

# 应用 CLSI EP12-A2 和 EP15-A2 评估腺病毒 IgM 抗体的磁微粒化学发光法检测试剂

杨俊梅 刘倩倩 崔宁华 孙红启

郑州大学附属儿童医院 郑州市儿童感染与免疫重点实验室 450000

通信作者: 杨俊梅, Email: yangjunmei7683@163.com, 电话: 0371-85515770; 孙红启, Email: sunhongqi@163.com, 电话: 0371-85515770

**【摘要】** 目的 应用美国临床实验室标准化协会 CLSI EP12-A2 和 EP15-A2 文件, 评估一种磁微粒化学发光法腺病毒 IgM 抗体检测试剂的性能。方法 参照 EP15-A2 文件方法, 选用高中低 3 个浓度的样本, 每个样本每天重复测定 4 次, 持续 5 d, 计算总不精密度。应用 EP12-A2 文件方法, 制备  $C_{50}$ 、 $C_{50}-20\%$ 、 $C_{50}+20\%$  浓度样本, 重复检测 40 次, 验证  $C_{50}\pm 20\%$  是否在  $C_5\sim C_{95}$  区间之外。应用 EP12-A2 文件, 与临床诊断标准比对, 计算灵敏度和特异性; 与同类 ELISA 法进行方法学比对, 计算符合率和  $Kappa$  值。结果 3 批产品检测高中低 3 个浓度样本的总不精密度均小于 8%, 低于行业标准和说明书声称值。3 批产品的  $C_{50}\pm 20\%$  均在  $C_5\sim C_{95}$  区间之外, 验证通过。以核酸为临床诊断标准, 灵敏度为 100% (95% CI: 79.6%~100%), 特异性为 97.8% (95% CI: 94.5%~99.1%),  $Kappa$  值 = 0.871 ( $P=0.001$ )。与酶联免疫法同类产品的阳性符合率为 66.7% (95% CI: 53.6%~77.7%), 阴性符合率为: 97.4% (95% CI: 95.4%~98.5%), 总符合率为 93.9% (95% CI: 91.6%~95.6%),  $Kappa$  值 = 0.678 ( $P=0.001$ )。结论 本研究的全自动磁微粒化学发光法腺病毒 IgM 抗体检测试剂精密性良好, 与临床诊断标准符合率较好。

**【关键词】** 腺病毒; IgM 抗体; 磁微粒化学发光法; EP12-A2; EP15-A2

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (2018020698)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.04.021

## Application of CLSI EP12-A2 and EP15-A2 documents in the performance evaluation of Adenovirus IgM CLIA microparticles

Yang Junmei, Liu Qianqian, Cui Ninghua, Sun Hongqi

Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou Key Laboratory of Children's Infection and Immunity, Zhengzhou 450000, China

Corresponding author: Yang Junmei, Email: yangjunmei7683@163.com, Tel: 0086-371-85515770; Sun Hongqi, Email: sunhongqi@163.com, Tel: 0086-371-85515770

**【Abstract】** **Objective** Application of Clinical and Laboratory Standards Institute evaluation protocols-12 approved guideline 2<sup>nd</sup> edition (CLSI EP12-A2) and EP15-A2 documents in the performance evaluation of Adenovirus IgM CLIA microparticles. **Methods** Referring to the EP15-A2 method, three samples of high and low concentration were selected. Each sample test was repeated 4 times one day for 5 days, and the total imprecision was calculated. Referring to the EP12-A2 method, samples of  $C_{50}$ ,  $C_{50}-20\%$  and  $C_{50}+20\%$  were prepared and repeated 40 times, to verify  $C_{50}\pm 20\%$  bounds the  $C_5\sim C_{95}$  interval. Compared with diagnostic accuracy criteria, the sensitivity and specificity were calculated. Compared with ELISA method, the concordance rate and  $Kappa$  value were calculated. **Results** The total imprecision CV (%) was less than 8%, lower than that announced by manufacturer.  $C_{50}\pm 20\%$  concentration fall outside the  $C_5\sim C_{95}$  interval. Compared with diagnostic accuracy criteria, the sensitivity was 100% (95% CI: 79.6%~100%), specificity was 97.8% (95% CI: 94.5%~99.1%),  $Kappa$  value was 0.871. Compared with ELISA method, the positive concordance rate was 66.7% (95% CI: 53.6%~77.7%), negative concordance rate was 97.4% (95% CI: 95.4%~98.5%) total concordance rate was 93.9% (95% CI: 91.6%~95.6%),  $Kappa$  value was 0.678. **Conclusions** The performance of Adenovirus IgM CLIA microparticles can meet clinical requirements.

