

全自动血凝分析仪性能验证方案*

王 威, 王 刚 (西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061)

摘要:设备在安装时及常规使用中需要通过性能验证来评估其性能指标,来判断设备是否符合相关检验所要求的规格。全自动血凝分析仪由于其检测项目的特殊性,必须建立和实施与之相匹配的性能验证方案。该文参照 CLSI 相关文件总结出可行的适用于全自动血凝分析仪的性能验证方案,并进行综述。

关键词:全自动血凝分析仪;性能验证;CLSI 文件

中图分类号:R446 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)05-157-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.05.042

Protocol for Evaluation of the Automated Coagulation Analyzer

WANG Wei, WANG Gang (Department of Clinical Laboratory, the First

Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: When the device is installed, it needs to be verified by some special tests to evaluate its performance and to determine whether the device is in accordance with the requirements of the relevant inspection specifications. The projects of the automated coagulation analyzer are particularly different from other tests, especially the biochemistry tests. So the clinical laboratory should establish and implement the matching performance validation protocol. This article refers to the CLSI related documents to summarize a feasible and applicable evaluation protocol, helping for evaluating automated coagulation analyzer.

Keywords: automated coagulation analyzer; evaluation protocol; CLSI documents

ISO15189:2008《医学实验室质量与能力认可准则》对实验室质量控制的要求日益规范和严格, CNAS-CL02 指出:设备在安装时及常规使用中应显示出能够达到规定的性能标准,并且符合相关检验所要求的规格,亦即需进行性能评估^[1]。各实验室应参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI) H57-A^[2]及相关文件^[3~6]对血凝分析仪进行验证、确认和使用。血凝分析仪的性能验证包括精密度、携带污染、参考区间、线性等,以及运行凝固法、发色底物法和(或)免疫比浊法等方法的血凝仪的比对。本文参照 CLSI 相关文件对全自动血凝分析仪性能验证方案综述如下:

1 评估标本的选择 标本的采集、处理、运输和储存都应依据 CLSI H21-A5 文件进行^[7]。枸橼酸钠抗凝的新鲜血浆是凝血试验的首选,并且枸橼酸钠的浓度在同一实验室的使用应该保持一致。如果评估试验在标本采集后 4 h 内不能完成,推荐使用冷冻或者是冻干血浆进行评估,冷冻血浆优于冻干血浆。如果使用冷冻血浆,血浆应该在一 70℃ 或者更低的条件下保存。在一 20℃ 条件下保存超过 2 周的标本是不被接受的,因为某些因子的活性可能降低。冷冻后复融的标本,其检测结果不能与新鲜血浆进行比较^[8]。然而,如果只有一 20℃ 的冷冻条

件,冷冻的血浆标本需复融后在目前使用的系统与待评估的系统同时检测,以得到在相同条件下可比较的数据。

2 评估项目的选择 评估试验的范围取决于实验室测试的范围及测试数量。最基本的评估项目应包括一步法的 PT, APTT, TT 和/或凝固法 FIB 的精密度、可比性。对于大型的方法学评估,需同时选择正常和病理性的血浆标本。这些方法包括用于筛查出血及血栓性疾病的凝固法、发色底物法;自动免疫比浊法及监测抗凝治疗的方法。同时评估同一台仪器上所有的一步法的因子试验和发色底物法检测试验是没有必要的,可以通过项目的组合来达到评估的目的,得到仪器的性能指标,比如:一个基于一歩法 PT 试验的因子(V 因子活性);一个基于一歩法 APTT 试验的因子(Ⅲ活性);一个直接发色底物法试验(蛋白 C 活性),一个间接发色底物法试验(抗凝血酶活性)和一个免疫比浊法试验(vWF 抗原)。D-二聚体缺乏统一标准,不适合进行方法学的比较。

3 试剂的选择 试剂的选择取决于评估的目的,应用于筛选方法的试剂应当与推荐使用的常用试剂进行比较,并适用于参考仪器。由于试剂的组分可能影响检测结果,因此通常进行同组分对相同组

* 作者简介:王 威(1984—),女,硕士,主管检验师,主要从事临床血液学检验相关工作,Tel:029-85324014,E-mail: wangwei-1516@163.com。
通讯作者:王 刚,副教授,主要从事临床检验工作。

分”的比对。例如,进行比对的不同促凝血酶原激活酶试剂应包括有同种的组织因子,比如重组人源试剂对重组人源试剂,兔脑试剂对兔脑试剂,或者至少要有相似的国际敏感指数(ISI)值;并且 APTT 试剂的激活剂应尽量匹配。

