



TEST METHOD VERIFICATION

方法验证

四川大学华西医院实验室医学科

黄亨建

四川大学华西医院
WEST CHINA HOSPITAL, S.U.

学习和讨论内容

管理机构的要求

方法确认的支持性文件

方法的评价的主要内容



ALB试剂说明书

性能特性

使用罗氏/日立系统确定的性能数据如下。各个实验室得到的结果将有所不同。

不精密度 (n=21)

用人血清和控制品进行批内 (n=21) 天间 (n=10) 重复检测, 确定可重现性。

样品	批内			天间		
	均值 g/L	SD g/L	CV %	均值 g/L	SD g/L	CV %
人血清	27	0.1	0.39	32	0.5	1.71
Precinorm U	30	0.3	0.85	30	0.6	1.99
Precipath U	30	0.2	0.63	28	0.4	1.37

方法学比较

A. 以罗氏诊断的 GmbH 的老白蛋白试剂, 在罗氏 / 日立 717 分析仪上检测结果为 x , 和本试剂在相同仪器上检测结果为 y 。用患者血清进行方法学比较, 结果如下 (g/L):

Passing/Bablok 直线回归
 $\hat{y} = 1.049x - 1.70$ $\hat{y} = 1.041x - 1.43$
 $r = 0.9891$ $r = 0.9891$
 $SD(md\ 95) = 1.2$ $Sy \cdot x = 0.7$

检测的血清例数: 64

样品内白蛋白浓度范围为: 16—46 g/L。



ALB试剂说明书

干扰

判断指标：白蛋白在 35 g/L 时的回收率在初始值的±10%内，干扰属可接受。

黄疸：I 指数低于 60（结合胆红素和游离胆红素浓度约为 60mg/dl）没有明显干扰。

溶血：H 指数低于 1000（血红蛋白浓度约为 1000mg/dl）没有明显干扰。

脂血（内脂）：L 指数低于 1000（甘油三酯浓度约为 2000 mg/dl）没有明显干扰。但是脂血混浊的浊度和甘油三酯间相关性很差。

分析灵敏度（检测下限）

2g/L。

最低灵敏度为非空白的最低可检测白蛋白浓度。对最低白蛋白标准进行 21 次重复测定，以 3 倍标准差确定检测下限。

检测/可报告范围

10-70g/L

对高浓度样品可以稀释重做得到可靠结果。在没有重做功能的仪器上，用 0.9%NaCl 对样品进行手工稀释（如：1+1）。再将结果乘上稀释因子（如 2）。

参考值

参见 Tietz 资料

成年人： 34-48g/L

新生儿 0-4 天： 28-44g/L

儿童 4 天-14 岁： 38-54g/L

14-18 岁： 32-45g/L

每个实验室应考虑参考值对接触人群的适用性，如有必要，应自行确定参考范围。在用作诊断时，应结合患者病史及其它临床检查结果。



管理机构的要求

豁免项目
(简单/家用
测试)

中度复杂
项目
(强制)

高度复杂
项目
(强制)

临床实验室改进修正案1988(CLIA 88)
测试种类的复杂性
临床实验室执行以上三类



管理机构的要求

- 管理机构对豁免试验的要求

不要求试剂批号之间的验证
遵循生产厂家的说明书



管理机构的要求

- 管理机构对豁免试验的要求

不要求豁免仪器和中心实验室仪器之间比较

不要求多个豁免仪器仪器比较



管理机构的要求

• 管理机构对豁免试验的要求

质量控制

遵循生产厂家的说明书

QC结果在控

QC结果失控, 纠正措施必须记录

仪器内部控制结果不需要记录, QC不可接受
仪器控制自动锁定, 不能分析样本。

QC频率、操作遵循生产厂家的说明书



管理机构的要求

• 管理机构对豁免试验的要求

方法性能

除了参考范围，其它性能验证不要求
操作手册、仪器维护、标本处理、结果报告和安全与
非豁免一致。

豁免测试所有常见的POCT，化学、血液学、免疫学、
微生物学、尿液和有限的服务



管理机构的要求

• 管理机构对非豁免试验的要求

2003年1月24日, 美国医医疗服务中心 (CMS、 the Final CLIA Rule) 公布. 陈述: “实验室的分析方法 (non-waived) 必须要确认其性能.”



管理机构的要求

•非豁免试验

1、 Non-waived unmodified tests – moderate and high complexity tests (中度或高度试验)

2、 Non-waived, modified (or in-house developed) tests.(更改中度或高度试验或开发的试验)



管理机构的要求

非豁免检测项目未修改的测试

(中度和高复杂性)如化学、血液学等验证是完成4实验

1、重复实验(估计不精确度)



2、方法比较(估计不准确度)



3、线性试验(可报告的范围)



4、参考值区间验证



管理机构的要求

非豁免检测项目但修改（实验室开发和项目），必须确定以下性能特点：

- 精密度
- 准确度
- 可报告的范围
- 参考区间
- 分析灵敏度（检测限）
- 分析特异性（干扰物质）



管理机构的要求

- 《医疗机构临床实验室管理办法》 检查细则
(通用要求)

医疗机构临床实验室应当保证检测系统的完整性和**有效性**，对需要校准的检验仪器、检验项目和对临床检验结果有影响的辅助设备定期进行校准。



CAP-LAP的要求

COM.40300 **Analytic Accuracy/Precision** Phase II

- The laboratory verifies or establishes analytic accuracy and precision for each test.

COM.40400 **Analytic Sensitivity** Phase II

- The laboratory verifies or establishes the analytic sensitivity (lower detection limit) of each assay, as applicable.

COM.40500 **Analytic Interferences** Phase II

The laboratory verifies or establishes analytic interferences for each test

COM.40600 **Reportable Range** Phase II

- The reportable range (analytic measurement range) is verified/established for each analytic procedure before implementation

COM.50000 **Reference Intervals** Phase II

- The laboratory establishes or verifies its reference intervals (normal values).



