



图 1 Mg 试剂校准轨迹

3 讨 论

全自动生化分析仪的应用大大提高了临床生化测定工作效率,解放了劳动力,减少了标本用量和人为误差,达到了准确、快速、微量的目的^[2]。随着《医疗机构临床实验室管理办法》的实施,实验室的质量管理越来越被重视,为了获得高质量的生化检验结果,就必须加强生化分析过程中各个环节的质量控制,对测定标本的仪器一定要进行校准^[3],对不同分析项目要根据其特性确立各自的校准频率^[4]。在这里首先必须明确生化分析仪不论如何先进,它还是一个比较器,它测试出来的标本结果是随着标准限的设置不同而变化的^[5]。所以,在卫生部临床检验中心拟定的“临床实验室(定量测定)室内质控工作指南”中明确指出“对测定标本的仪器一定要求进行校准,校准时要选择合适的(配套的)标准品/校准品;如有可能,校准品应能溯源到参考方法或/和参考物质;对不同的分析项目要根据其特性确立各自的校准频率。”这说明校准仪器是室内质控的重要部分,强调了校准工作的必要性和重要性,同时指出了校准的方法和要求^[6]。生化分析仪在定标校准后,随着时间的推移,各种影响因素的累加,会对检测结果产生一定的偏差^[7]。要保证所出现的偏差在允许误差的范围之内,就必须对生化分析仪进行定期校准,可根据本实验室所使用试剂稳定性、方法学特性、仪器状态而制定校准次数和校准模式(单点或多点)^[8]。本科使用的镁试剂是由北京莱帮生物有限公司提供,其原理是在弱碱性缓冲液中,血清镁与偶氮类显色剂作用生成蓝紫色化合物,其颜色深浅与血清镁含量呈正比,与同样处理的标准液进行比较,可求得血清镁含量。在日常镁试剂使用过程中,将出现用新开封试剂、试剂开封后连续使用、已用剩余试

• 质控与标规 •

剂混合后再次使用三种情况,从上面实验可知,三种情况的校准 K 值会出现较大的波动^[9],分析原因可能与镁是弱碱性试剂,其开瓶后,空气中的 CO₂ 溶入弱碱性缓冲液中,造成缓冲液的 pH 值发生改变,从而造成校准 K 值的变化。为了切实做好室内质控,作者必须在新开封试剂、试剂开封后连续使用、已用剩余试剂混合后再次使用三种情况下进行校准,在校准合格后方可进行室内质控和患者样本的检测,只有这样,才能提高生化检测的整体水平,才能使发出的检验报告更可靠、准确^[10]。

参考文献

[1] 储海,皇甫月明. 浅谈全自动生化分析仪的校准体会[J]. 医疗装备, 2005, 18(1): 58.
[2] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科技文献出版社, 2007: 81.
[3] 罗富银, 宋宗琴. 全自动生化分析仪生化检测项目校准周期的确立[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(14): 1471-1472.
[4] 彭黎明, 王兰兰. 检验医学自动化及临床应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 773.
[5] 陈文祥, 申子瑜, 杨振华. 临床检验分析质量指标的设定[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(4): 298-300.
[6] 杨娜, 汪旭强, 黄鹏. 不同三酰甘油校准品对血清测定结果的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(1): 20-21.
[7] 孙继红. 全自动生化分析仪质量控制探讨[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(1): 124-125.
[8] 张国伟, 张少锋. 雅培 C8000 生化分析仪总蛋白试剂的携带污染对血清镁测定的干扰及对策[J]. 检验医学, 2007, 22(6): 749-750.
[9] 赵俊红. OLYMPUS AU400 生化分析仪的保养[J]. 中国医学装备, 2009, 6(5): 63-64.
[10] 胡丽涛, 何法霖, 王薇, 等. 生物学变异在患者系列结果改变评价中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(6): 153-155.

(收稿日期: 2011-12-09)

感染性疾病定量分子检测的质量保证

杨 雪¹, 王治国^{2△}

(1. 北京协和医学院研究生院, 北京 100730; 2. 卫生部北京医院/卫生部临床检验中心 100730)

摘 要:目的 提出一套感染性疾病定量分子检测质量保证的方案。方法 参考临床实验室常规检验质量控制程序, 结合感染性疾病定量分子检测的特殊性, 对感染性疾病定量分子检测临床应用中质量控制和质量保证重要方面进行分析。结果 依据临床实验室检测全过程的阶段, 分别就检验前期(标本采集时间和类型、标本运输和保存)、检验中期(标本处理、核酸提取、结果分析)和检验后期(结果的报告和解释)中影响定量分子检测结果的关键步骤质量控制过程进行详述。结论 定量分子检测是感染性疾病常用的实验室检测方法, 对其做好质量控制和质量保证对于实验室获得正确的结果和结果解释非常重要, 对于患者的医疗有重要意义。

