

약물검사에서 관리시료의 농축을 이용한 보고 가능 범위의 설정에 대한 연구

녹십자의료재단 고객지원 및 QA¹ · 임상화학검사실²

장상우¹ · 김남용 · 최호성 · 박용원² · 윤근영²

A Study of Reportable Range Setting through Concentrated Control Sample

Chang, Sang Wu¹, Kim, Nam Yong., Choi, Ho Sung., Park, Yong Won², Yun, Keun Young²

*Technical Information & QA Division¹ and Clinical Chemistry Dept.²
Green Cross Reference Laboratories, Seoul, Korea*

This study was designed to establish working range for reportable range in own laboratory in order to cover the upper and lower limits of the range in test method. We experimented ten times during 10 days for setting of reportable range with between run for method evaluation.

It is generally assumed that the analytical method produces a linear response and that the test results between those upper and lower limits are then reportable. CLIA recommends that laboratories verify the reportable range of all moderate and high complexity tests.

The Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) and Laboratory Accreditation Program of the Korean Society for Laboratory Medicine states reportable range is only required for "modified" moderately complex tests. Linearity requirements have been eliminated from the CLIA regulations and from others accreditation agencies, many inspectors continue to feel that linearity studies are a part of good lab practice and should be encouraged.

It is important to assess the useful reportable range of a laboratory method, i.e., the lowest and highest test results that are reliable and can be reported. Manufacturers make claims for the reportable range of their methods by stating the upper and lower limits of the range.

Instrument manufacturers state an operating range and a reportable range. The commercial linearity material can be used to verify this range, if it adequately covers the stated linear interval.

CLIA requirements for quality control, must demonstrate that, prior to reporting patient test results, it can obtain the performance specifications for accuracy, precision, and reportable range of patient test results, comparable to those established by the manufacturer.

If applicable, the laboratory must also verify the reportable range of patient test results. The reportable range of patient test results is the range of test result values over which the laboratory can establish or verify the accuracy of the instrument, kit or test system measurement response.

교신저자 : 장상우, (우)135-260 서울특별시 강남구 포이동 164-10
녹십자의료재단 학술 및 QA
Tel : 02-578-0131 Ext.402
E-mail : johnmadams@hanmail.net

We need to define the usable reportable range of the method so that the experiments can be properly planned and valid data can be collected. The reportable range is usually defined as the range where the analytical response of the method is linear with respect to the concentration of the analyte being measured. In conclusion, experimental results on reportable range using concentrated control sample and zero calibrators covering from highest to lowest range were salicylate 8.8µg/dL, phenytoin 0.67µg/dL, phenobarbital 1.53µg/dL, primidone 0.16µg/dL, theophylline 0.2µg/dL, vancomycin 1.3µg/dL, valproic acid 3.2µg/dL, digitoxin 0.17ng/dL, carbamazepine 0.36µg/dL and acetaminophen 0.7µg/dL at minimum level and salicylate 969.9µg/dL, phenytoin 38.1µg/dL, phenobarbital 60.4µg/dL, primidone 24.57µg/dL, theophylline 39.2µg/dL, vancomycin 83.65µg/dL, valproic acid 147.96µg/dL, digitoxin 5.04ng/dL, carbamazepine 19.76µg/dL, acetaminophen 300.92µg/dL at maximum level.

Key Words: Reportable range, Test system, Good laboratory practice, Clinical Laboratory Improvement Amendments(CLIA)

I. 서 론

CLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendments)의 보고가능범위에 대한 정의는 “분석기, 시약, 검사R과정의 측정반응 중 유효하다고 보는 최저 하한치와 최고 상한치의 상관성을 초과하는 검사결과의 범위이다라고 정의하였다(문과 장, 2004) 보고될 수 있고 신뢰하는 최고치와 최저치 검사결과의 한계치는 실험계획을 통해서 검사방법의 유용한 분석범위를 평가하는데 중요하다

일반적으로 분석방법은 보고 가능한 최고치와 최저치의 범위내에서 검사결과가 직선성의 반응을 나타낸다 미국의 임상병리개선법률(CLIA, 88)에서는 검사실들이 보고가능범위를 검증할 것을 요구하고 있고 미국병리학회의 검사실인증(CAP-LAP)이나 대한임상병리학회의 검사실 인증(KSCP-LAP)에서도 검사방법의 최저치와 최고치에 대한 한계치의 설정과 검증자료를 요구하고 있다(문과 장, 2004).