方法确认的支持性文件

定量实验室方法的初步评价 (CLSI EP10)

临床化学设备操作精密度评价 (CLSI EP5)

用患者标本进行方法学比较和偏倚评估 (CLSI EP9)

定量分析方法的线性 (CLSI EP6)

临床化学干扰试验 (CLSI EP7)

基质效应的评价 (CLSI EP14)

精密度和准确度性能的用户证实 (EP15-A)

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute



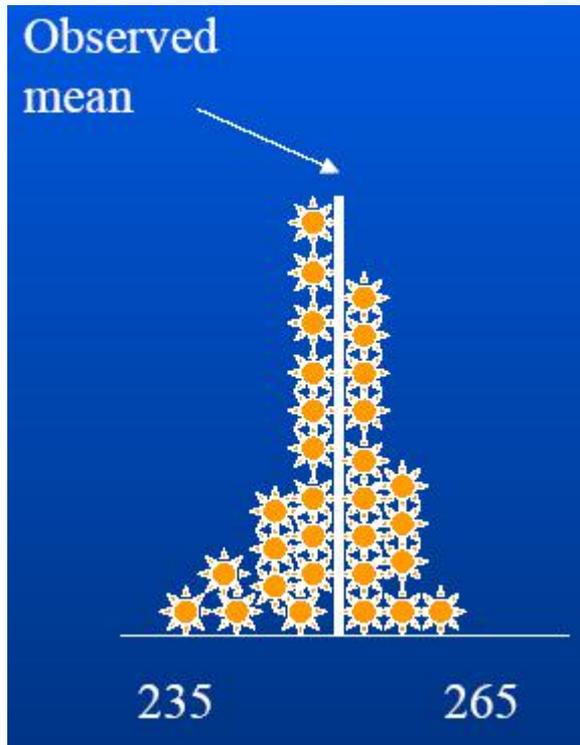
方法的评价的主要内容

方法确认的基本内容：

- 评价不精密度（随机误差）
- 评价不准确度（系统误差）
- 可报告范围的确认（线性范围）
- 参考值的确认（正常值范围）
- 分析方法的灵敏度（最低检测限）
- 分析方法的特异性（干扰试验）



一、不精密度



第一重要的性能指标

—— 精密度



一、不精密度

指同一样本在一定条件下多次重复测定得到的一系列单次测定值之间的接近程度，是表示测定结果中随机误差大小程度的指标。

用标准差（SD）和变异系数（CV）描述不精密度的大小



一、不精密度

1. 计算批内（日间）不精密度(CV或SD)，并将与
厂家批内（日间）不精密度比较



一、不精密度

性能特性

使用罗氏/日立系统确定的性能数据如下。各个实验室得到的结果将有所不同。

不精密度 (n=21)

用人血清和控制品进行批内 (n=21) 天间 (n=10) 重复检测, 确定可重现性。

样品	批内			天间		
	均值 g/L	SD g/L	CV %	均值 g/L	SD g/L	CV %
人血清	27	0.1	0.39	32	0.5	1.71
Precinorm U	30	0.3	0.85	30	0.6	1.99
Precipath U	30	0.2	0.63	28	0.4	1.37



一、不精密度

2. 不精密度分析目标进行比较



CLIA88推荐最大测量不精密度

推荐允许误差

分析项目	决定性水平 Xc	可接受性能 (CLIA'88)	精密度目标 (最大标准差)		固定限目标 (最大总误差) CLIA'88
			Xc*CLIA/4	Barnett Fraser	
常规化学					
丙氨酸氨基转移酶	50U/L	20%	2.5		5.8
白蛋白	3.5g/dL	10%	0.09	0.25	0.05
碱性磷酸酶	150U/L	30%	11		5.1
淀粉酶	100U/L	30%	7.5		3.7
门冬氨酸氨基转移酶	30U/L	20%	1.5		1.2
碳酸氢盐	20mmol/L			5.0	0.46
	30mmol/L			5.0	0.69
总胆红素	1.0mg/dL	0.4	0.10	0.2	0.08
	20mg/dL	20%	1.0	1.5	1.6
血气 PCO2	35mmHg	5mmHg	1.3	3	0.84
	50mmHg	5mmHg	1.3	3	1.2
血气 PO2	30mmHg	3s	0.75s		3s
	80mmHg	3s	0.75s	5.0	3s
	195mmHg	3s	0.75s		3s
血气 pH	7.35	0.04	0.01	0.004	0.01
	7.45	0.04	0.01	0.006	0.01
总钙	7.0mg/dL	1.0	0.25	0.16	0.06
	10.8mg/dL	1.0	0.25	0.24	0.10
	13.0mg/dL	1.0	0.25	0.30	0.12
氯	90mmol/L	5.0%	1.1	2.0	0.63
	110mmol/L	5.0%	1.4	2.0	0.77
总胆固醇	200mg/dL	10%	5.0		5.4
高密度脂蛋白胆固醇	35mg/dL	30%	2.6		1.9
	65mg/dL	30%	4.9		3.6
肌酸激酶	200U/L	30%	15		32
肌酸激酶同工酶	13ug/L	3s	0.75s		3s
肌酐	1.0mg/dL	0.30	0.08	0.15	0.02
	3.0mg/dL	15%	0.11		0.07
葡萄糖	50mg/dL	6.0	1.5	5.0	1.1
	126mg/dL	10%	3.15	5.0	3.1
	200mg/dL	10%	5.0		4.4
铁	150ug/dL	20%	7.5		24
乳酸脱氢酶	300U/L	20%	15		12
乳酸脱氢酶同工酶	100U/L	30%	7.5		30
镁	2.0mg/dL	25%	0.13		0.02
无机磷	4.5mg/dL				0.11
钾	3.0mmol/L	0.50	0.13	0.25	0.04



四川大学华西医院
WEST CHINA HOSPITAL, S.U.



