

文章编号: 1001-764X(2012)10-742-04

我国临床分子诊断质量管理及标准化的现状、问题及对策

李金明(卫生部北京医院, 卫生部临床检验中心, 北京 100730)



作者简介:李金明, 研究员, 博士, 博士研究生导师。1993 年毕业于中国协和医科大学研究生院, 获医学博士学位。享受国务院政府特殊津贴, 卫生部有突出贡献中青年专家。在国内系统地提出了临床分子诊断实验室管理、检测质量保证及标准化的概念和方法。研究方向为临床分子诊断及标准化和基因治疗载体。以项目负责人承担国家自然科学基金课题 5 项, “863” 课题 1 项。以第一作者和通信作者发表论文 150 多篇 (SCI 收录 38 篇)。任国家“863” 计划生物和医药技术领域体外诊断技术产品开发重大项目总体专家组成员以及国际临床化学协会分子诊断委员会等 10 多个学术团体委员。中南大学和厦门大学兼职教授。《中华检验医学杂志》和《临床检验杂志》等多本杂志编委。

摘要:分子诊断在诸多的疾病诊疗中正发挥着越来越重要的作用, 使临床进入到了个体化医学时代。临床分子诊断方法除了直接杂交方法外, 基本上都有一个基因扩增过程, 尽管卫生部从 2002 年开始即对临床基因扩增检验实验室进行规范化管理, 提出质量保证要求, 但仍存在 SOP 可操作性差、仪器维护校准不到位和室内质控及其分析形式化等问题。此外, 当前的个体化医学检测涉及的科室正在迅速地扩至病理科、药剂科、肿瘤科、甚至胸外科等临床科室的实验室, 其绝大部分目前存在无规范化实验室分区、人员未经培训、无 SOP、无室内质控等诸多问题。对这些相关专业领域的专家和实验室技术人员的持续宣讲和培训, 是转变长期存在的惯性思维的一种有效方法, 具有良好专业理论知识及具备“认真” 特质的实验室技术人员是实施质量管理和标准化的基石。

关键词:分子诊断; 基因扩增; 质量管理; 标准化

中图分类号: R446; Q7

文献标志码: A

沃森和克里克 1953 年在英国《Nature》杂志上发表的 DNA 双螺旋结构, 不但为人类认识生命的本质、揭示生命现象开了一扇大门, 也为后来的临床分子诊断奠定了基础。临床分子诊断系指采用分子生物学方法 (基因扩增、测序、杂交、蛋白质组分析等) 检测患者体内特定遗传物质的结构或表达水平的变化而做出的诊断。分子诊断的材料包括 DNA、RNA 和蛋白质。分子诊断发展到现在, 如果说有阶段性里程碑的话, 从 1953 年始, 几乎每隔 10 年左右即有。1963 年, 桑格的双脱氧测序方法的发明, 使特定基因的 DNA 序列不再神秘。美国的雅劳和伯森在研究人类激素时, 发明了采用放射性核素标记的可测量微量激素的放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA)。其后, 在相当长一段时间内, 放射性核素标记方法在分子生物学研究和分子诊断中得到了广泛应用。1972~1973 年伯格等创建了重组 DNA 技术, 由其衍生的基因工程, 不但大大拓展了分子诊断技术, 而且改变了人类的生活。1983 年莫利斯发明的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 在其耐热 DNA 聚合酶的瓶颈问题解决后, 1989 年后, 即成为生命科学研究和分子诊断的“革命性” 技

术, 并使得人类基因组计划得以在 1990 年开始启动。现在涉及 DNA 和 RNA 的分子诊断, 几乎离不开 PCR 及其衍生技术。1991~1993 年实时荧光 PCR 技术使 PCR 定量变得简单明了, 并大大减少了实验室“污染” 的机会。芯片技术的出现, 解决了高通量检测的问题。2003 年人类基因组计划的初步完成, 进入到后基因组时代, 功能基因组学研究揭示了人类各种基因多态性与疾病易感及药物敏感的关系, 并延伸到肿瘤基因组的研究。从基因结构变化及其表达, 得到个体疾病的预后和治疗药物的选择信息, 进入到个体化医学检测时代。2010 年以后, 随着新一代测序技术的出现, 个体基因组的分析变得迅捷而又价廉, 是分子诊断领域的又一个革命性的进步。