보고가능범위란 “각 검사항목에 따라서 최고 측정가능한 수치와 최저측정가능한 수치의 설정이다”. 보고범위의 결정(reportable range determination)은 검사 전체시스템의 반응이 최저치에서 최고치까지 예측선을 따라서 초과하는 검사결과들의 범위를 결정하는 과정이다. 보고범위 결정과 검량보정검증 사이의 현실적인 차이나 보고가능범위의 검증은 보통 검체수가 많을수록 보고범위의 최고치와 최저치의 농도를 명확하게 해준다(문과 장, 2004). 즉 보고가능범위의 최저치와 최고치의 범위가 클수록 검사방법이 좋다고 할 수 있는 이유는 재검사에 따른 비용의 절감이다.

보고가능범위가 결정이 되면 검증은 상품화된 5점 검량법을 사용한다면 0%, 25%, 50%, 75%, 100%로 검사하고 그 목표치와의 사이에서 변이백분율을 구하고 직선성을 그려보고 비교하거나 상관계수를 검정하여 판단할 수도 있다. 실험시료를 3-5회 측정된 시료를 구하여 0%, 25%, 50%, 75%, 100%로 검사하고 회석하여 논리적 계산치와 실측치의 차이를 구하고 비교하면 된다(문과 장, 2004).

II. 재료 및 방법

1. 재료

상품화된 직선성 검증시료는 실험원가가 매우 높으므로 경제성을 고려하여 2003년 12월 2일부터 17일까지 녹십자의료재단에서 관리시료로 자가제조한 고치시료와 상품화된 zero calibrators를 대상으로 10일간 COBAS INTEGRA 800 System(Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA)을 이용하여 급간측정으로 TDM 검사를 실시하였다.

고치 시료는 lot number 651599 level III, COBAS-FP TDM Multianalyte Control을 사용하였고, zero calibrator는 Roche Diagnostics Corporation의 COBAS-FP phenytoin calibrator, theophyLine calibrator, phenobarbital calibrator, VANC calibrator, salicylate calibrator, carbamazepine calibrator, primidone calibrator, valproic acid calibrator, vancomycin calibrator, acetaminophen

calibrator, digoxin calibrator를 사용하여 검사를 하였다. 실험시약은 Roche Diagnostics 의 kit를 사용하였다.

2. 방법

1) 실험시료

보고가능범위의 실험시료에서 저치시료는 Roche Diagnostics Corporation의 COBAS-FP zero calibrators를 사용하였고 고치 시료는 COBAS-FP TDM Multianalyte Control level III를 사용하였다. 고치 실험시료의 제조방법은 보고가능범위를 근접하는 시료를 제조하기 위하여 salicylate, phenytoin, phenobarbital, primidone, theophylline, vancomycin, valproic acid, digitoxin, carbamazepine 검사에서는 일상적으로 5ml 대신 2ml로 용해하여 2.5배 농축하였다. Reportable range(RR)에 근접하는 농축시료는 vancomycin의 보고가능범위(RR)의 상한치가 80 μ g/mL였는데 83.65 μ g/mL이었고, salicylate의 보고가능범위상한치가 1000 μ g/mL였는데 관측치는 969.9 μ g/mL이었으며 primidone는 보고가능범위의 상한치가 24 μ g/mL였는데 관측치는 24.57 μ g/mL이었으므로 더 이상의 희석이나 농축방법을 선택하지 않고 그대로 사용하였다. 그러나 acetaminophen, phenytoin, phenobarbital, theophylline, valproic acid, digitoxin, carbamazepine 검사에서는 현저한 농축차이가 발생되어 phenytoin는 희석액 0.3ml에 시료 0.6ml을 혼합하여 보고가능범위 상한치에 근접하도록 조정하였고, phenobarbital는 희석액 0.5ml에 시료 0.5ml를 용해하고, theophylline는 희석액 0.4ml에 시료 0.5ml를 혼합하였으며, valproic acid는 희석액 0.4ml에 농축시료 0.6ml의 비율로 혼합하고, digitoxin는 희석액 0.4ml에 농축시료 0.6ml를 carbamazepine는 희석액 0.5ml에 농축시료 0.5ml를 혼합하였으며 acetaminophen는 희석액 100ml에 acetaminophen 300mg을 용해하여 사용하였다.

