

DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2018.10.15

CLSI EP15-A3 在临床生化正确度验证中的应用*

徐建华¹, 刘冬冬¹, 徐宁¹, 马监林², 詹科海³, 陆丰源⁴, 林莉¹, 王建兵¹, 庄俊华¹, 黄宪章¹(1.广东省中医院检验医学部, 广州 510105; 2.广东医科大学检验学院, 广东东莞 523808; 3.蚌埠医学院检验系, 安徽蚌埠 233000; 4.厦门大学公共卫生学院实验医学系, 福建厦门 361102)

摘要:目的 探讨美国临床和实验室标准化协会(CLSI) EP15-A3 文件在正确度验证中的应用价值。方法 按照 EP15-A3 文件 5×5 实验设计方案, 用 IFCC 提供的 RelA (水平 1) 和 RelB (水平 2) 样品、美国国家标准与技术研究院(NIST) 909C 参考物质分别验证肌酐(Cr)、尿素(Urea)、尿酸(UA)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、葡萄糖(Glu)的正确度。每个样品每天 1 批, 每批重复 5 次, 共 5 d, 每个样品获得 25 个数据。用 Grubbs'法计算离群值, 单因素方差分析(ANOVA) 计算用户的批内不精密度(S_R)和实验室内不精密度(S_{WL})。基于 S_R 和 S_{WL} 计算结果的均值及其标准差, 计算靶值(TV)及其标准误差, 最后计算出 TV 的确认区间(VI)。观察各指标检测均值是否在 VI 内, 如通过则用户证明了候选方法的偏差可接受; 若不通过则计算均值和 TV 的相对偏差, 观察该相对偏差是否小于用户定义的可接受范围($<1/2 TEa$)。若是则证明候选方法的偏差可接受。否则, 需查找原因或与厂家联系。结果 6 个生化项目的测定结果均通过 Grubbs'法离群值检查, 各项目无离群值。该次验证实验中, 除 NIST 909C 参考物质样品 Urea、TC、RelA 样品 Cr 水平 2 均值不在 VI 内, 但相对偏差均小于 $1/2 TEa$ 外, 其他均值都在 VI 内。结论 用 EP15-A3 文件进行验证的 6 个生化项目的正确度均符合临床要求。

关键词: 正确度; 精密度; 性能验证; EP15-A3

中图分类号: R446

文献标志码: A

Application of CLSI EP15-A3 in estimation for trueness of clinical biochemistry

XU Jianhua¹, LIU Dongdong¹, XU Ning¹, MA Jianlin², ZHAN Kehai³, LU Fengyuan⁴, LIN Li¹, WANG Jianbing¹, ZHUANG Junhua¹, HUANG Xianzhang¹(1. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510105, Guangdong; 2. School of Laboratory Science, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, Guangdong; 3. Department of Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui; 4. Department of Laboratory Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China)

Abstract: Objective To evaluate the application of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline EP15-A3 document for estimation of trueness of testing results in clinical biochemistry. **Methods** According to the EP15-A3 basic 5×5 precision design of experimental procedure, the bias of results of 6 common biochemistry items including creatinine (Cr), urea, uric acid (UA), total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and glucose (Glu) were verified by using IFCC RelA (level 1) and RelB (level 2) samples and NIST 909c reference material. The basic 5×5 design for five days and one run for each sample per day were performed, and five replicates per run should yield a total of 25 results for each sample. The outliers were calculated by Grubbs' test. The user's repeatability variance (S_R) and the within-laboratory variance (S_{WL}) were calculated by one way ANOVA analysis. Both the overall mean and its standard error, and the target value (TV) and its standard error were calculated according to S_R and S_{WL} , and the verification interval (VI) for the TV was calculated at last. The mean values of each indicator were observed whether they were in VI. If the mean value was within the VI, it means that the bias of the candidate method should be acceptable, otherwise the bias between the observed mean and the TV had to be recalculated to observe if the bias was less than the user-defined allowable bias ($<1/2 TEa$). If so, it was proved that the bias of the candidate method should be acceptable. Otherwise, the reasons of bias should be found or contacting the manufacturer should be needed. **Results** The results of the 6 biochemistry items were all passed through Grubbs' outliers test, and no outliers were found in each item. In this estimation for bias by two reference materials, each mean of levels was within the VI expecting the reference material of urea and TC from NIST 909c and the sample of Cr from RelA (level 2), but the biases were all less than $1/2 TEa$. **Conclusion** The trueness of the 6 Roche biochemistry items verified with EP15-A3 document were all acceptable for meeting the clinical requirements.