临床分子诊断涉及基因扩增的检测技术, 要保证检验质量, 必须有严格的实验室质量管理并标准化, 否则, 极易出现由实验室扩增产物或标本之间交叉“污染” 所致的假阳性结果, 影响临床疾病的诊疗。本文拟对我国临床分子诊断质量管理及标准化的现状、问题及展望作一讨论。

1 我国临床分子诊断应用及质量管理的回顾

我国乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)人群感染率一直较高,上个世纪 80 年代,在国内不少传染病医院或医院的传染科实验室,采用同位素(^{32}P)标记 DNA 探针直接膜上斑点杂交的方法检测 HBV DNA。但由于检测灵敏度较低($>10^5$ 拷贝/mL),尽管假阴性结果存在,但假阳性问题较少发生。1989 年后,随着 PCR 技术的引入,从 90 年代初到中期,全国大到三级甲等医院,小到镇一级的卫生院,众多的实验室都在开展临床 PCR 检验,全国生产 PCR 试剂的厂家也有上百家之多。临床检测应用中出现了大量的假阳性问题,于是,有些临床实验室在检测 HBV DNA 后通常是先看 HBV 血清标志物结果,相符即报阳性,不相符报阴性。一个性病病原体核酸 PCR 检测,出现阳性结果,则将患者找过来问,有临床症状的,报阳性,否则,报阴性。导致了临床医生对 PCR 检验结果的不信任。其影响之大之深,直到现在,在不同的学术场合,乃至一些临床疾病诊疗指南内,一提到 PCR,就会说其不可靠,假阳性过高。

鉴于上世纪 90 年代中期临床 PCR 检验存在的上述问题,卫生部临床检验中心于 1998 年 3 月 20 日在卫生部北京医院召开专家座谈会,与会专家指出了所存在的大量问题,随后不到一个月,卫生部下发了《关于暂停临床基因扩增(PCR)检验的通知》(卫医发[1998]第 9 号),暂停了 PCR 在临床检验中的应用。这种暂停并不意味着 PCR 技术本身有什么问题,无疑其是一个成熟的技术,问题的存在是应用不规范,一则实验室没有严格的实验室分区设计;二是实验技术人员没有经过临床基因扩增检验相关的质量保证方面知识的培训;三是实验室没有建立有效的质量保证体系;四是当时的试剂方法多为科研用扩增产物初步鉴定所用到的 PCR 凝胶电泳方法,很不规范。经过充分酝酿和准备,部中心于 1997 年年底,向全国发出了第一次 HBV DNA 质评样本进行室内质量评价的预研^[1],1998 年正式开展 HBV DNA 和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV) RNA 室内质量评价项目^[1-2]。1999 年 8 月举办了第一期《全国临床基因扩增检验实验室技术人员培训班》。2002 年 1 月卫生部下发了《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》(卫医发[2002]10 号),要求凡是开展向患者收费的临床基因扩增检验项目的临床实验室必须按规范进行设置,要有严格的实验室分区,配备必要的仪器设备,人员须接受部临检中