4 精密度测试 精密度通常用不精密度来表示,不精密度报告为标准差(s)或者变异系数(CV%)。H57-A^[2]指出:精密度测试应包括重复性(批内精密度)和实验室的批间精密度。传统的精密度测试方法为,同一标本连续运行 20 次计算批内精密度;相同的标本每天运行一次,共运行 10~30 天,计算批间精密度。但是,由于测试批间精密度的方法存在许多缺陷,现在已被在数天内重复测试的方法所取代。检测批间精密度的推荐方法^[9,10]:每天运行一次两个浓度水平、各三份的血浆标本,持续 5 个工作日。如果同一批内出现失控数据,弃去本批次的所有数据,再重新运行一次。

通常,对于批间精密度的检测,每个实验项目需要 2 或 3 份不同水平的血浆标本。典型的,PT, APTT, TT 和/或凝固法 FIB 批间精密度测试需要一份正常血浆和一份异常高值血浆,或者一份正常血浆和两份不同浓度水平的异常血浆,其中至少一份异常血浆的浓度水平应当接近临床决定水平。

正常标本和异常标本的不精密度的可接受水平可以咨询仪器制造商。但是仪器制造商的重复性声明需要通过比较实验室测量的不精密度和仪器制造商声明的不精密度来确认。如果仪器制造商的声明用变异系数表示,可通过下式将 CV 换算为 s : $s = CV\% \times \bar{x} \pm s$ ($\bar{x} \pm s$ 为所有不同浓度样本检测结果的均值)。如果测定的 s 小于厂家的声明,那么实验室证明了其精密度与厂家是一致的。如果 s 大于厂家的声明时,一定要注意的是:用户的重复性可以大于厂家的声明,但不能有统计学上的差异^[10]。

5 正确度 正确度是指测定结果与真值间的接近程度^[2,11]。在凝血试验尤其是在凝血筛查试验中,真值的概念是不常用的。凝血酶原国际标准化比值(INR)已经成功标准化了,但是 PT, APTT, TT 仍然没有标准。尽管像Ⅲ因子、纤维蛋白原、抗凝血酶等项目可以得到 WHO 的国际标准,但是其评估方法和参考方法可能取决于方法学的应用、其它凝血因子的浓度和是否存在抗凝物质。当存在 WHO 标准时,可采用合适的 WHO 标准或者应用 WHO 标准校准过的质控或标准血浆进行结果的判定。

6 可比性 对于大多数的凝血试验,真值的概念是不适用的。在这种情况下,可比性可以用于替代

正确度的评估^[12]。通常,实验室需检测一定数量的涵盖试验项目可报告范围的标本去可靠地评价可比性。可比性用于血凝仪/试剂系统与目前使用的血凝仪/试剂系统,或认可的参考方法间的比较。PT 和 APTT 项目应该包含在任何可比性评估过程中^[2]。这些比对试验的运行依赖于试剂的选择。另外,对于可比性评估,仪器评估可能要求更全面的测试水准去评估试剂的反应性。

6.1 PT/INR PT/INR 项目至少应评估 40 份接收 VitK 拮抗剂治疗的病人标本。其中,30 份标本的 INR 范围在 2.0~4.5;5 份标本 INR<2.0;5 份标本 INR>4.5。可接受范围通常被定义为:大于 85% 的治疗范围(INR 2.0~4.0)内的标本结果,与现有的已建立的方法所得到的结果相比,其值在 ± 0.5 INR 内。如果可能,厂家和参考方法提供的 ISI 值需采用标定过的血浆进行确认^[13]。如果两种方法间的差异很明显,那么结果需要采用与参考方法最相似的方法进行确认,比如仪器参考方法用于确认仪器终点检测方法。

6.2 APTT APTT 的可比性评估应该包括正常标本,普通肝素治疗的病人标本,含狼疮抗凝物质的病人标本,因子缺乏的病人标本。如果 APTT 用于监测肝素治疗,至少需要评估 20 份 APTT 测定值涵盖整个治疗范围的病人标本。但是,在正常血浆中掺入肝素的做法是不可取的。这些数据可以用于肝素治疗范围的解释,其效果等同抗 Xa 试验(范围在 0.3~0.7 IU/ml),并可用于建立合适的 APTT 治疗范围^[14]。狼疮抗凝物质和/或因子缺乏的标本应当用于评价 APTT 试剂的敏感性^[14]。

7 参考区间 血凝仪选择项目参考区间的确认,需要使用至少 20 份健康个体的血浆标本^[15]。同时,性别、药物、激素水平、饮食补充物等影响因素需要依据测试项目考虑在内。理想状态下,检测条件应当与实验室的功能相符,比如日常检测采用新鲜血浆的实验室,也应采用新鲜血浆进行评估;日常检测采用冷冻复融血浆的实验室,则采用冷冻复融血浆进行评估。新鲜血浆标本应在 4 h 内完成检测。-70℃ 保存后的冷冻血浆标本需在 37℃ 水浴条件下迅速复融,轻柔混匀,并且立即检测。

