

ДЕМОНСТРАЦИЯ РАБОЧЕГО ДИАПАЗОНА И ВЕРИФИКАЦИЯ ЛИНЕЙНОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ И СИСТЕМ НА ОСНОВАНИИ МЕТОДОЛОГИИ ДОКУМЕНТА CLSI EP6-A.

В этом материале, мы рассмотрим, как на практике в условиях медицинской лаборатории можно выполнить демонстрацию рабочего диапазона и верификацию линейности методов в рамках аккредитационных требований ISO 15189. Методической основой наших рекомендаций будет документ CLSI EP6-A, на основании которого нами был подготовлен рабочий инструмент в формате электронных таблиц Excel. Здесь, как и ранее, этот инструмент мы будем использовать для более эффективного развертывания наших рекомендаций в практической плоскости.

Цель и сфера применения документа EP6-A.

Документ EP6-A разрабатывался рабочей группой по линейности комитета EP6-A для двух целей. Первая цель состояла в описании методологии определения линейности количественных процедур (методов) исследования. Вторая цель заключалась в описании применения этой методологии для верификации их линейности. В связи с этим, сфера применения документа достаточно широка. Документ может использоваться как производителями тест-систем (определение линейности), так и персоналом медицинских лабораторий (верификация линейности) количественных процедур (методов) исследования. Как правило, медицинские лаборатории проводят верификацию линейности количественных методов исследования в рамках проведения верификации методов или аналитических систем, то есть в процессе внедрения методов или аналитических систем в практику лабораторий, а также после проведения корректирующих мероприятий.

EP6-A: определение терминов.

Документ EP6-A содержит описание протокола проведения эксперимента по определению и верификации линейности количественных методов исследования, а также статистического анализа полученных данных. В то же время, в документе не указываются цели по допустимой величине нелинейности методов. В связи с этим, документ подчеркивает, что для интерпретации полученных данных, каждая лаборатория должна сама установить целевые значения допустимой нелинейности либо в виде половины величины допустимой общей ошибки определения аналита, либо в виде величины допустимого аналитического смещения данного метода. Документ EP6-A содержит следующие определения терминов, связанных с протоколом эксперимента, статистическим анализом данных и целями допустимой нелинейности количественных методов исследования:

- **Допустимая разница/Допустимая ошибка** – Величина аналитического отклонения, взятая из любых источников, которую пользователь может применять для оценки системы тестирования, и которая соответствует клиническим требованиям теста; ПРИМЕЧАНИЕ: Границы допустимого различия (ошибки) для одного наблюдения представляют в виде целевого значения образца плюс или минус величина допустимой ошибки.
- **Аналитическое смещение** – Разница между ожидаемым результатом тестирования и принятой референтной величиной. ПРИМЕЧАНИЕ: В целом, отклонение/различие основано на результатах повторных измерений с использованием утверждённого (дефинитивного, референтного или предназначенного для сравне-

ния) метода и тестируемого метода. Результат может выражаться в единицах или процентах (ISO-3534-1,1993).

- **Правильность** – Близость между величинами среднего значения, полученного на большой серии результатов измерений и принятого референтного значения. ПРИМЕЧАНИЕ: Как правило, величину правильности выражают количественно посредством статистического измерения величины аналитического смещения, которая обратно пропорциональна величине правильности.
- **Линейность** – способность (в пределах данного диапазона) обеспечить результаты, которые прямо пропорциональны концентрации (количеству) аналита в тестируемой пробе; ПРИМЕЧАНИЯ: а) Как правило, линейность отражает ответ всей системы (то есть скорее её финальный аналитический ответ, а не сырые инструментальные данные); б) Линейность системы измеряется посредством тестирования известных уровней аналитов при помощи разработки отношения или известного отношения их друг к другу (не обязательно точно известных); когда на графике против этих результатов откладывают результаты ответа системы, степень с которой построенная кривая соответствует прямой линии, является мерой изменения линейности системы.
- **Тестируемая система** – включает в себя весь процесс тестирования, то есть оборудование, образец, персонал, реагенты расходные материалы и процедуры; ПРИМЕЧАНИЕ: Также, тестируемая система состоит из таких атрибутов (характеристики метода) как тип прибы, температура тестирования, влажность и тд.
- **Процедура измерения** – набор описанных специфических операций, используемых при выполнении отдельных измерений в соответствии с данным методом (VIM,1993).ПРИМЕЧАНИЕ: б) Ранее, в этом документе (в предыдущих редакциях) использовался термин "Аналитический метод".
- **Линейный диапазон** – для этого документа - диапазон, в котором результаты тестируемой системы являются приемлемо линейными; то есть величины ошибки нелинейности в нем меньше величин ошибок, взятой за критерий неприемлемой нелинейности.
- **Диапазон измерения** – совокупность значений мезюрандов, для которых ошибка измерительного прибора предназначена лежать в заданных границах (VIM,1993). ПРИМЕЧАНИЯ: а) Для этого документа – диапазон значений (в единицах соответствующего аналита [мезюранда]), для которого выполнены критерии приемлемости; то есть где ошибки, связанные с нелинейностью, неprecизионностью или другими источниками лежат в пределах установленных границ; б) Ранее, в этом документе (в предыдущих редакциях) использовался термин "Рабочий диапазон".
- **Повторяемость (Повторяемость измерительной системы/прибора)** – способность измерения (системы/прибора) обеспечивать близость схожих показателей при повторном применении того же самого мезюранда в одинаковых условиях измерения (VIM,1993). ПРИМЕЧАНИЯ: а) Эти условия включают одинаковую процедуру измерения; одинаковое измерительное оборудование, используемое в тех же условиях, в том же месте, а также повторные измерения, выполненные в течение

