

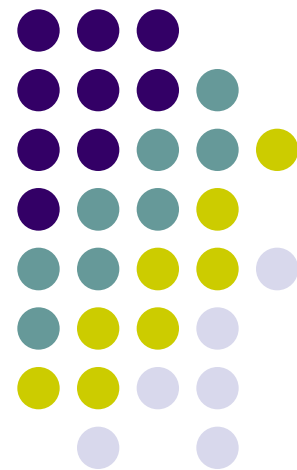
# 临床基因扩增检验 的质量保证

李金明 卫生部临床检验中心

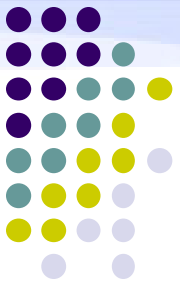
Tel.010-58115061

Email: [jmli63hn@gmail.com](mailto:jmli63hn@gmail.com)

2014.3.26-28 广州



# 临床分子诊断发展历程：几个里程碑

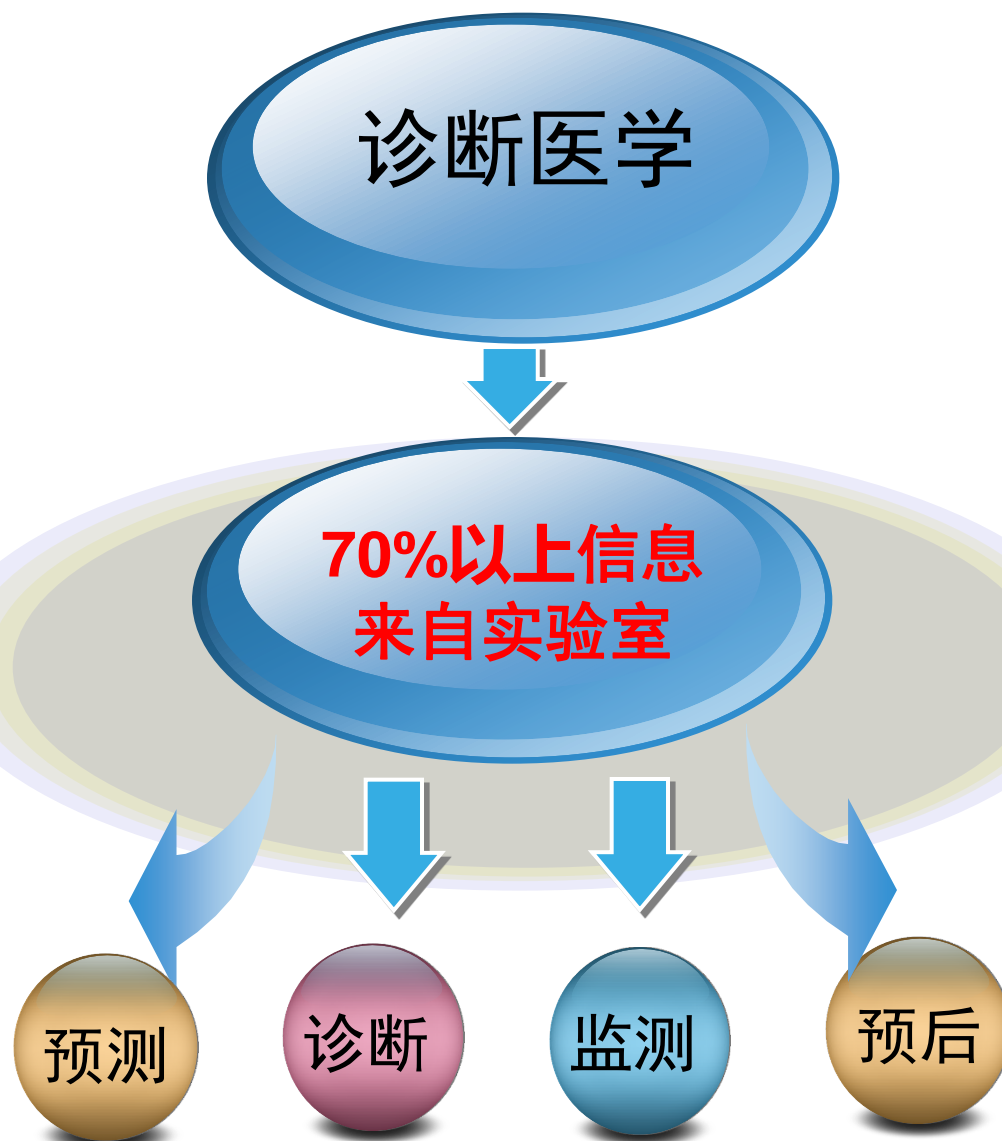


- 1953年:DNA双股螺旋的发现
- 1963年:放射免疫测定技术、核酸测序方法
- 1972~1973年:重组DNA技术
- **1983年:PCR测定技术**
- 1991-1993年:实时荧光PCR技术和芯片技术
- 2003年：人类基因组计划基本完成。纳米和量子标记技术？
- 2011年-**新一代测序技术**



免疫和分子诊断是整个检验医学领域内发展最快、最有活力的，在疾病的诊断和治疗中往往有决定性作用！

分子诊断对检验医学的划时代意义！

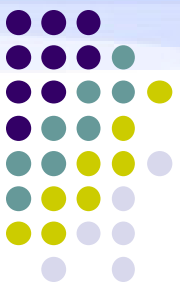


# 质量保证 (Quality Assurance, QA)



- 为一产品或服务满足特定质量要求提供充分 **可信性** 所必要的 **有计划的和系统的措施**。



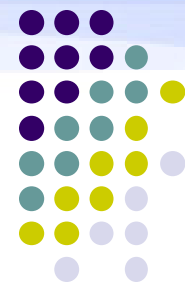


# 室内质量控制 (Internal Quality Control,IQC)的概念

- 由**实验室工作人员**，采取一定的方法和步骤，连续评价本实验室工作的可靠性程度，旨在**监测和控制本实验室工作的精密度**，提高本室常规工作中批内、批间样本检验的一致性，以**确定测定结果是否可靠、可否发出报告的一项工作**。
- 可概括为：(1) **执行者**：实验室技术人员；(2) **目的**：监测实验室测定的重复性；(3) **功能**：决定了当批测定的有效性，报告可否发出。是对实验室测定的**即时性评价**。



# 室间质量评价 (External Quality Assessment, EQA)



- 为客观比较一实验室的测定结果与靶值的差异，由**外单位机构**，采取一定的办法，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**。这是**对实验室操作和实验方法的回顾性评价**，而不是用来决定在实时的测定结果的可接受性。当EQA用来为执业许可或实验室认证的目的而评价实验室操作时，常描述为**实验室能力验证 (Proficiency testing, PT)**。在以前的文献中，EQA常描述室间质量控制。



# 批 (Run)



- 在相同条件下所获得的一组测定。

(5个相同：地点、仪器、试剂、  
人员、时间 )



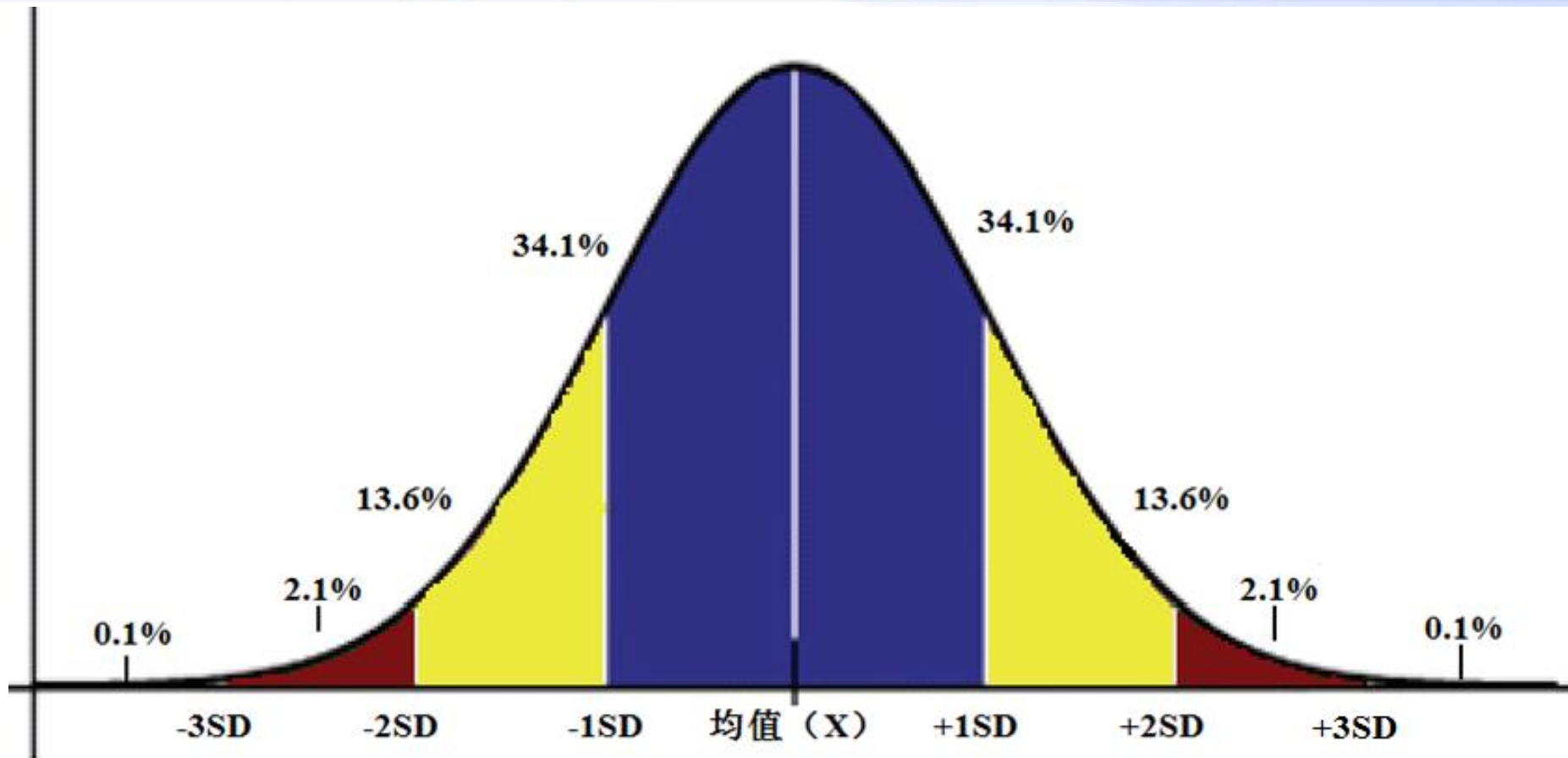
# 正态分布(Gaussian distribution)



- 当一质控物用同一方法在不同的时间重复多次测定，当测定数据足够多时，如以横轴表示测定值，纵轴表示在大量测定中相应测定值的个数，则可得到一个两头低，中间高，中为所有测定值的均值，左右对称的“钟形”曲线，亦即正态分布，又称高斯分布。







