

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 402—2024

代替 WS/T 402—2012

临床实验室定量检验项目参考区间的制定

Defining, establishing, and verifying reference intervals of quantitative analytes in
the clinical laboratory

2024 - 05 - 09 发布

2024 - 11 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

华东公共卫生
www.ecphf.cn

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 概述	2
5 直接法建立参考区间	2
6 间接法建立参考区间	7
7 转移法获得参考区间	7
8 参考区间评估和验证	8
附录 A（资料性） 参考区间相关问题	10
附录 B（资料性） 参考个体调查问卷示例	11
附录 C（资料性） 采用嵌套方差分析进行分组分析的示例	12
附录 D（资料性） 变更参考区间注意事项	13
参考文献	14

前 言

本标准为您推荐性标准。

本标准代替WS/T 402—2012《临床实验室检验项目参考区间的制定》。与WS/T 402—2012相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了“概述”章节（见4）；
- 增加了“间接法建立参考区间、转移参考区间”章节（见4.2.3和4.3）；
- 增加了“附录C 采用嵌套方差分析进行分组分析的示例”（见附录C）；
- 增加了“附录D 变更参考区间注意事项”（见附录D）；
- 增加了“术语与定义”部分的“置信区间”（见3.8）；
- 增加了“直接法建立参考区间常用研究方式、直接法建立参考区间的流程”、“表1：筛选参考个体考虑的排除因素”（见4.2.2、5.2和5.3.2）；
- 更改了“表2 分析前考虑因素”（见5.4.1，2012年版的5.2）；
- 更改了“参考值分析”的方法（见5.5.2，2012年版的7）；
- 增加了“参考值分组”部分的“b）嵌套方差分析”（见5.5.2.2）；
- 增加了“检测数据离群值判断”部分的“Tukey法”（见5.5.2.5）；
- 增加了“参考区间评估”（见8.1）；
- 更改了“小样本验证”的数据分析方法（见8.2，2012年版的8.2）；
- 更改了“大样本验证”、“附录A 医学决定水平描述内容”、“附录B 参考个体调查问卷示例”（见8.3、附录A、附录B，2012年版的8.3、附录A、附录B）。

本标准由国家卫生健康标准委员会临床检验标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由国家卫生健康委医疗管理服务指导中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会医政司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：中国人民解放军空军军医大学第一附属医院、中国医科大学附属第一医院、复旦大学附属中山医院、北京医院/国家卫生健康委临床检验中心、四川大学华西医院、北京大学第三医院、广东省中医院、首都医科大学附属北京同仁医院。

本标准主要起草人：郝晓柯、尚红、潘柏申、陈文祥、王兰兰、张捷、黄宪章、赵敏、刘家云、刘向祎。

本标准于2012年首次发布，本次为第一次修订。

临床实验室定量检验项目参考区间的制定

1 范围

本标准规定了临床实验室制定定量检验项目参考区间的技术要求。
本标准适用于建立定量检验项目参考区间的临床实验室。

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标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

WS/T 224 真空采血管的性能验证
WS/T 225 临床化学检验血液标本的采集与处理
WS/T 359 血栓与止血检验常用项目的标本采集与处理
WS/T 641 临床检验定量测定室内质量控制
WS/T 644 临床检验室间质量评价
WS/T 661 静脉血液标本采集指南
WS/T 662 临床体液检验技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

参考个体 reference individual

按照明确标准选择的作为检验对象的个体。

注：通常是符合特定标准的健康个体。

3.2

参考人群 reference population

由所有参考个体组成的总体。

注：通常参考人群中的个体是未知的，因此参考人群是一个假设总体。

3.3

参考样本组 reference sample group

从参考人群中选择的用以代表参考人群的足够数量的样本。

3.4

参考值 reference value

通过对参考个体标本进行检测而得到的值。

3.5

参考分布 reference distribution

参考值的分布。

注：参考分布可用参考样本组的分布和适宜的统计方法估计。

3.6

参考限 reference limit

源自参考分布，用于界定参考值区间的数值。

注：参考限是对参考值的描述，区别于临床决策值/医学决定水平。

3.7

参考区间 reference interval

两个参考限（包括参考限）之间的区间（参见附录A）。

注：参考区间是指从参考下限到参考上限的区间，通常取参考值分布的中间95%区间，即参考下限为2.5百分位值，参考上限为97.5百分位值。当只有一个参考限具有临床意义，这时的参考区间可以表示为 \leq 参考上限或 \geq 参考下限。