короткого периода времени; б) Повторяемость может быть выражена количественно в виде характеристик дисперсии.

- **Линейное уравнение** - уравнение, описывающее прямую линию. ПРИМЕЧАНИЕ: Математически, линейное уравнение, как правило, представляют как $Y = a + bX$, где X и Y являются входной и выходной переменными, a - это пересечение прямой с осью Y , а b - это её наклон.
- **Линейная регрессия** – статистический расчёт, результатом которого является описание предполагаемой линии, связывающей величины независимой и зависимой переменных, при этом независимая переменная точно известна; ПРИМЕЧАНИЕ: а) Расчёт основан на математическом определении прямой ($Y = a + bX$) и математической минимизации вертикального расстояния между каждой точкой данных и прямой регрессии.
- **Регрессия наименьших квадратов** – метод статистического расположения полученной прямой или кривой среди данных так, чтобы сумма квадратов расстояний от каждой точки от прямой в перпендикулярном направлении по отношению к оси X (то есть, параллельно оси Y), была минимальной. ПРИМЕЧАНИЕ: Это позволяет сделать прямой расчёт коэффициентов и оценка их неопределённости.
- **Полиномиальная регрессия** – это регрессия наименьших квадратов с использованием полиномов различных порядков:
 - $Y = a + b_1X$ - Полином первого порядка (прямая линия);
 - $Y = a + b_1X + b_2X^2$ - Полином второго порядка;
 - $Y = a + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$ – Полином третьего порядка;
- **Стандартное отклонение Y относительно регрессии // Стандартная ошибка регрессии ($SD_{y,x}$)** – это мера дисперсии наблюдаемых величин зависимой переменной Y относительно рассчитанного среднего значения этой переменной \hat{Y} для всех величин предикторной переменной X .
- **Верификация** - подтверждение путем представления объективных доказательств того, что требования для специфического использования или применения были выполнены (ISO 15189).

Обзор экспериментального подхода документа EP6-A.

Протокол эксперимента основан на полиномиальной регрессии, поскольку, с одной стороны, это достаточно строгий статистический метод, а с другой – этот метод можно легко имплементировать при помощи электронных таблиц Excel. Полиномиальный подход является параметрическим, то есть допускает, что экспериментальные данные могут быть описаны математическим уравнением прямой линии или кривой, а случайная ошибка описывается нормальным распределением. В сущности, полиномиальный метод оценивает нелинейность, поскольку полиномы предназначены создавать графические модели для нелинейных систем. Поэтому, сначала, полиномиальная оценка допускает, что полученные экспериментальные данные являются нелинейными. В принципе, полиномиальный статистический метод оценки и верификации линейности работает в три главных этапа (Рисунок 1):

- На первом этапе, метод выполняет сравнительную оценку аппроксимации экспериментальных данных нелинейным и линейным полиномом, то есть, иными словами, будет или нет, нелинейный полином описывать экспериментальные данные лучше, чем линейный.
- На втором этапе, оцениваются различия между линейной и лучшей нелинейной аппроксимационными полиномиальными моделями и сравнивают эти различия с допустимой величиной нелинейности (величиной $\frac{1}{2}$ TEa) для данного аналитического метода.
- На третьем этапе, определяют концентрации, при которых линейность метода является приемлемой для клинического применения, и сравнивают их со спецификацией производителя метода по линейности. Результатом такого сравнения должна состояться либо нет верификация метода.