**正态分布**的基本统计学含义可用均数 (X)、标准差 (SD)和概率来说明。



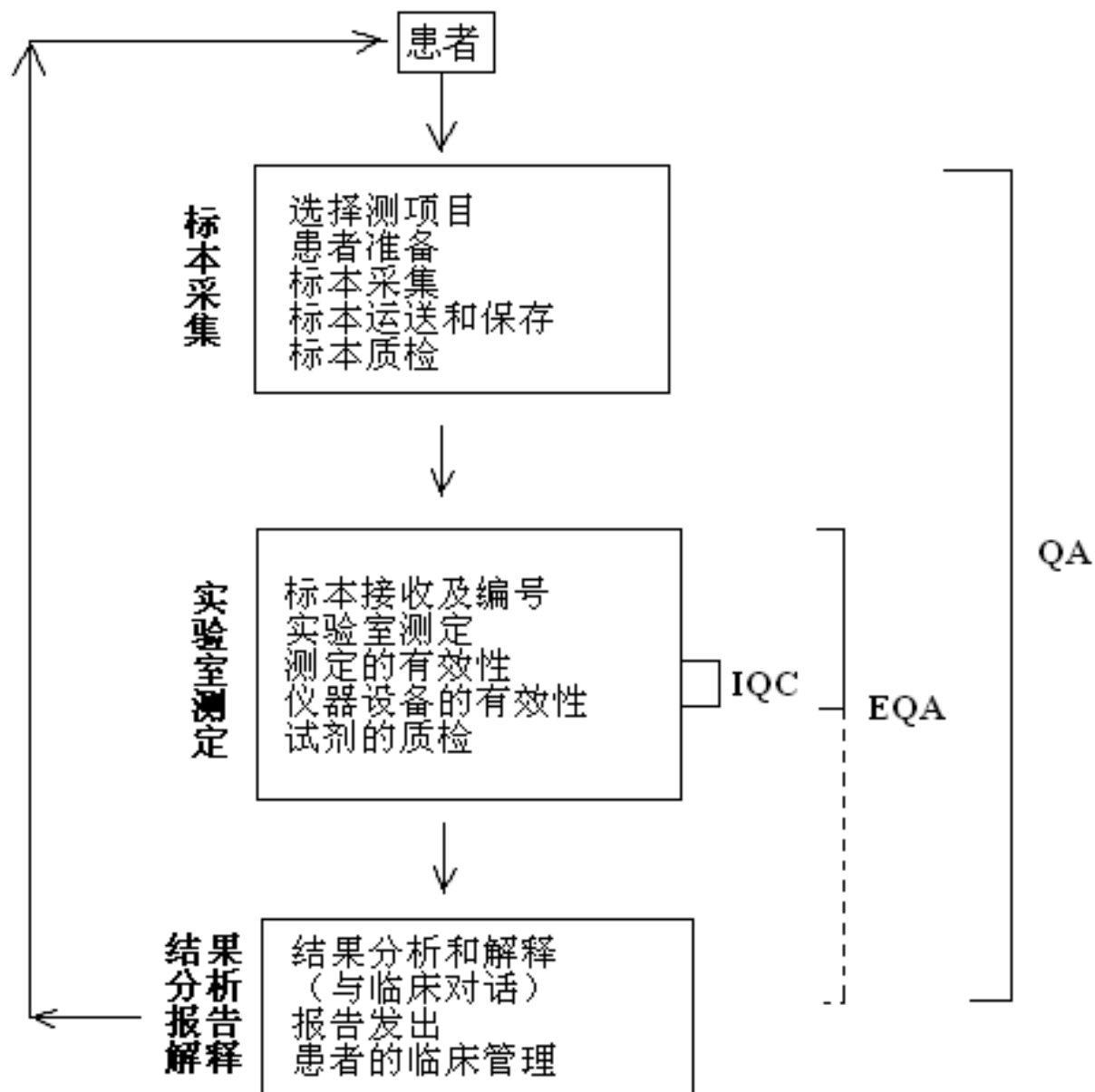
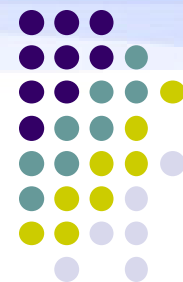
# 临床PCR检验实验室常规测定步骤



- **标本收集：** 选择测定项目、标本收集和保存。
- **实验室测定：** 标本接收、贴标签、样本处理、核酸扩增、产物检测、测定的有效性和临床诊疗价值。
- **报告和解释：** 结果发出、结果解释和临床管理。



# 质量保证、室内质控和室间质评之间的关系



# 临床标本的正确采集、运送、保存的重要性



- 临床检验的质量保证关键环节
- 解决涉及实验室检验的医患纠纷的方法之一





# 标本的类型

- 血清(浆)
- 分泌物
- 痰
- 粪便
- 尿
- 脑脊液
- 组织

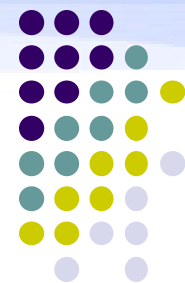




# 标本采集、运送和保存中的关键点

- **容器**：密闭的、一次性、无菌、无核酸酶及其他扩增抑制物
- 采集方法：**人**（训练有素）、防污染、处理
- 运送保存时间和温度：尽可能快？低温？
- 合格标本：容器完整、量够、时间符合要求、外观符合要求、处理符合要求、要采到靶细胞或病原体





# 临床标本的滤纸上保存

- 临床标本置于经过处理的滤纸片上，如靶核酸为DNA，可室温保存数月至数年，如靶核酸为RNA，则可稳定数周。
- 保存在滤纸上的标本，保存时间长，还可因为标本中的PCR抑制物如血红蛋白、酶、免疫球蛋白等吸附于滤纸上，而不对后面的扩增检测造成影响。
- 不管是全血、血清（浆）。还是尿液、粪便、分泌物等均可此种方法。





# 临床标本中PCR反应抑制物

- **内源性的** :免疫球蛋白、蛋白酶、血红素及其代谢产物、白细胞内的乳铁蛋白、肌红蛋白、脂类、粘蛋白、尿素、离子、胆盐、多糖等。
- **外源性的** :如肝素抗凝剂、纤维素和硝酸纤维素、过度UV照射后的矿物油、手套滑石粉、标本容器或采样器材上含有的抑制物。



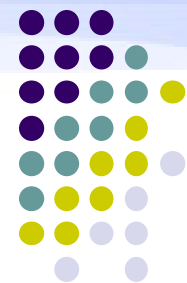




# 临床基因扩增检验的室内质量控制

- 测定前的质量控制
- 非统计和统计学质量控制
- 质量控制的评价





# 测定前质量控制

- 实验室设施、仪器设备及管理
- 理想的试剂和操作方法
- 人员培训





# 实验室仪器设备及管理

- 加样器：维护、校准
- 扩增仪：维护、校准
- 恒温干浴仪或水浴箱：维护、校准
- 离心机：维护
- 生物安全柜：维护
- 冰箱：维护



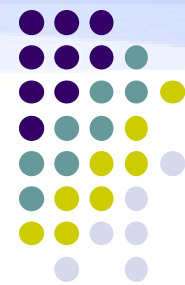
# 基因扩增仪器设备的质控



| 仪器设备 | 质控方法     | 频 度      | 失控标准            |
|------|----------|----------|-----------------|
| 扩增仪  | 仪器校验实验   | 当仪器移动时   | 实验失败            |
|      | 热电偶监测温度  | 每月一次     | 如靶温度或温度差异超出允许范围 |
|      | 扩增功能检测   | 每 4 个月一次 | 待测孔未出现扩增，检测温度   |
|      | 程序打印     | 每次测定时    | 打印程序不对          |
| 加样器  | 校准       | 每年 2 次   | 不符合要求           |
| 水浴箱  | 温度检测     | 每次实验     | 不符合要求           |
| 酶标仪  | 预防性维护及校准 | 每年 2 次   | 不符合要求           |



# 离心管、吸头等质检



- 带滤芯吸头的密封性
- 离心管PCR抑制物质检

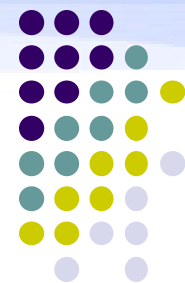




# 扩增仪的扩增功能检测

- **目的：**通过扩增功能来间接获知**孔间的均一性**。
- **方法：**即将加有一已知的含一定浓度的阳性质控样本的扩增反应管置于扩增仪各孔中按常规进行扩增检测，观察结果的一致性程度，如果有某一个或几个孔结果有问题，则应确定这一个或几个孔是否会重复性地得到假阴性结果，如果是，则表明相应孔的热传导有损坏。





# 理想的试剂

- 试剂方法的性能验证及每批试剂的质检
- 性能指标：

## 重复性

准确性（定量：回收率、标准物质等；定性：方法学比较等）

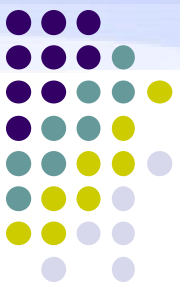
线性范围（定量）

分析特异性

## 测定下限

## 抗干扰能力





# 理想的操作方法

- 定量测定的精密度是测定组成步骤的变异

$$\text{和的平方根(SD)} = \sqrt{SD_a^2 + SD_b^2 + SD_c^2 + \dots}$$

上式中 $SD_a$ 、 $SD_b$ 、 $SD_c$ 是步骤a、b、c等（例如试剂准备、标本采集、核酸提取、扩增和产物检测等）的标准差







# 理想的试剂和操作方法

- 改善测定精密度的措施必须首先着重在最不精密的步骤上，应对试剂准备、标本收集、核酸提取、测定方法和仪器操作写出“标准操作程序” (SOP)



