

临床分子诊断质量管理问题及思考

万本愿

前言

- 分子诊断发展迅猛，已广泛应用于肿瘤、遗传病、个体化药物治疗等多个领域。尤其是近年来精准医学概念的提出，高通量测序（High-Throughput Sequencing），又名下一代测序技术(next-generation-sequencing technology, NGS)、数字PCR技术在医学实验室逐渐应用，分子诊断更成为关注热点。
- 依据《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》相关规定，我国医疗机构临床基因扩增检验实验室必须通过验收，因此在实验室设置、设施和环境、人员资质、标本管理、质量控制、检验报告等环节进行严格把关，在很大程度上保证了医学实验室分子诊断技术的检测质量。然而，随着分子诊断技术快速发展，分子诊断行业快速扩张，分子诊断的质量问题也随之凸显，分子诊断质量管理也面临新的挑战。

一、分子诊断质量管理存在的主要问题



(一)开展科室多，技术人员质控意识淡薄

- 1.医疗机构检验科：
 - 1.1经过临床检验中心验收，
 - 1.2基本建立了较完善的实验室质量管理体系，
 - 1.3检测人员都经过规范化的培训，有较强的质量保证意识。

(一)开展科室多，技术人员质控意识淡薄

- 随着精准医学走向临床步伐的加快，当前的个体化医学检测涉及的科室正在迅速地扩展至
- 2.病理科、药剂科、中心实验室、甚至肿瘤科等临床科室的实验室，医学检验所也如雨后春笋般纷纷开展分子诊断项目。
- 2.1这些实验室相关技术人员普遍缺乏检验资质，未经过专业的培训，质控意识淡薄，缺乏必要的质控知识；
- 2.2人员没有经过有资质机构的规范化培训，缺乏质量意识。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。
- 2.3开展分子病理项目的实验室除公立医院除病理科外，普遍缺乏具备组织标本质量评估能力的病理医师。
- 其状况与20世纪90年代病原体PCR检测遍地开花情况类似，质量令人担忧！

案例1:

- 在某三甲教学医院的事情。临床医生给某乙型肝炎患者开了乙肝“两对半”和**HBV DNA**定量检测申请单，但是医生对检验结果看不懂，三个医生给出了三个解释，最后干脆让患者自己找检验科解释。
- 上述问题之所以产生，主要是实验技术人员没有经过临床基因扩增检验相关的培训。
- 因此，加强分子诊断临床实验室管理与提高实验技术人员诊断水平迫在眉睫。

(二)仪器设备校准不到位

- 临床基因扩增检验实验室涉及的仪器设备较多，通过定期校准使之维持好的状态，是保证检测结果准确可靠措施之一。然而，仪器设备校准不到位问题普遍存在。
- 1.有些实验室未及时校准；
- 2.校准未覆盖检测所需的参数；
- 3.不对校准报告进行评估，导致未达到检测要求的设备由于实验室人员不知晓仍在使用的；
- 4.校准单位无相关资质及校准人员，无相应校准能力，导致仪器校准坏等情况时有发生；
- 5.校准时间和校准报告及时性都受到影响。

(二)仪器设备校准不到位

- 6.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。
- 7.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；
- 8.不清楚仪器设备的技术档案如何建立及其作用。

案例2:

- 这是个分子检测仪器设备管理上不到位而引发的问题:
- 有的医生曾多次投诉某些患者的两次检查结果差异过大，或者根本与现实情况不符，一查原因，发现是分子检测仪器阀门开关不正常，导致部分结果无法检测荧光而造成假阴性。

(三)方法学性能验证不规范

- 1.《医疗机构临床实验室管理办法》中规定，医疗机构临床实验室应当对方法学进行性能验证，确定检测系统是否能满足特定的要求。
- 1.1.分子诊断定量项目至少包括精密度、正确度、线性范围、检出限；
- 1.2.定性项目至少包括重复性和符合率。
- 2.有的非检验科实验室技术人员不了解方法学验证的概念，更无从谈起如何验证。
- 2.1实验室在开展项目前不进行验证、或验证方法不规范；
- 2.2对于NGS、数字PCR技术、无创产前基因检测(non-invasive prenatal testing, NIPT)等不知如何规范地进行性能验证。
- 2.3更值得一提的是，验证不是实验室独立完成，验证数据由厂家提供，因而无法真正了解使用的检测系统的性能状态。

