

Westgard 多规则质量控制法在 HPLC 筛查珠蛋白生成障碍性贫血中的应用*

夏超然^{1,2}, 王娟^{1,2}, 陈美珏^{1,2}, 任兆瑞^{1,2}, 黄英^{1,2}, 王伟^{1,2△} (1. 上海交通大学附属儿童医院/上海市儿童医院, 上海 200040; 2. 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040)

【摘要】目的 探讨 Westgard 多规则质量控制法在应用高效液相色谱(HPLC)技术对珠蛋白生成障碍性贫血进行分子检测和筛查中的应用价值。**方法** 应用全自动 HPLC 分析系统对血红蛋白分子中胎儿血红蛋白(HbF)和血红蛋白 A₂(HbA₂)两个组分进行定量检测分析,对每一组分的低值和高值质量控制品与每批次样品进行同批检测,绘制 Levey-Jennings 质量控制图。应用 Westgard 多规则 $1_{2s}/1_{3s} 2_{2s} R_{4s}$ 对每批次检测结果进行室内质量控制。分析 HbF 和 HbA₂ 的两个质量控制品在选用的质量控制警戒值 1_{2s} 出现前后的重测比对结果,验证质量控制规则在临床诊断中的适用性并探讨该规则在珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用价值。珠蛋白生成障碍性贫血的基因诊断分别采用跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-PCR)法检测缺失和反向点杂交技术检测常见的基因突变位点。**结果** Westgard 质量控制警戒值 1_{2s} 出现后,重测比对结果差异无统计学意义($P>0.05$),与该批次的基因诊断符合率无明显差异。研究建立并验证 Westgard 多规则 $1_{2s}/1_{3s} 2_{2s} R_{4s}$ 在应用 HPLC 分析技术对 HbF 和 HbA₂ 定量检测的质量控制作用,证实可以通过质控品检测出误差类型,降低假失控概率,可应用于定量检测珠蛋白生成障碍性贫血的临床诊断和筛查中。**结论** Westgard 多规则质量控制法在应用全自动 HPLC 定量分析珠蛋白生成障碍性贫血的筛查诊断中起到重要的室内质量监控作用,可以评价临床检测报告的可靠性,并且对导致结果不可靠的误差实时监控。

【关键词】 Westgard 多规则; 高效液相色谱; 珠蛋白生成障碍性贫血; 血红蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.01.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)01-0001-03

Application of multiple Westgard QC rules on screening of thalassemia by high performance liquid chromatography*

XIA Chao-ran^{1,2}, WANG Juan^{1,2}, CHEN Mei-jue^{1,2}, REN Zhao-rui^{1,2}, HUANG Ying^{1,2}, WANG Wei^{1,2△} (1. Affiliated Children's Hospital of Shanghai Jiaotong University / Shanghai Municipal Children's Hospital, Shanghai 200040, China; 2. Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】Objective To investigate the application value of the Westgard quality control(QC) rules in the molecular detection and screening of thalassemia by using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The automatic HPLC analysis system was applied to quantitatively detect HbF and HbA₂ in hemoglobin molecule. The low and high value quality control materials of each ingredient together with each batch of specimens were performed the same batch detection and the Levey-Jennings quality control chart was drawn. The obtained results of each batch were conducted the internal quality control by applying the Westgard multiple rules $1_{2s}/1_{3s} 2_{2s} R_{4s}$. Analysis of the data obtained before and after the appearance of the QC alert value 1_{2s} , demonstrated multiple QC rules can be applied in the quantitative measurement of HbF and HbA₂ for the diagnosis and screening of thalassemia. The molecular diagnosis of thalassemia including Gap-PCR and reverse dot blot were used for the detection of deletion and common genetic mutations in Chinese population. **Results** After the appearance of the QC alert value 1_{2s} , the data showed no statistically significant difference($P>0.05$). The corresponding results also showed no statistically significant difference with the gene diagnosis. The Westgard multiple quality control rules $1_{2s}/1_{3s} 2_{2s} R_{4s}$ in the analysis of quantitative detection of HbF and HbA₂ by using the HPLC technology established in this study was validated and could be further used in the other quantitative analysis in the clinical diagnosis of thalassemia. By monitoring the process of QC materials, the types of errors could be identified using these quality control rules, the probability for false rejection could also be reduced. **Conclusion** The use of multiple Westgard QC rules plays an important role in the internal quality control on quantitative analysis of HbF and HbA₂ by automated HPLC for the screening and diagnosis of thalassemia. It is used to evaluate and inspect whether the clinical reports are reliable, and to monitor the error in the quality control process that may lead to unreliable results at real time.

