



CNAS-GL043

兽医检测实验室 ELISA 试验测量
不确定度评估指南

Guide to the Evaluation of Uncertainty in ELISA Test
Measurement in Veterinary Laboratory

中国合格评定国家认可委员会

兽医检测实验室 ELISA 试验测量不确定度评估指南

1、适用范围

本指南规定了兽医检测实验室对 ELISA 试验进行测量不确定度评估的“从上到下法”和“从下到上法”。

本指南适用于兽医检测实验室对 ELISA 进行测量不确定度的评估。

2、引用文件

下列文件中的条款通过引用而成为本文件的条款。以下引用的文件，注明日期的，仅引用的版本适用；未注明日期的，引用文件的最新版本（包括任何修订）适用。

3.1 CNAS— CL01 《检测和校准实验室能力认可准则》

3.2 CNAS-CL01-G003:2019 《测量不确定度的要求》

3.3 OIE 《Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals 》(2019): Chapter 1.1.5 “Quality management in veterinary testing laboratories”、Chapter .2.2.4 “Measurement uncertainty”

3、术语和定义

测量不确定度：与测量结果相关联的参数，表征合理地赋予被测量值的分散性。

标准不确定度：以标准偏差表示的测量不确定度称为标准不确定度，以 u 表示。

扩展不确定度：确定测量结果区间的量，合理赋予被测量之值分布的大部分可望含于此区间。

不确定度的 A 类评定：对在规定测量条件下测得的量值用统计分析的方法进行的测量不确定度分量的评定。

不确定度的 B 类评定：用不同于测量不确定度 A 类评定的方法对测量不确定度量进行的评定。

合成标准不确定度：当测量结果是由若干个其他量的值求得时，按其他各量的方差（和）协方差算得的标准不确定度。

自由度：在方差计算中，和的项数减去对和的限制数，符号为 ν 。

置信概率：与置信区间或统计包含区间有关的概率值 $(1-\alpha)$ ， α 为显著性水平。当测量值服从某分布时，落在某区间的概率 P 即为置信概率。置信概率是介于 $(0, 1)$ 之间的数，常用百分数表示。在不确定度评定中置信概率又称置信水准或置信水平。

包含因子：为获得扩展不确定度，而对合成标准不确定度所乘的数字因子。包含因子一般以 K 表示。置信概率为 P 时的包含因子用 K_P 表示。

4、“从下到上法” / “影响因素分析法” 评估 ELISA 测量不确定度的步骤

4.1 确定 ELISA 试验检测结果不确定度来源

4.1.1 A 类不确定度因素

A 类不确定度影响因素包括（但可能不限于）对被稀释后的被检血清或抗原的每个浓度进行的多个平行进检测引起的不确定度、不同人员之间不同检测同一样品引起的测量不确定度、标准样品引起的不确定度、不同品牌试剂用于同一血清进行引起的不确定度、被检样品/试剂盒存放条件引起的不确定度、采样是否正确及样品是否被污染引起的不确定度、样品运输和储存条件引起的不确定度、处理样品引起的不确定度、环境条件引起的不确定度、设备因素引起的不确定度、未知的随机因素引起的不确定度。

4.1.2 B 类不确定度影响因素

B 类不确定度因素因素包括（但可能不限于）酶标仪的分辨力、孵育所用的恒温箱温度、加样器、天平、未知随机因素（如设备供电是否稳定、环境温度是否变化很大、试剂反复冷藏、人员身体状况等等）。

4.2 影响 ELISA 试验检测结果各因素不确定度的评估

4.2.1 A 类因素的不确定度评估

对列出的 A 类不确定度影响因素，分别进行重复测量。对每个影响因素测量出的结果按照如下方式分别计算。

(1) 计算所测量之值的平均值 \bar{x}

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n: 测量列数据的个数;

X: 第 i 个测量值;

(2) 计算每个影响因素有限测量值的标准偏差(用 S 表示)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n v_i^2}{n-1}}$$

$v_i = x_i - \bar{x}$ (即: 测量结果减去被测量的最佳估计值)

(3) 计算每个影响因素有限次测量值的相对标准偏差(或称为平均值的标准偏差)

$$S_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$S_{\bar{x}}$ 为 \bar{X} 的实验标准偏差