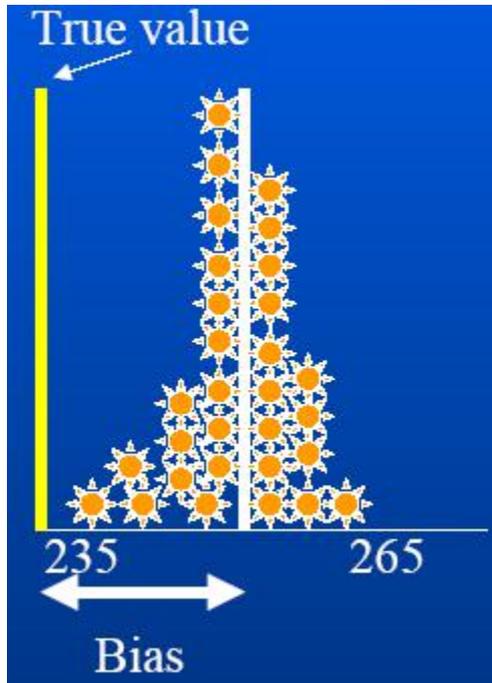
一、不精密度

批内CV（或标准差s） $\leq 1/4$ 的CLIA允许误差

天间CV（或标准差s） $\leq 1/3$ 的CLIA允许误差



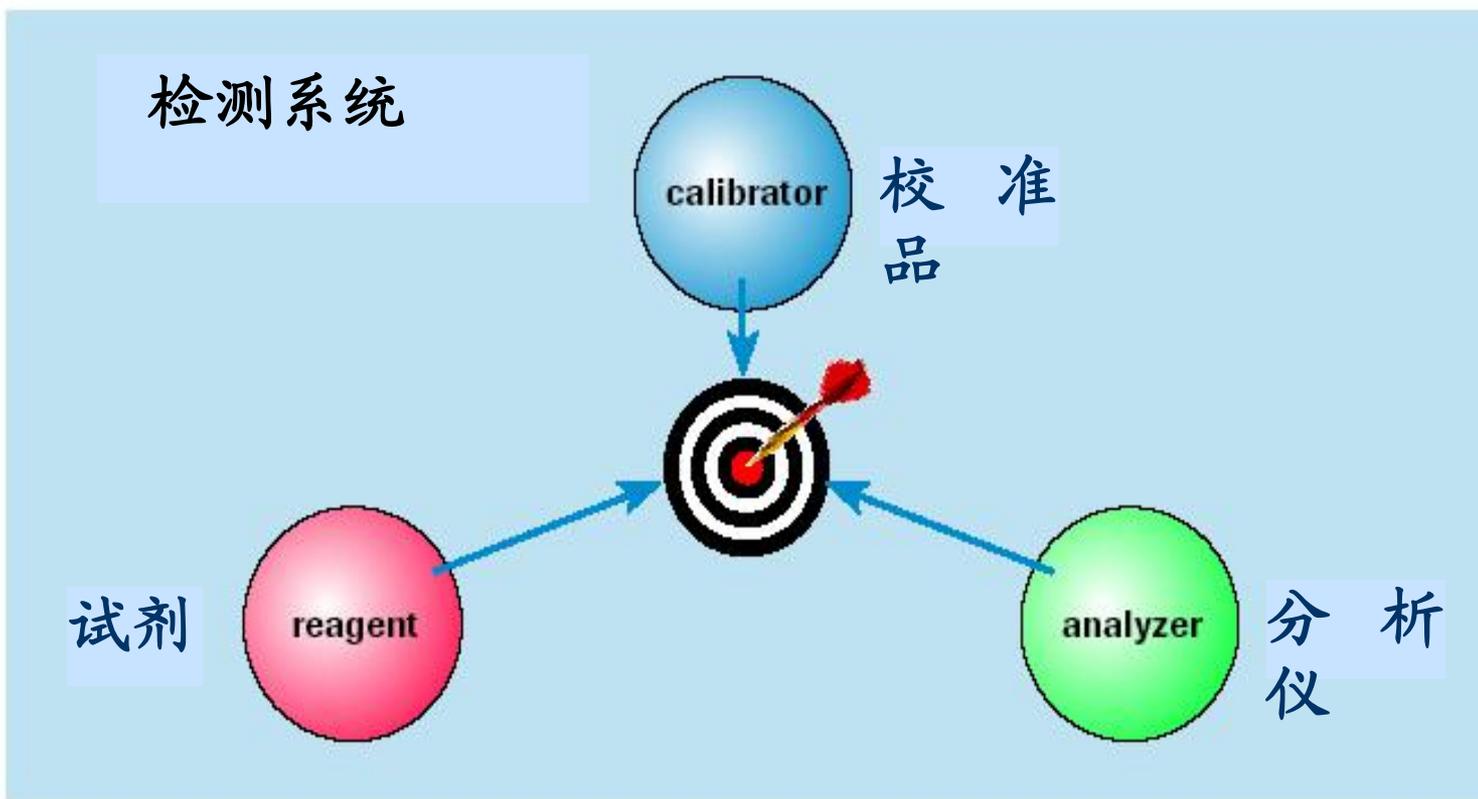
二、正确度



大批检测结果的均值与真值的一致程度与系统误差有关，常用**偏倚**表示不正确度



测量正确度与检测系统的关系



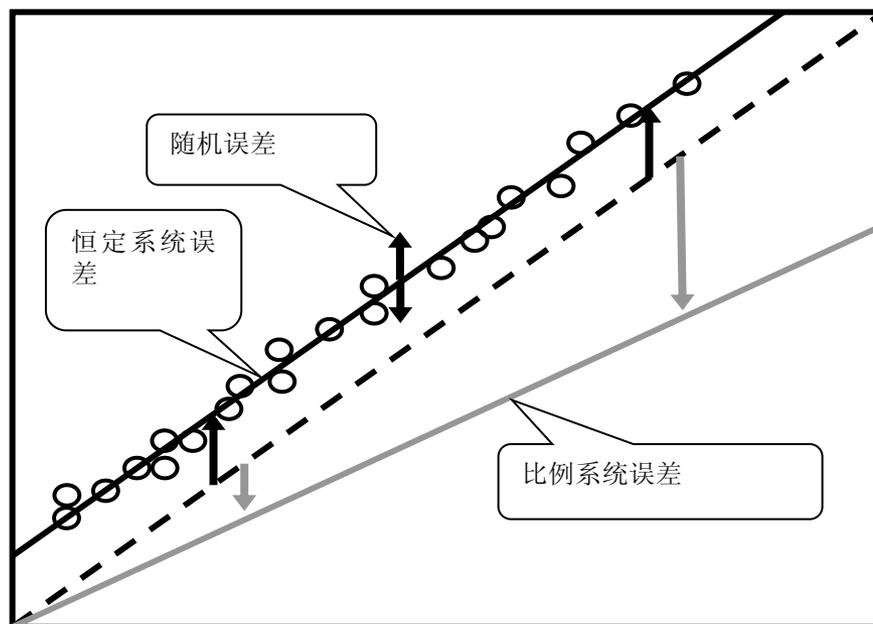
二、正确度

评价准确度的常用试验

方法比较试验

回收试验

干扰试验



二、正确度

1、方法比较试验 (comparison of methods experiment)

将试验方法（待评价或待验证的方法）与比较方法（参考方法或准确度已知的方法）进行比较

用于评价试验方法的恒定和比例系统误差。



二、正确度

-比较方法

理想的比较方法= reference method

- 样本个数： 40 份患者样本

1/3低浓度

1/3中浓度

1/3高浓度

(可报告范围)



二、准确度

—足够样品数量

—时间

至少5天, 可以延长到20天

两种方法同时测试标本在2小时内



二、正确度

比较的方法——数据分析

图形分析Graph analysis

回归分析Regression analysis

可接受的标准Acceptable criterion



二、正确度

比较的方法——数据分析

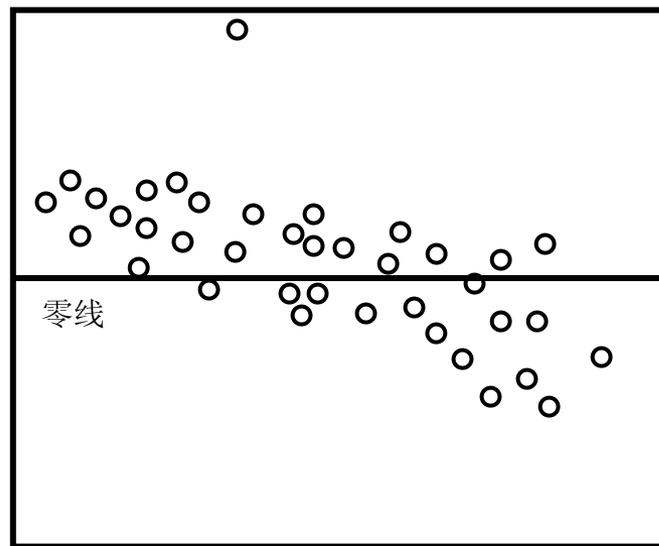
1. 数据绘图：

——差异图

测试结果减去比较结果的差异
差异应该分散在零线。

寻找离散值和重复测量

差异
试验
比较



