

卫生行业与医药行业相关标准检出限的异同解析

朱岭峰, 葛丹红, 方慧玲, 朱宇清
(上海市临床检验中心, 上海 200126)

摘要: 当体外诊断试剂厂商仅按医药行业标准对某个定性检测项目声明了空白限 (LoB) 时, 临床实验室应完成该项目检出限 (LoD) 的性能验证。文章对多个医学相关个行业标准中 LoD、LoB 的定义进行分析, 并指出其在各文件中的异同。同时将定性项目中 C50 浓度、C95 浓度与定量项目中 LoD、LoB 的相互联系进行归纳、整理。

关键词: 检出限; 空白限; 临界值

Similarities and differences of limits of detection in health institutions and pharmaceutical institutions

ZHU Lingfeng, GE Danhong, FANG Huiling, ZHU Yuqing. (Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China)

Abstract: Clinical laboratories should complete the performance verification of the limit of detection (LoD) of qualitative test items, when the manufacturer of *in vitro* diagnostic reagents only declares the limit of blank (LoB) according to the standards of pharmaceutical institutions. The definitions of LoD and LoB in several medical related institution standards are analyzed, and the similarities and differences are pointed out. C50 concentration and C95 concentration in qualitative test items are correlated with LoB and LoD in quantitative test items.

Key words: Limit of detection; Limit of blank; Cut-off value

中国合格评定国家认可委员会 (China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS) 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》^[1]中明确指出: 定性检验方法和程序的分析性能验证内容应参考试剂盒说明书明确标示的性能参数, 至少应包括检出限 (limit of detection, LoD) 和符合率 (采用国家标准血清盘或临床诊断明确的阴、阳性样品各 20 份, 或与其他分析方法比对)。性能验证和方法学确认一直是临床实验室质量管理的重要内容。目前, 在临床实验室、体外诊断试剂说明书及各类学术论文中, LoD 仍有使用混乱的现象。我们就相关的术语及概念进行

初步解析。

1 医药行业和卫生行业相关标准中空白限 (limit of blank, LoB) 的区别

我国医药行业标准 YY/T 1183-2010《酶联免疫吸附法检测试剂 (盒)》^[2]中, LoD 的定义为: 样品中以一定概率可被声明与零有差异的被测量的最低值。并在定义下有 3 个注释^[2]: (1) 也被描述为“最低检出限” (或计量或值); (2) 有时被不正确地称为分析灵敏度; (3) 本标准中的最低 LoD 为区别于零的不低于 95% 可信区间的最低浓度。这与国际理论和应用化学联合会 (the International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) 对 LoD 的定义——给定分析程序具有适当的确定检出分析物的最

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会青年项目 (20174Y0217)

作者简介: 朱岭峰, 男, 1985 年生, 主管技师, 主要从事临床免疫检验工作。

葛丹红, 女, 1982 年生, 主管技师, 主要从事临床生化检验质量控制工作。

朱岭峰和葛丹红对本研究具有同等贡献, 并列为一作者。

通信作者: 朱宇清, E-mail: zhuyuqing@sccl.org.cn.

小浓度和量^[3]一致。IUPAC规定若LoD的分析信号为 X_d , 则 $X_d = x_B + k \cdot s_B$, 并建议 k (可靠性系数) 取3, x_B 、 s_B 分别为有限测量次数的空白均值和空白标准差。YY/T 1183-2010规定定量检出方法学确认的试验方法为: 用零浓度校准品或者样本稀释液作为样本进行检测, 重复测定20次, 得出20次测量结果的吸光度(A)值, 计算其平均值(M)和标准差(SD), 得出 $M+2SD$ (如果原理为竞争法, 则为 $M-2SD$)所对应的 A 值, 根据试剂盒所用的校准品的定标曲线方程或者根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度- A 值结果进行两点回归拟合, 得出一次方程, 将 $M+2SD$ 所对应的 A 值带入方程, 求出对应的浓度值, 即为LoD^[2]。这一计算过程与IUPAC的区别仅仅是系数2和3, 即95%可信区间和99.7%可信区间的区别。故可以认为YY/T 1183-2010中LoD的定义就是源自于化学领域的概念。

