



CNAS-GL038

临床免疫学定性检验程序性能验证指南

Guidance of Verification of Qualitative Measurement
Procedures used in the Clinical Immunology

中国合格评定国家认可委员会

前 言

本文件由中国合格评定国家认可委员会（CNAS）制定，是对 CNAS-CL02: 2012《医学实验室质量和能力认可准则》和 CNAS-CL02-A004: 2018《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明》中有关临床免疫学定性检验程序进行性能验证实验所做的具体解释和指导，供医学实验室和评审员参考使用。

本文件为首次发布。

临床免疫学定性检验程序性能验证指南

1 范围

本指南适用于申请认可或已获认可的医学实验室对临床免疫学（定性）检验程序进行性能验证实验活动，也可供评审员在现场评审过程中参考使用。

本指南主要适用于医学实验室使用的临床免疫学定性检验方法，其他专业领域使用的定性检验程序/方法可参考使用。

临床免疫学定性检验程序，也称临床免疫学定性检验方法，在本指南中统一称为临床免疫学定性检验程序（以下简称“检验程序”），包括纯定性免疫检验、半定量（滴度）的免疫检验和以定量方式报定性结果的免疫检验等各项检验活动。

本文件适用于医学实验室采用的经确认的检验程序。

2 规范性引用文件

下列文件对于本指南的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅该版本适用于本指南。凡是未注明日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改部分）适用于本指南。

WS/T 416-2013 《干扰实验指南》

WS/T 494-2017 《临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求》

WS/T 505-2017 《定性测定性能评价指南》

WS/T 514-2017 《临床检验方法检出能力的确立和验证》

3 术语和定义

对于本标准，GB/T 29791.1-2013（ISO 18113-1：2009，IDT）中的定义适用。下列术语和定义适用于本指南。

3.1 5%~95%浓度区间 $C_5 \sim C_{95}$ interval

临界值附近的分析物浓度，在此区间之外的检测到的浓度结果始终为阴性（浓度 $<C_5$ ）或始终为阳性（浓度 $>C_{95}$ ）。

注： C_5 即仅有5%被检样本可被判断为阳性时的分析物浓度， C_{95} 即有95%被检样本可被判断为阳性时的分析物浓度。

3.2 诊断准确度标准 diagnostic accuracy criteria

使用单一方法或方法组合（包括实验室检查、影像学检测、病理学和随访信息在内的临床信息），来判断待研究特性存在与否的当前最佳可用标准。随着分析系统的发展，诊断准确度标准会随着改变。诊断准确度标准不考虑候选方法的结果（评估中的新程序）。诊断准确度标准可以评估指定选择的方法组合的综合积分来进行最终的阳性/阴性分类。

4 总则

4.1 性能验证的时机

4.1.1 新检验程序常规应用前。

4.1.2 任何严重影响检验程序分析性能的情况发生后，应在检验程序重新启用前对受影响的性能进行验证。影响检验程序分析性能的情况包括但不限于：仪器主要部件故障、仪器搬迁、设施（如纯水系统）和环境的严重失控等。

4.1.3 常规使用期间，实验室可基于检验程序的稳定性，利用日常工作产生的检验和质控数据，定期对检验程序的分析性能进行评审，应能满足检验结果预期用途的要求。现用检验程序的任一要素（仪器、试剂、校准品等）变更，如试剂升级、仪器更新、校准品溯源性改变等，应重新进行验证。

4.2 性能验证的参数

性能验证指标的选择应满足该项目的预期用途，临床免疫学定性检验程序的分析性能参数一般包括：符合率、精密度（重复性）、检出限、临界值、抗干扰能力、血清与血浆结果一致性等。实验室应根据不同检验项目的预期用途，选择对检验结果质量有重要影响的参数进行验证。

