



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1789.3—2022

体外诊断检验系统 性能评价方法 第3部分：检出限与定量限

In vitro diagnostic test systems—Performance evaluation method—
Part 3: Limit of detection and limit of quantitation

2022-07-01 发布

2024-01-01 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总则	2
4.1 总体要求	2
4.2 检出限与定量限评价概述	3
4.3 样本要求	3
4.4 待评价产品	3
4.5 评价流程	3
5 检出限建立方法	5
5.1 方法一	5
5.2 方法二	7
5.3 方法三	8
6 定量限建立方法	9
6.1 概述	9
6.2 方法一	9
6.3 方法二	9
6.4 其他方法	10
7 检出限与定量限验证方法	10
7.1 检出限验证方法	10
7.2 定量限验证方法	11
7.3 简单验证方法	11
8 结果报告的建议	11
9 示例	12
附录 A (资料性) 利用方法一建立空白限和检出限的案例分析	13
附录 B (资料性) 利用方法二建立检出限的案例分析	17
附录 C (资料性) 利用方法三建立检出限的案例分析	19
附录 D (资料性) 基于精密度要求建立定量限案例分析	20
附录 E (资料性) 基于总误差要求建立定量限案例分析	24
附录 F (资料性) 空白限、检出限声明的验证案例分析	28
附录 G (资料性) 定量限声明的验证案例分析	29
参考文献	31

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 YY/T 1789《体外诊断检验系统 性能评价方法》的第 3 部分，YY/T 1789 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：精密度；
- 第 2 部分：正确度；
- 第 3 部分：检出限与定量限；
- 第 4 部分：线性区间与可报告区间。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会(SAC/TC 136)归口。

本文件起草单位：迪瑞医疗科技股份有限公司、北京市医疗器械检验所、上海市临床检验中心、北京中关村水木医疗科技有限公司、科美诊断技术股份有限公司。

本文件主要起草人：孙雅玲、邹迎曙、王华梁、杨宗兵、林曦阳。

引 言

在对体外诊断医疗器械产品进行性能评价时,体外诊断仪器、试剂、校准品等共同参与,反映的是仪器、试剂、校准品等组成的测量系统的性能,因此 YY/T 1789《体外诊断检验系统 性能评价方法》采用系统的概念进行描述。

分析性能的评价是指对测量系统检测患者样品结果可靠性的估计。体外诊断检验系统的分析性能包括精密度、正确度、准确度、检出限与定量限、线性区间与可报告区间、分析特异性等。YY/T 1789 拟由下列部分构成。

- 第 1 部分:精密度。目的在于给制造商对定量检验的体外诊断检验系统进行的精密度(包括重复性、实验室内精密度、实验室间精密度)性能评价提供方法指导。
- 第 2 部分:正确度。目的在于给制造商对定量检验的体外诊断检验系统进行的正确度性能评价提供方法指导。
- 第 3 部分:检出限与定量限。目的在于给制造商对定量检验的体外诊断系统进行的检出限与定量限性能评价提供方法指导。
- 第 4 部分:线性区间与可报告区间。目的在于给制造商对定量检验的体外诊断检验系统进行的线性区间与可报告区间性能评价提供方法指导。
- 第 5 部分:分析特异性。目的在于给制造商对定量检验的体外诊断检验系统进行的分析特异性性能评价提供方法指导。
- 第 6 部分:定性试剂的精密度、诊断灵敏度和特异性。目的在于给制造商对定性检验的体外诊断检验系统的精密度、诊断灵敏度和特异性、预测值评价等性能评价提供方法指导。

检测方法的下限是评价测量系统质量的一个重要性能指标,该指标在很大程度上体现了测量系统的检测能力。尤其是当分析物在低浓度水平有重要临床意义时,检测方法的下限尤为重要。检出限(LoD)与定量限(LoQ)是评估检测方法下限的指标,空白限(LoB)是建立和验证检出限时的必要指标。LoB 永远小于 LoD,而 LoD 则小于或等于 LoQ。本文件提供了 LoB、LoD 和 LoQ 的建立及验证方法。

体外诊断检验系统 性能评价方法

第3部分：检出限与定量限

1 范围

本文件规定了体外诊断检验系统的检出限与定量限性能评价方法。

本文件适用于制造商对定量测定的体外诊断检验系统进行性能评价。

本文件不适用于结果报告为名义标度和序数标度的体外诊断检验系统的性能评价,例如用于血细胞鉴定、微生物分型、核酸序列鉴定、尿液颗粒鉴定,结果报告为阴性、阳性或1+、2+、3+的体外诊断检验系统。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

YY/T 1441 体外诊断医疗器械性能评估通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

空白限 limit of blank; LoB

空白样本可能观察到的最高测量结果(以规定的概率 α)。

注: LoB也称为“净状态变量的临界值”。

3.2

检出限 detection limit; limit of detection; LoD

由给定测量程序得到的测得量值,对于此值,在给定声称物质中存在某种成分的误判概率为 α 时,声称不存在该成分的误判概率为 β 。

注1: 国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)建议 α 和 β 默认值等于0.05。

注2: 术语“分析灵敏度”有时被用于代表检出限,但这样的用法现在不鼓励。

[来源:GB/T 29791.1—2013, A.3.14]

3.3

定量限 quantitation limit; limit of quantitation; LoQ

在规定的测量条件下以指定的测量不确定度能测量的样本中可被测量的最低量。

注1: 在体外诊断标示中,有时候也被用来指检测下限、定量下限、测量下限。

注2: 不鼓励使用术语“功能灵敏度”表示此概念。

[来源:GB/T 29791.1—2013, A.3.44]

3.4

被测量 measurand

拟测量的量。

注 1：在检验医学中被测量的规定需说明量类（例如质量浓度）、含有该类量的基质（例如血浆）以及涉及的化学实体（例如分析物）。

注 2：被测量可以是生物活性。

注 3：在化学上，“分析物”，或某种物质或化合物的名称，有时被用作“被测量”术语。此用法是错误的，因为这些术语不指代量。

[来源：GB/T 29791.1—2013, 3.39]

3.5

参考量值 reference quantity value

参考值 reference value

用作与同类量值比较的基础的量值。

注 1：参考量值可以是被测量的一个真值，在此情况下它是未知的，或者是一个约定量值，在此情况下它是已知的。

注 2：具有相应测量不确定度的参考量值通常与以下参照一起提供：

- a) 一种物质，例如一个有证参考物质；
- b) 一个装置，例如一个稳频激光器；
- c) 一个参考测量程序；
- d) 测量标准的一种比较。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.50]

3.6

测量偏倚 measurements bias

偏倚 bias

系统测量误差的估计值。

注 1：偏倚反相关于正确度。

注 2：偏倚的估计是一系列测量值的平均值减去参考量值。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.25]

3.7

随机测量误差 random measurement error

随机误差 random error

在重复测量中按不可预见方式变化的测量误差分量。

注 1：随机测量误差参考量值是对同一被测量无穷多次重复测量结果得到的平均值。

注 2：一组重复测量的随机测量误差形成一个可以由其期望值和方差概括的分布，期望值通常被假定为零。

注 3：随机测量误差等于测量误差减去系统测量误差。

[来源：GB/T 29791.1—2013, A.3.48]

3.8

验证 verification

为给定项目满足规定要求提供客观证据。

注 1：给定项目可以是，例如，一个过程、测量程序、物质、化合物或测量系统。

注 2：规定要求可以是，例如，满足制造商声明或技术指标。

注 3：在法定计量中，验证与对测量仪器的检查和标贴和（或）发放验证证书有关。

注 4：验证不应和校准或确认相混淆。

注 5：在化学上，对于物质或活性的特征的验证需描述物质或活性的结构式或特性。

注 6：ISO 9000:2005 的 3.8.4 中验证的定义为：通过提供客观证据，对规定要求已得到满足的认定。

[来源：GB/T 29791.1—2013, 3.73]

4 总则

4.1 总体要求

制造商在对体外诊断医疗器械进行性能评价时，其计划、实施、评价和文件化等相关过程应符合

YY/T 1441 的规定。制造商应规定所有管理和实施体外诊断医疗器械性能评估相关人员的责任和相互关系,并确保具备充足的资源。制造商设计评价方案,并进行测试,做好相关记录,所有文件和记录作为该产品技术文件的一部分。性能评价的负责人应对性能评价结果最终评定和审查,并形成评价报告。

4.2 检出限与定量限评价概述

检出限与定量限评价分为建立及验证,检出限的建立方法应根据具体产品的原理、检测结果差异和分布,选择合适的分析方法和数据统计方法进行计算,分析方法有 3 种。定量限的建立应预先确定准确性目标,满足目标的前提下,可以测量的最低被测量浓度即为定量限。准确性目标要求越严格,定量限可能越大。鉴于定量限定义的灵活性,当报告定量限估计时,要求包括其确定时的准确度目标。准确度目标应以不确定度表示,当不确定度不易获得时,准确度目标优先设定为总误差目标。在某些情况下,如无法在合适的低水平待测物浓度下确定不确定度或总误差目标,可采用其他合理的替代方法建立定量限,例如研究试剂精密度达到固定要求时的最低待测物浓度。

相对于建立方法而言,验证方法相对简单,只需要测定一定份数符合要求的空白样本和低浓度样本,考察检测结果是否满足条件,即可判断空白限、检出限和定量限的设置是否合理。

4.3 样本要求

评价检出限和定量限,依赖于空白样本和低浓度水平样本的测试。宜采用独立和天然人源样本。空白样本代表不含被测量的人源样本,对于空白样本的获得,可直接来源于人源样本,或对人源样本进行技术处理得到。如空白人源样本不易获得,也可以寻找可行替代物,例如样本稀释剂、缓冲液、生理盐水、纯水、蛋白质溶液和类似的基质等。天然低浓度水平人源样本不宜获得,可采用稀释或加标样本以便提供期望的被测量水平的低浓度水平样本。所有替代物样本应在测量过程中与天然人源样本表现相似,可通过线性、回收和/或其他适当的测试予以证明。