농축된 시료가 보고가능범위 상한치에 근접한 primidone, salicylate, vancomycin 검사에서는 더 이상 재처리 없이 사용하고, 상한치를 초과하는 phenytoin, phenobarbital, theophylline, valproic acid, carbamazepine, digitoxin 검사는 각기 31%, 51%, 40%, 37%, 54%, 36%를 낮추기 위해서 다시 희석하였으나 acetaminophen 검사는 너무 차이가 벌어져서 희석액 100ml에 300 μ g을 용해하여 보고가능범위 상한치에 근접하도록 하여 실험시료로 사용하였다.

2) 관리시료와 검량물질

Calibrator는 COBAS-FP Phenytoin 등의 Calibrators를 사용하였고, 관리시료는 acetaminophen, salicylate, phenytoin, carbamazepine, phenobarbital, primidone, theophylline, vancomycin, valproic acid 검사는 COBAS-FP TDM Multianalyte control를 사용하였으며 digitoxin 검사는 Roche TDM Online Digitoxin controls을 사용하였다. 신뢰성을 위해서 10개의 TDM 검사항목이 실험계획법(DOE)에 의하여 산출된 통계량의 관리허용범위 내에 들어오음을 확인하고 검사항목들에 대한 양 시료를 검사하였다.

3) 측정방법

측정물질들로서는 검사 kit의 Roche Diagnostics Corporation에서 제조한 kit를 사용하였으며 분석기는 COBAS INTEGRA 800을 사용하였다. 측정원리는 acetaminophen, salicylate 검사는 enzymatic method, phenytoin, carbamazepine, phenobarbital, primidone, theophylline, vancomycin, valproic acid 검사는 fluorescence polarization 검사법을 사용하였고, digitoxin 검사는 kinetic interaction of microparticles in solution(KIMS) 검사법을 사용하였다.

보고가능범위(RR)의 설정을 위하여 상한치와 하한치는 일차 between run으로 10일간 측정하고 그 평균치와 표준편차를 계산하고 평균치로부터 표준편차의 2배인 $\bar{X}+2s$ 를 그 범위로 하였다.

4) 실험방법

Table 1과 2에서와 같이 실험에 대한 측정기간은 일차 검사변이를 감소시키기 위하여 급간측정으로 10회 보고가능범위의 저치와 고치시료를 사용하여 실험하고 계산 방법은 각기 $\bar{X}+2s$ 를 적용하여 계산을 하였다.

III. 결 과

1. 보고가능범위의 하한치 결과

보고가능범위의 하한치는 Table 1과 같이 salicylate 8.8 μ g/dL, phenytoin 0.67 μ g/dL, phenobarbital 1.53 μ g/dL, primidone 0.16 μ g/dL, theophylline 0.2 μ g/dL, vancomycin

Table 1. Lower limit of reportable range with zero calibrators

Statistics	Test items(sample: zero calibrator)										
	No.	CARB	DIG	VANC	VALP	PHNY	PHNO	THEO	SALI	ACETA	PRIM
	1	0.3	0.62	1.3	3.2	0.6	0.6	0.2	6.2	0.7	0
	2	0.3	0.63	1.3	3.2	0.7	0.6	0.2	6.2	0.7	0.1
	3	0.4	0.65	1.3	3.2	0.7	0.7	0.2	3.2	0.7	0.1
	4	0.3	0.63	1.3	3.2	0.6	0.6	0.2	5.3	0.7	0
	5	0.4	0.63	1.4	3.2	0.9	0.6	0.2	4.6	0.7	0.1
	6	0.5	0.63	1.3	3.2	0.8	0.6	0.2	3.6	0.7	0
	7	0.6	0.53	1.3	3.2	0.8	0.8	0.2	5.8	0.7	0
	8	0.2	0.57	1.3	3.2	0.8	0.9	0.2	9.3	0.7	0.1
	9	0.2	0.63	1.3	3.2	0.8	0.8	0.2	3.9	0.7	0.1
	10	0.2	0.45	1.3	3.2	0.9	0.6	0.2	4.1	0.7	0
Sum		3.4	5.87	1.31	32	6.1	7	2	52.2	7	0.5
Mean		0.26	0.07	1.3	3.2	0.61	1.25	0.2	5.22	0.7	0.05
s		0.052	0.21	0	0	0.032	0.14	0	1.79	0	0.053
LLO RR		0.36	0.17	1.3	3.2	0.67	1.53	0.2	8.8	0.7	0.16
Insert		0.12	0.17	1.39	3.15	0.61	0.6	0.16	2.6	0.7	0.03
Difference		0.24	0	-0.09	0.05	0.06	0.93	0.04	6.2	0	0.13