比较方法结果

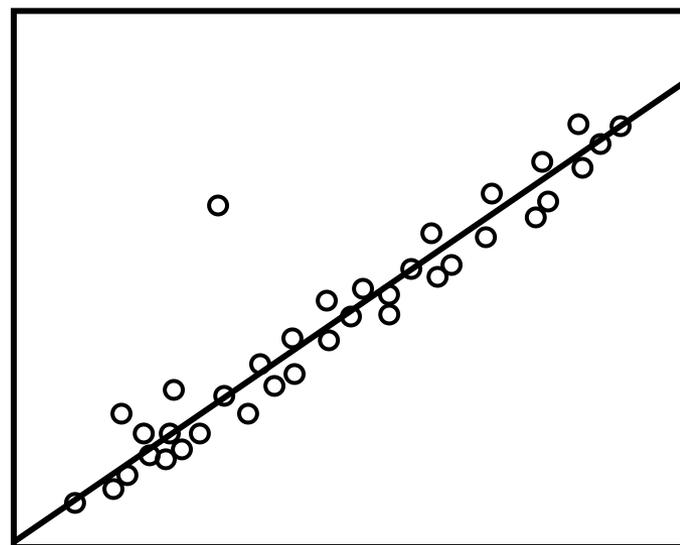


二、正确度

比较的方法——数据分析
——对比图

Y轴: 试验方法测定值

X轴: 比较方法的测定值



比较方法结果

测定方法结果



二、正确度

比较的方法——数据分析

2. 统计工具计算系统误差

线性回归分析:

$$\hat{Y} = bX + a$$

系统误差

$$SE = |Y_c - X_c|$$



二、正确度

比较的方法——数据分析

3. 可接受的标准Acceptable criterion

应用方法比较的回归方程, 计算医学决定水平的预期偏差.

$$| a+bXc) -Xc | < 1/2TEa \quad (\text{CLIA88})$$



二、正确度

用患者标本进行方法学比较和偏倚评估（CLSI EP9）

精密度和准确度性能的用户证实（EP15-A）



二、正确度

2. 室间质评回报结果评价不正确度

项目：总蛋白		g/L									
样本编号	你室结果	靶值	偏倚(%)	允许范围	VIS允许范围	下限	靶值	上限	VIS	评价结果	
200811	54.4	52.7	3.23	47.4 - 58.0	49.6 - 55.8		*		83	通过	
200812	63.4	61.9	2.42	55.7 - 68.1	58.3 - 65.5		*		62	通过	
200813	72.3	70.5	2.55	63.5 - 77.5	66.4 - 74.6		*		65	通过	
200814	81.9	81.0	1.11	72.9 - 89.1	76.3 - 85.7		*		28	通过	
200815	79.8	78.0	2.31	70.2 - 85.8	73.4 - 82.6		*		59	通过	

