

临床检验液相色谱-质谱检验中质量控制*

叶圆圆, 王 薇, 赵海建, 王治国[△]

(北京医院卫生部临床检验中心, 北京 100730)

摘要: 本文从液相色谱-质谱(LC-MS)检测的质量保证和质量控制着手, 讨论了质控品选择、质控浓度和频率、LC-MS 的额外质量控制样品、质控品可接受性评价、质控失控的纠正、多组分和多重检测的质控要求、周期性质量保证程序和其他质量保证方面, 希望对 LC-MS 检测的质量控制和质量保证提供参考。

关键词: 液相色谱-质谱; 质量控制; 临床检验

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 24. 058

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2016)24-3513-04

质量管理体系包括使实验室满足其质量目标的政策和程序。实验室质量管理体系的两大重要组成成分是质量保证(QA)和质量控制(QC)。液相色谱-质谱(LC-MS)检测的 QA 程序必须监控从检验前期到结果报告和解释的检验全过程。QC 计划应提供正在使用的 LC-MS 法的性能评价以保证进行合适的校准和保持合适的测量不确定度。定量 LC-MS 法可能会使用标本准备或预处理步骤如稀释、衍生化、水解、提取、加入内标和浓缩程序。为了使 QC 过程能充分地监控整个检验测量阶段, 必须用与患者标本测量相同的程序来测量质控品。而且, 质控品必须遵循所有的预处理步骤。

每个 LC-MS 法都必须定义其最低质量要求。QC 要求发展时应考虑方法的用途并以允许总误差(Tea)界限、预期生物学变异或医疗上使用该结果的风险为基础^[1-2])。已有文件提供了 QA 和 QC 的一般指导^[3-6]。

1 质控品选择

LC-MS 检测的质控品选择应考虑以下两点: 质控品的基质成分和质控品的稳定性。

1.1 质控品的基质 LC-MS 检测的 QC 过程必须监控重要的性能指标如校准有效性、提取效率、柱效和离子抑制程度。这些性能参数通常取决于样品基质的组成成分^[7-8]。用与患者样品基质不同的质控品来确定 LC-MS 的性能参数可能是无效的, 因为待测样品含有患者样品基质。因此, 质控品的基质成分应与患者样品基质尽可能相同。一般情况下, 商品化的质控品如果其基质合适的话是可以使用的。但对某些 LC-MS 检测而言, 商品化感兴趣分析物是不可使用的, 因为它们通常是免疫检测方法而设计的。而免疫检测法通常没有 LC-MS 法那么大的分析测量范围, 因此商品化质控品可能不能表示最佳质控浓度范围。

含有内源性分析物的混合患者样品或加入外源性分析物的混合样品都可作为质控品。但是基质成分的存在和含量, 如脂类、蛋白和药物, 可能会随混合患者样品的改变而改变。这些物质可能会造成干扰或增加物质间的批内或批间变异。吸附过的血清通常可用作内源性分析物的质控品准备的基质。但是, 残留的碳和吸附过程引起的基质变化可能造成该样品基质与原始的患者样品基质不同。对于药物检测, 质控品应包括

母体化合物和活性代谢产物。

应评估用于生产或准备质控品的程序、瓶间均匀性、批内变异和批间变异以确定该质控品是否适合于长期监控。质控品和校准品的制备应有两套不同的基础物质准备方案。由于对 LC-MS 法存在基质相关的离子抑制这种独特的影响, 因此建议对质控品基质与患者样品的可比性进行评价。基质可比性的体现是通过展示质控品有与原始患者样品可比的 LC-MS 性能参数, 如提取效率、回收率、色谱特征和离子抑制^[8]。实验室必须定义性能参数可比性的可接受标准并将其文件化^[9]。

1.2 质控品稳定性评估 对质控品稳定性特点的基础评估对于使用 QC 值来监控方法性能是十分重要的。若质控品保存不当或降解则无法使用。如果实验室自己制备质控品, 则实验室必须开展研究以确定其适合的保存条件和稳定性要求。

