

临床实验室荧光原位杂交技术的质量管理*

费 阳, 王 薇, 王治国 (北京医院卫生部临床检验中心, 北京 100730)

摘要: 荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)技术在很多临床实验室已经成为一项常规技术了。它可以用于检测对传统细胞遗传学分析来说太小而不能识别,但是对于标准脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)测序来说太大而不能检查的遗传畸变。如今, FISH 不仅用于医学遗传学,也在很多其它领域包括神经科学、进化生物学、微生物学、病理学、毒理学和生殖遗传学内使用。FISH 技术的迅速发展使得开展 FISH 的临床实验室对 FISH 的质量要求越来越高。该文对 FISH 的质量管理进行了具体描述,旨在提高实验室检测结果的准确度和可靠性,从而提高临床满意度并且改善病人预后。希望能够给开展 FISH 的临床实验室提供參考。

关键词: 细胞遗传学; 荧光原位杂交; 质量管理

中图分类号: Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)02-149-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2015. 02. 048

Quality Management of Fluorescence in Situ Hybridization Methods for Clinical Laboratories

FEI Yang, WANG Wei, WANG Zhi-guo (National Center

for Clinical Laboratories, Beijing Hospital of the Ministry of Health, Beijing 100730, China)

Abstract: FISH technology has become a routine technique in many clinical laboratories. It can be used for the examination of genetic aberrations that are too small to visualize by conventional cytogenetic assays, but too large to detect by standard DNA sequencing. Today, FISH applications are used not only in medical genetics, but also in many other disciplines including neuroscience, evolutionary biology, microbiology, pathology, toxicology, and reproductive genetics. As FISH technology keep developing, the requirement of the results of FISH is increasingly high. This paper described the quality management for FISH detailedly, aimed at improving the accuracy and reliability of the result of FISH, satisfying the requirements of clinicians and patients and improving the healthcare quality and outcome of patients, hoping for providing some references for laboratories who develop FISH technology.

keywords: cytogenetics; fluorescence in situ hybridization; quality management

将近 30 年前发展的荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术是一种适用于研究染色体结构和功能的有力方法^[1~3]。此方法,最初用于帮助人类基因组计划进行脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)绘图,很快就被临床试验和临床研究采用。如今, FISH 不仅用于医学遗传学,也在很多其它领域包括神经科学、进化生物学、微生物学、病理学、毒理学和生殖遗传学内使用。FISH 可以研究对传统细胞遗传学分析来说太小而不能识别,但是对于标准 DNA 测序来说太大而不能检查的遗传畸变。FISH 技术的迅速发展使得开展 FISH 的临床实验室对 FISH 的质量要求越来越高。本文对 FISH 技术的质量管理进行了具体描述,旨在提高实验室检测结果的准确度和可靠性从而提高临床满意度改善病人预后。

1 人员 参与 FISH 分析的实验室人员应该非常

精通此方法的基本原理并且应该有一个对常规实验室和质量程序的综合理解^[4]。全部的检测人员应该在他们可能参与的 FISH 试验的特定程序的工作过程中得到完全培训。在岗位描述中应该记录全体实验室人员的资格和责任。

实验室应该提供继续教育和专业发展的机会来帮助实验室人员保持在工作 and 专业知识中的熟练性和实时性。应该在个人档案中保存继续教育计划和参与记录。

注意相同 FISH 试验人员的阅读分析差异可能是由于阅读技术的不同引起的。实验室应该有能力监视这种不同,并且应该尝试通过培训和持续能力评估来限制它们。

实验室人员能力在培训后应该立刻评估和记录,而且在那之后至少每年评估一次。评估能力的方法包括直接观察常规工作过程、监视对检测结果

* 作者简介: 费 阳(1991-),女,在读硕士研究生,研究方向:实验室质量管理, E-mail: 277475101@qq.com。

通讯作者: 王治国, 硕士, 研究员, 主要从事临床检验质量控制方法研究和室内质量评价工作, E-mail: zgwang@nccl.org.cn。

的个人贡献和回顾工作记录。质控品和能力验证(proficiency testing, PT)材料的检测表现也可以用来评估性能。

2 设施和环境

2.1 恒温水浴箱和烤片机 恒温水浴箱、烤片机和加热器常用于加热 FISH 使用的试剂。应该使用一个认证的或校准的温度计来确认温度计的准确度或这些物体的内部温度监视系统提供数据的可靠性。同时,应该每日记录操作温度。