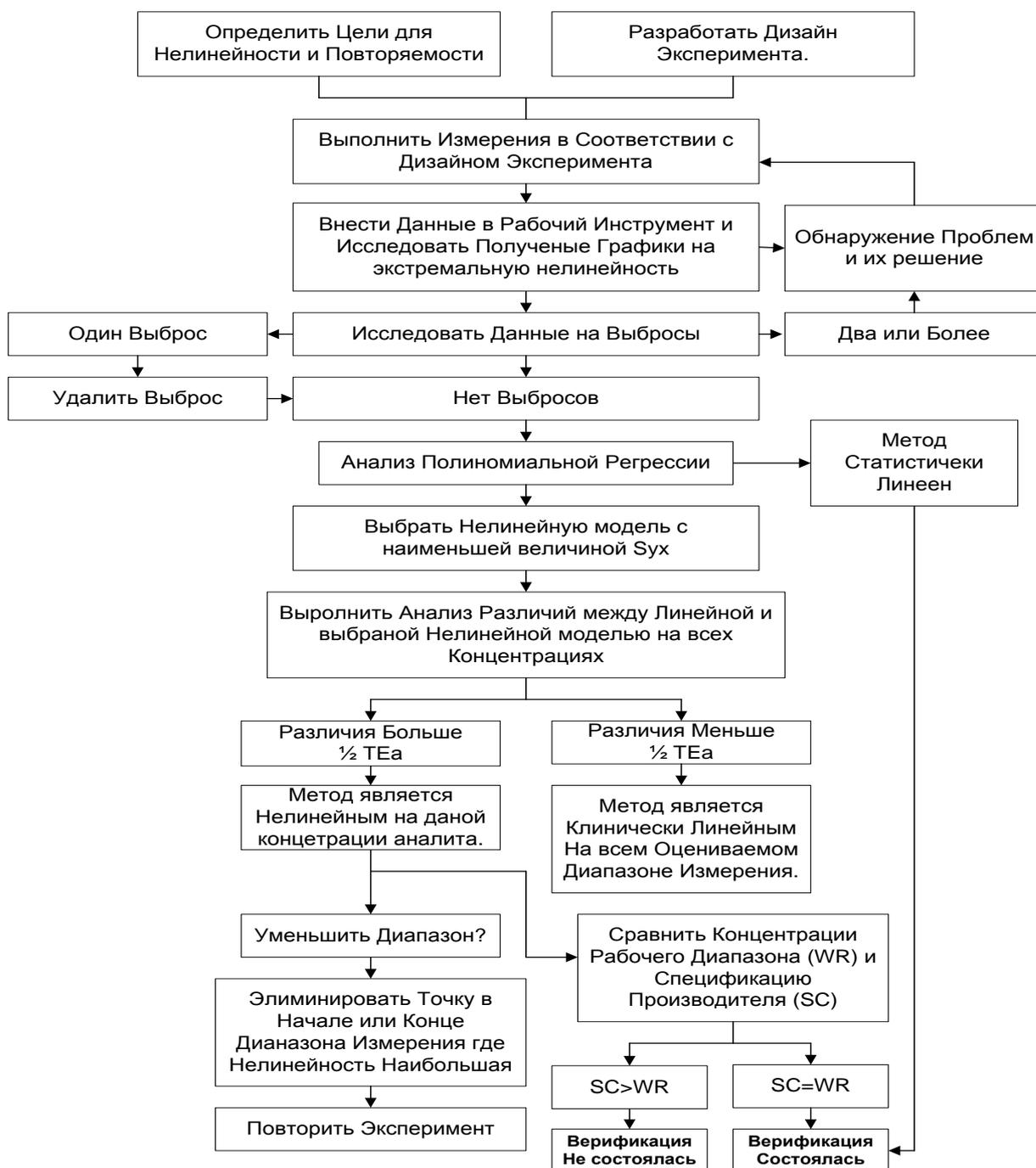


Рисунок 1 . Процесс выполнения эксперимента по верификации линейности аналитического метода в соответствии с документом CLSI EP6-A.

Если верификация линейности в рамках верификации метода исследования проводится на новой аналитической системе, то тогда для обучения операторов правильной на ней работе, то есть калибровке, ежедневному обслуживанию и рекомендованной производителем процедуре контроля качества, необходим ознакомительный период.

