

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.038

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.038>

· 专家述评 ·

ISO 15189 认可规范在分子病理检测结果质量保证中的应用

管文燕, 樊祥山, 陈洁宇, 杨军, 叶庆

(南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 南京 210008)

[摘要] 随着精准医疗的发展, 分子病理诊断已越来越多地应用于临床。对检测结果质量的管理是确保分子病理检测结果准确性、科学性的基础。笔者根据ISO 15189 CNAS-CL02: 2012《医学实验室质量和能力认可准则》中5.6章节《检测结果质量的保证》内容及其在分子诊断领域的应用说明, 探讨涉及检测结果质量保证中的应用实践, 以期建立完善的质量保证体系, 为临床提供优质的分子病理检测服务。

[关键词] ISO 15189; 分子病理; 检测结果; 质量保证

Application of accreditation criteria published by ISO 15189 in quality assurance for results of molecular pathology detection

GUAN Wenyan, FAN Xiangshan, CHEN Jieyu, YANG Jun, YE Qing

(Department of Pathology, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Abstract Recent progress in precision medicine has improved the molecular pathology detection to be increasingly applied to diagnose of diseases. It is important for ensuring the accuracy and scientific of pathological examination results. The quality management for results is the basis for ensuring the accuracy and scientific of molecular pathology detection. According to the Chapter 5.6 headed "Quality Assurance for Detection Results" of accreditation criteria for the quality and competence of medical laboratories (ISO 15189 CNAS-CL02: 2012) and the related guidance on the application in the field of molecular diagnostics, the application of criteria in quality assurance for results is discussed in the hope of establishing a complete system, which is the guarantee for providing quality service to clinic.

Keywords ISO15189; molecular pathology; detection results; quality assurance

随着分子靶向药物在临床获得的巨大成功, 新一代测序技术的迅猛发展, 精准医疗概念的深入人心, 伴随临床治疗和诊断的分子病理检测技术得到了前所未有的广泛应用^[1]。分子病理学成为

病理学的发展方向和最具活力的领域, 分子病理检测平台的建设、管理成为病理学实验室质量管理体系的重要组成部分。ISO 15189 CNAS-CL02: 2012《医学实验室质量和能力认可准则》^[2]在分子

收稿日期 (Date of reception): 2018-05-28

通信作者 (Corresponding author): 叶庆, Email: qingye1998@126.com

病理检测领域有专门的应用说明CNAS-CL36《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》^[3], 为分子病理检测质量管理提供了依据。截至2018年2月, 中国大陆仅有3家公立医院病理科通过CNAS认可, 其中申请认可的分子病理检测项目仅数项^[4]。目前ISO 15189认可对分子病理检测而言仍是不小的挑战。例如, 国内多数分子病理实验室目前参考《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》作为实验室规范化管理的依据, ISO 15189认可准则及其分子检测领域的应用说明较之有不同之处, 部分要求更为严格; 又如, 准则中的有些概念或要求对于分子病理执业人员而言仍还比较模糊, 可操作性仍有难度。南京鼓楼医院病理科自2017年5月正式引入ISO 15189质量管理体系, 目前该体系运行近9个月, 亚专科分子病理预计申报14项参加CNAS认可。现对本科室亚专科分子病理组依据ISO 15189准则及应用说明中第5.6章节《检测结果质量的保证》的内容, 完善分子病理检测结果质量保证体系的实践经验进行总结, 供同道参考、交流。

1 室内质量控制

室内质量控制是通过一系列的步骤, 连续地评价本实验室测定工作的可靠性, 并依其决定当批检测结果的有效性、判断检测报告能否发出的过程。

1.1 组织学质控

用于基因突变检测的甲醛固定石蜡包埋(formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE)样本及细胞学样本的肿瘤细胞含量, 影响最终检测结果的可靠性。

1.1.1 FFPE 样本

在进行分子病理检测前需经有经验的病理医师选定肿瘤细胞丰富的蜡块, 切取1张2 μm厚切片, 用于常规病理HE染色, 病理医师划定以肿瘤细胞为主、没有明显的坏死、黏液和炎性改变的区域, 确定肿瘤细胞的百分比(肿瘤细胞/划定区域)^[5]。实验员对照HE切片上所划定的受检区域, 使用一次性刀片或Tips吸头, 将受检区域的肿瘤组织刮入EP管中富集。不同检测平台对肿瘤细胞含量的要求不一, 具体视所采用的DNA提取方法和突变检测方法的灵敏度而定, 目前尚无统一标准。如组织EGFR基因突变检测推荐肿瘤细胞数量在200个以上, 肿瘤细胞比例达50%^[6]。对于肿瘤