若实验室自己确定质控品的稳定性要求, 则以下信息应文件化: 保存条件、测定的浓度、不同时间间隔后改变的程度和确定稳定性是否可接受的标准。若质控品有冻融循环, 则应测定多次冻融循环后的影响程度。此外, 应评价样品准备和分析的时间间隔中, 室温下质控品的短期稳定性。实验设计详细评估质控品的冻融稳定性和短期、长期温度稳定性。质控品的处理过程(如解冻过程)应包括在实验室程序中。

若质控品厂商提供足够的关于稳定性要求验证的数据, 其提供的关于质控品的稳定性和保存的相关信息可能需要使用到。在这种情况下, 必须严格遵循厂商提供的保存信息。如果实验室对商品化质控品产物做出改变(如稀释以制备低浓度样品)或保存条件与厂商要求不符, 则实验室必须验证其保存要求和稳定性。

2 质控浓度和频率

2.1 确定质控浓度 根据管理指南, 对于定量检测, 在进行患者标本检测时每 24 小时至少要检测 2 个浓度的质控品。但对 LC-MS/MS 检测而言, 则需 2 个以上。LC-MS 检测需要考虑的一点是分析测量区间跨越许多量级的能力。若方法的分析测量区间很大, 则需增加质控浓度数量以稳定评估方法在区间内的性能。例如, 睾酮检测要求包括多个决定域(男女均包括在内), 因此需增加额外的质控浓度。

作者建议将质控品浓度设定在医学诊断点附近以辅助检

* 基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(7143182)。

[△] 通讯作者, E-mail: zgwang@nccl.org.cn。

测是否有临床上的显著误差。理想情况下,质控品浓度应覆盖整个分析测量区间,包括测量区间上限(ULMI)和测量区间下限(LLMI)。质控品浓度应跨越分析测量区间以保证对所有测量值有足够的方法性能,并保证检测的线性没有发生变化。建议最低有 3 个质控品浓度:1 个在 3 倍 LLMI 附近,1 个在测量区间的中间位置,1 个在 ULMI 附近。此外,质控品浓度的位置在已知的分析麻烦点上或附近如 LLMI 和临床决定阈可能有助于早期检测失误以满足方法性能标准。

2.2 质控的最低频率 如果检测的动态范围较大或一次运行中分析了相对较多的样品,则应增加质控品检测的数量(大于每 24 小时 2 个浓度)。作者建议一个批次中分析的质控品数量占总样品数量至少 5% 或最少有 6 个质控品样品(如 3 个浓度样品每个检测 2 次)。然而,方法要求的质控品分析频率应最终反应方法验证时建立的方法性能、一定时间内分析的样品数和错误结果的临床影响。日常检测中应不断再评价质控频率。若方法较稳定可用最低分析频率。若该方法表现出性能下降则应增加质控分析。质控样品的位置应优化分析转移、漂移或分析过程一部分的误差检测。大样品检测的情况下通常将质控样品放在该次运行的起始、中间和结束处,如大于 50 个样品。在持续检测状态下,应在满足方法转移或漂移的前提下按固定频率分析质控品,这样就不太可能出现错误结果。使用质控趋势规则和多规则或能更及时的检测出方法性能下降^[1,4]。

3 LC-MS 法的额外质量控制样品

以 LC-MS 为基础的定量检测要求额外监控 QA 和 QC 以保证检测的色谱条件和质谱条件处于最佳状态。

3.1 系统适应性评估 系统适应性检测的目的是在分析前评价 LC-MS 系统的性能。用非提取样品(如纯溶液中的分析物或内标)确定基本仪器性能参数在预期范围内。该样品提供的系统性能信息与提取过程无关。仪器平衡及注入后,应分析系统适应性样品。系统适应性样品应至少检测 3 次,其中第 1 次注入的结果应舍弃。可接受标准应包括方法验证过程中建立的基础色谱参数,如正确峰的存在、背景和分析物信号的强度、峰分辨率、保留时间和峰对称性。系统适应性检测失败可能意味着系统性能出现问题,应对问题进行调查。建议至少在每次分析运行前和定期维修后,真空损失或当系统达到平衡后进行系统适应性样品分析。