Время проведения эксперимента должно быть максимально коротким. Документ рекомендует выполнять эксперимент в течение одного рабочего дня.

Особое внимание документ уделяет требованиям к тестируемому образцу, используемому для выполнения верификационного эксперимента, а именно:

- Количество концентраций образца должно быть от 5 до 7, при этом концентрации должны покрывать весь линейный диапазон, указанный в спецификациях производителя. Минимальное количество концентраций должно быть 5, поскольку такое количество позволяет выполнить надёжную верификацию линейности метода, а также использовать полиномиальный метод.
- Матрикс образца должен быть схож с матриксом образцов пациентов, для которых предназначен верифицируемый метод, а также он должен быть свободен от интерферентов, указанных в инструкции производителя данного метода. В документе дана иерархия типов приемлемых матриксов экспериментальных образцов:
 - **Пулы образцов пациентов.** Позиционируется как идеальный матрикс с концентрацией аналита в одном пуле близкой к ожидаемой верхней границе рабочего диапазона. При этом, тестируемые образцы следует разводить другим пулом пациентов с концентрацией аналита близкой к ожидаемому нижнему пределу детекции данного метода.
 - **Пул образцов пациентов, используемый с рекомендованным дилюентом.** Здесь, пул образцов пациентов с концентрацией близкой к ожидаемой верхней границе рабочего диапазона разводят дилюентом, рекомендованным производителем для данного метода исследования.
 - **Пул образцов пациентов с добавлением аналита.** Добавляемый материал, содержащий аналит, не требует высокой степени очистки, при условии, что в нем будут отсутствовать интерферирующие вещества для данного метода. Если же интерферирующие вещества будут присутствовать, то тогда это следует отметить в отчете. Если в качестве добавляемого материала будет использоваться концентрированный раствор аналита, то тогда, в результате его добавления, пул образцов пациентов не должен быть разбавлен более, чем на 10%. Кроме этого, используемый растворитель также должен быть указан в отчёте.
 - **Пул образцов пациентов, разведённый подготовленным пулом образцов пациентов.** Эта подготовка, например диализ, термообработка и хроматография, заключается в снижении концентрации аналита. Здесь, следует помнить, что процедуры подготовки могут изменить аналит или матрикс физически или химически. В принципе, важно сохранить целостность матрикса, а не достичь низких уровней аналита просто путем разбавления.

- **Коммерческий Контрольный/Калибровочный/Линейный материал.** При использовании этого материала, с ним нужно работать точно так же как и с образцами пациентов.
- **Пул образцов пациентов, разведённый физиологическим раствором, либо другим диюлентом, который не рекомендован производителем метода.** При использовании этих образцов следует быть осторожными, поскольку такие диюленты могут изменить их матрикс. Здесь, разведения должны быть сведены к минимуму и впоследствии документированы.
- **Недоразведённый или сверхразведённый Коммерческий Контрольный Материал.** При использовании этих образцов, следует остерегаться матричных различий, которые могут повлиять на результаты эксперимента. Эти эффекты могут варьировать в зависимости от величины концентрации аналита. Разведения должны быть сведены к минимуму и их следует документировать. Также необходимо добиваться полного растворения материала.
- **Водные растворы.** При использовании водных растворов, их матрикс может влиять на работу метода, что, в свою очередь, может влиять на интерпретацию результатов эксперимента. Тем не менее, большое количество рутинных клинических методов откалиброваны при помощи водных материалов, концентрации которых можно принимать в качестве целевых значений.
- **Растворы, основанные на других растворителях.** Здесь, матричные эффекты более вероятны при использовании органических растворителей.

Как мы видим, для успешного выполнения эксперимента по верификации линейности и демонстрации рабочего диапазона верифицируемого метода в соответствии с документом EP-6A нужны следующие компоненты:

1. Тестируемый материал, желательно на основе человеческого матрикса.
2. Концентрации материала, как минимум 5 уровней, покрывающих весь диапазон линейности метода, указанный в спецификациях производителя.
3. Цель для допустимой нелинейности метода.
4. Компьютерная программа, необходимая для эффективной обработки статистических данных.

Далее, в ходе детального, пошагового описания верификационного эксперимента, мы будем опираться на рабочий инструмент, выполненный в формате электронных таблиц Excel. Этот инструмент предусматривает работу с материалом, как на основе человеческого матрикса, так и с коммерческим материалом для верификации линейности с пятью уровнями его концентраций.

