

# 应用 EP6-A2 方法验证迈瑞 血糖试剂盒的线性范围

李伟 吴文礼 李丹 母继进 曹磊

作者单位: 835000 新疆维吾尔自治区伊宁, 新疆生产建设兵团第四师医院检验科(李伟、吴文礼)

841802 新疆维吾尔自治区若羌, 新疆生产建设兵团三十六团医院检验科(李伟、李丹、母继进、曹磊)

通讯作者: 李伟, Email: 532897182@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.04.002

**【摘要】** 目的 通过验证本实验室迈瑞血糖试剂盒的线性范围, 初步评价该血糖试剂盒的性能。方法 依据美国临床实验室标准化协会(CLSI) 2003 年 4 月发布的 EP06-A2 文件, 用高值和低值血糖浓度的样本按比例精确配成等间距的 6 个实验样本, 每个浓度水平测量 2 次, 所得实验数据做一次、二次和三次多项式回归分析, 二次多项式的非线性系数  $b_2$ 、三次多项式的非线性系数  $b_2$ 、 $b_3$  进行  $t$  检验, 判断非线性系数是否有统计学意义, 即与 0 之间有无差异。计算标准回归误差( $Sy.x$ ), 确定最适多项式模型。结果 未发现离群的实验结果。实验样本重复测定的恒定误差( $SDr$ ) 为 0.40%,  $SDr$  小于本室的批内不精密度要求 1/4 CLIA'88 允许总误差(2.5%)。确定最适多项式模型为二次回归多项式。6 个浓度水平的线性偏差( $DL_i$ ) 最大值为 1.73%, 小于美国临床病理学家协会(CAP) 要求的非线性差异指标(2.5%)。结论 该迈瑞葡萄糖试剂盒在 0.5 ~ 25.0 mmol/L 范围内呈线性, 本验证实验结果与该试剂盒标示的线性范围一致。

**【关键词】** 全自动生化分析仪; 性能验证; 血糖试剂盒

## Validation of the linear range of Mindray blood glucose kit by EP6-A2 method

Li Wei, Wu Wenli, Li Dan, Mu Jijin, Cao Lei. Department of Clinical Laboratory, the Forth Division Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Yining 835000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China (Li W, Wu WL); Department of Clinical Laboratory, the Thrity-six Regiment Hospital of Xinjiang Production and Construction Corps, Ruoqiang 841802, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China (Li W, Li D, Mu JJ, Cao L)

Corresponding author: Li Wei, Email: 532897182@qq.com

**【Abstract】** **Objective** To preliminarily evaluate the performance of the blood glucose kit by verifying the linear range of the Mindray blood glucose kit in our laboratory. **Methods** According to the EP06-A2 document issued by the American Clinical Laboratory Standardization Institute (CLSI) in April 2003, six equal-interval experimental samples with high and low blood glucose concentrations were accurately proportionally prepared. Each concentration level was measured twice. The obtained experimental data were analyzed by simple, quadratic and cubic polynomial regression analyses. The  $t$ -tests were carried out for non-linear coefficients  $b_2$ ,  $b_2$  and  $b_3$  obtained from the above quadratic and cubic polynomial regression analyses respectively to judge whether the non-linear coefficients had statistical significances or not, that was whether there were differences between them and 0. The optimal polynomial model was determined by calculating the standard regression error ( $Sy.x$ ). **Results** No experimental results were outliers. The constant error ( $SDr$ ) of repeated determinations of experimental samples was 0.40%. The  $SDr$  was less than the total allowable error (2.5%) of 1/4 CLIA'88 for the in-batch imprecision in our laboratory. The quadratic regression polynomial type was determined as the optimal polynomial model. The maximum linear deviation ( $DL_i$ ) of the six concentration levels was 1.73%, which was less than the non-linear difference index (2.5%) required by the American Association of Clinical Pathologists (CAP). **Conclusion** The Mindray glucose kit was linear in the range of 0.5-25.0 mmol/L, demonstrating that these experimental results were consistent with the linear range indicated by the kit.