关键词: 感染; 分子生物学; 全面质量管理; 质量控制
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 16. 045 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)16-2010-03

定量分子检测方法目前越来越多地用于感染性疾病的临床检测和监测过程中, 实验室对于做好定量分子检测的质量工作非常重要。目前检测核酸分子的方法有多种, 检测原理主要含靶物质扩增、探针扩增或信号扩增和常用到的检测方法主要为: 终点检测核酸扩增、实时检测核酸扩增、无核酸扩增的信号检测。本文主要参考美国临床和实验室标准化研究院(CLSI)

△ 通讯作者, E-mail: zgwang@nccl. org. cn.

MM06-02^[1]以及相关文献[2-9]就临床实验室检测全过程中的检验前、检验中和检验后期中保证定量分子检测方法的质量关键点给出一条明确的路线。

1 检验前期质量保证

实验室检测的结果可能会影响到患者疾病的预后或者治疗的决策,实验室工作人员应该意识到检测的结果反应的是患者的机体状态,而不是标本处理的人工结果。检验前期临床实验室应该重视的过程包括标本采集、标本运输以及标本保存等阶段。

1.1 标本采集 感染性疾病标本采集的过程要注意标本采集的时间、温度、溶血、贴签等问题。对员工进行标本采集和处理培训是非常有必要的。

1.1.1 标本采集时间 标本采集的时间是由许多因素决定的,如检测目的和特定感染,过早或过晚都可能会产生假阴性的结果。治疗监测通常要求确定出基线的病毒载量以及在恰当时间间隔内进行的后续检测。例如,巨细胞病毒(CMV)疾病中,应该在基线时检测病毒载量,而治疗开始后病毒载量会下降。由于一线抗病毒药物达到治疗水平和病毒生活的半寿期是需要时间的,因此过频繁的检测并不能得到有意义的结果,尤其是在治疗的第一周。

1.1.2 标本采集类型及采集量 检测使用到的标本类型及含量应该是特定的。定量分子检测中有多种标本类型,最常见的标本类型为血清、血浆、全血和脑脊液(CSF)等。标本的类型不同病毒载量也不同,例如 EB 病毒在全血中的病毒载量高于血浆中病毒载量一个 \log_{10} 值。标本类型恰当的选择依赖于多种因素,如感染的位置以及被检测的对象。

标本采集量与定量分析检测的方法有关的。使用同一标本多点滴定的方法需要的标本含量较使用一点滴定的方法多。如果只获得一份标本也可以进行多种分析,前提条件是核酸分离后有足够的目标被测量含量。标本中的目标被测量含量如果较少,可能会出现采样变异/错误的情况。如果核酸已经从标本中提取出并且要用于多重分析,在核酸提取过程中发生的任何情况都有可能影响到整个分析检测。

1.2 标本采集/运输设备 某检测方法厂商确认过的适当的采集和运输系统以及在产品说明中推荐的标本采集和运输系统都适用于该检测系统所有的标本。实验室在使用没有得到厂商推荐的设备前应该对其进行确认。标本采集/运输设备绝对不能与核酸发生不可逆转地结合,而且也不能干扰扩增或检测。通常优先使用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂对采集的全血标本进行抗凝,但是在分子检测中使用如柠檬酸葡萄糖抗凝剂进行抗凝是已通过确认的^[1]。任何用于确保核酸稳定性的试剂都应该确认其对分析灵敏度的影响和检测的干扰。如果标本采集/运输设备包含稳定性的液体,应该将稀释效应纳入到影响结果计算的因素中。

1.3 标本运输和保存 实验室必须确定出标本运输和保存恰当的条件,可以遵照厂商说明书中的建议或者实验室自身确立的条件。标本在运输和存储过程中不应该暴露于那些能导致核酸降解或增加检测困难性的条件中。标本的采集和加工之间的间隔时间,以及标本的存储和运输温度之间应该有相应的条件限制。由于核糖核酸酶(RNases)的普遍存在,核糖核酸(RNAs)很容易发生降解,因此对于那些要检测 RNA 含量的标本而言这些限制条件尤为关键。