所属组	双缩脲法	成绩	100%
本组实验室数	1072	VIS成绩	59
方法	双缩脲法		
仪器	Roche Modular D2400/P800		
试剂	Roche		
校准物	Roche		



二、正确度

3. 对于没有PT/EQA的分析项目

应用美国临床实验室标准化委员会GP29-A。

《Assessment of Laboratory Tests When proficiency Testing is Not Available; Approved Guideline GP29-A》替代评价方法(Alternative Assessment Procedure AAP)。



衡量质量的两个重要指标

测量的固有不精密度

测量的正确度

总误差

允许总误差
TEA

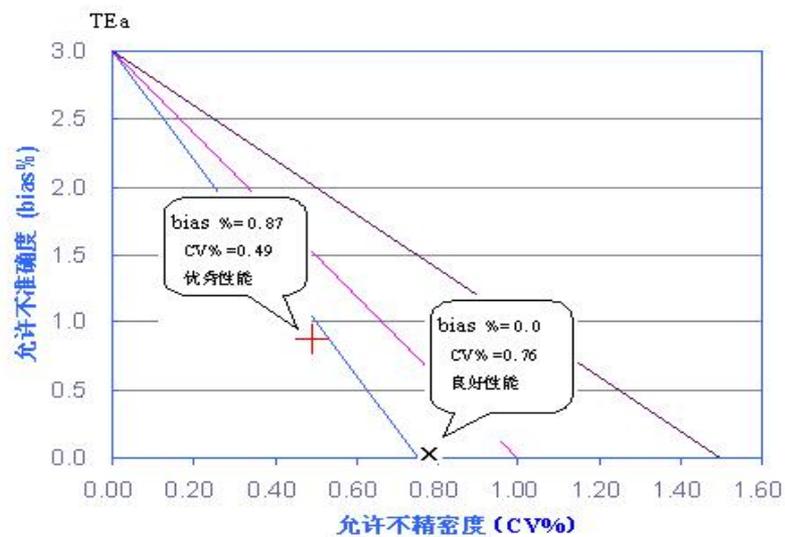
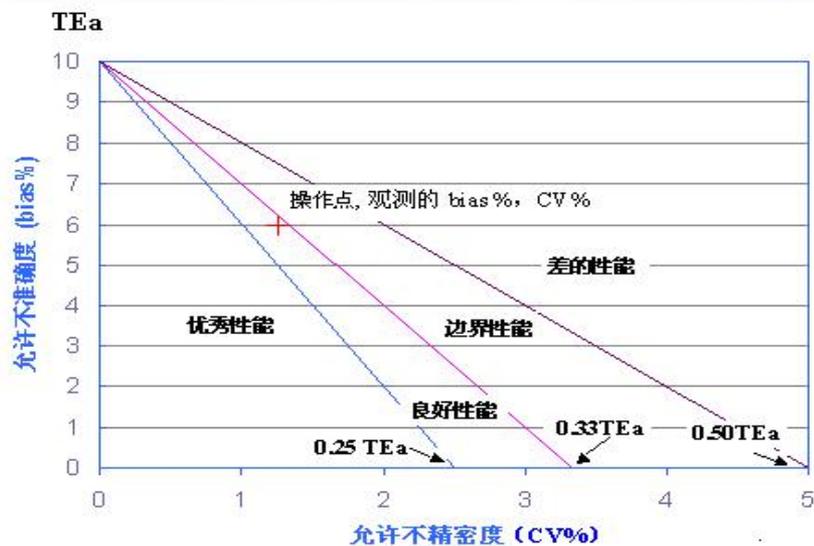


允许总误差指标与其他国家总误差指标

检验项目	本标准TE (%)	美国TE	
丙氨酸氨基转移酶	16.0	± 20%	
天门冬氨酸氨基转移酶	15.0	± 20%	
γ-谷氨酰基转移酶	11.0	± 20%	
碱性磷酸酶	18.0	± 30%	
肌酸激酶	15.0	± 30%	
淀粉酶	15.0	± 30%	
乳酸脱氢酶	11.0	± 20%	
总蛋白	5.0	± 10%	
白蛋白	6.0	± 10%	
总胆红素	15.0	± 20%	± 6.84 mmol/L
血糖	7.0	± 10%	± 0.33 mmol/L
肌酐	12.0	± 15%	± 26.5 μmol/L
尿酸	12.0	± 17%	
尿素	8.0	± 9%	± 0.71 mmol/L
总胆固醇	9.0	± 10%	
甘油三酯	14.0	± 25%	
氯离子	4.0	± 5%	



测量不精密度和正确度对质量的影响



三、干扰试验

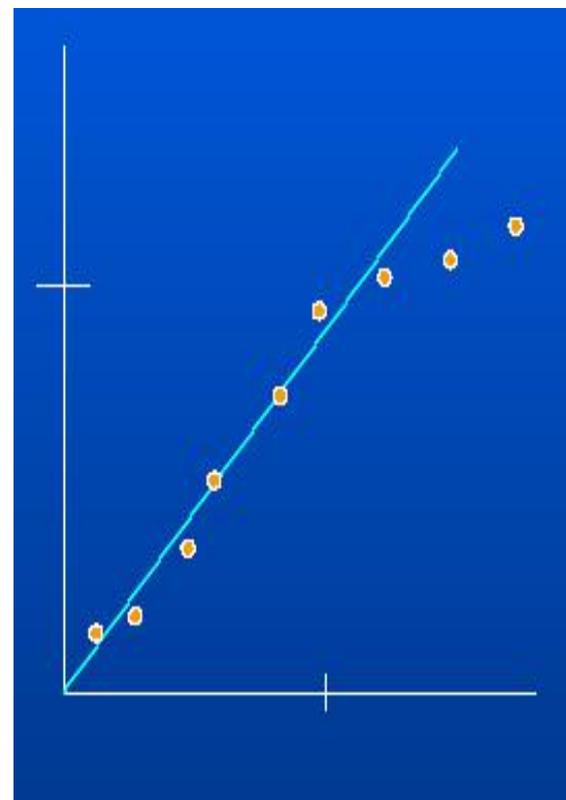
干扰试验是通过定量检测样本中的物质所引起试验方法的系统误差，以评价方法的准确度。由干扰物质引起的误差通常是恒定系统误差，与分析物的浓度无关系。



