

• 质控与标规 •

# 基于 ISO15189 要求的免疫学定性试验性能验证方法的探讨

江 涛, 李 军, 王昌富, 张国良, 艾红梅  
(荆州市中心医院检验医学部, 湖北荆州 434020)

**摘 要:**目的 根据 CNAS-CL39 的要求, 探讨定性试验的性能验证方法。方法 以 ELISA 法检测 HBsAg 为例, 以厂家给定的性能指标为验证依据, 根据空白检出限及样本检出限的验证方法对检出限进行验证, 按照 EP15-A2 标准验证该方法的精密程度, 采用验证方法与公认方法比较的 2×2 列联表验证该方法的符合率, 采用收集的 HBsAg 阴性患者血清对 cut off 值进行验证。结果 检出限、精密程度(重复性和中间精密程度)、符合率、诊断临界值的验证结果均符合要求。结论 本研究按照 ISO15189 和 CNAS-CL39 文件要求进行的免疫学定性试验性能验证方案是科学而适用的。

**关键词:**免疫学检验; 定性试验; 性能验证  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.033 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)03-0332-02

To investigate the verification method for immunological qualitative test performance based on ISO15189 requirements  
Jiang Tao, Li Jun, Wang Changfu, Zhang Guoliang, Ai Hongmei  
(Department of Laboratory Medicine, Central Hospital of Jingzhou, Hubei Jingzhou 434020, China)

**Abstract:** Objective To investigate the verification method for immunological qualitative test performance in accordance with CNAS-CL39 requirement. **Methods** HBsAg by ELISA method was taken as the example to verify the performance index based authentication methods, based on the detection limit of the blank and sample detection limit, according to the EP15-A2 standard authentication precision. A 2×2 contingency table was taken to verify compliance rate of the method, HBsAg-negative patients were used to verify the value of the cut off value. **Results** The detection limit and precision are in accordance with the rate, the cut off value validation results are in accordance with requirements. **Conclusion** CNAS-CL39 file based immunological qualitative test performance verification program is scientific and applicable.

**Key words:** immunology testing; qualitative tests; performance verification

近年来, 各大型医院实验室纷纷将通过 ISO15189:2007 实验室质量和能力的认可纳入到了实验室的发展规划中。在质量体系的构建中, 对试验方法进行方法学性能验证是实验室技术要求中非常重要的一环, 由于大部分标准化的验证方法均是针对定量检测而制定的, 而免疫学定性试验则缺乏标准化的验证方法, 导致许多实验室对于定性试验的验证内容和验证方法存在困惑。在 2013 年 4 月实施的 ISO15189 补充文件 CNAS-CL39 实验室质量和能力的认可准则在免疫学检验领域的应用中, 对免疫学定性检验方法的性能验证内容提出了具体的要求, 但仍没有提供标准的方法。本文根据 CNAS-CL39 的要求, 结合本实验室的情况, 以 ELISA 法检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)为例, 对定性试验的性能验证方法进行探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 国产酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HBsAg 试剂盒, 北京康彻思坦生物科技有限公司 HBsAg 标准物质(浓度 1 IU/mL)。随机收集 60 例乙型肝炎患者血清标志物全阴性新鲜血清和 60 例 HBsAg 阴性而有其他免疫标志物(HBsAb 和 e 系统)阳性的患者新鲜血清。

**1.2 检测仪器** 瑞士 Tecan 公司 RSP 100 全自动加样仪; 德国 Siemens 公司 BEP III 全自动酶免疫分析仪, 仪器均按 ISO 15189 质量体系技术要求校准。

**1.3 验证内容** 检出限、精密程度(重复性和中间精密程度)、符合率、诊断临界值。

## 1.4 验证方法

**1.4.1 检出限** 以 HBsAg 阴性质控物浓度作为空白检测限(LoB)浓度样本, 收集连续的 20 个检测批次的 HBsAg 阴性质

控物吸光度值(A 值), 与厂家给定空白检测限(LoB)A 值比较。将 HBsAg 标准物质经阴性血清稀释调整至厂家给定的样本检测限(LoD)水平, 本试剂盒给定 HBsAg LoD 为 0.2 IU/mL, 按常规标本检测, 收集连续的 20 个批次上述检测限水平血清测定 A 值。20 例阴性质控物 A 值高于厂家给定空白检测限小于或等于 3 次时为 LoB 验证合格; 20 例检测限水平血清的测定 A 值低于厂家给定空白检测限小于或等于 1 次为 LoD 验证合格<sup>[1]</sup>。

**1.4.2 精密程度** 将 HBsAg 标准物质(浓度 0.5 IU/mL)按照 CLSI EP15-A2 标准<sup>[2]</sup>, 连续 5 d 实验, 每天做一批, 每批 3 次重复测定, 计算重复性( $S_r$ )和中间精密度( $S_t$ )。计算公式(详见 EP15-A2 文件)为:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (X_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}, S_t =$$

$\sqrt{\frac{n-1}{n} \cdot s_r^2 \cdot s_b^2}$  其中 D 是总天数, n 是每日重复次数,  $X_{di}$  是第 d 天 i 次重复结果,  $\bar{x}_d$  是第 d 天所有结果的均值。

**1.4.3 符合率** 采用连续的 40 例卫生部和省临床检验中心 HBsAg 的能力比对数据(含阴性、阳性及弱阳性标本), 以卫生部和省临床检验中心所提供的室间能力比对“靶值”为公认方法的检测结果, 本实验室 HBsAg 检测数据与其进行比较(制定 2×2 列联表, 见表 3), 符合率 = 100%[(A+D)/(A+B+C+D)], 符合率大于或等于 80%为验证符合<sup>[3]</sup>。

