

外周血涂片形态学检验人员能力比对考核体系的建立与应用

肖秀林, 王昌富, 邓明凤, 彭长华[△]

(荆州市中心医院检验医学部, 湖北荆州 434020)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.072

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)11-1518-02

医学实验室质量和能力认可准则在临床血液学检验领域的应用说明对形态学检验人员的结果比对提出了如下要求^[1]: 应定期(至少每 3 个月 1 次, 每次至少 5 份临床样本)进行形态学检验人员的结果比对、考核并记录, 同时对外周血涂片形态学检验人员应能识别的细胞及寄生虫有明确的要求。由于新鲜标本很难同时满足所需识别的细胞及寄生虫的要求, 因此采用临床样本考核外周血涂片形态学检验人员血涂片的制作、染色及阅片等基本的实际操作能力, 采用显微摄影照片考核检验人员对异常细胞、寄生虫等临床不多见病例的识别, 将两者有机结合, 取长补短, 建立了一套既能满足国家实验室认可中有关外周血涂片形态学检验人员能力比对要求又能在实际工作中有效实施和应用的考核体系, 可较为全面、客观地考核外周血涂片形态学检验人员的能力, 设计科学, 可操作性强, 现以 2013 年 6 月的考核为例报道如下。

1 外周血涂片形态学检验人员能力比对考核体系的建立与实施

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 显微镜; 玻片; 高级油镜油; EDTA-K₂ 采血管; 瑞氏-姬姆萨复合染色液(A 液, B 液, 由珠海贝索生物技术有限公司提供)。

1.1.2 样本来源 由考核组织人员选取 5 份新鲜临床样本, 其中应包含淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞增高的样本。

1.1.3 血液细胞显微摄影照片 应尽可能涵盖 CNAS-CL43: 2012 医学实验室质量和能力认可准则在临床血液学检验领域的应用说明中对外周血涂片形态学识别所要求的细胞及寄生虫。

1.2 比对人员与比对频率 涉及外周血涂片形态学识别的所有工作人员每 3 个月进行 1 次外周血涂片形态学检验能力比对考核。

1.3 考核内容

1.3.1 临床样本比对 比对人员使用 5 份新鲜临床样本独立完成血涂片的制作、染色及白细胞显微镜分类计数, 考核外周血涂片形态学检验人员血涂片的制作、染色及阅片等基本的实际操作及阅片能力。

1.3.2 外周血涂片显微摄影照片的考核 每位比对人员观察至少 20 幅外周血涂片显微摄影照片, 重点考核其对异常细胞、寄生虫等临床不多见病例的识别。

1.4 考核体系的实施

1.4.1 临床样本比对 (1) 试验操作: 参考方法由两位形态学

检验经验丰富的检验人员操作。分别由参考方法操作者和比对者对 5 份新鲜临床样本进行血涂片的制作与染色。每份样本制作两张血涂片, 其中一张备用。参考方法操作者(A 和 B)和比对者对每张血涂片分析 100 个细胞: 首先在低倍镜下(10~40 倍)进行浏览, 观察有无异常细胞和细胞分布情况。选择涂片的体尾交界处染色良好的区域(检查从约 50% 的红细胞互相重叠区域开始, 向红细胞完全散开的区域推移, 采用“城垛式”方法检查血涂片), 在油镜下计数 100 个白细胞, 按其形态特征进行分类计数, 求出各类细胞所占比值(百分率): 中性粒细胞(N)、淋巴细胞(L)、单核细胞(M)、嗜酸性粒细胞(E)、嗜碱性粒细胞(B)、异型淋巴细胞(VL)、其他有核细胞。(2) 数据采集: 参考者(A、B)和每位比对者的分类计数结果登记在数据表上, 见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。(3) 可信区间计算: 采用精确概率法^[2]进行计算, 计算方法见公式 1~2, 当 $m=0$ 时, $P_L=0$; 当 $m=n$ 时, $P_U=1$; 式中 n 为所数白细胞总数, m 为所数白细胞总数中的某类细胞个数, α 为显著性水平; P_L 为总体 $(1-\alpha)\%$ 的下限, P_U 为总体 $(1-\alpha)\%$ 的上限; 当 α 为 0.01 时, P_L 、 P_U 为 99% 的可信区间。(4) 采用精确概率法计算可信区间可在 Excel 软件中快速实现^[2], 并可自动判定比对结果是否满足要求。(5) 结果判断: 按照 99% 可信区间计算方法, 得到参考方法结果的可信范围。将比对者结果与可信范围比较, $\leq 99\%$ 可信范围上限, 且大于或等于 99% 可信范围下限判定为合格, 超出此范围判定为不合格。