**【Key words】** Adenovirus; IgM; CLIA microparticles; EP12-A2; EP15-A2

**Fund program:** Medical Science and Technology Project of Henan Province (2018020698)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.04.021

腺病毒(adenovirus)是无包膜的双链 DNA 病毒,根据生物学特点和核酸序列可分为 6 个亚群,检测方法有:核酸检测、抗原检测、血清学特异性抗体检测和病毒分离培养等<sup>[1-2]</sup>,其中血清特异性 IgM 抗体阳性对诊断具有重要参考意义<sup>[3]</sup>。目前应用于临床的 IgM 抗体检测方法有间接免疫荧光法(IFA)和酶联免疫吸附法(ELISA),这些方法均需要手工操作,应用中对结果的影响因素较多。随着检验技术的发展,全自动化学发光法已越来越多的应用于传染病及激素等检测<sup>[4-5]</sup>,根据医学实验室认可国际标准 ISO15189《医学实验室质量和能力专用要求》和《医疗机构临床实验室管理办法》要求,新的检测系统在用于常规工作前应对其分析性能进行验证确认或分析评价,证实其能够满足预期用途<sup>[6]</sup>。对于定性检测产品,最重要的两个指标是精密性和检测准确性,本研究根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发表的 EP12-A2 文件《定性检测性能评价的用户方案》<sup>[7]</sup>,对安图生物生产的 AutoLumo A2000 磁微粒化学发光法腺病毒 IgM 抗体检测试剂进行性能评估。其中对于精密性的评估,EP12-A2 中是以  $C_{50} \pm 20\%$  是否在  $C_5 \sim C_{95}$  范围内评估精密性,只适用于定性检测,评估方法相对复杂,一般在接受新的检测系统时进行评估;而实验室日常的检测精密性常以变异系数(CV)体现,企业和行业都对检测的变异系数有相关的要求,而且能和室内质控结合起来方便的评估每天的检测是否失控,因此本文增加了 EP15-A2 文件《用户对精密度和准确度性能的验证指南》精密度的评估<sup>[8]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 精密性评估样本:收集腺病毒 IgM 抗体阳性血清样本,所有样本均无溶血、无黄疸、无脂浊,根据反应性强弱混合成 3 份,离心后取上清液,分装成 20 管,置  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  冰冻保存。

1.1.2 与临床诊断标准比对样本:2017 年 12 月至 2018 年 2 月,郑州大学附属儿童医院呼吸道感染住院患者,症状包括发热  $38\text{ }^\circ\text{C}$  以上,扁桃体炎、咽炎、肺炎等。入院时采集患者咽拭子和血清样本,对咽

拭子核酸检测为阳性的患者,出院时(5~14 d)再次采集血清样本。共入选 198 例患者,其中 15 例患者核酸检测为阳性,并在入院和出院时采集了双份血清。

1.1.3 与同类产品比对样本:2017 年 9 月至 2018 年 1 月,郑州大学附属儿童医院门诊和住院患者 558 例,年龄 1 个月至 14 岁(平均 4 岁)。患者来自 6 个科室,其中呼吸科 186 例,消化科 121 例,肾脏风湿科 62 例,急诊医学科 78 例,血液肿瘤科 51 例,感染性疾病科 60 例。所有患者仅在入院时用普通血清管采集分离急性期血清,编号后  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存。本研究经郑州大学附属儿童医院伦理委员会批准,患者签署知情书。