Key words: trueness; precision; performance verification; EP15-A3

* 基金项目: 国家自然科学基金(81572088); “十二五”国家科技支撑计划(2013BAI02B04, 2012BAI37B01); 广东省中医院拔尖人才项目(2014-47); 广东省中医院综合标准化示范项目(YN2015BZ10)。

作者简介: 徐建华, 1976 年生, 男, 主任技师, 硕士研究生导师, 博士, 主要从事临床生化与质量管理工作。

通信作者: 黄宪章, 教授, 博士研究生导师, E-mail: huangxz020@163.com。

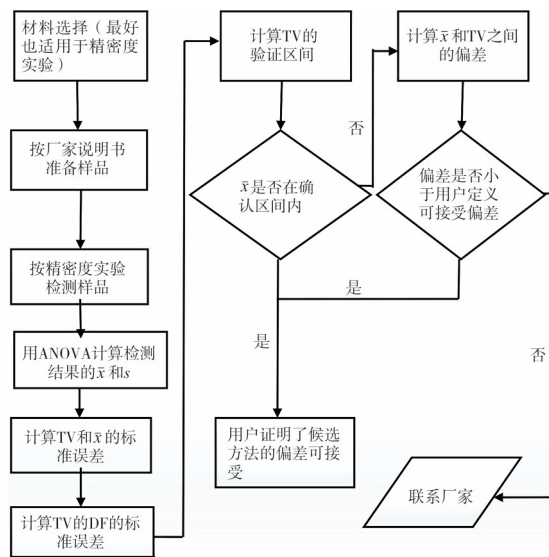
参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI) 发布的 EP15-A3 文件^[1] ,用 2 种不同来源且已赋值的参考物质验证 6 个临床常用生化项目肌酐(Cr)、尿素(Urea)、尿酸(UA)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、葡萄糖(Glu) 的正确度 ,并评价 2 种不同参考物质在正确度验证实验中的应用价值 ,供同行参考。

1 材料与方 法

1.1 样品来源 (1) IFCC 提供的 2015 年国际参考实验室室间比对计划样品: Rela A(水平 1) 和 Rela B(水平 2); (2) 美国国家标准与技术研究院(NIST) 909C 参考物质。上述样品测定前均分装冻存。

1.2 仪器与试剂 7180 全自动生化分析仪购自日本 Hitachi 公司; Cr(酶法 ,批号 612087)、Urea(尿素酶法 ,批号 609036)、UA(尿酸酶法 ,批号 610599)、TC(CHOD-PAP 法 ,批号 607260)、TG(GPO-PAP 法 ,批号 607060)、Glu(葡萄糖氧化酶法 ,批号 611715) 试剂及其配套 Cfas 校准品(批号 176123) 均购自 Roche 公司; 2 个水平质控品(水平 1 ,批号 45682; 水平 2 ,批号 45683) 购自 Bio-Rad 公司。

1.3 检测流程 检测样品前校准检测系统 ,质控结果在控。按照 EP15-A3 文件要求 2 个样品 ,每天 1 批 ,每批重复 5 次 ,共 5 d ,每个样品得到 25 个数据; 具体流程见图 1。



注: ANOVA 单因素方差分析; DF 自由度; TV 靶值。

图 1 EP15-A3 正确度验证检测流程(利用已知浓度的参考物质)

1.4 统计学分析 用 SPSS 17.0 统计软件进行。

1.4.1 离群值检验 用 Grubbs' 方法判断离群值。首先计算 Grubbs' 上下限值 ,公式为 Grubbs' 限值 = $\bar{x} \pm G \times s$ (G 为 Grubbs' 因子 ,当 $n = 25$ 时 ,G 值为 3.135) ,测定结果中的最小值和最大值不能超出 Grubbs' 限值范围。如超出 ,则判断为离群值 ,每个样品最多允许 1 个离群点 ,所有样品不能超过 2 个离群点^[2]。

