

回归和多元分析在参考物质互换性研究中的应用

卫生部北京医院卫生部临床检验中心(100730) 胡丽涛 王 薇 王治国[△]

【提 要】 目的 探讨回归和多元分析在参考物质互换性研究中的应用。方法 参照美国临床和实验室标准化研究院(CLSI) C53-A 及相关文件,结合实际工作总的实例进行分析总结,应用回归分析和多元分析评价参考物质互换性。**结果** 用于参考物质互换性评价的回归方法有普通最小平方方法(OLS)、戴明(Deming)和 Passing-Bablok(PB),具体的实施可通过建立 95% 预测区间和标准差的倍数进行分析。多元统计主要适用于没有参考方法的多种方法比较。**结论** 临床实验室应该根据具体的互换性评价研究计划和实际情况选择合适的统计方法。

【关键词】 参考物质 互换性 回归分析 相应分析

参考物质互换性是指不同测量程序检测参考物质或代表性标本中相同的被测测量时各结果的数学关系等效性。互换性评价是为了建立和验证常规测量结果到参考系统的溯源性,或者说是为了建立或验证各方法检测结果的协调性。互换性的评价首先应该设计一个评价计划,确定参考物质、质控物和新鲜标本需要重复检测的次数,重复检测次数取决于检测方法的灵敏度和统计显著性。线性回归分析和相应分析(correspondence analysis)是互换性确认研究的主要方法。

回归分析评价互换性

1. 回归方法

回归分析方法是假定一组变量(x, y)间具有线性关系并估计线性模型参数和标准差。常用的回归方法有:普通最小平方方法(OLS)、戴明(Deming)和 Passing-Bablok(PB)。OLS 和 Deming 回归使用的是普通最小平方方法但是数据假设不同。回归方法的选择取决于数据的特性,即 X 和 Y 的方差以及参考物质和患者标本的重复检测次数。

OLS 假定 Y 变量服从方差恒定的正态分布,自变量 X 无误差。Deming 回归假设两个测量程序 X 和 Y 所得的结果都含有误差,其对回归模型斜率和截距的估计是根据观察点到回归线的垂直距离的平方和最小。Deming 回归不需要 X 和 Y 数据方差相等,当方差不相等时根据观察点到回归线的非垂直(合适的角度)距离平方和最小,但前提是假设方差在数据范围内是恒定的。

当 X 和 Y 的标准差在测量范围内都近似恒定,可以对测量结果的重复均值使用常规的 Deming 回归方法。若方差不是常数而是与浓度成比例,推荐使用加权 Deming 回归分析或者非加权 Deming 回归分析对结果进行对数转换。测量结果经对数转换后稳定了其标准差,这是基于统计学理论并可通过计算画出标准差

与重复测量结果对数间的关系图进行验证,然后可将常规 Deming 回归用于对数转换结果的均值。

与 Deming 回归相似,PB 回归在两个变量都存在不精密度时较适用。它是一种非参数程序,对误差分布类型没有规定。PB 回归可用于恒定或成比例的误差情况,唯一的限制是假设方差的比例等于斜率的平方。为了估计线性回归的斜率,使用两个数据点间的斜率。斜率 S_{ij} 是指将第 i 个点与第 j 个点连接起来所得直线的斜率($i = 1, 2 \cdots n; j = 1, 2 \cdots n; i \neq j$)。由于 n 个数据点有 $n(n-1)/2$ 个数据点组合,将所得的斜率按从小到大的顺序排列 $S(1) \leq S(2) \leq S(3) \cdots \leq S(N)$,然后计算斜率小于 -1 的斜率数 K 。回归直线的斜率即斜率中位数向右移动 K 个单位,如果 N 为奇数 $b = S\left[\frac{N+1}{2} + k\right]$,若 N 为偶数 $b = 0.5\left[S\left(\frac{N}{2} + K\right) + S\left(\frac{N}{2} + 1 + K\right)\right]$ 。截距的估计是使得一半的数据点落在直线的上方,一半落在下方。PB 回归的优点表现在离群值的稳健性,缺点是由于非参数方法的性质造成的较宽的置信区间。