按方法一建立检出限时,如采用生理盐水、纯水等替代物作为空白样本,可选择 1 个空白样本,增加重复测试次数,保证每批试剂测试空白样本结果数量 ≥ 60 个。选择低浓度样本,浓度范围在 1 LoB~5 LoB,LoB 的粗略估计可计算为单个空白样本的 20 个重复测量的最大值,如 LoB 值为零,则低浓度水平样本浓度范围按期望值确定。宜将样本分装并冰冻保存($-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -70\text{ }^{\circ}\text{C}$),每次试验前取出以保证稳定性和一致性。

按方法三建立检出限时,应使用至少 3 个独立的阳性人源样本,如可获得,则世界卫生组织(WHO)标准物质或其等效标准物质应作为阳性样本。如果被测量具有遗传变异,则应选择足够的样本来代表主要基因型,特别是在测量程序的使用说明书中具体引用的那些,较不常见或较少临床相关的基因型可通过验证测试使用;阴性样本用于评估测量程序的假阳性率和/或评估 LoB,采用本方法应使用天然人源样本,而不是加工过的样本或人工样本。可使用阴性混合样本,但是应测试至少 30 个特定的阴性样本。

以准确度目标评价定量限时,应已知每个样本的标准值。样本可以为参考物质样本,或通过参考测量程序或其他具有可接受准确度的测量程序测定得到具有标准值的低浓度水平样本及其稀释样本。

4.4 待评价产品

待评价产品一般是体外诊断试剂,该试剂与体外诊断仪器、校准品等组成特定的测量系统,评价时,应对包括待评价产品在内的测量系统的名称、型号、批号等基本信息进行记录并报告。

4.5 评价流程

4.5.1 影响因素分析

分析天、分析批、试剂批号、校准品批号、校准周期、操作者、仪器、实验室等因素均会对测试结果产

生影响。在进行检出限和定量限评价前,可通过文献、类似产品的信息、用户反馈、已有经验、风险分析、调研、预试验数据等途径识别潜在的影响因素,并判断哪些因素会对评价产生较大影响。一般情况下,没有必要对各个影响因素进行单独评估,本文件所采用的平衡嵌套设计将各相关因素整合在一起进行考虑,例如分析天、分析批中包含校准周期、操作者、试验环境等因素。

4.5.2 评价方案设计

检出限的建立,依赖于对低浓度水平样本的测试与建立的空白限的值。而空白限的建立,依赖于对空白样本的测试,由空白样本的结果确定。试验设计为使用仪器在多天使用多个试剂批号对空白样本和低浓度水平样本的重复测量,并满足最少测试结果要求和最小设计要求。例如,对于经典法要求保证每个试剂批号得到至少 60 个空白样本测试结果和 60 个低浓度水平样本测试结果,最小设计要求为:1 个仪器系统、2 个试剂批号、3 个测试日、4 个空白样本、4 个低水平浓度样本(浓度范围为 1 LoB~5 LoB)、每个样本重复测试 2 次(每个试剂批号、仪器系统和测试日的组合)。

定量限的建立,需要根据临床需求和厂家选定的性能规范的允许误差来设定准确度目标,最常见的是设定总误差(TE)目标值,并预先确定预期的定量限的目标浓度,在该浓度下制备多个低浓度水平样本。使用多个试剂批号,一个或多个仪器系统在多天中重复测试样本。根据测量结果计算每个试剂批号的 TE 。如果每个试剂批号的 TE 满足预定目标,则平均浓度报告为测量程序的定量限。要求保证每个试剂批号得到 36 个低浓度水平样本测试结果,并满足最小设计要求:1 个仪器系统、2 个试剂批号、3 个测试日、4 个独立的已知被测量浓度的低浓度水平样本、每个样本重复测试 3 次(每个试剂批号、仪器系统和天的组合)。

上述最小设计均不能满足每个试剂批号测试结果的总数要求,可通过添加更多设计因素(例如校准品批、校准循环、操作者)和/或增加重复次数以提供足够数量的测量结果,增加哪些因素的选择取决于特定的测量程序、用于测试的可用资源和具体的严格性要求。

4.5.3 试验注意事项

检出限与定量限评价试验前,研究者应能正确、熟练操作待评价的产品,以及相关的仪器设备、校准程序、质控程序、维护程序等。评价试验的整个过程中,应保证仪器设备稳定运行,依照待评价产品的使用说明中的校准频率进行校准,并运行质控程序,一旦待评价产品出现失控,应重新测定。准备完成设计测试所需要足够的试剂量和样本份数,并保证每份样本量充足,足够按设计需求等分试样,并能提供额外等分试样以备可能的测试错误或处理故障。

试验过程中应实时检查数据的完整性和有效性。如果因质控原因或其他已识别和确认出的错误来源,影响到数据的真实性时,则剔除错误数据,并及时重复测试以补充数据。若剔除数据较多时,应考虑测量系统性能的稳定性及此时进行性能评价的适宜性。

4.5.4 数据分析

检出限与定量限建立试验,有两条数据分析的路径。第一条路径用于使用 2 个或 3 个试剂批号的研究,则对每个试剂批号的数据独立计算得到每个试剂批号的检出限或定量限值,并选择最大值作为测量程序的报告检出限或定量限值;第二条路径用于使用 4 个或更多个试剂批号的研究,则对组合数据集计算得到组合数据的检出限或定量限值,作为测量程序的报告检出限或定量限值。值得注意的是仅有 2 个或 3 个试剂批号的研究可能会受到显著的试剂批号间变异性的影响。这种预期变异性在使用 4 个或更多个试剂批号时会得以减弱。在数据统计分析中,如果试剂批间或样本间检测结果变异性过大,应首先查明原因,进而决定是否采用其他试验方法重新进行评价。

4.5.5 结果报告

性能评价的负责人应撰写评价报告。评价报告中应包含检出限与定量限评价的方案、数据和评价结果。

5 检出限建立方法

5.1 方法一

5.1.1 试验

使用方法一评价检出限(LoD),依赖于对低浓度水平样本的测试与已经建立的空白限(LoB)的值。本文件推荐采用同时对一组空白样本和一组低浓度水平样本进行测量,选择参数或非参数数据统计分析,评价检出限。

推荐的试验模型为:采用1个仪器系统、2个试剂批、3个测试日、5个空白样本、5个低浓度水平样本(不同浓度)、每个样本进行4次重复测量,满足每个试剂批号的空白样本与所有低浓度水平样本测试结果数量 ≥ 60 个。依据试验设计,制定测试计划,每个测试日,根据测试计划进行每个样本的指定数量的重复测试。

注:本文件中所有试验均可采用其他模型,如当样本的稳定性较差,不能实现多天重复测试时,可不考虑最小设计要求中测试天数的要求,减少测试天数,增加每日重复测试数量,保证最终测试结果数量即可。

5.1.2 数据检查

每个分析批结束时,检查测量结果,以便发现可能的处理错误或结果缺失。识别潜在离群值并分析可能的离群原因(例如样本不足、仪器处理错误、样本识别混淆)。除了测量程序本身的分析误差之外,由上述可能的离群原因引起的异常值可重新测试并代入数据,尽量在同一日完成重新测试。任何此类重新测试应与原始测试结果一起记录。如果任何一个试剂批号的所有样本结果中存在5个以上确定原因的异常值,则需要重新测试。确保在测试结束时有足够的测量结果进行数据分析。最终测试结果可通过格拉布斯(Grubbs)检验统计离群值,允许剔除1个离群值,否则应重新测定。

5.1.3 数据分析

5.1.3.1 空白限计算

5.1.3.1.1 正态分布判定

对测试结果进行统计学分析,判断测试结果是否为正态分布,进而确定使用参数分析法或非参数分析法计算空白限。可利用商业软件进行正态分布判定。

5.1.3.1.2 参数分析法计算空白限

若数据呈正态分布,适用参数分析法计算空白限,按式(1)和式(2)计算。

$$\text{LoB} = \bar{X} + kSD_K \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$k = \frac{1.645}{1 - \left[\frac{1}{4(n - N)} \right]} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

LoB ——空白限；

$\bar{X}$ ——空白样本测试结果的均值；

k ——正态分布的第 95 百分位数的乘数(1.645 表示从 $\alpha=0.05$ 的正态分布的第 95 百分位数。
如果选择不同的 α 值作为 LoB 估计的基础,则该乘数将需要相应地改变)；

SD_K ——空白样本测试结果的标准差；

n ——空白样本的测试次数；

N ——空白样本的数量；

$n-N$ ——估计的 SD_K 的自由度。

5.1.3.1.3 非参数分析法计算空白限

若数据呈非正态分布,适用非参数分析法计算空白限,采用非参数分析法计算空白限,方法如下:将数据按大小升序排列; $X_{(1)}, X_{(2)}, \dots, X_{(i)}$,依据排列好的数据估计 p 百分位数所在位置的值,如果这个值为非整数则进行线性插入。 p 百分位数按式(3)计算。

$$RP = N(p/100) + 0.5 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

RP ——排位；

N ——测试结果的个数；

p ——合适的百分位数,通常为 95。

示例: $N=40$,95 百分位数为 38.5,则 $LoB = X_{(38)} + 0.5[X_{(39)} - X_{(38)}]$;如 $N=45$,95 百分位数为 43.25,则 $LoB = X_{(43)} + 0.25[X_{(44)} - X_{(43)}]$ 。

