

· 论 著 ·

基于 CLSI EP12-A2 文件要求的乙型肝炎五项定性检测性能验证

唐恩跃¹, 何增品², 崔晓花², 杨永平², 熊秋霞^{2△}

(1. 云南省保山市人民医院检验科 678000; 2. 昆明医科大学第一附属医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 对昆明医科大学第一附属医院检验科免疫室酶联免疫吸附试验(ELISA)定性项目乙型肝炎(乙肝)五项进行性能验证。方法 采用 ELISA, 通过稀释乙肝五项各项目强阳性标本得到临界值浓度(C50)并验证其是否正确;采用各个项目 C50 - 20% ~ +20% 浓度范围的重复性实验验证其结果是否包含 C5 ~ C95 区间;用 C50 + 20% 浓度验证检测限;常规手工操作试验和 TECAN 全自动酶免检测两种方法检测 10 例阳性和 10 例阴性标本, 对其结果进行方法学比较及分析。结果 5 个项目 C50 验证正确;C50 - 20% ~ +20% 浓度范围包含了 C5 ~ C95 区间;检测限验证通过;5 个项目两种方法检测结果一致性检验 Kappa 系数均为 1。结论 本实验室乙肝五项定性检测使用方法及试剂盒相关性能均验证合格, 常规手工操作试验方法和 TECAN 全自动酶免检测方法两种方法学比较结果一致性较好。

关键词:乙肝五项定性检测; 性能验证; 酶联免疫吸附试验**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.022**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2016)24-3443-03

Performance validation of 5-item qualitative detection of hepatitis B based on requirements of EP12-A2 CLSI file

TANG Enyue¹, HE Zengpin², CUI Xiaohua², YANG Yongping², XIONG Qiuxia^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Baoshan Municipal People's Hospital, Baoshan,

Yunnan 678000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To perform the performance verification of 5-item qualitative detection of enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) in the immunology room of laboratory department of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University.

Methods The ELISA method was adopted. The strong positive samples of hepatitis B 5 items were diluted to the critical value concentration (C50) and its correction was verified; the repeated experiments with the C50 - 20% - +20% concentration range for the various items were adopted to verify whether the results including the C5 - C95 interval; the detection limit was verified by using the C50 + 20% concentration; 10 positive and 10 negative specimens were detected by the conventional manual operating test and TECAN fully automatic enzyme immunoassay detection, then the obtained results were performed the methodological comparison and analysis. **Results** The 5-item C50 verification was correct; the C50 - 20% - +20% concentration range included the C5 - C95 interval; the verification of detection limit was passed; the Kappa coefficient of 5-item consistency test in the results detected by two methods was 1. **Conclusion** The application method of hepatitis B 5-item qualitative detection and related performance of reagent kit all are qualified by verification. The methodological comparison results of the routine manual operation test and TECAN fully automatic enzyme immunoassay display good consistency.

Key words: five qualitative detection of hepatitis B; performance verification; enzyme linked immunosorbent assay

近年来,各大医院实验室将通过 ISO15189 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,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^[1]。定性项目的性能评价包括重复性评价(分析物浓度接近临界点时的重复性实验、批内重复性、批间重复性)、方法学比较(包括未知临床诊断的方法学比较和已知临床诊断的方法学比较)、检测限验证、特异性验证等。其中最主要的是分析物浓度接近临界点时的重复性实验和方法学比较两项评价。美国临床和实验室标准化协会(CLSI)颁布的 EP12-A2 文件《定性项目的性能评价》提出定性检测重复性须验证 3 个浓度值的临床标本,即 C50(临界点)、C5(低于 C50 浓度 20%) 和

