临床基因扩增检验实验室技术审核中存在的问题分析

曾艳芬, 陈发林

(福建省立医院福建省临床检验中心, 福建福州 350001)

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.069

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)19-2711-02

聚合酶链反应(PCR)应用初期因规范性问题, 曾被全面暂停在临床应用。经过 PCR 技术工作规范的制订和技术人员培训, 卫生部于 2002 年出台《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》和《临床基因扩增检验实验室工作规范》, 重新向临床开放 PCR 检测项目。2010 年卫生部出台《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》, 加强对临床基因扩增检验实验室的管理。

福建省临床检验中心作为福建省医疗机构临床基因扩增检验实验室 PCR 技术审核组织部门, 自 2003 年起对全省医疗机构临床基因扩增检验实验室进行技术审核, 采用初次评审和 5 年复评审的方式。目前全省有 84 家 PCR 实验室, 先后完成 142 次现场技术审核。84 家实验室所在医院等级分布为三级医院 52 家, 二级医院 23 家, 其他医院 9 家。2003 年 6 月至 2013 年 12 月技术审核存在问题分类汇总情况见表 1。

表 1 2003 年 6 月至 2013 年 12 月技术审核存在问题分类汇总情况

存在问题类型	构成比(%)
检测方法	18.7
设备管理	15.0
质量控制	13.1
人员管理	12.5
记录	11.2
标本管理	8.3
设施和环境	7.7
实验室设置和设备	5.8
报告	4.9
投诉	2.8

1 检测方法方面存在的问题

1.1 体系文件编写和管理的问题 医疗机构 PCR 实验室通常隶属检验科, 其质量手册和程序文件与检验科合在一起, 因此技术审核重点关注的内容之一是标准操作程序(SOP)^[1]。部分实验室在体系文件的格式、内容、可操作性、管理等方面存在问题。

虽然 SOP 文件无统一、标准的格式, 但实验室名称、SOP 文件名称、编号、启用日期、版本号、修订号、页码、编写人、审核人、批准人等基本要素是必不可少的。许多实验室会遗漏其中的个别要素, 如修订号一项, 因 SOP 文件形成后, 在使用过程中可能出现不适用情况, 应针对该 SOP 文件进行修订, 有关责任人重新签字确认后实施, 此时只需对新 SOP 文件的修订号

进行修改, 当修订的次数或文件达到程序文件换版的规定时, 再对整个文件体系进行换版。

一些实验室的 SOP 文件内容不够详尽具体, 可操作性较差。例如仪器维护保养 SOP 文件存在责任人、维护保养周期不明确, 以及维护和保养的方法及步骤不具体等问题。建议每个仪器设备按具体的维护步骤编写 SOP 文件, 注明责任人、维护时间、内容、所需材料, 并有记录。除常规维护外, 应有可能存在意外情况(如出现破管、泼溅、爆盖等)的处理步骤。

质量体系文件管理不到位, 存在实验室出现作废文件与现行文件并存, 工作区域缺少相关 SOP 文件, 仪器、设备和检测方法已更改而其相应的 SOP 文件未及时更新等现象。

1.2 试剂耗材质检的问题 PCR 实验室应对试剂、离心管、加样枪头等进行质检, 而部分实验室未进行或操作不规范。离心管应进行爆盖试验、高速离心时完整性试验, 以及是否存在抑制物等方面的检测。带滤芯的枪头应进行滤芯密封性、是否含有扩增抑制物等方面的检测。试剂质检包括内、外包装检查及性能检验, 外包装检查主要是看包装的完整性、包装箱内维持的温度和试剂的有效期; 内包装检查主要是看试剂是否齐全、有无说明书等。试剂性能检测建议在启用新批号试剂前进行, 按照日常操作规范带入至少 5 个近期的由上个批号试剂检测过已知结果的样本, 通过不同批号结果一致性的评价, 来评估新批号试剂的性能。