我国卫生行业标准WS/T 514-2017《临床检验方法检出能力的确立和验证》(简称514文件)^[4]中, “检出限”的定义为: 给定测量程序获得的测得值, 其声称的物质成分不存在的误判概率为 β , 声称的物质成分存在的误判概率为 α 。并在定义下有2个注释: (1) 国际理论和IUPAC推荐的 α 和 β 的默认值为0.05; (2) 也被称作检测下限、最小可检测浓度(值), 缩写为LoD。

514文件中LoB的定义为: 测量空白样本时可能观察到的最高测量结果^[4]。在定义下有1个注释: 并非样本中实际被测物的浓度。LoB也被称作净状态变量临界值。514文件中规定根据空白标本测量结果分布选择数据分析方法, 非参数统计方法没有分布要求, 适用于所有的数据集; 如空白标本的测量结果呈方差齐性则应采用参数统计方法计算LoB, 计算公式为: $LoB = M_B + C_p \cdot SD_B$, 式中 M_B 为空白标本的均值, SD_B 为空白标本的标准差, C_p 为正态分布第95百分位数的乘数因子——用观察 SD 代替真实未知人群 SD 的校准因子, 计算公式为 $1.645/[1-1/4(B-K)]$, 式中 B 为数据集空白结果的总数, K 为空白标本数。

从定义上来看, 卫生行业标准中LoB的定义与医药行业标准中LoD的定义接近, 计算公式本

质是一致的, 即空白标本的均值加上不同倍数的空白标本的标准差, 这2个公式仅是系数不同(分别为2和 C_p)。原因是卫生行业标准考虑了2个因素: 低水平和空白样本结果的分布未必呈对称和正态分布; 低水平和空白样品的重复检查结果未必是具有结果相近的标准差。故我们认为从定义和计算公式上来说, 医药行业标准中的LoD相当于卫生行业标准中的LoB。

514文件中LoD的计算公式(参数统计)为: $LoD = LoB + C_p \cdot SD_L$, 式中LoB为测量程序的空白限, SD_L 为低值标本结果的标准差, C_p 为正态分布第95百分位数的乘数因子——用观察 SD 代替真实未知人群 SD 的校准因子, 计算公式为 $1.645/[1-1/4(L-J)]$, 式中 L 为所有低值标本结果的总数, J 为低值标本数。由这2个公式可推导出 $LoD > LoB$ 。

医药行业标准中的LoD源自化学领域, 在某些分析化学中对空白样品做重复检测并计算均值和标准差, 然后将均值和数倍标准差相加(一般为2~3倍), 即得到LoD。这个方法的缺点是无法区分现有的和真实的(或实际的)浓度, 也混淆了一个事实, 即实际处在LoD真实浓度的样品(以化学方法确定的LoD), 将只有50%的可能性能得到该值, 说明存在着分析物^[5]。故该方法得到的值一定是低于使用卫生行业标准中LoD(较严格的统计方式)的值, 也可以说是卫生行业标准中LoB和LoD的浓度差。

同时, 卫生行业标准对于LoD的计算方式有多种, 除参数统计方法外, 还有非参数统计方法、精密度曲线方案及概率单位方案, 用于不同的数据、实验及检测方法。

2 医药行业文件中LoD、卫生行业文件中LoB和CNAS文件中临界值的关系

CNAS 2019年发布的CNAS—GL038: 2019《临床免疫学定性检验程序性能验证指南》(简称GL038)未给出LoD的具体定义, 但文件中关于临界值的验证的计算方案为: 选择健康人和其他标志物阳性患者的新鲜血清样本各30份, 分3~5批在3~5 d内进行检测, 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的临界值(或者在说明书提供的临界值 $\pm 20\%$ 内), 则

验证通过^[6]。这相当于医药行业文件中的LoD、卫生行业文件中的LoB。故可以认为CNAS文件中的临界值、医药行业文件中的LoD、卫生行业文件中的LoB三者的含义是相同的，且CNAS文件的内容更类似临界值的方法学确认而非性能验证。