### 1.2 仪器与试剂

1.2.1 磁微粒化学发光法试剂盒:腺病毒 IgM 抗体检测试剂盒(磁微粒化学发光法),全自动化学发光仪 AutoLumo A2000,郑州安图生物生产。高值质控品 Q1(S/CO 4.5~6.0)、低值质控品 Q2(S/CO 1.0~1.6)、洗液、发光底物等耗材,由郑州安图生物生产。该试剂盒采用捕获法检测血清/血浆中的 IgM 抗体,从样本载入到报告实验结果都由全自动化学发光仪完成,S/CO 值  $\geq 1.0$  判定为阳性, $< 1.0$  判定为阴性。

1.2.2 酶联免疫法(ELISA)试剂盒:腺病毒 IgM 检测试剂盒,德国 Euroimmun 公司生产。该试剂盒使用纯化的腺病毒抗原包被微孔板,辣根过氧化物酶标记抗人 IgM 抗体,采用间接法检测血清/血浆中的 IgM 抗体,样本比值  $\geq 1.1$  时,结果判为阳性;比值  $< 0.80$  时,结果判为阴性; $0.80 \leq$  比值  $< 1.1$  时,结果为可疑。

1.2.3 腺病毒核酸检测方法:核酸提取、检测试剂均为郑州安图生物生产;实时荧光定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司 7500 Real Time PCR System 机型。Ct 值  $< 34$  为核酸检测阳性。

### 1.3 方 法

1.3.1  $C_{50}$  和  $C_{50} \pm 20\%$  浓度制备:同一样本重复测量,得到 5% 阳性结果的浓度为  $C_5$ 、50% 阳性结果的浓度为  $C_{50}$ 、95% 阳性结果的浓度为  $C_{95}$ 。高于和低于  $C_{50}$ ,使重复测定结果分别达 5% 阳性和 95% 阳性

的浓度称为  $C_5 \sim C_{95}$  区间,  $C_5 \sim C_{95}$  区间越小则重复性越好。 $C_{50}$  浓度制备: 将高值新鲜阳性血清, 用阴性血清做系列浓度稀释, 每天上午和下午分别做 2 个重复检测, 连续 10 d, 分别得到 40 个重复检测结果, 阳性结果在 14~26 次范围内, 即  $C_{50}$  制备正确, 应尽量选择阳性接近 20 次的浓度值。 $C_{50} \pm 20\%$  浓度制备: 将配制  $C_{50}$  用的高值新鲜阳性血清, 分别按照制备  $C_{50}$  稀释倍数的 5/6 倍和 5/4 倍稀释, 制备  $C_{50} + 20\%$  和  $C_{50} - 20\%$ 。

1.3.2 EP12-A2 精密性评估: EP12-A2 以  $C_{50} \pm 20\%$  的浓度范围是否在  $C_5 \sim C_{95}$  区间内判断精密性是否符合要求, 即  $C_{50} \pm 20\%$  样本各检测 40 个重复,  $\geq 36$  个结果为阳性或阴性认为通过验证。

1.3.3 EP15-A2 精密性评估: 按操作说明书每天对仪器进行维护保养和常规质控, 在控后进行检测。将 3 个浓度的新鲜阳性样本复溶, 充分混匀后上机检测, 每份样本每天上午和下午各做 2 个重复检测, 连续 5 d, 每份样本得到 20 个测试结果。

1.3.4 EP12-A2 方法学比对: 临床诊断标准比对选择核酸作为比对方法, 鉴于腺病毒的潜伏期为 3~8 d, 核酸的出现时间会早于 IgM 抗体, 因此对核酸阳性患者采集双份血清以监测 IgM 抗体的变化。同类产品的比对选择德国 Euroimmun 公司 ELISA 试剂盒被作为对比试剂, 用两个试剂盒每天平行检测相同的样本, 20 d 内检测完成, 按照试剂盒各自说明书判断结果。

1.4 统计学方法 按 EP12-A2 和 EP15-A2 文件进行试验数据的统计学处理。不精密度 CV 值用 Excell 计算; 方法学比对数据以四格表显示; 符合率 95% 置信区间用 Excell 计算; 一致性 Kappa 值用 SPSS 18.0 计算, Kappa 值 0.61~0.80 表明两者高度一致性, 0.81~1.0 表明两者极高一致性<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