四、可报告范围

评价分析方法能报告的**可信**的最低、最高的浓度范围值。

确认厂家所提供该分析系统的可报告范围是否一致。



四、可报告范围

可报告范围（reportable range）指可以报告的所有结果范围，包含两种类型的范围：

分析测量范围
(**analytical
measurement
range, AMR**)

临床可报告范围
(**clinical
reportable
range, CRR**)



四、可报告范围

分析测量范围（analytical measurement range, AMR）

指对没有进行任何预处理（稀释，浓缩等）的样本，分析方法能够直接测定出的待测物的范围，用**线性实验**来评价试验方法的分析测量范围，也即**线性范围**。



四、可报告范围

- 1、目测线性法
- 2、最小二乘法线性评价
- 3、总误差与总允许误差比较

NCCLS制订并推出的评价方案（EP-6）

多项式线性评价方案（2003）



四、可报告范围

1、目测线性法

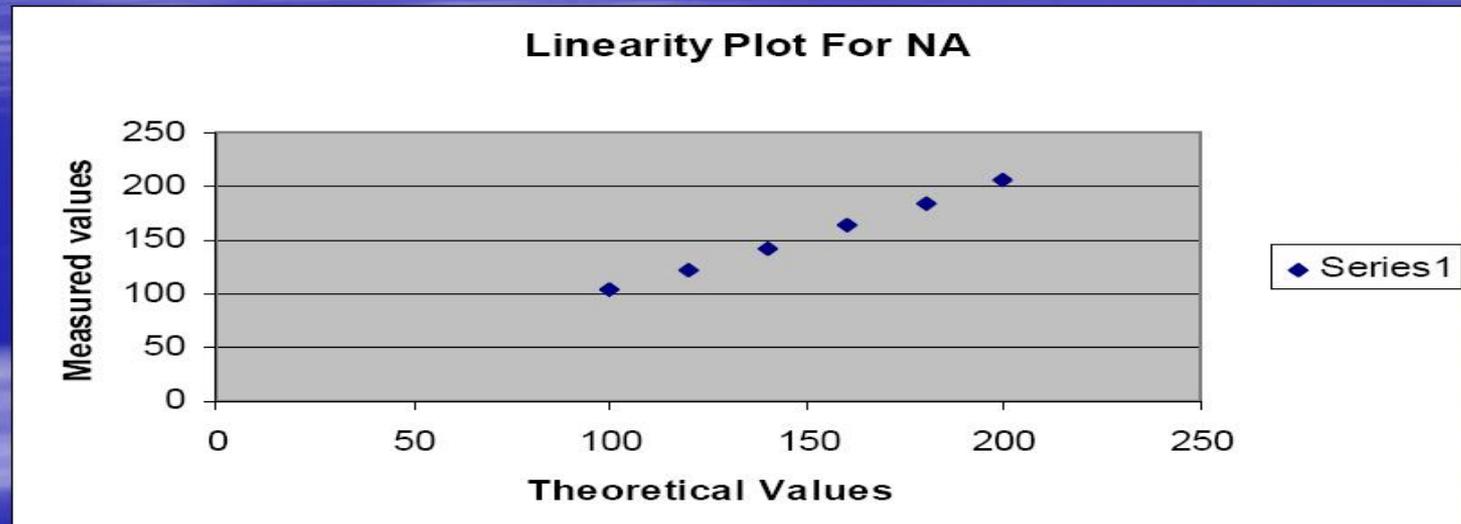
- Analyte: Na CX-5 Analytical Range: 100-200 mmol/L
- Lab Analytical Range: 100- 200 mmol/L

■ Sample Level	Theoretical Value (x)	Measured Value Average (y)
■ M100 L-0/5	100	103.1
■ M100 L-1	120	122.1
■ M100 L-2	140	142
■ M100 L-3	160	164.1
■ M100 L-4	180	184.9
■ M100 L-5	200	205.6



四、可报告范围

Linearity Plot – Example 1



四、可报告范围

2、最小二乘法线性评价方案（回归分析）

拟合的直线方程

$$Y=Bx+A$$



四、可报告范围

进行统计学判断和评价：

- 1、 b （在 1.00 ± 0.03 范围内）， a 近于0，则可直接判断该测定方法可报告范围在实验已涉及浓度。
- 2、若 b 不接近1， a 较大；若 $b < 0.97$ ，或 > 1.03 ，已有可能 b 和1之间有统计上显著性差异。

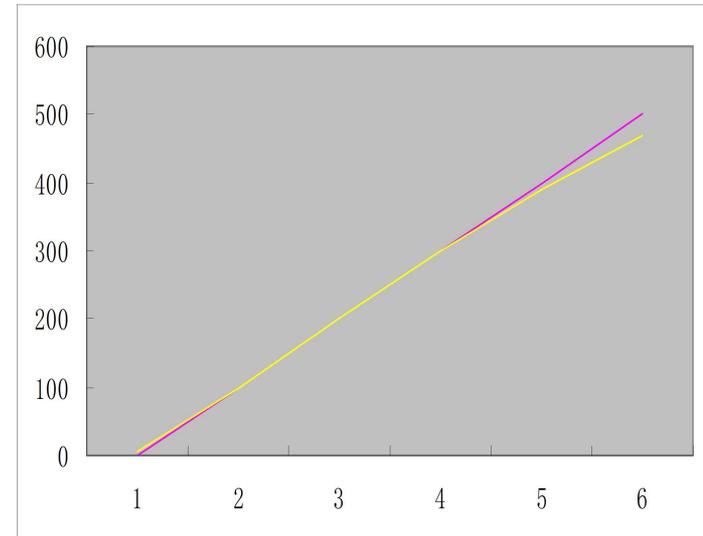
试着舍去某组数据，另作回归统计。若缩小分析范围后，回归式有明显改善， b 近于1， a 趋于0。此时，缩小的分析范围是真实的可报告范围。