2.2 玻片 显微镜玻片通常使用碳酸盐玻璃制作。玻片经常会被机器加工过程中的油渍或者小的玻璃碎片污染,可以用有机溶剂、乙醇、洗涤剂如十二烷基硫酸钠清洗干净。

依据气候条件,每个实验室应该鉴定出最适合储存待杂交和已完成的 FISH 玻片的方法。预杂交玻片可以室温储存。在湿度高的地方,建议储存在暴露于干燥剂的密封干燥罐内。

2.3 温度计和吸液管 温度计每年都应该按照来自国家计量部门的标准或者一个等效的标准做准确性验证。吸液管应该在它们投入使用之前校准。重新校准应该记录,至少,在初始校准后的每年。校准可以通过使用一个分析天平称重分配体积的水完成。在 24℃ 时,体积分配与水的重量相等(例如,1 ml 水重 1 g)。

2.4 显微镜环境照明 基于在目镜中的影像以及观察者形象化低水平强度和多重颜色探针信号的需要,荧光显微镜最好放置在一个环境照明最小的房间或地方。在设计 FISH 分析执行的位置时。使用双向开关来允许灯光水平的调整是一个可实践选择。使用眼罩附加到目镜上也可以帮助信号的形象化。

2.5 显微镜 用于形象化和记录 FISH 信号的显微镜质量对于全部 FISH 试验的性能是至关重要的。在一个 FISH 试验开展之前,应该确认这些系统的适当性能。应该每日清理显微镜来移除玻片浸润油以及物镜和目镜上的灰尘。必须定期维护显微镜且保证其完全清洁。因为用于 FISH 的系统比用于其它细胞遗传学的系统更加复杂,每个系统有一个记录本来记录全部相关维护数据可能是有用的。

3 检验过程

3.1 检测过程中的质量控制 在 FISH 检测中,内部质控可以是待测目标相应染色体上相同所在地的简单物质。一个更有力的内部质控是被另一个探针(被一个不同的荧光标记)检测的第二基因组目标,它与试验探针同时杂交。在中期分子中,此类质控品用于确认杂交的有效性和识别是否存

在在试验位置有信号的染色体。

外部质控片通常是与试验玻片相似杂交的参考玻片。如果试验要检测 Y 染色体上的目标,通常会需要一个外部正常男性质控片来确认杂交是成功的。如果实验室没有使用外部质控片来保证使用了正确的探针(在每批试验中),那么就必须有一个替代方法来保证。

如果外部质控片与试验玻片平行检测,在试验报告开始之前应该证明它们是如预期进行的。如果外部质控片用于试验的质量控制(quality control, QC)目的,它们应该由检测试验玻片的技术人员检测。如果制造商提供质控片(或者其它材料)来与 FISH 探针成套设备一起使用,这些质控片应该按照建议使用。

3.2 中期和间期分析 参与细胞计数的技术人员应该详细了解 FISH 探针的设计和可能的信号类型:普通、典型反常和可能的变体型。应该有计分标准以便一个 FISH 技术人员记录的类型可以轻易的与另一个 FISH 技术人员记录的类型关联。

理想情况下,应该有至少两名技术人员用盲法的方式给每个 FISH 探针计分。每个实验室内都应该建立增加第三名阅读者或者审核者的标准。这些标准应该与临床环境相关,这样与正常临界值接近的计分之间的差异就会比被分类为异常的计分之间的差异获得更多的关注。实验室应该监视需要第三名阅读者的情况以便识别有差异结果的原因并解决。

4 结果报告

4.1 报告内容 应包括以下:①报告应该包括全部的实验室认可部门要求的人口统计学的数据和样品的数据;②报告中应该包含用于执行试验的探针的来源和标识;③应该在报告中使用的已获认可的人类基因组组织基因命名委员会基因标记(<http://www.genenames.org>);④如果 FISH 分析限制在某些选择的细胞中,选择的标志应该列在报告中;⑤如果技术质量不充足,报告应该要包含对另一个样品的申请;⑥报告应该包含报告日期并且指出是否此结果与任何预期结果一致;⑦适当认可的实验室负责人应该给报告签名。如果使用一个电子签名,它必须遵守适当规则。

除了上述内容,报告的结果应该包括观察的信号型,分析的细胞数量,每个临床相关信号型的细胞数量。结果可以使用细胞遗传学系统命名法描述,但是报告也应该包括一个对正文的解释(例如,正常、异常、缺失、重排)和对任何试验结果意义的解释。后者应该突出展示于报告中。在描述实验结果的意义时,应该考虑病人临床状态、标本来源、

样品检测前暴露的环境和试验的全部局限性。

4.2 记录 样品处理和检测过程中的记录为结果提供了客观证据。实验室应该保留特定结果的图像、试验报告和全部检测记录。保留什么和保留多长时间根据实验室地点和试验标本来源的不同而不同。用于 FISH 分析的玻片通常在实验室负责人的指导下储存。通常要求将玻片储存到全部试验完成,但是一些监管部门可能要求更长时间的储存。