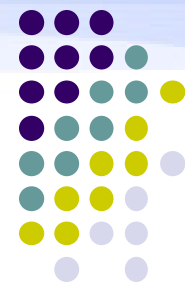
# 人员培训



- 方法原理
- 核酸扩增检测的关键环节
- 仪器设备使用、维护和校准
- 结果的分析、报告及进一步处理
- 质控的分析
- 知其然又知其所以然。

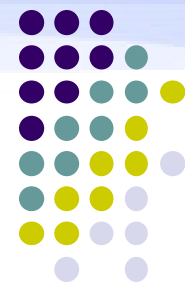


# 实验室内部培训存在的问题



- 人员少，实际上没有内部培训
- 形式
- 没有年度培训计划
- 没有培训记录



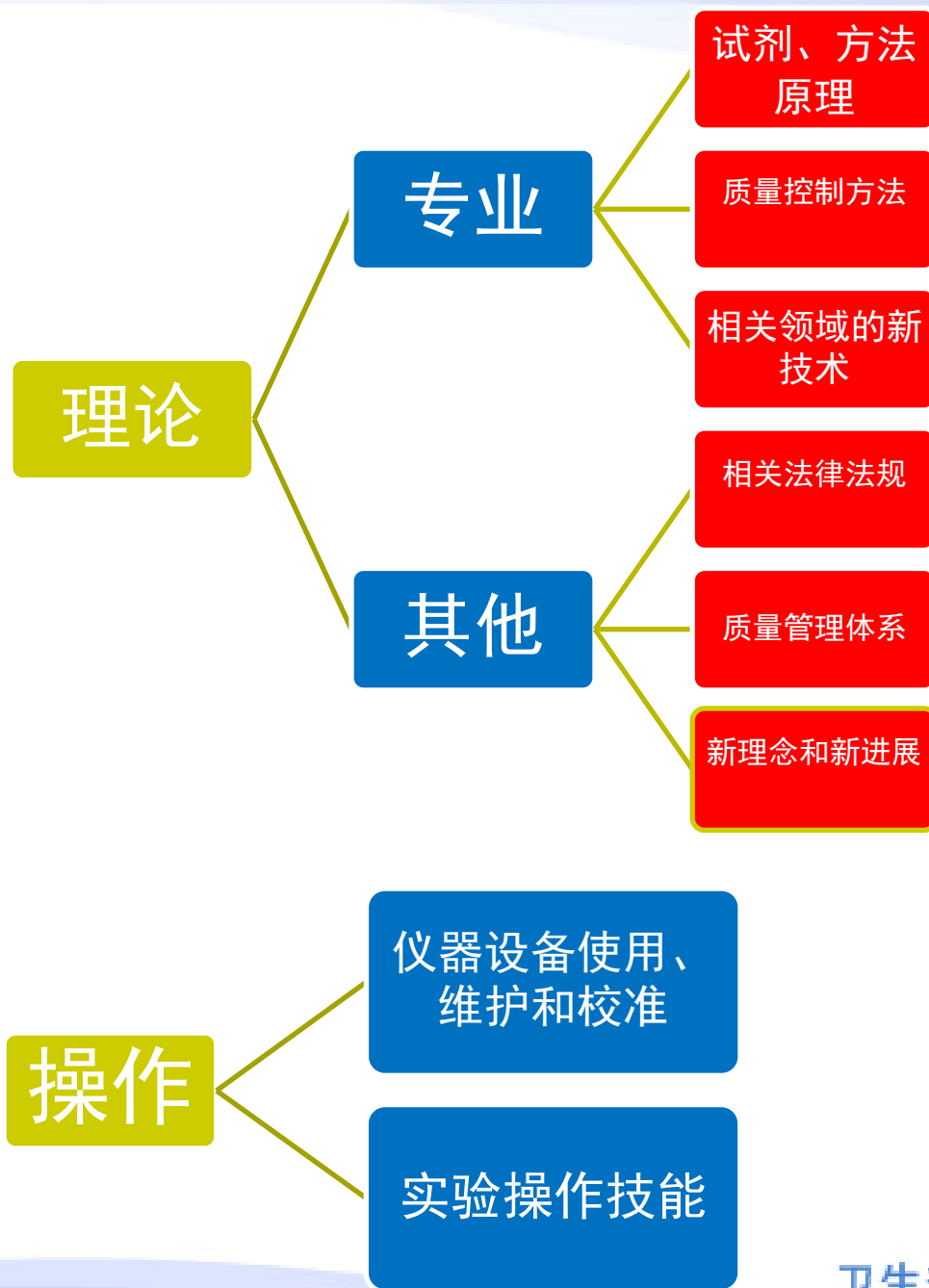


# 实验室人员内部培训的重要性

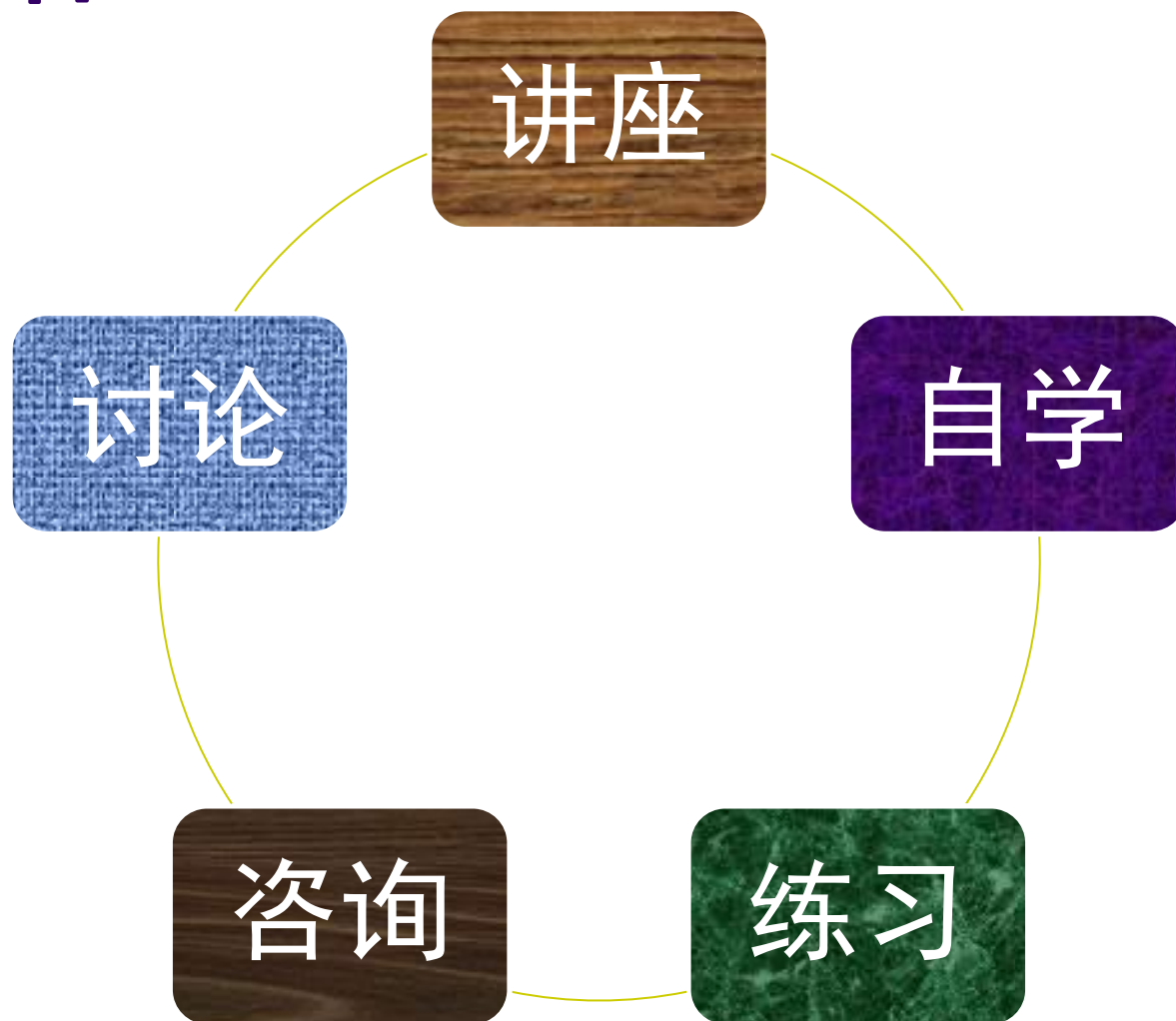
- 外部培训提供的是“理念”，是被动的，更多的是“学习”
- 内部培训是主动的，源于实践，高于实践，更多的是“思考”

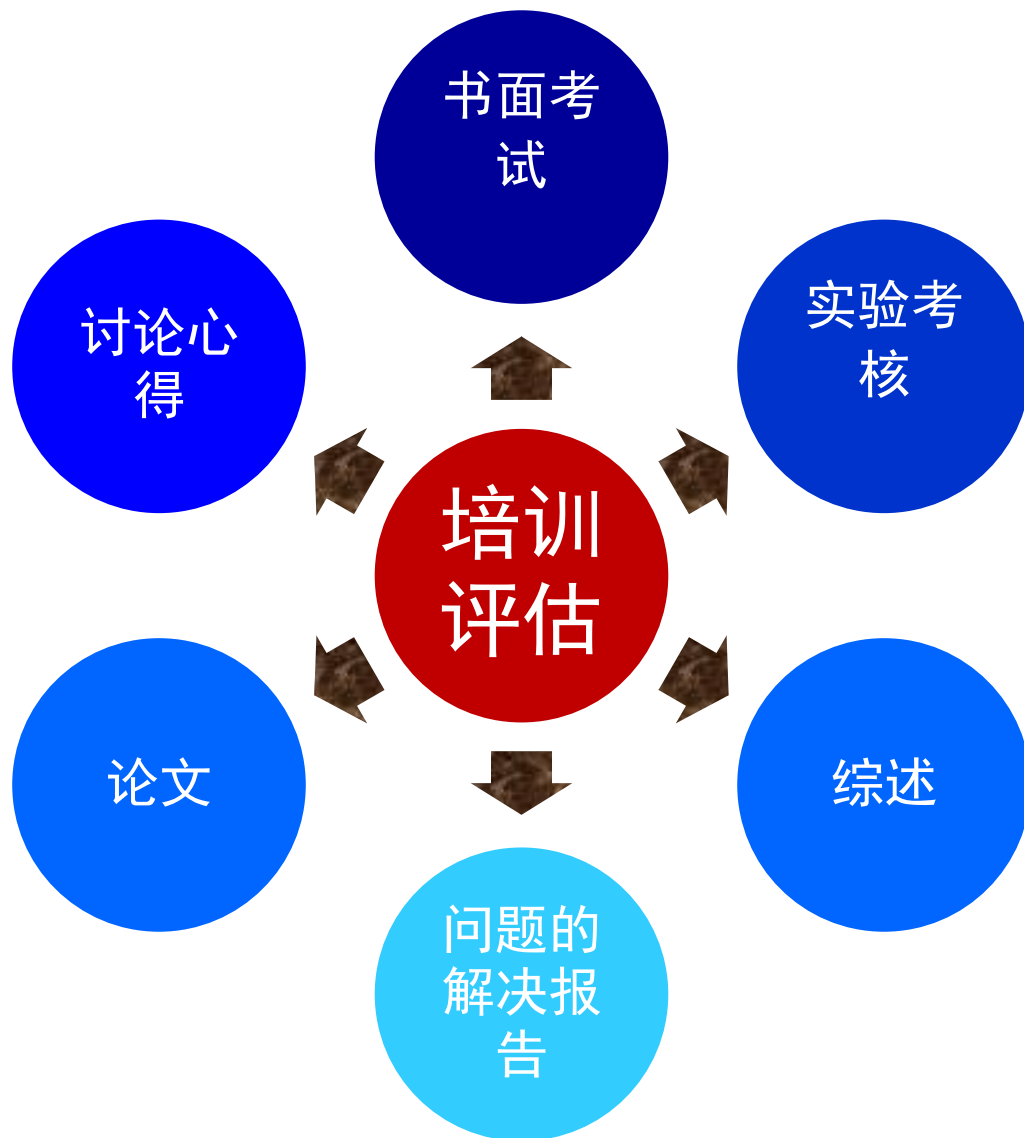
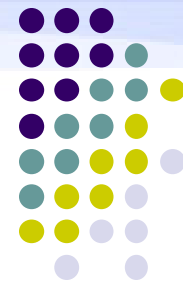


# 内部培训所涉及的范围

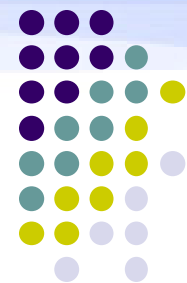


# 如何培训





# 室内质控方法

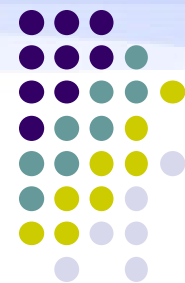


- 非统计学方法
- 统计质控方法





# 非统计学方法



- 在检测临床标本的同时，检测一定数量（与临床样本的数量相适应）的已知弱阳性（与试剂宣称的测定下限相适应）和阴性的质控样本
- 检测有效的质控判断方法：阳性检测为阳性（反应性），阴性检测为阴性（非反应性）。



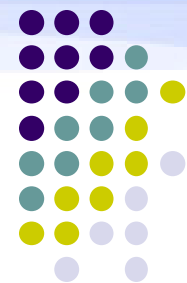


# SNP、突变等定性检测质控品从哪来？

- 日常检验阳性样本的收集
- **弱阳性质控品**：浓度为试剂盒检测限2-4倍的样本
- **较强阳性质控样本？**
- **阴性质控品**：日常检验的阴性标本



# 统计学质量控制



- 理想的室内质控样本的条件
- 测定中质控样本的设置、数量及排列顺序
- 统计学质控的特点
- 统计质控方法



# 存在的问题



- 概念不清
- 不知道具体怎么做
- 不会写室内质控的SOP
- 不知道如何选择室内质控物
- 不会分析室内质控的结果





# 理想的室内质控样本的条件

- 基质与待测样本一致；
- 所含待测物浓度接近试验的决定性水平；
- 稳定；
- 靶值或预期结果已定；
- 无已知的生物传染危险性；
- 单批可大量获得；
- 价廉

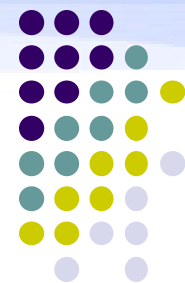


# 质控物浓度的选择



- **定量测定**：测定线性范围内的高、中、低三种浓度
- **定性测定**：接近方法测定下限（2-4倍）的浓度
- **阴性质控物**



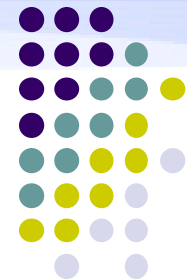


# 临床基因扩增检验IQC统计计算问题

- 可使用质控样本扩增后的IU/ml来进行统计计算，也可用其**对数值**进行。
- 由于基因扩增结果的原始数据通常很大，可能不呈正态分布，故使用其**对数值**来进行质控统计分析。



# 国际单位的由来

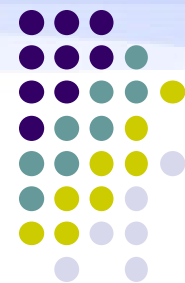


- **IU/ml**



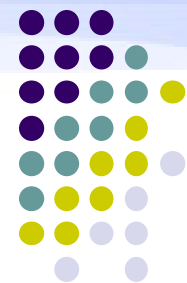


# 每次（批）测定质控物的数量及放置



- 标本数量如小于30，弱阳性和阴性质控各1份，标本数量增加，质控物数量相应按比例增加
- 均匀分散于临床标本中，与临床标本一同处理（核酸提取）
- 扩增时的排列顺序，可排于标准品或校准品之后，临床样本之前。但在扩增仪中的位置，不应永久性的固定的在一个孔，而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，可以尽可能的监测每一个孔的扩增有效性。