心及其指定机构的培训,持证上岗。同时,要建立实验室质量保证体系,编写标准操作程序(standard operation procedure, SOP)。具备上述硬件和软件后,须通过由部临检中心或省级临床检验中心组织的专家验收,合格后方可正式开展临床基因扩增检验项目。同时,部临检中心下发了《临床基因扩增检验实验室工作规范》(卫检字[2002]9 号)。2002 年 7 月深圳市人民医院检验医学部分子生物实验室成为第一家通过验收的临床基因扩增检验实验室。同年,部中心组织编写了人员培训教材《临床基因扩增检验技术》^[3],根据实际验收发现的问题及技术的进展,2007 年又出版了《实时荧光 PCR 技术》^[4]。2010 年 12 月卫生部正式下发了《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发[2010]194 号)。截止到 2011 年 10 月,全国按照所制定的标准通过验收的临床基因扩增检验实验室共 1 600 余家。采用所编写的培训教材和培训模式共举办了培训班 150 多期,培训实验室技术人员 13 000 多人。涉及全国 28 个省、直辖市和自治区。

为保证临床基因扩增检验的准确性,实现病毒核酸定量检测的量值溯源,部中心自 2002 年开始研制 HBV 和 HCV 核酸检测国家标准物质^[5-7],分别于 2005 年和 2007 年获得国家二级和一级标准物质证书。并采用基于 MS2 噬菌体衣壳蛋白包装外源 RNA 的病毒样颗粒,研制无生物传染危险性且稳定的 RNA 病毒核酸质控品和标准物质^[8-10],获得 5 种 HCV RNA 和 1 种 HIV-1 RNA 液体国家二级标准物质(表 1)。

2 现状及问题

长期以来,我国的临床分子诊断项目主要为感染性疾病病原体核酸的扩增检测,如 HBV、HCV、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、结核分枝杆菌、沙眼衣原体、淋球菌等,采用的方法基本上都是实时荧光 PCR,开展的科室主要在医疗机构的检验科,个别在感染科、皮肤科等临床科室的实验室。极少部分为遗传病的产前诊断,如广东、广西和海南地区的地中海贫血的产前基因检测等,采用的方法主要有 PCR 琼脂糖凝胶电泳和 PCR 杂交(膜上和芯片)等,开展的科室除了检验科外,相当部分在妇幼保健相关的产前诊断中心的实验室。已接受培训的人员及通过验收的实验室基本上也都是这些实验室。上述实验室相当一部分都经过了 5~10 年的运行及持续改进培训(各级临床检

验中心定期举办的质控和持续改进培训班及会议等),除了有符合分区要求的实验室外,基本上都建立了较完整的实验室质量管理体系,有了较好的质量意识,迅速扭转了临床 PCR 检验不可靠的局面。尽管如此,上述实验室仍有需要注意或改进之处,主要在以下几个方面,主要是理念问题。(1) SOP 没有可操作性。这一点是实验室质量管理和标准化的灵魂,如果 SOP 的编写不是为实际工作,只是为了应付验收检查,则质量管理和标准化就无从谈起。(2) 仪器设备维护和校准不到位。对 PCR 仪、恒温干浴仪、生物安全柜、测序仪、杂交仪、芯片扫描仪、加样器等仪器设备没有定期的维护,或根本不知道怎么维护。对加样器、扩增仪等的校准由外部机构如仪器厂家、计量部门等进行,没有 SOP、没有校准的原始实验记录,并且不清楚仪器设备的技术档案如何建立及其作用。(3) 实验记录的形式化及不会归档。(4) 不会分析室内质控结果,有些没有商品质控品的项目不知道质控品从哪来,自然就没有室内质控。(5) 有些项目不参加室间质量评价。(6) 人员的内部培训形式化,不参加相关的质控会议,缺乏持续的外部培训。此外,也有相当的人员对实验室分区、缓冲间、传递窗和空气流向设计的必要性和正确性的理解不到位。