3 LoB、LoD、C50浓度、C95浓度、临界值之间的关系

GL038未给出LoD的具体定义，但其验证方式为：使用定值标准物质的样本梯度稀释至厂商声明的LoD浓度，样本总数不得少于20个。如果 $\geq 95\%$ 的样本检出阳性，LoD验证通过^[6]。514文件中的LoD验证的内容为：保证检测结束时有足够的测量结果进行数据分析，至少应包括20个低值标本结果；计算低值测量结果等于或超过LoD声明的百分比；将得到的百分比与附录E的临界值比较，如果没有匹配的测量结果总数（N），选择最接近的值；如果观察百分比大于或等于附录E中的值，则验证成功^[4]。可以看出，2个文件的验证方式大体一致，其主要区别是514文件中规定了不同标本结果数对应临界值观察比例不同，例如20个结果对应临界值观察比例为85%，30结果对应临界值观察比例为87%。我们认为两者的LoD的性能验证的实质内容是一致的，但514文件中规定的限值更为合理，通过查表可知当标本结果数为1 000个时对应的临界值观察比例为94%，故将任一 ≥ 20 个的标本结果的限值都规定为95%是不合理的。

我国卫生行业标准WS/T 494-2017《临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求》^[7]（简称494）和WS/T 505-2017《定性测定性能评价指南》^[8]（简称505）2个文件中有关于临床免疫学定性检验程序中临界值、LoD的相关定义。首先，505文件定义：临界点或值在定性试验中，临界点是指检测反应的某一点，低于此检测反应点的定性检测结果被判定为阴性，而高于此点则被判定为阳性^[8]。494文件仅定义了临界值浓度（C50）：处于或接近临界值的分析物浓度，多次重复检测此浓度的单一样本时将获得50%的阳性结果和50%的阴性结果^[7]。这一定义与505文件中C50浓度的定义完全相同。我们认为卫生行业标准中临界值与C50浓度是有

区别的。首先，505文件中明确表示试剂生产厂家根据检测目的及临床敏感性和特异性建立临界浓度，且一旦确立，用户不可随意更改。而C50浓度是通过Wilson计分可信区间法估计出的浓度（在实际操作中不易获得50%阳性、50%阴性的结果，故利用统计学的方法估计了C50浓度，在40次的重复实验中有14~26次阳性则C50浓度验证通过），所以C50浓度应是围绕着临界值有无限个浓度值，在理想条件下C50浓度等于临界值，即50%阳性、50%阴性。故临界值具有唯一性，而C50浓度值具有不确定性。尽管有着定义上的不同（为了实验室用户注意到在实际重复性研究中，厂家定义的临界值和方法评价时估计的C50之间的差异会导致定性测定的偏差），但是不可否认临界值与C50浓度在数值上应很接近，而CNAS文件中并未将这2个概念加以区分，这可能与检测系统重复性良好而导致实验室用户难以确定C50浓度有关。其次，卫生行业标准“定义和术语”中均未对LoD定义，但494文件指出：检测限是指检测方法可检测出的最低被测量浓度，也称检测低限或最小检出浓度，有时也被称为分析灵敏度。分析物浓度位于C5~C95区间之外（ $<C5$ 或 $>C95$ ）时，候选方法对同一样本的重复性检测将得到相同结果。因此，C95代表了某一试剂可以测出的最低被测量浓度^[7]。在定性项目中（这里的定性是指只有阳性、阴性或者有反应、无反应），这是合理的，但在定量项目中，无论是医药行业标准中LoD的定义，还是和514文件中定量检出限（LoQ）和功能灵敏度（FS）的定义都是有差异的。在定量项目中声称的物质成分存在的误判概率为0.05和定性项目中C95即有95%被检样品可被判定为阳性时的分析物浓度其定义是相一致的，即C95浓度相当于LoD。

在卫生行业标准与CNAS文件的定义中，空白限和检出限分别用LoB和LoD表示，但医药行业标准中，因为其定义来自于化学领域，LoD的定义相当于卫生行业标准与CNAS中的LoB。然而医药行业标准作为国内体外诊断试剂的行业标准，产品的申报、注册很有可能按此标准进行，同时，医药行业标准规定体外诊断试剂必须有LoD的声明。故如果体外诊断试剂厂商在