**【Key words】** Automatic biochemical analyzer; Performance verification; Blood glucose Kit

检验科在引进新的实验方法、试剂或仪器时, 都要对其技术或产品性能指标(如精密度、准确度、线性范围等)作出评价<sup>[1]</sup>。本实验室近期引进一台深圳迈瑞公司生产的 BS-460 型全自动生化分析

仪,同时使用其配套葡萄糖测定试剂盒,为验证该试剂盒说明书声明的线性范围,本室参考美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)EP6-A2 方法对 BS-460 型全自动生化分析仪测定葡萄糖的线性范围进行验证实验,现报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要材料

1.1.1 仪器与试剂 仪器采用 TDZ4-WS 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司,规格:200~1 000 μL),BS-460 型全自动生化分析仪(深圳迈瑞公司);试剂采用葡萄糖(glucose, Glu)测定试剂盒(葡萄糖氧化酶法)及其配套校准品(迈瑞公司,批号:141518001);质控品(迈瑞公司),常规生化复合定值质控品(正常水平)(迈瑞公司,批号:050217006)。

1.1.2 样本来源 从本院患者样本中选择一高血糖样本(血糖浓度为 24.56 mmol/L)的血清;生理盐水为市售医用品。

1.1.3 统计学分析 应用 IBM SPSS Statistics 22.0 统计分析软件包分析处理实验数据。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 样本配制 选取血糖浓度为 24.56 mmol/L 的患者血清作为高值样本(H),低值样本(L)以生理盐水代替。按照 1L、0.2H+0.8L、0.4H+0.6L、0.6H+0.4L、0.8H+0.2L、1H 将 H 和 L 配制为 6 个系列浓度的实验样本。

1.2.2 检测步骤 对上述 6 个实验样本随患者样本在迈瑞 BS-460 型全自动生化分析仪上进行测定,每个实验标本重复测定 2 次,2 次检测的间隔时间尽量缩短。

1.2.3 实验结果 记录结果,每个样本 2 次检测的结果计算均值。观察所收集数据有无明显的离群点,如有应查找原因。若有明确原因,纠正后修正数据;若无明确原因,则应重新检测全部数据。

#### 1.2.4 精密度检验

1.2.4.1 计算恒定误差(SDr) 根据公式计算 SDr。

$$SD_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k [r_{i1} - r_{i2}]^2}{2 \times L}}$$

式中,  $r_{i1}$  为第  $i$  个样本第 1 次测量的浓度值与其均值的百分比,  $r_{i2}$  为第  $i$  个样本第 2 次测量的浓度值与其均值的百分比。本研究设定不精密度目标

为 CLIA'88 允许误差的 1/4,比较 SDr 与设定的不精密度目标。如果 SDr 大于 1/4 CLIA'88 允许误差,则有可能是检测实验样本的生化分析检测系统的精密度太低,其所得的实验数据不能够可靠且真实地评价线性关系。此时应检查验证实验中人员的具体操作步骤和生化分析仪的技术问题,查找导致精密度太低的原因,原因得到纠正后,验证实验应该重新进行。反之,则表示符合。

1.2.4.2 多项式线性评价 以理论值为横坐标,以实测值均值为纵坐标进行线性回归分析,计算一阶、二阶、三阶回归方程及其回归标准误差( $Sy_x$ )。一阶、二阶、三阶回归方程分别为  $y=b_0+b_1x$ 、 $y=b_0+b_1x+b_2x^2$ 、 $y=b_0+b_1x+b_2x^2+b_3x^3$ 。计算二阶( $b_2$ )、三阶( $b_2$ 、 $b_3$ )回归系数标准误( $SE_i$ ),然后进行  $t$  检验。若非线性系数  $b_2$ 、 $b_3$  与 0 比较,经  $t$  检验无显著差异( $P>0.05$ ),存在线性关系,不精密度满足条件时,则分析完成;若二阶回归方程的非线性系数  $b_2$ ,或三次多项式模型的  $b_2$  或  $b_3$  中任一个与 0 比较,有显著差异( $P<0.05$ ),则该组数据存在非线性。当非线性存在时,通过计算多项式的  $Sy_x$ ,  $Sy_x$  值最小的多项式为最适多项式模型。当二次多项式或三次多项式为数据线性模型时,则需计算每个实验样本在最适多项式上的线性偏差,每个线性偏差与设定目标比较,从而评价每个点的非线性程度<sup>[2]</sup>。