3.8

置信区间 confidence interval

在参考区间研究中，通常需要计算参考限的置信区间。指按预先给定的概率（ $1-\alpha$ ）所确定的包含未知总体参数的一个范围。

4 概述

4.1 参考区间主要来源

临床实验室常用参考区间来源包括：引用卫生行业标准、试剂说明书、权威教材等提供的参考区间；通过研究建立的参考区间；通过参考区间转移法获得的参考区间。

4.2 建立参考区间的方法

4.2.1 建立参考区间的方法包括直接抽样法（直接法）和间接抽样法（间接法）。

4.2.2 直接法建立参考区间是目前推荐的首选方法，通过建立纳入、排除标准，采用人群直接抽样方法，选取合格的参考个体，进行标本检测以建立参考区间。对标本检测前可以明确参考个体筛选标准的指标，可按照事先制定好的筛选标准收集参考个体；对标本检验前不能明确筛选标准的指标（如实验室开展的新检测项目），可在标本采集和检验后完善筛选标准，确定参考个体。

4.2.3 间接法建立参考区间指利用医疗机构既有的检验数据经过适宜的数据收集、数据清洗及选择正确的统计方法而建立参考区间的方法。当特定人群（如新生儿、儿童）采集标本困难，或研究标本类型特殊（如脑脊液）时，直接法难以实现，可考虑使用间接法建立参考区间。间接法虽然相对简单且成本低，但数据库中可能存在大量不健康个体的检测值，应经科学严谨的方法加以识别及排除。该方法尚不认为是参考区间建立的常用方法，仅作为直接法建立参考区间无法实现或不适用时的一种替代方法。

4.3 转移参考区间

转移参考区间是指将已有参考区间转移应用至其他分析方法/分析系统的方法。实验室缺乏可引用的参考区间，也无法通过研究建立参考区间时，在满足实验室服务人群适用性和分析系统可比性要求的前提下，可考虑使用转移参考区间的方式，获得适合本实验室的参考区间。该方法不是参考区间建立的常用方法，仅适用于上述特殊情况下的替代方法。

4.4 参考区间研究的伦理要求

参考区间研究开展前应申请且通过伦理审查，并遵照国家相关法律、法规执行。

5 直接法建立参考区间

5.1 常用研究方式

参考区间的研究方式通常为单中心研究或多中心研究。为提高参考人群的代表性，建立更稳健的参考区间，获得能够在更广泛地域/人群适用的参考区间，推荐采用多中心联合研究方式建立参考区间。

5.2 建立参考区间的流程

5.2.1 基本流程

建立参考区间的基本流程如下：

- a) 确定参考区间的适用人群，选择合适的研究方式；
- b) 确定影响分析物水平的因素：如地域、季节、生物节律、饮食、运动、体位、药物、标本类型、标本保存和运输条件等，明确影响检测结果的因素和生物学变异来源；
- c) 根据预期是否需要按性别、年龄等因素分组，以及设定的置信区间，计算合适的参考个体数量；
- d) 制定参考个体筛选标准（纳入和/或排除标准），设计参考个体筛查流程，确定合适的参考个体；
- e) 制定各实施环节的标准操作规程，培训相关人员；
- f) 由参与者签署知情同意书，填写调查问卷，进行体格检查以及影像学检查、物理检查、实验室检查等（必要时）；
- g) 根据调查问卷和既定的健康评估结果对潜在的参考个体进行分类，初步筛选符合纳入标准的参考个体；
- h) 采集参考个体标本并检测；
- i) 分析参考值数据，绘制散点图观察数据分布特征及变化趋势，绘制直方图观察频数分布类型；识别可能的数据错误和/或异常值，剔除离群值；
- j) 分析参考值，采用适宜的统计方法，计算参考区间的上限、下限及其置信区间；记录以上各步骤和过程。

