

感染性疾病诊断和监测微阵列技术的质量控制*

张诗诗, 章晓燕, 王 薇, 王治国 (北京医院卫生部临床检验中心, 北京 100730)

摘要: 随着越来越多的临床实验室采用微阵列技术(Microarrays)进行诊断性测试, 不同类型的微阵列以及它们在临床实验室中的运用突飞猛进。微阵列技术是目前较为新颖的一项技术, 主要用于感染性疾病中病原体的检测、鉴定、基因分型以及耐药性的确定。该文以建立微阵列检测的一般要求为起始, 按照检验前、检验中和检验后的顺序进行具体说明; 同时描述微阵列技术分析性能的验证和确认; 提出关于微阵列技术质量控制和质量保证的考虑; 并讨论数据分析和解释部分所需的方法和参数。

关键词: 感染性疾病; 微阵列分析; 核酸检测; 病原体检测

中图分类号: R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)06-160-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.06.049

Quality Control of Microarrays for Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases

ZHANG Shi-shi, ZHANG Xiao-yan, WANG Wei, WANG Zhi-guo

(National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: With a growing number of clinical laboratories adopted Microarrays for diagnostic testing, the different types of Microarrays and their application in clinical laboratories had improved enormously. Microarrays was a relatively new technology. It mainly deals with infectious pathogen detection, identification, and genotyping, as well as drug resistance determination. This article begins with the general requirements for the establishment of Microarrays, with detailed explanations in the sequence of before, during and after the assay. Meanwhile, it also describes the verification and validation of analytical performance of Microarrays, raises several considerations for the quality control and quality assurance, and discusses methods and parameters needed for data analysis and interpretation.

Keywords: infectious diseases; microarray analysis; nucleic acid testing; pathogen detection

微阵列技术是一项较为新颖的技术。在临床实验室中, 主要利用该技术对感染性疾病和相关病原体作出诊断。为了更好地了解该技术, 临床实验室必须结合各自实际情况, 明确其在各个步骤中所涉及的问题, 并同时微阵列技术的分析性能进行验证和确认, 设定相关的质量控制要求以及质量保证。

1 建立微阵列检测的一般要求

1.1 检验前要求 如美国临床和实验室标准化研究院(CLSI)文件 MM13^[1]所述, 在检验前阶段主要要求标本的采集和处理遵循良好的实验室规范。进行分子检测的每个实验室, 应该有针对样品接受和拒绝标准的书面方针。实验室应为临床医生提供具体的指导并进行最佳的患者标本采集技术培训。

1.2 检验中要求

1.2.1 标本储存: 具体的标本类型储存建议可以参照 CLSI 文件 MM13^[1]。

1.2.2 自动化仪器: 实验室人员要详细了解自动化系统, 能充分验证仪器性能并解决潜在误差或系统故障。

1.2.3 样品核酸提取: 目的是去除下游反应的污染物和抑制剂, 纯化感兴趣的核酸。

1.2.4 扩增: 为确保特异且一致的扩增, 要求精心设计引

物并优化引物、缓冲液、模板浓度和循环温度。

1.2.5 标记和纯化: 生物素和荧光标记是最常使用的。结合应该是有效的并且可用分光光度法进行定量测量。靶核酸需在杂交前纯化, 其技术应该也是定量和有效的, 且扩增和标记产物无实质性损失。

1.2.6 杂交和洗涤: 要保证在与正确的探针结合时能有效地去除任意非特异性信号, 其中洗涤缓冲液的组成和温度至关重要。应该确保信号标记维持在激活状态。

1.2.7 检测: 由专门的仪器测量阵列上每一个探针的已标记核苷酸信号。

1.2.8 控制: 用不同类型的质控品调查整个试验的不同步骤。质控品的浓度应该接近检出限, 多水平的质控物可用于决定动态范围。质控品的运用应该遵照地方和区域现有的监管要求。

1.3 检验后要求

1.3.1 初步信号分析: 具体分析见下述第四部分-数据分析和解释。

1.3.2 数据标准化: 可用于调查相关生物样品间的关系, 且经常用作比较试验的研究工具。具体信息参见 CLSI 文件 MM06^[2], MM12^[3], MM17^[4] MM19^[5] 和下述第四部分-数据分析和解释。