2.1 EP12-A2 精密性  $C_{50}$  用 3 个批次试剂各检测 40 个重复, 阳性结果均在 14~26 个范围内,  $C_{50}$  制备

正确。 $C_{50} + 20\%$  用 3 个批次试剂各检测 40 个重复, 阳性结果均  $\geq 36$  个,  $C_{50} - 20\%$  用 3 个批次试剂各检测 40 个重复, 阴性结果均  $\geq 36$  个, 3 批次的精密性均验证通过, 结果见表 1。将  $C_5$ 、 $C_{50} - 20\%$ 、 $C_{50} + 20\%$ 、 $C_{95}$  4 个浓度的各 40 次检测结果阳性率绘制成不精密度曲线, 可见  $C_{50} \pm 20\%$  的浓度值范围在浓度区间之外, 说明精密性良好, 见图 1。

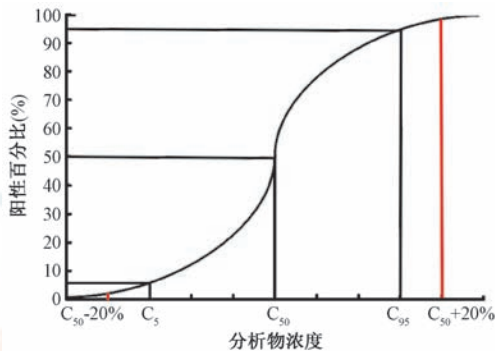


图 1 不同浓度的各 40 次检测结果阳性率的不精密度曲线

Fig.1 Imprecision curve of different concentration with 40 times tests of positive samples

2.2 EP15-A2 精密性 用 3 批试剂检测高、中、低 3 个浓度样本的不精密度 CV 均在 7% 以下, 低于行业标准和厂家说明书声称, 结果见表 2。

### 2.3 EP12-A2 方法学比对

2.3.1 与临床诊断标准比对: 198 例患者分别采集了咽拭子样本和血清样本, 其中 15 例患者核酸检测为阳性, 183 例患者核酸检测为阴性。15 例核酸检测为阳性的患者 IgM 抗体均检出了阳性, 灵敏度为 100% (95% CI: 79.6%~100%), 包括入院出院双份血清 IgM 均阳性 2 例, 阴性转阳性 9 例, 阳性转阴性 4 例, (见图 2)。183 例核酸检测为阴性的患者检出 IgM 阳性 4 例, 特异性为 97.8% (95% CI: 94.5%~99.1%)。见表 3。与临床诊断标准比对 Kappa 值 = 0.871 (P < 0.05)。

2.3.2 与同类产品比对: 门诊和住院患者采集的 558 例血清标本中, 酶联免疫法检出 13 例可疑样本计入阴性统计。磁微粒化学发光法与酶联免疫法的

表 1 接近临界值的样本重复性验证

Tab.1 Repeatability verification of the critical value sample

试剂批次	$C_{50}$		$C_{50} + 20\%$		$C_{50} - 20\%$	
	阳性 (%)	结论	阳性 (%)	结论	阴性 (%)	结论
第 1 批	16/40 (40.0)	正确	38/40 (95.0)	通过	40/40 (100)	通过
第 2 批	18/40 (45.0)	正确	39/40 (97.5)	通过	39/40 (97.5)	通过
第 3 批	22/40 (55.0)	正确	40/40 (100)	通过	40/40 (100)	通过

阳性符合率为:66.7%(95%CI:53.6%~77.7%),阴性符合率为:97.4%(95%CI:95.4%~98.5%),总符合率为 93.9%(95%CI:91.6%~95.6%),与同类产品比对的 *Kappa* 值=0.678( $P<0.05$ )。见表 4。