5.1.3.2 检出限计算

首先对低浓度水平样本测试结果进行统计学分析,判断其是否为正态分布,同时开展方差齐性检验。若低浓度水平样本的测试结果呈正态分布且方差齐,则按参数分析法计算检出限。具体方法:由多个低浓度水平样本的测试结果计算出合并标准差 SD_Z 。多个低浓度水平样本的合并标准差按式(4)~式(6)计算。

$$SD_Z = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (n_i - 1) SD_i^2}{\sum_{i=1}^N (n_i - 1)}} \dots\dots\dots (4)$$

$$k = \frac{1.645}{1 - \left[\frac{1}{4(L - N)} \right]} \dots\dots\dots (5)$$

$$LOD = LOB + kSD_Z \dots\dots\dots (6)$$

式中：

SD_Z —— N 个低浓度水平样本的合并标准差；

n_i ——第 i 个低浓度水平样本的结果数；

SD_i ——第 i 个低浓度水平样本的标准差；

k ——正态分布的第 95 百分位数的乘数(1.645 为 $\beta=0.05$ 时,正态分布的第 95 百分位数的界值,如果 β 改变,该数值随之变动)；

N ——低浓度水平样本的数量；

L ——所有试剂批号中所有低浓度水平样本结果的总数；

$L-N$ ——估计的 SD_Z 的自由度。

若低浓度水平样本的测试结果呈非正态分布,可将数据转化成其他形式(例如对数形式)再进行统计分析。如果转化后的数据也呈现非正态分布,则使用非参数分析计算法检出限。具体方法为将各批号试剂低水平样本检测结果分别统计并排序,如果满足低于 LoB 值的结果的百分比小于期望的Ⅱ类错误(β),则该试剂批的 LoD 即为低水平样本检测结果分布的中位数。例如,典型的 $\beta=0.05$ 类型Ⅱ错误要求意味着不超过 5%的低水平样本分布结果低于 LoB。如果一个或多个试剂批号的结果不能满足Ⅱ型错误要求,则使用新一组较高的测量浓度的低水平样本重复该研究。不需要重复研究的 LoB 部分,直到每个试剂批号分布均满足Ⅱ型错误要求。其中,Ⅱ型错误(β)是指当实际上物质存在预指定水平,错误地接受其不存在的零假设的概率,即假阴性结果。与之相关的Ⅰ类错误(α)是指当一个物质存在时,错误地拒绝其不存在的零假设的概率,即假阳性结果。 α 和 β 默认值等于 0.05。

5.2 方法二

5.2.1 试验

当假定检出限(LoD)附近的变异很大,或者临床实验室未对 LoD 进行明确估计,期望获得更宽测量浓度范围的情形时,使用精密度特征曲线来建立 LoD。

推荐的试验模型为:1 个仪器系统、2 个试剂批、5 个测试日、5 个低浓度水平样本、每个样本每个试剂批每天重复测试 8 次,满足了每个样本每个试剂批号测试结果数量为 40 个。之后进行试验前准备,依据试验方案开始试验测试,测试实施过程中检测测量结果。

5.2.2 数据检查

同 5.1.2。

5.2.3 数据分析

5.2.3.1 建立精密度特征曲线

计算各样本每个试剂批号的测量平均浓度及 SD (或 CV),以每个试剂批号的 SD (或 CV)为 Y 轴,测量浓度为 X 轴,建立室内精密度分布图。

使用精密度曲线法成功在很大程度上取决于用于拟合精密度与浓度数据的特定模型以及模型的拟合质量。合适模式的选择与所测试的样本测量浓度范围有着很紧密的关系。广泛使用的是线性模型,如式(7),二次模型,如式(8),以及 Sadler 精密度特征曲线模型,如式(9)。

$$SD_s = C_0 + C_1 X \quad \dots\dots\dots (7)$$

$$SD_s = V_0 + V_1 X + V_2 X^2 \quad \dots\dots\dots (8)$$

$$SD_s = (B_1 + B_2 X)^{B_3} \quad \dots\dots\dots (9)$$

式中:

SD_s ——实验室内精密度;

X ——相关被测量浓度;

$C_0, C_1, V_0, V_1, V_2, B_1, B_2, B_3$ ——模型拟合处理中评估的参数。

5.2.3.2 评价精密度曲线模型拟合的可接受性

使用合适的模型拟合精密度曲线,并确定适当的接受标准,以评估拟合质量。如果模型拟合结果为不可接受,考虑以不同的形式表示精密度(例如方差、 SD 或 CV),并重新拟合模型,要确保 LoD 一定要包含在最终数据范围内。

5.2.3.3 计算 LoD 估计值

从 LoB 测量值浓度开始(因为根据定义, LoD 不能小于 LoB), 通过精密度模型计算预测的实验室内精密度(SD_s), 并使用它来计算 LoD 估计值。如果精密度曲线模型使用 CV 作为变量, 则需要将 CV 值转换为相应的 SD_s 值, 并依据式(10)、式(11)计算 LoD。

$$LoD = LoB + kSD_s \quad \dots\dots\dots (10)$$

$$k = \frac{1.645}{1 - \left[\frac{1}{4(M - N)} \right]} \quad \dots\dots\dots (11)$$

式中:

SD_s ——实验室内精密度;

M —— N 个低浓度水平样本的测试结果的总数;

k ——正态分布的第 95 百分位数的乘数(1.645 为 $\beta=0.05$ 时, 正态分布的第 95 百分位数的界值, 如果 β 改变, 该数值随之变动)。

5.2.3.4 确定每批试剂或多批试剂组合数据的 LoD 值

以 LoB 值为初始测量浓度, 作为 X 代入精密度曲线模型, 计算 SD_s 和相关的 LoD 估计值, 逐渐增加测量浓度, 重复该过程, 直到得到一个与拟合的 LoD 估计值相等的测量浓度, 此值作为数据集的 LoD。

5.3 方法三

5.3.1 试验

方法三 LoB 与 LoD 的建立可以平行或顺序进行, LoB 值的确定有两种情况, 第一种定义为零并且通过测试多个阴性人源样本确认(假阳性结果的百分比不超过规定要求, 每个试剂批号应单独确认); 第二种使用多个阴性人源样本的方法确定。

推荐的试验模型为: 2 个试剂批号、1 个仪器系统、3 个测试日、已知被测量含量的 3 个独立阳性样本、30 个独立阴性样本、每个阳性样本稀释 5 个浓度梯度、每天每个试剂批号每个稀释梯度的阳性样本重复测试 20 次、每个试剂批号每个阴性样本 2 次重复。依据试验设计, 制定测试计划。

注: 可用单个样本进行初步测试以判断稀释比和稀释梯度数量。稀释系列应当使得至少三种稀释产生在 0.10~0.90 范围内的命中率, 并且至少一种稀释产生超过 0.95 的命中率。适当的增加稀释的数量可用于改善模型的质量。

5.3.2 数据检查

同 5.1.2。

5.3.3 数据分析

独立分析每个试剂批号的所有阳性样本的数据, 具体步骤如下:

按式(12)计算每个稀释度的命中率 H_i 。

$$H_i = \frac{N_Y}{N_Z} \quad \dots\dots\dots (12)$$

式中:

i ——第 i 个稀释度;

N_Y ——存在被测量作为阳性结果重复报告的数量;

N_Z ——第 i 个稀释度重复测试总数。

以被测量浓度作为 X 轴变量,命中率作为 Y 轴变量,绘制概率单位曲线,进行概率拟合。通常在 X 轴上使用 $\lg$ 浓度会改善概率拟合质量。使用合适的统计学检验来评价概率单位模型的拟合质量(例如偏差统计或卡方检验),判断模型拟合是否可接受。如模型拟合可接受,通过曲线找到预期命中率下的分析物浓度,将该值作为特定试剂批的 LoD 。如果拟合度不可接受,通过测试另外的稀释度和/或重复测试现有稀释度,如果可以,可将这些结果和现有数据合并使用,可能可以提高拟合的质量。

6 定量限建立方法

6.1 概述

定量限(LoQ)是指能够准确检测到的样本中被测量的最小实际量,其应满足实验室对准确度的要求。定量限可等于或高于检出限,但不能低于检出限。如果测量值的不确定度(或总误差)偏低,则没有必要对每一种方法都测定定量限。在这些情况下,可以适合地报告每一个低水平结果的估计不确定度,并允许用户指出是否适用。 LoQ 优选根据总误差目标或偏倚目标来定义。

6.2 方法一

根据临床需求和室间质量评价的允许误差设定总误差目标值($TE_{\text{目标值}}$)。利用式(13)或式(14)计算建立试验中每个试剂批号每个低浓度水平样本测试结果的总误差(TE)。

韦斯特加德模型(Westgard model):

$$TE = |B| + 2SD \quad \dots\dots\dots (13)$$

均方根模型(RMS model):

$$TE = \sqrt{SD^2 + B^2} \quad \dots\dots\dots (14)$$

式中:

TE ——总误差;

B ——偏倚,即测试结果均值减去参考值之间测值差异;

SD ——每个试剂批号每个低浓度水平样本的标准差。

利用方法一评价定量限,应已知每个用于评价检出限的低浓度水平样本的标准值。利用 5.1 方法评价出检出限后,计算每个样本测值与标准值的 TE ,如果计算所得 $TE \leq TE_{\text{目标值}}$,则 $LoQ = LoD$;反之,由方法二确定新的定量限。

注 1: 低浓度水平样本可以为参考物质样本,或通过参考测量程序或其他具有可接受准确度的测量程序测定得到的低浓度水平样本。

注 2: 参考物质样本为选择法定或商业化的参考物质。如果没有所需低浓度的商业化或法定的参考物质,可以在确定低浓度范围呈线性后,选择加入参考物质或适当的稀释已知浓度的样本来制备所需参考物质样本。