1.4.2 数据分析 (1) 用单因素方差分析方法计算批间均方(MS_1) 和批内均方(MS_2); (2) 计算批内变异(V_W) ,设定 $V_W = MS_2$; 计算批间变异(V_B) , $V_B = (MS_1 - MS_2) / n_0$; 计算批内重复性(S_R , $S_R = \sqrt{V_W}$) 和实验室内不精密度(S_{WL} , $S_{WL} = \sqrt{V_W + V_B}$); (3) 计算标准误差(se_x) , $se_x = \sqrt{\frac{1}{n_{Run}} - \left[S_{WL}^2 - \left(\frac{n_{Rep} - 1}{n_{Rep}} \right) S_4^2 \right]}$,其中 n_{Run} 为测试批次 , n_{Rep} 为每批重复次数 ,参考物质标准误差(se_{RM}) , $se_{RM} = U/k$,其中 k 为“包含因子” ,如果给定范围 95% 或 99% ,则 $se_{RM} = U/1.96$ 或 $U/2.58$; (4) 用 se_x 和 se_{RM} 计算混合的标准误差(se_c) , $se_c = \sqrt{se_x^2 + se_{RM}^2}$; (5) 计算合成自由度(df_c) , $df_c = df_x \cdot (se_c / se_x)^4$,对于 Rela 样品可通过查阅文件附表得到 df_c ; (6) 计算 TV 的确认区间(VI) , $VI = TV \pm (m \times se_c)$,其中 $m = t_{(0.975, df_c)}$; 不同样品进行正确度验证时 ,其计算公式详见 EP15-A3 文件。

2 结果

2.1 离群值检验结果 EP15-A3 用 Grubbs' 法判断离群值 ,首先计算 6 个项目的 Grubbs' 上下限 ,然后与各项目的最小值和最大值比较 ,最小值与最大值在 Grubbs' 上下限值之间 ,则无离群值 ,否则需排除后再进一步统计分析。本研究无离群值 ,见表 1 和表 2。

2.2 2 种参考物质的 VI 首先分别计算每种参考物质每个水平的 \bar{x} 及其 se_x ,再计算参考物质靶值的 se_{RM} ,其中 NIST 909c 标准物质的 se_{RM} 由厂家给出 ,然后用 se_x 和 se_{RM} 计算 se_c ,NIST 909c 标准物质通过 se_c 计算 df_c ,进而计算 VI ,Rela 样品则通过 se_c 查表得 df_c 进而计算 VI。各样品确认区间具体结果见表 3 和表 4。

表 1 NIST 909C 标准物质 6 个生化项目正确度验证离群值计算结果(n = 25)

项目	\bar{x}	s	CV (%)	最小值	最大值	Grubbs'下限	Grubbs'上限	是否有离群点
Cr($\mu\text{mol/L}$)	74.00	0.82	1.10	73.00	76.00	71.00	77.00	否
Urea(mmol/L)	4.48	0.08	1.79	4.38	4.59	4.23	4.73	否
UA($\mu\text{mol/L}$)	278.00	1.44	0.52	276.00	282.00	274.00	283.00	否
TC(mmol/L)	3.55	0.032	0.91	3.45	3.60	3.45	3.65	否
TG(mmol/L)	1.18	0.007 5	0.64	1.17	1.19	1.15	1.20	否
Glu(mmol/L)	5.10	0.025	0.49	5.05	5.14	5.02	5.18	否

注: n 测试数; \bar{x} 平均值; s 标准差; CV 变异系数。

表 2 Rela 样品 6 个生化项目正确度验证离群值计算结果(n = 25)

项目	浓度水平	\bar{x}	s	CV (%)	最小值	最大值	Grubbs'下限	Grubbs'上限	是否有离群点
Cr($\mu\text{mol/L}$)	水平 1	162.00	1.69	1.04	159.00	166.00	156.00	167.00	否
	水平 2	293.00	1.55	0.53	291.00	296.00	288.00	298.00	否
Urea(mmol/L)	水平 1	5.00	0.05	0.98	4.92	5.08	4.84	5.16	否
	水平 2	19.34	0.15	0.78	19.06	19.72	18.87	19.81	否
UA($\mu\text{mol/L}$)	水平 1	293.00	0.98	0.33	291.00	295.00	290.00	296.00	否
	水平 2	592.00	1.80	0.31	588.00	596.00	586.00	597.00	否
TC(mmol/L)	水平 1	4.85	0.033	0.68	4.75	4.90	4.75	4.95	否
	水平 2	3.67	0.03	0.83	3.61	3.72	3.58	3.76	否
TG(mmol/L)	水平 1	1.83	0.008	0.45	1.81	1.84	1.80	1.86	否
	水平 2	1.45	0.013	0.87	1.42	1.49	1.41	1.49	否
Glu(mmol/L)	水平 1	6.16	0.027	0.44	6.12	6.23	6.08	6.24	否
	水平 2	11.62	0.09	0.76	11.36	11.79	11.32	11.90	否