【Key words】 Westgard multiple rules; HPLC; thalassemia; hemoglobin

* 基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2012BAI09B04)。

作者简介:夏超然,女,在读硕士,实习研究员,主要从事遗传病分子诊断方法及发病机制的研究。△ 通讯作者, E-mail: wangwei@schchildren.com.cn。

珠蛋白生成障碍性贫血是一类在世界范围内广为流行的遗传性血液疾病^[1-2]。因珠蛋白基因的缺失或突变使珠蛋白肽链的合成减少或缺失,导致血红蛋白中胎儿血红蛋白(HbF)和血红蛋白 A₂(HbA₂)等水平异常。对 HbF 和 HbA₂ 的定量分析是筛查和诊断珠蛋白生成障碍性贫血的主要临床生化指标^[3]。作者应用全自动高效液相色谱(HPLC)分析系统对 HbA₂ 和 HbF 进行定量检测,发现检测结果与基因诊断结果的符合率较高,可重复性和精确性高,与血液学指标联合检测可作为珠蛋白生成障碍性贫血筛查和诊断的可靠方法^[3]。但由于检测过程容易受各种干扰,如红细胞生存期改变,标本储存条件与处理方法的差异,异常血红蛋白等因素均可造成报告值出现假阳性升高或降低,进而影响到采用 HbF 和 HbA₂ 评估患者是否患病的准确性。因此,HbF 和 HbA₂ 检测的标准化和质量管理至关重要^[4-7]。本文在对珠蛋白生成障碍性贫血患儿和健康对照标本进行 HPLC 全自动定量分析的同时,应用低值和高值两个水平的质量控制品与每批次样品进行同批检测,采用 Westgard 多规则质量控制法对质量控制品所得结果进行室内质量控制,以验证这些质量控制规则在临床诊断珠蛋白生成障碍性贫血中的适用性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1~12 月于本院经基因诊断确诊的珠蛋白生成障碍性贫血患儿 200 例和 60 例健康儿童,年龄为 1~16 岁。健康儿童标本基因检测结果显示均无 α 珠蛋白基因和 β 珠蛋白基因异常,所有检测标本均排除其他各种疾病。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与保存 全血标本约 2 mL 置于乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝采血管,4℃ 保存。

1.2.2 珠蛋白生成障碍性贫血的基因诊断 按照基因检测实验的要求对血液进行预处理, α 珠蛋白基因诊断采用跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-PCR)和反向点杂交法检测缺失(SEA、3.7/4.2)和常见突变(CS、QS、WS)。 β 珠蛋白基因诊断采用反向点杂交法检测 17 种中国人群的常见突变。

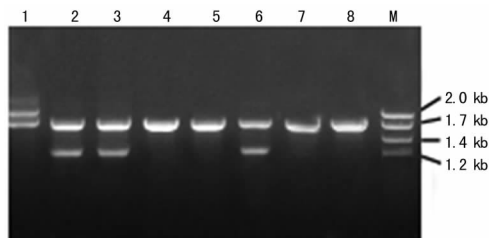
1.2.3 全自动 HPLC 分析 应用美国 Bio-Rad 公司的 D-10™ 血红蛋白全自动 HPLC 分析系统及其配套检测试剂盒、校准品和质量控制品。按照仪器操作说明对标本进行预处理,并完成质量控制品和临床标本的 HbF、HbA₂ 的定量检测,以峰面积占总洗脱面积百分比及各组分保留时间的形式报告。检测时高值、低值质量控制品的位置随机放置。针对 HbF 和 HbA₂ 两个组分,每隔 7 d 测定 1 次,在每批中检测两个不同浓度的质量控制品,两个浓度各测 1 次,记录质量控制结果并将其绘制在各自的质量控制图上。

1.3 Levey-Jennings 质控图的绘制 在进行 HbF、HbA₂ 质量控制检测时,分别应用低值和高值两种浓度质控品,确定两个水平质控品的均值和标准差,以及质量控制上、下限($\bar{x} \pm 3s$)。绘制相应 Levey-Jennings 质控图。每批次样品与 HbF 和 HbA₂ 的低值、高值质控品进行同批检测,HbF、HbA₂ 的质控图分别包含各自两个水平质控品的检测结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。应用 Westgard 多重质量控制规则 $1_{2s}/1_{3s}, 2_{2s}, R_{4s}$ 对每批次检测结果进行室内质量控制。

2 结果

2.1 基因诊断结果 见图 1~2。正常标本均显示仅 1 条 1.8 kb 区带; α 珠蛋白生成障碍性贫血标本中泳道 1 对应 2.0、1.8 kb 两个扩增片段,检测结果为基因型 $\alpha\alpha/-\alpha^{3.7}$;泳道 2、3、6 对应 1.8、1.3 kb 两个扩增片段,标本检测结果为 $\alpha\alpha/-SEA$ 。图 2 为 α 珠蛋白生成障碍性贫血 QS 纯合点突变。作者对 17 种中国人群的常见突变,包括 CD41-42(-TCTT)、IVS-2-654(C-T)、-28(A-G)、CD71-72(+A)、CD17(A-T)、E(G-A)、CD43(G-T)、-29(A-G)、CD27-28(+C)、IVS-1-1(G-T)、CD31(-C)、-32(C-A)、-30(T-C)、CD14-15(+G)、CAP+40-43、起始密码子 int、IVS-I-5(G-C)进行了检测。