5 实验前准备

5.1 实验操作人员应熟悉方法原理与操作，能对样本进行正确处理。

5.2 实验室设施及环境符合检验程序工作要求。

5.3 仪器经过校准，其各项性能指标合格。

5.4 试剂及校准品满足检验程序要求。

6 性能验证要求

6.1 符合率验证

6.1.1 诊断符合率验证

临床免疫学定性检验程序可根据诊断准确度标准是否明确来验证诊断符合率。

6.1.1.1 验证要求

当诊断和被检测物的结果明确，即用金标准进行检测，且满足诊断准确度标准时，可采用评估诊断灵敏度和诊断特异性的方法来验证诊断符合率。

6.1.1.2 验证方案

a) 当诊断和被检测物的结果明确时，选取阴性样本 20 份（包含至少 10 份其他标志物阳性的样本）、阳性样本 20 份（包含至少 10 份浓度在 cut-off 值和 2-4 倍 cut-off 值之间的弱阳性样本，1 份极高值阳性样本），随机盲号法重新分号，检测样本，将所有检测结果按表 1 汇总填表。

表 1 诊断符合率验证

	金标准（诊断准确度标准）		
	疾病	非疾病	
候选实验	a (+, 阳性)	b (+, 阳性)	a+b
	c (-, 阴性)	d (-, 阴性)	c+d
	n1	n2	n

b) 诊断符合率计算

$$\text{诊断灵敏度} = [a/n1] \times 100\%$$

$$\text{诊断特异性} = [d/n2] \times 100\%$$

$$\text{诊断符合率} = [(a+d)/n] \times 100\%$$

6.1.1.3 可接受标准

如果实验室计算得出的诊断灵敏度、诊断特异性和诊断符合率不低于厂商检验方法声明，则通过验证；如果低于厂商检验方法声明，则未通过验证，应寻找原因或更换检验方法。

6.1.2 方法符合率验证

临床免疫学定性检验程序当诊断准确度标准不明确时，可采用评估方法符合率的方式来实现符合率的验证，包括用候选方法评估已知能力验证或室间质评的样本以及不同方法学或/和相同方法学在不同实验室之间的比对。

6.1.2.1 验证要求

参比系统（在用检测方法）经验证性能符合设定标准，日常室内质控、室间质评/能力验证合格的在用检测方法。优先选用符合以上要求的经 CNAS 认可的医学实验室的检测方法。

6.1.2.2 验证方案

a) 样本：选取阴性样本 10 份（包含至少 5 份其他标志物阳性的样本）、阳性样本 10 份（包含至少 5 份浓度在 cut-off 值和 2-4 倍 cut-off 值之间的弱阳性样本，1 份极高值阳性），共 20 份样本，随机每 4 份分成一组。采用参比方法和候选方法均每天按照患者样本检测程序进行平行检测一组样本。

b) 将所有检测结果按表 2 汇总填表，计算符合率。

表 2 方法符合率验证

	参比方法（非诊断准确度标准）		
	疾病	非疾病	
候选方法	a (+, 阳性)	b (+, 阳性)	a+b
	c (-, 阴性)	d (-, 阴性)	c+d
	n1	n2	n

$$\text{阳性符合率} = [a/n1] \times 100\%$$

$$\text{阴性符合率} = [d/n2] \times 100\%$$

$$\text{总符合率} = [(a+d)/n] \times 100\%$$

$$\text{阳性似然比} = \text{阳性符合率} / (1 - \text{阴性符合率})$$

$$\text{阴性似然比} = (1 - \text{阳性符合率}) / \text{阴性符合率}$$

6.1.2.3 可接受标准

可接受标准为所用厂商检验方法（候选方法）标准。若无可用的厂商标准时，可根据实验室检测方法的预期用途制定实验室验证可接受标准。

6.2 精密度（重复性）验证

临床免疫学定性检验程序若以量值或数值形式表达定性结果，精密度验证方法可参照 CNAS-GL037《临床化学定量检验程序性能验证指南》。

6.2.1 验证要求

用于验证的样本应是临床标本，如使用质控品则应具有很好的稳定性和均一

性，样本浓度应包括阴性、弱阳性和阳性水平。

6.2.2 验证方案

6.2.2.1. 检验程序以量值或数值形式表达定性结果的验证方法

a) 样本：选取阴性样本 2 份（至少 1 份其他标志物阳性）样本、阳性样本 3 份（包含至少 1 份浓度在 cut-off 值和 2-4 倍 cut-off 值之间的弱阳性，1 份极高值阳性）样本，共 5 份样本，按照患者样本检测程序进行检测。

b) 验证过程：阳性样本参照 CNAS-CL02-GL037《临床化学定量检验程序性能验证指南》。阴性标本跟随阳性样本同时检测。

6.2.3 可接受标准

为所用厂商检验方法声明的标准。若无可用的厂商标准时，实验室可根据临床诊疗的质量要求确定可接受标准。

6.3 检出限验证

6.3.1 验证要求

所用检验程序在厂商试剂使用说明书等有检出限声明时，有标准物质时，或以定量形式表达定性结果时，应进行检出限的验证。选用定值标准物质如国际参考品、国家参考品、厂商参考品进行检出限验证。