# 阴性质控样本的种类

- 阴性原血清样本
- 实验过程中带入的空管
- 仅含扩增反应混合液的管





# 阴性原血清样本的功能

- 监测实验室的以前扩增产物的“污染”
- 由实验操作所致的标本间的交叉污染。  
具体地说，如强阳性标本气溶胶经加样器所致的污染、强阳性标本经操作者的手所致的污染、使用翻盖离心管核酸提取时在较高温孵育时盖子崩开等
- 扩增反应试剂的污染。



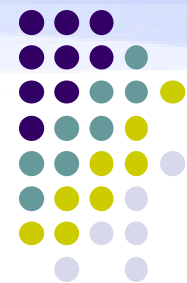
# 核酸提取过程中带入的空管



- 监测核酸提取过程中的**实验室“污染”**的存在（在整个实验过程中，开口放置于核酸提取的操作台面区域内，最后以水为基质，进行扩增）



# 仅含扩增反应混合液的管



- 监测试剂的“污染”

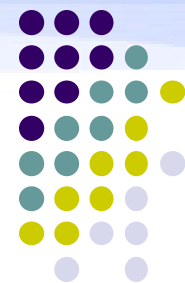


# 实验室是否发生污染的鉴别



- 可将一个或多个空管打开静置于标本制备区30～60分钟，然后加入扩增反应混合液同时以水替代核酸样本扩增，如为阳性，而上述仅含扩增反应混合液的管为阴性，则说明实验室以前扩增产物的存在。





# 质控规则的表达方式及定义

- 质控规则的表达方式
- 质控规则的功能
- 常用质控规则的符号及定义





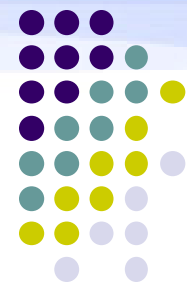
# 质控规则的表达方式

- 通常质控规则以符号 $A_L$ 来表示，其中A为质控测定中超出质量控制限的测定值的个数，L为控制限，通常用均值或均值 $\pm 1\sim 3SD$ 来表示。
- 当质控测定值超出控制限L时，即可将该批测定判为失控。
- 常用的 $1_{3s}$ 质控规则，其中1为原式中的A，3s为原式中的L，表示均值 $\pm 3s$ ，其确切的含义为：在质控测定值中，如果有一个测定值超出均值 $\pm 3s$ 范围，即可将该批测定判为失控。





# 质控规则的功能



- 简单地说就是用于判断测定批的失控还是在控。



# 常用质控规则的符号及定义



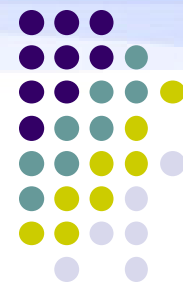
## 符 号

## 定 义

- $1_{2s}$  一个质控测定值超出 $\pm 2s$ 控制限。
- $1_{3s}$  一个质控测定值超出 $\pm 3s$ 控制限。
- $2_{2s}$  两个连续的质控测定值同时超出 $+2s$ 或 $-2s$ 控制限。
- $R_{4s}$  同一批测定中，两个不同浓度质控物的测定值之间的差值超出 $4s$ 控制限。
- $4_{1s}$  四个连续的质控测定值同时超出 $+1s$ 或 $-1s$ 控制限。
- $7_T$  七个连续的质控测定值呈现一个向上或向下的趋势变化。
- $10_X$  十个连续的质控测定值同时处于均值（ $\bar{x}$ ）的同一侧。



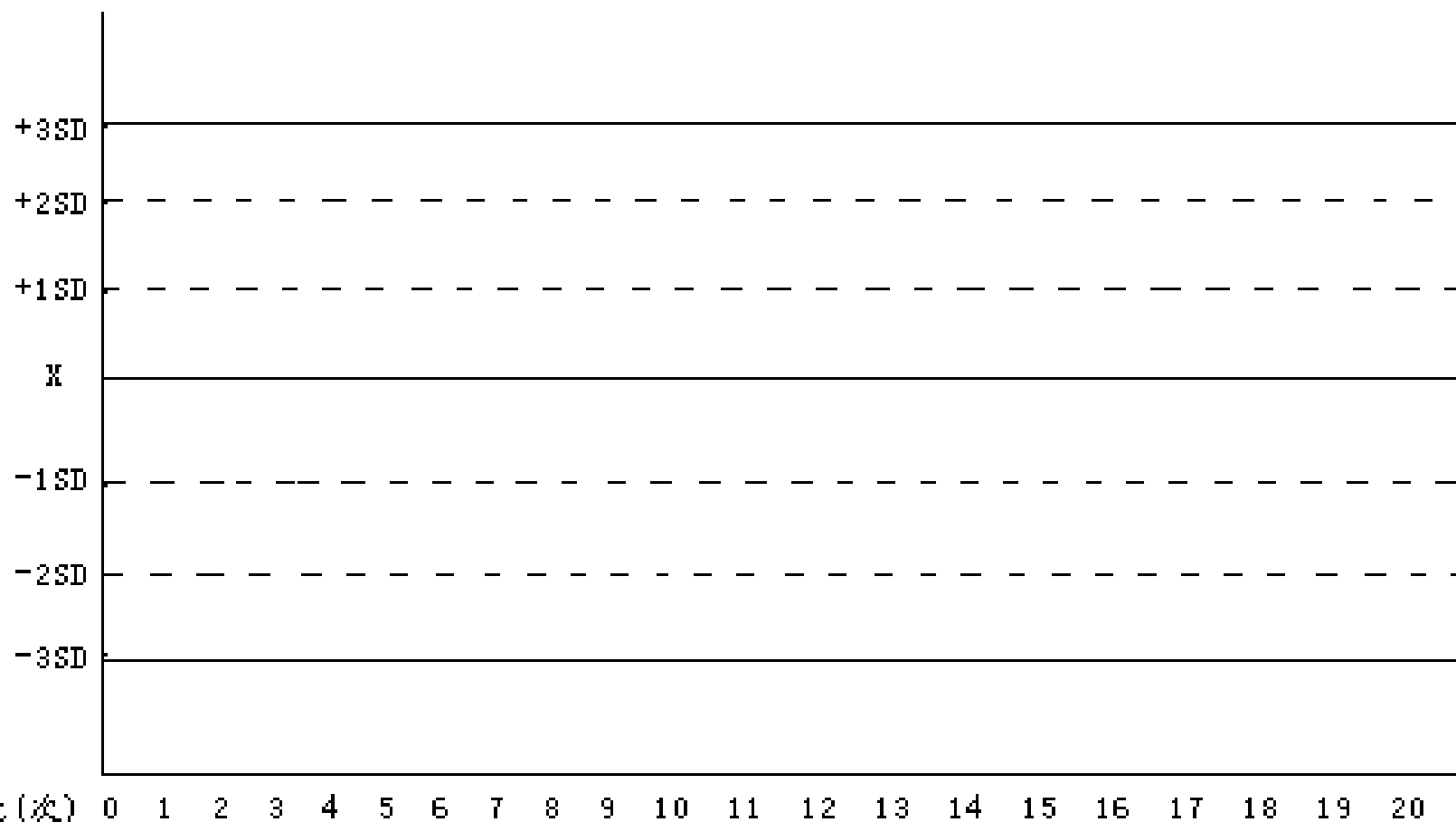
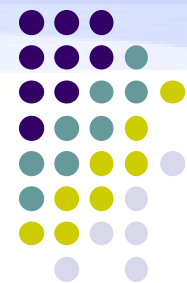
# Levey-Jennings质控图方法

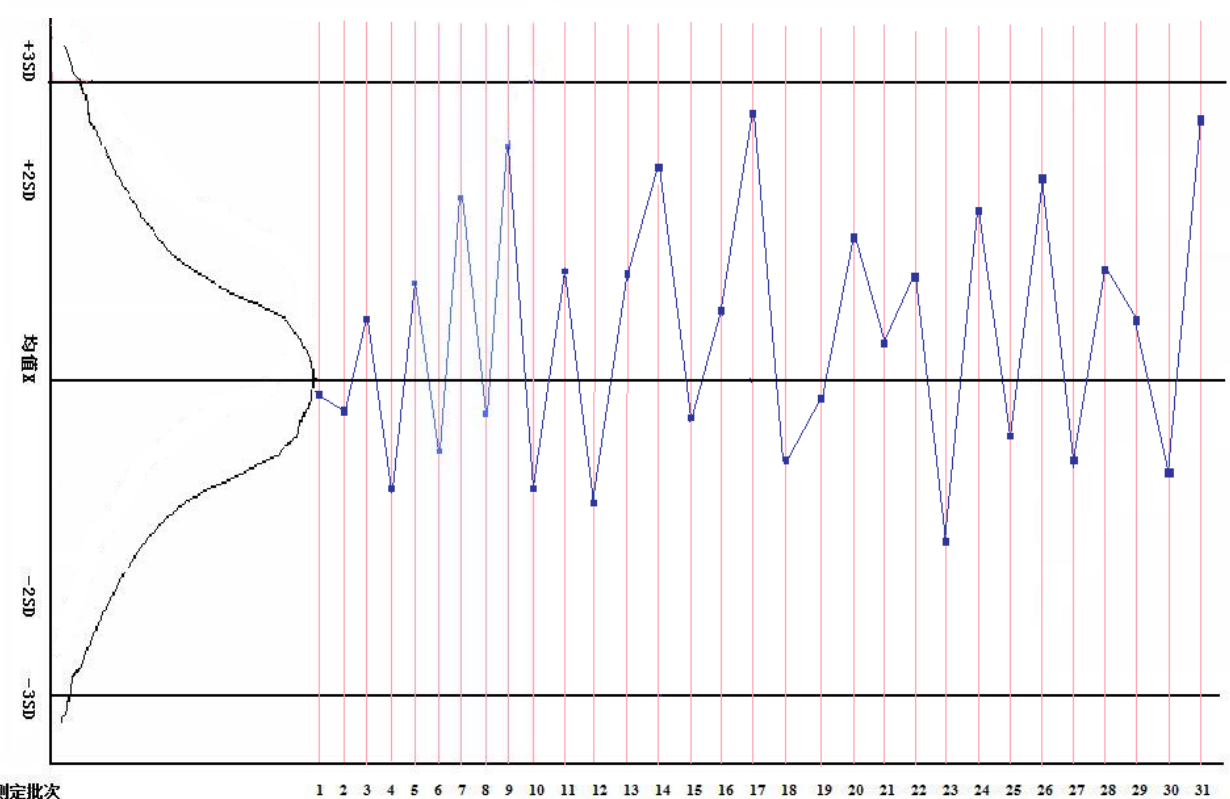
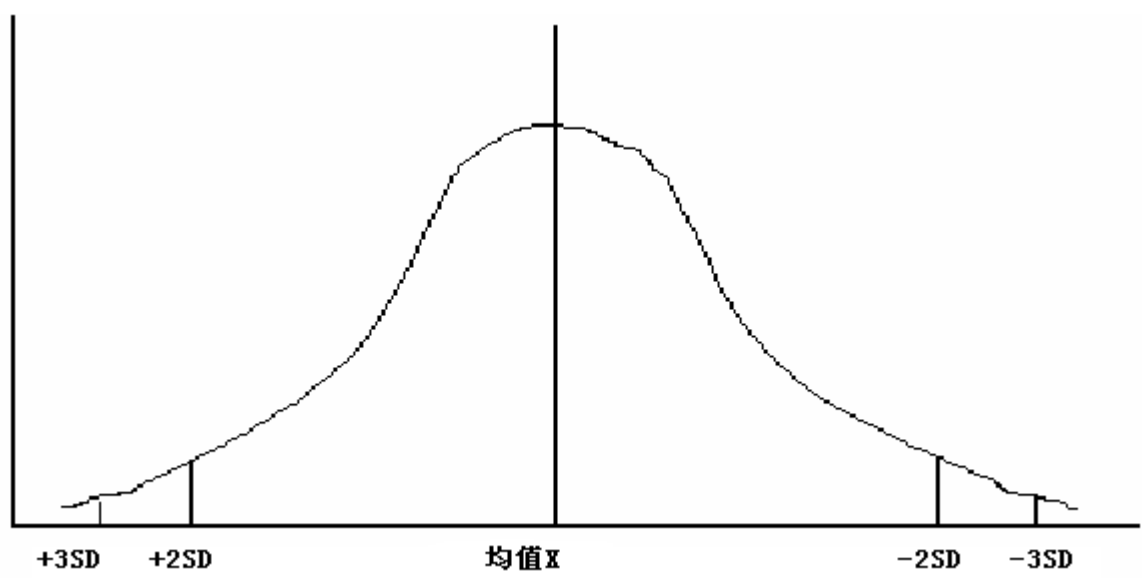
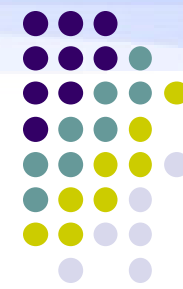


