DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.01.12

· 质量管理研究 ·

利用临床血常规标本富集血细胞在血液分析仪线性验证中的应用评价

王力,阳振曦,程焱,崔巍(国家癌症中心 国家肿瘤临床医学研究中心 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院检验科,北京 100021)

摘要:目的　利用临床血常规标本分离、富集血细胞,制备高浓度血细胞样品,用于血液分析仪线性范围的验证评价。**方法**　从多份临床新鲜血常规抗凝全血标本中分离、富集血细胞,制备高浓度血细胞样品,按照国家卫生行业标准 WS/T 406—2012 及 WS/T 408—2012 文件的要求,对 Sysmex XN-350 血液分析仪的线性范围进行验证。**结果**　混合多份临床血常规标本,通过分离富集血细胞可获得高浓度血细胞样品;对 Sysmex XN-350 血液分析仪线性验证数据进行多项回归分析显示,Hb 与 PLT 为一阶线性,而 RBC、HCT 和 WBC 为临床可接受的二阶线性。RBC、Hb、HCT、WBC 和 PLT 线性验证数据的不精密度计算值分别为 0.73%、0.58%、0.84%、1.11%和 1.39%,均小于判定界值 9.76%,数据的精密度较好,可满足线性评价的要求;实际验证的线性范围分别为(0~8.35)×10^{12}/L、0~260 g/L、0%~76.2%、(0~291.38)×10^{9}/L 和(0~2 404)×10^{9}/L,可基本满足临床需求。**结论**　混合多份临床血常规标本通过分离、富集可获得高浓度血细胞样品,可用于血液分析仪线性范围的验证。

关键词:血液分析仪;性能验证;线性范围;高浓度样品

中图分类号:R446　　**文献标志码:**A

Verification and evaluation for linear range of automatic hematology analyzer by using enriched blood cells from clinical complete blood count samples

WANG Li, YANG Zhenxi, CHENG Yan, CUI Wei (Department of Clinical Laboratory, National Cancer Center/National Clinical Research Center for Cancer/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, *China*)

Abstract: Objected　The high-concentration blood cell samples were prepared by using enriched blood cells separated from clinical complete blood count samples for verification of the linear range of thehematology analyzer. **Methods**　High concentration blood cell samples were prepared by separating and enriching blood cells from multiple fresh clinical anticoagulant complete blood count samples. According to the standard document for national health professional standard WS/T 406—2012 and WS/T 408—2012.the linear range of Sysmex XN-350 hematology analyzer was verified with high-concentration blood cell samples. **Results**　High-concentration blood cell samples were obtained by separating and enriching blood cells from mixing multiple clinical complete blood count samples which included different blood types. Polynomial regression analysis of the linear verification data from Sysmex XN-350 hematology analyzer showed that Hb and PLT were first-order linearity, while RBC, HCT and WBC were clinical acceptable second-order linearity. The imprecision of the linearity verification data of RBC, Hb, HCT, WBC and PLT were 0.73%, 0.58%, 0.84%, 1.11% and 1.39% respectively, which were all smaller than the judgment threshold 9.76%. The precision of the data was fine, and could meet the requirements of linear evaluation. The linear ranges of actual verification for RBC, Hb, HCT, WBC and PLT were (0 to 8.35)×10^{12}/L, 0 to 260 g/L, 0% to 76.2%, (0 to 291.38)×10^{9}/L and (0 to 2 404)×10^{9}/L respectively, which largely meeted the clinical requirements. **Conclusion**　High concentration blood cell samples could be obtained by separating and enriching mixing multiple clinical complete blood count samples, which could be used to verify the linear range of the automatic hematology analyzer.

Key words: hematology analyzer; performance verification; linear range; high concentration sample

随着 ISO 15189 医学实验室认可工作的不断推进以及实验室管理的逐步规范,验证血液分析仪的检测性能已基本成为临床实验室的常规工作之一。按照卫生行业标准 WS/T 406—2012《临床血液学检验常规项目分析质量要求》的相关规定,需验证的项目应包括:本底计数、携带污染、精密度、正确度、线性、可比性等[1]。但是目前商品化的线性质控物较少且缺乏有效的购买渠道,大部分医院在短期内遇到涵盖所有项目的临床极端高值样品的可能性很小,所以如何及时有效地进行线性评价是目

作者简介:王力,1984 年生,女,主管技师,硕士,从事临床基础检验工作。

通信作者:崔巍,研究员,E-mail:wendycuiwei@ sina.cn。

前血液分析仪性能验证工作中的一个难点[2]。为解决这一难题,现介绍一种可简单获得血液分析仪高浓度线性验证样品的方法供大家参考。

1　材料与方法

1.1　主要仪器与试剂　XN-350 血液分析仪及其配套试剂、校准品和质控品(日本 Sysmex 公司)。Heraeus Labofuge 400 及 Heraeus Multifuge 4 KR 离心机(德国 Thermo Scientific 公司)。