$$P_L = \frac{m}{m + (n - m + 1) F_{\frac{\alpha}{2}, 2(n - m + 1), 2m}} \quad (\text{公式 1})$$

$$P_U = \frac{m + 1}{m + 1 + \frac{(n - m)}{F_{\frac{\alpha}{2}, 2(m + 1), 2(n - m)}}} \quad (\text{公式 2})$$

1.4.2 外周血涂片显微摄影照片的考核 血液细胞显微摄影照片的考核采取一对一监考的方法, 由血液病检验室专业主管准备足够多的题库(本次考核共准备了 20 套题), 每套题至少 20 幅显微摄影照片, 按序编号, 制作成 PPT 文件, 每幅图片设定播放时间 20 s, 考核时抽取题号, 单独作答, 重点考核外周血涂片形态学检验人员对异常细胞、血液寄生虫等临床不多见病例的识别。

1.5 考核要求与评价

1.5.1 考核要求 由经验丰富的形态学检验人员担任评审员对比对人员血涂片的制作与染色进行评价。一张合格血涂片的要求: 厚薄适宜, 血膜头、体、尾明显, 有核细胞分布均匀, 边

[△] 通讯作者, E-mail: xiao9996@163.com。

缘整齐,两边留有一定的空隙^[3]。染色合格的要求:在显微镜下粒细胞、单核细胞、淋巴细胞和其他细胞必须能显示清晰的核浆分界,能识别核染色质成分和细胞质的颜色差异;红细胞呈肉红色;白细胞胞浆能显示各种细胞的特有颗粒和色彩,细胞核染紫红色,染色质清楚,粗细松紧可辨。

1.5.2 考核结果评价 临床样本白细胞分类计数的比对要求为 100% 样本的检测方法与参考结果相符;显微摄影照片比对人员能正确识别至少 80%。

1.6 本院检验科外周血涂片形态学检验人员 2013 年 6 月能力比对考核结果 所有外周血涂片形态学检验比对人员其血涂片的制作与染色均符合要求。白细胞显微镜分类计数能力比对结果:全部 28 名比对人员中有 4 人共计 6 张血涂片出现了不合格的结果,经过培训学习后采用备用血涂片重新进行考核,结果全部合格。外周血涂片显微摄影照片的考核结果,所有比对人员均合格。

2 外周血涂片形态学检验人员能力比对考核体系的重要意义及应用体会

全自动血液分析仪目前在临床上已得到了广泛的应用,除检测外周血细胞的数量即进行全血细胞计数外,亦可对外周血细胞形态提供一些参数或示警,如未成熟粒细胞、原始细胞、异型淋巴细胞等,但这些形态学参数仅能起到提示作用,不能作为临床检验诊断的依据。如需得到确切的结果,目前还需依靠血涂片显微镜人工镜检进行确认。正如丛玉隆^[4]所倡导应提高我国细胞形态学诊断水平,加大对细胞形态学检验重要临床价值和忽视形态学检查导致不良后果的宣传。由此可见,外周血涂片形态学检验在血液学检验中具有十分重要的地位,其检验质量对疾病诊断尤其是血液病的筛查与诊断至关重要。由于血液分析在临床上应用十分广泛,涉及检验人员较多,如何考核外周血涂片形态学检验人员的能力以保证检验质量成为血液学检验工作中必须关注与解决的问题,目前有关血涂片形态学检验人员比对与考核相关的文献报道较少。CNAS-CL43:2012 医学实验室质量和能力认可准则在临床血液学检验领域的应用说明中对外周血涂片形态学检验人员的能力亦提出了明确的要求,除需要正确识别血液中细胞外,还需采用临床样本进行人员的比对。通过工作中不断地摸索与实践,建立和应用了一套行之有效的对外周血涂片形态学检验人员考核体系,主要包括采用临床新鲜样本考核外周血涂片形态学检验人员血涂片的制作、染色及阅片等基本的实际操作与阅片能力,采用显微摄影照片考核检验人员对外周血涂片中异常细胞、寄生虫等临床不多见病例的识别能力。