* 基金项目: 北京市自然科学基金(基金编号: 7143182), 北京医院资助课题(BJ-2015-025)。

作者简介: 张诗诗(1991—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 实验室质量管理, E-mail: 792743875@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。

1.3.3 背景扣除:能用于高密度微阵列以纠正非特异的探针结合。但在临床分析中,更适合分析特定的探针而非依赖于实质性的背景扣除技术。

1.3.4 模式解释:很重要。特异生物的出现可能与明确的探针信号模式相关,相似的生物株可能会有重叠却不相同的信号模式。解释应该与样品中的混合菌群相适应且谨慎地执行复合基因型结果的解释。

1.3.5 报告:清晰、简明。高度复杂分析的结果可能要求由合格的供应商或实验室专家进行审核和总结。阳性结果应该突出显示并记录相关阴性结果。

1.3.6 意外的结果:感染性病原体的基因修饰可能会使微阵列分析有意外的结果,实验室应该意识到基因修饰会导致一些菌株在分析中无法测到。非典型的结果可能代表一个新的变异菌株,样本需要被送到参考实验室进一步分析和确认。

1.3.7 污染控制:因为临床上的重要病原体可在实验室中出现,所以实验室应该有污染的防止程序和识别程序(参见 CLSI 文件 MM19^[5])。

2 分析性能的验证和确认 CLSI 文件 MM17^[4]是微阵列用户使用的主要资料。该文件指出,验证定义为“确认先前厂家所建立的规定性能”,确认定义为“建立新试验或新方法、标本类型、临床指标或患者人群的性能特征,通常由厂家建立”。每个实验室需要发展其自身独有的验证和确认方案,也可以参考指南文件和相关书籍^[6,7]得到更多有关的详细论述和建议。

2.1 三层分类方法

2.1.1 体外诊断医疗器械:是当试验厂商进行可接受的确认研究后由监管机构批准或认证(如美国食品和药品监督管理局 FDA 许可或批准)。其验证较为简单,需要更少的操作时间、样品和资源。每个实验室可以使用相关指南确定验证方案。使用检测系统指定基质作为验证样本非常重要。如果检测系统说明书列举多种可接受标本,分析性能验证的标本应包括临床实验室可遇到的所有标本类型。

2.1.2 改进的体外诊断医疗器械:是使用改变了许可或批准的医疗器械来执行检验,比如标本类型、患者人群、仪器、软件或预期用途的改变。当实验室为满足其特定检测需求而改进体外诊断检测时,确认计划通常比验证更全面。对于任何改进,原体外诊断试验的分析和临床规范可能不再适合试验的预期用途。因此,确认改进的体外诊断试验首先要评估和重新定义与改进后有关的所有试验参数和规范并确保满足试验的预期用途。

2.1.3 实验室自建试验:是未经批准的检验方法,用于特定实验室的临床诊断,且该实验室负责建立试验的性能特征。因为没有事先规定的性能要求和规范,所以实验室自建试验的确认可能是最复杂的过程。参考 CLSI 文件 MM17^[4]中确认计划和试验过程的完整描述。可能被忽视的部分是评估开发试验关键原材料的供应商,应通过建立良好供应商资格程序来实现买者自负(“买者当心”)的概念。以被核酸污染的商品化试剂为例,用更敏感的检测方案(如微阵列)可发现更多的污染问题,这对于依赖试剂关键原材料质量的实验室自建试验尤为重要。因此,供应商应确定所提供的试剂达到医学实验室的要求,对于购买的

每个关键材料都应建立明确的书面标准或规范。

2.2 临床确认

2.2.1 标本类型:成功的临床确认中一项关键因素是一套临床样品需要有足够的数量、类型来确保结果的合理解释,并认识到试验和检验结果的局限性。当选择样品时,应考虑以下因素:评估生物体突变和变异的普遍程度(样品可合理应用于建立试验性能规范并规定其局限性);试验应使用有代表性、现实中可得的样本类型(如鼻咽拭纸/抽吸物、脑脊液、培养的生物、新鲜或冰冻组织、石蜡包埋组织);包含代表每种可能报告结果的样品(对于多重微阵列试验,性能建立应包括所有检测的菌株、变异或突变;在某些情况下,如罕见突变和变异,包含特定靶基因型的天然样品很难得到,因此,建立性能规范应包括替代的控制样品和程序)。