细胞数量不达标的样本应重新采集, 对特殊情况(如患者无其他标本)者可继续检测, 并在报告中“标本评价”一栏中注明, 以便让临床医师知晓结果准确性程度。

1.1.2 细胞学样本

胸水、肺泡冲洗液、痰液标本, 在处理为细胞沉淀后, 需制作1张细胞学涂片, 用于HE染色供病理医师确定肿瘤细胞的百分比(肿瘤细胞/整张涂片)。建议将细胞学样本制作为细胞蜡块再行检测, 优点在于切片细胞不重叠、易保存。

1.2 核酸质控

对提取核酸的质量进行监控, 是检测结果质量保证的关键环节。核酸质量指标包括核酸浓度、核酸纯度及核酸完整性。

1.2.1 核酸浓度

可通过紫外分光光度计 A_{260} 读数测定, 并依据试剂盒推荐检测浓度对核酸进行稀释。需要注意的两点是: 1) 紫外分光光度计是利用核酸(DNA/RNA)在紫外光260 nm波长有最大吸收峰的原理测定核酸浓度, 测定的DNA或RNA值可能包含了残留的RNA或DNA的量, 因此测定值偏高; 2) 对于核酸浓度较低的样本, 如血浆游离DNA浓度很低, 紫外分光法测定准确性、稳定性差。采用荧光染料核酸定量法可以规避紫外分光法以上两个缺点。

1.2.2 核酸纯度

主要通过紫外分光光度计 A_{260} 与 A_{280} , $A_{230\text{ nm}}$ 比值测定。 $A_{280\text{ nm}}$ 是蛋白和酚类物质最高吸收峰的吸收波长, A_{260}/A_{280} 比值低, 表示受到蛋白(芳香族)或酚类物质的污染; $A_{230\text{ nm}}$ 是碳水化合物最高吸收峰的吸收波长, 纯DNA和RNA的 A_{260}/A_{230} 比值为2.5, $A_{260}/A_{230}<2.0$ 表示受到碳水化合物(糖类)、盐类或有机溶剂污染。用于分子病理检测的核酸样本建议: DNA的 A_{260}/A_{280} 为1.6~1.8, RNA的 A_{260}/A_{280} 为1.7~2.0^[7]。

1.2.3 核酸的完整性

由于甲醛固定和石蜡包埋处理组织的过程会导致核酸的片段化以及核酸分子间的交联, 因此推荐用于核酸提取的FFPE样本的保存时间宜小于3年。对于保存时间超过3年的FFPE样本建议在行检测前进行核酸片段化检测, 以确保核酸的完整性。相较于DNA, RNA在提取及保存过程中更易降解, 必要时, 行检测前可进行琼脂糖凝胶电泳或毛细管电泳观察有无DNA污染和RNA的完整程度。

另外需要特别注意的是, 不利于核酸检测的

前处理(例如含HCl的脱钙液处理),即使对较稳定的DNA也会造成严重片断化,此类样本不推荐进行分子病理检测。

1.3 扩增反应质控

为避免假阳性、假阴性结果导致的错误诊断结论,检测的扩增反应中必须设置质控物,在质控品检测结果成立的前提下,才能对检测样品扩增结果进行判定^[8]。定性检测项目,每次实验应设置阴性、弱阳性和/或阳性质控物;定量检测项目,每次实验应设置阴性、弱阳性和阳性质控物。阴性质控主要监测实验室扩增产物污染、标本交叉污染和试剂污染等情况;阳性质控用已知的阳性和/或弱阳性标本来监测核酸提取及扩增效率;需要时,可选择合适的“管家”/内参基因作为内对照以评价样本的质量。当同时检测多个变异位点时,可根据实验室的条件设立针对2~3个位点的阴性或阳性对照。质控品在扩增仪的排列顺序,不应永久性地固定在一个孔,应在每次扩增检测时,进行相应的顺延,以使在一定的时间内,尽可能监测每一个孔的扩增有效性。