8 携带污染 携带污染包括标本污染和试剂污染,通常是指标本吸样针残留有之前的标本或试剂^[16]。

8.1 标本携带污染 标本的携带污染信息可以由仪器厂家提供,也可以根据 H57-A 进行评估^[2]。PT 和 APTT 的标本携带污染程度的评估,需应用一个正常的血浆标本(标本 A)和一个极度异常的血浆标本(标本 B)进行测试。对于 PT,异常标本

可选择 INR 值等于 3.0~4.0 的含香豆素的血浆;对于 APTT,异常标本可选择含肝素的 APTT 值接近于 50~80 s 或其它相近的 APTT 值的血浆标本。标本按以下顺序进行检验: A1, A2, A3, B1, B2, B3。此顺序检测正常标本对异常标本测定结果的影响。然后,应用相反的顺序: B1, B2, B3, A1, A2, A3 来检测异常标本对正常标本测定结果的影响。每个顺序重复测定 10 次,携带污染百分率按下式进行计算:正常对异常标本携带污染率 = $(B1 - B3) / (A3 - B2) \times 100$,异常对正常标本携带污染率 = $(A1 - A3) / (B3 - A2) \times 100$,携带污染的显著性通过配对 t 检验进行计算。正常标本对异常标本携带污染的显著性计算 B1 和 B3 的值,异常标本对正常标本携带污染的显著性计算 A1 和 A3 的值。

FIB 标本携带污染程度的评估,需选择三个标本,其值覆盖可测量范围,中间值也可由等量的高值和低值标本混合而成^[17]。标本每天运行一批,持续 5 天,并按以下顺序进行检验,分析过程中不得更改、中断或插入其它标本:中值、高值、低值、中值、中值、低值、低值、高值、高值、中值。如果后面 9 个标本中的任何一个标本被拒绝、丢失或者任何原因的无结果,整个批次需要重新运行。第一个标本用于灌注系统,不用于计算。从第二个标本开始,所得数据用于每批的数据分析。数据可在 EX-CEL 表中计算。

8.2 试剂携带污染 如果仪器应用的是专用的试剂传递系统,携污评价是不需要的。然而,如果标本针同时用于采集样本和试剂,或所有的试剂用同一根针采样,则需要测定试剂携带污染率。试剂的携带污染信息可由厂家提供,也可根据 H57-A 进行评估^[2]。APTT 和凝固法(Clauss)FIB 的凝血酶携带污染的影响最好通过测试 5 等份正常血浆标本,并观察第一等份 APTT 值的逐渐缩短来进行评估。因为,血凝仪的检测具有随机性,其对标本的检测顺序并不一定按照命令输入的顺序进行。因此,在下一个测试开始之前,一定要确定前面的所有测试都完成。5 等份的正常血浆,按以下顺序进行检测: A1 APTT, A2 APTT, A3 APTT, A4 APTT, A5 APTT, A1 Clauss FIB, A2 Clauss Fib, A3 Clauss FIB, A4 Clauss FIB, A5 Clauss FIB。此顺序需重复检测 10 次,APTT A1 的均值与 A5 的均值进行比较,显著性通过配对 t 检验进行计算。凝血酶的携带污染率通过 APTT A1 的值与 A5 相比逐渐缩短来确定。

9 线性(可报告范围) 当验证线性范围时,需要 5~7 个能覆盖整个线性范围(厂家提供)的不同浓

度的标本,每个浓度水平测量两次。推荐用高值和低值浓度的样本按比例精确配成等间距的不同浓度样本,理想的样本类型是病人的标本,用接近于预期的可报告范围上限和下限(或测量低限)的两个分析浓度的标本配成所有标本浓度^[18]。中间浓度管由高浓度和低浓度管按恒定的间距配成不同的浓度,方法如下:第 2 管为 3 份低浓度和 1 份高浓度标本混合而成;第 3 管为 2 份低浓度和 2 份高浓度标本混合而成;第 4 管为 1 份的低浓度和 3 份高浓度标本混合而成。每管的浓度由以下公式来计算,第 1 管的浓度为 $C1$,体积为 $V1$,以此类推,第 5 管的浓度和体积分别为 $C5$ 和 $V5$:浓度 $C = (C1 \cdot V1 + C5 \cdot V5) / (V1 + V5)$ 。测量结果(Y)和预期结果(X)进行图解表示,然后进行统计学分析。

10 统计分析 比较不同的检测系统,对于标本数量的设定需根据研究所需要的检验效能来确定。应用 t 检验比较两个检测系统间的相差一个 s 的某一变量,当预设 $\alpha = 0.05$ 时,要达到 80% 的检验效能需运行 16 份标本;要达到 95% 的检验效能需运行 26 份标本^[2]。

