression, WLS)计算线性。自变量(X)为期望值,因变量(Y)为检测值,WLS 权重为 R/Var (R 为重复检测次数, Var 为方差),方程为 $Y=1.025X+0.72$, R^2 为 0.999。尿总蛋白线性范围计算结果见表 1。ADL 均在 $\pm 10\%$ 以内。最终确定线性范围为 9~3 222 mg/L。

表 1 尿总蛋白线性范围计算结果

相对浓度	检测平均值 (mg/L)	3 次检测 CV (%)	期望值* (mg/L)	预测值 (mg/L)	偏差 (mg/L)	百分偏差 (%)	ADL ($\pm 10\%$)
1	3 222	0.3	3 222	3 303	-81	-2.5	是
0.9	2 933	1.3	2 901	2 974	-41	-1.4	是
0.801	2 658	0.6	2 579	2 644	14	0.5	是
0.701	2 343	0.3	2 258	2 315	28	1.2	是
0.601	2 016	1.1	1 937	1 986	30	1.5	是
0.501	1 694	0.7	1 616	1 657	37	2.2	是
0.402	1 355	0.6	1 294	1 327	28	2.1	是
0.302	1 015	1.2	973	998	17	1.7	是
0.202	694	0.6	652	669	25	3.7	是
0.103	351	0.9	331	340	11	3.2	是
0.003	9	6.2	9	10	-1	-10.0	是

注:*,期望值为相对浓度 $\times 3 222$ mg/L;偏差=检测值-预测值;百分偏差=[(检测值-预测值)/预测值] $\times 100\%$ 。

2.3 EP06-A 法确定线性 一次多项式、二次多项式、三次多项式结果及拟合曲线见表 2。EP06-A 方法评价二次、三次多项式与直线回归的偏差结果见表 3。二次多项式与一次多项式的百分偏差为

-103.2%~2.4%，三次多项式与一次多项式的百分偏差为-70.3%~0.4%。二次多项式、三次多项式与一次多项式的差值显示均为低浓度偏差较大，最终确定线性范围为 331~3 222 mg/L。

表 2 尿总蛋白 EP06-A 评价多项式拟合结果

多项式	回归系数	系数值	系数标准误	t 值	P 值	回归标准误
一次	b ₀	35.4	18.4	1.9	0.09	—
	b ₁	1.0	0.0	104.6	<0.001	0.010
二次	b ₀	-11.3	10.5	-1.1	0.32	—
	b ₁	1.1	0.0	72.9	<0.001	—
	b ₂	-0.000 03	0.0	-6.5	<0.001	0.000
三次	b ₀	4.2	7.3	0.6	0.58	—
	b ₁	1.0	0.0	50.4	<0.001	—
	b ₂	0.000 03	0.0	2.0	0.08	—
	b ₃	-0.000 000 01	0.0	NA	NA	0.000

注:三次多项式无法拟合相应数值,用 NA 表示。

表 3 EP06-A 方法评价二次、三次多项式与直线回归的偏差(11 个点)

理论浓度 (mg/L)	直线回归	二次多项式	三次多项式	差值(mg/L)	百分偏差(%)	差值(mg/L)	百分偏差(%)
	预期值 (mg/L)	预期值 (mg/L)	预期值 (mg/L)	(二次多项式与 一次多项式)	(二次多项式与 一次多项式)	(三次多项式与 一次多项式)	(三次多项式与 一次多项式)
9	44.4	-1.4	13.2	-45.8	-103.2	-31.2	-70.3
331	366.4	349.5	338.1	-16.9	-4.6	-28.3	-7.7
652	687.4	693.1	666.2	5.7	0.8	-21.2	-3.1
973	1 008.4	1 030.6	996.4	22.2	2.2	-12.0	-1.2
1 294	1 329.4	1 361.9	1 326.8	32.5	2.4	-2.6	-0.2
1 616	1 651.4	1 688.0	1 656.3	36.6	2.2	4.9	0.3
1 937	1 972.4	2 006.8	1 981.1	34.4	1.7	8.7	0.4
2 258	2 293.4	2 319.5	2 300.0	26.1	1.1	6.6	0.3
2 579	2 614.4	2 626.1	2 611.2	11.7	0.4	-3.2	-0.1
2 901	2 936.4	2 927.3	2 913.5	-9.1	-0.3	-22.9	-0.8
3 222	3 257.4	3 221.5	3 203.2	-35.9	-1.1	-54.2	-1.7