(4) 每个影响因素的标准不确定度评估

$$u = S_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

4.2.2 B 类因素的不确定度评估

(1) 加样器产生的不确定度

加样器产生的不确定度来源于加样器(C)产生的不确定度 $u(C)$ 和温度效应(T)产生的不确定度 $u(T)$ 。

加样器校准(C)产生的不确定度 $u(C)$ ：根据加样器说明书的介绍，该加样器的准确度为 $\pm 2\%$ ，ELISA 试验中每次加样量为 $100 \mu\text{L}$ ，按矩形分布处理，加样器引入的标准不确定度为： $u(C) = (100 \mu\text{L} \times 2\%) / \sqrt{3} = 1.15 (\mu\text{L})$

温度效应(T)产生的不确定度 $u(T)$ ：容量器皿一般在 20°C 下被校准，假设实验室的温度在 $20 \pm 4^\circ\text{C}$ 之间波动，水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4}/^\circ\text{C}$ ，按矩形分布 $100 \mu\text{L}$ 加样器由温度效应引入的标准不确定度为： $u(T) = 100 \times 4 \times 2.1 \times 10^{-4} = 0.084 (\mu\text{L})$ 。

由于校准和温度效应是 2 个相互独立的分量，因此 $100 \mu\text{L}$ 底物 ($V_{\text{底}}$) 引起的标准合成不确定度 $u(V_{\text{底}}) = [u^2(C) + u^2(T)]^{1/2} = (1.15^2 + 0.084^2)^{1/2} = 1.153 (\mu\text{L})$

同理由 $100 \mu\text{L}$ 终止液 ($V_{\text{终}}$) 所引起的标准合成不确定度 $u(V_{\text{终}}) = u(V_{\text{底}}) = 1.153 (\mu\text{L})$ ；

因为 $u(V_{\text{底}})$ 和 $u(V_{\text{终}})$ 是两个相互独立的两个分量，所以液层厚度的标准合成不确定度为： $u_{(\text{液层厚度})} = [u^2(V_{\text{底}}) + u^2(V_{\text{终}})]^{1/2} = 1.631 (\mu\text{L})$

(2) 酶标仪的不准确度

由前述可知酶标仪的测量引起的标准不准确度为 B 类不确定度，求解为：

$$u_{(\text{酶标仪})} = [u_1^2 + u_2^2 + u_3^2]^{1/2}$$

(3) 温育时间的不确定度

ELISA 试验中，孵育时间分别为 $45 \text{ min} \pm 3 \text{ min}$ 和 $30 \text{ min} \pm 3 \text{ min}$ ，按照均匀统计分布计算，标准差为 $3 \text{ min} / 3^{1/2} = 1.732 \text{ min}$ 。

$$u_{(\text{时间})} = [1.732^2 / 45^2 + 1.732^2 / 30^2]^{1/2} = 0.069 \text{ min}$$

(4) 温育温度的不确定度

ELISA 试验共需孵育 3 次，孵育的温度均为 $37^\circ\text{C} \pm t^\circ\text{C}$ 。根据均匀统计分布计算，其标准差为 $t/3^{1/2}$ ，所以温度的相对不确定度为：

$$u_{(\text{温度})} = [(t/3^{1/2})^2 + (t/3^{1/2})^2 + (t/3^{1/2})^2]^{1/2}$$

如果 t 为 $\pm 2^\circ\text{C}$ ， $U_{(\text{温度})} = 2.000$

4.2.3 相对标准不确定度的合成

以上各分量互不相关,故合成不确定度就是将各个影响因素算出来的不确定度合在一起的过程,即将各个影响因素的不确定度的 2 次方加在一起,再开平方根。

因为待测样品 (S), 阳性对照 (P), 阴性对照 (N), 酶标仪 (Uc), 温育时间 (U_{T1}), 温育温度 (U_{T2}) 的不确定度均为相对独立的分量, 所以合成相对标准不确定度为:

$$u = \sqrt{u^2(\bar{S}) + u^2(\bar{P}) + u^2(\bar{N}) + u^2(\bar{C}) + u^2(\bar{T}_1) + u^2(\bar{T}_2)}$$

4.2.4 扩展不确定度的计算与表示

以标准偏差的倍数表示的不确定度称为扩展不确定度, 以 U 表示。在自由度 $\nu = n-1$, 测量结果的置信水平定为 95% 时, 最佳估计值的扩展不确定度为 $U = k \cdot s_x$, 对于有限次测量, 可通过查学生 T 表得到包含因子 K。在 ELISA 试验中一般使用 2 倍扩展不确定度, 即 $K=2$ 。

4.2.5 不确定度的报告

得出 ELISA 试验的不确定度后, 如果需要在检测报告中予以表示, 可表示为: $X = x \pm U$, 其中 x 为实际样品的 OD 值, U 为 OD 值的不确定度, X 表示被检样品的准确的 OD 值所在的区间。