6.3.2 验证方案

使用定值标准物质的样本梯度稀释至厂商声明的检出限浓度，在不同批内对该浓度样本进行测定（如测定 5 天，每天测定 4 份样本），样本总数不得少于 20 个。稀释液可根据情况选用厂商提供的稀释液或阴性血清，该阴性血清除被验证的目标物必须阴性外，其对应的相关物质（如抗原或抗体）也必须阴性，且试剂说明书上申明的干扰物质必须在允许范围之内。

6.3.3 可接受标准

如果 $\geq 95\%$ 的样本检出阳性，检出限验证通过。

6.4 临界值验证

6.4.1 验证要求

依据制造商临界值确定方案进行验证对于以临界值（cut off value; C_{50} ）来判断阴阳性的检测方法，应在实验室现有检测条件下，可参照 WS/T 505 和 WS/T 494 标准评价临界值，评价（临界值-20%）至（临界值+20%）的浓度范围是否包

舍于、位于或者超出这种方法的 95% 区间。候选方法的厂商说明书有时会指定分析物的临界值。如果有提供临界值，则在以下实验中可将其作为代替 C_{50} 的近似值。如果没有提供临界值，则可以从阳性样本中进行系列稀释，并且重复检测稀释度样本，以估计产生 50% 阳性和 50% 阴性结果的浓度，对应于该稀释度浓度即为 C_{50} 。

6.4.2 验证方案

6.4.2.1 当临界值是基于阴性样本或阴性人群确定时，选择 40 例健康人的新鲜血清样本，检测结果用“1/3”原则来排除离群值，即将疑似的离群数据与其相邻数据之差 D 除以数据全距 R ，若 $D/R \geq 1/3$ 则为离群值，检测过程中将发现的离群值舍弃，并用新的健康体检人群个体代替，最终确保 40 例检测结果都不含有离群值。

若 40 例样本检测均小于说明书提供临界值或仅有不多于 2 例样本超出说明书提供临界值，则本次验证通过。

6.4.2.2 选择健康人和其他标志物阳性的患者新鲜血清样本各 30 份，分 3~5 批 3~5 天进行检测，计算平均值 M 和标准差 SD 。

临界值验证值为 $M+3SD$ ，若该验证值不大于说明书提供临界值（或者在说明书提供临界值 $\pm 20\%$ 内），则验证通过。

6.4.2.3 当临界值同时基于阴性样本或阴性人群和阳性样本或阳性人群确定时，除了 6.4.2.1 方案外，还需增加阳性样本的验证。

选择弱阳性（浓度均匀分布在临界值 $\pm 20\%$ 内）的新鲜血清或质控血清样本共 60 例，分 3~5 批 3~5 天进行检测，计算平均值 M 和标准差 SD ，临界值验证值为 $M-3SD$ 。若验证值与说明书提供的临界值接近（或者在说明书提供临界值 $\pm 20\%$ 内），则验证通过。

6.4.2.4 制备足够 40 次重复检测的 3 个样本：分别为处于临界浓度、高于临界浓度 20% 和低于临界浓度 20% 的样本；重复检测样本 40 次，确定每一份样本结果为阳性和阴性的百分比。

临界浓度的阳性结果于 $(14-26)/40$ （35%–65%）之间， C_{50} 验证通过。当（临界浓度+20%）阳性结果 $\geq 36/40$ （90%），且（临界浓度-20%）阴性结果 $\geq 36/40$ （90%），表明（临界值-20%）至（临界值+20%）的浓度范围位于这种方法的 95%

区间。

6.4.3 若验证不通过，实验室需根据验证的结果评估本实验室条件下，该方法的假阴性、假阳性的可能性，并结合预期用途（筛查、诊断或确认试验等），制定本实验室的复检规则。