5.2.2 多中心参考区间研究基本要求

除应满足本标准第5.2.1条要求外，还应保证：

- a) 控制多中心研究的分析前变异：如标本采集、标本保存、运输、离心、处理条件、受试者采样前准备等应保持一致；
- b) 控制多中心研究的分析变异：应根据制定的标准化质量控制程序，评估和保证研究用分析系统的检测性能满足要求；应保证多中心检测的标准化和/或一致性。理想情况是通过包含两个及以上可互通（无基质效应）的参考物质或参考方法定值的物质，对各中心检测结果进行正确度验证，结果在可接受范围内；应监控研究用分析系统的室内质控数据，以及其在全球/全国同一产品质控数据评估中的表现（如可获得），保证其能代表该分析系统的总体水平；
- c) 控制多中心研究的分析后变异：保证数据采集、录入及处理等过程的标准化。

5.3 参考个体选择

5.3.1 参考个体来源

应保证参考个体的代表性，理想情况下，宜按随机抽样方法选择参考个体。用于参考值检测的个体应涵盖各年龄组，不应集中在某一年龄段，以保证参考人群代表性。除非是特殊设计需要，否则不宜选择住院或门诊病人。

5.3.2 参考个体的排除标准

筛选参考个体时，应排除对结果有影响的因素，并设计详尽的调查表以排除不符合要求的个体，相关示例见本标准附录B。针对不同的检验项目筛选标准不尽相同，主要考虑因素见表1：

表1 筛选参考个体考虑的排除因素

疾病史	慢性病史	生活史	饮酒
	手术史		吸烟

表1 筛选参考个体考虑的排除因素（续）

疾病史	输血史	生活史	吸毒
	近期疾病（如急性感染、外伤等）		妊娠或哺乳
用药史	处方药		特殊饮食（如素食、节食等）
	非处方药		运动（近期剧烈运动）
	避孕药	环境因素	特殊职业暴露等
	维生素、保健品等	遗传因素	家族史
体格检查	异常血压、BMI 等	辅助检查	异常影像学、实验室检查结果
注：本表仅列举了筛选参考个体常考虑的排除因素，临床实验室应根据每个检验项目的特点及影响因素增加或减少排除因素，以制定科学合理的筛选标准。			

5.3.3 参考个体的分组

根据所筛选参考个体的特征进行分组。最常用的方式是按性别或年龄分组，下面是常见分组因素：

- 年龄（如新生儿、儿童、成人及老年人）；
- 性别；
- 种族；
- 地域；
- 昼夜节律（呈脉冲释放的激素，如皮质醇激素）；
- 月经周期（如性激素）；
- 妊娠时期的不同孕周；
- 空腹或非空腹。

5.4 参考标本分析前因素

5.4.1 分析前准备内容

参考标本分析前准备包括参考个体的状态、标本采集方式、标本的离心、处理与保存等方面见表2。

表2 分析前考虑因素

受试者	标本采集	标本处理
饮食要求	采集装置和添加剂	运送方式、运送时间
禁食或非禁食	采集环境（如温度）	标本状态（有无溶血、脂血等）
空腹时间	采集时间	血清、血浆的分离要求（离心转速）
药物禁忌	采集体位	标本保存（温度、时间等）
吸烟	标本类型	分析准备（人员、仪器、试剂、校准品、质控品等）
饮酒	采集量	检测系统（方法学、分析性能等）
运动或活动	采集操作（如采血是否顺利、止血带使用时长、采血管顺序、颠倒混匀是否充分等）	
采样前静息时间		
压力或情绪波动		
生物节律		

5.4.2 参考个体数量

以非参数方法估计参考区间，至少需要120例（剔除离群值后），若需分组则每组至少120例。120例样本例数为参考区间建立的最低样本量要求，临床实验室在实际操作过程中还应结合待建立检验项目

的数据分布特征，如呈明显偏态分布时，应重新估算有效样本例数，适当扩大样本量以获取准确的参考区间。

5.4.3 标本采集

5.4.3.1 实验室应明确规定标本的采集、处理和保存要求。

5.4.3.2 如果检测标本为血液标本，则应区分是动脉血、静脉血还是毛细血管血。如需使用抗凝剂、促凝剂，应明确抗凝剂、促凝剂的种类和浓度等。血液标本采集时，应按照 WS/T 224、WS/T 225、WS/T 359 和 WS/T 661 等相关行业标准、指南执行。