C95(高于 C50 浓度 20%)。(1)C50:最佳条件下,处于和接近临界值的分析物浓度,多次重复检测此浓度的单一标本时,将获得 50% 的阳性结果和 50% 的阴性结果;(2)C5:检测浓度为 C5 的分析物时,将产生 5% 的阳性结果,用浓度 < C5 的标本进行重复性检测时,将持续得到阴性结果;(3)C95:检测浓度为 C95 的分析物时,将产生 95.0% 的阳性结果,用浓度 > C95 的标本进行重复性检测时,将持续得到阳性结果^[2]。昆明医科大学第一附属医院检验科免疫室参照 EP12-A2 文件对乙型肝炎(乙肝)五项进行分析物接近临界点时的重复性实验和方法学比较两项性能评价,同时验证检测限。

1 材料与方法

1.1 标本选择

1.1.1 质控品 阴性血清(自配)和标准血清质控品:HBsAg 临界质控品 0.2 IU/mL(201504002), 乙肝表面抗原(HBsAg)

0.5 IU/mL(201404002),乙肝表面抗体(HBsAb)10 mIU/mL(201411002),乙肝 e 抗原(HBeAg)1 NCU/mL(201404002),乙肝 e 抗体(HBeAb)1 NCU/mL(20148001),乙肝核心抗体(HBcAb)2 IU/mL(201409002)均产自康彻斯坦公司。

1.1.2 分析物接近临界点时的重复性实验

1.1.2.1 定性检测重复性须验证 3 个浓度值的临床标本,即 C50(临界点)、C5(C50-20%) 和 C95(C50+20%)。

1.1.2.2 如何获得系统或试剂的临界点(C50):检测试剂或系统说明书可能会注明分析物的临界浓度。如果临界浓度未知,可将阳性标本进行梯度稀释,然后对他们进行重复检测以确定能够获得 50% 阳性和 50% 阴性结果的对应稀释度,这一对应稀释度的分析物浓度即为临界点(C50)。

1.1.3 方法学比较 收集常规检测标本 20 例,其中阳性标本 7 例,弱阳性标本 3 例,阴性标本 10 例。

1.2 试剂与试剂 HBsAg 检测试剂(批号 201503081)、HBsAb 检测试剂(批号 201506081)、HBeAg 检测试剂(批号 201502021)、HBeAb 检测试剂(批号 201412411)、HBcAb 检测试剂(批号 201506081)均产自上海科华。仪器为瑞士 Tecan 公司生产的 Tecan Freedom Evolyzer-2 全自动酶免一体机、Thermo Multiskan MK3 酶标仪;深圳汇松公司生产的 PW-960 全自动酶标洗板机,仪器均按 ISO15189 质量体系技术要求校准。

1.3 方法

1.3.1 室内质控 如性能验证在 10 d 内完成,每次试验质控品重复检测 2 次,共提供 20 次重复检测结果;如果性能验证超过 20 d,则每一批次都要对每份质控品进行单次检测,总计提供 20 次重复结果。

1.3.2 分析物接近临界点时的重复性实验 将每个项目 S/CO 值在 3 左右的阳性标本用 0.9% 的生理盐水进行倍比稀释,将各稀释度进行 40 次重复检测(每个项目 C50 浓度 OD 值接近 CUT OFF 值),重复检测每个项目的 C50-20%、C50+20% 浓度标本各 40 次,确定每一浓度标本结果阳性和阴性的百分比。实验操作和结果判断严格按照说明书进行。

1.3.3 检测限验证 用 C95 浓度的标本,重复检测 40 次。

1.3.4 方法学比较 设定手工操作、MK3 比色为评价方法,TECAN 全自动酶免检测方法为靶方法,验证其符合率,分别用常规手工操作试验方法和 TECAN 全自动酶免一体机同时检测 20 例标本,分布于 10 d 内,按常规方法检测。

1.4 判断标准

1.4.1 室内质控 不合格批次在 10 d 内不应超过 1 次或 20 d 内不超过两次,如若超出,立即停止检测工作并咨询试剂制造商以确定原因并采取纠正措施。

1.4.2 分析物接近临界点时的重复性实验 判断标准见表 1,若 C50 验证合格,则说明 C50 估计正确,若 C50-20%、C50+20% 验证合格,则说明(C50-20%)~(C50+20%) 浓度包含了 C5~C95 的区间。

