

# 分子檢驗品管的挑戰

曾嶽元<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>國泰綜合醫院病理暨檢驗醫學部，台北，台灣

<sup>2</sup>輔仁大學醫學系，台北，台灣

## 摘要

分子檢驗的錯誤可出現在分析檢測前期（preanalytic testing phase）、分析檢測中期（analytic testing phase）和分析檢測後期（postanalytic testing phase）。分析檢測中期的錯誤主要來自於技術作業流程，因此有隨機錯誤（random error）和系統錯誤（systemic error）兩種。由於兩者皆不易察覺，所以品管（quality control; QC）就成為品保（quality assurance; QA）的關鍵點。一般而言，實驗室可藉各種品管物（quality materials）來偵測檢驗是否出錯，但是科技的快速進展以及個人化醫療的來臨，已使得常規的品管變得捉襟見肘。在尚未有公認的品管規範可遵循之前，我們或許可視情況採用「Levey-Jenning 管制圖」或「複檢（duplicate）」來應對。（生醫 2013;6(1):25-29）

關鍵字：品管（quality control; QC）、隨機錯誤（random error）、系統錯誤（systemic error）、Levey-Jenning 管制圖、複檢（duplicate）

## 前言

每個人都知道在臨床醫療上，提供錯誤的檢驗結果比不提供結果還要危險，尤其是指令性的檢驗項目對病人影響更是重大。譬如，檢驗錯誤而未測得致癌基因成癮性（oncogene addition），以致癌症病人錯過標靶治療，就會造成嚴重的後果。這類的隱憂讓分子檢驗人員忐忑不安，不知何時會踩到地雷。不幸的是，我們都知道，檢驗錯誤是一定會發生的，尤其是

高複雜度的分子檢驗更是如此。對此無法避免的事實，我們該採取的策略包括：降低錯誤發生的機率、找出發生錯誤的檢驗項次，以及防止同樣的錯誤再度發生。因此，品質保證（quality assurance; QA）就是檢驗單位的最高目標。

## 分子檢測錯誤的探討

正如同其他的醫學檢驗，分子檢驗也涵蓋三個層

通訊作者：曾嶽元 教授

電話：886-2-2690-7965 ext 2518

傳真：886-2-2691-9800

地址：106 台北市仁愛路四段280號 病理暨檢驗醫學部

電子郵件：jeffbucknell@gmail.com

面：分析檢測前期（preanalytic testing phase）、分析檢測中期（analytic testing phase）和分析檢測後期（postanalytic testing phase）。分析檢測前期即檢驗前之程序（pre-examination procedure），此階段始於臨床醫師提出檢驗申請、病人準備與採集原始檢體、檢體運送與實驗室內傳送，而止於分析檢測之開始，所以此層面包括開單勾選項目、取檢體、標示及包裝和傳送。分析檢測中期包括挑選檢驗方法、執行檢驗步驟、監視及證實檢測正確性、可靠性和記錄結果。分析檢測後期即檢驗後之程序（post-examination procedure），此階段包括系統性的審查、報告格式製作與解釋、釋出檢驗結果報告，以及檢驗報告的建檔和剩餘檢體的貯存。

醫學檢驗的錯誤可出現在上述任何一個步驟中<sup>1-4</sup>，分子檢驗自然也不例外。有調查指出<sup>5</sup>，45%的錯誤發生在「分析檢測前期」，尤其是「挑錯項目」竟然佔了所有錯誤的27%。以APC基因檢測為例，Giardiello等人<sup>6</sup>就發現有17%的申請案例是沒有必要的。最主要的原因是開立此檢測的醫師不了解APC基因檢測的侷限性。此外，檢驗單所附之資訊不足也是常見的錯誤<sup>7</sup>，例如臨床醫師在開立連鎖分析檢驗時，未於申請單上提供個案之家族樹或系譜（pedigree）等資訊可讓判讀的醫師參考。而「分析檢測中期」的錯誤發生約佔整體錯誤率的30%，其中試劑用錯和儀器故障就佔了八成。另有24%的錯誤發生在「分析檢測後期」，其中七成發生在「打錯報告」。就單一項檢驗而言，若以纖維性囊腫（cystic fibrosis）的基因檢測為例來看，其整體錯誤率為1.5%，其中約一半發生在「分析檢測中期」和「分析檢測後期」<sup>8</sup>。然而出乎意料地，有研究者從九萬

多筆DNA檢測中發現，「分析檢測中期」竟是最少出現錯誤的地方，其錯誤率僅有萬分之六至十二而已<sup>9</sup>。

由於各個實驗室設計之作業流程不同，因此每個實驗室之分析前、中、後期的錯誤率不盡相同，甚至不同的檢驗項目也有不同的錯誤分佈率。不過大體而言，檢驗錯誤大多發生在分析檢測的前、後期，而發生在這兩階段的錯誤主要來自於行政作業流程的疏失。相反地，分析檢測中期的錯誤主要是來自於技術作業流程。不過，行政作業流程的錯誤比較容易察覺，而且修改的成本較低，只要參與者願意改善，很容易地就可以大幅度的降低整體錯誤率。但是，技術作業流程的錯誤有隨機錯誤（random error）和系統錯誤（systemic error）兩種，兩者皆不易察覺，而且偵測及排除的成本相當高。由於分析檢測中期的錯誤率原本就不太高，因此很難再壓低其錯誤率。這也就是為什麼QA中最重要環節就在品管（quality control; QC）了。