四、可报告范围

3、总误差与总允许误差比较

理论值	实测值			均值
0	0	5	10	5
100	95	100	105	100
200	200	195	205	200
300	310	300	290	300
400	380	390	400	390
500	470	460	480	470



四、可报告范围

理论值	均值	偏差	允许CV%	SD	2SD	方法TE= 偏差+2SD	TEA (10%)
0	5	5					
100	100	0					
200	200	0					
300	300	0					
400	390	-10	3	12	24	-34	+/-40
500	470	-30	3	15	30	-60	+/-50

分析测量范围 0-400



四、可报告范围

临床可报告范围 (clinical reportable range, CRR)
指对临床诊断、治疗有意义的待测物浓度范围。此范围如果超出了AMR, 可将样本通过稀释、浓缩等预处理使待测物浓度处于分析测量范围内, 最后结果乘以稀释倍数。



四、可报告范围

	未处理 (线性范围上限)	1/2	1/5	1/10	1/20	1/30
实测值	505	245	98	55	24	19
	500	243	107	52	27	17
	495	256	103	48	26	18
平均值	500	248	102.7	51.7	26	18
理论值	500	250	100	50	25	17
偏差%		-0.8	2.7	3.3	4.0	6.0
回收%		-99	102.7	103.4	104	105.9

1、确定稀释后可靠检测浓度低限

2、CRR上限： $20*500=10000$



四、可报告范围

临床可报告范围具备

- 1、满足质量规范的要求
 - 2、征求临床医生的要求
- 定义分析项目的CRR



五、检测限

检测限（limit of detection）

用于评价检测系统可检测出的最低分析物浓度

检测低限（LLD）

生物检测限（BLD）

功能灵敏度（FS）



五、检测限

检测低限 (lower limit of detection, LLD)

空白样本测定均值加2 (或3) 倍标准差

- 1、描述的是检测结果为“零”时的浓度范围
- 2、95%或99%有分析物 (从无到有)
- 3、报告形式：小于LLD



五、检测限

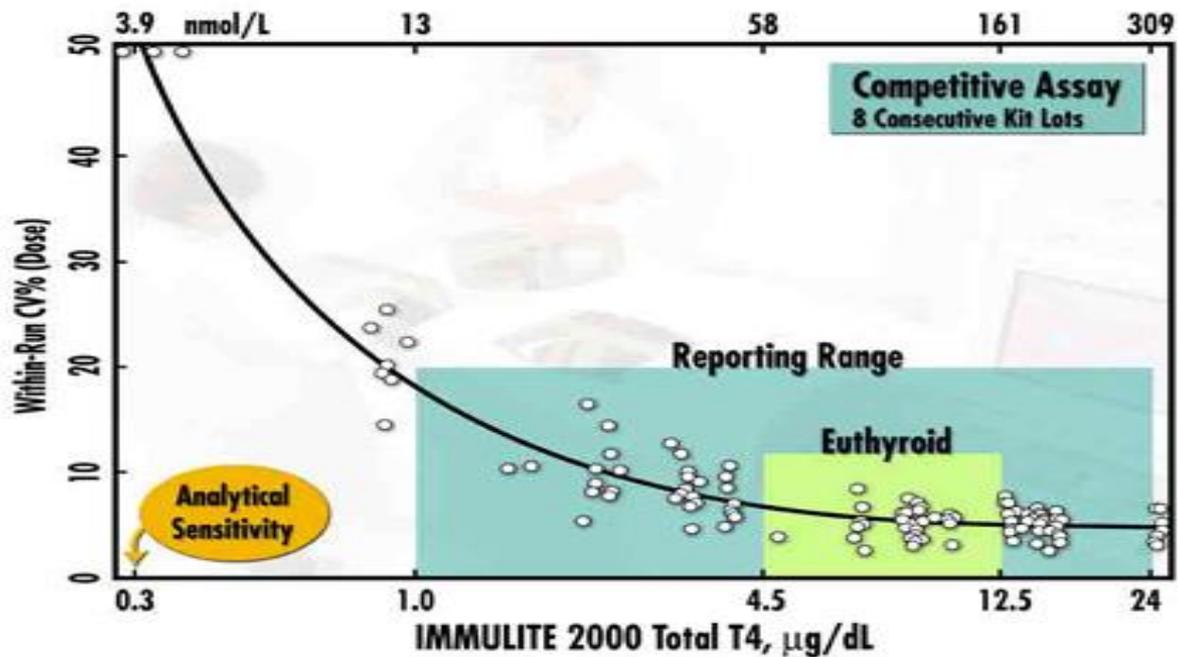
功能灵敏度 (functional sensitivity, FS)