11 结论 卫生部于 2012 年 12 月 25 日发布了卫生行业标准《临床血液学检验常规项目分析质量要求》(标准编号: WS/T 4062012)^[19],其中规定了自动血凝分析仪的性能验证方法和分析质量要求。行业标准的规定是满足临床需要的基本要求,一般比企业标准的要求低,当仪器说明书声明的性能指标高于行业标准时,临床实验室应按照说明书的要求实施性能验证^[20]。随着凝血检测项目的不断发展,以及自动血凝分析仪性能的不断提高,要求临床实验室采用更严格的评估方法来验证血凝仪的性能。仪器厂家的仪器性能声明还需在仪器安装时由实验室进行确认。

目前,某些厂家的血凝性能验证文件部分内容参考生化项目的性能验证,并不适用于血凝分析仪。比如 APTT 的携带污染程度的评估,在排除如肝素、狼疮抗凝物质等干扰因素后,应考虑相关凝血因子浓度及活性对结果的影响,因子活性或浓度越低,APTT 的值越高。因此,在 APTT 的携带污染程度的评估过程中,与生化项目不同的是可选择正常标本与高值标本进行测试,而非低值标本与高值标本。当实验室 APTT 的低值标本比较难获得时,正常标本可满足验证的要求。

CLSI 系列文件针对自动血凝分析仪的性能验证给出了很详细地指导,其要求高于行业标准及企业标准。实验室应根据本实验室的条件,参考 CLSI 相关文件编写适用于本实验室的血凝分析仪

性能验证程序,以确认仪器厂家的仪器性能声明,独立客观地对本实验室的血凝分析仪进行验证。

参考文献:

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02 医学实验室质量和能力认可准则[S]. 北京:中国计量出版社,2006:6.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL02 Accreditation Criteria of the Quality and Competence of Medical Laboratories [s]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2006:6.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol for the evaluation, validation and implementation of coagulometers; approved guideline [S]. Wayne: PA, CLSI H57-A, 2008.
- [3] International Organization for Standardization. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test system-Requirements for in vitro monitoring system for self-testing of oral-anticoagulant therapy[S]. Switzerland; Geneva, ISO/FDIS 17593, 2005.
- [4] International Organization for Standardization. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test system-guidance on risk analysis for in vitro diagnostic medical devices-complementary element[S]. Switzerland; Geneva, ISO/DIS 14971, 2004.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Managing and validating laboratory information systems; approved guideline[S]. Wayne: PA, CLSI ATUO 08-A, 2006.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; approved guideline-third edition[S]. Wayne: PA, CLSI M29-A3, 2005.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline-fifth edition [S]. Wayne: PA, CLSI H21-A5, 2008.
- [8] Woodhans B, Girardot O, Blanco MJ, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma[J]. Blood Coagul Fibrinol, 2001, 12(4): 229-236.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline-second edition[S]. Wayne: PA, CLSI EP5-A2, 2004.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness; approved guideline-second edition[S]. Wayne: PA, CLSI EP15-A2, 2005.
- [11] Clinical and Laboratory Standards Institute. Protocol for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline [S]. Wayne: PA, CLSI EP17-A, 2004.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition[S]. Wayne: PA, CLSI EP9-A2, 2002.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedure for validation of INR and local calibration of PT/INR systems; approved guideline [S]. Wayne: PA, CLSI H54-A, 2005.
- [14] Clinical and Laboratory Standards Institute. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test; approved guideline-second edition[S]. Wayne: PA, CLSI H47-A2, 2010.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline-second edition [S]. Wayne: PA, CLSI C28-A2, 2000.
- [16] England JM, Rowan RM, Van Assendelft OW, et al. Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte counting and cell marker applications [J]. International Council for Standardization in Haematology: Prepared by the ICSH Expert Panel on Cytometry. Clin Lab Haematol, 1994, 16(2): 157-174.
- [17] Clinical and Laboratory Standards Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement procedures; approved guideline-third edition[S]. Wayne: PA, CLSI EP10-A3, 2006.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A Statistical Approach; approved guideline[S]. Wayne: PA, CLSI EP6-A, 2000.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 406-2012 临床血液学检验常规项目分析质量要求[S]. 北京:中国标准出版社, 2013.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Analytical quality specifications for routine tests in clinical hematology [S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [20] 陆红, 李臣宾, 周文宾, 等. 《临床血液学检验常规项目分析质量要求》的适用性评价[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 169-172.
Lu H, Li CB, Zhou WB, et al. Applicability evaluation of "Analytical Quality Specifications for Routine Tests in Clinical Hematology" [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 169-172.

收稿日期: 2016-08-24
修回日期: 2017-07-05