注 3: 当没有可比较的参考方法或参考物质时,分析偏倚可忽略,此时总误差等于 $2SD_s$ 。

注 4: 当 B 为相对偏倚时,式(13)可以表示为 $TE(\%) = |B| + 2CV$,在不考虑分析偏倚的条件下,总误差等于 $2CV$ 。

注 5: 如果需要更高的概率,则通过更大的因子来增加 SD_s 。例如,置信度为 99.5%,测试结果呈正态分布, $TE = |B| + 4SD$ 或 $TE = |B| + 4CV$ 。

6.3 方法二

6.3.1 试验

根据临床需求和室间质量评价的允许误差设定总误差目标值($TE_{\text{目标值}}$)。并预先确定预期的定量限(LoQ)的目标浓度,在该浓度下制备多个低浓度水平样本。使用多个试剂批号,一个或多个仪器系统在多天中重复测试样本,推荐的试验模型为:1 个仪器系统、2 个试剂批号、3 个测试日、每个样本重复测

试 3 次(每个试剂批号、仪器系统和天的组合)、4 个独立的已知被测量浓度的低浓度水平样本。要求保证每个试剂批号得到 36 个低浓度水平样本测试结果,制定每日测试计划,每个测试日根据测试计划进行每个样本的指定数目的重复测试。根据测量结果计算每个试剂批号的总误差(TE)。如果每个试剂批号的 TE 满足预定目标,则平均浓度报告为测量程序的 LoQ 。

6.3.2 数据检查

同 5.1.2。

6.3.3 数据分析

计算给定试剂批号的所有重复样本中每个低浓度水平样本的平均值和 SD ,并依据标准值计算每个低浓度水平样本的偏倚。根据式(13)或式(14)计算每个样本的 TE 。如果需要,根据样本的标准值转换为百分数(%)。与 $TE_{\text{目标值}}$ 进行比较,满足 $TE < TE_{\text{目标值}}$ 的最低浓度的样本被作为该批号的定量限值。所有批号的最大定量限被作为测量程序的定量限。

6.4 其他方法

6.4.1 概述

除上述方法一和方法二建立定量限外,还可以使用精密度曲线法来建立定量限值。此方法中可接受的准确度目标仅基于精密度要求。具体方法介绍如下。

6.4.2 样本选择

获得 9 个血清标本,其浓度应覆盖测量范围的下限区域,根据临床经验,9 个样本,最低值选在 LoD 附近,高值为 6 倍~7 倍 LoD ,期间 7 个点大致依据等浓度点排列。

6.4.3 试验

推荐的试验模型为:1 个仪器系统、2 个试剂批、5 个测试日、9 个低浓度水平样本、每个样本每个试剂批每天重复测试 8 次,满足了每个样本每个试剂批号测试结果数量为 40 个。之后进行试验前准备,依据试验方案开始试验测试,测试实施过程中检测测量结果。

6.4.4 数据检查

同 5.1.2。

6.4.5 数据分析

采用统计学软件,计算各样本每个试剂批号的测量平均浓度及 SD (或 CV),以每个试剂批号的 SD (或 CV)为 Y 轴,测量浓度为 X 轴,建立室内精密度分布图。开展函数回归分析,结合数据组特点,选择适合的函数(一般幂函数居多),将允许误差(允许不精密度)作为 Y 代入方程,反求 X 结果,即为该批号 LoQ ,两批号取最大值作为 LoQ 。

7 检出限与定量限验证方法

7.1 检出限验证方法

在验证 LoD 值之前,需要首先验证 LoB 值的准确。推荐的方案是:1 个试剂批、1 个仪器系统、3 个测试日、2 个空白样本、2 个检出限浓度样本、每个样本进行 4 次重复测量。

计算空白样本测试结果中小于或等于 LoB 声明的结果占总数的百分比。与表 1 中的下限值进行比较。如果百分比大于或等于表 1 的值,则认为空白限验证成功;如果百分比小于表 1 的值,则空白限验证不成功。

计算检出限浓度样本测试结果中大于或等于 LoB 声明的结果占总数的百分比。与表 1 中的下限值进行比较。如果百分比大于或等于表 1 的值,则认为检出限验证成功;如果百分比小于表 1 的值,则检出限验证不成功。

表 1 检测能力声明结果的 95%置信下限表

测量总数 N	观测比例下限/%	测量总数 N	观测比例下限/%
20	85	100	90
30	87	150	91
40	88	200	92
50	88	250	92
60	88	300	92
70	89	400	93
80	89	500	93
90	90	1 000	94

7.2 定量限验证方法

推荐的方案是:1 个试剂批、1 个仪器系统、3 个测试日、5 个定量限浓度样本、每个样本进行 3 次重复测量,测量结果数量为 45 个(3 天 $\times$ 5 个样本 $\times$ 3 次重复)。对于每个样本,计算其目标值的允许误差范围。

计算每个样本的测试结果落在允许误差范围内的个数,从而计算满足 LoQ 声明的可接受目标标准的所有样本测量结果的百分比,与表 1 中的下限值进行比较。如果百分比大于或等于表 1 的值,则认为验证成功;如果百分比小于表 1 的值,则验证不成功。

7.3 简单验证方法

为方便验证操作,简单验证时不考虑日间影响,对 5 份浓度近似检出限的低值样本进行检测,每份样本检测 5 次,对检测结果按大小进行排序,符合低于制造商提供的空白限数值的检测结果的数量应小于或等于 3 个,即可认为制造商提供的空白限和检出限的设置基本合理。

对 5 份浓度近似定量限的已知浓度低值样本进行检测,每份样本检测 5 次,得到 25 个重复结果,如检测结果符合每个样本的测试结果落在允许误差范围外的个数小于或等于 3 个,即可认为制造商提供的定量限的设置基本合理。

8 结果报告的建议

如果测试结果在空白限与定量限之间,可用于判定分析物存在,但测量结果不应用于临床解释。测量结果在检出限与定量限之间,可以报告,但要说明有较高的不确定性。

宜依据表 2 向客户报告测量结果。

表 2 测量结果报告

测试结果 X	报告结果
$X \leq \text{LoB}$	报告“未检出”
$\text{LoB} < X < \text{LoD}$	报告“物质存在,不能被定量”
$\text{LoD} \leq X < \text{LoQ}$	报告“物质存在,不能被定量,测试结果 $< \text{LoQ}$ ”或报告定量结果,并注明不确定度较高
$X \geq \text{LoQ}$	报告“定量结果”

9 示例

检出限与定量限评价的示例见附录 A~附录 G。

附录 A

(资料性)

利用方法一建立空白限和检出限的案例分析

本案例来自胃泌素释放肽前体(ProGRP)化学发光测量程序的检测能力研究,使用经典法方案来评价空白限(LoB)和检测限(LoD)。默认 $\alpha=\beta=0.05$ 。

设计方案为:

- 1 个仪器系统;
- 2 个试剂批(1 和 2);
- 3 个测试日;
- 5 个空白样本、5 个低浓度水平样本;
- 每个样本进行 4 次重复测量。

这样就满足了每个试剂批号的空白样本和低浓度水平样本测试结果数量各为 60 个(3 天 $\times$ 5 个样本 $\times$ 4 次重复)。表 A.1 和表 A.2 列出了两个试剂批号观察到的空白样本结果,表 A.3 和表 A.4 列出了两个试剂批号观察到的低浓度水平样本的结果。

表 A.1 试剂批号 1 的空白样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	测试次数	空白样本 1	空白样本 2	空白样本 3	空白样本 4	空白样本 5
1	1	0.11	-0.02	0.14	-0.04	0.04
	2	0.02	0.00	0.35	-0.02	0.04
	3	0.12	0.03	0.07	-0.02	-0.12
	4	0.11	-0.02	0.24	-0.03	0.01
2	1	-0.04	-0.10	-0.01	-0.03	-0.06
	2	-0.05	-0.03	-0.08	-0.05	-0.04
	3	0.08	-0.01	-0.12	0.26	-0.12
	4	0.25	0.10	-0.15	-0.05	0.15
3	1	-0.07	0.16	-0.03	0.00	0.11
	2	-0.10	0.01	-0.08	-0.11	-0.09
	3	-0.09	-0.08	0.03	-0.03	-0.14
	4	-0.01	-0.10	-0.07	-0.07	-0.09

表 A.2 试剂批号 2 的空白样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	测试次数	空白样本 1	空白样本 2	空白样本 3	空白样本 4	空白样本 5
1	1	-0.01	-0.10	-0.02	-0.04	-0.04
	2	-0.04	-0.02	-0.09	-0.07	-0.02
	3	0.11	-0.03	-0.10	0.27	-0.09
	4	0.27	0.10	-0.16	-0.02	0.14

表 A.2 试剂批号 2 的空白样本测试结果 (续)

单位:pg/mL

测试天数	测试次数	空白样本 1	空白样本 2	空白样本 3	空白样本 4	空白样本 5
2	1	0.06	0.07	—0.03	0.11	—0.06
	2	0.05	0.03	0.03	0.36	0.00
	3	—0.13	0.13	0.01	0.07	—0.02
	4	0.03	0.10	0.00	0.23	—0.05
3	1	—0.05	0.14	—0.05	—0.01	0.12
	2	—0.07	0.00	—0.11	—0.11	—0.07
	3	—0.10	—0.09	0.02	—0.03	—0.15
	4	0.00	—0.09	—0.09	—0.05	—0.10

表 A.3 试剂批号 1 的低浓度样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	测试次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
1	1	0.38	0.71	1.21	1.38	1.82
	2	0.35	0.70	1.05	1.50	1.90
	3	0.44	0.72	1.20	1.32	2.01
	4	0.38	0.77	1.06	1.33	1.83
2	1	0.32	0.75	1.13	1.40	1.94
	2	0.39	0.72	1.19	1.40	1.86
	3	0.43	0.77	1.01	1.50	1.93
	4	0.43	0.77	1.08	1.46	1.80
3	1	0.35	0.79	1.02	1.33	1.85
	2	0.34	0.78	1.07	1.37	1.75
	3	0.42	0.69	1.20	1.34	1.68
	4	0.41	0.70	1.04	1.34	1.91