1.2.4.3 非线性度的判断 当最适多项式为二次多项式或三次多项式时,需要计算每个样本的线性偏离( $DL_i$ ),公式为  $DL_i = p(x_i) - (b_0 + b_1x_i)$ ,式中  $x$  的取值范围为  $x_1 \cdots x_6$ ,  $p(x_i)$  为最适多项式在点  $x_i$  处的计算值,  $b_0 + b_1x_i$  为一次回归多项式在点  $x_i$  处的计算值,  $DL_i$  是最适非线性模型与线性模型在点  $x_i$  处的差异。

## 2 结果

2.1 血糖浓度测定结果 6 个系列浓度样本进行血糖测定的结果,见表 1。

表 1 6 组样本血糖浓度测定结果

样本编号	实际浓度 (mmol/L)	实测浓度 1 (mmol/L)	实测浓度 2 (mmol/L)	均值 (mmol/L)	差值 (mmol/L)
1	0.00	-0.01	-0.01	-0.01	0.00
2	4.91	5.00	4.99	5.00	0.01
3	9.82	10.18	10.05	10.12	0.13
4	14.74	14.65	14.65	14.65	0.00
5	19.65	19.57	19.65	19.61	-0.08
6	24.56	24.02	24.09	24.06	-0.07

2.2 初步检查数据 初步目测线性检查未发现明显的非线性,目视判断本实验的 12 个检测数据,未

发现离群点。

**2.3 计算  $SDr$**  根据  $SDr$  计算公式代入实验数据得  $SDr$  为 0.004 4, 小于本研究设定的不精密度目标, 表明本实验测量数据的精密度符合线性判断的要求。

**2.4 多项式回归分析** 血糖线性验证实验的多项式回归分析结果, 见表 2。

表 2 血糖线性验证实验的多项式回归分析结果

阶别	系数	系数值	$SE_i$	$t$ 检验	$S_{y.x}$	自由度
1	b0	0.189 0	0.161 2	1.172 9	0.222 7	10
	b1	0.981 2	0.010 8	90.540 1		
2	b0	-0.015 7	0.125 5	-0.125 1	0.138 5	9
	b1	1.043 8	0.024 0	43.419 2		
	b2	-0.002 6	0.000 9	-2.710 2		
3	b0	-0.016 3	0.166 2	-0.098 0	0.169 6	8
	b1	1.044 3	0.065 7	15.889 8		
	b2	-0.002 6	0.006 6	-0.392 0		
	b3	$1.62 \times 10^{-6}$	0.000 2	0.009 1		

注:  $t=b_i/SE_i$ 。自由度的计算公式为  $df=L \cdot R - Rdf$ ,  $L$  为准备的不同浓度样本数,  $R$  为重复检测次数;  $Rdf$  为回归分析占用的自由度, 指  $Rdf$  回归模型中系数的数量 (包括  $b_0$ ) 一阶、二阶、三阶多项式回归分析的  $Rdf$  分别为 10、9、8

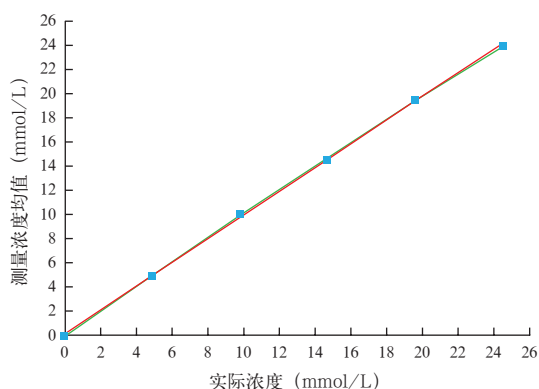
**2.5 计算  $DL_i$**  血糖线性验证实验的线性偏离计算结果, 见表 3。

表 3 血糖线性验证实验的线性偏离计算结果

样本编号	$x_i$ (mmol/L)	$p(x_i)$ (mmol/L)	$b_0+b_1x_i$ (mmol/L)	$DL_i$ (mmol/L)	$DL_i$ (%)
1	0.00	-0.02	0.19	-0.21	
2	4.91	5.05	5.01	0.04	0.81
3	9.82	9.99	9.82	0.17	1.73
4	14.74	14.82	14.65	0.17	1.15
5	19.65	19.51	19.47	0.04	0.20
6	24.56	24.08	24.29	-0.21	

