

• 行业研究 •

临床实验室对定量检测产品精密度的评价

郭 绮

(重庆市药品技术审评认证中心, 重庆 401120)

摘要:随着体外诊断(IVD)行业的不断发展以及临床实验室对 IVD 定量检测产品精密度验证活动的不断实践和认识的加深,国家、行业、用户对产品质量要求不断提高。为了使临床实验室对于 IVD 定量检测产品精密度验证达成统一标准,笔者依据美国临床和实验室标准化协会(CLSI) EP15-A3 文件,编制了临床实验室定量测量项目精密度验证程序,旨在为临床实验室 IVD 定量检测产品精密度的验证提供参考。

关键词:临床实验室; 精密度; 评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.15.025

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2019)15-1889-04

文献标识码:A

Evaluating the precision of products for quantitative assay in clinical laboratories

GUO Qi

(Chongqing Pharmaceutical Technology Review and Certification Center, Chongqing 401120, China)

Abstract: With the development of in vitro diagnosis (IVD) industry, increasing practice and cognition of precision verification activities for IVD products of quantitative assay in clinical laboratories, the quality requirements of national authority, IVD industry and clinical laboratories (end-users) are continuous up-grading. In order to reach a unified standard for the precision verification of IVD products for quantitative assay in clinical laboratories, the author developed a precision verification procedure for quantitative measurement items in clinical laboratory based on the document EP15-A3 of CLSI, aiming at providing reference for the precision verification of IVD products for quantitative assay in clinical laboratories.

Key words: clinical laboratories; precision; verification

临床检验中对患者样本一般进行一次测量,体外诊断(IVD)试剂的精密度符合要求才能保证临床结果的准确性,好的精密度是获得良好准确度的先决条件^[1]。精密度主要由测量过程中的随机误差和一些变异因素(如试剂批次、校准周期、校准品批次、仪器、操作者等)所引起,针对不同的引起精密度变化的因素进行考察,可得到不同类型的精密度,如批内精密度、批间精密度等^[2-3]。精密度是 IVD 试剂、仪器的重要分析性能之一,是产品研发、产品标准制订、产品注册等过程的重要技术指标,其评价资料是评价拟上市产品有效性的重要依据,也是产品注册所需的重要申报材料之一^[3-4]。所以精密度在 IVD 定量检测产品研发阶段就应该受到厂家研发人员的重视。

精密度作为检验项目分析性能参数中最重要的性能指标之一同时也是医学实验室 ISO 15189 质量管理体系要求的项目,受到临床实验室的高度重视^[5]。目前,国内临床实验室主要依据 WS/T 492-2016《临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证》标准进行评价^[4],该标准主要依据 CLSI EP 15-A 文件^[4,6]。随着近几年国内 IVD 行业的迅速发展以及

临床实验室对 IVD 定量检测产品精密度验证活动的不断实践和加深认识^[7],国家审评中心、行业、临床实验室对 IVD 定量检测产品的质量要求也在不断提高。笔者依据新版美国临床和实验室标准化协会(CLSI) EP15-A3 文件“用户对精密度验证和偏倚评估”,编制了临床实验室定量测量项目精密度验证程序,旨在为临床实验室 IVD 定量检测产品精密度验证的实施提供参考。

1 精密度验证方法

1.1 方法简介 实验主要是在 5 个工作日内重复检测同一批样本,共 5 次。如需要达到更可靠的稳定性,则建议增加实验时间^[6]。

1.2 准备工作

1.2.1 熟悉期 (1)人员培训:工作人员应学会仪器操作,维护程序,样本准备方法,测量系统校准和校准验证功能,必要时由厂家提供培训。(2)质控程序:在熟悉期就应该建立该方法的质控程序。根据厂家说明书,确认仪器操作在控,可使用厂家推荐的质控方法,但不应该使用厂家建立的不精密度来建立质控范围。关于质控程序的建立,可以参考 CLSI C24 文件。

作者简介:郭绮,女,副主任药师,主要从事器械技术审评方面的研究。

本文引用格式:郭绮. 临床实验室对定量检测产品精密度的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(15): 1889-1892.