表 A.4 试剂批号 2 的低浓度样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	测试次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
1	1	0.37	0.77	1.04	1.32	1.89
	2	0.32	0.66	1.05	1.39	1.68
	3	0.34	0.75	1.20	1.29	1.74
	4	0.41	0.75	1.10	1.46	1.74

表 A.4 试剂批号 2 的低浓度样本测试结果 (续)

单位: pg/mL

测试天数	测试次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
2	1	0.33	0.67	1.18	1.29	1.77
	2	0.35	0.69	1.01	1.38	1.77
	3	0.34	0.71	1.02	1.41	1.73
	4	0.42	0.78	1.18	1.51	1.89
3	1	0.32	0.66	1.14	1.51	1.89
	2	0.35	0.71	1.19	1.43	1.62
	3	0.36	0.78	1.15	1.31	1.67
	4	0.32	0.79	1.12	1.41	1.95

应对测试数据进行正态分布检验,依据 5.1.3 中规定计算空白限和检出限,但为了更好地理解和掌握标准中的所有计算方法,先不考虑数据分布影响。首先采用非参数法评估空白限(LoB),采用参数方法评价检出限(LoD);之后再采用参数方法评估空白限(LoB),采用非参数方法评价检出限(LoD)。

因为使用两个试剂批号进行评估,分别评估每个批号的 LoB 估计值和 LoD 估计值。选择较大者作为测量程序的 LoB 和 LoD。

以下采用非参数法评估 LoB 估计值,采用参数法评估 LoD 估计值。

非参数法评估 LoB 估计值:对于给定的试剂批号,将 5 个空白样本的测试结果组合,按从低到高排序。使用典型的 I 型误差风险 $\alpha=0.05$,相应的百分位数 $P=1-\alpha=0.95$,计算秩序 $RP=60 \times (95 \div 100) + 0.5 = 0.5 + (60 \times 0.95) = 57.5$,通过线性插入法得出试剂批号 1 和试剂批号 2 的空白限分别为 0.24 pg/mL 和 0.25 pg/mL,选择较大者作为测量程序的 LoB。

表 A.5 秩序和从空白样本测试结果秩序位置得到的 LoB

单位: pg/mL

秩序	测值(试剂批号 1)	测值(试剂批号 2)
56	0.16	0.14
57	0.24	0.23
58	0.25	0.27
59	0.26	0.27
60	0.35	0.36
LoB	0.24	0.25

综上所述,ProGRP 项目的空白限为 0.25 pg/mL。

参数法评估 LoD 估计值:对于给定的试剂批号,将 5 个低浓度水平样本的测试结果组合,按照式(1)计算,得到两个试剂批号的 LoD 分别为 0.35 pg/mL 和 0.36 pg/mL,选择较大者作为测量程序的 LoD。

表 A.6 从低浓度样本测试结果的 SD_z 和 LoD 计算

单位:pg/mL

低浓度样本	试剂批号 1		试剂批号 2	
	n	SD_i	n	SD_i
样本 1	12	0.040	12	0.037
样本 2	12	0.036	12	0.046
样本 3	12	0.076	12	0.079
样本 4	12	0.065	12	0.079
样本 5	12	0.090	12	0.076
SD_z	0.065		0.066	
K	1.653		1.653	
LoD	0.35		0.36	

综上所述,ProGRP 项目的检出限为 0.36pg/mL。

以下采用参数法评估 LoB 估计值,采用非参数法评估 LoD 估计值。

参数法评估 LoB 估计值:独立地对每个试剂批的所有空白结果计算出平均值和 SD_K 。依据式(2)计算得到 $k=1.653$ (来自 $n=60$ 和 $N=5$),依据式(1)分别计算得到试剂批号 1 和试剂批号 2 的 LoB 估计值为 0.174 pg/mL 和 0.176 pg/mL,其中较大值(0.176 pg/mL)为测量程序的 LoB。见表 A.7。

表 A.7 LoB 使用参数数据分析选项计算

单位:pg/mL

参数	试剂批号 1	试剂批号 2
$\bar{X}$	0.000	0.001
SD_K	0.105 1	0.105 9
k	1.653	1.653
LoB	0.174	0.176

非参数法评估 LoD 估计值:分别计算得到试剂批号 1 和试剂批号 2 的 LoD 估计值为 1.075 pg/mL 和 1.130 pg/mL,其中较大值(1.130 pg/mL)为测量程序的 LoD。见表 A.8。

表 A.8 LoD 使用非参数数据分析选项计算

单位:pg/mL

参数	试剂批号 1	试剂批号 2
中位数	1.075	1.130
小于 LOB 的结果比例	0.00%	0.00%
LoD	1.075	1.130

附录 B

(资料性)

利用方法二建立检出限的案例分析

本案例来自肌红蛋白(MYO)测定试剂盒(免疫比浊)研究,因为初始精密度测试结果显示重复性随着测量浓度的增加而变化,所以使用精确曲线方案来评估检测限(LoD)。

制备 5 个空白样本,使用 2 批试剂在 3 个工作日内的经典法设计来测试这些样本,每个样本每批试剂每天重复 4 次。通过非参数选项分析结果,得到空白限(LoB)估计值为 2.83 ng/mL。

精密度曲线法建立 LoD 的设计方案为:

- 1 个仪器系统;
- 2 个试剂批(1 和 2);
- 5 个测试日;
- 5 个低浓度水平样本;
- 每个样本进行 8 次重复测量。

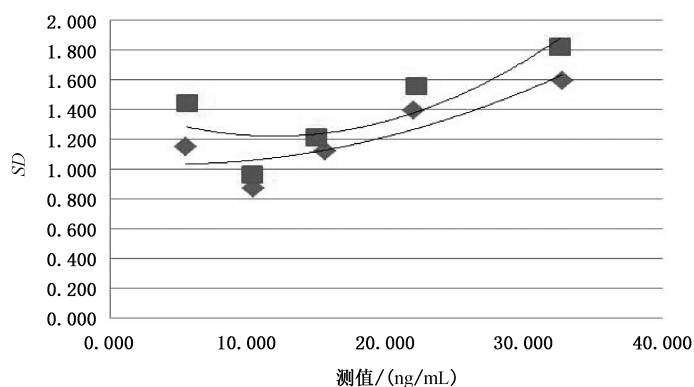
这样就满足了每个低浓度水平样本每批试剂测试结果数量为 40 个。表 B.1 列出了 2 批试剂测试低浓度水平样本的统计结果。

表 B.1 所有样本观察的精密度和平均浓度

单位:ng/mL

样本编号	试剂批号 1		试剂批号 2	
	平均值	SD_i	平均值	SD_i
样本 1	5.460	1.148	5.553	1.440
样本 2	10.330	0.869	10.308	0.965
样本 3	15.568	1.118	14.965	1.215
样本 4	22.020	1.395	22.173	1.560
样本 5	32.710	1.591	32.588	1.822

依据表 B.1 中的数据,绘制精密度曲线图,采用二阶多项式模型进行。



说明:

◆——试剂批号 1

■——试剂批号 2

试剂批号 1: $y = 0.0007x^2 - 0.0061x + 1.0455$, $R^2 = 0.7787$

试剂批号 2: $y = 0.0015x^2 - 0.0367x + 1.4388$, $R^2 = 0.704$

图 B.1 精密度曲线图

因为使用 2 个试剂批号进行评估,分别评估每个批号的 LoD 估计值。选择较大者作为测量程序的 LoD。由图 B.1 可得到 2 批试剂的精密度曲线如下:

试剂批号 1 曲线: $SD_s=0.000\ 7x^2-0.006\ 1x+1.045\ 5$

试剂批号 2 曲线: $SD_s=0.001\ 5x^2-0.036\ 7x+1.438\ 8$

依据公式 $LoD=LoB+kSD_s$ 计算 LoD 估计值,其中 k 利用公式(11)计算得到, $k=1.646$ 。

使用回归线方程在相应的被测量浓度(MC)下计算 SD_s 值。然后使用上述公式利用得到的 SD_s 值计算试验 LoD 值。通过从试验 LoD 值中减去 MC 值计算偏倚。当偏倚由正变负时,可减少 2 个浓度间的步长,确定当偏倚等于 0 时的 LoD 评估值即为最终确定的 LoD 值,如表 B.2 所示。

表 B.2 MC 、 SD_s 与试验 LoD 值及偏倚

单位:ng/mL

被测量浓度	试剂批号 1			试剂批号 2		
	SD_s	试验 LoD	偏倚	SD_s	试验 LoD	偏倚
4.623	1.089	4.623	0.000	1.439	5.200	0.577
5.168	1.096	4.635	-0.533	1.420	5.168	0.000

分别计算得到试剂批号 1 和试剂批号 2 的 LoD 估计值为 4.62 ng/mL 和 5.17 ng/mL,其中较大值(5.17 ng/mL)为测量程序的 LoD。

附录 C

(资料性)

利用方法三建立检出限的案例分析

本案例来自乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒(PCR-荧光探针法)分析诊断测试,其中空白限(LoB)等于零。测试的概率分析建立检测限(LoD)。使用单个患者样本,2批试剂来简化这个案例。将样本制备成5个被测量浓度的稀释系列,并且使用2个试剂批对每个稀释液进行一组重复测量。表C.1中总结了每个试验条件、观察到的阳性结果的数量、进行的测量总数和计算的命中率比率。

表 C.1 稀释的阳性测试结果的观察比例

lg 浓度水平	阳性结果数/总测试结果		命中率	
	试剂批号 1	试剂批号 2	试剂批号 1	试剂批号 2
1.698 97	30/30	30/30	100 %	100 %
1.301 03	30/30	30/30	100 %	100 %
1.000 00	30/30	30/30	100 %	100 %
0.698 97	29/30	26/30	96 %	86 %
0.301 03	24/30	12/30	80 %	40 %