2.2.2 结果评估:需要恰当定义试验确认的分析金标准或“临床真理”。对于新的生物或基因型检测,临床确认包括临床结果的分析作为“临床真理”。当使用参考方法时,参考试验结果被认为是“真理”。试验性能将以临床灵敏度和特异度的方式计算和报告。新方法诊断的准确度是通过与参考方法比较时证实其一一致性程度决定的,也可以计算阳性和阴性结果的似然比或受试者工作特征(ROC)曲线。

2.2.3 确认的局限性:任何研究都有局限性,试验确认研究也不例外。重要的是用文件记录这些局限性以确保结果的正确解释。一些常见的局限性可能包括、但不限于样品的选择和参考/比对方法的选择。同时也应分析和记录发表的文献或通过确认发现试验的局限性。

2.2.4 继续进行的确认:试验验证/确认数据的接受性和新试验在患者检测的实施不能认为是试验性能监测和评估的结束。不断进行的确认可认为是对检验持续不断的改进。从确认研究得出的性能规范可用于评估每批操作检验的“有效性”,且该信息也会添加到合适的确认文件中。

2.3 数据评估 决定检验值的改变是否有意义取决于整个系统的精密度和数值分布形状。如果检验值遵循正态分布, t 检验等参数检验可用于数据分析。如果不遵循正态分布,则应用非参数检验或将数据转化以符合参数标准。可使用 Kolmogorov-Smirnov 检验方法来对数据集进行正态性检验。若为非正态分布数据,用户需要判断非参数检验是否合适,或数据进行对数转化,然后用参数方法进行分析。

3 质量控制和质量保证 当微阵列应用到临床诊断时要考虑质量保证(quality assurance, QA)和质量改进问题。QA 包括常规质量控制(quality control, QC)、能力验证(proficiency test, PT)、技术人员能力、仪器校准和临床相关性。QC 测量和确认试验的正确性能。QA 是包括检验过程所有阶段(如检验前、检验中和检验后)的正确检验结果的检验过程。不考虑试剂来源,所有临床实验室必须采取程序以最小化污染造成假阳性结果的风险,并控制抑制作用导致的假阳性结果(参考 CLSI 文件 MM03^[8])。

3.1 阴/阳性质控品 使用阴/阳性质控品以确保检测试剂的完整性和检测程序的适当性能。每批检测推荐使用多个阴性质控品,可以分布在整个批中(如前面、中间和最后的位置)。在患者标本的每个分析批应包括阳性质控品,或已知的包含靶序列的阳性样品(外部阳性质控品)。质控品

的制备、提取和检验与患者标本采用相同方式。如果阳性或阴性质控不如预期执行,应检验该批样品的所有结果以确定是否需要重复检验。此外,微阵列检测的QC还包括检验新试剂或新试剂盒,使用必要的质控品并与当前的试剂或试剂盒平行检验至少一个阴性临床样本和一个阳性临床样本。实验室应包括与分子检测标准操作程序有关QA措施的文件及指南。

3.2 能力验证 保证患者标本常规检测产生优质的结果需要PT。来自外部实验室认可机构比如美国病理学家学会(CAP)检测样品的周期性考核或替代的PT方案,是PT样品的典型来源。对于特定的被测量如果没有可获得的外部系统时,使用实验室间计划也是可以接受的。不可接受的PT结果需要进行调查,最后要采取纠正措施。PT促使质量改进,它是QA的基石。

3.3 技术人员能力 实验室人员必须有能力进行微阵列检测。QA要求监测检验前、检验中和检验后阶段。操作者能力评估包括技术人员按预定方式执行试验的观察和记录,包括人员遵守规定的标准操作程序、生物安全、患者保密、结果解释、报告和QC文档的确认。另外,实验室人员应文件记录继续及相关教育的证据。

3.4 仪器质量保证 质量计划必须具有良好的文件化和组织化。所有仪器的文件内容必须包括清洗、功能、校准、维护、修理和服务。进一步的细节和指南可参考ISO 15189:2012。