Цели и задачи эксперимента по верификации линейности и демонстрации рабочего диапазона метода документа EP6-A.

- **Цель эксперимента по верификации линейности метода** - Получить объективные доказательства того, что требования к производителю по линейности метода выполнены.

- **Задача эксперимента по верификации линейности метода** - Получить специалистами лаборатории объективные доказательства того, что спецификация производителя метода по линейности, указанная в его инструкции, будет воспроизводиться в верификационном эксперименте, выполненном в этой лаборатории.

Пошаговое описание протокола эксперимента по верификации линейности количественных методов исследования документа EP6-A.

Пошаговое выполнение протокола эксперимента по верификации линейности количественных методов исследования документа EP6-A можно представить следующим образом:

- В день проведения эксперимента подготовить два пула образцов пациентов.
 - Первый - с концентрацией исследуемого аналита равной или превышающей на 20 - 30% величину концентрации верхней границы диапазона линейности, указанной в спецификациях производителя.
 - Второй - с минимальной концентрацией исследуемого аналита, приблизительно равной величине нижнего предела детекции метода.
- Внести концентрации и объемы полученных пулов в соответствующие ячейки рабочего инструмента прилагаемого к данному материалу, выполненному в формате электронных таблиц Excel (Рисунок 2), после чего, инструмент автоматически рассчитает требуемые объемы и расчетные равномерные концентрации промежуточных пулов тестируемого материала.

Pool N	Vol.Pool 1	Vol.Pool 5	Concentration (Units)
1	600		40
2	450	150	60
3	300	300	80
4	150	450	100
5	600		120

Рисунок 2. Места ввода информации об объемах и концентрациях пулов тестируемого материала в рабочий инструмент документа CLSI EP6-A.

- Внести в соответствующий журнал информацию об измерительном оборудовании (название, производитель, SN), реагентах, контролях, калибраторе (названия, производитель, лоты, сроки годности), а также о методе исследования.
- Выполнить калибровку метода и верифицировать ее при помощи выполнения Внутрिलाбораторного Контроля Качества (ВКК).

- Выполнить исследования концентрации аналита в пулах тестируемого материала в дубликатах и внести полученные результаты, а также название аналита, единицы измерения и фамилию оператора в соответствующие ячейки рабочего инструмента (Рисунок 3), после чего, инструмент автоматически рассчитает полученные экспериментальные данные.
- Внести в соответствующую ячейку рабочего инструмента величину допустимой нелинейности метода в виде величины Допустимой Общей Ошибки Определения Аналита (Рисунок 3).

Исследуемый Аналит **Повторы** **ФИО МедТехнолога**

CLSI EP06-A - Verification Working Range

Parameter	IgG	Replicates	2	Levels	5
Units	mg/dl	Days	1	Operator	Turkowski G

Единицы Измерения **Дни Исследования**

Средние Значения Результатов **Абсолютные Различия Результатов** **Различия Результатов в Процентах**

N	Dilution Scheme	Repeat 1	Repeat 2	Mean	Diff	Diff ² /2	%Diff	%Diff ² /2	Pooled SD	SD Результатов
1	L	Первый Результат	26,2	Второй Результат	0,3	Средние Различия Результатов в Процентах			2,8	SD Результатов
2	0,75L+0,25H	139	138	138,5	1		0,72	0,261	Pooled CV	CV Результатов
3	0,50L+0,50H	269	273	271,0	-4	8	1,48	1,089	0,9	
4	0,25L+0,75H	337	343	340,0	-6	18	1,76	1,557	Allowable TEa	
5	H	405	404	406,5	5	12,5	1,23	0,756	2,0	

Сюда Внести Результаты Измерения Пулов Тестируемого Материала.

Сюда ввести Величину Допустимой Ошибки Определения Аналита (TEa).

Рисунок 3. Места ввода начальной информации и результатов измерений тестируемого материала на основе пулов пациентов в рабочий инструмент документа CLSI EP6-A.

Следует отметить, что здесь мы описали выполнение экспериментального протокола с использованием тестируемого материала, основанного на пулах пациентов. Если же, будет использоваться тестируемый материал, основанный на специальных коммерческих материалах (Linearity Sets), то тогда протокол будет проще, поскольку не требуется выполнять его разведений. В этом случае, как правило, выполняют реконструкцию “бутылочных” лиофилизатов, после чего выполняют тестирование (Рисунок 4).