1.2　标本采集与处理　按照标准操作流程[3]采集新鲜全血标本,EDTA-K_2 抗凝,用于血常规检测,完成检测并留取备份后的剩余标本用于本实验研究。

1.3　方法

1.3.1　高浓度红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)和血细胞比容(HCT)样品的制备　选取当天同血型全血标本 4 份(RBC 尽量>5.00×10^{12}/L),混合成 2 份后用 Heraeus Multifuge 4 KR 离心机 2 000 r/min 离心 3 min;用一次性塑料吸管去除大部分血浆后将剩余血细胞混合于 1 支试管中,获得约 3 mL 高浓度 RBC、Hb 和 HCT 样品。

1.3.2　高浓度白细胞(WBC)和血小板(PLT)样品的制备　(1)选取当天全血标本(ABO 血型可能不同,尽量选取 WBC 和 PLT 测定结果较高的标本,如 WBC>15.00×10^9/L、PLT>250×10^9/L)40 份,混合后倒入 8 支 10 mL 离心管中。(2)用 Heraeus Labofuge 400 离心机 3 000 r/min 离心 10 min,用一次性塑料吸管尽量提取中间富含 WBC 和 PLT 的白膜层(提取时会混有一定量的血浆、红细胞)混合备用(约 12 mL 分装至 4 支 EDTA-K_2 抗凝真空采血管内)。(3)摇匀后放入 Heraeus Multifuge 4 KR 离心机中,再次 3 000 r/min 离心 5~10 min,用一次性塑料吸管再次尽量提取中间白膜层混合备用(约6 mL 分装至 2 支 EDTA-K_2 抗凝真空采血管内)。(4)重复步骤 3,进一步富集 WBC 和 PLT,提高其浓度,得到约 3 mL 高浓度 WBC 和 PLT 样品。

1.3.3　线性验证样品的制备与检测　用 XN-350 血液分析仪配套稀释液[4]将上述高浓度血细胞样品分别按 100%、80%、60%、40%、20%、10%、2%、0%的比例进行稀释,稀释好的样品放置滚轴混匀器上进行混匀备用。每个稀释度的样品重复测定 3 次。

1.4　统计分析　依据行业标准 WS/T 406—2012《临床血液学检验常规项目分析质量要求》,按照行业标准 WS/T 408—2012《临床化学设备线性评价指南》的相关计算指标以及公式等采用 R 语言统计分析线性数据[5]。首先,采用格拉布斯(Grubbs)法进行离群值检验,剔除离群值。然后,对线性验证数据进行多项回归分析,确定最优拟合方程;如数据拟合结果为统计学标准的非线性,则需按照指南中的公式计算最优拟合曲线与直线的平均差异值(average deviation from linearity, ADL),并与临界值进行比较以判断是否为临床可接受的非线性。最后,按照指南中的公式计算数据的不精密度,与界值进行比较从而检验线性验证数据的精密度,以保证多项回归分析统计学的准确性。具体计算公式参照指南中相应内容以及相关文献资料[6]。