注:  $p(x_i)$  为最适多项式在点  $x_i$  处的计算值,  $b_0+b_1x_i$  为一次回归多项式在点  $x_i$  处的计算值

**2.6 线性范围确认** 以血糖实际浓度为  $x$  轴、每个标本 2 次测定浓度的平均值为  $y$  轴绘制血糖线性范围验证实验示意图, 见图 1。



注: 红色线条为一次回归多项式拟合曲线, 绿色线条为二次回归多项式拟合曲线

图 1 血糖线性范围验证实验

### 3 讨论

线性范围指试剂盒按说明书使用可准确测量的范围, 在试剂盒的评价中有重要的作用。试剂盒测定线性范围是衡量其质量的重要指标, 也是保证正确使用和鉴定试剂盒的关键指标之一<sup>[3]</sup>。本实验室所用迈瑞葡萄糖测定试剂盒声明的线性范围为 0.5 ~ 25.0 mmol/L, EP6-A2 文件要求用户在自己的实验室验证生产厂家说明书告知的线性范围时, 实验样本需要 5 ~ 7 个, 其浓度范围要能够覆盖试剂盒说明书标明的线性范围, 因此本验证实验选择生理盐水 (其血糖浓度为 0 mmol/L) 作为测定浓度的下限, 选择血糖测定结果为 24.56 mmol/L 的患者血清作为测试浓度的上限。用患者血清和生理盐水按比例精确配制成等间距的 6 个实验样本, 且每个样本重复测量 2 次<sup>[4]</sup>。

EP6-A2 文件处理实验数据的基本步骤如下:

① 首先按顺序记录实验样本所得数据, 目视检查每一个测定数据是否有与其他数据比较相差较大的离群值, 或者实验数据的测定有明显的错误值。如果是检测过程中的操作错误或化学分析仪的技术性问题被发现, 并且得到正确解决, 则整个实验验证过程应该重新进行一遍; 如果检测过程中的操作无误或化学分析仪的技术性问题没有明显错误, 此时应审视 6 个实验样本 2 次重复检测所得数据是否有离群值, 若发现存在离群值, 则应该剔除该值。如果 2 个或 2 个以上的离群值被发现, 且上述实验数据不能够被合理解释, 此时应怀疑化学分析仪系统的检测性能。查找出现问题的原因, 如有必要, 需请所产化学分析仪的厂家协助帮忙。② 对实验数据作精密度检验, 即计算实验数据的比例误差 ( $CVr$ ) 或  $SDr$ , 这是因为线性评估还应考虑随机误差的影响, 随机误差来源于随机变异, 可能会导致非线性的评估能力降低。将  $CVr$  或  $SDr$  与不精密度的设定目标进行比较, 若  $CVr$  或  $SDr$  大于实验室既定的不精密度目标, 则很有可能为重复性即精密度太差, 这样的实验数据不能够用来可靠且真实地评价线性关系。此时应检查验证过程中的人员操作问题或是化学分析仪的问题, 查找到精密度低的产生原因, 纠正这些原因后, 重新进行验证实验。只有当  $CVr$  或  $SDr$  小于实验室设定的不精密度目标时, 实验样本检测所得的数据才可以进行多项式回归分析, 即一次、二次和三次回归分析。一次、二次和三次多项式回归分析后, 可以得到线性系数和非线性系数, 二次和三次多

项式的非线性系数与 0 进行统计学比较,其方法采用 *t* 检验。若二次多项式模型的非线性系数 *b*<sub>2</sub>,或三次多项式模型的 *b*<sub>2</sub> 或 *b*<sub>3</sub> 中任意一个与 0 比较无显著差异 ( $P>0.05$ ),则提示该组数据呈线性;若非线性系数 *b*<sub>2</sub> 和 *b*<sub>3</sub> 与 0 比较有显著差异 ( $P<0.05$ ),则提示该组数据存在非线性。通过计算多项回归式的 *S<sub>y.x</sub>*, *S<sub>y.x</sub>* 最小的多项式即为最适多项式回归模型,计算 *S<sub>y.x</sub>* 公式可以参考 CLSI 2018 年 6 月颁布的第 3 版 EP09c 文件。最适多项式模型确定后,还要计算最适多项式在每组实验样本的非线性度,如果最大的线性偏差仍小于设定目标,说明最适多项式的非线性程度可以接受,此时仍可以认为在所验证的实验样本浓度范围内该项目呈线性<sup>[5-8]</sup>。