表 1 分析物接近临界点时的重复性实验判断标准

浓度	40 次测试	结论
C50	(14~26)/40(35%~65%)	正确
C50-20%	阴性结果≥36/40(90%)	验证通过
C50+20%	阳性结果≥36/40(90%)	验证通过

1.4.3 检测限验证 C95 浓度的标本重复检测 40 次阳性结果≥36/40 则验证通过。

1.4.4 统计学处理 计算 Kappa 系数评价其一致性,Kappa 系数大于等于 0.75,说明两种方法一致性较好,Kappa 系数在 0.40~0.75 则两种方法一致性一般,Kappa 系数小于 0.40 两种一致性较差。计算公式为 Kappa 系数=(Po-Pe)/(1-Pe),其中 Po 是实际一致比,Pe 是期望一致比。

2 结 果

2.1 分析物浓度接近临界点的重复性验证 对各项目 C50、C5、C95 浓度各进行 40 次测试,5 个项目均验证通过,说明 5 个项目 C50-20%~C50+20% 的浓度包含了 C5~C95 的区间。见表 2。

表 2 分析物浓度接近临界点的重复性验证结果[n/n(%)]

项目	C50		C50+20%		C50-20%	
	阳性	结论	阳性	结论	阳性	结论
HBsAg	19/40(47.5)	正确	38/40(95.0)	通过	38/40(95.0)	通过
HBsAb	24/40(60.0)	正确	38/40(95.0)	通过	38/40(95.0)	通过
HBeAg	22/40(55.0)	正确	38/40(95.0)	通过	39/40(97.5)	通过
HBeAb	19/40(47.5)	正确	39/40(97.5)	通过	40/40(100.0)	通过
HBcAb	23/40(57.5)	正确	38/40(95.0)	通过	38/40(95.0)	通过

2.2 检测限验证 5 个项目在 C95 浓度时均验证通过。见表 3。

表 3 检测限验证结果[n/n(%)]

项目	C95(C50+20%)	
	阳性	结论
HBsAg	38/40(95.0)	验证通过
HBsAb	38/40(95.0)	验证通过
HBeAg	38/40(95.0)	验证通过
HBeAb	39/40(97.5)	验证通过
HBcAb	38/40(95.0)	验证通过

2.3 方法学比较 5 个项目 20 例标本用常规手工操作试验方法和 TECAN 全自动酶免一体机检测阳性符合率和阴性符合率全部为 100.0%,5 个项目 Kappa 系数全部为 1,表明 5 个项目常规手工操作试验方法和 TECAN 全自动酶免一体机检测结果一致性较好。

3 讨 论

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^[2]。对定性实验而言,临界值是唯一的医学决定水平,它的高低直接关系试验的成败^[3]。用浓度接近临界值的标本作为评价材料比用强阳性或低阴性标本更能发现检测误差^[4]。根据 EP12-A2 文件《定性项目的性能评价》要求,乙肝五项须进行分析物接近临界点时的重复性实验和方法学比较两项性能评价,其他的可以选做,不作强制要求。

由于最佳条件不易获得,实验室准确估计 C50 比较困难,昆明医科大学第一附属医院检验科免疫室按照 EP12-A2 文件要求,乙肝五项各个项目的 C50 通过稀释各(下转第 3448 页)