Legend: LLO AMR(Lower Limit of Reportable Range), $\bar{X} \pm 2s$

1.3µg/dL, valproic acid 3.2µg/dL, digitoxin 0.17ng/dL, carbamazepine 0.36µg/dL, acetaminophen 0.7µg/dL로 나타났으며 제조회사에서 제공하는 수치는 각기 2.6µg/dL, 0.61µg/dL, 0.6µg/dL, 0.03µg/dL, 0.16µg/dL, 1.39µg/dL, 3.15µg/dL, 0.17ng/dL, 0.36µg/dL으로 실험 실측치와 큰 차이가 없었으나 salicylate가 실측치에서 6.2µg/dL, primidone검사에서 0.13µg/dL이 더 높게 나타났다.

2. 보고가능범위의 상한치 결과

Table 2와 같이 보고가능범위 상한치의 실험결과는 salicylate 969.9µg/dL, phenytoin 38.1µg/dL, phenobarbital 60.4µg/dL, primidone 24.57µg/dL, theophylline 39.2µg/dL, vancomycin 83.65µg/dL, valproic acid 147.96µg/dL, digitoxin 5.04ng/dL, carbamazepine 19.76µg/dL, acetaminophen 300.92µg/dL이었으며, 공급업체공의 보고가능범위 상한치와 거의 일치한 검사항목들은 phenytoin, phenobarbital, primidone, theophylline, digitoxin, carbamazepine, acetaminophen이었고 차이가 나타난 검사항목들은 vancomycin +3.65µg/dL, valproic acid -2.04µg/dL, salicylate -30.1µg/dL로 나타났다.

IV. 고찰

신뢰할 수 있는 최저치와 최고치 검사를 보고할 수 있는 검사실의 검사방법의 분석범위를 평가하는 것은 중요하다(Wsetgard, 2003). 임상병리과학 분야에서 검사실 인증제도의 도입으로 body fluid 검사, 임상화학, 약물검사, 면역혈청검사에서 검사방법에 따라서 보고가능한 검사결과 범위가 정해져 있는가를 요구하고 현장조사를 한다 그리고 보고가능범위(reportable range: RR)는 검사실에서 직접 최소한 5점이상의 농도에서 직선성을 보이는가를 검증한 자료를 제시해야한다.

보고가능범위란 동일한 자동분석기의 model 이라도 분석기의 열화의 정도, 분석기의 중요한 부품의 교체, 검량물질의 변질과 교체, 시약의 lot number의 교체, 동일한 시약이라도 역가의 저하나 농축, 분석기의 lamp의 성능저하, 분석기의 model의 차이에 따라서 다르게 나타난다(문과 장, 2004). 그래서 CLIA, KSLM-LAP, CAP LAP의 검사실 인증심사에서는 보고가능범위를 매 6개월 단위로 재설정할 것을 요구한다(Rabinovitch, 2001).

이상적인 보고가능범위는 Table 1 및 Table 2와 같이 제시한 상·하한치에 근접한 실험결과치를 보여야한다

Table 2. Upper limit of reportable range with diluted multiple calibrators

statistics	test items(sample: zero calibrator)										
	no.	CARB	DIG	VANC	VALP	PHNY	PHNO	THEO	SALI	ACETA	PRIM
	1	16.6	4.8	79.4	138.1	36.8	58.1	38.1	933.2	298	24
	2	17.4	4.92	79.3	142.3	36.8	59.8	38.3	950.5	300.1	23.1
	3	17.4	4.92	80	144	37.4	58.3	37.4	972.5	297.1	23.2
	4	19.5	5	75.9	139	37.9	59.3	39	942.4	296.9	21.9
	5	18.4	4.95	70.6	145	36.8	60	38.5	942.9	297.6	24
	6	16.9	4.93	80	139	37.5	59.3	38.3	928	300	22.6
	7	17.5	4.9	75.7	144.7	37.9	59.3	38.4	945.9	298	23.3
	8	18.3	4.93	79	139.9	36.8	58.7	38.3	920.4	300.1	23
	9	19.1	4.8	76.6	145.1	36.9	58.4	37.8	924.5	297.1	22.2
	10	17.8	4.92	80	144.7	37.2	59.3	38.5	928.4	296.9	23.4
sum		178.9	49.1	76.5	1421.8	372	590.5	383	9388.6	2981.8	231.3
mean		17.9	4.91	77.65	142.2	37.2	59.1	38.3	938.9	298.2	23.13
s		0.93	0.064	3	2.88	0.45	0.64	0.45	15.5	1.36	0.72
ULO RR		19.76	5.04	83.65	147.96	38.1	60.4	39.2	969.9	300.92	24.57
insert		20	5	80	150	40	60	40	1000	300	24
difference		-0.24	0.04	3.65	-2.04	-1.9	0.4	-0.8	-30.1	0.92	0.57