经目视检查和统计计算,本次线性验证实验的样本数据,不存在明显的离群值和非线性。通过 SPSS 统计软件计算,实验样本检测所得数据计算的 *SD<sub>r</sub>* 值约为 0.4%, *SD<sub>r</sub>* 小于本实验室设定的批内不精密度要求,即 1/4 CLIA'88 允许总误差 (2.5%),表明生化分析检测系统的随机误差对验证实验的结果无明显影响,实验样本的测定数据可用于线性评价。通过对实验数据进行多项式回归分析及计算多项式的 *S<sub>y.x</sub>*,统计得出最适多项式模型为二次多项式回归方程。再通过最适多项式和一次多项式计算得出 6 个实验样本的 *DL<sub>i</sub>*, 6 个 *DL<sub>i</sub>* 中的最大值为 1.73%, *DL<sub>i</sub>* 最大值小于设定的预期目标 2.5%,因而可以接受最适多项式的非线性程度。绘制散点图,其 *x* 轴

数值为配制的 6 组血糖浓度, *y* 轴数值为 6 组实验样本 2 次重复测定的均值,通过散点图发现该迈瑞葡萄糖试剂盒在 0.5 ~ 25.0 mmol/L 范围内呈线性,因此本次线性验证实验的实验结果与试剂盒说明书声明的线性范围一致。

**参考文献**

- 1 Glibert B, Bourleaux V, Peeters R, et al. Analytical performance verification of the beckman coulter AU5800 clinical chemistry analyser against recognized quality specifications reveals relevance of method harmonization [ J ]. Clin Lab, 2016, 62(1-2) : 57-72.
- 2 Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures : a statistical approach ; approved guideline [ M ]. Wayne, PA : CLSI, 2003.
- 3 冯洋 . 微量白蛋白检测试剂盒性能验证 [ J ]. 实用检验医师杂志, 2018, 10(1) : 18-20.
- 4 马春红,赵春燕 . 应用 EP6-A 文件评价 MP1 干式生化分析仪淀粉酶检测的线性 [ J ]. 检验医学与临床, 2016, 13(18) : 2681-2682.
- 5 齐发梅,李金龙,齐占斌 . 用 EP6-A2 方法验证比色法检测血清超氧化物歧化酶 [ J ]. 实验与检验医学, 2014, 32(2) : 119-120, 136.
- 6 吕赛平,邹学森 . 定量检测系统线性评价方法 -EP6-A 法 [ J ]. 实验与检验医学, 2009, 27(3) : 303-304, 334.
- 7 胡军红,谢建红,陆玲,等 . 日立 7600 生化检测系统检测天门冬氨酸氨基转移酶临床可报告范围的研究 [ J ]. 实验与检验医学, 2015, 33(1) : 52-55.
- 8 周琦,李少男,李小鹏,等 . 利用美国国家临床实验室标准化委员会 EP6-A 指南判定线性 [ J ]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1) : 85-86.

(收稿日期 : 2018-11-14)

(本文编辑 : 张耘菲)

**消 息**

**《实用检验医师杂志》广告业务招商**

《实用检验医师杂志》由国家卫生和计划生育委员会主管,中国医师协会与天津市天津医院共同主办,是中国医师协会检验医师分会会刊。本刊为中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,“万方数据—数字化期刊群”独家收录,《中国学术期刊网络出版总库》收录期刊,中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,《超星期刊域出版系统》全文收录。

《实用检验医师杂志》于 2009 年 7 月 21 日获得中华人民共和国新闻出版总署批准的中华人民共和国期刊出版许可证,京期出证第 5864 号; 2018 年 1 月 12 日获得天津市和平区市场和监督管理局批准从事广告发布业务(广告发布登记号:津和工商广登字 2018024 号)。广告经营范围:设计、制作印刷品广告,利用自有《实用检验医师杂志》发布广告。本刊为国内外公开发行。目前本刊编辑部已开发了广告业务,欢迎需要在本刊刊登广告的客户联系我们。联系电话:022-23306917