重复测定变异系数为CV 20%的检测限样本浓度，反映了方法能可靠测定的最低浓度（从有到无）

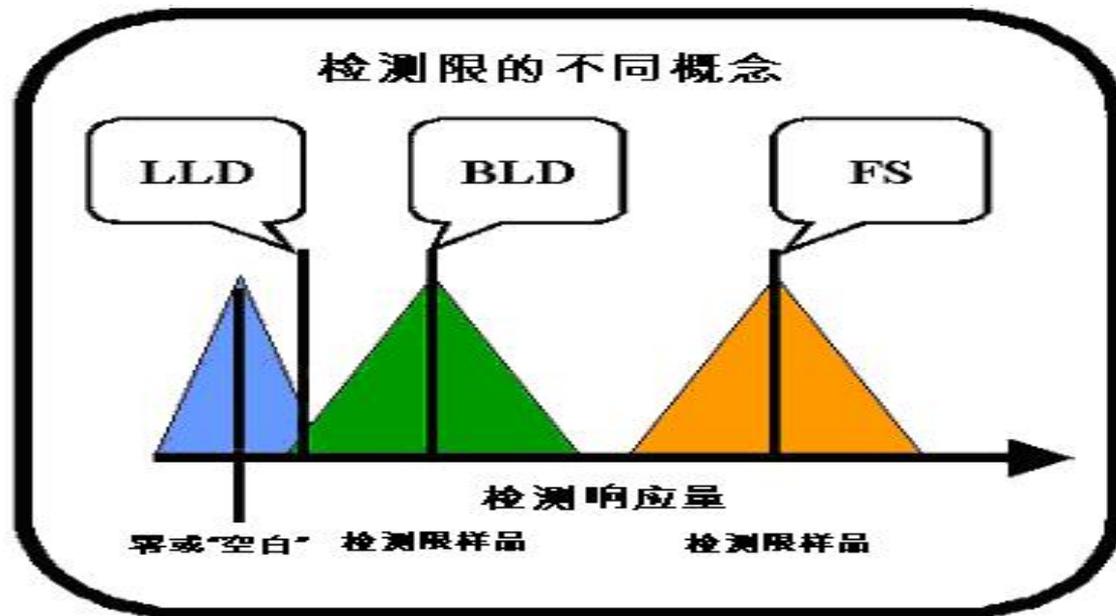


五、检测限

功能灵敏度



五、检测限



六、参考值范围的确认

目的

评价厂家提供的参考值范围是否支持本实验室
测定病人结果的解释

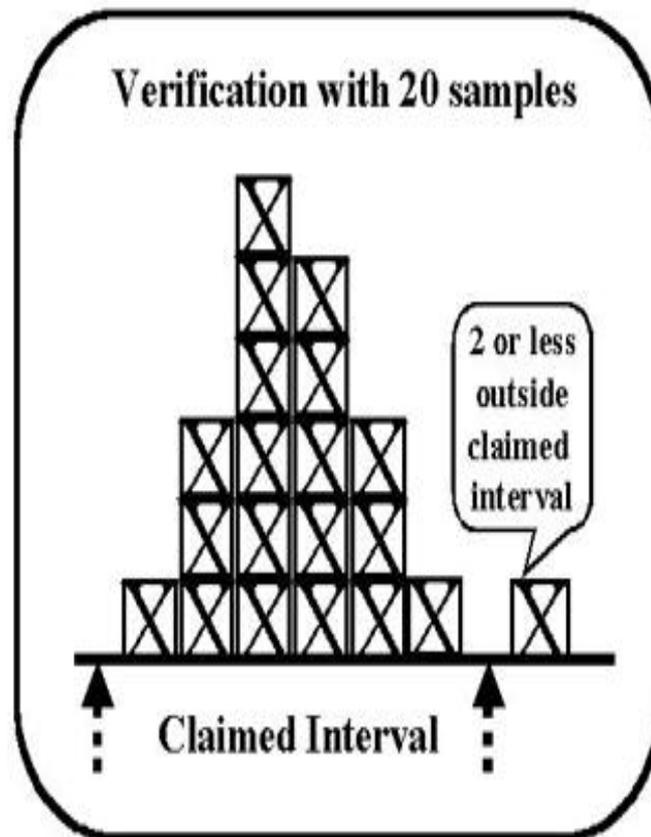
NCCLS C28-A validate the transference of established
reference intervals to the individual laboratory



六、参考值范围的确认

1、证20份样本

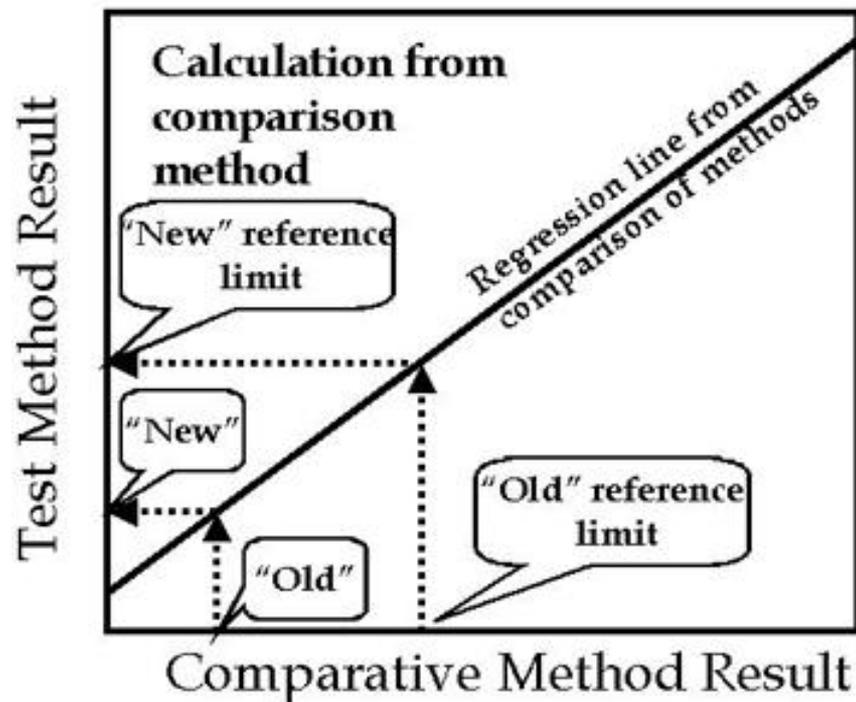
结果判断:20份样本中有2份样本或以内在厂家的参考范围外.



六、参考值范围的确认

2、参考值的转移

通过“试验方法”
与“比较方法”的
关系确定参考值的转移



学习和讨论内容



主管人员：

对方法学确认的
评价实验数据给予
评价并签名。

评价实验数据装
订成册。方便追溯



统计分析工具：

Use available statistical tools.

www.westgard.com/medxcel.html

www.westgard.com/mvtools.html



四川大学华西医院
WEST CHINA HOSPITAL, S.U.





谢 谢

四川大学华西医院
WEST CHINA HOSPITAL, S.U.

www.cd120.com