拟合概率模型的图见图 C.1。

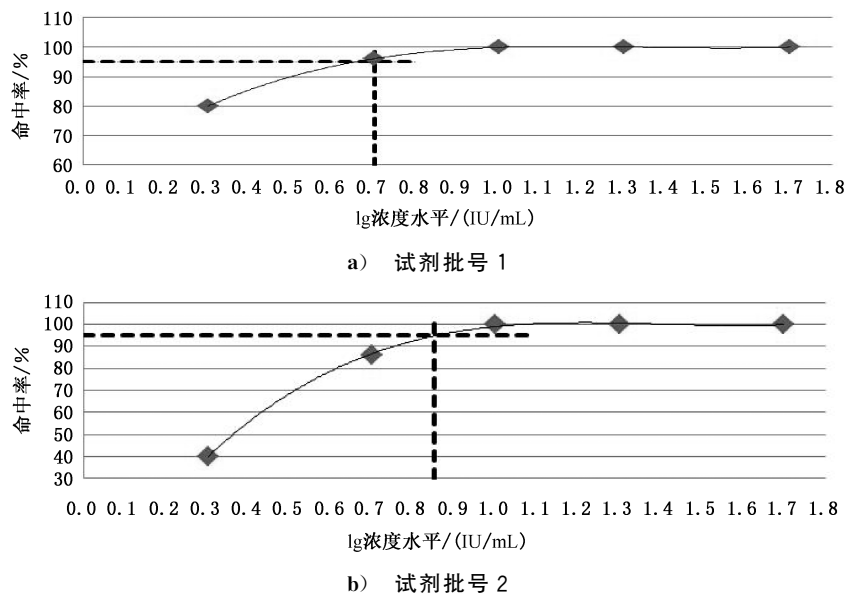


图 C.1 2批试剂的概率分析图

分别计算得到试剂批号 1 和试剂批号 2 的 LoD 估计值为 5.01 IU/mL 和 7.80 IU/mL,其中较大值 (7.80 IU/mL) 为测量程序的 LoD。

附 录 D

(资料性)

基于精密度要求建立定量限案例分析

本案例来自促卵泡生成激素(FSH)化学发光法检测项目的定量限检测能力研究,评价定量限,其中可接受的准确度目标仅基于精密度要求。期望的实验室内精密度为 10.00%。

设计方案为:

- 2 个试剂批;
- 1 个仪器系统;
- 5 个测试日;
- 9 个低浓度水平样本;
- 每个样本进行 8 次重复测量,上午、下午各 4 次。

表 D.1 和表 D.2 列出了 2 个试剂批号低浓度水平样本结果。

表 D.1 试剂批号 1 的低浓度样本测试结果

样本	样本 1		样本 2		样本 3		样本 4		样本 5		样本 6		样本 7		样本 8		样本 9	
	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午
重复次数	0.078	0.085	0.166	0.181	0.207	0.225	0.239	0.261	0.432	0.451	0.501	0.512	0.764	0.781	0.846	0.865	1.086	1.099
	0.094	0.102	0.141	0.154	0.243	0.265	0.257	0.282	0.395	0.412	0.500	0.511	0.742	0.758	0.921	0.941	1.079	1.092
	0.083	0.091	0.121	0.132	0.193	0.210	0.257	0.283	0.432	0.451	0.491	0.502	0.746	0.763	0.890	0.910	1.112	1.125
	0.046	0.050	0.179	0.195	0.267	0.291	0.257	0.283	0.377	0.393	0.521	0.532	0.814	0.831	0.891	0.911	1.129	1.142
第 1 天	0.148	0.161	0.143	0.156	0.185	0.201	0.248	0.274	0.369	0.385	0.515	0.526	0.674	0.688	0.856	0.875	1.111	1.124
	0.102	0.111	0.131	0.143	0.207	0.225	0.266	0.292	0.356	0.371	0.535	0.547	0.726	0.743	0.966	0.987	1.112	1.125
	0.069	0.075	0.149	0.162	0.197	0.215	0.239	0.261	0.371	0.387	0.517	0.528	0.751	0.768	0.933	0.954	1.143	1.156
	0.118	0.128	0.111	0.121	0.197	0.215	0.248	0.275	0.396	0.413	0.501	0.512	0.739	0.755	0.925	0.945	1.034	1.046
第 2 天	0.100	0.109	0.170	0.185	0.204	0.222	0.266	0.297	0.350	0.365	0.511	0.522	0.681	0.696	0.934	0.955	1.108	1.121
	0.116	0.126	0.149	0.162	0.192	0.209	0.248	0.275	0.368	0.384	0.559	0.571	0.716	0.732	0.879	0.898	1.082	1.095
	0.122	0.111	0.170	0.155	0.266	0.242	0.308	0.286	0.409	0.394	0.575	0.565	0.744	0.731	0.916	0.899	1.115	1.095
	0.150	0.137	0.163	0.148	0.233	0.212	0.319	0.297	0.379	0.365	0.521	0.512	0.710	0.697	0.958	0.941	1.245	1.222
第 3 天	0.155	0.141	0.175	0.159	0.252	0.229	0.308	0.285	0.442	0.426	0.465	0.457	0.655	0.643	0.942	0.925	1.223	1.201
	0.174	0.158	0.178	0.162	0.236	0.215	0.308	0.288	0.430	0.414	0.582	0.571	0.770	0.756	0.939	0.922	1.119	1.099
	0.082	0.074	0.167	0.152	0.287	0.261	0.319	0.295	0.400	0.385	0.525	0.515	0.694	0.682	0.952	0.935	1.112	1.092
	0.082	0.074	0.199	0.181	0.232	0.211	0.264	0.244	0.410	0.395	0.551	0.541	0.717	0.704	0.904	0.888	1.145	1.124
第 4 天	0.106	0.097	0.168	0.153	0.276	0.251	0.297	0.277	0.400	0.385	0.484	0.475	0.750	0.737	0.942	0.925	1.173	1.152
	0.148	0.135	0.181	0.165	0.254	0.231	0.297	0.276	0.433	0.417	0.571	0.561	0.750	0.737	1.017	0.999	1.191	1.169
	0.110	0.101	0.182	0.166	0.265	0.241	0.275	0.257	0.472	0.455	0.586	0.575	0.774	0.760	0.989	0.971	1.131	1.111
	0.145	0.132	0.203	0.185	0.244	0.222	0.319	0.291	0.430	0.414	0.520	0.511	0.678	0.666	0.941	0.924	1.145	1.124
第 5 天																		

单位: IU/L

表 D.2 试剂批号 2 的低浓度样本测试结果

样本 重复次数	样本 1		样本 2		样本 3		样本 4		样本 5		样本 6		样本 7		样本 8		样本 9	
	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午	上午	下午
	单位: IU/L																	
第 1 天	0.074	0.081	0.159	0.173	0.217	0.226	0.255	0.279	0.397	0.414	0.553	0.565	0.803	0.821	0.998	1.020	1.222	1.236
	0.116	0.127	0.110	0.120	0.219	0.229	0.245	0.272	0.392	0.409	0.496	0.507	0.731	0.747	0.915	0.935	1.023	1.035
	0.110	0.119	0.186	0.203	0.206	0.215	0.292	0.325	0.383	0.400	0.560	0.572	0.746	0.763	1.024	1.046	1.214	1.228
	0.114	0.124	0.147	0.160	0.253	0.264	0.245	0.272	0.363	0.379	0.552	0.564	0.707	0.723	0.868	0.887	1.069	1.081
	0.125	0.114	0.175	0.159	0.213	0.222	0.315	0.293	0.420	0.404	0.590	0.579	0.763	0.750	0.939	0.922	1.144	1.123
第 2 天	0.149	0.136	0.161	0.146	0.206	0.215	0.315	0.294	0.375	0.361	0.516	0.507	0.703	0.690	0.948	0.931	1.232	1.209
	0.155	0.141	0.175	0.159	0.200	0.209	0.307	0.285	0.442	0.426	0.465	0.457	0.655	0.643	0.942	0.925	1.223	1.201
	0.190	0.173	0.195	0.177	0.254	0.265	0.337	0.315	0.471	0.453	0.637	0.625	0.843	0.828	1.028	1.010	1.226	1.204
	0.077	0.084	0.164	0.178	0.241	0.251	0.235	0.257	0.425	0.444	0.493	0.504	0.752	0.769	0.833	0.851	1.069	1.082
	0.102	0.111	0.154	0.167	0.216	0.225	0.279	0.306	0.429	0.447	0.543	0.555	0.805	0.823	0.999	1.021	1.172	1.185
第 3 天	0.081	0.089	0.118	0.129	0.274	0.261	0.251	0.276	0.422	0.440	0.479	0.490	0.728	0.744	0.869	0.888	1.085	1.098
	0.047	0.052	0.184	0.200	0.253	0.241	0.264	0.290	0.386	0.403	0.534	0.546	0.834	0.853	0.914	0.934	1.158	1.171
	0.141	0.154	0.137	0.149	0.264	0.252	0.237	0.262	0.352	0.368	0.491	0.502	0.643	0.657	0.817	0.835	1.061	1.073
	0.107	0.116	0.137	0.150	0.233	0.222	0.279	0.305	0.372	0.388	0.560	0.572	0.760	0.777	1.010	1.032	1.163	1.177
	0.080	0.073	0.163	0.148	0.309	0.295	0.311	0.288	0.390	0.376	0.512	0.502	0.677	0.665	0.929	0.912	1.085	1.065
第 4 天	0.086	0.079	0.210	0.191	0.225	0.215	0.278	0.257	0.433	0.417	0.581	0.571	0.756	0.742	0.954	0.937	1.207	1.185
	0.102	0.093	0.161	0.147	0.282	0.269	0.284	0.265	0.383	0.369	0.464	0.455	0.719	0.706	0.903	0.887	1.124	1.104
	0.146	0.133	0.179	0.163	0.208	0.198	0.292	0.272	0.427	0.411	0.563	0.553	0.740	0.726	1.003	0.985	1.173	1.152
	0.118	0.107	0.195	0.177	0.219	0.209	0.293	0.275	0.505	0.486	0.626	0.614	0.827	0.812	1.057	1.038	1.209	1.187
	0.154	0.141	0.217	0.197	0.234	0.223	0.339	0.310	0.458	0.441	0.555	0.544	0.723	0.710	1.003	0.985	1.220	1.198