此外,对于基因突变、基因多态性或基因型检测,可选取最能反映检测情况的突变或基因型样品定期复检,以进一步达到质控目的。

1.4 室内质量控制的评价

在上述室内质控步骤中,如发现质控数据违背了控制规则,就意味着至此的检测步骤或失控质控品同批样本检测结果可能作废。首先,检测人员应填写失控记录表,上交专业主管,由其做出是否终止检测或发出与失控质控品同批样本检测报告的决策。其次,检测人员应查明引起失控的原因。失控信号的出现一般受多种因素的影响,采取原因分析的思路一般包括:1)检查质控品。重新测定同一质控品,用以查明是否有人为误差或偶然误差;新开一管质控品,重测失控项目;新开一批质控品,重测失控项目。2)更换试剂,重测失控项目。3)进行仪器维护,重测失控项目。4)重新校准仪器,重测失控项目。5)寻求厂家技术支持或专家帮助。查明原因后,如为假失控,可由专业主管决定、签字后发出报告;如为真失控,采取纠正措施,并验证纠正措施的有效性,验证方法有:1)再次检测质控品,结果在控。2)重新检测至少5例在控状态下检测的临床标本。失控纠正后,需由专业主管审核确认,全部样本再重新检测,各质控步骤合格后签字发出检

测报告。

2 室间质量控制

室间质量评价是利用多家实验室检测同一标本、反馈实验结果后,按照预先制定的准则评价检测者的能力,也称能力验证(proficiency testing, PT)。

2.1 比对实验室的选择原则

优先选择获CNAS认可的能力验证提供者的能力验证计划;当无获认可提供者提供的能力验证计划时,优先参加卫生系统权威机构(省部级)提供的实验室间比对(以下简称室间质评)^[9];对于上述机构都未列入的质评活动项目,选择使用相同检测方法的更高级别或同级别医学实验室进行实验比对。

2.2 评价数量及频次

实验室申请认可的每个分子检测领域的项目样品数量:至少5份,包括正常和异常水平或不同常见基因突变或基因型;每年至少参加2次室间质评活动。

2.3 室间质评具体操作

2.3.1 质评样品的检测

实验人员对于接收的比对实验样本需进行数量、编号等信息的仔细核对,并将比对实验样本按要求进行保存。检测过程中,应将比对实验样本按常规临床标本对待,根据实验室常规工作程序、使用与常规样本完全相同的方法和试剂进行测定,不得特殊对待。向质评单位上报比对结果时注意仔细核对数据,以免错报、漏报。

2.3.2 质评结果的反馈与分析

卫生系统权威机构提供的室间质评项目,会提供项目的质量评价报告,基本包含各评价样本、各评价内容的靶值与参评实验室的测定值,PT得分(分值),PT结果(合格、不合格);与其他实验室进行的室间质评项目,判定标准为 $\geq 80\%$ 的结果符合为合格。参评实验室对收到反馈结果应进行认真分析,对于不合格或对于合格但有扣分的内容,应查找原因,并采取相应纠正措施。参与室间质评的全过程及结果分析与措施需详细、如实地记录,形成报告后交由技术主管审核。特别指出的是,目前部分室间质评项目还需提供检测报告,虽然不计入计分范围,但通过反馈结

果,可指导参评单位就报告内容、报告清晰度、基因命名、结果解释等进行更规范的撰写。另外,对于基于石蜡切片的比对实验样本,质评机构会要求上报病理诊断结果及肿瘤细胞比例,但对于肿瘤细胞比例的计算标准并未明确指出,目前也无相应行业规范参考,因此参评实验室可事先询问质评机构计算标准,避免在肿瘤细胞比例上被扣分。

3 检测结果的可比性

在工作中,实验室常使用2套及以上检测系统检测同一项目,应设置不同检测系统的比对实验、建立比对数据,表明其检测结果的一致性,增加检测报告的可信度。如部分实验室EGFR基因突变检测可在ABI7500检测系统(有ROX校正)检测,亦可在Roche LightCycler480检测系统(无ROX校正)检测,需对2种检测系统进行比对实验。比对频次建议每年至少1次,样品数量不少于20例。

不同实验员操作同一检测项目时,同样需设置不同人员间的比对实验,建立比对数据,排除实验人员操作对检测结果的影响。比对频次建议每年至少1次,样品数量不少于5例。

另外,当同一检测项目,在需要变更检测方法、检测位点等时,实验室应告知临床医师在结果可比性方面的任何变化,并讨论对临床活动的影响。如EGFR基因突变检测,在可检测的突变位点发生变化(增加或删除),或者由一代测序检测系统改为ARMS-PCR检测系统时导致检测灵敏度发生变化,需要提前开临床沟通会或在LIS系统中醒目告知,确保临床医师知晓变更对临床活动的影响。