Приписанные Концентрации Аналита **Первый Результат** **Второй Результат**

Experimental and Input Data

N	Bottle Value	Repeat 1	Repeat 2	Mean	Diff	Diff ² /2	%Diff	%Diff ² /2	Pooled SD
1	50	50	50	Средние Значения Результатов	0	0	0,00	0,000	4,5
2	100	100	100	100,0	0	0	0,00	0,000	Pooled CV
3	150	145	155	150,0	-10	50	6,67	22,222	2,6
4	200	205	195	200,0	10	50	5,00	12,500	Allowable TEa
5	250	250	250	250,0	0	0	0,00	0,000	2,0

Сюда Внести Результаты Измерения Коммерческого Линейного Материала (Linearity Sets).

Сюда ввести Величину Допустимой Ошибки Определения Аналита (TEa).

Рисунок 4. Места ввода начальной информации и результатов измерений тестируемого материала на основе коммерческих наборов по верификации линейности методов (Linearity Sets) в рабочий инструмент документа CLSI EP6-A.

Статистический Анализ Экспериментальных Данных.

Как только в рабочий инструмент будут внесены результаты экспериментальных данных, он автоматически рассчитает статистику полиномиальной регрессии, а именно коэффициенты полиномов первого, второго и третьего порядков и Стандартную Ошибку Регрессии (S_{yx}) для них (Рисунок 6). Здесь, модель полинома первого порядка, представляющая собой прямую линию, призвана оценить является ли метод линейным или нет. Модель полинома второго порядка призвана аппроксимировать нелинейную зависимость с возрастающим или убывающим трендом на высоких концентрациях анализатора. Модель полинома третьего порядка также призвана аппроксимировать нелинейную зависимость, но возникающую на разных концентрациях анализатора, то есть аппроксимировать, так называемый “сигмовидный” ответ, то есть нелинейный ответ, возникающий на разных концах диапазона измерения. В принципе, если величины коэффициентов нелинейности полинома второго (b_2) и третьего (b_2 и b_3) порядков будут равны нулю, то тогда нелинейность в экспериментальных данных будет отсутствовать. Иными словами, ответ аналитической системы будет статистически линейным на всем протяжении диапазона измерения. Тем не менее, для верификации линейности диапазона измерения, важнее определить и оценить его клиническую, а не статистическую нелинейность (Рисунок 5).