- Hematol, 2016, 91(1):76-89.
- [5] 中华医学会儿科学分会血液学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童骨髓增生异常综合征诊断与治疗中国专家共识(2015年版)[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(11): 804-809.
- [6] 覃霞, Baumann I, 陈静, 等. 130例骨髓增生异常综合征(难治性血细胞减少)和获得性再生障碍性贫血患儿的临床及病理特征分析[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(8): 713-718.
- [7] Taran SJ, Taran R. Role of iron chelation in improving survival: An integral part of current therapy for myelodysplastic syndromes[J]. South Asian J Cancer, 2015, 4(4): 186-188.
- [8] 彭碧, 曾白华, 陈小红. 铁代谢相关血清学指标在贫血诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(5): 552-554.
- [9] Chamsseddine AN, Jabbour E, Kantarjian HM, et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions[J]. Curr Oncol Rep, 2016, 18(1): 4.
- [10] Kawai N, Matsuda A, Jinnai I, et al. Proposal of criteria for dyserythropoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes[J]. Int J Hematol, 2016, 103(2): 227-233.
- [11] Burgstaller S, Wiesinger P, Stauder R. Myelodysplastic syndromes in the elderly: treatment options and personalized management[J]. Drugs Aging, 2015, 32(11): 891-905.
- [12] 董海波, 谢品浩, 袁翠英, 等. 病态造血在骨髓增生异常综合征诊断中的意义[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(5): 685-688.
- [13] Remacha F, Arrizabalaga B, Villegas A, et al. Evolution of iron overload in patients with low-risk myelodysplastic syndrome; iron chelation therapy and organ complications [J]. Ann Hematol, 2015, 94(5): 779-787.
- [14] 陈梅, 顾俊, 陆弘逾, 等. 骨髓增生异常综合征输血依赖患者铁代谢状况分析[J]. 实用临床医学, 2016, 17(1): 1-4.
- [15] Wood JC. Estimating tissue iron burden: current status and future prospects[J]. Br J Haematol, 2015, 170(1): 15-28.
- [16] 邢丽丽, 秦卫玲, 窦敬芳, 等. 细胞形态学异常在骨髓增生异常综合征的诊断价值[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2016, 34(1): 12-15.
- [17] Matsuda A, Jinnai I, Iwanaga M, et al. Correlation between dysplastic lineage and type of cytopenia in myelodysplastic syndromes patients with refractory anemia according to the FAB classification[J]. Am J Clin Pathol, 2013, 140(2): 253-257.
- [18] Taran SJ, Taran R. Role of iron chelation in improving survival: An integral part of current therapy for myelodysplastic syndromes[J]. South Asian J Cancer, 2015, 4(4): 186-168.

(收稿日期:2016-09-12 修回日期:2016-10-30)

(上接第3444页)

个项目的强阳性标本得来,5个项目的C50验证结果在47.5%~60.0%,全部验证正确。在确定了C50后,对5个项目C50+20%的浓度各进行40次检测,阳性率均在95.0%及以上;对5个项目C50-20%的浓度各进行40次检测,阴性率都在95.0%及以上,验证通过,说明5个项目的(C50-20%)~(C50+20%)浓度包含了C5~C95的区间。C5~C95区间的宽度暗示了定性试验的精密度,因为其反映了重复性检测结果不一致的浓度范围,C5~C95的区间越窄,代表方法越好^[4]。同时,5个项目在C95验证通过的情况下也说明5个项目检测限也验证通过。

当实验室同时使用2套以上的检测系统检测同一项目时,必须保证两者检测结果的一致性^[5]。本室对各项目的10例阳性标本和10例阴性标本用常规手工操作试验方法和TECAN全自动酶免一体机检测来验证两个方法的一致性,各个项目的阳性符合率和阴性符合率均为100.0%,通过计算Kappa系数来评价其一致性,5个项目两种方法检测一致性较好。

本实验室乙肝五项定性检测使用方法及试剂盒相关性能均验证合格,常规手工操作试验方法和TECAN全自动酶免检

测两种方法学比较结果一致性较好。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. 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.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP12-A2 User protocol for evaluation of qualitative test performance; approved guideline[S]. PA, USA: CLSI, 2009.
- [3] 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.
- [4] 周辉, 张治国, 杜春英, 等. Bact/Alert 3D系统与常用检测方法的比较[J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(7): 902-903.
- [5] 黄妩姣, 黄宪章, 庄俊华, 等. CLSI EP12-A2文件在HBsAb定性检测性能评价中的应用[J]. 检验医学, 2012, 27(11): 900-903.

(收稿日期:2016-09-04 修回日期:2016-10-23)