注:4~5、7~8 为正常标本;1~3、6 为 α 珠蛋白生成障碍性贫血标本;M 为 DNA 标记物。

图 1 α 珠蛋白生成障碍性贫血 GAP-PCR 电泳图

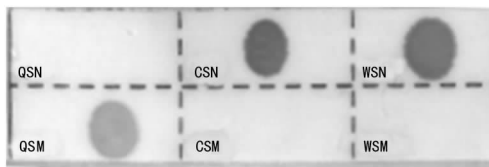
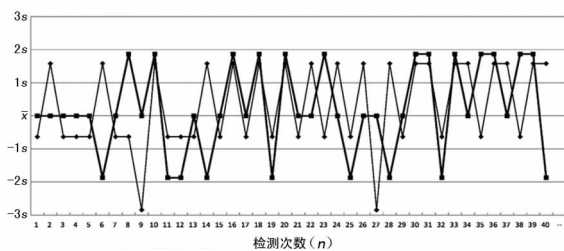
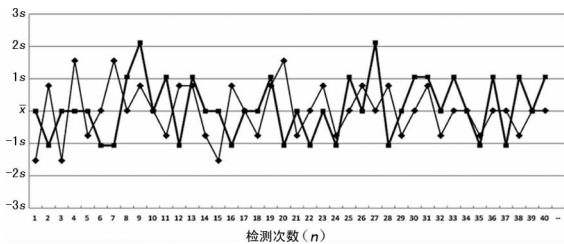


图 2 α 珠蛋白生成障碍性贫血标本反向点杂交结果



注:水平 1 为低值质量控制品检测值,水平 2 为高值质量控制品检测值。

图 3 HbF 的 Levey-Jennings 质量控制图



注:水平 1 为低值质量控制品检测值,水平 2 为高值质量控制品检测值。

图 4 HbA₂ 的 Levey-Jennings 质量控制图

2.2 HbF 和 HbA₂ 定量测定的质量控制分析 在分别应用单一规则: $1_{3s}, R_{4s}, 2_{2s}, 10\bar{x}, 4_{1s}$ 时,该质量控制周期 40 批次检测中,批间及批内均未出现违反相应规则现象;分别应用单一规则 1_{2s} 、Westgard 多规则 $1_{2s}/1_{3s}, 2_{2s}, 4_{1s}$ 时,40 次质量控制检测中

共出现 2 次违反该质控方案的情况,即在第 9 次、第 27 次质控时分别出现 1 次违反 1_{2s} 规则的现象。见图 3~4。对质控品及该批次临床标本进行重复定量测定,经比对临床标本检测结果,差异无统计学意义($P<0.05$),见表 1。这 2 次违反情况均在重复测定时恢复在控且违反 1_{2s} 。该批次出现前后两个批次的临床标本检测结果与基因诊断结果的符合率均为 100%。整个质控周期质控品的检测情况,其中低值 HbF 质控品检测水平为 $(2.24\pm0.06)\%$,变异系数(CV)值为 2.68%;高值 HbF 质控品为 $(9.80\pm0.70)\%$,CV 值为 7.14%。低值 HbA₂ 质控品为 $(2.31\pm0.11)\%$,CV 值 4.76%;高值 HbA₂ 质控品为 $(5.51\pm0.09)\%$,CV 值最低,为 1.63%,说明检测结果稳定性比较高。

表 1 质量控制警告出现前后数据比对($\bar{x}\pm s, \%$)						
指标	<i>n</i>		出现警告	调整后在控	<i>t</i>	<i>P</i>
HbF	260	第 1 次	1.24±0.61	1.34±0.53	1.369	0.204
		第 2 次	3.84±1.78	3.74±1.89	1.088	0.305
HbA ₂	260	第 1 次	2.15±0.31	2.27±0.34	-1.118	0.292
		第 2 次	4.51±0.91	4.34±0.72	1.448	0.182

3 讨 论

质量控制是临床检测实验室对质控品的检测,通过对结果的统计分析来监视和评价实验结果^[8-10]。分为室内质控和室间质控。室内质控可提高批内、批间检测的一致性,确保实验结果准确、可靠,通过连续测定同一批质控品来评价实验室工作的可靠程度。室间质控是利用多家实验室分析同一标本,通过实验室间比对确保本实验室维持稳定的检测水平^[9-11]。在应用全自动 HPLC 对 HbF 和 HbA₂ 的定量检测中,为确保检测结果准确性、可靠性、可重复性高,须建立本实验室的质控方案对实验操作进行有效的室内质控。