- 也称Shewhart质控图，是由美国的Shewhart于1924年首先提出，并用于工业产品的质量控制。
- 二十世纪五十年代初，Levey-Jennings将其引入临床检验的质量控制。经Henry和Segalove的改良，即为目前常用的Levey-Jennings质控图。



# Levey-Jennings质控图





# Levey-Jennings质控图

## 基本的统计学含义



- 稳定条件下，在20个IQC结果中不应有多于1个结果超过2SD（95.5%可信限）限度；在1000个测定结果中超过3SD（99.7%可信限）的结果不多于3个。
- 如以 $\pm 3s$ 为失控限，假失控的概率为0.3%。

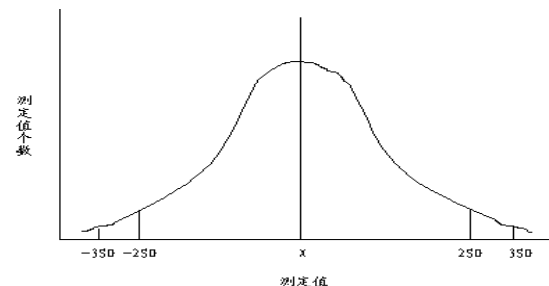
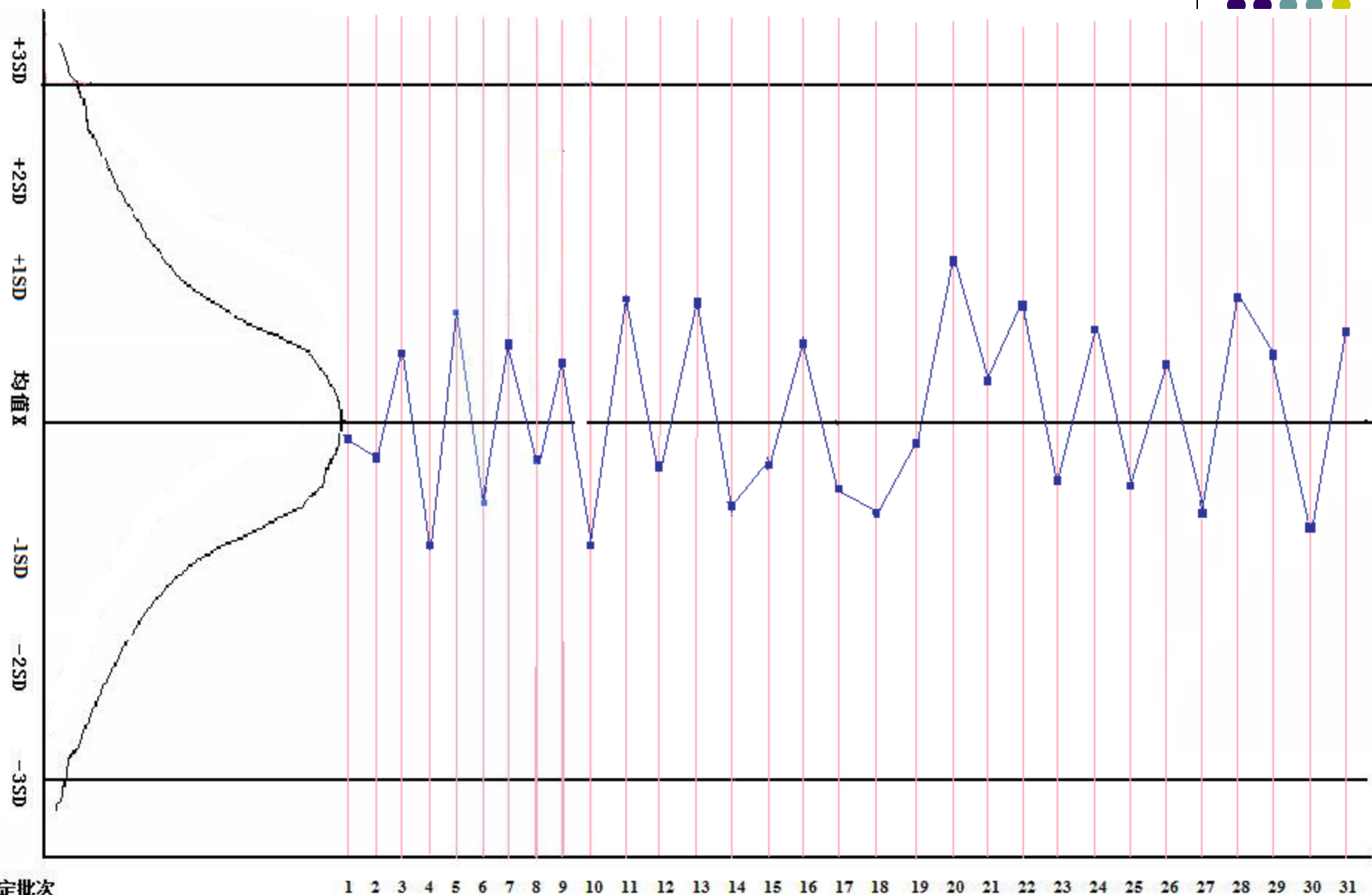


图2 测定值的正态分布图





测定批次



卫生部临床检验中心

National Center For Clinical Laboratories

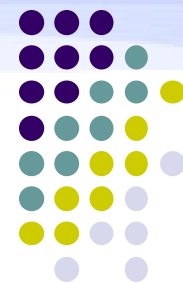
# “假阳性”的统计学室内质控方法



- 基于日常检验的阳性率比值(呈正态分布)
- 直接概率计算方法 (不呈正态分布)

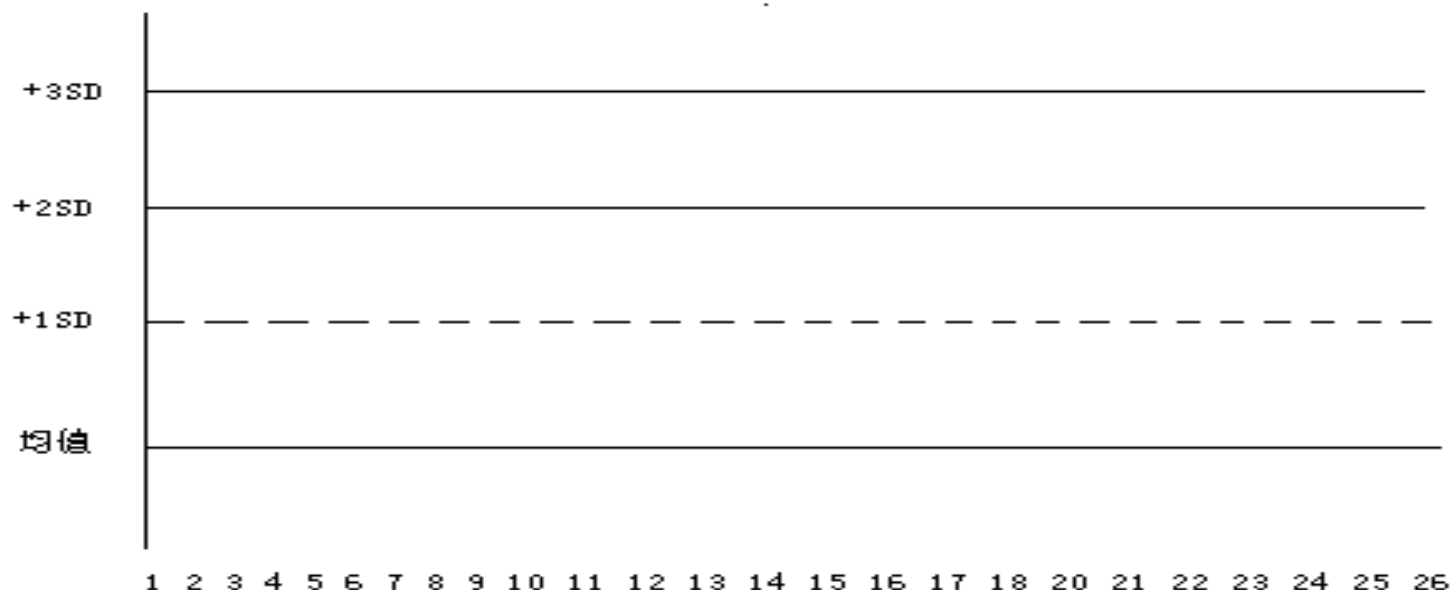






# 基于日常检验的阳性率比值

- 半Levey-Jennings质控图法





# 质控规则

- 当阴性质控样本为阳性时,不管阳性率测定比值为何,均为失控,所有阳性标本须重新测定,并增加一倍阴性质控样本。
- 如果阴性质控样本为阴性,某次测定阳性比值超出 $+3SD$ ,则为失控,为 $1_{+3S}$ 规则。本次结果阴性结果根据阳性质控样本的情况,决定是否可以发出,所有阳性样本结果不能发出,需查找出现阳性率增高的原因,并在增加一倍阴性质控样本的情况下重新检测。





# 可能的几种失控表现

- **曲线向上漂移**：提示出现污染，污染可能是由于某一天操作上的失误导致实验室被污染如标本泄漏，产物泄漏，试剂被污染等
- **向上的趋势性变化**：可能存在累积性的产物污染，实验室扩增产物逐渐累积，从而使病人结果的阳性率逐渐增高。此时实验室需要进行彻底清洁。





# 直接概率计算法

- 按统计学规律，一个事件发生的**概率小于5%**被称为**小概率事件**，即发生的可能性很小。
- 当一个**小概率事件发生时**，则可能有误差存在，有必要对其发生的**原因进行分析**。
- 对每天的**日常病人结果中阳性率出现的概率进行计算**，如果这种结果出现的概率小于5%时，则可判为失控。





# 根据二项式分布的概率计算

- 在一个实验室中某检测项目结果的**阳性率为 $p$** ,计算在 **$n$** 个样本中有 **$k$** 个阳性结果的概率。根据二项式分布的概率计算公式如下:

$$P(X=k)=n!/[k!(n-k)!]p^k(1-p)^{n-k} \quad (1)$$

其中 $n$ 为当次实验检测标本数,  $k$ 为阳性个数,  $p$ 为阳性率。

- **$P(X=k)<5\%$ 为失控**。此时, 阴性标本可以发出报告, 所有阳性标本在查清原因后重做。

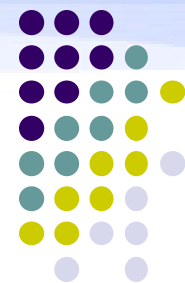




# 根据二项式分布的概率计算

- 如果一个实验室检测某项目，平常病人结果的阳性率为**10%**，即  $p=0.1$ ，在某一次检测**25 (n)** 个样本出现**6 (k)** 个阳性结果，19个阴性结果，则检测过程中是存在污染的可能性可通过下述方法计算。即计算在25个样本中出现6个或6个以上阳性结果的概率，此时的概率为1-（获得0个或1个或2个或3个或4个或多5个阳性结果的概率）即：
- $P(X=k) = 1 - [P(0) + P(1) + P(2) + P(3) + P(4)] = 1 - [(1-0.1)^{25} + 25(1-0.1)^{24}0.1 + 300(1-0.1)^{23}0.1^2 + 2300(1-0.1)^{22}0.1^3 + 12650(1-0.1)^{21}0.1^4 + 53130(1-0.1)^{20}0.1^5] = 0.0334$
- 则在这个实验室一次检测**25**个标本获得**6**个阳性结果的概率为**3.34%**，小于5%，属于小概率事件，即发生的可能性很小，可能有污染所致假阳性结果的可能。