(四)分子诊断报告模式不统一

- 随着精准医学的迅速发展，
- 1.分子诊断项目专业跨度大、
- 2.检测样本种类多、
- 3.检测方法及技术平台多、检测内容复杂，
- 4.临床医生对分子诊断报告也有不同的需求。
- 5.然而不同的实验室出具的分子诊断报告模式极不统一，内容也千差万别，检测结果描述不清晰，许多重要的信息如检测方法、分子病理报告中标本质量评估内容、必要的临床及检测建议等缺失，个体化药学基因多态性检测报告中检测结果出现根据不同基因型推导出但并未检测的内容，**NGS**检测偶然发现的基因该如何报告实验室缺乏统一的规定。

二、分子诊断检测质量问题分析



（一）“质量”周边风险“潜伏”

- 目前在临床应用中，存在同一实验室不同检测批次间或不同实验室对同一标本检测间结果的差异，这已成为时常困扰临床医师、患者以及实验室技术人员的普遍性问题。
- 据介绍，造成不同临床实验室间检验结果差异的原因，通常包括临床标本的采集、试剂方法、测定操作、仪器设备的维护校准、数据处理及结果报告、标准物质及质控物的应用等方面的不规范等因素。
- 分子诊断最为常用的方法是基因扩增，包括实时荧光PCR、PCR+扩增产物分析等。基因扩增检验灵敏度高、特异性好，但涉及步骤多，受影响的因素也多，如标本的稳定性、扩增产物的“遗留污染”与标本间的“交叉污染”、仪器设备的状态、耗材质量等。

案例3:

- 有家医院在去年12月的一次实验中发生了爆管事件，事件过后已经按照标准操作程序(SOP)规程进行了消毒处理，到现在已经半年了，还是不能消除污染。
- 这是典型的实验室污染，PCR实验室一旦出现严重污染，消除是比较困难的，通常应该采取一些措施，如开窗通风，采用次氯酸钠溶液擦拭地面、桌台，甚至墙面、增长紫外线照射时间，用75%乙醇喷雾每天进行“清除”等。

(二) SOP是“灵魂”与“精髓”

- 分子诊断实验室要做到避免扩增产物“污染”和标本间的交叉“污染”所致的假阳性结果的出现，须有严格的实验室分区，如试剂准备和贮存区、标本制备区、扩增区和产物分析区等，还要建立实验室质量保证体系。
- 建议对整个分子诊断的分析前(标本采集、运送和保存等)、分析中(实验室测定)和分析后(结果报告及解释)等进行文件化的规定及标准化，以取得日常检验工作的最佳秩序和最佳效益。
- 1、SOP是实验室质量管理的“灵魂”，它源于一些标准文件(试剂盒和仪器说明书及国内国际标准)和实验室实际工作经验的积累，因此高于相关标准文件。

(二) SOP是“灵魂”与“精髓”

- 2、PCR检测的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、室间质评及其分析和结果报告与解释等细节，而这些细节的完成情况，均决定于是否有可操作性的SOP。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。
- 3、在一个刚建立的实验室，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就可能会有缺陷。这就需要在今后的实际工作中，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所在。
- 4、SOP的编写应注意通俗易懂、注重细节、清晰明了、图文并茂。实验室工作人员应严格遵循SOP中的步骤要求进行操作，应每年定期根据实验室的运行状况进行SOP审核修订，对于文件的修订、废止、改版或更新，要按照规定的要求，合理且规范进行，并防止无效或作废版本文件使用。

