

临床分子诊断质量保证的重要性

李金明

以蛋白质及核酸分子为检测物的临床分子诊断方法主要包括酶免疫试验(EIA)、放射免疫试验(RIA)、荧光免疫测定(FIA)、化学发光免疫测定(CIA)等免疫测定方法及聚合酶链反应(PCR)和核酸杂交(Nucleic acid hybridization)等基因检测方法。临床分子诊断是临床检验各学科中最具发展潜力的领域,将成为 21 世纪的主导检验技术。随着人类基因组计划的完成和蛋白质组计划的启动,临床分子诊断方法将在更深层次揭示疾病的本质,指导临床诊断和治疗。

免疫测定方法是以抗原与抗体间的特异结合反应为基础的检测技术。理论上只要能得到某种生物或生理活性物质的特异抗体,即可建立这种物质的免疫测定方法。过去一些难以进行定量检测的微量生物活性物质,如酶、激素、受体、细胞因子等,现已使用免疫测定技术进行临床检测。随着标记物(同位素、酶、荧光素、微量元素、发光物质等)添加技术的进步,免疫测定技术已从低灵敏的免疫沉淀和免疫凝集反应时代,进入高灵敏的放射免疫、酶免疫、荧光免疫和发光免疫测定时代。

核酸是生命现象的物质基础,细胞因子、受体、酶、激素等是生命活动发挥作用的功能单位。在核苷酸的细微改变哪怕是单个碱基的变化,都可能引起表达产物的巨大改变,影响生物功能的发挥,进而导致疾病的发生。基因检测的对象主要是 DNA, RNA 的检测通常也通过检测逆转录后的互补 DNA 来实现。其检测原理主要是核酸扩增和/或利用 DNA 双螺旋链间互补原理的杂交。各种核酸扩增和杂交自动化检测仪及核酸提取纯化仪器的不断推出,大大促进了基因诊断技术的临床应用。

除了激素、治疗药物外,很多疾病的特异性标志物是使用分子诊断方法来检测的,如肿瘤标志物、自身抗体、细胞因子、感染性疾病的血清学标志物以及病原体基因、遗传病基因、肿瘤基因、基因突变等,这些标志物的检测质量直接关系到患者的临床诊断和治疗。随着我国医疗事故处理条例的出台,患者被真正放在了服务对象的位置上。当代医学对一个疾病的诊断正越来越多的依赖于实验室检验,其为疾病诊断提供了许多最为直接的证据。因此,建立实际有效的临床分子诊断的质量保证措施,将最大限度的减少误诊的发生,也使医患纠纷的处理有据可依。

“质量保证”是为某一产品或服务满足特定的质量要求提供充分可信性所必要的有计划的和系统的措施,用在临床分子诊断中,就是为临床分子诊断检验报告满足准确及时的质量要求提供充分可信性所必要的有计划的和系统的措施——对涉及到可能会影响测定结果的每一步骤都要写出标准操作程序(standard operation procedure, SOP)和有效的室内质量控制方法。

室内质量控制(internal quality control, IQC)和室间质量评价(external quality assessment, EQA)是质量保证的两个方面。IQC 的核心就是在实验室内由本室工作人员所采取的质量控制措施,主要是为了监测实验室测定日间重复性(即精密度)和发现测定方法在某一天出现的重大误差,它决定了即时的测定结果是否有效及报告能否发出。而 EQA 却是对实验室测定结果的回顾性评价。主要是测定一实验室的结果与其他实验室结果之间存在的差异(偏差),建立实验室间测定的可比性,其评价的是实验室测定的准确度。可见这二者在临床实验室的质量控制中是相辅相成,互为补充。

IQC 以前强调的是统计学质控,现在 IQC 的含义已有扩展,主要包括 3 个方面:(1)测定前的质量控制(2)统计学质量控制(3)质量控制的评价。测定前的质量控制包括仪器设备的维护校准、试剂及消耗品的质检、切合实际的实验 SOP 的制定以及人员的培训等。这是测定中的统计学质控的前提。试想如果实验室的仪器设备处于非良好状态,所使用的检测试剂及消耗品达不到质量要求,实验人员业务知识及操作水平低