# 根据泊松分布的概率计算

- 在临床检测中，一些检测项目如HCV RNA、CT、结核杆菌、淋球菌的**阳性结果率均较低**，这时虽然可以使用公式（1）计算概率，**但如果标本量很大**，使用泊松分布来估计二项式分布是一种更为简便的方法。
- 根据泊松分布，可使用下式计算概率：
$$P(X=k) = (np)^k e^{-np} / k! \quad (2)$$
- **$P(X=k) < 5\%$ 为失控**。此时，阴性标本可以发出报告，所有阳性标本在查清原因后重做。





# 根据泊松分布的概率计算

- 一个实验室中，某项目每次检测结果的阳性率约为**2% (p)**，则在**100 (n)**个样本中出现**8 (k)**个阳性结果的概率。
- 根据泊松分布，可使用公式 (2) 计算概率，此时 $n=100, p=0.02, k=8, np=2$ 代入公式 (2) 计算得

$$P(X=10) = 2^8 e^{-2} / 8! = 0.0009 = 0.09\%。$$







# 标本间交叉污染的概率计算

- 在个体化医学检测的一些项目中，**如果所有阳性结果的出现是连续性的，则可能存在标本间的交叉污染**，即阳性样本污染了它邻近的阴性样本，这种情况的概率计算公式如下：

$$P=(n-r+1)/[n!/r!(n-r)!] \quad (3)$$

其中**n**为当次实验检测标本数，**r**为连续出现阳性或阴性的个数。

- 当某次实际测定标本连续阳性的概率大于所计算的概率，则判为失控**。阴性标本结果可以发出，阳性标本要考虑标本间交叉污染的问题。



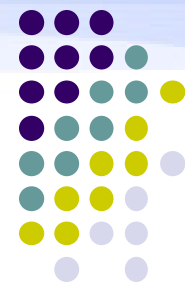


# 标本间交叉污染的概率计算

- 如在一次检测100个标本的某项目检测中，所有**2个阳性结果连续出现的概率**为：  
$$P=(100-2+1)/[100!/2!(100-2)!]=99/4950=0.02$$
 **概率为2.0%。**  
因此，如在100个标本中，连续出现两个为阳性次数有3次，即概率为3.0%，则为失控。
- 而在一次检测100个标本，所有**3个阳性结果连续出现的概率**为：  
$$P=(100-3+1)/[100!/3!(100-3)!]=98/161700=0.0006$$
 **概率为0.06%。**  
因此，如果如在100个标本中，连续出现三个为阳性次数有1次，即概率为1.0%，为失控。



# 失控处理的20字原则



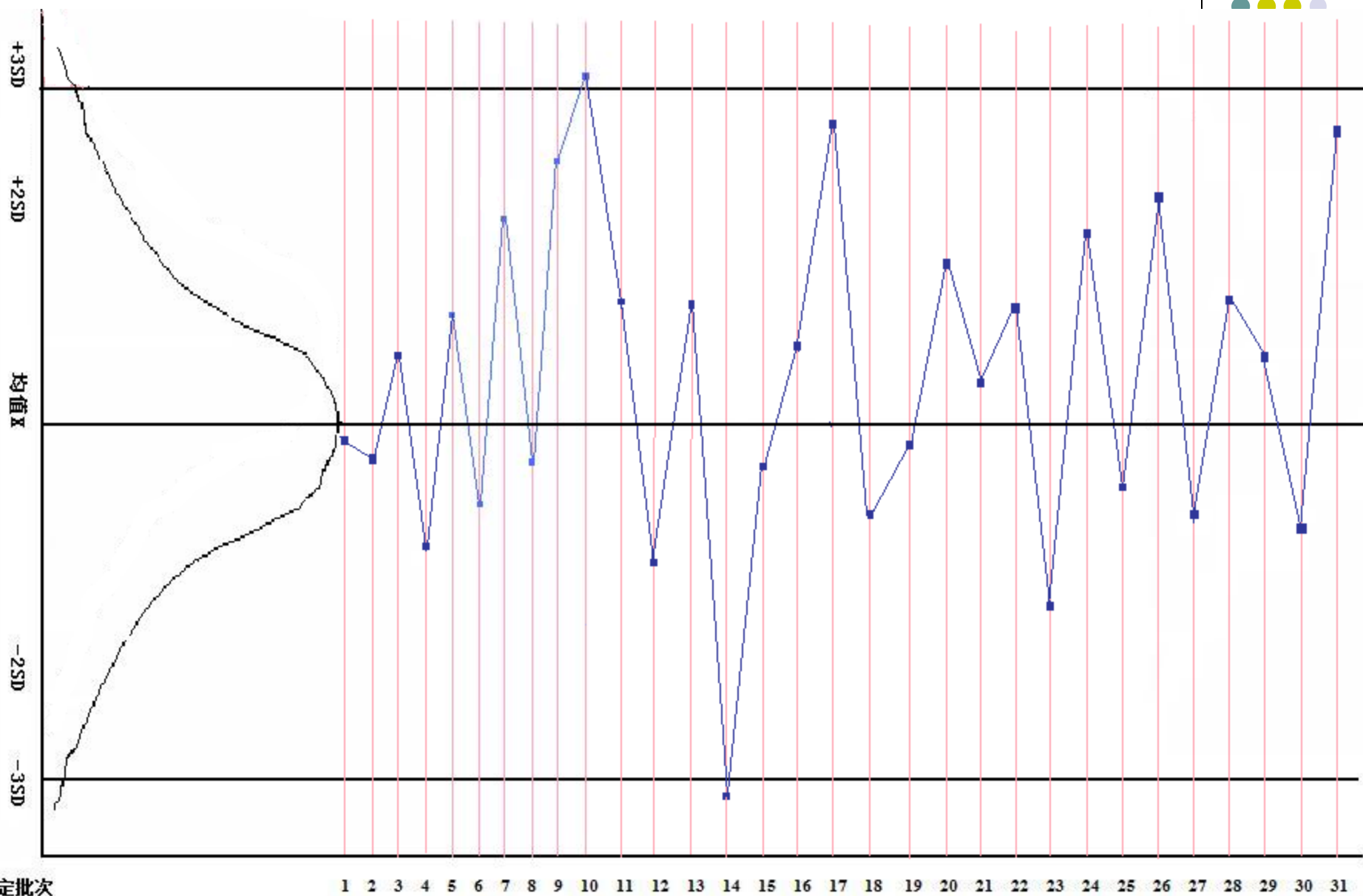
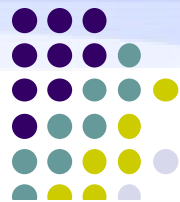
- 查出异因
- 采取措施
- 保证消除
- 不再出现
- 纳入标准

## 预防！

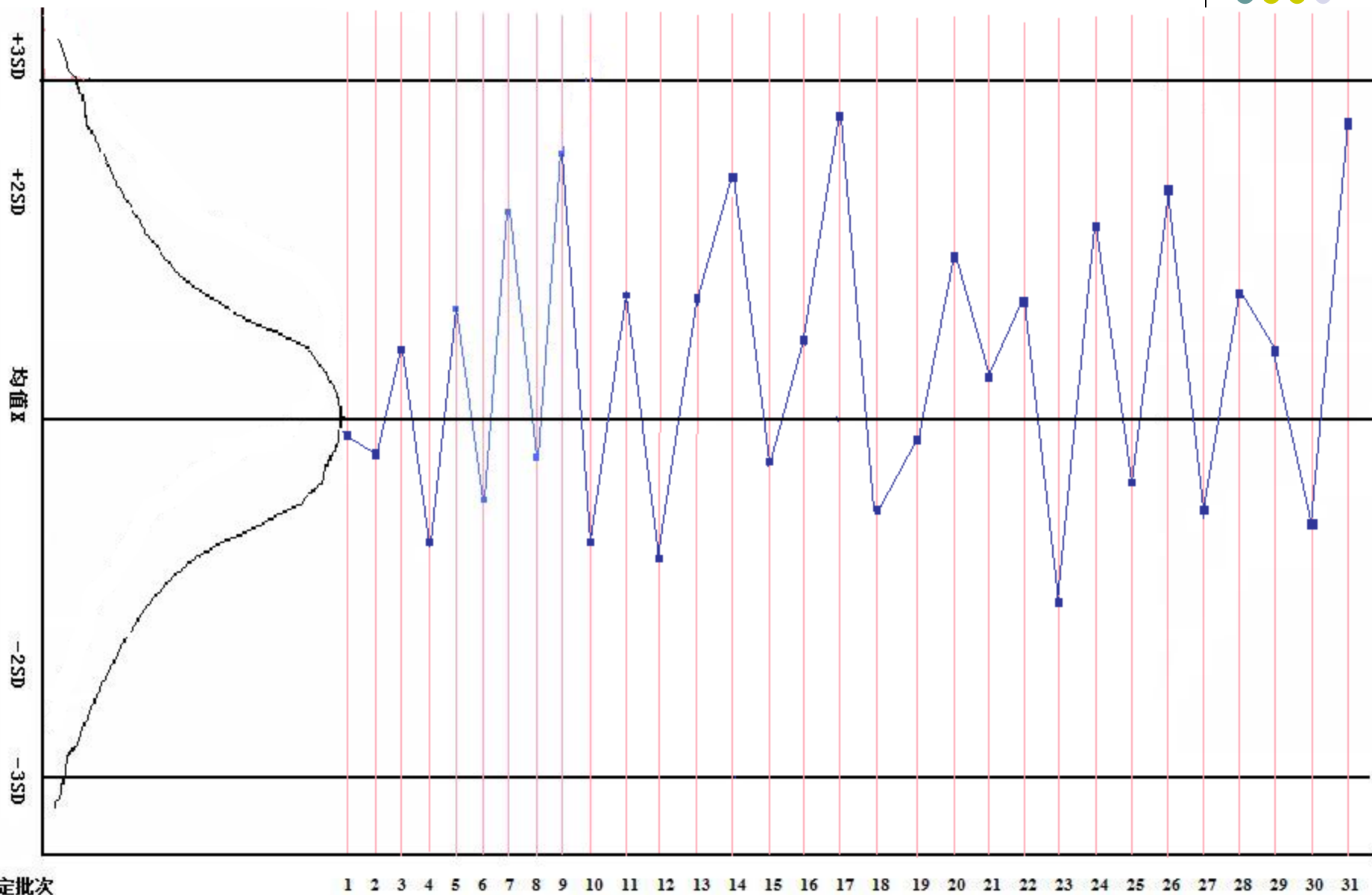
防止同样的问题出现第二次是质量管理的“精髓”！



# 分析用质控（图）



# 控制用质控（图）

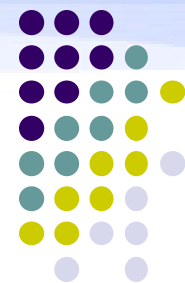


# 室内质量控制的评价



- IQC是一个集体活动，不光是对实验室一次测定的有效性的判断，也反应了实验室测定趋势的变化。
- IQC的失控不能做为处罚的依据，应建设性的找出失控的原因，针对其采取措施加以改进。
- 对IQC应定期进行评价。





# 阳性质控样本失控的常见原因

- **核酸提取中的随机误差**。如核酸提取中的丢失、有机溶剂的去除不彻底、标本中扩增抑制物的残留、所用耗材如离心管有PCR抑制物等。
- **仪器的问题**。如扩增仪孔间温度的不均一性、孔内温度与所示温度的不一致性等。
- **试剂的问题**。如Taq酶和/或逆转录酶的失活、探针的纯度及标记效率和核酸提取试剂的效率等。