表 2 高、中、低 3 个浓度样本 3 批试剂检测的精密度

Tab.2 Precision of 3 batches reagents with different concentration

样本	批次	平均值	标准差	变异
		S/CO	SD	CV(%)
高值样本	第 1 批	5.01	0.22	4.39
	第 2 批	4.97	0.23	4.63
	第 3 批	4.97	0.21	4.23
中值样本	第 1 批	3.77	0.19	5.04
	第 2 批	3.73	0.18	4.83
	第 3 批	3.75	0.20	5.33
低值样本	第 1 批	1.07	0.07	6.54
	第 2 批	1.19	0.06	5.04
	第 3 批	1.11	0.07	6.31

表 3 磁微粒化学发光法 IgM 与临床诊断标准比对结果

Tab.3 Comparison of magnetic particle chemiluminescence IgM with clinical diagnostic criteria

	PCR		合计
	阳性	阴性	
	磁微粒化学发光法 IgM	15	4
	0	179	179
	15	183	198

### 3 讨论

精密性是体外诊断试剂盒的重要性能指标,描  
 双份血清IgM S/CO值变化

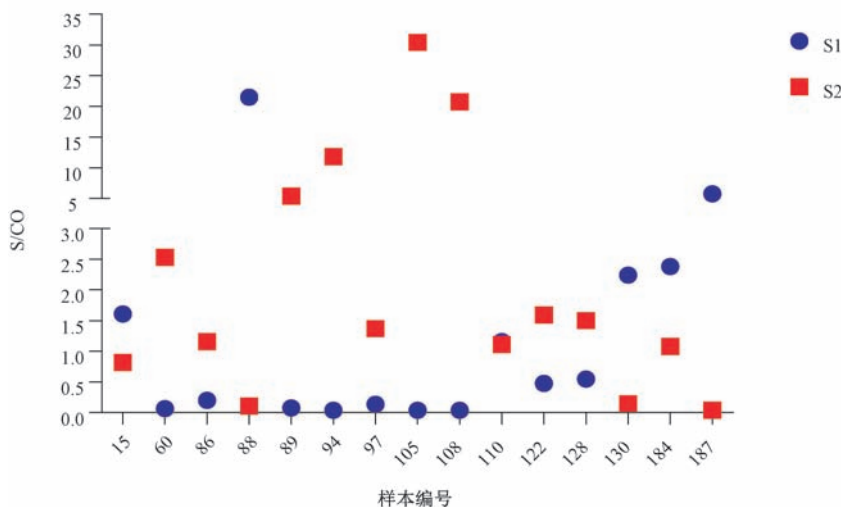


图 2 15 例核酸阳性患者双份血清 IgM S/CO 值变化  
 (入院时编号 S1, 出院时编号 S2)

Fig.2 Changes of IgM S/CO value in double sera of 15 nucleic acid positive patients (no. S1 on admission, no. S2 on discharge)

述方式有多种,本研究中使用了 EP12-A2 和 EP15-A2 两种不同的评估方式。精密性评估所用样本均为阳性血清或用人血清稀释的阳性血清,以排除基质效应的影响<sup>[10]</sup>,同时还包括了强、中、弱反应性样本,保证评估结果与在临床应用中沒有偏差。结果显示,用 EP12-A2 方法验证的 3 批产品  $C_{50} \pm 20\%$  的浓度值范围均在  $C_5 \sim C_{95}$  浓度区间之外,验证符合要求。3 批产品检测高中低 3 份样本的总不精密性均小于 8%,低于行业标准 15% 的要求。磁微粒化学发光法使用的固相载体是微米级的磁性微粒,整个反应过程是均相反应,单人份管理,避免了分析间的反应时间差和误差,因此用两种方案验证的精密性均良好。

表 4 磁微粒化学发光法与酶联免疫法比较

Tab.4 Comparison of IgM results between magnetic particle chemiluminescence and ELISA

		酶联免疫法 IgM		合计
		阳性	阴性	
磁微粒化学发光法 IgM	阳性	42	21(1)*	63
	阴性	13	482(12)	495
	合计	55	503(13)	558