随着新的治疗药物、药物代谢与特定基因多态性关系、药物作用特定基因的突变等的研究进展,以个体化用药治疗为特征的个体化医学正快走向临床医学的前台,个体化医学得以实施的一个关键性支柱就是以基因及结构变化和基因表达为检测靶标的个体化分子检测,这些检测除了荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 和银增强原位杂交 (silver-enhanced in situ hybridization, SISH) 检测乳腺癌 HER-2/neu 基因扩增以及免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 检测 HER2 受体蛋白表达状态等少数项目外,基本上都涉及 PCR 扩增,如基于特异荧光探针的实时荧光 PCR、扩增阻滞突变 (amplification refractory mutation system, ARMS) 实时荧光 PCR、蝎形 (scorpion) 探针 ARMS 实时荧光 PCR、PCR 测序、PCR 芯片或膜或微颗粒 (如 luminex) 上杂交等。相关研究的进展,带来了“分子病理学”、“肿瘤基因组学”、“转录组学”和“药物基因组学”等概念。最早接触这些概念者是相关专业和临床科室的一些专家,于是,近年来个体化医学检测在全国的许多医疗机构的病理科、药剂科、肿瘤科、妇产科、内科、甚至胸外科的实验室开展

起来,混乱状况与上世纪 90 年代初中期病原体核酸 PCR 检测极为相似,其问题主要表现在以下几个方面:(1) 没有规范的实验室分区设计,大多数开展此类检测的实验室目前处于这种状况。(2) 没有任何的实验室质量保证体系,不知道临床基因扩增检验实验室须验收合格后,方能开展临床检验项目。(3) 人员没有经过有资质机构的规范化培训,缺乏质量意识。(4) 开展临床检测,有的使用商品试剂盒,有的是自配试剂但没有严格的试剂配制 SOP,有的甚至一部分实验如标本制备和基因扩增在自己实验室完成,测序则像研究生做科研一样,找有关商业测序公司进行。(5) 没有室内质控,或根本不知道如何进行室内质控。(6) 除了极少部分实验室参加了一些国外公司组织实验室间结果比对外,基本上没有定期的室间质量评价或实验室间比对。

3 对策

一件事情能否成功,离不开“天时、地利、人和”三个要素。“人”放在后面,但人是最重要的。没有高素质的实验室技术人员,一是无法高质量的完成常规检测操作,二是不可能树立起真正的质量意识。这里的高素质主要指两个方面,一是具备较好的专业知识技能,其次也是最重要的,就是做事“认真”。有了高素质的技术人员,外部的上岗培训,通俗地讲就是一个“洗脑”过程,更多的是提供一种理念,即通过培训,能明确知道在临床基因扩增检验中,如果不注意把握好一些关键环节,采取一些有效的措施,所得到结果就有很大的可能性是错的。但仅有外部的培训远远不够,在常规检验中,对实验室内部发生的问题有针对性的培训和自我完善。与最初培训的“被动学习”不同,其源于实践高于实践,是“主动思考”得来的东西,会有质的飞跃。因此,作为临床基因扩增检验实验室应在人员具有外部培训合格后,可通过讲座、讨论、咨询、练习、自学等方式进行有效的内部培训,培训的记录可以是书面考试、实验考核结果、问题讨论心得、问题解决的报告、针对日常工作的问题进行研究的论文和综述等。

运动的物体,速度越快惯性越大。应该说,人类的思维很快,所以惯性也最大。从一个不好的习惯变成良好的习惯确实也很难,但良好的习惯一旦养成,即成为生产力。临床实验室从长期的经验管理模式要进入到真正的质量管理,无疑是需要时间的。如果是一张白纸,则相对容易省时得多,关键是写的第一笔不能出问题。临床基因扩增检验实验室有很

多是新建的,自然实验室技术人员可能也是新进人员,如果对其在一开始就树立质量意识和理念,加上认真的态度和良好的专业素质,就很容易使实验室进入到质量管理状态。当然,如果一件事情你持续不断地去加强它,它终究会成为一种习惯。

有了上面的两个基石,余下的就是具体如何去做好的方法问题。做一件事情,没有一个好的过程很难有一个好的结果,至少是出现好的结果的概率极低。临床基因扩增检验亦如此。对临床基因扩增检验中的“过程”(包括分析前、中和后)的有效掌控,最关键的就是靠 SOP 的按实际工作详细制订和日常工作中的切实遵循。编写有可操作性 SOP 的