2. 使用 95% 预测区间进行回归分析

假设测量结果同一对测量程序的被测量之间呈线性关系,则参考物质和新鲜临床标本测量程序与所得结果间的关系如下:

$$Y = \alpha_H + \beta_H X \quad (1a)$$

$$Y = \alpha_R + \beta_R X \quad (1b)$$

α_H 和 α_R 分别代表人体标本和参考物质的各对测量程序所得结果线性关系的截距, β_H 和 β_R 分别代表人体标本和参考物质的各对测量程序所得结果线性关系的斜率。通过各模型的参数相等建立(1a)和(1b)的数学关系等效性:

$$\alpha_H = \alpha_R \quad (2a)$$

$$\beta_H = \beta_R \quad (2b)$$

考虑到两种方法的测量误差,新鲜临床标本的模型(1a)可以表示为:

[△]通讯作者:王治国,E-mail: zgwang@nccl.org.cn

$$Y = \alpha_H + \beta_H (X + \varepsilon_X) + \varepsilon_Y \quad (3)$$

α_H 为新鲜临床标本检测结果的截距, β_H 为新鲜临床标本检测结果的斜率, ε_X 为 X 测量的随机误差, ε_Y 为 Y 测量的随机误差。在假设各方法、标本和重复检测中的随机误差是独立的, 且服从均值为 0, 标准差为不依赖被测量水平的常数 $\sigma(\varepsilon_X)$ 和 $\sigma(\varepsilon_Y)$ 模型 (3) 中的参数估计可使用普通 Deming 回归。模型 (3) 可变换为:

$$\bar{Y}_i = \alpha_H + \beta_H (\bar{X}_i + \varepsilon_X) + \varepsilon_Y \quad (4)$$

α_H 为人体标本获得的截距, β_H 为人体标本获得的斜率, ε_X 为 X 重复测量均值的随机误差, ε_Y 为 Y 重复测量均值的随机误差。假定用方法 Y 和 X 测量参考物质与新鲜临床标本具有互换性, 则使用方法 Y 测量参考物质得到的结果 Y_R 与用方法 X 测得的结果 X_R 具有线性关系:

$$Y_R = \alpha_H + \beta_H X_R \quad (5)$$

\bar{Y}_{R_pred} 是 Y 方法重复进行 r_R 此重复所得值的均值, 受到模型参数估计和测量随机误差的影响, 表达如下:

$$\bar{Y}_{R_pred} = \hat{\alpha}_H + \hat{\beta}_H (\bar{X}_R + \varepsilon_{\bar{X}_R}) + \varepsilon_{\bar{Y}_R} \quad (6)$$

$\hat{\alpha}_H$ 为人体标本获得的截距, $\hat{\beta}_H$ 为人体标本获得的斜率, \bar{X}_R 为参考物质 X 方法获得结果的均值, $\varepsilon_{\bar{X}_R}$ 和 $\varepsilon_{\bar{Y}_R}$ 分别为参考物质 X 和 Y 方法测量的随机误差。 \bar{Y}_R 的 $(1 - \gamma)$ 100% 预测区间计算为:

$$\bar{Y}_{R_pred} \pm t(1 - \gamma/2, v) \hat{\sigma} \bar{Y}_{R_pred} \quad (7)$$

v 为预测值标准差的自由度; γ 检验水准, $\gamma = 0.05$; $t(1 - \gamma/2, v)$: 自由度为 v 的 t 分布 $(1 - \gamma/2)$ 100 百分比。等式 (7) 描述了单个具有互换性参考物质重复测量均值的 $(1 - \gamma)$ 100% 预测区间。当使用 m 份浓缩参考物质 (如 m 份单个参考物质到稀释物或一版内 m 份参考物质一起使用) 用于互换性评价时, 每份参考物质的重复测量次数相同, 则 $(1 - \gamma)$ 100% 预测区间的估计要更宽。这种情况下的区间估计为 $t(1 - \gamma/2m, v)$, 表示自由度为 v 的 t 分布 $(1 - \gamma/2m)$ 100 百分比 (基于多重比较的 Bonferroni 方法)。