3.2 双空白和空白样品 双空白样品指的是不含分析物或内标的提取样品。双空白样品的目的是监控 LC 系统和质谱仪的背景信号,同时检测前面分析过程或高浓度样品分析后的携带物。建议在每批次分析的起始和结束时及高浓度校准品或质控品分析后注入双空白样品。在特异性分析物跃迁中存在峰或峰面积小于 20% LLMI 可保证系统不具有背景噪音或携带物残留。内标跃迁的峰面积应小于等于 5% 含内标样品的峰面积。

空白样品指的是含有内标但不含分析物的提取样品。空白样品的目的是确定降解的内标占分析物峰面积的百分比。空白样品的分析物跃迁峰面积应小于 20% 的分析物 LLMI。应在每批次检测的起始和结束处分析空白样品。

4 质控品可接受性评价

对于定量检测,实验室应在包含以前的质控品的批次内重复分析以建立可接受的 QC 均值和标准差。新批次质控品的

评价程序见 CLSI 文件 C24^[1]。不论质控品是购买的还是实验室自制的,实验室都必须建立自己的质控品可接受标准。可接受标准取决于方法性能目标和临床用途。不建议直接使用厂商提供的可接受性范围,除非实验室在使用前已经验证过。

5 质控失控的纠正

质控失控后应调查原因并记录采取的所有措施。应评价质控结果的数值可接受范围和色谱可接受标准,如干扰峰、基线噪音、保留时间变换、峰对称性和携带物。可允许范围外的数值变异可能是由于程序上的错误、方法性能减退或仪器相关问题。

6 多组分和多重检测的质控要求

LC-MS 法的优势之一在于注入一次样品可以检测多重分析物(如激素或药物)。这种多组分法的 QC 应包含合适浓度的每种分析物。检测中应建立每种分析物的 QC 可接受标准。如果分析物并非直接相关,某一分析物失控并不需要停止检测其他分析物。但是如果检测包含母体药物及其代谢产物,则不论母体或代谢产物失控,都应停止检测母体和代谢产物。

多重系统使用 2 个或以上的 LC 柱以提高 LC-MS 的产出。如果该系统含有两条独立的样品发送模块(如两个注射器,两个独立的 HPLC 系统),每个发送模块可被视为一个独立的系统并应服从控制。因此,每个传送系统和色谱柱都应有自己的校准品和质控品。而有一些系统是组态的,即样品间共用一个注射和传送系统,但样品在进入色谱柱以前分流开。相同的地方是一部分校准品在每个色谱柱中都需要分析,将两个色谱柱的结果进行整合以得到完整的校准曲线。在这种情况下,应安排好运行顺序以保证每个浓度的质控品在每个色谱柱中都得到了分析。

为了检测某个色谱柱的问题,最好使用具有相同提取或样品准备过程的分装的质控品以评价色谱柱的一致性。应比较 Levey-Jennings 图或其他 QC 转移或漂移检测机制的均值从而评估随时间迁移时柱子间的可比性。校准品、质控品和试剂的批次变化确认应包括每个柱子。

7 周期性质量保证程序

7.1 质谱仪质量校准/调整 质谱仪质量校准/调整通常同时进行。质量校准指检测特异性离子峰的正确质量值,通过注入质量校准标准品实现。质量调整指调整仪器参数如电压和气体流速以优化峰强度。如果质谱仪没有做好质量校准/调整工作,可能会造成敏感度或特异性下降。质量校准和调整,或校准/调整验证,应每 6 个月进行一次或根据厂商的要求。如果质量验证证明系统不稳定的话,应更加频繁地进行质量校准/调整工作。每个实验室都应建立质量校准/调整的最低频率和可允许总离子计数、离子强度、峰分辨率、质量跃迁的可接受标准。在维修、环境改变、仪器故障或仪器真空条件出现问题后应进行质量校准/调整或验证。

7.2 多仪器间的相关性 通常某一检测在多 LC-MS 系统间进行。每个 LC-MS 系统都应视为独立的,即使附加仪器源于同一厂商或有相同的模式。若要将某一已建立好并已验证过后的系统加入另一 LC-MS 系统中将需要进行方法验证。但根据管理指南,可能需要一个限制性更强的验证程序。限制性或部分验证应“出于目的需要”,而且只有当方法性能中潜在差异很小的情况下才需要证明。限制性验证范围可能从 LLMI、正