5.4.3.3 若为其他体液标本如尿液、脑脊液等，应按照 WS/T 662 等相关行业标准、指南规定的标本采集、处理和保存要求执行。

5.5 参考值数据的检测和统计分析

5.5.1 检测系统的要求

检测系统的要求如下：

- 实验室应至少对使用的检测系统的精密性、正确度、线性范围进行验证和评估；
- 实验室应开展室内质控，且每分析批质控结果在控，变异系数在允许范围内，要求参见 WS/T 641；
- 实验室应参加室间质评，成绩合格。要求参见 WS/T 644；
- 采用配套系统时，校准品应有明确溯源；采用非配套系统时，应与配套系统进行比对实验，偏倚在允许范围内；
- 标本检测严格按照生产厂商的要求或操作手册进行，并准确记录检测数据。

5.5.2 参考值分析

5.5.2.1 绘制散点图

绘制散点图进行初步判断：

- 评估参考值与某一连续变量（如年龄）是否存在相关性；
- 是否需按某一分类变量（如性别）分别建立参考区间；
- 是否存在潜在的离群值。

5.5.2.2 参考值分组

当考虑分组的因素为分类变量（如性别），可直接按该变量性质分成不同亚组；当考虑分组的因素为连续变量（如年龄），可通过视觉评估法等找到适宜的连续变量分组切点。参考区间的分组还需同时考虑分组后各组参考值之间的差异是否有统计学意义及临床意义。

a) 标准正态偏差检验

涉及单个分组因素时（如仅分析性别差异），可采用标准正态偏差检验（standard normal deviate test），也称 Z 检验来检验分组后的参考值分布差异有无统计意义，以确定是否需要分组。

$$Z = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- \bar{x}_1 ——第一组的均值；
- \bar{x}_2 ——第二组的均值；
- s_1 ——第一组的标准差；
- s_2 ——第二组的标准差；
- n_1 ——第一组的个数；
- n_2 ——第二组的个数；

$$S = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2} \dots\dots\dots (2)$$

Z 判断限值 (Z^*) 见公式:

$$Z^* = 3 \sqrt{\frac{n_{average}}{120}} = 3 \sqrt{\frac{n_1+n_2}{240}} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$n_{average}$ ——两组个数的均值;

若计算 Z 值超过 Z^* , 可以考虑分组; 另外如 $s_2 > 1.5 s_1$, 或 $\frac{s_2}{s_2-s_1} < 3$, 也可以考虑分组。

b) 嵌套方差分析

若同时涉及多个因素分组时, 可采用嵌套方差分析 (nested analysis of variance, nested ANOVA) 判断多组数据间均值差异有无统计学意义, 以确定是否需要分组, 相关示例见附录C。

5.5.2.3 对于统计结果提示参考区间存在性别、年龄等差异, 但临床意义并不明确时, 根据已有研究, 结合临床意见, 充分论证后决定参考区间是否按差异因素分组。

5.5.2.4 绘制频数分布直方图

针对分组后的参考值, 分别绘制频数分布直方图, 判断频数分布是否符合近似正态分布。如不符合, 可选择使用如Box-Cox转换或自然对数转换等方法进行数据的正态转换。

5.5.2.5 离群值判断及处理

a) Dixon 法

将检测数据按照大小排序并计算极差 (最大值与最小值之差) R, 然后分别计算最大值和最小值与其相邻数值之差D; 若 $D/R \geq 1/3$, 则将极端观察值视为离群值。剔除离群值后若样本量不足120例, 则需补足120例, 再重复上述步骤。

b) Tukey 法

Tukey法适用于近似正态分布的参考值, 如果参考值分布不符合近似正态时, 可以考虑采用Box-Cox正态转换。然后, 计算数据的Q1 (第25百分位数)、Q3 (第75百分位数) 及IQR (四分位间距, $IQR=Q3-Q1$)。分别计算离群值检测的上、下临界值: 下临界值= $Q1-1.5 \times IQR$; 上临界值= $Q3+1.5 \times IQR$; 临界值外的参考值均被视为离群值, 应剔除。如此迭代, 直至所有数据均落在上、下临界值范围内为止。剔除离群值后若样本量不足120例, 则需补足120例。