参考物质的互换性可以通过画出 \bar{Y}_R 与 \bar{X}_R 的直线关系图表示, 表达如下:

$$Y = \hat{\alpha}_H + \hat{\beta}_H X \quad (8)$$

计算并在同一图中画出 95% 的预测区间。当一个 \bar{Y}_R, \bar{X}_R 点落在了预测区间内, 则认为参考物质具有互换性; 否则不具有互换性。

当测量方法 Y 和 X 受到测量误差的影响, 不具有线性关系, 则从等式得到的回归线的预测区间不是封闭的。因此, 若数据不能够转换成线性关系, 而且分割后也不满足线性关系或者新鲜标本数量不合适的情况下无法确定互换性。

图 1 展示了用回归方法进行互换性评价, 数据来

自附录。假设每一份新鲜患者标本和参考物质实用方法 MA 和 MD 进行 r 次重复测量, 在方法测量范围内的方差固定, 则新鲜患者标本采用两种方法结果回归关系的 95% 预测区间代表了后面所测的结果将有 95% 的概率在此界限范围内。同样具有互换性参考物质的结果与新鲜患者标本有相同的特点, 其被测量的值应该以 0.95 的概率落在此界限内。如有参考物质上述方法的值落在了新鲜患者标本 95% 预测区间范围外, 则认为此参考物质不具有互换性。

图 1 和 2 中所有的待评价参考物都是独立的 ($m = 1$), 不是单一参考物质的稀释物或者一版中的部分。这两个图展示了参考物质的值与新鲜标本所得预测区间的关系。7 个参考物质中有 6 个与新鲜患者标本使用方法 MA 和 MD 测量具有互换性, 因为其结果包含在新鲜患者结果的 95% 预测区间内。参考物质 F 在方法 MA 和 MB 之间及 MA 和 MD 之间不具有互换性。

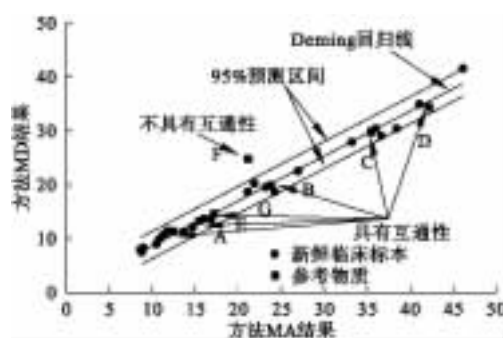


图 1 使用回归和 95% 预测区间评价参考物质方法 MA 与 MD 间的互换性

3. 使用回归标准差 S_{y-x} 的倍数进行回归分析

新鲜临床标本数据点与回归最佳拟合线之间的残差已经用于评价参考物质或者真实度质控物质残差的标准。通过使用两种方法的新鲜临床标本结果得出的回归线和回归标准差 S_{y-x} 。值得注意的是使用 PB 回归方法算出的 S_{y-x} 会比 OLS 和 Deming 回归大, 原因是 PB 回归线非参数估计。这部分所考虑的测量方差在测量范围内是恒定的, 在参考物质浓度范围内的新鲜临床标本数也适当。待评价的参考物质也由两种方法检测, 预测值 Y 是通过新鲜临床标本的回归方差计算所得, 相对残差的计算如下。

$$\text{相对残差} = \frac{Y_{\text{测量值}} - Y_{\text{预测值}}}{S_{y-x}}$$

表 1 用图 1 和 2 中的数据计算了相对残差, 用 ± 2 倍 S_{y-x} 与用回归 95% 预测区间得出的结论相似。对于配对方法 MA 和 MB, 其中 6 个参考物质具有互换性。无论是用 ± 2 倍 S_{y-x} 还是用回归 95% 预测区间, 参考物质 D 的参数都落在了判断标准的边缘, 不同的是它落在了回归 95% 预测区间内 (如图 2) 被判为具