注: n 测试数; \bar{x} 平均值; s 标准差; CV 变异系数。

表 3 NIST 909C 标准物质 6 个生化项目确认区间结果

项目	\bar{x}	TV	S_R	S_{WL}	$se_{\bar{x}}$	se_{RM}	se_c	$df_{\bar{x}}$	df_c	m	VI	$\frac{\bar{x}-TV}{TV}$	1/2 TEa
Cr(mol/L)	74.00	73.00	1.22	1.55	0.49	0.81	1.06	4	87	1.99	71.00~75.00	1.37%	±6%
Urea(mmol/L)	4.48	4.32	0.18	0.20	0.05	0.044	0.067	4	13	2.16	4.18~4.46	3.70%	±4%
UA($\mu\text{mol/L}$)	278.00	278.00	1.39	3.76	1.59	3.00	3.39	4	83	1.99	271.00~284.00	0.00%	±6%
TC(mmol/L)	3.55	3.70	0.023	0.089	0.039	0.041	0.056	4	18	2.10	3.58~3.82	-4.05%	±4.5%
TG(mmol/L)	1.18	1.21	0.001	0.003	0.000 6	0.008	0.008	4	>1 000	1.96	1.18~1.23	-2.48%	±7%
Glu(mmol/L)	5.10	5.05	0.058	0.14	0.057	0.044	0.072	4	10	2.23	4.89~5.21	0.55%	±3.5%

注: \bar{x} 均值; TV 靶值; S_R 用户估算的批内不精密度; S_{WL} 用户估算的实验室内不精密度; $se_{\bar{x}}$ 平均值的标准误差; se_{RM} 参考物质标准误差; se_c 合成标准误差; $df_{\bar{x}}$ 检测批自由度; df_c 合成自由度; m t 分布的分位数; VI 确认区间。

表 4 Rela 样品 6 个生化项目确认区间结果

项目	浓度水平	\bar{x}	TV	S_R	S_{WL}	$se_{\bar{x}}$	se_{RM}	se_c	df_c	tau	m	VI	$\frac{\bar{x}-TV}{TV}$	1/2 TEa
Cr(mol/L)	Rela 1	162.00	164.00	1.61	1.71	0.41	0.32	0.52	10	0.78	2.23	162~165	-1.22%	±6%
	Rela 2	290.00	293.00	1.52	1.55	0.33	0.30	0.44	13	0.92	2.16	292~294	-1.02%	
Urea(mmol/L)	Rela 1	5.00	5.07	0.045	0.055	0.017	0.009	0.019	7	0.54	2.36	5.00~5.12	-1.38%	±4%
	Rela 2	19.27	19.34	0.095	0.16	0.06	0.019	0.063	5	0.32	2.57	19.11~19.43	-0.36%	
UA($\mu\text{mol/L}$)	Rela 1	293.00	293.00	1.00	1.00	0.20	0.20	0.28	15	1.00	12.71	289.00~296.00	0.00%	±6%
	Rela 2	590.00	592.00	1.88	1.88	0.37	0.38	0.53	15	1.01	2.13	589.00~592.00	-0.34%	
TC(mmol/L)	Rela 1	4.85	4.91	0.032	0.035	0.009	0.006	0.011	9	0.71	2.26	4.85~4.93	-1.22%	±4.5%
	Rela 2	3.73	3.67	0.030	0.030	0.006	0.006	0.009	15	1.00	12.71	3.62~3.84	1.63%	
TG(mmol/L)	Rela 1	1.83	1.85	0.022	0.022	0.005	0.004 4	0.006 4	12	0.88	2.18	1.83~1.87	-1.08%	±7%
	Rela 2	1.43	1.45	0.012	0.013	0.0032	0.002 4	0.004	10	0.75	2.23	1.41~1.45	-1.38%	
Glu(mmol/L)	Rela 1	6.16	6.15	0.027	0.028	0.006	0.005 4	0.008 1	12	0.90	2.18	6.13~6.17	0.16%	±3.5%
	Rela 2	11.76	11.62	0.089	0.089	0.018	0.018	0.18	20	1.02	2.09	11.38~12.14	1.20%	

注: \bar{x} 均值; TV 靶值; S_R 用户估算的批内不精密度; S_{WL} 用户估算的实验室内不精密度; $se_{\bar{x}}$ 平均值标准误差; se_{RM} 参考物质标准误差; se_c 合成标准误差; df_c 合成自由度; tau 平均值标准误差与参考物质标准误差比值; m t 分布的分位数; VI 确认区间。