(三)室内质控分析流于形式

- 目前，国内常用的分子诊断技术为基于扩增的**PCR**技术，由于**PCR**是在体外对目的片段进行特异扩增，导致结果易出现假阳性或假阴性。因此，为保证**PCR**检测结果的准确、可靠，必须有严格的室内质量控制措施。
- 1.目前开展分子检测的实验室一般都会做室内质控，但是开展基因突变或基因型检测项目，常年仅使用一个基因型室内质控品，未对其他具有临床决策的基因突变或基因型进行监控；对于**NGS**、**NIPT**等不知如何做室内质控才符合要求。
- 2.实验室对室内失控分析基本流于形式，原因分析与出现的失控现象缺乏必然联系，采取的纠正措施与所分析的原因也无因果关系，未从根本上解决问题，导致相同的失控现象经常出现，不仅浪费人力、财力，还严重影响检测质量和报告时间。

(三)室内质控分析流于形式

- (4)没有室内质控，或根本不知道如何进行室内质控；有室内质控也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)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。
- (6)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。
- (7)有些项目不参加室间质量评价。

三、分子诊断质量管理面临的挑战及对策

- 目前，分子诊断技术快速发展，定量PCR技术出现高灵敏度和绝对定量检测，数字PCR也在临床上得到应用；NGS的发展促进了肿瘤和遗传性疾病的诊断和治疗，并直接推动了无创产前诊断技术的变革；液体活检以其无创性、准确性、动态性等独特的优势逐渐被临床医生认可，体液中的循环肿瘤细胞(circulation tumor cell, CTC)、循环肿瘤DNA(ctDNA)和外泌体(exosome)等遗传信息载体已成为热点。虽然开展分子诊断的实验室必须依据《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》实施，但是随着分子诊断新技术的不断涌现及涉及领域的不断拓展，分子诊断POCT及比传统分子检测更复杂的技术如NGS等进入临床，需要新的与之相适应监管模式和标准对实验室进行监管。同时，分子诊断专业其人员要求、质控方法、结果分析及解释等也有其自身特点，需要不断探索，寻求解决办法。

(一)明确检测主体

- 为保证医疗质量和医疗安全，针对目前个体化医学检测在全国众多医疗机构的不同科室开展的现状，医疗机构应本着集中设置、统一管理、资源共享原则，从质量保证这一基本点出发，合理规划分子诊断实验室，明确检测主体，避免遍地开花，最终昙花一现的局面。

(二)加强人员培训

- 实验室具有良好专业理论知识及操作技能的技术人员是实施质量管理的基石。通过持续宣讲和培训，使分子诊断实验室技术人员转变长期存在的惯性思维，并从主观上强化质量控制意识，同时注重培训效果，尤其应加强检测项目与相应临床应用相关知识储备，积累临床咨询经验，尽快提高与临床医生根据分子诊断报告进行交流的能力，最大程度体现分子诊断的真正价值。

(三)建立适宜的室内质控措施

- 分子诊断技术不同于已发展成熟的生化检测，不能简单地将现有的质量控制方法应用于分子诊断检测。首先缺乏商品化的分子诊断室内质控品。目前，国际上常用的核酸扩增质控物大致可分为三类：分别是阳性患者样本、细胞培养物和含有单一目的片段的质粒，各有优缺点，实验室宜根据检测方法、检测项目选择合适的室内质控品进行监控。
- 同时，由于分子诊断室内质控不参与分析前过程，部分项目使用质粒无法监控核酸提取过程，因此，应考虑分子检测室内质控作用的局限性，可通过验证内部结果的一致性加以分析补充。如在分子病理学中，一些情况在临床上是非常罕见的，如大肠癌中同时出现**BRAF**和**KRAS**基因突变，或肺癌中同时出现**EGFR**和**KRAS**基因突变，在日常检测中宜考虑这些信息保证结果的一致性。
- 另外，关注每次检测阴性或阳性结果的出现频率以及同一基因型或基因突变出现频率或连续出现频率等，也可作为提示实验室"污染"的质控指标。

(四)规范分子诊断报告模式和内容

- 伴随医学的不断发展，分子诊断检验结果不仅有简单明了的数据提示，更多的是涵盖病原、病因、诊断、病程演变和预后判断的多方位检验。目前分子诊断分析前、分析中的质量控制有了很大改善，但分析后仍然停留在简单的信息核对和历史结果回顾等方面，检验结果内容薄弱，模式也不统一，导致临床和患者对分子诊断报告的临床价值和认可程度大打折扣。
- 为更好的发挥分子检测项目的临床意义，临床基因检测报告应该明确、简洁、准确可靠、并具有充分的解释、可信性和权威性，除基本内容外，还应包含特定信息：如方法学、检验程度的详细信息、质量控制信息、分子遗传检验项目应提供基因参考序列。结果报告术语描述规范、报告解释、备注说明等尽可能完善，具体可参考《临床基因检验诊断报告模式专家共识》。