(3) 实验记录: 实验应记录的内容包括仪器名称和检测信息(分析物种类、数量、单位)、试剂和校准品批号、选择某测量浓度的理由、样本信息(组成、不确定度等)、精密度声明的来源(通常是厂家的药品说明书里的表格)、实验所用的软件工具以及它们的版本号、检测数据回顾和数据处理的个人责任、实验设计和延期的任何决定。(4) 数据处理方法: 当选定了一种数据处理的方法后, 应注意一些潜在的误差来源: 如每一个计算步骤的公式转变需要额外校对, 合理进行有效数字的取舍, 注意表格的完整性和公式的正确性等。

1.2.2 设备和环境要求 所有用于精密度验证实验的设备均应在使用前核查是否处于受控状态, 在设备运行期间应保持实验室内环境始终处于受控状态, 无空气污染, 通风足够, 如每小时至少换气 6 次(尤其是有机械通风装置的房间内)。

1.2.3 实验室要求 需有足够时间开启和运行仪器以确保操作者理解仪器的全部步骤并能正确操作。

1.3 实验设计

1.3.1 时间、批次及重复次数 基本的 5×5 设计: 要求至少检测 2 个不同浓度样本, 至少检测 5 d(可以不连续), 每天 1 批, 每批重复测量 5 次。实验结束后每个样本总共得到 25 个结果^[6]。为获得更可靠的精密度验证数据, 可以将检测时间增加为 7 d。

1.3.2 样本 (1) 样本选择: 应至少选择 2 个样本, 最好是患者血清或混合血清, 或者商业性的质控材料, 尽量与厂家建立精密度声明时所用材料一致^[8-10]。(2) 浓度选择: 样本应有不同的检测浓度, 最好有一个代表了临床决定值(临界值)或参考限附近, 或简单地落在正常和异常范围。应避免使用极高、极低浓度样本^[11], 因为它超出了厂家说明书的水平范围, 需要外推计算, 或者得到的结果可能会超出某些重复检测范围。(3) 样本保存: 应注意样本储存条件, 保证整个实验期间样本的稳定性, 降低因样本不稳定带来的精密度影响。习惯做法是能整个使用和解冻的样本, 以方便检测。在决定样本体积和数量的时候, 要注意无效腔以及有可能要用到的额外批次的检测。(4) 样本处理: 应严格按照要求进行样本处理, 避免不同操作者带来的差异, 样本处理过程要与厂家建立精密度声明时所做的保持一致; 不同浓度样本可以在不同天或不同批内检测完毕, 检测时需先做质控, 质控在控时结果可以接受, 如失控需查明原因, 拒绝所有检测结果, 缺失的结果需额外补齐。

2 精密度验证实验流程

精密度验证实验给用户提供了精密度性能验证的指引和方法。为了区分厂家的不精密度声明和用户的精密度验证值, 本文分别用 σ_R 、 σ_{WL} 表示厂家声明的重复性和实验室内不精密度, 用 S_R 、 S_{WL} 表示用户验证的重复性和实验室内不精密度。通常, 厂家有

两种精密度声明——重复性(批内不精密度)和实验室内不精密度^[10]。本部分内容提供了从这两种声明中识别总变异的统计学方法。图 1 为样本的(重复性和实验室内)不精密度的验证和分析图。