6.5 抗干扰能力验证

6.5.1 验证要求

应验证与检测对象可能存在交叉反应的物质对检测的影响。应验证说明书中涉及的干扰物质对测定的影响，这些干扰物质主要包括血红蛋白、甘油三酯、胆红素和免疫球蛋白 G 等。对于病原体标志物检测，还应验证与检测目标物可能存在交叉反应的病原体对检测的影响，这类病原体主要是与检测目标物可能有交叉抗原、易引起相同或相似的临床症状的病原体。宜在病原体感染的医学决定水平（弱阳性）进行验证。

6.5.2 验证方案

可参照 WS/T 416-2013 《干扰实验指南》。

6.5.2.1 相关物质干扰验证试验

a) 样本准备：收集目标物分别为阴性、弱阳性、阳性不同浓度的 5 份样本。同时收集目标物阴性的高浓度血红蛋白、高甘油三酯、高胆红素和 IgG 样本。

b) 抗干扰具体方案

1) 将收集的高浓度血红蛋白、高甘油三酯、高胆红素和 IgG 样本分别加至上述选取目标物分别为阴性、弱阳性、阳性不同浓度的 5 份样本中，使其干扰物质浓度达到厂商说明书声称的干扰浓度。

2) 加入干扰物质的量应小于样本量的 10%（对照组加入等量的健康人阴性血清），以上干扰物浓度可在相应的分析仪上检测。

3) 未添加干扰物质的阴性、弱阳性、阳性不同浓度的 5 份样本作为对照。

4) 对所有样本同时进行目标物检测，每个浓度重复检测 2 次，计算均值并记录。

c) 可接受标准

加干扰物质的阳性组结果和阳性对照组结果之间符合率应 $\geq 80\%$ ；添加干扰物质的阴性组和阴性对照组结果均为阴性。

6.5.2.2 病原体干扰验证试验

a) 样本准备：收集目标物分别为阴性、弱阳性、阳性不同浓度的 5 份样本。同时收集与目标物可能有交叉抗原、易引起相同或相似临床症状的病原体样本（浓度为弱阳性水平）。

b) 抗干扰具体方案

1) 将收集与目标物可能有交叉抗原、易引起相同或相似临床症状的病原体弱阳性样本分别加至上述选取目标物分别为阴性、弱阳性、阳性不同浓度的 5 份样本中。

2) 加入干扰物质的量应小于样本量的 10%（对照组加入等量的健康人阴性血清），以上干扰物病原体弱阳性样本可在相应的分析仪上检测。

3) 未添加干扰物质的阴性、弱阳性、阳性不同浓度的 5 份样本作为对照。

4) 对所有样本同时进行目标物检测，记录结果。

c) 可接受标准：加干扰物质的阳性组结果和阳性对照组结果之间符合率应 $\geq 80\%$ ；添加干扰物质的阴性组和阴性对照组结果均为阴性。

6.6 血浆与血清样本结果的一致性验证

6.6.1 验证要求

对于厂商试剂说明书上可以同时使用血清或者血浆的样本，需对不同的抗凝剂的影响进行评估。

6.6.2 验证方案

分别选取血清和血浆各 20 份样本，均应包含阴性、弱阳性、阳性样本，同时按常规方法进行检测。

6.6.3 可接受标准

血清和血浆检测结果的一致性为 100%，则验证通过。

参考文献

1. CNAS-CL02: 2012 《医学实验室质量和能力认可准则》
2. CNAS-CL02-A004: 2018 《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明》
3. WS/T 416-2013 《干扰实验指南》
4. WS/T 494-2017 《临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求》
5. WS/T 505-2017 《定性测定性能评价指南》
6. WS/T 514-2017 《临床检验方法检出能力的确立和验证》
7. CLSI EP12-A2: User Protocols for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition.
8. CLSI I/LA21-A2: Clinical Evaluation of Immunoassay; Approved Guideline-Second Edition.
9. CLSI I/LA23-A: Assessing the Quality of Immunoassay Systems: Radioimmunoassays and Enzyme, Fluorescence, and Luminescence Immunoassays; Approved Guideline.
10. CLSI EP28-A3C: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, 3rd Edition.