(五)加快分子诊断标准物质研发步伐

- 虽然多数能力验证信息表明分子诊断实验室间的结果一致性较好，但也有多份能力验证报告指出分子诊断缺乏重复性与可比性，究其原因主要是当前缺乏可用的国际标准物质。
- 由此可见，标准物质对于检测结果可比性具有关键作用。为了有效保证分子诊断的质量，国际相关机构正加大力度开发所需标准物质/参考物质，我国相关机构也应加快分子诊断标准物质的研发力度，保证检测结果的可比性。

(六)尽快推动实验室自建项目(laboratory developed tests, LDT)发展

- 受限于我国现有的临床检验项目注册审批制度，分子诊断项目已远远不能满足临床的需求，与国外差距甚远，肿瘤、遗传病、罕见病等领域尤其突出，如何破解这一难题，允许开展**LDT**，满足临床需求，需要相关政策的支持。
- 有专家也提出过很好建议，如采用试点单位开展和适当质量监管相结合的办法，并及时总结**LDT**试点单位开展经验，及时评估**LDT**项目的临床应用及价值。

博晖微流控检测系统

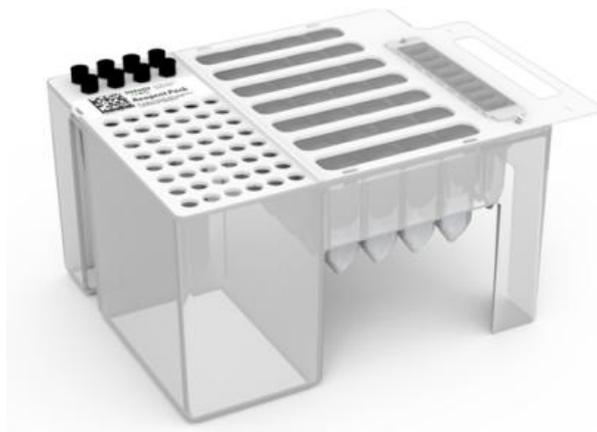
➤微流控（Microfluidics）指的是使用微管道处理或操纵微小流体的系统所涉及的科学和技术。因为具有微型化、集成化等特征，微流控装置通常被称为微流控芯片，也被称为芯片实验室（Lab on a Chip）。