确度、精密度和分析测量区间的评价等整个完整验证过程,由实验室主任负责完成。至少每 6 个月应进行仪器间的相关性验证。可接受标准应基于方法性能标准和临床效果。

7.3 新色谱柱的确认 本文所说的新色谱柱是指在初始方法验证中从同一厂商处购买的并且与固定相类型相同的色谱柱。该色谱柱可能有或没有新的批号。若使用不同的固定相或不同厂商的色谱柱则需要重新进行方法验证。

不论是源于同一或不同厂商的新色谱柱的安装都应视为试剂批号改变。验证新色谱柱性能的过程应证明使用该新色谱柱是否能得到与之前相同的实验结果。该验证过程是在更换了色谱柱但不改变 HPLC 或 MS 的其他条件下分析 5 个先前分析过的基质合适的患者样品。用于验证新色谱柱的患者样品的浓度应跨越分析测量区间。如果无法获得患者样品,应进行独立线性检测。已有关于新试剂批次的确认指南。应比较新色谱柱与旧色谱柱的结果,可接受标准应基于之前建立的色谱接受标准(如保留时间、背景信号、峰面积/高、分辨率和错误峰的舍弃)和方法性能要求。

7.4 新批号质控品、校准品和试剂的验证 应验证新批号质控品、校准品和试剂^[1]。新批号商品化校准品或实验室内新制备的校准品必须经过验证以保证结果不会因为更换新的校准品而改变。在使用旧批次校准品进行方法校准的时候分析一组患者样品,然后当更换新批次校准品进行校准时重新分析这些患者样品。比较新旧批次中该组患者样品结果的差异以预先确立可接受标准,基于方法验证过程中建立的方法性能预期。或者,当方法用旧批次校准品时校准时,将新批次校准品视为未知样品进行检测,然后根据可接受标准比较新批次校准品的测定值与预期值间的差异。建议使用可溯源的新批次校准品进行验证。

应对新批次试剂进行验证。通常 LC-MS 检测中的“新批次试剂”不好定义,如:在流动相其他成分保持不变的情况下用新批次的甲酸或甲酸铵来制备流动相所组成的“新试剂批次”是否算新批次?如果流动相的制备过程严格按照操作规程而且组成成分的批次没有改变的情况下新制备的流动相是否算新批次?

实验室需考虑劳动、支出和其他现实问题。最佳实践建议是每个实验室根据改变试剂成分的预期结果来定义“新批次试剂”。例如,用于准备提取试剂的新批次基质粉末可能会影响方法性能,因此,实验室将其定义为试剂批次改变。实验室应具有该方法使用的所有试剂成分和色谱柱的分析证明书。此外,新批次试剂成分开始使用的日期应记录下来。

7.5 周期性正确度监控 建议进行 LC-MS 的周期性正确度监控。正确度监控应半年进行一次或当新批次校准品使用后。如果可能的话,建议使用具有给定值的可溯源到美国标准技术研究院(NIST)或检验医学溯源联合委员会(JCTLM)参考方法的校准品。如果已经证明可使用替代参考物质,实验室应溯源校准品赋值以用于实验室内自制校准品或没有溯源至 NIST 或 JCTLM 参考测量程序的商品化校准品。关于溯源性和方法标准化的内容可参考 CLSI 文件 EP32^[10]。建议半年进行一次校准品溯源性确认。

8 其他质量保证方面

LC-MS 法通常需要在分析前进行样品转换,如衍生化、提

取、离心和加入样品至自动注射器样品瓶。整个检测过程中应保持样品标识完整以保证检测结果与患者一一对应。有些实验室已经采用了自动样品准备过程,包括标本标识和追踪能力,但大多数实验室仍是手工完成的。实验室必须建立一个体系以对所有进样瓶贴上标签或能追踪其标识。此外,样品标识必须与运行顺序相连,从而使实验室可以评估特定患者样品、校准品或质控品的原始数据。