Legend: LLO AMR(Lower Limit of Reportable Range), $\bar{X} \pm 2s$

본 실험에서는 하한치의 차이는 salicylate 6.2µg/dL, phenytoin 0.06µg/dL, phenobarbital 0.93µg/dL, primidone 0.03µg/dL, theophylline 0.04µg/dL, vancomycine -0.09µg/dL, valproic acid 0.05µg/dL, digitoxin 0.17ng/dL, carbamazepine 0.24µg/dL, acetaminophen 0.7µg/dL로 나타났으며 제조회사에서 제공하는 수치와 근접한 검사항목들을 보였으며 가장 큰 차이를 보이는 검사는 salicylate 이었으며 그 다음이 phenobarbital이었다.

회사제공의 보고가능범위 상한치와 거의 일치한 검사항목들은 phenytoin, phenobarbital, primidone, theophylline, digitoxin, carbamazepine, acetaminophen 검사에서는 매우 근접한 결과치를 보였고 차이백분율이 큰 검사항목들은 vancomycine +3.65µg/dL, valproic acid -2.04µg/dL, salicylate -30.1µg/dL로 나타났다.

보고가능범위의 계산방법과 결정에 대한 검증방법의 구체적인 내용에 대해서는 참고문헌의 ‘6 시그마 정도관리’와 ‘6 시그마 정도경영’을 참고하면 도움이 될 것이다. 중요한 핵심은 일단 보고가능범위가 결정되고 설정되면 그것을 검증하여 실측범위(working range)가 그 설정범위 내에 들어오는가를 확인하는 절차를 필히 거쳐야 한다는 것을 인식하고 있어야 한다. 제조회사에서 제공한 수치와

차이가 난 것은 고치시료의 선택이 중요함을 인식하였다.

V. 결 론

경제적인 보고가능범위를 설정하기 위한 실험결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 정도관리에서 사용되는 관리시료를 농축하여 사용하면 시료의 수집기간이 짧고 매우 경제적이거나 목표치와 동일하게 하려면 재 회석내지는 농축과정을 준수해야 한다.
2. 지정된 보고가능범위에 접근하는 상·하한치를 설정 하려면 실험시료의 선택이 매우 중요하다는 사실을 인식하였다.
3. 지정된 보고가능범위에 가장 근접한 검사항목은 phenytoin, phenobarbital, theophylline, digitoxin, carbamazepine, acetaminophen, valproic acid, vancomycine이었고 primidone 검사에서는 특히 하한치에서 변이백분율이 1900%로 나타났으며 상한치에서 가장 큰 변이를 보인 검사는 salicylate이었다.
4. Acetaminophen 검사에서는 관리시료를 농축하는데 한

계성이 있으므로 보고가능범위의 상한치에 접근하기 위하여 300 μ g/mL를 100ml에 용해하여 사용하는 불편이 존재하였다.

- 가장 이상적인 보고가능범위를 설정하려면 경제성 보다는 상품화된 검량물질들(linearity materials)을 사용하면 좋으리라고 사료된다.

참 고 문 헌

- Rabinovitch A. Commission on Laboratory Accreditation. Laboratory Accreditation Program. Automated/General Chemistry Checklist. p15, College of American Pathologists, Illinois, 2001
- Westgard JO. Basic Method Validation, Training in Analytical Quality Management for Healthcare laboratories 2nd ed. p88, Westgard QC Inc., Madison, 2003
- 문해란, 장상우. 요분석·특수화학·RIA검사의 정도관리. In 6 시그마 정도관리: 인증중심의 정도관리. p572, 퍼냄 흥 출판사, 서울, 2004
- 문해란, 장상우. 6 시그마 정도관리: 인증중심의 정도관리. p572-573, 퍼냄 흥 출판사, 서울, 2004
- 문해란, 장상우. 검사 kit의 평가방법. In 6 시그마 정도경영: 인증중심의 정도관리. p212, 퍼냄 흥 출판사, 서울, 2004
- 문해란, 장상우. 6 시그마 정도관리: 인증중심의 정도관리. p213-233, 퍼냄 흥 출판사, 서울, 2004