根据原始数据,分别计算出试剂批号 1 和试剂批号 2 测试结果的平均值,标准偏差(SD_{WL})和变异系数(CV)(见表 D.3)。

表 D.3 精密度估计数据统计

单位: IU/L

样本水平	试剂批号 1			试剂批号 2		
	平均测值	SD_i	$CV/\%$	平均测值	SD_i	$CV/\%$
水平 1	0.111	0.031	28.369	0.113	0.032	28.600
水平 2	0.162	0.021	13.083	0.165	0.025	15.215
水平 3	0.231	0.027	11.865	0.236	0.027	11.543
水平 4	0.278	0.022	8.086	0.284	0.026	9.241
水平 5	0.403	0.030	7.397	0.412	0.036	8.675
水平 6	0.527	0.032	6.156	0.539	0.047	8.801
水平 7	0.731	0.041	5.669	0.747	0.057	7.673
水平 8	0.928	0.038	4.101	0.948	0.065	6.863
水平 9	1.128	0.044	3.943	1.152	0.063	5.509

依据上述数据,绘制图 D.1。采用 OriginPro 软件,将变异系数 CV 定义为自变量(X),均值定义为因变量(Y),依据数据组特点选择适合的函数类型(选择函数原则为曲线平滑、方程便于计算以及函数曲线通过象限中大部分点),使用幂函数模型 $Y=C_0 X^{C_1}$ 来拟合数据集。

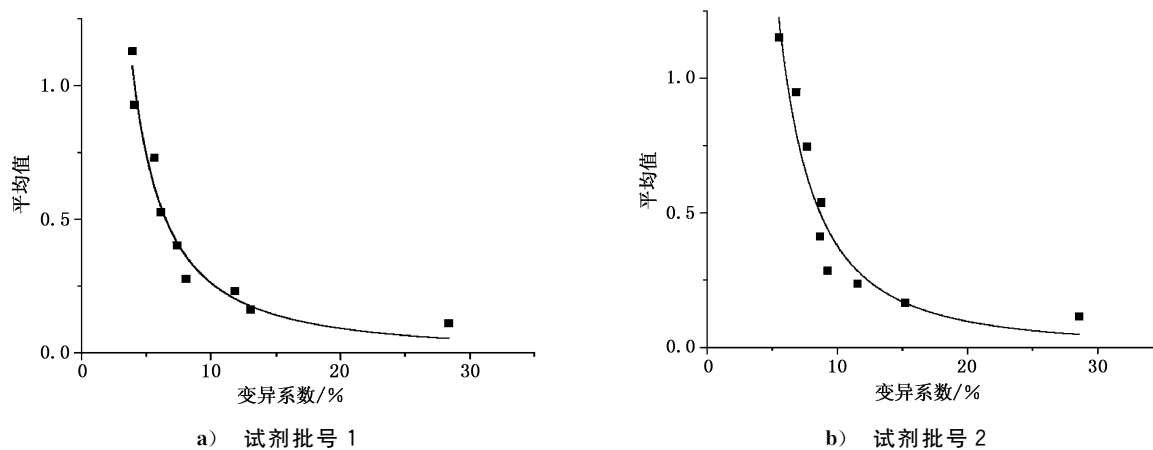


图 D.1 精密度曲线图

两批试剂的精密度曲线如下:

试剂批号 1 曲线: $Y = 8.515X^{-1.509}$; 试剂批号 2 曲线: $Y = 35.539X^{-1.973}$

求解方程以得到期望的 Y 值,将准确度目标值 $CV = 10\%$ 作为 X 代入方程,得到:试剂批号 1 的 $LoQ = 0.263$ IU/L,试剂批号 2 的 $LoQ = 0.378$ IU/L,所以选择最大者 $LoQ = 0.378$ IU/L 作为最终的定量限。

附 录 E

(资料性)

基于总误差要求建立定量限案例分析

本案例来自 cTnI 内部测量程序的检测能力研究,评价定量限,其中可接受的准确度目标仅基于总误差要求,LoQ 准确度目标是小于 20% 的总误差(TE)。使用传统的 Westgard 模型来定义用于该评估的总误差。

试验设计方案如下:

- 1 个仪器系统;
- 2 个试剂批(1 和 2);
- 3 个测试日;
- 5 个低浓度水平样本;
- 每个样本进行 4 次重复测量。

这样就满足了每个低浓度水平样本每批试剂测试结果数量为 60 个。表 E.1 和表 E.2 分别列出了 2 批试剂测试低浓度水平样本的测试结果。

表 E.1 试剂批号 1 的低浓度样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	重复次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
1	1	20.7	27.8	32.2	40	51.8
	2	22.3	24.5	31.2	43.9	51.7
	3	22.6	24.7	34	38.8	51.7
	4	36.3	26.9	34.6	40.5	50.4
2	1	22.3	23.7	32.1	37.4	48.6
	2	23.5	23.2	33.5	39.2	50.8
	3	21.5	25.5	31.2	42.2	46.6
	4	22.8	24.7	34.6	37.6	49.6
3	1	26	25.5	32.3	40.7	51.6
	2	20.2	26.9	30.3	38	52.5
	3	21.2	29.9	32.3	41.4	52.2
	4	21	26.2	32.2	42.8	50.7

表 E.2 试剂批号 2 的低浓度样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	重复次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
1	1	20.4	26.7	27.1	39.3	48.5
	2	17.6	21.6	29.7	36.1	50.9
	3	18.9	23.2	28.5	38.5	47.1
	4	19.4	23.9	28.5	33.6	39.9

表 E.2 试剂批号 2 的低浓度样本测试结果（续）

单位：pg/mL

测试天数	重复次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
2	1	22.2	23.2	32.1	36.6	48.1
	2	22.7	23.2	30.2	38.1	46.9
	3	24.4	23	31.7	36.3	—
	4	18.9	23.4	29.6	35.6	49.7
3	1	24.1	25.1	31.3	41.2	50
	2	23.9	28.5	32.2	38.9	50.9
	3	22.5	23.9	29.9	38.6	49.8
	4	22.8	33.8	31.6	38.2	48.5

表 E.3 对测试结果进行统计，计算平均值、SD 及 TE，表中列出的参考值由参考测量程序得到。

表 E.3 低浓度样本平均值、标准差 (SD) 和总误差 (TE)

单位：pg/mL

样本	确定值	平均值		偏倚		SD		TE/%		
		试剂批号 1	试剂批号 2	试剂批号 1	试剂批号 2	试剂批号 1	试剂批号 2	试剂批号 1	试剂批号 2	平均值
样本 1	16.00	23.37	21.48	7.37	5.48	4.35	2.33	83	54	69
样本 2	20.00	25.79	24.96	5.79	4.96	1.88	3.34	44	51	47
样本 3	30.00	32.54	30.20	2.54	0.20	1.37	1.63	17	11	14
样本 4	36.00	40.21	37.58	4.21	1.58	2.10	2.02	22	14	18
样本 5	50.00	50.68	48.21	0.68	-1.79	1.71	3.08	8	16	12

观察结果，判断样本是不满足准确度目标的 TE，绘制 2 个试剂批次的低浓度样本的计算 TE 与参考值的曲线图，如图 E.1 所示，使用线性回归模型拟合和外推法，确定准确度目标可以在质量浓度约 40 pg/mL 时达到。

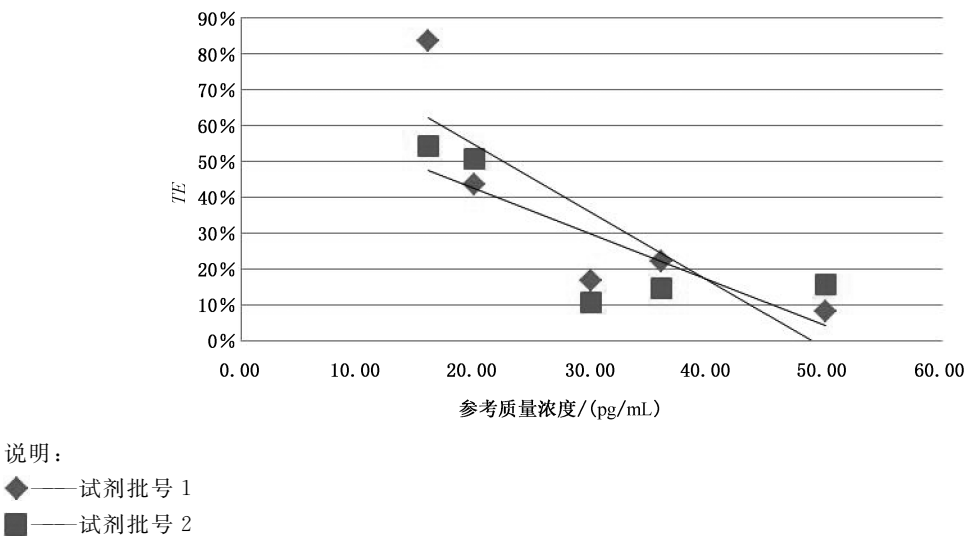


图 E.1 2 个试剂批号的低水平样本的计算 TE 与参考值的曲线图

在质量浓度 40 pg/mL 左右制备 5 个混合样本,使用参考方法确定定值。使用 1 个仪器系统,在 3 个测试日中,每日每个样本通过 2 个试剂批号重复测试 3 次。这样每个试剂批产生 45 个重复。样本的观察结果和参考值总结见表 E.4 和表 E.5,统计结果见表 E.6。