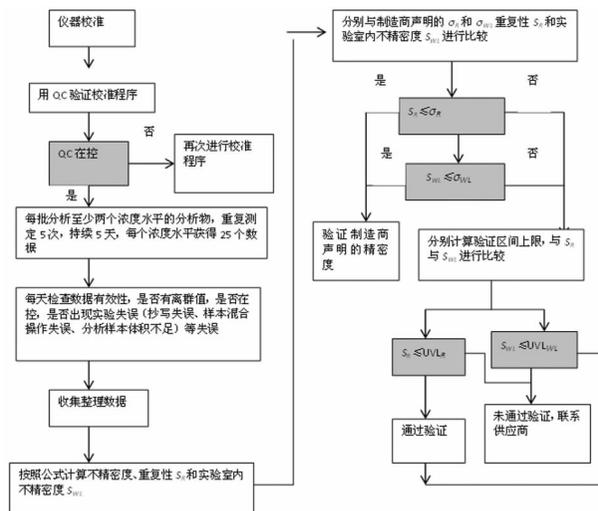


图 1 样本精密度(重复性和实验室内)验证分析图

3 数据分析

3.1 测量数据判断

3.1.1 数据完整性判断 每天都应检查所有结果, 如果由于检测系统或室内质控导致需要拒绝该批结果, 应及时查找原因补充数据。

3.1.2 各样本数据分析 注意: 本文内容假设用户实验时使用最基本的 5×5 设计, 也可多 1~2 个批次, 可使用单因素 ANOVA 软件进行分析。按照 5×5 设计进行试验得到的总胆红素结果, 见表 1。表中总胆红素检测结果无缺失值, 根据 Grubb's 法 25 个结果中无离群值^[6], 具体分析: 计算所有结果的平均值和标准差(SD), Grubbs' 因子 G(取决于 N, 当数据是平衡无缺失时 $N=25$, G 一般为 3.135, n_0 则为 5)^[6]。也可以根据《数据的统计处理和解释 正态样本离群值的判断和处理其他方法》进行离群值判断^[12]。总胆红素所有结果均值为 18.8 和 0.22 $\mu\text{mol/L}$, Grubbs' 范围的上、下限计算: Grubbs' 限值 = 均值 $\pm G \cdot SD = 18.8 \pm 3.135 \times 0.22 = 18.1$ 或 19.5 $\mu\text{mol/L}$ 。表 1 中数据均在该范围内, 所以无离群值。

表 1 总胆红素精密度验证原始数据($\mu\text{mol/L}$)

重复次数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
1 次	18.6	18.5	18.9	19.1	19.0
2 次	18.4	18.5	18.8	19.0	18.9
3 次	18.7	18.7	18.9	18.9	18.8
4 次	18.8	18.6	18.7	19.1	18.5
5 次	18.5	18.8	18.7	19.2	18.6

3.2 不精密度实验数据的单因素方差分析 精密度验证的实验数据使用单因素方差分析方法, 可借助相

关统计软件来进行,以表 1 中总胆红素分析结果为 例,其统计结果输出如表 2 所示。

表 2 总胆红素单因素方差分析的输出结果

变异来源	SS	DF	MS
批间	$SS_1 = 0.6824$	$DF_1 = k - 1 = 4$	$MS_1 = 0.1706$
批内	$SS_2 = 0.4320$	$DF_2 = DF_{total} - DF_1 = (N - 1) - (k - 1) = N - k = 20$	$MS_2 = 0.0216$
总变异	$SS_{total} = 1.1144$	$DF_{total} = 24$	—

注:—表示该项无数据

有些方差分析软件提供批间和批内方差分量,即 V_B 和 V_W 的计算。如没有提供,可以根据以下公式进行计算: $V_W = MS_2$; $V_B = MS_1 - MS_2/n_0$ 。如果 $MS_1 \leq MS_2$ (相对罕见)则 $V_B = 0$ 。当数据是平衡的无缺失时, n_0 为 5,如数据有缺失,则应咨询相应统计专家。变异分量 V_W 直接与重复性变异相关, V_B “单纯地”与批间变异相关。批间变异可纠正为批内变异,但两种变异分量 (V_B 和 V_W) 的总和与实验室内不精密度相关。取平方根得到用 SDs 表示的预期精密度: $S_R = \sqrt{V_W}$, $S_B = \sqrt{V_B}$, $S_{WL} = \sqrt{V_W + V_B}$ 。相对而言, $CV_R = S_R \times 100/\bar{X}$ 和 $CV_{WL} = S_{WL} \times 100/\bar{X}$, \bar{X} 是样本所有结果的均值。仍以表 1 总胆红素样本数据做例子,单因素方差分析后得到表 2。

根据表格内数据, $V_W = MS_2 = 0.0216$, 由于 $MS_1 (0.1706) \geq MS_2 (0.0216)$, 计算 $V_B: V_B = (MS_1 - MS_2)/n_0 = (0.1706 - 0.0216)/5.0 = 0.0298$, 根据这些变异分量数值,可以计算用 SD 为表示单位的不精密度: $S_R = \sqrt{V_W} = \sqrt{0.0216} = 0.15 \mu\text{mol/L}$, $S_B = \sqrt{V_B} = \sqrt{0.0298} = 0.17 \mu\text{mol/L}$, $S_{WL} = \sqrt{V_W + V_B} = \sqrt{0.0216 + 0.0298} = 0.23 \mu\text{mol/L}$ 。总胆红素均值为 $18.8 \mu\text{mol/L}$,