GenPlex微流控系
统



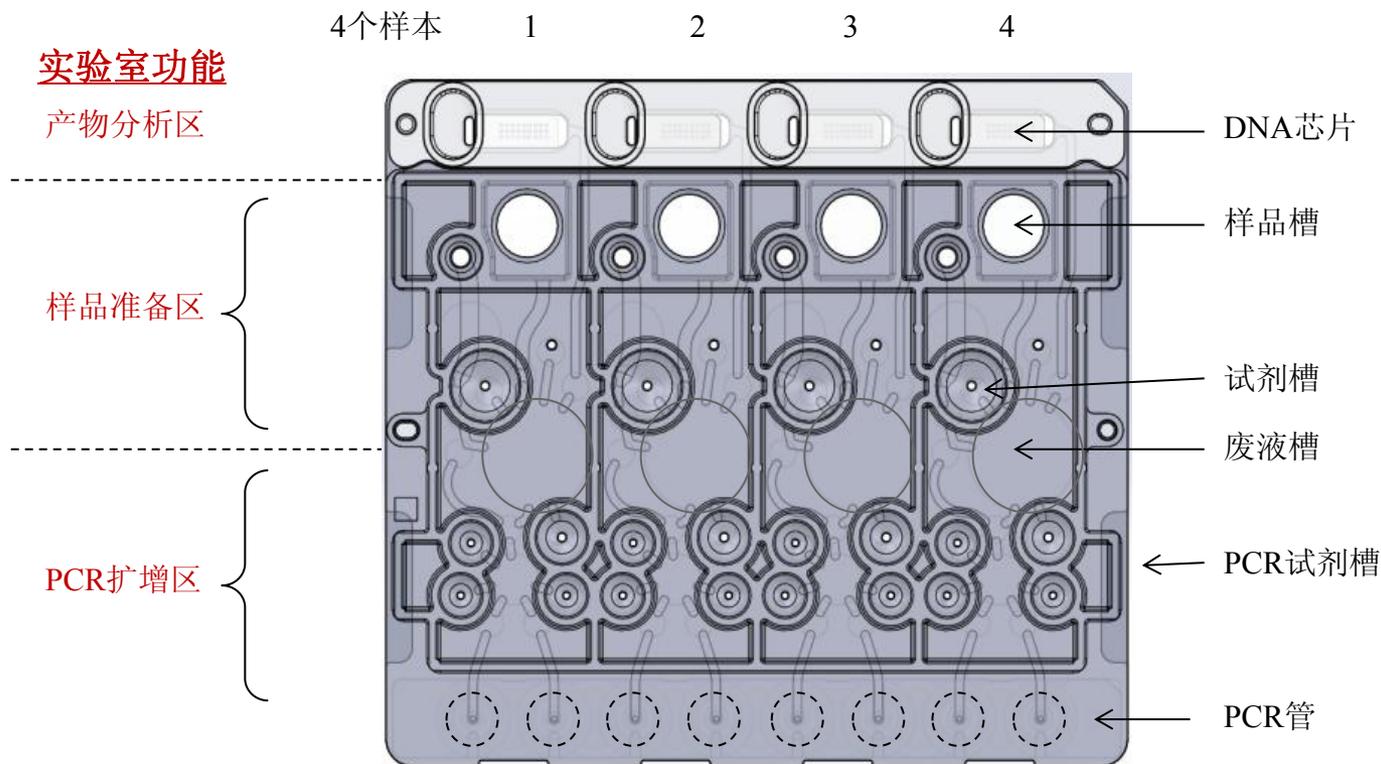
芯片



试剂盒

独特的芯片技术：芯片上的实验室

- **整合性：**将传统的三区或四区实验室整合与同一芯片上。
- **全自动封闭性：**人为零干预，样本进，结果出。



GenPlex微流控检测系统解决了传统PCR技术的痛点和难点

➤传统PCR检测的困难

- 需PCR实验室：分三区或四区
- 需多台设备和多名专业人员
- 专用场地，占地大
- 需要资质认证，监管严格
- **基层推广难**

➤博晖GenPlex微流控核酸检测系统

- 将PCR实验室和所有操作集成于一台设备
- 全程全自动：人工零干预，样本进，结果出，实现无人值守
- 简化了传统的PCR实验室，**适合基层广泛开展**

传统PCR实验室需要专用场地，严格分区



集成



微流控全自动核酸检测系统

四、肿瘤个体化治疗检测的质量保证

- **1、标准操作程序**
- 肿瘤个体化治疗的检测**标准操作程序（SOP）**，原则上应按照《个体化医学检测质量保证指南》的要求进行编写，其内容应包括：
 - 试剂准备
 - 样本采集
 - 样本接收与预处理
 - 核酸提取
 - 检测方法
 - 结果分析和报告
 - 仪器操作
 - 实验室安全措施等临床检验的所有环节。

2、质控品及类型

- 检测质控品的建立是为了提高实验室检测结果的可靠性和可重复性，一般情况下，针对发现罕见的基因突变、实验运行异常、新批次的试剂与上一批次试剂的比对、储存条件或反应温度发生改变后的样本和试剂、验证整体测试可靠性的样本等，都应合理设置质控品。
- （1）阳性对照：以含有目的片段的DNA(或质粒)作为模板进行扩增，证明PCR试剂是否有效、扩增过程是否正确。但阳性样品扩增效率高，应严格控制其浓度和存放位置，避免其成为潜在的污染源。例如，检测基因突变时，应根据选用的检测方法，选择该方法最低检测限的阳性样本。
- （2）阴性对照：以不含有目的片段的阴性样品作为模板进行扩增，用于证明扩增过程中无假阳性现象。
- （3）空白对照：以纯水作为模板进行扩增，用于证明扩增过程中无假阳性现象。