2.3 2 种参考物质结果 \bar{x} 与 VI 的比较 分别比较参考物质样品每个水平的 \bar{x} 与其靶值 VI 情况,若均值在 VI 内,则证明该方法检测结果与参考物质靶值没有显著性偏差;若不在 VI 内,则计算均值和 TV 的相对偏差,观察相对偏差是否小于用户定义的可接受范围,一般以小于 1/2 TEa 为标准(TEa 可为国家临检中心可接受水平)。若是则证明候选方法的相对偏差可接受。否则,需查找原因或与厂家联系。表 3 和表 4 结果显示,除 NIST 909C 标准物质样品 Urea、TC、Rela 样品 Cr 水平 2 的均值不在 VI 内,但其相对偏差均小于 1/2 TEa,其他水平的均值都在 VI 内。结果证明,实验室现用的 6 个罗氏生化项目的正确度验证通过,可满足临床需要。

3 讨论

正确度又称真实度,定义为多次无限测量的均值与真值的接近程度,反映仪器或方法的系统(校准)偏差大小,用偏移表示^[3-5]。

本实验根据 2014 年 9 月 CLSI 发布的 EP15-A3 文件,运用 2 种不同的实验方法对罗氏 6 个常用生化项目进行验证,分别通过测定 NIST 909C 和 Rela 样品进行正确度评价,结果显示,正确度验证通过,符合质量目标要求。国内暂未见 EP15-A3 新版文件在正确度验证中的应用。EP15-A3 文件关于正确度的验证与原 EP15-A2 文件相比主要有如下几个方面的改进及完善之处^[2,6]:(1) 标本数量和检测次数:EP15-A3 基本方案为 5×5 设计,每天 1 批,每批重复 5 次,共 5 d,共 25 个数据,EP15-A2 基本方案为 5×3 设计,每天 1 批,每批重复 3 次,共 5 d,共 15 个数据;故 EP15-A3 统计效能比 EP15-A2 高。(2) 参考物质:EP15-A3 根据所选参考物质不同,提供计算方法不同,而 EP15-A2 只提供单一计算方法;故 EP15-A3 正确度验证中参考物质的选择范围更广。(3) 离群值检验:EP15-A3 不仅要求检测时室内质控在控,同时规定采用 Grubbs' 法检验离群值点;EP15-A2 未提供具体离群值检验方法,仅要求检测

时室内质控在控;故 EP15-A3 方法判断更客观,操作性更强。(4) 统计方法:EP15-A3 明确采用单因素方差分析进行计算,各步骤以表格和流程图等形式呈现,而 EP15-A2 仅给出各步骤的公式,需进行繁琐的手工计算;故 EP15-A3 方法计算更方便,更易操作。EP15-A3 在统计学处理上最显著的特点是计算合成自由度(df_c),实际上就是统计学教材上所介绍的有效自由度,主要是消除可能由于方差不齐对结果判断的影响。计算有效自由度的基本公式为

$$Satterthwaite \text{ 方程,即 } df_c = (se_x^2 + se_{RM}^2)^2 / \left(\frac{se_x^4}{df_x} + \frac{se_{RM}^4}{df_{RM}} \right)。$$

根据文件中 tau 值查表并不方便($tau = se_{RM} / se_x$),且表中部分数据误差较大;建议读者直接用 Satterthwaite 方程计算合成自由度(有效自由度)。

综上所述,相比 EP15-A2 文件,EP15-A3 的正确度验证方案更加科学合理、可操作性更强,所提供的统计学方法更简便、统计效能更高,所得结论更严密。另 EP15-A3 可同步进行精密度和正确度验证,实用性强,适用于临床实验室开展定量检测项目的性能验证。

4 参考文献

[1] CLSI. User verification of precision and estimation of bias; Approved guideline-Third edition: CLSI EP15-A3 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2014.
 [2] 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.
 [3] 庄俊华,徐宁,陈茶,等. 医学实验室质量体系文件范例 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 806-840.
 [4] 庄俊华,黄宪章,翟培军. 医学实验室质量体系文件编写指南 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 308-330.
 [5] 徐建华,庄俊华,郑松柏,等. 常规方法检测血清总胆红素的正确度评价[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(12): 946-949.
 [6] CLSI. User Verification of performance for precision and trueness; Approved guideline-Second edition: CLSI EP15-A2 [S]. Wayne, PA: CLSI, 2005.

(收稿日期: 2018-04-29)

(本文编辑: 王海燕)