阳性质控样本测定结果偏低或为阴性

结果偏低

阴性

观察临床标本情况

临床标本中  
无强阳性

临床标本中  
有较强阳性

临床标本  
中有阳性

临床标本  
全为阴性

随机误差

所用离  
心管含  
抑制物

Taq 酶  
活性降  
低

核酸提  
取试剂  
效率低

核酸提  
取中靶  
核酸丢  
失

核酸提  
取中抑  
抑物残  
留

核酸提  
取试剂  
混入

扩增仪  
孔间温  
度差异

Taq 酶 或  
逆转录酶  
失活

更换进  
口离心  
管

更 换  
Taq 酶  
再检测

更换核  
酸提取  
试剂

重新提取或已知浓度DNA  
在同一孔内扩增

结果正常

结果仍低

所有标本重新检测

检测质控样本及3~5份已  
知阳性样本

质控样本  
测定正常  
且阳性样  
本有些值  
增加

质控及已  
知阳性样  
本测定仍  
异常

按系统误  
差途径分  
析

进行扩增  
仪孔温度  
校准后再  
检测



卫生部临床检验中心

National Center For Clinical Laboratories





# 避免假阴性的措施

- 纯化核酸
- 标本重复双份测定
- 稀释标本
- 使用“内质控” (Internal Control, IC)

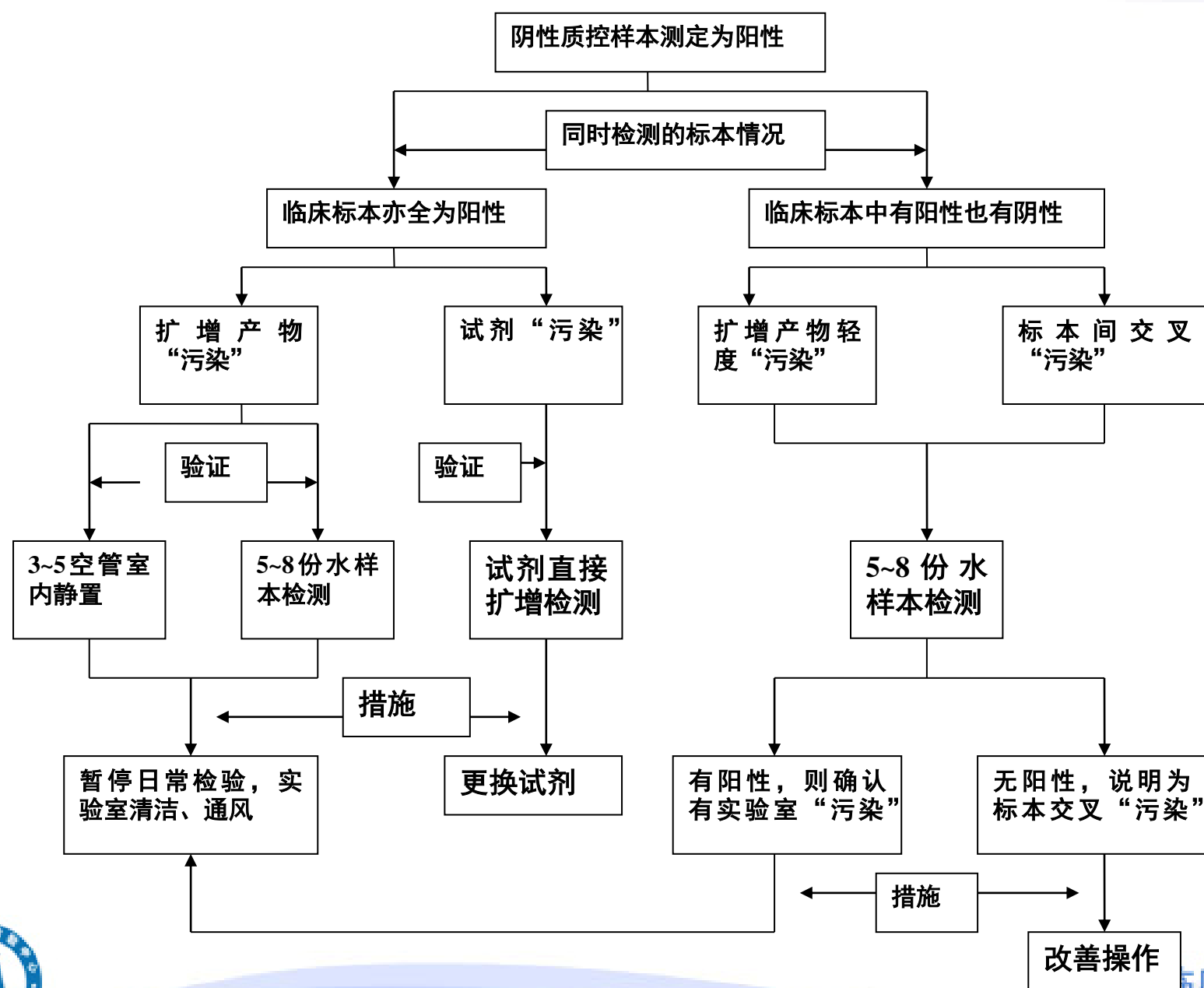
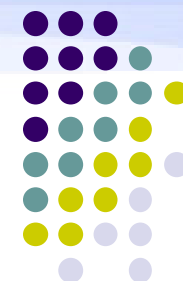


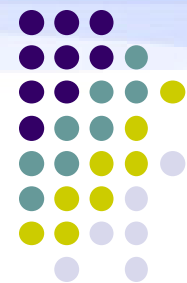


# 阴性质控样本的常见失控原因

- 扩增产物的“污染”
- 临床标本的核酸提取过程中发生的标本间的交叉“污染”







# 一个临床PCR实验室对全 年室内质控结果的分析举例



## 2008 年 PCR 室

### HBV DNA 荧光定量检测的室内质控总结



- 一. 我室的室内质控程序是严格按照 SOP 文件去操作的。
- 二. 第一批室内质控品是上海科华生物工程股份有限公司提供的。室内质控批号 200703。计算此质控品 20 次检测结果的对数值平均值, 作为本批质控品的靶值。 $\bar{X}=5.63$ ,  $SD=0.22$ ,  $CV=3.8\%$ , 绘制我室室内的质控图。

2008 年 1 月至 9 月份室内质控血清测定结果

| 时间         | $\bar{X}$ | SD   | CV%  |
|------------|-----------|------|------|
| 2008 年 1 月 | 5.75      | 0.19 | 3.32 |
| 2008 年 2 月 | 5.63      | 0.22 | 3.8  |
| 2008 年 3 月 | 5.60      | 0.25 | 4.5  |
| 2008 年 4 月 | 5.61      | 0.22 | 3.94 |
| 2008 年 5 月 | 5.55      | 0.23 | 4.19 |
| 2008 年 6 月 | 5.46      | 0.49 | 8.9  |
| 2008 年 7 月 | 5.52      | 0.34 | 6.2  |
| 2008 年 8 月 | 5.51      | 0.23 | 4.2  |
| 2008 年 9 月 | 5.51      | 0.22 | 4.0  |

第二批质控品是上海科华生物工程股份有限公司提供的。室内质控批号 200802。用“即刻法”质控方法测定前 20 次质控品检测值的变化,  $SI_{上限}$  和  $SI_{下限}$  值均 $<$ 附表表中  $n2s$  对应的值时, 说明质控测定值的变化在  $2s$  之内, 是可以接受的。计算 20 次检测结果的对数平均值, 作为本批质控品的靶值。275003017  $\bar{X}=5.08$ ,  $SD=0.23$ ,  $CV=4.8\%$ ; 275003015  $\bar{X}=5.07$ ,  $SD=0.24$ ,  $CV=4.7\%$ 。绘制我室的质控



一. 图。

2008 年至 10 月至 12 月室内质控血清测定结果

| 时间          | $\bar{X}$      | SD   | CV% |
|-------------|----------------|------|-----|
| 2008 年 10 月 | 5.09           | 0.19 | 3.7 |
| 2008 年 11 月 | 275003017 5.14 | 0.23 | 4.4 |
|             | 275003015 5.07 | 0.23 | 4.6 |
| 2008 年 12 月 | 275003017 5.08 | 0.21 | 4.1 |
|             | 275003015 5.16 | 0.17 | 3.3 |

2008 年室内质控总结表

| 时间          | $\pm 1SD$ | $\pm 2SD$ | $\pm 2SD \sim \pm 3SD$ | 出 $\pm 3SD$ | 检测次数 |
|-------------|-----------|-----------|------------------------|-------------|------|
| 2008 年 1 月  | 32        | 39        | 1                      |             | 40   |
| 2008 年 2 月  | 18        | 31        |                        |             | 31   |
| 2008 年 3 月  | 26        | 43        | 4                      |             | 47   |
| 2008 年 4 月  | 28        | 40        | 1                      |             | 41   |
| 2008 年 5 月  | 30        | 36        | 4                      |             | 40   |
| 2008 年 6 月  | 24        | 36        | 3                      | 2           | 41   |
| 2008 年 7 月  | 39        | 45        |                        | 4           | 49   |
| 2008 年 8 月  | 25        | 37        | 4                      |             | 41   |
| 2008 年 9 月  | 31        | 41        | 3                      | 1           | 45   |
| 2008 年 10 月 | 41        | 49        |                        |             | 49   |
| 2008 年 11 月 | 32        | 42        | 2                      |             | 44   |
| 2008 年 12 月 | 43        | 50        |                        | 1           | 51   |

2008 年 1 月至 12 月检测 HBV DNA 定量次数为 519 次。所有测定值

处于均值  $\pm 1s$  范围内的概率为 0.71，处于均值  $\pm 2s$  范围内的概率为

0.94，在 100 个 IQC 结果中有 4.2 个结果超过  $2s$  限度。有 8 次结果



超出了 3s 限度。

四、阳性质控品失控（4月3、8、21日；5月21、22日、6月2、4日7次失控出-3SD）2003年我室做室内质控以来，我们的阳性质控品基本上是放在一个固定的（E2）孔内进行检测。2007年在杭州举办的《全国临床PCR实验室室间质评总结暨学术研讨会》上，李金明主任讲到，阳性质控品应放在不同孔内进行检测，使得在一定时间内，可以尽可能的监测每一孔的扩增有效性。

我们从2008年3月24日至6月4日将阳性质控品放在不同孔内进行检测，检出D2孔阳性质控品对数值出-3SD。观察3月24日检测的88份标本中，有较强阳性标本，阳性率48%，与已往标本阳性检出率基本相符。首先排除了系统误差（所用离心管含抑制物，Taq酶活性降低，核酸提取试剂效率低）我们在D2孔重新检测一管阳性质控品仍出-3SD，同时检测了已知的3份阳性份标本，结果基本一致。我们分析是D2孔本身的问题，请教了科华工程师，根据他的提示，我们用棉签沾上蒸馏水对D2孔进行清洁后再进行阳性质控品检测，结果恢复正常。孔内有灰尘或异物可造成背景荧光偏高，会影响我们检测数据的准确性。这次检出D2孔、B3孔、C5孔、D10孔、E10孔、D11孔、H11孔、共7个孔失控，处理措施同前。上述7次失控均有详细的失控记录。通过阳性质控品放在不同孔内进行检测的确能发现实验中存在的问题，很有实用意义。我们目前还没有做到采用高、中、低3种浓度的阳性质控样本。





1. 2008年6月14日(12次)检测阳性质控品的对数值 3.01 出-3SD
2. 2008年6月17日(24次)检测阳性质控品的对数值 4.57 出-3SD
3. 2008年7月4日(8)检测阳性质控品的对数值 4.3 出-3SD.
4. 2008年7月9日(15次)检测阳性质控品的对数值 4.5 出-3SD.
5. 2008年7月22日(34次)检测阳性质控品的对数值 4.77 出-3SD.
6. 2008年7月24日(38次)检测阳性质控品的对数值 4.9 出-3SD.
7. 2008年9月16日(24次)检测阳性质控品的对数值 4.87 出-3SD.
8. 2008年12月30日(49次)检测阳性质控品的对数值 4.19 出-3SD.

分析原因及处理措施见失控记录.