下,测定质量又从何谈起。统计学质量控制是监测实验过程中可能存在问题的行之有效的办法,目前常用来来自于 Shewhart 工业质控图的 Levey-Jennings 质控图和 Westgard 质控规则。临床分子诊断通常有定性和定量测定两类,定量测定一般沿用通常的临床化学室内质控做法即可,而定性测定的结果是“有”和“无”,即“阳性”和“阴性”之分,并且室内质控样本为能灵敏地反映测定变化的弱阳性质控物,因此,完全套用上述定量测定质控规则就不太合适。有研究表明,使用弱阳性质控物进行定性测定的室内质控在作图时,可以 S/CO 值表示测定结果,而使用稍强一点阳性质控物则以吸光度或 S/CO 值表示均可。必须强调的一点是,弱阳性样本必须测定为阳性,因为定性测定有一定的测定下限是对其最基本的要求。在临床实际工作中,常遇到的问题是,使用不同批号的试剂测定相同的弱阳性室内质控物,所得到的 S/CO 值有较大的差异,因此,每换一个批号的试剂,质控图就不得不重新开始绘制,使得质控难以持续进行。这就需要对目前的质控做法进行改进,使得质控图能不受试剂更换的影响而持续进行下去。当然,以 Grubbs 异常统计值取舍为基础的“即刻”质控方法也是可以循用的,尤其是在前二十次的测定中,显得较为实用,但要注意其应用的局限性。

与临床生化测定相比,临床分子诊断的室内质控并不太受重视,可能是由于室内质控品来源有限,而且对室内质控不知从何做起。室内质控的缺乏使得在定性分子诊断、实验室间常有结果不一致的情况出现,尤其是弱阳性标本。而定量测定则存在不同实验室间结果离散度大的问题。实验室应该对上述测定分析前的质量控制问题高度重视,而且要使用可靠一致的质控品或校准品进行统计学室内质控,这是解决各实验室结果可比性差同时也是保证检验质量的最为有效的途径。有些临床实验室每次检测时,也都同时检测一份室内质控品,但对质控结果既无分析,也不知如何判断是否失控;或者是失控了,检验结果照样报告,这样的室内质控就完全失去了意义。

由外来的机构或部门对实验室测定质量的评价简称外部质量评价(EQA),EQA 在美国叫做实验室能力验证(proficiency testing,PT)。室间质评数据既可对测定不合格实验室进行教育,也可作为对其采取法律、经济或业务上进行处罚的依据。我国的临床免疫检验 EQA 方法来源于英国的国家室间质量评价计划(national external quality assessment schemes, NEQAS),质评的目的也与 NEQAS 一样,主要是让参加者通过对自己实验室与其他实验室的测定结果的比较及组织者的解释而起到自我教育的作用。而美国 PT 的结果则是作为实验室执业许可或实验室认证的依据。正是因为所用目的不一样,在我国 EQA 所采用的对参评实验室的评价方法是一种相对比较的方法,如标准差指数(standard deviation index, SDI)。而 PT 则采用绝对的评价方法,即参评实验室测定结果与预期结果符合的样本的多少,80% 以上符合为合格,否则为不合格。EQA 与 PT 在形式上,没有本质区别,但在质评目的上的不同导致评价方法也不同。有文献报道,当 EQA 结果作为实验室执业许可或实验室认证的依据时,就可以将这种 EQA 称作 PT。可以预见,我们国家的临床实验室在不久的将来,也将逐步进入规范化和法制化的管理,临床实验室的认证是进行这种管理的必由之路,参加室间质量评价的结果当然就会成为实验室认证的重要依据。

在某些情况下,EQA 对参评实验室测定水平的反映存在有局限性:(1)参评实验室没有同等的对待 EQA 样本和患者样本。如多次重复检测质评样本;实验室间相互比对结果等。(2)当使用单一靶值时,难于评价单个实验室和测定方法。(3)在不同的 EQA 程序中,对实验室的评价可能不同。

综上所述,要做好质量保证,最重要的是必须要了解影响测定质量的实验室过程的所有步骤,测定过程中最薄弱的环节将决定测定质量。在临床分子诊断中,临床标本的收集就是很容易出现问题并最终影响测定质量的环节。即使是实验室内的测定,IQC 的概念也已覆盖了测定分析前和分析后评价等各个与质量有关的方面。采用统计学方法进行过程质控,是 IQC 的中心环节,伴随着每一次常规检测的始终,决定了当批测定的有效性,实验室应根据自身的特点选用适当统计质控方法。EQA 作为 IQC 的补充,在临床分子诊断的质量保证中是一个不可或缺的部分,但分子诊断有很多缺乏参考方法,难于校准以及检测技术多种多样,不同方法和/或试剂间的偏差仍然是不同实验室测定结果间缺乏一致的直接原因。EQA 的实施将有力的促进临床分子诊断的标准化。

(收稿日期:2003-06-12)

(本文编辑:唐栋)