5 文件和记录

5.1 方针 实验室应该有方针来定义它的 QC、质量保证(quality assurance, QA)和质量改进过程,同时有政策和程序描述执行 FISH 试验的类型和检测的标本类型^[5]。实验室也应该建立用于评估 FISH 试验的检验前、检验中和检验后过程质量的度量指标。

5.2 过程和程序指南 质量管理计划应该识别和记录检验前、检验中和检验后的工作过程。过程分析有助于实验室技术过程指南中程序文件的编写。

5.3 文件控制 实验室要求使用以下元素来控制它们的文件和记录,见临床和实验室标准化研究院(clinical and laboratory standards institute, CLSI)文件 QMS02^[6]和 QMS01^[7]。①文件鉴定、主文件、索引;②纪录的产生、审查和批准;③已获认可文件改变的审查与批准;④改变文件的定期审查;⑤文件评估与发布;⑥文件的获取、储存、保留或处理。

6 质量控制 如果实验室从制造商处购买一个新的 FISH 探针批号,那么就应该评估探针质量。评估应该包括使用实验室从前建立的方法进行探针定位的证实和探针杂交效率的评估。后者可以通过检测探针灵敏度和特异度来完成,或者通过证实与之前研究物质有等效性能来完成。如果等效性的证明包含一个阳性检测样品,探针定位可以在不进行中期分析的情况下建立,否则就需要进行中期分析。用于 QC 目的的探针的灵敏度和特异度评估可以在 25 个有丝分裂细胞上(如果目标在性染色体上或是在研究的男性细胞上,那么需要 50 个)或者在 200 个间期细胞核上进行。

应该监视实验室执行的每个 FISH 试验。同时,如果需要,要每年进行两次重新校准试验。对于那些基于参考数据库来进行解释的试验,实验室也应该有方法来保证技术“漂移”没有损害到来源于那些数据库的临界值的可靠性。完成这项任务的方法包括用新的质控样品数据来增加(或替换)数据库样品数据和将从已知的普通标本处获得的结果与建立的临界值进行系统性比较。

实验室应该记录和调查差错或不遵从实验室建立的政策、过程、程序或者其它强制性要求的事件。监视计划的获取并且分析信息来识别问题和它们的原因以便采取纠正措施(见 CLSI 文件 QMS11)^[8]。此过程包括识别、分类、调查、记录、补救措施和一个预防未来相同性质问题发生的行动计划。

7 质量保证

7.1 FISH 探针和使用探针试验成套设备的监管和制造状况 实验室应该认识到政府监管可能影响到 FISH 探针会怎样(或可否)在临床检测中使用。美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)和欧共体(European Community, EC)标志系统可能是最知名的保证此类产品质量的政府系统。

在美国,只有标记为“用于体外诊断”的探针是 FDA 通过或批准用于特定临床意图的。标记为分析物特异性试剂的探针在包装和性能声明(制造商的)方面服从 FDA 的监管。标记为仅供研究用(research use only, RUO)的探针不是用于临床的。制造商不能将它们就这样投入市场,并且在美国实验室对这些探针的使用是有限制的。

EC 标记证明产品已经满足了欧盟销售安全、健康或环境要求。EC 标记产品的制造商自己声称他们的产品符合这些要求。产品的外部评估依据其特性可能发生也可能不发生。

7.2 认可 实验室应该获得所有适当的政府和监管部门授权或认可。

7.3 能力验证和实验室审计 实验室性能的客观证据由内部和外部测量评估。实验室应该参与外部许可或认可、能力验证(PT)和性能比较(例如实验室之间的)。外部组织依据发布的要求和指南来评估实验室(通过现场调查)。如果识别出问题,就要求实验室采取纠正措施以维持授权或认可。

实验室应该参与两类内部评估:质量指标检测和实验室审计。①质量指标是追踪过程性能的被测量(例如,标本充足、周转时间和过程失败)。实验室应该利用一个或者更多指标来检查检验前、检验中和检验后工作过程的性能。②实验室审计会比较真实情况与要求,并将结果展示给实验室主管、负责人、管理层。任何检验前、检验中、检验后或者管理过程都可以审计来确定它与建立的政策、过程和程序,以及外部监管和认可要求的一致性。

外部 PT 给实验室提供了与使用类似方法和仪器的同行实验室比较它的试验的准确度和解释能力的机会。很少能得到用于 FISH 试验的外部 PT 计划。最大的计划,

(下转 155 页)