4.2.6 不确定度的应用

根据所用 ELISA 试剂盒的结果判定标准, 当 $OD > 0.5$ 时判定为 ELISA 阳性 (+), 当 $OD < 0.5$ 时判定为 ELISA 阴性 (-)。如果测得了本实验室的 ELISA 试验的确定度, 就应该计算出每个样品的 $X = x \pm U$ 。例如, 在 U 为 ± 0.02 , 实际样品测得的 OD 值为 0.49, 表示被检样品准确的 OD 值应该在 0.47-0.51 之间; 在 U 为 ± 0.02 , 实际样品测得的 OD 值为 0.51, 表示被检样品准确的 OD 值应该在 0.49-0.53 之间。这二份样品不可以完全确定其为阴性结果。如果实际样品测得的 OD 值为 0.48 以下或 0.53 以上, 即使把不确定度计算在内, 前者的最大 OD 值也小于 0.5, 仍可判为阴性, 后者的最小 OD 值也大 0.5, 仍可判为阳性。

5. “对照样品” / “自上而下”法评估 ELISA 测量不确定度的步骤

5.1 “评估原理

“对照样品” / “自上而下”法评估 ELISA 的测量不确定度, 是利用质控样品对试验方法的全过程和性能进行监控, 直接评估该试验过程的合成不确定度。

实际评估时, 选择一个弱阳性对照血清质控样品, 进行有限次的 ELISA 重复试验, 计算出检测结果的平均值、标准偏差 (SD)、相对标准偏差 (RSD)。RSD 即为不确定度。假设数据以正态分布, 在阈值附近以 95% 置信水平计算。扩展不确定度即为: 2

乘以 RSD。

5.2 评估举例

5.2.1 评估实例

用检测禽流感病毒抗体的竞争 ELISA 有限的的数据为例,说明血清学中“自上而下”评估测量不确定度的方法。

在竞争 ELISA 试验中,试验结果是所测得样品(本实验是阳性对照质控样品)的 OD 值与阴性对照 OD 值间的比值,再用 1 减去这个比值。就得到了与所测抗体活性水平正相关的数值,抗体活性水平越高,计算得到的值越大。这个值即为抑制百分值或 PI 值。

所以弱阳性对照血清的 OD 值 (OD_L) 就转换为:

$$PI_L = 100 \times [1 - \{ OD_L / OD_N \}]$$

相对标准偏差就是:

$$RSD (PI_L) = SD (PI_L) / (PI_L)$$

试验检测数据如下表

试验检测次数	PI (%)
1	56
2	56
3	61
4	64
5	51
6	49
7	59
8	70
9	55
10	42

经过计算可得:

检测次数为 10, 平均值 (Mean) 为 56.3, 标准偏差 (SD) 为 7.9。

相对标准偏差 (RSD) = $SD/Mean = 7.9/56.3 = 0.14$

假设数据以正态分布, 在阈值附近以 95% 置信水平计算。扩展不确定度

$$U(95\%CI) = 2 \times RSD, \text{ 即 } 2 \times 0.14 = 0.28$$

5.2.2 评估结果的应用

举例的禽流感病毒抗体竞争 ELISA 试验的判定阈值 PI 为 50% (即 $PI > 50\%$ 为阳性, $PI < 50\%$ 为阴性)。所测得的不确定度在阈值水平上的应用为:

$$95\%CI = 50\% \pm (50\% \times 0.28) = 50\% \pm 14\%$$

解释：在 95%置信度下，如果检测结果 PI 大于 64%时，不可判为阳性结果。同样，在 95%置信度下，如果检测结果 PI 不小于 36%时，不可判为的阴性结果。

所有试验都应建立用于解释与“灰色区域”或“不确定/质疑区”有关的较低置信区间。

参考文献

1. 国家质量技术监督局计量司组编. 测量不确定度评定与表示指南, 第一版. 北京: 中国计量出版社。
2. 李慎安. 测量不确定度表达百问, 第一版. 北京: 中国计量出版社。
3. 李慎安、郭兰典. 商品检验不确定度评定释例, 第一版. 北京: 中国计量出版社。
4. 《检测和校准实验室能力认可准则》CNAS-CL01:2006。
5. 《测量不确定度评定与表示》JJF1059-1999。
6. 《测量不确定度的要求》CNAS-CL07:2011
7. 《测量不确定度要求的实施指南》CNAS-GL05:2011
8. 中国实验室国家认可委员会. 实验室认可与管理基础知识, 第一版. 北京: 中国计量出版社。
9. 《通用计量术语及定义》JJF1001-1998。