9 总 结

LC-MS 的分析特异性比目前广泛开展的诊断方法更高,如免疫法和酶法。正如免疫法从五十多年前开始发展至如今已经成为主要的诊断性检测的自动化技术方法,MS 也将继续发展并对临床实验室产生重要影响,因此,LC-MS 法的标准化至关重要。LC-MS 如今在代谢紊乱、疾病扫描、激素定量、药物治疗监测、微生物有机体确定和药物毒性/中毒的诊断中发挥重要作用^[11]。虽然 LC-MS 的应用范围很广,但美国食品与药品监督管理局(FDA)只批准了一项定量 LC-MS 检测,其他 LC-MS 检测项目属于 FDA 分类的实验室自建项目(LDT)。LC-MS 检测的重复性不是很理想,因此正确进行 LC-MS 检测的质量控制和质量保证是检测结果应用于临床的重要方面。

LC-MS 在临床实验室检测中的重要性与日俱增,对 LC-MS 法的稳健性和协调性需求也越来越高,但与之相关的质量管理体系还有待持续发展。本文从 LC-MS 检测的质量保证和质量控制着手,讨论了质控品选择、质控浓度和频率、LC-MS 的额外质量控制样品、质控品可接受性评价、质控失控的纠正、多组分和多重检测的质控要求、周期性质量保证程序和其他质量保证方面,希望对 LC-MS 检测的质量控制和质量保证提供参考。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Statistical quality control for quantitative measurement procedures; principles and definitions; approved guideline-third edition; C24-A3[S]. PA, USA; CLSI, 2006.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Laboratory quality control based on risk management; approved guideline; EP23-A[S]. PA, USA; CLSI, 2011.
- [3] Westgard JO, Basic QC. Practices: Training in statistical quality control for medical laboratories[M]. 3rd. Madison, WI: Westgard QC, 2010.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality management system; a model for laboratory services; approved guideline-fourth edition; QMS01-A4[S]. PA, USA; CLSI, 2011.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality management system; continual improvement; approved guideline-third edition; QMS06-A3[S]. PA, USA; CLSI, 2011.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Development and use of quality indicators for process improvement and monitoring of laboratory quality; approved guideline; QMS12-A[S]. PA, USA; CLSI, 2010.
- [7] Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry[J].

Clin Chem, 2003, 49(7): 1041-1044.

- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. Mass spectrometry in the clinical laboratory: general principle and guidance; approved guideline: C50-A [S]. PA, USA: CLSI, 2007.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of commutability of processed samples; approved guideline-third edition: EP14-A3[S]. PA, USA: CLSI, 2014.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Metrological traceability and its implementation; a report: EP32-R[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

[11] Lynch KL. CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry[J]. Clinical Chemistry, 2015, 62(1): 24-29.

(收稿日期: 2016-06-16 修回日期: 2016-09-26)

• 检验科与实验室管理 •

重症珠蛋白生成障碍性贫血儿童输血情况调查的意义及方法*

陆祝选, 苏相耿, 李 彬

(广西壮族自治区南宁中心血站 530003)

摘要:结合广西南宁地区重症珠蛋白生成障碍性贫血儿童输血调查情况,从调查的背景、调查的目的及意义、调查的内容以及方法等做了简要的阐述,并指出,要解决重症珠蛋白生成障碍性贫血儿童这个弱势群体的高额治疗费用以及血液来源,不仅需要血站的努力,更需要卫生行政部门及政府部门的大力支持,需要制定统一的输血费用报销政策,提倡重症珠蛋白生成障碍性贫血儿童门诊治疗,做到患儿能够登记在册,依据在册登记,定点供血,定点输血,定点规范治疗,定点报销。

关键词:重症珠蛋白生成障碍性贫血; 儿童; 输血; 调查研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.059