2 设备管理方面存在的问题

2.1 实验室仪器和设备建档的问题 PCR 实验室应该为主要仪器和设备建档, 一机一档。档案内容包括, (1) 仪器基本情况: 仪器设备名称、型号、序列号、生产厂家、购置日期、接收日期、启用日期、目前放置地点、接收时的状态、负责人等; (2) 仪器使用说明书、注册证等复印件, 合格证书; (3) 仪器校准记录: 本次校准日期和下次应校准的日期, 校准证书或数据; (4) 仪器维修或维护的历史记录; (5) 仪器配备的小配件(如保险丝、灯泡)记录。

2.2 仪器校准的问题 仪器设备定期校准确保其在良好状态下工作, 对保障检验质量的作用是不言而喻的。PCR 实验室主要仪器设备(如加样枪、温度计、金属浴、离心机、生物安全柜、扩增仪)均应校准。目前仪器校准的规范性较差, 如某些厂家的扩增仪校准报告, 只有简单的结论, 而无具体的检测数据。扩增仪的校准包括光学系统、温度模块升降温的速率、荧光本底的校准, 以及孔间温度差异等是否在允许误差范围内。

3 质量控制方面存在的问题

3.1 室内质量控制的问题 室内质量控制是指实验室人员采取一定的方法和步骤, 连续评价实验室工作的可靠程度, 旨在

监测和控制实验室常规工作的精密度,提高实验室常规工作中批内、批间样本检验的一致性,以确定测定结果是否可靠及可否发出报告的一项工作^[2]。许多实验室在质控品的选择与设置,质量控制方法的有效性,失控的判断及措施方面均存在缺陷。室内质量控制应该保证以下几点,(1)从基质、浓度、稳定性等方面选择合适的质控品,定性试验选择弱阳性和阴性质控品,定量试验选择阴性质控品。(2)室内质控品的来源:购买商品化的质控品,应写明购买厂家、浓度水平;自制质控品应写明质控品的制备方法、稳定性、管间差异的评价方法及合格条件。(3)建议对质控品每次扩增的位置进行顺延,以便更好地监测每一个孔的扩增有效性,顺延规则应在 SOP 文件中表述清楚。(4)质量控制方法的选用:定性试验和定量试验可分别参照免疫学、常规化学相应的质量控制方法。(5)尽可能多的罗列失控现象和可能原因,制订相应的纠正措施,在实际工作中参照执行。

3.2 室间质量评价的问题 室间质量评价是客观比较实验室的测定结果与靶值的差异,由外部机构采取一定的方法,连续、客观地评价实验室的结果,发现误差并校正结果,使各实验室之间的结果具有可比性^[3-4]。室间质量评价存在 2 个问题:(1)数据的真实性,实验室上报的室间质评结果与原始数据不符,说明实验室“特殊对待”质评样本或相互沟通;(2)失控后的分析,笔者在室间质量评价现场看到的失控后分析报告的原因多为质控品复溶时间不够、混匀不充分、加样量不足或随机误差等,分析均不够深入、全面,并缺乏纠正和预防措施。笔者建议失控后分析报告应该从以下 4 点分析:(1)提取核酸是否存在误差;(2)扩增孔间温度是否一致,升、降温速率及荧光背景是否符合要求;(3)探针的纯度、标记效率和核酸提取试剂的效率;(4)人员的操作经验、扩增后的分析、标准曲线的确定。

4 人员管理方面存在的问题

人员的规范管理是防止实验室污染,保证实验室生物安全的重要环节,而继续教育是检验质量持续改进的重要保证^[5-10]。

很多实验室都存在人员进出管理不到位的现象,人员出入随意,甚至逆行;试验期间缓冲间两侧门同时打开;未经培训的学生可随意使用实验室。这些不规范的管理使实验室存在污染和安全隐患。因此,实验室应制订相关的人员管理制度和规范的实验室操作规程并严格执行,加强人员“无基因、防污染”的概念及生物安全培训,采用人员进出登记或安装门禁系统、气锁连动门等措施来加强管理。