5.6 参考区间确定

5.6.1 参考区间统计方法

5.6.1.1 非参数法

无论数据是否服从正态分布, 均推荐采用非参数法。非参数法是参考区间估计的推荐方法。将n个参考个体的观察值按从小到大的顺序排列, $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$, x_1 及 x_n 分别为全部观察值的最小值和最大值, 把这n个秩次分为100等分, 与r%秩次相对应的数即为第r个百分位数, 以符号 P_r 表示。参考下限和参考上限的秩次可以分别用 $P_{2.5}$ 和 $P_{97.5}$ 表示。用 $r=0.025 \times (n+1)$ 和 $r=0.975 \times (n+1)$ 计算, 若计算值不是整数, 可将它们四舍五入后取整。

5.6.1.2 参数法

若数据服从正态分布, 或检测数据经转换后服从正态分布, 可按 $\bar{x} \pm 1.96s$ 表示 95%数据分布范围或 $\bar{x} \pm 2.58s$ 表示 99%分布范围。

5.6.2 参考限的置信区间

通常使用 Bootstrap 方法计算参考限的 90%置信区间。

6 间接法建立参考区间

6.1 间接法数据来源及要求

6.1.1 **特点：**主要基于医疗机构既有的检验数据进行研究。

6.1.2 **常见数据来源：**体检人群、献血人群、门诊患者或住院患者。使用来自相对健康个体的数据更适合使用间接法，如献血者、定期健康体检人群等。无论使用何种来源的数据集，应采用纳入、排除标准及有效的数据处理方法，排除对结果有影响的疾病人群数据。

6.1.3 **样本量：**间接法研究中，样本量介于 1000 例至 10000 例之间被视为小样本数据，10000 例及以上被视为大样本数据。实验室应根据研究指标的特点和分组需求进行有效样本量评估。

6.1.4 **数据稳定性：**在数据采集期间，应保证数据来源的检测系统分析性能稳定，量值传递未发生改变，精密性、正确度在实验室分析性能质量指标控制范围内。必要时需对室间质评及室内质控数据进行回顾性分析。

6.2 间接法建立参考区间的流程

6.2.1 数据清洗

剔除对拟建立参考区间检验指标有影响的相关疾病人群，以及其他临床检查、检测指标明显异常提示疾病者（如可获取）。如短期内出现多次重复测量数据提示疾病可能时，仅保留一次数据或全部删除。

6.2.2 数据转换

若清洗后的数据服从正态分布，可进行下一步离群值处理；若清洗后的数据呈偏态分布，应使用对数转换或Box-Cox等数据变换方式将其转成正态分布或近似正态分布的数据。

6.2.3 离群值处理方法

离群值处理常用方法包括茎叶图或箱式图、Tukey法、Grubbs检验法、Chauvenet准则、LAVE法等。实验室应根据待分析数据的特点选择合适的离群值处理方法。

6.2.4 统计方法

常用的统计方法包括参数法和非参数法、迭代法、Hoffmann法、Bhattacharya法、Robust法和TML法等。实验室应根据不同的数据来源及数据分布特点选择合适的统计方法。

6.2.5 新参考区间的验证

通过间接法建立的参考区间，应按照本标准第8.3条进行参考区间验证。

7 转移法获得参考区间

7.1 转移参考区间应满足的条件

7.1.1 分析前因素的可比性

转移参考区间时应注意分析前因素如参考个体准备、标本采集和处理要求等应与参考区间建立时的条件保持一致。

7.1.2 实验室服务人群的适用性

人群适用性是转移参考区间的前提条件，即用于建立参考区间的人群与待转移参考区间的人群一致，或者有证据表明两个人群的生理水平无明显差异。

7.1.3 分析系统的可比性

建立参考区间时的分析系统应为被公认为具有良好检测性能的分析系统。实验室分析系统与待转移参考区间建立时采用的分析系统使用相同或相似的溯源标准，具有相近的精密度和分析特异性，检测结果具有可比性。

7.2 转移参考区间的程序

7.2.1 选择合适的参考区间来源：卫生行业标准发布的基于不同检测系统的参考区间、实验室之前使用的参考区间等。

7.2.2 评估转移参考区间的可行性：实验室使用临床新鲜标本在分析物稳定的时间范围内，同一时间进行分析系统间比对。比对样本量应 ≥ 100 例，比对样本的浓度应均匀分布，覆盖参考区间上限和下限，避免极端浓度。系统间的比对结果具有良好的相关性。使用散点图和偏差图（数值和百分比偏差）确定数值分布类型，如恒定SD、恒定CV、混合变异等。根据数据特点选择适宜的回归方程，如Deming回归、加权Deming回归、最小二乘法、Passing-Bablok回归等。