说明书中声称的LoD相当于卫生行业标准中的LoB,同时CNAS要求实验室必须验证定性项目的LoD,即厂商声明了一个50%阳性、50%阴性可能性的浓度,而实验实验室需要验证一个85% (或95%)阳性的浓度,给实验室进行相关的性能验证带来困难。各文件中LoD、LoB对应的含义见表1。

表1 各文件中检出限对应的含义

文件	LoB	LoD
YY/T 1183-2010	检出限	
WS/T 514-2017	空白限	检出限
CNAS-GL038: 2019	空白限	检出限
WS/T 494/505 (适用于定性项目)	C50浓度	C95浓度

4 讨论

面对上述情况,我们认为实验室首先需要了解清楚各体外诊断试剂厂商在说明书中声明的LoD是否与卫生行业标准和CNAS文件中的要求一致,同时体外诊断试剂厂商应积极配合实验室提供申报产品时确认LoD的方案,如果一致,实验室可直接按卫生行业标准和CNAS文件中性能验证的方案完成验证;如果不一致,该LoD为医药行业标准中的LoD,即卫生行业标准和CNAS中的LoB,按前文所述其实质是定性检测的临界值,同时上文已经提到,GL038文件并未区分临界值和C50的区别,且505文件也认为C50浓度应当很接近临界值,故可以认为此时厂商是提供了一个C50浓度,而卫生行业标准和CNAS文件中要求验证的浓度为C95浓度(LoD),从505和494文件中可知C50+20%浓度应该包含C95浓度,所以只需将厂商声明的浓度增加20%即为所需检测限,然后再检测该浓度的样本20次,阳性率>相应的限值即可完成验证。需要注意的是,如果该定性项目有定量方法学的支持或者国际参考品、国家参考物质的支持,那么可以通过上述方式比较轻松地获得C50+20%的浓度值,但是如果该方法没有这个条件,那么获得C50+20%的浓度值将比较困难,因为C50浓度对应的检测值(不论是S/CO值、A值或者发光值)与C50+20%浓度对应的检测值之比不等于C50浓度值(绝对浓度)与C50+20%浓度值之比(因为未减去空白浓度且未

考虑线性的情况),此时只能通过将1个阳性样品做一系列等比例稀释至C50浓度,再通过这一系列的稀释比例来确定C50+20%浓度,如:将阳性样本做1:2、1:4、1:8稀释,然后通过检测后发现1:8为C50浓度,此时只需4份1:8加上1份的1:4混合就获得了C50+20%浓度(即包含C95浓度)。需要注意的是,目前全自动分析仪的重复性与与传统的手工酶免检测比较有了质的飞跃,但同时也使确定C50浓度变得困难(良好的重复性导致40次检测结果相当的一致,很难出现14~26次阳性的情况),建议使用临界值附近浓度的检测结果作为C50浓度,然后再按上述流程完成检测限的验证。

在定量检测项目中LoD并非必须完成的性能验证项目,但对于促甲状腺激素、肌钙蛋白等项目却有非常重要的意义。同时在定性项目中LoD作为反应检测灵敏度的重要性能指标,是必须完成的性能验证项目。实验室应当重视检测限的性能验证工作,充分理解其含义,以便更好地为临床诊断服务。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A004: 2018 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, 2018.
- [2] YY/T 1183—2010 酶联免疫吸附法检测试剂(盒)[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2010.
- [3] 张秀明, 冯仁丰. 正确理解和使用分析灵敏度及检出限[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(9): 669-672.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS_T514—2017 临床检验方法检出能力的确立和验证[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2017.
- [5] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL038: 2019 临床免疫学定性检验程序性能验证指南[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2019.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 494—2017 临床定性免疫检验重要常规项目分析质量要求[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2017.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 505—2017 定性测定性能评价指南[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2017.

(收稿日期: 2019-08-02)

(本文编辑: 李 欣)