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2016)24-3516-04

珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血,简称地贫)是一种遗传性溶血性贫血,发病率极高。如果父母都是地贫基因携带者,其子女有 50% 可能为携带者,有 25% 的可能将成为重症地贫患者,这意味着孩子将终生靠输血和祛铁治疗维持生命,若不及时治疗,很有可能在学龄前死亡。目前,地贫的调查大多数为婚前的筛查,最大限度地避免重症地贫缺陷的新生儿^[1-2]。对于那些已经出生的重症地贫患儿,关于他们定期输血治疗相关学术报道几乎空白^[3]。笔者对南宁地区重症地贫患儿输血及供血情况进行调查,就开展重症地贫患儿输血的目的、意义及调查研究的方法做了简要的阐述。

1 调查背景

重症地贫患儿能否得到好的治疗,应该包括的因素有治疗方法、医疗费用、血液供应、社会关爱。2013 年 10~12 月,在广西医科大学第一附属医院“地贫之家”及解放军 303 医院“地贫之家”,选取 45 d 内在该 2 家医院门诊输血治疗的地贫患儿家长填写调查表(去除重复案例),见表 1。通过调查,可粗略反映广西地区地贫患儿输血的基本情况。经统计分析,广西地贫患儿遗传因素多为父母双向遗传地贫基因,户籍分布在城市、县份、乡镇均有,输血费用医保/新农合报销比例较高,除医保/新农合报销费用,每次输血自行承担的费用在 300 元以上的居多,首次输血年龄主要分布在 10 岁以内,输血病程大于 5 年的较少,患儿家长对于能否定期输血及足量输血持否定或不肯定态度。

1.1 输血治疗是最有效的方法 目前对于重症地贫儿童的治疗只有两种,输血祛铁治疗和造血干细胞的移植。虽然现在有很多人提出药物治疗、基因治疗等新的医疗技术手段,但在安全性、可持续性上还存在着许多疑问,至少需要 10~20 年去验证。一旦地贫患儿如果不加以正确治疗大多数患儿最终死于肝脏纤维化、脏腑功能衰竭及各种并发症。规范的输血及除铁

治疗能使重症地贫患儿有更好的生存质量^[4-5],重症 β 地贫患儿必须定时输注红细胞悬液,而且需要高量输血以维持生命和正常的生长发育,长期大量的输血,使铁负荷严重超载,因此在输血的同时必须使用祛铁剂,在未能进行造血干细胞移植前,输血将伴随终生。

1.2 输血治疗费用极为昂贵 重症地贫患儿长期输血是个漫长的过程,还有可能出现许多并发症,过敏反应、溶血反应、传染性疾病、铁沉积过多,输血费用及医疗费用将会成为一个家庭永远的负担。按照 1 例 6 岁左右体质量 20 kg 的患儿,如果需要保持高量输血,一次必须输注 2 U 的悬浮红细胞,每月 2 次,按照目前南宁医院 250 元/单位红细胞悬液的标准计算,平均每月单纯的输血费用近 1 000 元/人,另外还要加上检测费用、祛铁治疗费用、药物费用等,全年的费用达到了 5 万元/人,特别在农村地区,很少有家庭能够支付得起这么一笔费用。

1.3 血液供应紧张 我国血源供应普遍紧缺,血液供应紧张的情况将会在未来很长一段时间内是一种“常态”^[6]。按照“1.2”所述例子计算,每个重症地贫患儿每年需要 10 000 mL 的血,如果血站不能供应足量的血液,患儿不能接受“高量输血”的治疗,将会影响患儿的正常体格及智力发育,并伴随着多种并发症的发生。

1.4 社会关爱 重症地贫患儿及他们的家庭注定是个弱势群体,他们需要承受的不仅是来自医疗方面的诸多压力,如是否能够承受高额的医疗费用、是否有足够的血液供应等,更有来自社会的压力。由于患儿生长迟缓,体格相貌与正常孩子有所差异,往往在学龄阶段受到不同程度的歧视,如果得不到规范输血治疗,预期寿命仅 5 年左右^[7]。所以,社会应该给予这些患儿更多关注、关爱,更多的政策扶持,对重症地贫患儿持续规范地高量输血治疗及系统规范地祛铁治疗给患儿家庭带来的高额医疗费用,则需要社会医疗保障部门给予足够的重视,体

* 基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会科研项目(Z2012667)。