注: \*: 括号中数字为可疑样本

Note: \* Numbers in parentheses are those of suspicious samples

方法学比对包括与临床诊断标准比对和与已上市的同类产品比对,本研究中的临床诊断标准为核酸,鉴于核酸的出现时间早于 IgM 抗体,因此每例患

者均采集了间隔一段时间的双份血清以监测 IgM 抗体的变化,双份血样本中任何 1 份 IgM 检测为阳性即认定腺病毒感染。本研究中 15 例核酸阳性患者的双份血清中至少有 1 份样本检出为 IgM 阳性,因此与临床诊断标准的阳性符合率为 100%,但其中有 9 例核酸阳性患者第 1 份样本 IgM 检测为阴性,随后出现了阳转,由于腺病毒的潜伏期约 3~8 d,入院时第 1 份样本 IgM 抗体可能尚未出现,结果符合核酸与抗体的出现规律<sup>[11]</sup>。与临床诊断标准的比对结果提示磁微粒化学发光法 IgM 可用于腺病毒感染的检测,对于早期感染者初次检测为阴性时,应最好在间隔几 d 后再次采样检测。

与已上市同类产品 ELISA 方法比对时,为降低人群选择对比对结果的影响,本研究中样本人群来自 6 个科室,包括了相似疾病患者和可能干扰的人群,与同类产品比对的阳性符合率为 66.7% (95% CI: 53.6%~77.7%),阴性符合率为 97.4% (95% CI: 95.4%~98.5%),*Kappa* 值 < 0.75,表明两种方法的一致性不高,阳性符合率偏低。EP12-A2 文件指出评价方法和对比方法的错误结果都会导致比对结果的不一致,只要对比方法的结果不是 100% 符合,都需要对不一致样本用金标准进行检测,以确认哪个方法更准确,同时患者的临床诊断和样本的其他临床信息应当进行回顾以确定那些具有差异结果的样本中是否有显著的临床症状,从而需要进行进一步的调查。虽然目前腺病毒 IgM 抗体的检测尚没有国家标准和国家参考品,但参照磁微粒化学发光法腺病毒 IgM 检测方法,与临床 PCR 检测方法对比分析结果,磁微粒化学发光法的特异性和敏感性结果比较好。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 杨俊梅: 酝酿和设计实验, 实施研究, 分析/解释数据, 起草文章, 获取研究经费; 刘倩倩、崔宁华: 采集数据; 孙红启: 分析/解释数据, 对文章的知识性内容做批评性审阅, 统计分析

#### 参考文献

- [ 1 ] Gao WJ, Jin Y, Duan ZJ. Research progress in human adenovirus[J]. Chin J Virol, 2014, 30(2): 193-200.
- [ 2 ] 唐浏英. 腺病毒分型与诊断方法研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(5): 391-393. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2008.05.024.
- [ 3 ] 中华医学会呼吸病学分会. 中国成人社区获得性肺炎诊断和治疗指南(2016 年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(4): 1-27. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2016.04.001.
- [ 4 ] 郭炽星, 劳丽嫦, 蒋敏慧, 等. 梅毒螺旋体 4 种血清学检测方法的临床评价[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(11): 1484-1485. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.014.
- [ 5 ] 罗立梅, 张彬, 陈刚. 化学发光微粒子免疫分析法检测性激素 6 项的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(9): 1214-1216. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.021.
- [ 6 ] 唐恩跃, 何增品, 崔晓花, 等. 基于 CLSI EP12-A2 文件要求的乙型肝炎五项定性检测性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(24): 3443-3444. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.022.
- [ 7 ] Clinical and laboratory standards institute. User protocol for evaluation of qualitative test performance [J]. Approved Guideline, Second Edition [S]. EP-12A2, CLSI, 2008.
- [ 8 ] Clinical and Laboratory Standards Institute. User demonstration of performance for precision and accuracy EP15-A2 [S]. Wayne, USA: CLSI, 2004.
- [ 9 ] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977, 33(1): 159-174. DOI: 10.2307/2529310.
- [ 10 ] 张江涛, 曾洁, 马嵘. 血清尿酸测定的基质效应[J]. 检验医学, 2016, 31(8): 635-639. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2016.08.001.
- [ 11 ] Lessler J, Reich NG, Brookmeyer R, et al. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(5): 291-300. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70069-6.

(收稿日期: 2019-05-15)

(本文编辑: 唐浏英)