一个基本原则就是,怎么做怎么写,注重最可能影响结果的细节。为使实验室操作者能形象地理解和掌握 SOP,可采用文字叙述加照片图示的方法。此外,要指出的是,一个实验室刚建立,由于没有太长的实际检验运行时间,有很多的问题没有想到,因此,编写的 SOP 可能就会有缺陷,这就需要在以后实际工作中,不断根据发生的问题,对文件进行修改,其根本目的是避免同样的问题出现第二次,这也是质量管理的精髓。整个检验过程包括标本采集运送保存、仪器设备使用维护校准、室内质控及其分析、室内质评及其分析和结果报告与解释等细节,决定于有可操作性的 SOP。细节决定成败。

表 1 卫生部临床检验中心研制的病毒核酸国家标准物质

项目名称	级别(发布年)	批准号	浓度(IU/mL)
HBV DNA	二级(2005)	GBW(E)090031	$(1.03 \pm 0.21) \times 10^6$
	一级(2007)	GBW09150	$(1.20 \pm 0.24) \times 10^6$
HCV RNA	二级(2005)	GBW(E)090032	$(1.29 \pm 0.24) \times 10^6$
	一级(2007)	GBW09151	$(1.11 \pm 0.27) \times 10^5$
HCV RNA 液体	二级(2010)	GBW(E)090114	$(3.4 \pm 2.9) \times 10^3$
HCV RNA 液体	二级(2010)	GBW(E)090115	$(6.7 \pm 3.1) \times 10^3$
HCV RNA 液体	二级(2010)	GBW(E)090116	$(7.4 \pm 5.2) \times 10^4$
HCV RNA 液体	二级(2010)	GBW(E)090117	$(4.3 \pm 2.6) \times 10^5$
HCV RNA 液体	二级(2010)	GBW(E)090118	$(5.8 \pm 4.8) \times 10^6$
HIV-1 RNA 液体	二级(2011)	GBW(E)090169	$(9.5 \pm 1.9) \times 10^4$

4 参考文献

[1] 李金明,王露楠,邓巍,等. 乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶链反应测定的全国室内质量评价[J]. 中华医学杂志,2000,80(2):116-117.

[2] 王露楠,李金明,邓巍,等. HCV RNA RT-PCR 测定室内质量评价的研究[J]. 临床检验杂志,2000,18(5):281-283.

[3] 申子瑜,李金明. 临床基因扩增检验技术[M]. 人民卫生出版社,2002.

[4] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 人民军医出版社,2007.

[5] 王露楠,邓巍,申子瑜,等. 乙型肝炎病毒 DNA 标准物质的研究[J]. 中华肝病杂志,2007,15(2):107-110.

[6] 王露楠,吴健民,李金明,等. 丙型肝炎病毒核酸国家标准物质的研究[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(4):354-357.

[7] 李金明. 标准物质在乙型和丙型肝炎病毒核酸检测标准化中的重要性[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(8):850-852.

[8] Wei Y, Yang C, Wei B, *et al.* Ribonuclease-resistant virus-like particles containing long chimeric RNA sequences produced by a two-plasmid coexpression system[J]. J Clin Microbiol, 2008,46(5):1734-1740.

[9] Zhan S, Li J, Xu R, *et al.* Armored long RNA controls or standards for branched DNA assay for human immunodeficiency virus type 1[J]. J Clin Microbiol, 2009,47(8):2571-2576.

[10] Song L, Sun S, Li B, *et al.* External quality assessment for enterovirus 71 and coxsackievirus A16 detection by reverse transcription-PCR using armored RNA as a virus surrogate[J]. J Clin Microbiol, 2011,49(10):3591-3595.

(收稿日期:2012-08-31)

(本文编辑:刘群,陈维忠)