在临床样本比对中,涉及对白细胞分类计数准确度的评估,按照二项分布原理确定总体率的可信区间,即采用前述的精确概率法进行确定,可精确反映某一参数百分率的总体区间,尤其是接近 100% 或 0% 时的总体区间分布,避免出现某一参数百分率如为 100% 或 0% 时,如采用第 1 版 H20-A^[5] 和修订版 H20-A2^[6] 中所应用的正态近似法确定可信区间,则其 99% 可信区间只能为 100% 或 0% 的情况。由于白细胞分类计数中某些细胞如嗜碱性粒细胞极易出现百分率为 0% 而中性粒细胞较易出现百分率接近 100% 的情况,因此采用精确概率

法进行白细胞分类某一参数百分率可信区间的确定不仅科学合理,而且有着十分现实的临床应用价值。本室在外周血涂片临床样本比对中采用精确概率法计算白细胞分类计数参考方法检测结果 99% 可信区间,得到参考方法结果的可信范围,将各位比对人员白细胞分类结果与可信范围比较,判定其白细胞分类结果是否满足比对要求。如在比对中出现了不合格的结果,则需培训学习后采用备用血涂片重新进行考核,直至结果全部合格。

形态学检验人员对外周血涂片形态学识别能力的提高有赖于建立和实施严格高效的培训和考核措施。在近 5 年的工作中,全科形态学检验人员进行了两次系统的集中培训,每次培训时间 16 个学时;同时,结合日常工作进行适时培训,在注重识别正常细胞的基础上,加强对异常细胞及血液寄生虫的辨别。为了保证考核体系的有效运行,除了建立科学的考核办法外,在应用中还需从严执行考试纪律。临床样本血涂片的考核,每个比对人员需独立完成血涂片的制作、染色及白细胞显微镜分类计数,其参考方法操作者最后完成白细胞显微镜分类计数,给出参考结果,以避免提前泄漏结果。血液细胞显微摄影照片的考核采取一对一监考的方法,即准备足够多的题库,考核时抽取题号,单独考试,避免互相抄袭,以尽可能真实反映形态学识别能力,通过严格的考核制度,促使工作人员认真对待和学习相关知识。

总之,该考核体系既能满足国家实验室认可中有关外周血涂片形态学检验人员能力比对要求又能在实际工作中有效实施和应用,可全面、客观地考核外周血涂片形态学检验人员的能力,对于促进检验人员主动学习形态学知识、提高形态学检验能力以保证涉及外周血涂片形态学检验报告的准确性,更好地为临床和患者服务具有重要意义。该体系是外周血涂片形态学检验人员能力考核的有效方法,设计科学,可操作性强,值得在各级医院形态学检验人员的能力比对考核工作中推广应用。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL43 医学实验室质量和能力认可准则在临床血液学检验领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.
- [2] 彭小娟,肖秀林,周治年. 统计分析的 Excel 快速实现[M]. 武汉:武汉大学出版社,2012:56.
- [3] 熊立凡,刘成玉. 临床检验基础[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007:19.
- [4] 丛玉隆. 与时俱进不断提高血细胞学诊断水平[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(5):385-388.
- [5] CLSI. H20-A Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods[S]. Wayne, PA: CLSI,1992.
- [6] CLSI. H20-A2 Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods; approved standard[S]. 2nd ed. Wayne, PA: CLSI,2007.