**1.4.4 诊断临界值** 将 60 例乙型肝炎血清标志物全阴性的血清样本和 60 例 HBsAg 阴性而有其他免疫标志物阳性的患者新鲜血清标本分 3 批共 3 天进行检测, 计算均值( $\bar{x}$ )和标准

作者简介:江涛,男,主管技师,主要从事临床免疫学与检验的研究。

差( $s$ )。诊断临界验证值为  $\bar{x}+3s$ ,此值小于或等于厂家给定的诊断临界值为合格<sup>[4]</sup>。

1.5 统计学处理 所有数据均用 Excel 表记录并处理。

2 结 果

2.1 检出限验证结果 HBsAg 试剂厂家给定 LoB 吸光度值

为 0.10,20 次阴性质控物 A 值均小于 0.10,LoB 验证合格;20 次检测限水平血清 A 值均大于 0.10,LoD 验证合格,见表 1。

2.2 精密度验证结果 试剂厂家给定中间精密度为 CV (%)<15%,经计算,HBsAg 试剂的批内 CV(重复性)为 5.97%,中间精密度为 12.2%,验证合格。见表 2。

表 1 检出限验证结果

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
阴性质控物 A 值	0.009	0.030	0.012	0.013	0.014	0.015	0.007	0.006	0.010	0.018	0.015	0.009	0.007	0.010	0.007	0.007	0.007	0.006	0.010	0.012
检测限水平血清 A 值	0.145	0.157	0.160	0.143	0.184	0.156	0.178	0.165	0.140	0.151	0.141	0.156	0.145	0.164	0.146	0.157	0.137	0.144	0.140	0.135

表 2 精密度验证结果

项目	第 1 批	第 2 批	第 3 批	第 4 批	第 5 批
第 1 次	2.26	2.61	2.68	2.30	3.34
第 2 次	2.40	2.33	2.63	2.34	2.94
第 3 次	2.37	2.43	2.73	2.36	2.76
批均值	2.34	2.46	2.68	2.34	3.02

2.3 符合率验证结果 统计卫生部和省临床检验中心的比对数据总共 40 例,制定 2×2 列联表计算的符合率为 97.5%,验证合格。见表 3。

表 3 验证方法与公认方法比较的 2×2 列表( $n$ )

检测方法	公认方法		
	阳性	阴性	总数
阳性	19	0	19
阴性	1	20	21
总数	20	20	40

2.4 诊断临界值验证结果 试剂厂家给定诊断临界值为 0.105,120 例患者血清测定后计算得出验证值( $\bar{x}+3s$ )为 0.092,验证合格。

3 讨 论

随着国内检验医学总体水平的提高和医疗管理部门对医学实验室质量要求的提高,医学实验室质量和能力认可逐渐得到了各大型医院检验科的重视。ISO15189:2007 准则作为指导实验室建立质量体系的纲领性文件,其第 5.5.2 条款指出实验室应评估所选用方法和程序,在用于医学检验之前应证实其可给出满意结果<sup>[5]</sup>。在实验室检验方法中,免疫学定性试验应用广泛,但由于其结果不可溯源性及仅测出反应性(阳性)和无反应性(阴性),目前仍没有适用的完整而标准的性能验证方法。本研究根据 2013 年 4 月开始实施的补充文件 CNAS-CL39 实验室质量和能力的认可准则在免疫学检验领域的应用中对性能验证内容的要求,结合本实验室的实际情况,制定了切实可行的验证方案。

检出限评价的目的是评估检验方法所能检测到的分析物最低浓度,本研究根据空白检出限及样本检出限的验证方法对厂家给定的 HBsAg 的 LoB、LoD 进行验证,结果显示验证合格。

精密度是检验方法评估中最基本的评价指标,主要评价测

定结果的重复性,一般采用 CV 来反映精密度的好坏,由于免疫学定性测定过程中影响因素众多<sup>[6-7]</sup>,导致定性测定的变异系数普遍比定量测定方法高。现有的精密度评估方法均是针对定量试验方法而制定的,本研究在验证时采用 EP15-A2 的精密度验证方法,直接对验证标本的吸光度值进行计算,结果表明此验证方案是可行的,HBsAg 测定的重复性和中间精密度均符合厂家要求。

对于定性试验,只能用与结果明确标本的阴阳性符合率来评估其准确性,卫生部和省临床检验中心的能力比对样本可以被认为是诊断明确的样本,本研究收集 40 例 HBsAg 能力比对样本的比对结果,经 2×2 列联表计算符合率,结果显示验证合格。

对定性试验来讲,临界值是唯一的医学决定水平,所以定性试验临界值的高低,直接关系到试验结果的正确与否。本研究根据 CNAS-CL39 建议的验证方法,对 120 份验证标本进行测定然后计算  $\bar{x}+3s=0.092$ ,略小于厂家给定的诊断临界值 0.105,验证合格。

本研究按照 ISO15189 和 CNAS-CL39 文件的要求对 ELISA 法测定 HBsAg 的方法学进行性能验证,总结出全面、科学的免疫学定性试验性能验证方案。

参考文献

[1] 王治国. 临床检验方法方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:250-251.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. Wayne, PA:CLSI,2004.

[3] 胡良平. 检验医学科研设计与统计分析[M]. 北京:人民军医出版社,2004:168-184.

[4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL39:医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.

[5] 中国合格评定国家认可委员会. ISO15189:2007 医学实验室质量和能力的专用要求[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2008.

[6] 江涛,王昌富,李军. 349 例乙型肝炎病毒血清标志物复检结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(10):1269-1271.

[7] 葛君琍,王丽娜. 影响 ELISA 法检测乙型肝炎病毒血清标志物的因素[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):289-290.

(收稿日期:2013-11-25)