4 数据分析和解释

4.1 分析步骤

4.1.1 图像分析: 网格调整是与位点阵列的每个部分相协调以分配所成的像。信号和背景强度的估计,将由位点遮盖区域内像素值的直方图确定。直方图分隔技术可以直接测量位点信号和背景值。大部分微阵列分析方法定义信号强度为位点遮盖区域内像素值的平均值、中位数或另一个百分位数。

4.1.2 分析质量控制: ①内部质量控制。为确保微阵列分析的多个步骤(提取、扩增、杂交和检测等)如期进行且阴性结果不是因分析错误而产生,需有内/外源性样品的控制。内部质控品是不干扰检测灵敏度的。理想情况下,适当的内部质控品浓度水平接近检出限并近似地模仿被测生物体的性质。采用多个内部质控品可以帮助确定检测失败的具体步骤。②扩增质量控制。使用分光光度法评估靶核酸的存在和荧光染料的结合。通过凝胶电泳或柱方法评估扩增产物的量。其它扩增的质控方法,如针对特异目标的PCR或定量PCR,依赖于杂交所需的高精密核酸输入量。③杂交质量控制。对于杂交,微阵列的质量通常由以下几个因素评价,包括空间效应(不一致的背景)、芯片影响(制造缺陷)、人工影响(高背景、前景信号饱和、污染)、多芯片正常化比例系数。为检测无效或缺陷的位点,必须规定有效性标准。在整个微阵列的表面上,含有阳性和阴性控制探针对于评估充分的杂交条件是有用的。

4.1.3 背景校正: 背景代表着测量的信号强度值,是根据目标非特异地结合于探针上而假设的,并且必须从信号强度测量中移除以准确量化所存在的靶核酸量。“背景校正”也指信号调整,包括:背景噪音的修正和处理、交叉杂交的

调整、调整表达估计使其在合适的刻度里或与浓度呈线性关系。评估一个位点的背景,标准方法是假设背景水平与位点附近的强度相同并排除其它位点。局部背景是由每个位点附近的区域决定的,其校正通过位点周围的像素信号计算阵列上每个探针的背景强度并从测量的位点强度中扣除。全部背景是由阵列上阴性控制位点的信号确定,其强度通常作为阴性控制探针的平均值或中位数进行计算。

4.1.4 标准化: 因为每个位点荧光强度的测量可能在数据分析中根据一些线性或非线性功能进行不同地缩放,所以需进行数据标准化。标准化将鉴别和移除在测量荧光强度中的系统变异效应,目的是通过调整使信号强度可在不同的阵列间进行比较。常用的方法有:统计学描述法(如中位数和平均值)、控制位点技术、相关(回归)分析。

4.2 阈值确定 CLSI文件EP17^[9]中有测量空白限(LoB)和检出限(LoD)的详细描述。研究LoB的主要目标是确保没有产生潜在假阳性结果的不良操作或交叉杂交探针。LoD是显著超过空白样品测量的最低值,所有信号大于LoD的探针认为是可检测的。

5 结论 随着微阵列技术在临床实验室的推广,其质量控制和质量保证需要得到更多的关注。结合临床实验室中的实际问题,充分了解微阵列技术的优点和局限性,确保其得到更为合理有效的质量控制。

参考文献:

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute MM13-A. Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline[S]. Wayne, PA, CLSI MM13-A, 2005.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute MM06-A2. Quantitative Molecular Methods for Infectious Disease; Approved Guideline-Second Edition [S]. Wayne, PA, CLSI MM06-A2, 2010.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute MM12-A. Diagnostic Nucleic Acid Microarrays; Approved Guideline[S]. Wayne, PA, CLSI MMN-A, 2006.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute MM17-A. Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays; Approved Guideline[S]. Wayne, PA, CLSI MMN-A, 2008.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute MM19-A. Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments; Approved Guideline[S]. Wayne, PA, CLSI MM19-A, 2011.
- [6] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [7] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2014.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute MM03-A2. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Disease; Approved Guideline [S]. Second Edition. Wayne, PA, CLSI MM03-A2, 2006.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute EP17-A2. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline [S]. Second Edition. Wayne, PA, CLSI EP17-A2, 2012. 收稿日期:2015-07-29 修回日期:2015-09-25