实验室必须向标本采集和运输的人员提供标本恰当处理和运输条件的操作指南。还应提供特殊的处理要求和同运输

人员进行恰当的沟通。实验室必须建立不合格标本的拒收准则,不合格标本原则上不应该进行检测。同时,实验室应该告知检测申请者标本被拒收以及拒收的原因。运输标本时,每个标本应该具有如下的信息:(1)标本采集的日期;(2)标本开始运输的日期;(3)实验室接收到标本的日期;(4)标本接收时大致的温度。监测这些标本信息有助于确保(但不是绝对的)标本是正确地进行处理的。在以质量保证为目的的前提下,实验室应该记录标本运输问题以及标本拒收情况。

此外,由于重复的冻融可能会导致核酸降解,因此实验室应该确定出可接受的冻融参数。

2 检验中期质量保证

检验中期的质量保证活动关注的范围包括有标本处理、核酸提取等,关键是取决于检测方法的质控状态。实验室进行恰当的质量控制活动可确保整个检测过程中的性能。

2.1 标本处理 标本处理程序及相关考虑问题与标本的类型相关。例如,血浆和血清应该及时地从细胞中分离出,以减低核酸的降解,预防内源性干扰物质如亚铁血红素和基因组 DNA 的污染。当进行标本分杯时,应该使用好的实验室技术来避免交叉污染。分杯的标本不应该放回入原始的试管中。

2.2 核酸提取 核酸提取是影响定量分子检测结果不准确和变异的重要因素。

2.2.1 提取方法 核酸提取的方法有很多,比如有机提取、二氧化硅技术、玻璃纤维技术以及阴离子交换。以前核酸提取是人工进行的,目前越来越多的自动化平台应用到其中。定量检测中使用的自动化提取平台理论上具有增加复现性和降低潜在污染的好处。

定量检测所使用的核酸制备方法应该满足如下性能准则:(1)有效的分离,以便于在所有的标本类型检测中能够获得最佳的测量范围、检出限(LoD)和复现性;(2)避免污染(标本和纯化试剂的污染);(3)避免引入或产生检测干扰物质。

某些核酸制备的方法能够影响到定量检测方法,如乙醇沉淀纯化法。核酸的回收效果在酒精沉淀之后是很差的,尤其是当标本待检测内源性核酸含量很低时。这些情况下,可以添加糖原或非特异性的核酸等以增加产量。而且,在提取前向每份标本中加入内部校准品就可以评估核酸的损失。

当非靶核酸的含量在检测方法确认或性能验证过程中显示出对定量结果造成干扰或影响结果时,应该采取措施以减少其含量,尤其对于那些细胞 DNA 含量高的标本。对于 HIV-1,当提取出的核酸同时含有病毒 RNA 和基因组 DNA 时,存在的整合前病毒 DNA 能够致使病毒载量的过高估计。如果提取方法更以 RNA 为中心,这种情况通常是可以降到最低的,并且如果对提取和定量方法同时进行确认或验证,那么这种情况是可能避免的。

2.2.2 标本类型 另一个能够影响到核酸制备质量的问题是标本类型。通常无细胞的标本可以进行高质量的核酸标本制备,这些标本生理 pH 通常为 7.35~7.45,如血浆、血清和离心后脑脊液(CSF)。表 1 给出了高质量核酸获取的相关因素。

标本抑制剂(比如,亚铁血红素、胆汁盐和肝素)可能会不同程度地影响到不同的定量分子检测方法,产生假阴性结果或假性低病毒载量。而且,抑制作用在不同的标本类型间是不同的。

2.2.3 分析范围 定量分析方法的核酸提取结果检测范围必须要等同于或超出分析检测方法的测量范围,这在复杂的标本基质中尤其重要,在这些标本中存在大量的非特异性的核

酸,能够在核酸提取过程中竞争结合能力,这会为检测阶段人为地增加一个检测范围上限,导致检测结果的错误解释。同样地,特别高的靶病毒载量可能会超过提取方法的结合能力,这可能对相对小的基因组的病毒被测量具有低的风险,但是对于原核或真核靶物质是值得关注的。

2.3 结果分析 使用差值检查能够帮助实验室在报告发出前发现检测差错。差值检查对同一患者检查结果与之前相比发生的变化。差值检查可以在当前多数的实验室信息系统中使用到。在一些小到中等规模能接入到电子病历系统的实验室中,其可以通过与患者的病史比较以发现问题的存在。而这种方法不适合于大规模的参考实验室,对结果的趋势分析以及差值检查随时间的比例可能在识别出检测前和检测中差错中