2、质控品及类型

- (4) **PCR抑制物对照**: 在与阳性对照相同的反应体系中, 加入相同数量的待测样品**DNA**, 如果未扩增出目的片段, 证明此待测样品**DNA**中存在**PCR抑制物**。
- (5) **空白提取对照**: 空白提取对照扩增结果为阳性, 说明**DNA**提取试剂或过程中可能受到污染。
- (6) **阳性提取对照**: 阳性提取对照扩增结果为阴性, 说明提取过程可能有误。如果**DNA**阳性对照扩增结果为阴性, 或者**DNA**阴性对照和空白对照扩增结果为阳性, 则说明**PCR**试剂或扩增过程存在问题。
- (7) **基因检测单核苷酸多态性 (SNP)** 时, 需要设置多个阳性对照用于检测野生型纯合子基因型、杂合子基因型, 突变纯合子基因型。质控应尽可能模拟临床样本, 如基质或采样方法与待测样本相同。

3、室内质量控制

- 原则上按照《个体化医学检测质量保证指南》的要求进行。建议按照以下原则设定室内质量控制：
 - （1）如果只检测1个基因突变，定性测定有一份接近CUT-OFF(2~4倍)的弱阳性和一份阴性质控样本即可。质控品的设置数量随检测样本数的增加而按比例适当增加，例如临床样本数量达到50~60份，则可将阳性和阴性质控样本的数量翻倍。质控品应随机放置在临床样本中间随同临床样本一起同时处理。
 - （2）当同时检测多个突变基因时，可以根据实验室自身的条件，可只设立能最灵敏地反映检测问题的2个或3个突变基因的阴阳性质控，下次检测改用跟上次不同的基因突变的阴阳性对照，依次类推，循环往复。另外，质控样本在扩增仪中的位置不应持续性的固定在同一个孔，而应在每次扩增检测时，进行相应的顺延，尽可能在一定时间内可以监测到每一孔的扩增有效性。
 - （3）如果每次质控品的检测结果均成立，说明结果可信，报告可以发出；反之，就要对这种情况出现的原因进行分析。在找不到合理的解释的情况下，须将不符合的基因突变和其相应的对照重新检测。
- 此外，临床样本中每次检测阳性和阴性结果的出现频率，以及同一基因型或基因突变出现频率或连续出现频率等，均可作为提示实验室“污染”的质控指标。

4、室间质量评价

- 临床检测实验室应参加室间质评（**EQQA**），详细、如实地记录参与**EQQA**的全过程，根据反馈结果了解本实验室的能力、自查存在的问题，及时寻求改进方法，解决问题，完善实验室质量控制体系。

5、PCR污染控制

- （1）由于肿瘤基因突变检测时必须设置阳性质控品，阳性样本加样时、PCR扩增的产物可能成为PCR实验室的主要污染源，而PCR的敏感性和效率特别高，所以少量的扩增产物污染样本或反应管即可出现假阳性。尤其是PCR扩增产物和质粒分子很容易造成实验室的污染，导致假阳性现象发生。通过规范实验室设计、规范试剂耗材管理、规范实验室操作和技术处理来控制污染。
- （2）常见的PCR污染有样品间交叉污染、PCR试剂的污染、PCR扩增产物污染、气溶胶污染和实验室中克隆质粒的污染。
- （3）污染控制：规范实验室设计、规范试剂耗材管理、规范实验室操作和技术处理，如PCR扩增实验中使用dUTP，而不用dTTP。

五、结束语

- 医学实验室需进一步加强风险意识和风险管理，提高质量管理水平，从检测前、中、后每个环节切实规范管理和操作。让"每一个检测数据都关乎一个生命"的理念深入到每位检测人员的意识里和每个操作流程的环节中。同时，相关监管部门也应考虑分子诊断发展迅猛这一特殊性，需要进行现行监管模式的创新并及时出台相关技术规范，使我国分子诊断朝着健康有序的方向发展，更好地为患者提供高质量的分子诊断服务。