7.2.3 新参考限的计算：原参考区间的上、下限作为自变量代入线性回归方程，获得新参考区间的上、下限。

7.2.4 新参考区间的验证：通过转移参考区间方法获得新的参考区间后，应按照本标准第8.3条进行参考区间验证。

7.2.5 转移参考区间时，应注意以下问题：

- a) 若分析系统间检测结果的溯源性或分析特异性存在差异，检测结果不可比，不推荐转移法获得参考区间；
- b) 转移参考区间结果受比对样本数量、浓度分布范围、检测系统（仪器、试剂和校准品）性能和状态、比对数据相关性和统计方法等因素的影响，实验室进行转移参考区间时应充分考虑上述因素。此外，当使用线性回归方法进行转移时，如转移方程的截距值相对于待转移的参考限较大时，不建议转移；
- c) 参考区间转移的前提还应注意两系统间的可比性。通过线性回归方法进行转移时，如 $r^2 < 0.70$ ，不建议转移。当偏差图显示为恒定SD，若 $0.70 \leq r^2 < 0.95$ 时，推荐使用Deming回归；若 $r^2 \geq 0.95$ 时，推荐使用最小二乘法的线性回归（OLR）；当偏差图为恒定CV，推荐使用加权Deming回归；当偏差图显示为混合变异，推荐使用Passing-Bablok；当偏差图显示为异常结果（垂直偏态分布），推荐使用Passing-Bablok。

8 参考区间评估和验证

8.1 参考区间评估

如果实验室拟采用参考区间评估的方式来决定是否引用特定来源的参考区间时，实验室应保证服务的目标人群和其他分析前因素的可比性，如参考人群地域分布、参考个体和标本类型的选择、标本采集方法和标本处理程序等；分析中因素的可比性，如具有相同或相近的溯源性、分析特异性、结果一致性等。在此基础上，经过临床论证通过后，可引用该来源的参考区间，并形成评估报告。

8.2 小样本验证

实验室在应用参考区间前，应从本地参考人群中筛选少量参考个体，将其测得值与参考区间进行比较，验证待使用参考区间的适用性：

- a) 筛选合格的参考个体每个分组至少20例（性别、年龄分布应均衡）。筛选标准参照参考区间建立时应用的标准；
- b) 按照本实验室操作程序采集、处理、检测标本，检测前需保证分析系统性能符合相关要求；
- c) 采用Dixon方法检查并剔除离群值，方法详见本标准第5.5.2.5条。若剔除离群值后样本量不足，则需予以补足；

- d) 验证结果的判定方法：在参考区间之外的验证数据不超过 10% 为通过验证；若超过 10% 的数据在参考区间之外，则另选至少 20 例合格参考个体，重新按照上述判断标准进行验证。以选择 20 例合格的参考个体为例：
- 1) 将 20 个检验结果与参考区间比较，若在参考区间之外的数据不超过 2 个（10%），则通过验证；
 - 2) 若 3-4 个数据位于参考区间外，则另选 20 例合格参考个体重新按照上述判断标准进行验证；
 - 3) 若超过 5 个以上数据位于参考区间外，或另选 20 例合格参考个体中有超过 3 个数据仍位于参考区间外，则参考区间验证未通过。
- e) 如验证通过，可引用该参考区间；如验证未通过，实验室应从参考个体和分析质量两方面进行重新评估：
- 1) 实验室应首先分析纳入验证的参考个体数据。若经离群值分析和剔除，仍有参考个体存在多个指标明显异常时，应进行充分评估以决定是否纳入验证；
 - 2) 实验室应重新评估分析质量，尤其是正确度，若证实是分析系统导致的检测质量问题，应改进或更换分析系统。分析质量评价可采用（但不限于）下列方式：分析具有互通性的有证标准物质或其他适宜的参考物质；参加适宜的正确度验证计划或标准化计划；与性能可靠的其他系统或方法进行比较；
 - 3) 若证明是人群差异导致的验证不通过（如特定高海拔地区、特殊生活习惯地区等），应建立或引用适合本地区人群的参考区间。
- 注1：即使验证数据在参考区间以外不超过10%，若这些数据均集中分布在单侧参考限附近，可能存在抽样偏差，宜采用大样本验证。
- 注2：小样本验证更适用于直接法建立的参考区间验证，采用间接法和转移法获得参考区间的验证时宜采用大样本验证。