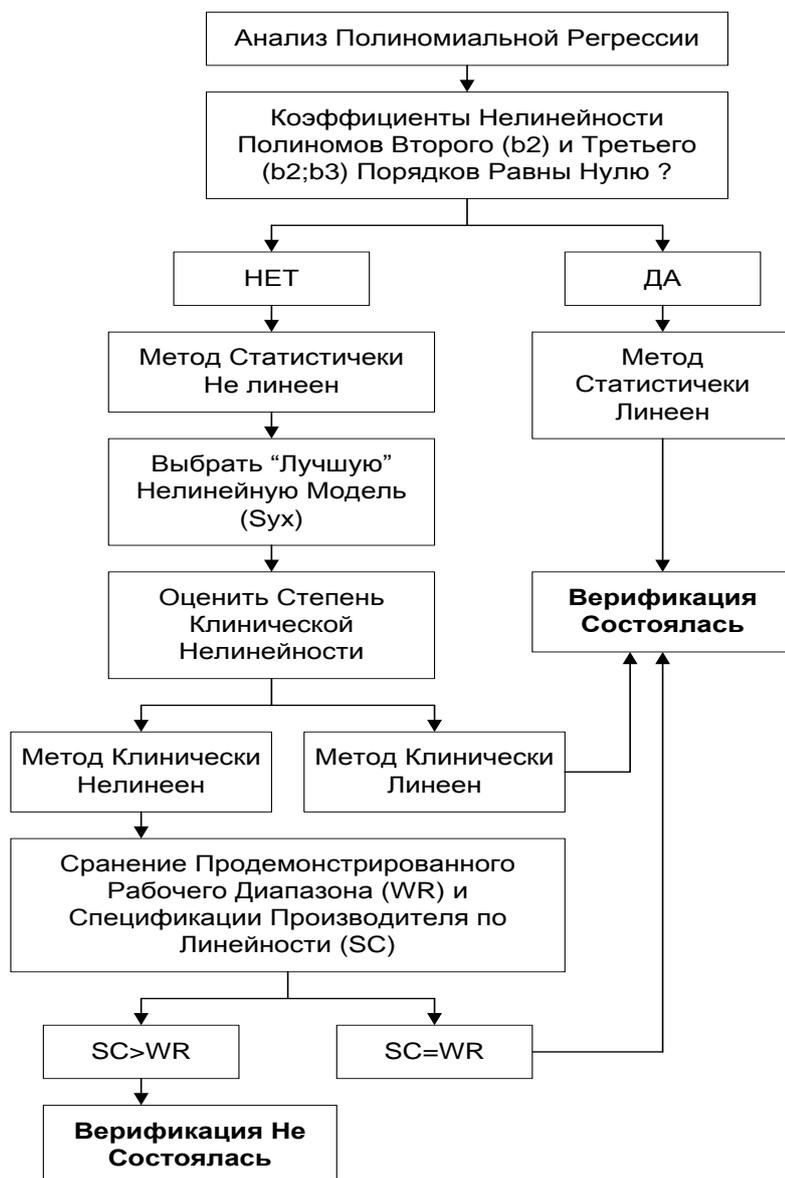


Рисунок 5. Процесс Статистического Анализа Экспериментальных Данных, выполняемых при помощи рабочего инструмента документа CLSI EP6-A.

Величина Стандартной Ошибки Регрессии (S_{yx}) – ключевой статистический параметр, необходимый для оценки лучшей нелинейной аппроксимации полиномиальными моделями полученных экспериментальных данных. Чем ниже её величина для данного полинома, тем лучше эта модель аппроксимирует нелинейные данные. На основании сравнения величины S_{yx} для разных моделей полиномов инструмент автоматически определяет и выбирает ту из них, которая лучше аппроксимирует полученные экспериментальные данные (Рисунок 6).

Важным мероприятием является анализ полученных данных на предмет выбросов. Документ рекомендует выполнять его на основании визуальной оценки построенных графиков. Если выброс случится, то тогда с ним работают в соответствии со схемой, продемонстрированной на Рисунке 1.

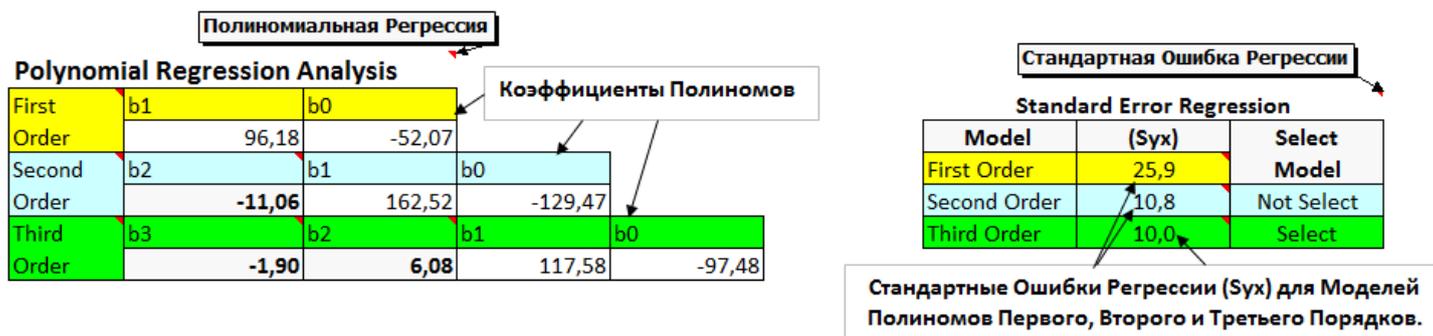


Рисунок 6. Анализ Полиномиальной Регрессии, расчет Стандартной Ошибки Регрессии для моделей полиномов первого, второго и третьего порядков и выбор нелинейной полиномиальной модели, которая лучше аппроксимирует экспериментальные данные.

Клиническая Оценка Степени Нелинейности.

Принцип клинической оценки нелинейности диапазона измерения заключается в сравнении величины различий между спрогнозированными результатами линейного и “лучшего” нелинейного полинома и половины величины Допустимой Общей Ошибки определения аналита (Allowable Total Error (TE_a)). Если эти различия для каждого результата будут больше величины $\frac{1}{2} TE_a$, то тогда в этой точке диапазон измерения метода будет клинически нелинейным, то есть неприемлемым для клиники. Соответственно, если эти различия для каждого результата будут меньше величины $\frac{1}{2} TE_a$, то тогда в этой точке диапазон измерения метода будет клинически линейным, то есть приемлемым для клиники. Это сравнение и оценку клинической нелинейности рабочий инструмент выполняет автоматически (Рисунок 7).