2.4 平均斜率法确定线性 线性初步评价结果显示,回归方程为 $Y = 35.4 + 1.0X$, R^2 为 0.999, r 为 0.999 6(95%CI:0.998 4~0.999 9), a 为 35.4(95%CI:-6.2~76.9), b 为 1.0(95%CI:0.99~1.03)。确定线性范围为 9~3 222 mg/L。

2.5 线性稀释回收法 9~3 222 mg/L 之间的 11 份样品的检测结果同平均斜率法。回归方程为 $Y = 35.4 + 1.0X$, R^2 为 0.999, r 为 0.999 6(95%CI:0.998 4~0.999 9), a 为 35.4(95%CI:-6.2~76.9), b 为 1.0(95%CI:0.99~1.03), 确定为线性。每个浓度样品的稀释回收率结果见表 4, 回收率在 100%~106.4%, 稀释偏差在 0%~6.4%, 最终确定线性范围为 9~3 222 mg/L。

表 4 线性稀释回收法确定线性范围的每个浓度样品稀释回收率结果

样品 编号	理论值 (mg/L)	实测值 (mg/L)	稀释回收率 (%)	稀释偏差 (%)
1	9	9	100.0	0.0
2	331	351	106.0	6.0
3	652	694	106.4	6.4
4	973	1 015	104.3	4.3
5	1 294	1 355	104.7	4.7
6	1 616	1 694	104.8	4.8
7	1 937	2 016	104.1	4.1
8	2 258	2 343	103.8	3.8
9	2 579	2 658	103.1	3.1
10	2 901	2 933	101.1	1.1
11	3 222	3 222	100.0	0.0

3 讨论

非配套检测系统,即由实验室选择不同厂商生产的分析仪器和试剂组合而成的自建检测系统,在国内临床实验室应用较多。ISO 15189 要求对自建检测系统性能进行确认,证明其性能满足临床要求

后方可应用于临床检测工作中^[6]。线性范围是反映检测系统性能的一项关键指标,其确认方法有多种,常用的有 EP06-A、平均斜率法、线性稀释回收法^[7]。2020 年 CLSI 以 EP06-Ed2 替代 EP06-A,国内对该方法与评价较少,本研究对上述 4 种方法进行比较研究,可为临床实验室选择线性范围确认方法提供参考。

线性范围确认过程的第一步为目测法初步评价,通过研究可发现该方法比较简单,容易识别非线性数据点,是确定后续研究高浓度水平样品选择的依据。

本研究采用 EP06-Ed2、平均斜率法、线性稀释回收法确定的尿总蛋白的线性范围均为 9~3 222 mg/L,而 EP06-A 法确定的线性范围为 331~3 222 mg/L。EP06-A 法的线性范围下限明显高于另外 3 种方法,存在很大的偏差,这是该方法的重大缺陷。由本研究可见,新发布的 EP06-Ed2 已经对此进行修正,采用最小加权二乘法 and 临床可接受性偏差分析方法避免这个问题。EP06-A 统计过程中要进行数个多项式的回归分析及数据拟合分析,对于临床实验室常规工作人员而言,统计过程太过复杂,不易掌握。采用最小加权二乘法取代了 EP06-A 的多项式回归方法,简化了方法的同时也提供了一种相对简单的分析方法,更便于临床实验室工作人员的掌握与应用。相对于 EP06-A 和 EP06-Ed2,平均斜率

法、线性稀释回收法操作简单,不需要复杂的统计过程,结果满足常规工作需求,适于临床实验室选择采用。

4 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 临床化学设备线性评价指南: WS/T 408—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [2] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007.
- [3] Das B. Validation protocol: first step of a lean-total quality management principle in a new laboratory set-up in a tertiary care hospital in India[J]. Ind J Clin Biochem, 2011, 26(3): 235-243.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: CLSI document EP06-A [S]. Wayne, PA: CLSI, 2003.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures. 2nd ed. A statistical approach; Approved guideline: NCCLS document EP06[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2020.
- [6] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 医学实验室质量和能力的要求 第 1 部分: 通用要求: GB/T 22576.1—2018 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [7] 张秀明, 范勇利, 温冬梅, 等. 临床化学自建检测系统分析性能确认的分析测量范围和临床可报告范围[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(12): 946-952.

(收稿日期:2022-05-30)

(本文编辑:王海燕)