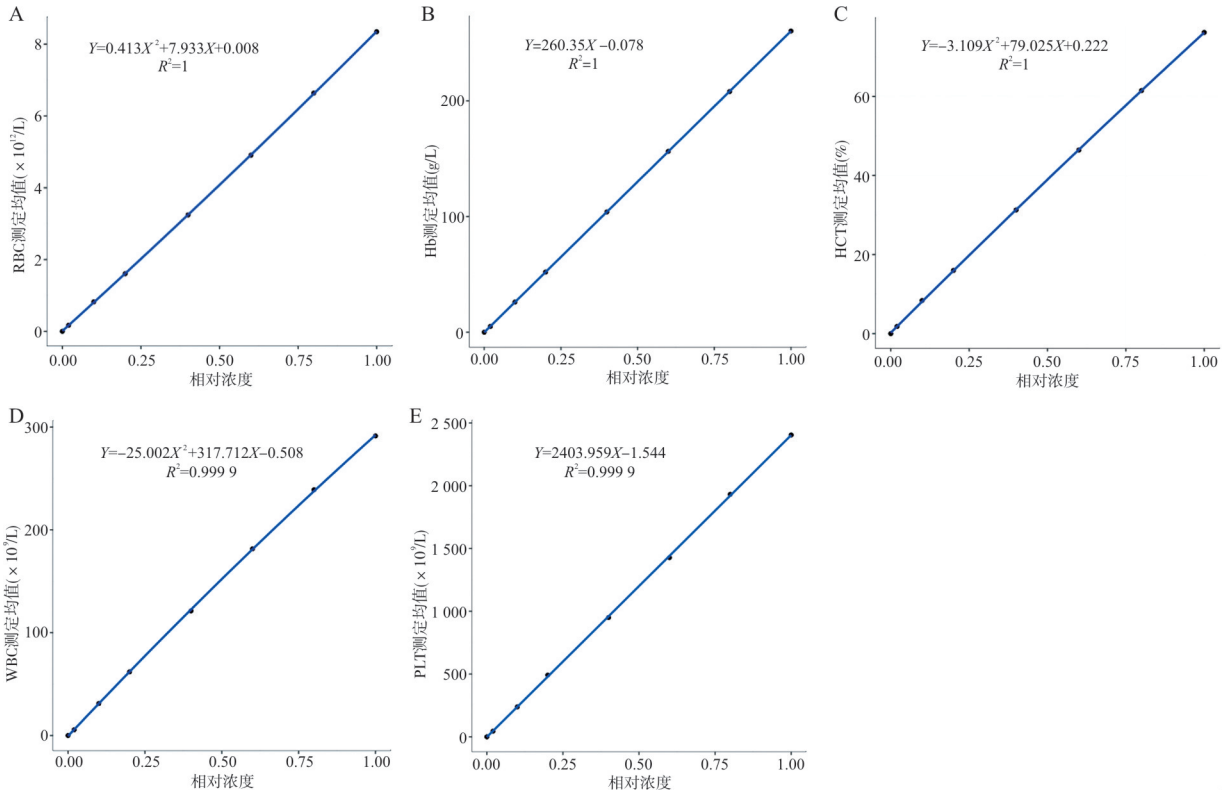
2　结果

2.1　高浓度血细胞样品的制备　将富集的高浓度血细胞样品用 Sysmex XN-350 血液分析仪进行初步检测,RBC、Hb、HCT、WBC 以及 PLT 的测定结果分别为 8.34×10^{12}/L、262 g/L、76.0%、293.00×10^9/L 和 2 387×10^9/L,达到预期要求。

2.2　线性验证数据及多项回归分析结果　剔除离群值后对验证数据进行多项回归分析,各项目线性验证不同比例浓度样品的测定值与最优拟合值见表 1。各项目线性验证数据的多项回归分析结果如图 1 所示,Hb 与 PLT 为一阶线性,而 RBC、HCT 和 WBC 为二阶线性,R^2 均在 0.95 以上。

表 1　各项目线性验证不同浓度样品的测定结果及最优拟合值

项目		100%	80%	60%	40%	20%	10%	2%	0%
RBC(×10^{12}/L)	平均值	8.35	6.64	4.91	3.24	1.61	0.82	0.17	0.00
	拟合值	8.35	6.62	4.92	3.25	1.61	0.81	0.17	0.01
Hb(g/L)	平均值	260.33	208.00	156.33	104.00	52.00	26.00	5.00	0.00
	拟合值	260.27	208.20	156.13	104.06	51.99	25.96	5.13	−0.08
HCT(%)	平均值	76.17	61.47	46.43	31.27	15.97	8.37	1.80	0.00
	拟合值	76.14	61.45	46.52	31.34	15.90	8.09	1.80	0.22
WBC(×10^9/L)	平均值	291.38	239.01	181.59	121.26	61.91	31.15	5.64	0.00
	拟合值	292.20	237.66	181.12	122.58	62.03	31.01	5.84	−0.51
PLT(×10^9/L)	平均值	2 404.00	1 931.67	1 427.33	950.33	491.33	238.67	44.67	0.00
	拟合值	2 402.41	1 921.62	1 440.83	960.04	479.25	238.85	46.54	−1.54



注：A～E 分别为 RBC、Hb、HCT、WBC 和 PLT 线性多项回归分析结果。

图 1　线性多项回归分析结果

2.3　非线性程度判断及精密度评价　从图 1 中可看出 RBC、HCT 和 WBC 为统计学标准的非线性，需计算 ADL 值以判定是否为临床可接受的非线性。RBC、HCT 和 WBC 的 ADL 计算值分别为 1.19%、0.95% 和 1.99%，均小于临界值 5.25%、5.28% 和 5.37%，为临床可接受的非线性。RBC、Hb、HCT、WBC 以及 PLT 线性验证数据的不精密度评估值分别为 0.73%、0.58%、0.84%、1.11% 和 1.39%，均小于判定界值 9.76%，说明数据的精密度良好，满足线性验证数据多项回归分析的统计学要求。

2.4　线性范围　各项目的实际验证线性范围与厂家声明的线性范围见表 2。由于 WBC 和 PLT 样品制备浓度未达到厂家声明的线性上限，导致实际验证线性范围低于厂家声明的线性范围，但实际验证线性范围也基本可满足绝大部分临床标本的检测需求。