采用 Westgard 多规则 $1_{2s}/1_{3s}2_{2s}R_{4s}$ 实时监控 HbF、HbA₂ 的定量检测。结果显示 40 个分析批次无违反 2_{2s} 、 4_{1s} 、 10_x 现象(图 3~4),说明检测过程中系统误差在可控范围内。当去掉 10_x 、 4_{1s} 单个规则时,发现尽管系统误差检出率可能增加,但并不影响随机误差的检出。在整个质控周期中,出现两次不连续的 1_{2s} 违背现象,但并未违反 R_{4s} 规则,因而该批内没有因随机误差而失控;对后续批次的批间分析发现并无 2_{2s} 失控现象,说明批间未出现系统误差的失控。应用 $1_{2s}/1_{3s}2_{2s}R_{4s}$ 可判定该批次临床标本检测结果在控。复测结果证实,当违反 1_{2s} 但不违反 $1_{2s}/1_{3s}2_{2s}R_{4s}$ 多规则时,2 次数据显示结果差异无统计学意义($P>0.05$),与基因诊断的符合率均为 100%,表明该批检测结果可以接受。因此,当仅违反 1_{2s} 规则,同时不违反 $1_{2s}/1_{3s}2_{2s}R_{4s}$ 联合规则,判定出现的是一个可接受的随机误差。当以 1_{2s} 作为警告而非失控规则使用,降低了假失控概率。

本实验室建立的 $1_{2s}/1_{3s}2_{2s}R_{4s}$ Westgard 多规则质控方案有着多规则质量控制方法的优越性。不仅提高了实验误差类型的检出率,在检测中可对结果进行准确判读,能及时、迅速分辨出误差性质,而且减少了不必要的重复测定,并可对违背该组合规则的检测过程进行回顾性分析,及时纠正误差,提高了质量控制方案在临床应用上的实用性和有效性。在实际应用过程中,违反某个单一规则并不是判断发生误差类型的绝对指征,其他类型的误差可与随机误差相伴存在,并容易被随机误

差掩盖。因此,要将单个规则和多规则质控方案有机结合起来完成对质控值的单次判定和整个质量控制过程的连续分析,指出调查误差的方向。

目前我国尚未开展针对 HbF 和 HbA₂ 定量测定的室间质量控制,本研究可为我国开展珠蛋白生成障碍性贫血筛查定量检测的质量控制提供借鉴。作者建议,检测 HbF 和 HbA₂ 的临床实验室应有相应的实验操作规程和质量控制规程,每周至少进行 1 次室内质控,出现警告或失控情况应加以分析、纠正,每月进行 1 次结果汇总并参加室间质量控制评估。

参考文献

[1] Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL. Advances in technologies for screening and diagnosis of hemoglobinopathies [J]. Biomark Med, 2014, 8(1): 119-131.

[2] Ghosh K, Colah R, Manglani M, et al. Guidelines for screening, diagnosis and management of hemoglobinopathies [J]. Indian J Hum Genet, 2014, 20(2): 101-119.

[3] 夏超然, 王娟, 杨为群, 等. 全自动高效液相色谱分析系统在地中海贫血诊断中的应用 [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(12): 1138-1142.

[4] Hens K, Berth M, Armbruster D, et al. Sigma metrics used to assess analytical quality of clinical chemistry assays: importance of the allowable total error (TEa) target [J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(7): 973-980.

[5] 孙剑, 杨燕. 应用 Westgard 多规则进行生化室内质量控制数据分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(9): 991-993.

[6] Karnpean R, Fucharoen G, Pansuwan A, et al. A proficiency testing program of hemoglobin analysis in prevention and control of severe hemoglobinopathies in Thailand [J]. Clin Chem Lab Med, 2013, 51(6): 1265-1271.

[7] Amid A, Haghi-Ashtiani B, Kirby-Allen M, et al. Screening for thalassemia carriers in populations with a high rate of iron deficiency: revisiting the applicability of the mentzer index and the effect of iron deficiency on hb A2 levels [J]. Hemoglobin, 2015, 39(2): 141-143.

[8] Schoenmakers CH, Naus AJ, Vermeer HJ, et al. Practical application of Sigma Metrics QC procedures in clinical chemistry [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(11): 1837-1843.

[9] Westgard S. Prioritizing risk analysis quality control plans based on Sigma-metrics [J]. Clin Lab Med, 2013, 33(1): 41-53.

[10] Westgard JO. Statistical quality control procedures [J]. Clin Lab Med, 2013, 33(1): 111-124.

[11] Dimech W, Vincini G, Karakaltsas M. Determination of quality control limits for serological infectious disease testing using historical data [J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(2): 329-336.