- [J]. Med Lab Obs, 1972, 4(1): 47-54.
- [2] 曾蓉, 王薇, 王治国. 临床实验室危急值报告制度的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 380-381.
- Zeng R, Wang W, Wang ZG. Establishment of clinical laboratory of critical value report system[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2012, 35(4): 380-381.
- [3] 温和, 夏昕, 胡元生, 等. 检验结果危急值报告制度的建立与临床应用[J]. 安徽医学, 2009, 30(10): 1257-1258.
- Wen H, Xia X, Hu YS, et al. The test results of critical value to establish a reporting system and clinical application[J]. Anhui Medical Journal, 2009, 30(10): 1257-1258.
- [4] 杨大千, 郭希超, 徐根云, 等. 危急值项目的数据挖掘分析[J]. 浙江检验医学, 2007, 5(3): 37-40.
- Yang DG, Guo XC, Xu GY, et al. The critical value of project data mining analysis[J]. Zhejiang Laboratory Medicine, 2007, 5(3): 37-40.
- [5] 张莉, 张国良, 黄伟忠. 某院临床实验室危急值的统计分析和比较[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(24): 2966-2967, 2969.
- Zhang L, Zhang GL, Huang WZ. Statistical analysis and comparison of the urgent value in a clinical laboratory[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2011, 8(24): 2966-2967, 2969.
- [6] 钱净, 施茜, 胡大春. JCI临床实验室评审标准在检验科危急值管理中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(2): 140-142.
- Qian J, Shi Q, Hu DC. JCI clinical laboratory accreditation standard critical value management application in laboratory[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(2): 140-142.
- [7] Wagar EA, Friedberg RC, Souers R, et al. Critical values comparison; a College of American Pathologists Q-probes survey of 163 clinical laboratories[J]. Arch Pathol Lab Med, 2007, 131(12): 1769-1775.
- [8] 何有琴, 刘岩, 程艳敏. “危急值”报告制应用于医疗质量管理中的研究进展[J]. 卫生软科学, 2009, 23(2): 143-145.
- He YQ, Liu Y, Cheng YM. Update of the panic value report system in medical quality management[J]. Soft Science of Health, 2009, 23(2): 143-145.
- [9] 魏源华, 顾万建, 李岷, 等. 检验科在临床沟通中可采取的措施[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(3): 59-61.
- Wei YH, Gu WJ, Li M, et al. How can the department of laboratory medicine do better for clinical service[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3): 59-61.
- [10] 张莉, 王悦宁, 李明江, 等. 实验室危急值报告的临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3): 263-264, 267.
- Zhang L, Wang YN, Li MJ, et al. Clinical analysis of Laboratory of critical value report[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, 33(3): 263-264, 267.

收稿日期: 2014-11-08

修回日期: 2015-02-06

(上接 151 页) 来自美国病理学家学会 (college of American pathologists, CAP), 服务于将近 300 个世界范围的实验室。CAP 考察一系列样本类型 (例如, 细胞悬浮液、福尔马林固定、石蜡包埋), 不同细胞目标 (例如间期、中期) 和检测目标 (例如融合、破碎、枚举) 的挑战。结果通过同行一致同意方法评分。

当开启一个新的测试时, 与一个或者更多外部实验室分享标本并且比较结果和解释来作为确认性能的途径直到能力证实是可取的。一旦建立起已经检测过样品的储备, 包括不同探针、信号类型和标本类型等等的正常和异常结果的样品, 实验室可能希望建立它自己的内部 PT 计划作为 QA 的一个替代途径。

参考文献:

- [1] Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(9): 2934-2938.
- [2] Lichter P, Cremer T, Borden J, et al. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries[J]. Hum Genet, 1988, 80(3): 224-234.
- [3] Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ hybridization; past, present and future[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 14): 2833-2838.
- [4] International Organization for Standardization. Medical laboratories-particular requirements for quality and competence[S]. Switzerland: Geneva ISO15189, 2007.
- [5] Berte LM. Laboratory quality management; a roadmap[J]. Clin Lab Med, 2007, 27(4): 771-790.
- [6] CLSI QMS02-A6. Quality management system; development and management of laboratory documents; Approved Guideline-Sixth Edition[S]. Wayne, PA: CLISQMS02-A6, 2013.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute QMS01-A4. Quality Management System; A model for laboratory services; Approved Guideline-Fourth Edition[S]. Wayne, PA: CLSI QMS01-A4, 2011.
- [8] CLSI document QMS11-A. Management of Nonconforming Laboratory Events; Approved Guideline[S]. Wayne, PA: CLSI QMS11-A, 2007.

收稿日期: 2014-09-16

修回日期: 2015-01-10