表 2　各项目的实际验证线性范围与厂家声明线性范围

项目	实际验证线性范围	厂家声明线性范围
RBC(×10¹²/L)	0～8.35	0～8.60
Hb(g/L)	0～260	0～260
HCT(%)	0～76.2	0～75.0
WBC(×10⁹/L)	0～291.38	0～440
PLT(×10⁹/L)	0～2 404	0～5 000

3　讨论

利用临床标本分离 PLT 和 WBC 在血液分析仪线性评价中的应用虽已有报道[7-9]，但本研究的创新点在于：(1) 富集方法简便、可操作性强，富集制备的样品项目齐全、浓度值较高，可满足大部分临床检测线性验证需求，并且一次富集可获得多个项目同时呈现高浓度值的样品，可在满足线性验证浓度要求的同时节约检测成本；(2) 线性验证统计分析方法科学严谨，保证了线性验证结果的准确性。

高浓度 RBC 样品的制备相对简单，需要注意的是：因所需临床标本数量较少，推荐采用血型相同的临床标本；离心转速不需要过高、时间不宜过长，以免因离心力过大造成 RBC 的破损或因过度挤压不易混匀，从而影响 RBC 和 HCT 的检测结果。

制备高浓度 WBC 和 PLT 样品成功的关键点在于：(1) 离心转速不易过低，以免离心后 PLT 处于血浆层而非中间白膜层，造成 PLT 的丢失；(2) 提取中间白膜层时需操作熟练，减少 WBC 和 PLT 的丢失，从而提高富集的效率。虽然在选取临床标本时因所需标本量较多而未采用同型血相混且富集后的样品中仍含有一定量的 RBC，但制备的样品并未看到 RBC 有明显的凝集或溶血现象。分析原因可能为：当多份不同血型血液混合时，血浆中存在

的血型物质中和了部分血型抗体,从而抑制了血型抗体与红细胞之间的凝集反应[10]。

美国临床和实验室标准协会(CLSI)H26-A2 及 EP6-A 文件推荐可采用自身无细胞血浆、磷酸缓冲盐溶液(PBS)或仪器厂商推荐的稀释液对高浓度样品进行稀释,来配制不同浓度水平的线性验证样品[11-12]。本研究采用厂商推荐的可用于仪器预稀释模式检测的配套稀释液对高浓度样品进行稀释,是否会造成高浓度样品与低浓度样品以及稀释后的线性验证样品与临床常规标本间基质的不同,产生基质效应从而对实验结果产生影响,还有待进一步的研究探讨。

本研究采用多项回归分析对线性验证数据进行统计分析,发现 Hb 与 PLT 为一阶线性,而 RBC、HCT 和 WBC 为临床可接受的非线性;线性评价数据的精密度均较好,可满足线性评价的要求。

4　参考文献

[1]卫生部. 临床血液学检验常规项目分析质量要求: WS/T 406—2012[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.

[2]周睿, 王清涛. 医学实验室认可中关于方法学性能验证的高频问题及应对[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(12): 885-887.

[3]国家卫生健康委员会. 静脉血液标本采集指南: WS/T 661—2020[S]. 北京:中国标准出版社, 2020

[4]Maciel TES, Comar SR, Beltrame MP. Performance evaluation of the Sysmex® XE-2100D automated hematology analyzer[J]. J Bras Patol Med Lab, 2014, 50(1): 26-35.

[5]卫生部. 临床化学设备线性评价指南: WS/T 408—2012[S]. 北京:中国标准出版社, 2012

[6]Kroll MH, Praestgaard J, Michaliszyn E, *et al*. Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(9): 1331-1338.

[7]吴少珍, 邓坤仪, 麦伟霞, 等. 多样本分离血小板在 ADVIA 2120 血细胞分析仪血小板线性验证中的应用[J]. 中国临床实用医学, 2010, 4(3): 68-70.

[8]王力, 郑翠玲, 韩晓红, 等. 临床样本分离白细胞在 Sysmex XN 血细胞分析仪性能验证中的应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(9): 927-930.

[9]陈静, 段小勇, 王晟. 自制血液分析高浓度样品进行血液分析仪检测线性范围的验证[J]. 中国社区医师, 2019, 35(25): 119-120.

[10]柳荣, 陈世洁, 张家骧. 血清中与 IgG 抗体结合的血型物质血凝抑制效价的测定方法[J]. 中国医科大学学报, 1988, 17(4): 310-311.

[11]CLSI. Validation, verification, and quality assurance of automated hematology analyzers; Approved standard-second edition; CLSI document H26-A2[S]. Wayne, PA: CLSI, 2010.

[12]NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; approved guideline; NCCLS document EP6-A[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003.

(**收稿日期**:2020-11-20)

(**本文编辑**:王海燕)