表 E.4 试剂批号 1 的测试结果

单位:pg/mL

测试天数	序号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
		样本参考值				
		60	80	30	36	50
1	1	59.3	72.2	32.2	40	51.8
	2	60.1	73.3	31.2	40.9	51.7
	3	59	69.8	34	38.8	51.7
2	1	59.1	69	32.1	37.4	48.6
	2	60.7	69.7	33.5	39.2	50.8
	3	57.8	71.9	31.2	40.2	46.6
3	1	59.5	74.9	32.3	40.7	51.6
	2	56.9	77.1	30.3	38	52.5
	3	61.2	71.5	30.3	41.4	52.2

表 E.5 试剂批次 2 的测试结果

单位:pg/mL

测试天数	序号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
		样本参考值				
		60	80	30	36	50
1	1	58.8	70.6	27.1	39.3	48.5
	2	58.2	71.8	29.7	36.1	50.9
	3	60.3	73.7	28.5	38.5	47.1
2	1	55.7	68.2	32.1	36.6	48.1
	2	59.3	67.5	30.2	38.1	46.9
	3	57.7	69.3	31.7	36.3	—
3	1	60	73	31.3	41.2	50
	2	64.2	72.4	32.2	38.9	50.9
	3	59.1	75.6	29.9	38.6	49.8

表 E.6 LoQ 试剂 1 和试剂 2 的数据统计

单位:pg/mL

试剂批号	样本	参考值	测试平均值	SD	偏差	TE	TE/%	LoQ
1	样本 1	60.00	59.29	1.34	-0.71	3.39	6	31.9
	样本 2	80.00	72.16	2.63	-7.84	13.10	17	
	样本 3	30.00	31.90	1.29	1.90	4.48	14	
	样本 4	36.00	39.62	1.36	3.62	6.35	17	
	样本 5	50.00	50.83	1.96	0.83	4.74	9	
2	样本 1	60.00	59.26	2.30	-0.74	5.35	9	30.30
	样本 2	80.00	71.34	2.67	-8.66	14.00	18	
	样本 3	30.00	30.30	1.73	0.30	3.75	12	
	样本 4	36.00	38.18	1.64	2.18	5.46	15	
	样本 5	50.00	49.03	1.60	-0.98	4.18	8	

每个试剂批号对所有样本计算的 TE 满足 $\leq 20\%$ 的准确度目标;因此,认为满足 LoQ 标准。满足试剂批次 1 的准确度目标的最低样本浓度为 31.90 pg/mL。对于试剂批次 2,LoQ 为 30.30 pg/mL。这 2 个估计值中的较大值 31.90 pg/mL 报告为测量程序的 LoQ。

附 录 F

(资料性)

空白限、检出限声明的验证案例分析

某诊断试剂厂商胃泌素释放肽前体(ProGRP)化学发光测量程序,声称的空白限(LoB)为 0.25 pg/mL,检出限(LoD)为 0.36 pg/mL,误差风险 $\alpha=\beta=0.05$ 。本案例为验证此两个检测能力声明。

验证空白限检出限声明的设计方案为:

- 1 个试剂批;
- 1 个仪器系统;
- 3 个测试日;
- 2 个空白样本、2 个低浓度水平样本;
- 每个样本每日进行 4 次重复测量。

表 F.1 列出了观察到的测试样本结果。

表 F.1 LoB/LoD 验证测试结果按浓度由低到高进行统计

单位:pg/mL

序号	空白样本	低浓度样本	序号	空白样本	低浓度样本
1	0.00	0.29	13	0.06	0.36
2	0.00	0.32	14	0.07	0.37
3	0.00	0.33	15	0.08	0.37
4	0.00	0.33	16	0.09	0.38
5	0.01	0.34	17	0.09	0.38
6	0.03	0.34	18	0.11	0.38
7	0.03	0.34	19	0.12	0.39
8	0.03	0.35	20	0.14	0.39
9	0.04	0.35	21	0.15	0.40
10	0.04	0.35	22	0.16	0.41
11	0.04	0.36	23	0.20	0.41
12	0.04	0.36	24	0.27	0.41

将空白样本结果与制造商的 0.25 pg/mL 的 LoB 声称的比较显示,除一个结果 0.27 pg/mL 之外,所有结果均小于或等于声明要求。得到 $23/24=95.8\%$ 的百分比。大于共识中 24 个样本量对应的最小百分比 87%,所以认为制造商的 LoB 声明验证通过。同样,大于或等于 LoB 声称的低浓度水平样本的百分比计算为 $24/24=100\%$ 。大于共识中 24 个样本量对应的最小百分比 87%,因此,制造商的 LoD 声明被视为验证合格。

附录 G

(资料性)

定量限声明的验证案例分析

本案例的数据来自胃泌素释放肽前体(ProGRP)化学发光测量程序,根据总误差(TE)为 20%的准确度目标,其定量限(LoQ)声称 1.05 pg/mL,误差风险 $\alpha=\beta=0.05$ 。本案例为验证定量限能力声明。

验证定量限能力的设计方案为:

- 1 个试剂批;
- 1 个仪器系统;
- 3 个测试日;
- 5 个低浓度水平样本;
- 每个样本进行 3 次重复测量。

表 G.1 列出了观察到的低浓度水平样本结果。

表 G.1 样本测试结果

单位:pg/mL

测试天数	重复次数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
1	1	1.27	1.11	0.91	0.98	0.97
	2	0.94	1.06	0.97	1.09	1.14
	3	1.26	1.22	0.87	1.19	0.93
2	1	0.89	1.14	0.90	1.16	1.24
	2	1.07	0.85	0.98	0.83	1.06
	3	0.86	1.04	1.20	1.01	1.18
3	1	1.13	0.90	1.20	1.26	1.24
	2	1.25	0.95	0.82	0.94	1.19
	3	1.00	1.28	0.99	1.12	1.11

对于每个样本依据 TE 范围计算上限和下限。将每个样本的结果与它们各自的允许 TE 范围限值进行比较,并且计算落在范围以外结果的数目。表 G.2 给出了样本的参考范围,表 G.3 列出了定量限验证的观察结果。

表 G.2 参考范围

单位:pg/mL

参数	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
参考值	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05
下限	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
上限	1.26	1.26	1.26	1.26	1.26

表 G.3 LoQ 验证的观察结果

单位:pg/mL

序号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5
1	1.27	1.11	0.91	0.98	0.97
2	0.94	1.06	0.97	1.09	1.14
3	1.16	1.22	0.87	1.19	0.93
4	0.89	1.14	0.90	1.16	1.24
5	1.07	0.95	0.98	0.83	1.06
6	0.86	1.04	1.20	1.01	1.18
7	1.13	0.90	1.20	1.21	1.04
8	1.05	0.95	0.82	0.94	1.19
9	1.00	1.28	0.99	1.12	1.11
超出上下限范围个数	0	1	1	1	0

统计结果表明,3 个测试结果落在允许的 TE 范围之外,满足准确度目标的百分比为 93.3%。与共识中样本量为 45 个时要求的最小百分比(88%)进行比较,大于要求的最小百分比,LoQ 声明验证通过。

参 考 文 献

- [1] GB/T 26124—2011 临床化学体外诊断试剂(盒)
- [2] GB/T 27415—2013 分析方法检出限和定量限的评估
- [3] GB/T 29791.1—2013 体外诊断医疗器械 制造商提供的信息(标示) 第1部分:术语、定义和通用要求
- [4] WS/T 514—2017 临床检验方法检出能力的确立和验证
- [5] 温冬梅.化学发光免疫法检测 AFP 的空白限、检出限和定量检测限的建立与评价[J].临床检验杂志,2010,28(6):469-471.
- [6] 谭丽娜.酶联免疫法检测血清乙型肝炎表面抗原的空白限检出限及定量限的建立与评价[J].中国药物与临床,2013,13(2):144-146.
- [7] 韩雪晶.高敏感方法检测心肌肌钙蛋白的检测限和功能灵敏度的建立及评价[J].检验医学,2013,28(2):98-101.
- [8] 康凤凤.临床实验室检测方法空白限、检出限和定量限评价新方法[J].中国卫生统计,2014,31(5):901-904.
- [9] 郭绪晓.基于 EP17-A2 的胶体金法检测粪便隐血的空白限、检出限及定量限的建立及评价[J].现代检验医学杂志,2015,30(1):78-81.
- [10] 胡敏.酶联免疫分析检测乙型肝炎 e 抗原的空白限检出限及定量限的建立与评价[J].检验医学与临床,2015,12(18):2656-2658.
- [11] 陈雪莹.乳胶增强免疫比浊法检测血清降钙素原的空白限、检出限和定量限的建立与评价[J].国际检验医学杂志,2015,10(36):3054-3056.
- [12] ISO 9000:2005 Quality management systems—Fundamentals and vocabulary
- [13] CLSI EP17-A2 Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition(2012)
- [14] CLSI EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline(2004)
- [15] CLSI EP05-A3 Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition(2014)
- [16] CLSI EP05-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition (2004)
- [17] CLSI EP07-A2 Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition (2005)
- [18] CLSI EP06-A Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures; A Statistical Approach; Approved Guideline (2003)
- [19] CLSI EP12-A User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition (2008)
- [20] CLSI EP14-A2 Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline—Second Edition (2005)
- [21] CLSI EP15-A User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline—Second Edition (2006)
- [22] Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation[J]. Clin-Biochem Rev, 2008, 29(Suppl 1): S49-S52.