有用。

回顾检测结果以及过去阳性结果和阴性结果所在比例同样是有用的质量保证活动。突然出现的阳性结果,尤其是弱阳性结果,可能提出存在污染,应该引起关注。阳性值的降低可能提示出分析灵敏度的降低,原因在于试剂缺陷、过程差错或者突发的靶序列变异(探针或引物不结合)。应该要求有对试剂性能系统的评价以及标准操作程序的检查。研究发现由于探针结合位点单核苷酸多态性会导致实时 PCR 结果发生假阴性^[10]。这些变异的存在可以通过定期对公开序列库的查看以及分析反应产物(判断出扩增子是否是合成了但没有检测到)来发现。通常,使用电泳(凝胶或毛细管)方法来检测扩增子,之后进行测序,以确定出潜在的变异体。

表 1 高质量核酸获取的挑战--因素和相关的标本类型

项目	因素	标本
降低核酸完整性	核酸酶 pH 化学交联多糖组成的厚细胞壁	尿液、大便、支气管肺泡灌洗液(BAL)、全血尿液、大便
酶抑制	高细胞含量 DNA 干扰物质的携带效应	福尔马林固定的组织含分枝杆菌和葡萄球菌的血液和体液 全血、骨髓尿液、大便

3 检验后期质量控制

定量分子检测的结果报告应该含检测值、解释性评论以及检测标记。扩增中得出的数据应该以 log₁₀ 转换后的数据进行报告,同时报告中也应该有原始数据。由于许多定量检测是用于治疗监测或预防管理的,对病毒载量变化(在复杂中代表着显著的改变)进行的微型解释性评论对于临床具有重要的意义。为确保结果报告的准确性,使用的方法和实验室人员的数量取决于检测仪器是否连接到了实验室信息系统。当这种连接实施时,结果报告是最准确的。此时,准确性的确保与校准品和质控品的检测(为了确保其落在检测范围内)是一样的简单,将结果在仪器上进行电子转化并传输到实验室信息系统中。

检测后阶段的质量保证是非常复杂的,当结果是手工输入到实验室信息系统中时是很容易发生差错的。此时,通常以打印形式报告的结果必须与原始结果进行人工比较,同时也要对质控品和校准品的有效性进行检查。这些活动应该在检测完成后快速地进行,以帮助及时发现无效的检测和抄写差错,并且这些活动应该在有审核者签字和日期的检测后报告中记录。

参考文献

[1] CLSI. MM06-Quantitative Molecular Methods for Infectious Dis-

eases. A Approved Guideline-Second Edition CLSI document[J]. Wayne, PA:CLSI, 2010.

[2] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009:1.

[3] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:1.

[4] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:1.

[5] 杨雪,王治国. 常规实验室检验血液标本处理程序[J]. 中国医院, 2011,15(11):61-64.

[6] 韦美德,贺望娇,戴盛明. 加强临床实验室分析前质量控制的重要行和紧迫性[J]. 国际检验医学杂志, 2009,30(6):617-618.

[7] 李臣,李振勤. 检验科全程质量控制的措施[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(15):1774-1775.

[8] 曾蓉,王治国. 临床实验室质量指标体系的建立[J]. 中华医院管理杂志, 2011,27(3):211-214.

[9] 曾蓉,王治国. 肿瘤标志物应用的质量要求[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(7):746-747.

[10] Stevenson J, Hymas W, Hillyard D. Effect of sequence polymorphisms on performance of two real-time PCR assays for detection of herpes simplex virus[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5):2391-2398.

(收稿日期:2012-01-05)

(上接第 2002 页)

of gastroenterology guideline on the management of helicobacter pylori infection[J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(8):1808-1825.

[5] Replogle ML, Glaser SL, Hiatt RA, et al. Biologic sex as a risk factor for Helicobacter pylori infection in healthy young adults[J]. Am J Epidemiol, 1995, 142(8):856-863.

[6] Fraser AG, Scragg R, Metcalf P, et al. Prevalence of helicobacter pylori infection in different ethnic groups in New Zealand children and adults[J]. NZ J Med, 1996, 26(5):646-651.

[7] Ng TM, Fock KM, Ho J, et al. Clotest(rapid urease test) in the diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. Singapore Med J, 1992, 33(6):568-569.

[8] Tseng CA, Wang WM, Wu DC. Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection[J]. Dig Dis Sci, 2005, 50(3):449-452.

[9] Van KN, Van HE, Deboer WA. Validation of a new, commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in gastric biopsies[J]. Neth J Med, 2006, 64(9):329-333.

[10] Liao CC, Lee CL, Lai YC, et al. Accuracy of three diagnostics tests used alone and in combination for detecting Helicobacter pylori infection in patients with bleeding gastric ulcers[J]. Chin Med J, 2003, 116(12):1821-1826.

(收稿日期:2012-01-10)