重复性 $CV_R = 0.80\%$, 实验室批间变异 $CV_B = 0.90\%$, 实验室内不精密度 $CV_{WL} = 1.22\%$ 。

4 用户获得的不精密度与厂家的声明进行比较

验证实验完成每个样本的重复性和实验室内不精密度的计算后,用户应检查获得的不精密度与厂家声明的是否一致,可将结果直接与厂家声明进行比较,如一致则验证通过^[14-15];如不一致则需进行相关的上限值(UVL)计算,必要时可联系厂家。仍以表 1 中总胆红素数据为例,经统计分析总胆红素的 $CV_R = 0.80\%$, $CV_B = 0.90\%$, $CV_{WL} = 1.22\%$, 分别与厂家声明的精密度(见表 3)进行比较。表 1 中总胆红素浓度为 $18.8 \mu\text{mol/L}$, 与厂家声明的第一个浓度相近,重复性为 0.80 , 小于厂家声明的 2.7% ; 实验室内不精密度为 1.22% , 小于厂家声明的 4.66% , 验证通过。

为了降低由于单独机会性导致的确证厂家精密度声明的失败,可以计算厂家声明的 UVL。UVL 表示当厂家声明正确时,从相同样本量和相同实验设计方案的用户精密度实验中获得不精密度估计的 95%

上限,是不精密度确证实验是否接受的判断标准。用户宁可使用 UVL 也不单独使用厂家声明,这样可以避免由于机会性引起的不恰当的验证失败,使验证试验成功率至少提高 5% 。

对于某给定标本,只有在用户的重复性估计值小于或等于厂家的声明(若失败,必须小于或等于厂家声明的相关 UVL)的时候,才能说用户观察到某浓度样本的重复性与厂家声明一致。由于 UVL 经常大于相关的声明,用户的估计值通常至少大于厂家的声明 30% , 仍然算通过。

如果用户的估计值超出了厂家声明,用户应将得到的估计值与声明的 UVL 比较,以总胆红素精密度验证为例。总胆红素厂家精密度声明 1、2、3 的均值分别为 20.6 、 80.3 、 $160.8 \mu\text{mol/L}$ 。通过下列三步计算 UVLs^[6]。(1)计算自由度 df,用于尚在疑问中的不精密度估计(df_R 是重复性的不精密度, df_{WL} 是实验室内不精密度)。(2)从 EP15-A3 文件中查得 UVL 的 F 因子。(3)利用 UVL 的 F 因子计算 UVL 和厂家的声明。将用户的不精密度与 UVL 进行比较。对于重复性比较,计算重复性的自由度 df_R 。 $df_R = N - k$, N 是结果的总数目, k 是检测批次的数目。对于实验室内不精密度比较,首先计算声明的比率 $\rho: \rho = \sigma_{WL}/\sigma_R = \%CV_{WL}/\%CV_R$, ρ 是用厂家的实验室内不精密度声明除以厂家的重复性声明,可以用 SD 表示,也可以用 CV 表示。然后从 EP15-A3 中得到大概的自由度, df_{WL} 。见表 3。

表 3 总胆红素厂家不同精密度声明的 UVLs 计算

项目	声明 1	声明 2	声明 3
重复性不精密度			
$\sigma_R (\%CV)$	0.55(2.7%)	1.8(2.2%)	2.4(1.5%)
k	5	5	5
n	5	5	5
df_R	20	20	20
F	1.34	1.34	1.34
UVL _R (%CV)	0.74(3.59%)	2.41(3.0%)	3.22(2.0%)
实验室内不精密度			
$\sigma_{WL} (\%CV)$	0.96(4.66%)	3.5(4.3%)	5.4(3.4%)
ρ	1.75	1.94	2.25
df_R	7	6	6
F	1.62	1.67	1.67
UVL _{WL} (%CV)	1.20(5.83%)	5.84(7.27%)	5.84(3.63%)