4 结果反馈的质控

当分子病理检测结果与临床和其他实验反馈的结果不符时,应记录并查找、分析原因,适当时采取纠正措施,如显示出存在潜在不符合的趋势,应采取预防措施。

5 检测数据的质控

检测质控数据的收集、整理分析也是检测结果质量保证中的关键环节。

5.1 室内质控数据的管理

所有检测项目的原始质控数据、原始记录以

及失控报告(违背哪一项失控规则、失控原因、采取的纠正措施、制定的预防措施等)都应上交文档管理员归档保存。

5.2 室内质控数据的月度分析

各检测项目应每月对涉及检测全过程的质控要素点进行总结分析,作为阶段性的室内质控数据填写在月度小结中。如月度内某病区多次出现送检样本脱落细胞量过少,应考虑对采样人员加强采集培训;又如基因突变的阳性率,如果发现阳性率高于文献资料报道值,应引起重视,考虑是否存在假阳性情况,如果阳性率偏低,应结合检测方法的局限性考虑假阴性的可能,并进行针对性的改进。

6 结语

CNAS发布的CNAS-CL02:2012《医学实验室质量和能力认可准则》^[2]和CNAS-CL36《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》^[3]是分子病理实验室参加ISO 15189认可的主要参考文件。检测结果质量保证是实验室质量管理体系的核心内容之一,在这方面,因《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》是对开展分子诊断检测实验室的强制要求,考虑的是全国范围内规范的分子诊断实验室都可以满足的条件,而CNAS实验室认可是实验室自发的行为,认可准则对实验室的具体要求侧重于对检测质量影响的考虑,既严格又全面具体,对室内质控具体如何开展、定性项目和定量项目质控物的选择、室间质评如何检测、不合格如何处理、没有室间质评如何处理、不同检测系统的结果一致性保证等均有详细的说明。本实验室在遵循《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》的同时,又通过参考ISO 15189认可规范,建立并不断完善检测结果质量保证体系,对可能影响检测结果质量的各个环节进行控制来确保检查结果的准确性和科学性。希望将一个更加规范化和标准化检测结果质量保证体系展现给广大分子病理实验室同仁,使得分子病理检测质量和服务水平得到不断改进和提高。

参考文献

1. 朱雄增. 精准医学时代下的精准诊断[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(7): 442-443.

- ZHU Xiongzeng. Precision diagnosis in the age of precision medicine[J]. Chinese Journal of Pathology, 2015, 44(7): 442-443.
2. 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02 2012医学实验室质量和能力认可准则[S]. (2013-11-12) [2015-06-01].
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL02 2012 accreditation criteria for the quality and competence of medical laboratories[S]. (2013-11-12) [2015-06-01].
 3. 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A009 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明[S]. (2018-03-01) [2018-03-01].
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL02-A009. Guidance on the application of accreditation criteria for the medical laboratory quality and competence in the field of molecular diagnostics[S]. (2018-03-01) [2018-03-01].
 4. 中国合格评定国家认可委员会. 获CNAS认可机构名录[EB/OL]. [2018-02-08] <https://www.cnas.org.cn/cxzq/697737.shtml>.
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. The CNAS approved list[EB/OL]. [2018-02-08] <https://www.cnas.org.cn/cxzq/697737.shtml>.
 5. 中华医学会病理学分会. 分子病理诊断实验室建设指南(试行)[J]. 中华病理学杂志, 2015, 44(6): 369-371.
Chinese Society of Pathology. Construction guides for molecular pathology laboratory (Trial)[J]. Chinese Journal of Pathology, 2015, 44(6): 369-371.
 6. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家组. 中国非小细胞肺癌患者表皮生长因子受体基因突变检测专家共识(2016版)[J]. 中华病理学杂志, 2016, 45(4):217-220.
Expert group on detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in Chinese patients with nonsmall cell lung cancer. Consensus on detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in Chinese patients with non-small cell lung cancer (2016)[J]. Chinese Journal of Pathology, 2016, 45(4): 217-220.
 7. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)[S]. [2015-07-31].
National Health and Family Planning Commission of China. Guidelines for the detection of individualized treatment of cancer (Trial)[S]. [2015-07-31].
 8. 李艳, 李金明. 个体化医疗中的临床分子诊断[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
LI Yan, LI Jinming. Clinical molecular diagnosis in individualized medicine[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013.
 9. 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL02 2016能力验证规则[S]. (2016-04-15) [2016-08-01].
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-RL02 rules for proficiency testing[S]. (2016-04-15) [2016-08-01].

本文引用: 管文燕, 樊祥山, 陈洁宇, 杨军, 叶庆. ISO15189认可规范在分子病理检测结果质量保证中的应用[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(10): 2278-2282. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.038

Cite this article as: GUAN Wenyan, FAN Xiangshan, CHEN Jieyu, YANG Jun, YE Qing. Application of accreditation criteria published by ISO15189 in quality assurance for results of molecular pathology detection[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(10): 2278-2282. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.038