8.3 大样本验证

对于某些重要检验项目的参考区间以及采用间接法或转移法获得的参考区间，实验室宜增加参考个体的样本量来进行验证（如每个分组 $n \geq 60$ ）。将其测得值与参考区间相比较，操作方法与验证结果判定同本标准第 8.2 条小样本验证。

8.4 注意事项

参考区间验证通过后，实验室在变更参考区间时的注意事项详见本标准附录 D。

附 录 A
(资料性)
参考区间相关问题

A.1 参考区间与医学决定水平

参考区间与医学决定水平应注意以下问题：

- a) 每一个定量的临床检测结果应与适当的参考区间相比较。在检测结果的报告中，应标注检测的方法，而不只是参考区间。需要时所确定的参考区间应反映亚组的区分，如性别、年龄等，尤其对于特殊群体，亚组的区分具有重要的意义。在报告中应使用术语“参考区间”，而不是使用“正常值”或“参考范围”；
- b) 医学决定水平是对疾病诊断、治疗或排除起决定作用的某一被测成分的浓度。医学决定水平不同于参考区间，既可以用于疾病诊断，还可以对疾病进行分级或分类，或对预后做出判断，其建立方式与参考区间不同，更依赖于循证医学研究；
- c) 描述参考群体和参考区间应文件化。当检测的变化影响参考区间时，应随时更新文件，并详细记录参考区间变化的原因，包括参考群体的数量、统计学分析、健康标准的评估、参考样本的排除和纳入标准以及分析使用的检测方法等。

附 录 B
(资料性)
参考个体调查问卷示例

参考个体调查问卷见表B.1。

表B.1 参考个体调查问卷

姓名：_____ 民族：_____ 性别：_____ 年龄：_____岁
 体重：_____ 身高：_____cm 出生地：_____ 电话：_____
 邮箱：_____ 现住址：_____

调查内容	调查结果
1、您觉得自己健康吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是
2、您有明确诊断的疾病吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述：
3、您最近有生病吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述：
4、您最近2周有服用处方药吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述原因及药物名称：
5、您近期有服用维生素或保健品吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述名称和最近一次服用时间：
6、您近期有献血吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述献血时间：
7、您是素食者吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是
8、您在减肥吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是，如果是，请描述减肥方法：
9、您吸烟吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述吸烟频次和数量：
10、您饮酒吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请描述酒的类型、饮酒频次、每次饮用量：
11、您工作环境经常接触有毒、有害物质吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是，如果是，请描述：
12、您家族是否有遗传性疾病？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是，如果是，请描述：
只限女性回答： 您还有月经吗？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是 如果是，请填写末次月经时间：
您是否处于妊娠期？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是
您是否处于哺乳期？	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是
注：临床实验室应根据研究的检验项目，适当增减或细化调查内容和调查结果。	

附录 C (资料性)

采用嵌套方差分析进行分组分析的示例

若同时涉及的多个因素之间存在嵌套关系,且最低水平的因素在其嵌套下的上一层高水平因素下也存在差异,应使用嵌套方差分析(nested analysis of variance, nested ANOVA)进行分析。如在进行多中心研究时,分别在甲省和乙省各抽取3家医院作为研究中心,命名为中心1-6。各中心分别筛选一定数量的参考个体,进行某项指标的检测,检测值记录为 $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ 。整理见表C.1。

表C.1 数据整理样表

省份	甲省(对应中心1-3号)			乙省(对应中心4-6号)		
中心名称	中心1	中心2	中心3	中心4	中心5	中心6
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	X_{12}

	X_n

其中检测个体间差异记录为 $SD_{\text{个体}}$,研究中心间差异记录为 $SD_{\text{中心}}$,省份间差异记录为 $SD_{\text{省份}}$ 。如 $SDR_{\text{中心}}$ ($SDR_{\text{中心}} = SD_{\text{中心}}/SD_{\text{个体}}$)大于0.3,则考虑各分中心均值存在差异,推荐按分中心分组,反之可合并。如 $SDR_{\text{省份}}$ ($SDR_{\text{省份}} = SD_{\text{省份}}/SD_{\text{个体}}$)大于0.3,则考虑各省份均值存在差异,推荐按省份分组,反之可合并。