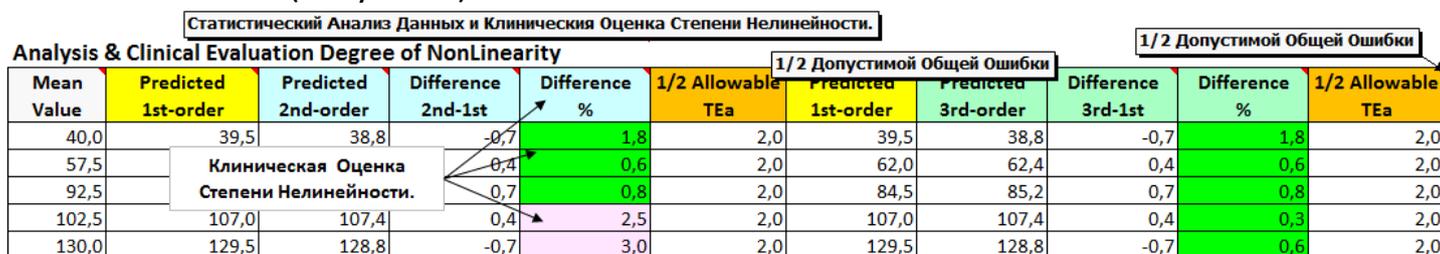


Рисунок 7. Анализ и клиническая оценка степени нелинейности, выполняемая в рабочем инструменте документа EP6-A. Если %Различий (Difference%) между линейной и “лучшей” нелинейной моделью полиномов будет меньше величины $\frac{1}{2} TE_a$, то тогда в этой точке(ax) диапазон измерения будет клинически линейным и будет автоматически выделен зеленым цветом. Если же %Различий (Difference%) между линейной и “лучшей” нелинейной моделью полиномов будет больше величины $\frac{1}{2} TE_a$, то тогда в этой точке(ax) диапазон измерения будет клинически нелинейным и будет автоматически выделен розовым цветом.

Здесь следует отметить, что в случае нелинейного ответа, документ EP6-A рекомендует изучить график зависимости концентраций от ответа (абсорбции) и локализацию на нем точек нелинейности. Тогда, если нелинейные концентрации будут находиться на обоих его концах, можно удалить из статистических расчетов точку, при которой степень клинической нелинейности наибольшая, после чего, статистические расчеты повторить. Эта процедура может помочь определить реальный диапазон измерения метода.

Процедура верификации линейности количественного метода исследования.

Процедура верификации метода основана на сравнении величин концентраций продемонстрированного в эксперименте рабочего диапазона метода, то есть диапазона, где линейность метода является приемлемой для клиники, со спецификацией производителя по линейности. Тогда, если эта спецификация будет шире величины этого клинически приемлемого диапазона, то верификация метода по линейности считается не состоявшейся. Если же спецификация производителя по линейности будет равна продемонстрированному рабочему диапазону метода, то тогда верификация метода по линейности считается состоявшейся.

Выводы.

- Документ EP6-A Института Клинических Лабораторных Стандартов (США) содержит методологию и экспериментальный протокол, позволяющий специалистам медицинских лабораторий эффективно выполнить эксперимент по демонстрации рабочего диапазона (диапазона измерения) метода (аналитической системы) и верификации его линейности.
- Эффективность выполнения эксперимента обусловлена строгостью статистического анализа экспериментальных данных, основанного на методологии полиномиальной регрессии.
- Статистическую обработку данных экспериментов, а также интерпретацию их результатов легко и удобно выполнить при помощи рабочего инструмента документа EP6-A, созданного в формате электронных таблиц Excel.

Литература.

1. CLSI EP6-A. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2003.
2. Kroll MH, Emancipator K. A theoretical evaluation of linearity. *Clin Chem.* 1993; 39:405-413.
3. Emancipator K, Kroll MH. A quantitative measure of nonlinearity. *Clin Chem.* 1993; 39:766-772.
4. Kroll MH, Emancipator K, Floering D, Tholen D. An algorithm for finding the linear region in a nonlinear data set. *Computers in Biology and Medicine.* 1999;29:289-301.
5. Kroll MH, Praestgard J, Michaliszyn E, Styer P. Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124:1331-1338.