(注:6月14日~7月24日在E12孔阳性质控失控。1.重新检测阳性质控品,检测结果恢复正常。2.挑选3~4份已知阳性标本,检测基本相同。我们认为该批质控品已使用一年半时间,可能保存出现了问题,因奥运期间试剂禁止空运,为减少重复,每批检测做两个质控品。

#### 一. 阴性质控品失控

1. 2008年4月9日,阴性质控品(原血清标本)检测值 5.31  
 $\times 10^2 \text{copies/ml}$ 。

2. 2008年10月16日,阴性质控品(原血清标本)检测值 8.81  
 $\times 10^4 \text{copies/ml}$ 。







## 分析原因:

1. 观察本次检测结果, 88 份 临床标本中有阳性标本也有阴性标本, 与我室以往的阳性检出率基本相符。
2. 水对照管与试剂对照管, 均为阴性。
3. 阳性标准品梯度曲线平滑均匀, 斜率、截距和相关系数三个参数的数值均在范围内。
4. 阴性质检标本测定为阳性, 是扩增产物轻度“污染”, 还是标本间交叉“污染”。

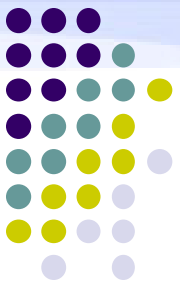
## 处理措施:

1. 当日结果暂时不发;
2. 重新打开一瓶相同批号的阴性质控品, 检测结果阴性。
3. 重新检测一份水标本, 检测结果阴性。
4. 将所有阳性标本重新检测, 结果基本相符。
5. 当日结果可以发出。

2008 年阴性质控出现两次失控, 4 月 9 日阴性质控失控可能是标本间交叉“污染”所致; 10 月 16 日可能是错加了标本所致。



# 全面质量管理的工作循环:PDCA



4个阶段，8个步骤

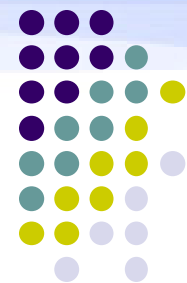
- 第一阶段（**P**lan）有4个步骤：

分析并找出问题；找出问题产生的原因；确定最主要原因；制定措施计划。

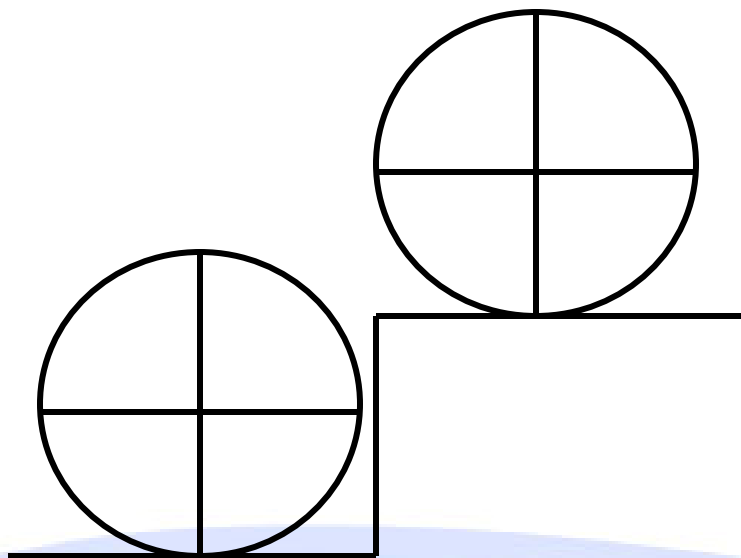
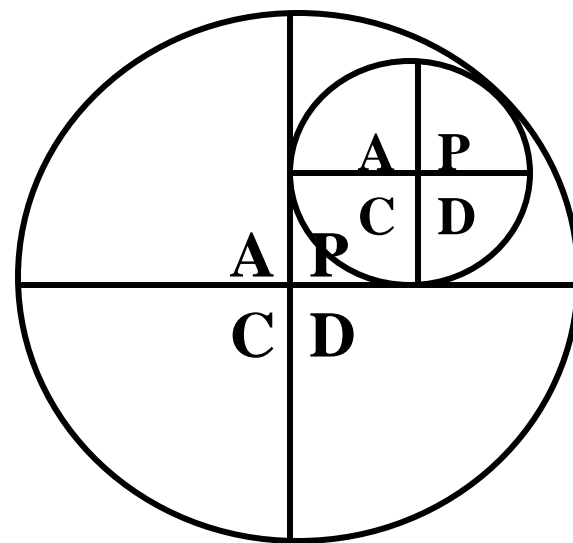
- 第二阶段（**D**o）有1个步骤：执行计划
- 第三阶段（**C**heck）有1个步骤：检查计划执行情况。
- 第四阶段（**A**ction）有2个步骤：总结、制定标准（修改质量文件），以巩固提高；发现新出现的问题，转入下一**PDCA**循环。



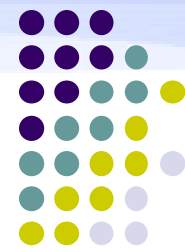
# PDCA的特点



- 小环合成大环
- 不断循环，阶梯式上升
- “A”是改进的动力之源



# HBV DNA质控失控发现质控结果超出均值-3SD)



## Plan

- **问题**：质控品结果偏低
- **原因**：PCR仪扩增孔内有灰尘所致，说明仪器设备日常清洁维护不到位
- **措施**：修改原有的仪器设备维护SOP，加大扩增孔维护频度。

## Do

- 按照新的室内质控SOP执行

## Check

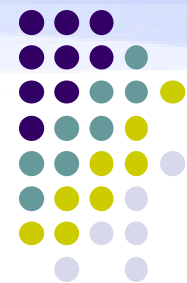
- 是否有同样的失控发生？
- 是否执行了新SOP？

## Action

- 总结，并将更改的扩增仪孔内清洁频度要求写进正式的扩增仪维护SOP。
- 是否出现新的问题？



# 室间质评的失控分析



- 定量测定：结果偏低或偏高
- 定性测定：假阳性或假阴性



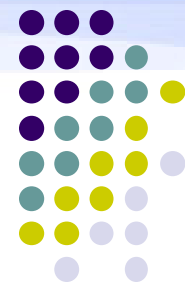
# 失控的原因



- 仪器
- 试剂（包括标准品系列）
- 消耗品
- 操作
- 实验室管理如“污染”（假阳性）



# 投诉的处理及分析



- 投诉的**来源**:

患者

合作方或客户

临床医生

- 投诉的**内容**:

结果的正确性

结果报告

服务态度



# 例1：患者投诉

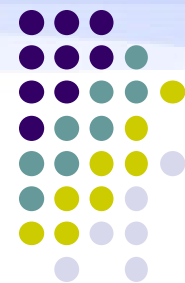


- 在你们实验室检测HBV DNA结果为 $2.0 \times 10^5$  IU/ml，但在另外一个医院检测的结果为 $<500$  IU/ml，是怎么回事？





# 处理及分析



- 原始记录的复审（包括质控、当批实验中阳性标本的检出情况）
- 保存标本的再检测
- 分析结论：（1）实验室检测无错误；（2）假阳性结果。
- 假阳性结果的管理应对措施：改进实验室管理（加强日常清洁，写入管理程序）；改进操作（人员操作培训，改进操作SOP）



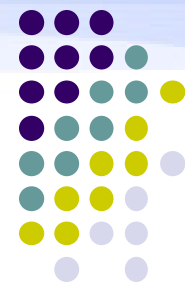
# 例2：患者投诉



- 我昨天在你们检验科做了一个HBV DNA检测，答应是昨天下午下班之前出结果，但到现在我还没看到结果，是怎么回事？



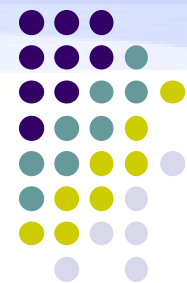
# 处理及分析



- 查标本及记录：漏做？结果有疑问，待重做或正在重做？
- 分析结论：（1）漏做及其原因（如标本未找到）；（2）结果有疑问。
- 措施：（1）如为漏做，原因是标本未找到，则分析是为什么？是标本接收者，将标本归为其他检验项目？还是标本传递过程中丢失？则完善标本接收、运送的SOP，并对实验室人员内部培训，要求严格遵守SOP。（2）结果有疑问，需重做未报。则完善报告的SOP，对这种情况进行规定，可给出一个报告，告诉患者需要重做。



# 例3. 医生投诉



- 我昨天给XXX患者开的是一个HCV RNA检验项目，而你们报的是HBV DNA结果，是怎么回事？



# 处理及分析



- 查原始检验申请单及实验记录
- 核查结果:(1)实验室人员没注意, 将HCV RNA弄成了HBV DNA; (2) 实验室人员报错结果。
- 措施: (1) 完善检测前标本及项目核对 SOP, 增加一名核对人员; (2) 完善结果报告程序, 报告审核人应起到真正的审核作用, 可完善设计报告发出之前的审核, 可设计一个更完善的报告发出“审核表”。



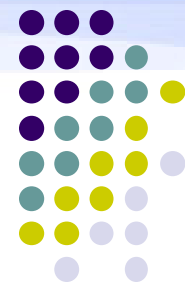


# PCR实验室最有效的防“污染”措施

- 实验室的“通风”
- 次氯酸钠溶液的使用
- 1mol/L HCl溶液的使用
- 紫外照射
- 70%乙醇溶液的使用



# IQC的局限性



- IQC可能测不出的误差

- **测定前**

样本鉴定不对  
样本贮存中变质

- **测定中**

样本吸取不对  
试剂加入不对

- **测定后**

结果记录错误

- 此类误差的发生率在不同的实验室有所不同，一般要求小于 0.1%，且应均衡地分布于测定前、测定中和测定后的不同阶段。





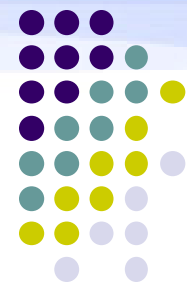
# IQC程序编写普遍存在的问题

- ①责任人不清。
- ②质控物的来源及浓度不清或不全，并且通常没有说明阴性质控物的来源。有些是自制，但制备方法不规范，没有任何的质量检验，定量结果没有溯源性。
- ③没有明确所选用的质控方法。对前20次的测定的室内质控没有解决方法。
- ④没有明确的失控判断标准，只是做了一些失控的含糊叙述。并且一般都没有阴性失控的判断方法。
- ⑤没有失控后的分析及处理措施。





# 室间质量评价 (EQA)



- EQA

- Proficiency testing (PT)



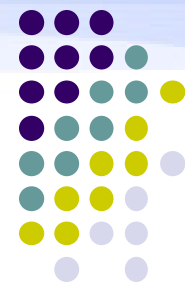
# EQA 的程序设计



- 确定质评方案,定期发放质评样本;
- 要求参加质评实验室报告结果的单位要一致,以便于统计;
- 报告要清楚、简洁;
- 要求参评实验室在测定EQA样本时,要以与常规样本完全相同的方式测定;
- 对测定方法、试剂及仪器等归纳总结;
- 对参评实验室的测定要有评价;
- EQA报告要迅速及时。



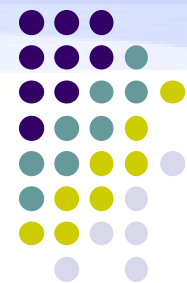
# EQA质评样本



- 样本特征与患者样本应尽量一致
- 样本浓度与试验的临床应用相适应
- 在样本发放的条件下稳定
- 不存在不可避免的传染危险性



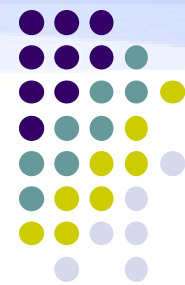
# EQA靶值



- 定性测定，应为明确的阴性或阳性
- 定量测定，则提供参考方法值或参加实验室的修正均值或参考实验室均值或方法或归组的方法均值



# EQA对测定技术的评价



- 使用适当的统计学方法
- 全面地对方法、试剂和单个参评实验室测定技术进行评价
- 指明严重误差
- 适当时评价测定的其它方面（如测定干扰）。

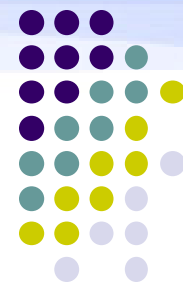


# EQA的局限性



- 参评实验室没有同等的对待EQA样本和患者样本
- 可能会妨碍给出不同结果的改良方法的发展
- 在不同的EQA程序中，对实验室的评价可能不同





# 谢谢！