5 结果解释

精密度验证所有数据分析和一致性检验完成后,用户拥有:(1)实验中每个测试样本的“重复性”和“实验室内不精密度的估计值”。(2)一致性检验结果(通过或失败)。

用户还应检查一致性检验结果是否覆盖精密度确认实验的所有样本浓度范围。如果所有结果都在确认范围内,则用户的精密度与厂家的声明一致(注:由于样本数量有限,统计结果有可能接受了错误的通过和错误的失败)。精密度验证实验完成后,可能会有以下 3 种情况。情况 1A:所有估计值都通过,接近或低于厂家声明或 UVLs,证明用户实验室的不精密度与厂家声明具有可比性。情况 1B:所有估计值通过,但有些勉强通过,该情况表明用户实验室所有结果,或者部分检测范围内结果的不精密度可能超出厂家声明。总体来讲该实验在统计学上还是与厂家声明一致。情况 2:大多数估计值通过,但有些没通过。实验负责人应回顾实验,判断该检验程序的不精密度是否与厂家的声明完全不符,该检验程序是否仍可接受使用。如可接受使用,人应详细阐述接受的理由,并监控日常质控的不精密度。情况 3:好几个估计值均未通过,实验总体与厂家声明不一致。用户可以有 3 个选择:(1)完全拒绝该检验程序;(2)寻找故障,比如说在厂家帮助下,重复整个精密度验证实验;(3)为确定该检验程序精密度性能特征,做天数和次数更多的实验验证。

6 注意事项

成功完成精密度验证实验后,用户可以将该检验程序投入使用。使用过程中,室内质控作为实验室不精密度的主要反映,通过长时间监控日常质控样本收集到的统计资料更能代表实验室内不精密度^[8]。但如果出现试剂或定标物批号的改变,仪器维修、试剂稳定性改变、实验环境因素变化、新操作者或分析前因素的影响等情况时,日常质控结果得到的不精密度值可能会超出厂家声明,用户应充分考虑并排除或降低这些变异因素。

如果用户“实验室内精密度”声明通过,但“重复性”声明没有通过,则反映了实验中“批”的差异。如厂家是通过双份检测得到,而用户的实验设计可能包含了更长的时间范围。

本文假设厂家的精密度声明准确地代表了检测方法目前的性能,也假设了厂家的声明是没有特别明显的不确定度。表格列出了跟不确定度相关的不精密度统计资料,但厂家声明的精密度实验可能不那么严谨,包括检测天数也达不到经典的 CLSI 文件 EP05 的实验设计^[13];对于某给定浓度和精密度类型,当用户的精密度既没有落入可允许变异范围也超出了厂家声明计算出来的 UVL 的时候,用厂家声明会比用

临床可允许变异范围要好得多。这种情况下,即使精密度验证实验没有通过厂家声明,用户也可选择接受检测方法的精密度性能。

参考文献

- [1] 王薇,王治国,李少男. 临床实验室对厂家声明的精密度和真实度的性能验证要求[J]. 检验医学杂志,2010,25(12):1001-1005.
- [2] 温冬梅,张秀明,吴剑杨,等. 应用 CLSI EP5-A2 文件评价生化检测系统的精密度性能[J]. 检验医学与临床,2010,7(19):2096-2098.
- [3] 崔涛,陈洪忠,张云娟. 临床化学体外诊断试剂分析性能评估要点探讨[J]. 生物技术通讯,2017,28(3):356-359.
- [4] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证: WS/T 492-2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [5] 段敏,赵海建,王薇,等. 临床检验程序不精密度、正确度及诊断准确度验证的实用性方法[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(6):165-169.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias: EP15-A3 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
- [7] 张传宝,赵海建,张天娇,等. 评价一种以 CLSI EP15-A2 文件验证生化分析系统精密度和正确度方法的应用价值[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志,2013,1(1):41-45.
- [8] 王宏斌,卓志娟,张丽等. 一种室内质控精密度评价标准的建立及其应用[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(20):2585-2589.
- [9] 徐春芝,吴继明,刘贵建,等. 临床实验室检测系统精密度验证方法比较及应用体会[J]. 国际检验医学杂志,2013,17:2304-2305.
- [10] 徐建华,刘冬冬,徐宁,等. CLSI EP15-A3 在临床生化精密度验证中的应用[J]. 临床检验杂志,2016,34(3):215-218.
- [11] 徐建辉,王惠民,苏建友,等. 两种商品定量试剂盒分析性能的验证实验[J]. 临床检验杂志,2010,28(6):467-468.
- [12] 国家标准化委员会. 数据的统计处理和解释:正态样本离群值的判断和处理:GB 4883-2008 [S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: EP05-A3 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
- [14] 杨志钊,缪丽韶,杨山虹,等. 利用 CLSI EP15-A 指南验证精密度和准确度[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):231-232.
- [15] 沈荣春,杨春兰,崔明,等. 不同精密度评价方法的比较及在临床血糖测定中的应用[J]. 检验医学与临床,2014,5(18):2497-2498.