有互换性,超出了 ± 2 倍 S_{y-x} 用相对残差标准判为不具有互换性。

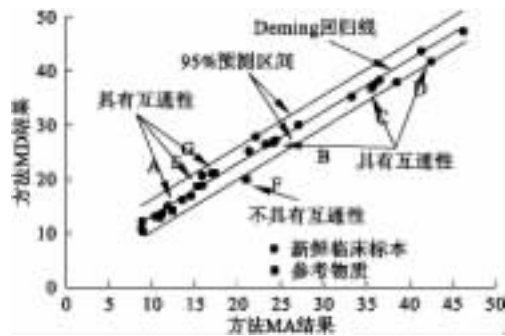


图2 使用回归和 95% 预测区间评价参考物质方法 MA 与 MB 间的互换性

表1 使用相对残差分析评价方法 MA 与 MB 和 MA 与 MD 参考物质的互换性

	方法 MA 与 MD	方法 MA 与 MB
	回归参数	
斜率	0.834	0.961
截距	0.396	3.660
S_{y-x}	1.033	1.188
	各参考物质的残差值	
A	-0.603	1.088
B	0.518	-0.117
C	0.326	0.601
D	0.997	2.164
E	-0.021	-0.523
F	-6.758	3.241
G	-0.066	-0.923

多元统计方法

主成分分析和相应分析这两种多元统计技术已经用于互换性评价。主成分分析和相应分析是描述性的方法,不进行数据模型的假设。这两种方法能够将患者标本中的可能的属性差别展示出来,也可以将参考物质处理为“非活动元素”使之不会被“活动元素”临床标本的模式影响。这一特点使得这两种统计方法可以用于互换性研究,因为参考物质不参与模式的确定。

相应分析将原始数据转换成二维的表格(标本栏和方法栏),不同单位的方法间对比不需要重新计算或转换。因子平面是由两个因子轴来确定的,每一个数据点可以通过将其投射到因子平面上使之可视化。实际工作中,这一平面是通过几个首要目标轴确定的,由于因子轴具有较高的次序性可以描述随机误差的特征,如抽样误差与分析精密度相关的误差。这一信息可以通过单个因子轴解释,直接与其相应向量成比例。图3是一个典型的相应分析图,附录B中的25个临床标本、7个参考物质和10种方法都投射到了同一个平面(两个因子轴)。两个标本的投射位置非常接近表明它们有相似的方法反应(如图3中的P7和P3)。同理,如果两分析方法非常贴近表明它们测量所有标

本是有相似的结果(见图3中的方法MH和MG)。

研究参考物质的互换性,只需使用患者标本建立主轴,参考物质作为非活动元素。如果参考物质落在不同显著因子平面的患者标本间,则认为此参考物质具有互换性。置信区域可以通过患者标本参考集来确定,以进一步描述这一总体成分分析和相应分析所描述的参考物质与方法的关系通常以图的形式表示,投射在临床标本确定的点群中心的参考物质代表了高度的互换性,其投射远离中心的参考物质被认为缺乏互换性,如图3中的参考物质F。

互换性确认程序的选择

参考物质互换性评价统计方法的选择应该根据参考物质和新鲜临床标本的数量以及参考测量程序的情况。美国临床和实验室标准化研究院(CLSI)评价方案(EP)14文件提出回归分析方法是公认的方法,因此当回归分析适用时推荐使用回归分析。回归方法适合于一次比较两个测量程序的结果。它给出了定量的数值和统计可接受标准的概率。当有一个参考测量程序时,回归方法对于多个常规测量程序较适用,各常规方法与参考方法比较容易控制。若没有参考测量程序

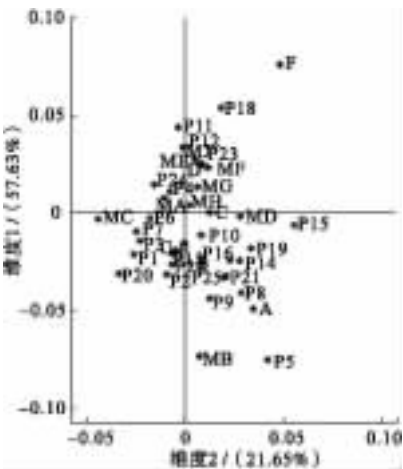


图3 相应分析图

时,需要两个测量程序随机组合进行比较,这样使评价过程变得很复杂。基于多元统计技术的互换性确认适合于同时比较多个测量程序,比较组中参考测量程序可有可无。结果输出是定量的,因此参考物质与新鲜临床标本在各测量方法间的等效性更加直观。当没有参考测量程序时,多元统计方法对于常规方法来说更实用,因为所有可能的组合都同时投射到一个二维平面,可以直观地进行分析。

参考文献

1. CLSI. Characterization and Qualification of Commutable Reference Materials for Laboratory Medicine; Approved Guideline. CLSI document C53-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.