“一区”为 PCR 实验室最洁净的区域,不应存在任何核酸,但大多实验室仍将试剂盒里的标准品和阳性对照品放置于“一区”。有些实验室还把“二区”、“三区”产生的记录,如室内质量控制的失控记录、仪器和设备的使用记录、故障维修记录等归档存放于“一区”。

一些 PCR 实验室工作人员经培训获上岗证后就没有机会再参加继续教育,导致知识陈旧。实验室应该重视人员的培训,每年对操作人员进行内部培训或参加其他的学习班以更新其知识。

5 记录方面存在的问题

所谓记录是阐明其质量管理体系所取得的结果,或提供质量管理体系完成活动的证据性文件,是质量管理体系文件的有机组成部分,也是完成质量体系中相关程序和标准操作所规定的过程及其结果的证实材料^[11-14]。PCR 实验室记录繁多,主要包括实验室清洁记录,环境条件的控制记录,仪器设备的操作、维护保养、校准过程及有关数据记录,检验试剂来源、批号及配制记录,检验标本的来源和唯一编号,质控记录和原始数据等。实验室每天工作流程相似,使用流程表可简化记录又能保证记录完整规范,但部分实验室未使用流程表或存在流程表设计不够实用合理现象。笔者建议各实验室应尽量细化流程表,将试验结果的原始数据打印并附在流程表上一同存档。

6 小 结

随着分子生物学的发展,PCR 在临床的应用越来越广泛,从最初检验科用于感染性疾病的检测,到目前病理科进行肿瘤的诊断与治疗、药剂科进行个体化治疗、产前诊断中心进行产前筛查及遗传病诊断等都离不开 PCR。因此,只有规范 PCR 的临床应用,才能更好地为临床一线服务。

参考文献

- [1] 申子瑜,李金明.临床基因扩增检验技术[M].北京:人民卫生出版社,2002:57-63.
- [2] 李金明.实时荧光 PCR 技术[M].北京:人民军医出版社,2007:55-60.
- [3] 王露楠,李金明,邓巍,等.HCV RNA RT-PCR 测定室间质量评价的研究[J].临床检验杂志,2000,18(5):281-283.
- [4] 肖艳群,蒋玲丽,金中淦,等.定量 PCR HBV DNA 室间质量评价可接受范围的探讨[J].检验医学,2012,27(6):503-505.
- [5] 周志统,瞿涤.生物安全三级实验室人员管理相关问题的探讨[J].微生物与感染,2011,6(3):188-190.
- [6] 宋秀军,江其生.浅谈临床定量 PCR 实验室管理[J].医疗卫生装备,2010,31(2):84-84.
- [7] 黄启慧.实时定量 PCR 实验室管理及污染预防[J].内蒙古中医药,2012,31(4):62.
- [8] 罗可天.疾病预防控制中心的 PCR 实验室管理要素[J].中国社区医师,2009(11):203-204.
- [9] 吕虹,周亚莉,张国军,等.临床基因扩增实验室的运行现状及质量保证[J].标记免疫分析与临床,2008,15(4):253-255.
- [10] 杨平,刘晶晶,杨迎春.实时 PCR 质量管理要素分析[J].中华现代临床医学杂志,2008,6(7):668-669.
- [11] 张妍,蓝煜,鲁葵.考绩档案管理在实验室认证中的作用[J].中国药事,2013(5):493-495.
- [12] 张姝,莫非,夏曙华,等.临床实验室管理模式在临床基础检验教学管理中的应用[J].检验医学教育,2011,18(2):13-14.
- [13] 郝鸿雁,郝淑萍.医疗机构实验室的科学管理探讨[J].实用医技杂志,2009,16(9):740-741.
- [14] 周平,沈默,黄学忠,等.临床基因扩增检验实验室过程记录电子文档的建立及应用[J].中华检验医学杂志,2007,30(10):1188-1189.