考虑到nested ANOVA的局限性(即对分组后区间的上限/下限差异不够灵敏),在 $SDR < 0.3$ 的情况下,应计算Bias Ratio作为是否分组的依据。

参考区间上限的Bias Ratio定义为:

$$\text{Bias ratio of UL (BiasUL)} = |UL_{\text{group1}} - UL_{\text{group2}}| / \{(UL_{A11} - LL_{A11})/3.92\}.$$

式中:

UL——参考上限;

LL——参考下限;

参考区间下限的Bias Ratio定义为:

$$\text{Bias ratio of LL (BiasLL)} = |LL_{\text{group1}} - LL_{\text{group2}}| / \{(UL_{A11} - LL_{A11})/3.92\}.$$

当Bias Ratio > 0.375时,考虑分组。

上述结果,若 $SDR < 0.3$ 且Bias Ratio < 0.375时,则不考虑分组;若 $SDR < 0.3$ 且Bias Ratio > 0.375时,则考虑各亚组间参考限值存在差异,推荐按区组因素分组。

附 录 D
(资料性)
变更参考区间注意事项

- D.1 实验室变更参考区间前应与相关临床科室进行充分沟通、论证。
- D.2 实验室应将参考区间变更情况报医务部门审批、备案。
- D.3 实验室在参考区间变更前应将变更信息及时告知临床医护人员、实验室人员及药物临床试验管理规范机构等。
- D.4 实验室应保证变更前检验报告单中的参考区间不被更改。
- D.5 参考区间变更后，实验室应与临床科室保持密切联系，追踪参考区间变更后临床应用效果，及时发现、解释和解决参考区间使用过程中遇到的问题。

参 考 文 献

- [1] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, 3rd Edition, EP28-A3c, 2010.
- [2] Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, et al. IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits. Indirect methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin Chem Lab Med.* 2018, 57(1):20-29.
- [3] 孙振球. 医学统计学3版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] 沈隽霏, 宋斌斌, 潘柏申. 间接法建立生物参考区间. *检验医学*, 2015, 30(04):391-396.
- [5] McDonald JH. Tests for one measurement variable. Nested anova. *Handbook of Biological Statistics*, 3rd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, 2014.
- [6] Peng X, Lv Y, Feng G, et al. Algorithm on age partitioning for estimation of reference intervals using clinical laboratory database exemplified with plasma creatinine. *Clin Chem Lab Med.* 2013, 28;56(9):1514-1523.
- [7] Grecu DS, Paulescu E. Quality assurance in the laboratory testing process: indirect estimation of the reference intervals for platelet parameters in neonates. *Clin Biochem.* 2014, 47(15):33-7.
- [8] Holmes DT, Buhr KA. Widespread incorrect implementation of the Hoffmann method, the correct approach, and modern alternatives. *Am J Clin Pathol*, 2019, 151(3):328-336.
- [9] Arzideh F, Wosniok W, Gurr E, et al. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med.* 2007, 45(8):1043-1057.
- [10] Yamamoto Y, Hosogaya S, Osawa S, et al. Japanese Association of Medical Technologists. Nationwide multicenter study aimed at the establishment of common reference intervals for standardized clinical laboratory tests in Japan. *Clin Chem Lab Med.* 2013, 51(8):1663-72.
- [11] Wang D, Yu S, Cheng X, et al. Nationwide Chinese study for establishing reference intervals for thyroid hormones and related tests. *Clin Chim Acta.* 2019, 496:62-67.
- [12] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline, 3rd edition, EP09-A3, 2013.
- [13] Estey MP, Cohen AH, Colantonio DA, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals from Abbott to Beckman, Ortho, Roche and Siemens Clinical Chemistry Assays: Direct validation using reference samples from the CALIPER cohort. *Clin Biochem.* 2013, 46(13-14):1197-1219.
- [14] Ichihara K, Ceriotti F, Kazuo M, et al. The Asian project for collaborative derivation of reference intervals: (2) results of non-standardized analytes and transference of reference intervals to the participating laboratories on the basis of cross-comparison of test results[J]. *Clin Chem Lab Med.* 2013, 51(7):1443-1457.
- [15] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Verification of reference intervals in the medical laboratory implementation guide; EP28-Ed3-IG, 2022.
-