## 常規的品管

美國聯邦政府於1988年制定的「臨床實驗室改進修正案（Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988）」，也稱為「CLIA'88」。在其中的品管準則即指出，每次檢驗中都必須帶入陽性和陰性樣本。這個觀念是很重要的，因為我們可以藉此排除偽陰性和偽陽性的可能性。對於定量的檢驗，實驗室也應該備製一系列稀釋的樣本以作為檢驗靈敏度以及線性（linearity）的測試。因為即便已清楚的定義精確度的標準，但批號之間的變異性

還是可能會發生的。不管是定性或定量的檢驗，凡是為品管目的而使用之樣本皆稱為「品管物（quality materials）」。

品管物可以是來自檢體本身的成份之一，此謂之「內建的品管物」。例如「例行轉錄產物（housekeeping transcript）」即是內建的品管物，它可用來評估檢體的RNA品質。由於並非所有的核酸分子之生物學變異性皆相同，因此所選用的內建品管物最好包括兩種，例如分別代表高拷貝數和低拷貝數的DNA或RNA。而品管物也可以是從外面添加的，實驗室若使用添加的品管物來監控檢測的性能，那麼這些外加的品管物就必須符合一定的公認標準。譬如Invitrogen（Carlsbad, CA）和VWR（Rador, PA）所販售的RNA品管物就合乎External RNA Controls Consortium（ERCC）的標準。此外，外源性的品管物應該儘量跟病人的檢體類似。譬如，臨床檢驗剩餘的病人檢體就可以貯存作為品管使用。當很難找到新鮮的血液作為品管使用時（事實也是如此），我們可使用貯存的白血球和之前剩餘的核酸來當作品管物。當使用細胞株作為品管的時候，有專家建議使用多項細胞株的混合物，以避免因單一細胞株所造成的偏差。在實際操作時，無論是使用哪一種外源性的品管物，冰存的品管物在解凍後最好只使用一次，以避免反覆的冷凍和解凍過程破壞品管物之品質。在評估檢驗的概況時，品管物應和病人檢體在同次檢測中一起操作，以避免時空差異造成的誤判。此外，品管物必須在檢體處理的第一個步驟中就添加進去，例如在處理檢體加入溶解液（lysis buffer）的時候就開始納入品管物，以避免前段操作不受監控。

醫學實驗室通常以「Levey-Jenning 管制圖」來執行定量檢驗之品管。當以此管制圖用於分子檢驗之品管時，實驗室可視檢驗之頻率決定何時加入品管物，如此可觀察檢驗結果是否發生偏移。在同一次檢測中，一個外加的品管物可配上數個病人檢體以降低成本。相反地，我們也可以同時使用多個品管物以增加偵測錯誤的能力。不過要注意的是，使用的品管物愈多，檢驗失敗率就愈高。譬如使用一項品管物時若有5%的失敗率，那麼當我們使用四項品管物時，失敗率就會高達18%。如果其中有一項品管物之檢驗結果超出允收範圍，我們並不需要將其他的品管物作廢；但是只要有品管物的結果是錯誤的，同一批的檢體就必須暫停檢驗，俟品管物的錯誤結果釐清後，再決定下一個步驟。如果病人的檢體還足夠的話，那麼受到影響的臨床案例通常會加以重做。無論如何，當品管結果落於允收範圍外時，我們都必須加以記錄並探討根本原因，並且進行矯正措施。

## 品管的挑戰

在檢驗中使用陽性、陰性品管物，以及使用高、低不同濃度的品管物，是基本的品管方式。然而，對於許多高複雜度的分子檢驗，卻很難做到這一點。因為目前分子基因檢驗超過二千項，我們即便有這些檢測的品管物，也無法貯存和管理這麼多的品管物。即便是單項分子檢驗，也不見得就有品管物可用或預知怎麼用。譬如說，A基因沒有突變熱點，那麼在執行A基因之突變檢驗時，怎麼帶進陽性品管物？尤有進者，在微陣列（microarray）檢驗中，更不可能對成千上萬個分析點一一附加品管物。這些情況常見於分子檢驗，但無法以常規品管監控其檢驗品質。

在這種情況下，品管策略就是針對分析物中最不穩定的成員或步驟作管制。例如在RNA的定量檢測過程中，最不穩定的步驟就是cDNA的備製，因此品管就必須涵蓋這一點。根據擬監控的項目來使用適當的品管物，我們再由品管物的檢驗結果即可得知檢驗中是否出現錯誤，像是出現外來的抑制物，如殘留的化學藥品；或者是出現內源性的抑制物，如血紅素。另外，利用無模板（template）品管物可讓我們評估背景訊號和汙染的可能性。如果使用某些品管標誌例如組織病理學的特徵，那麼品管結果甚至可用來指出檢驗錯誤的來源。

對於「多分析物之檢測（multianalyte assay）」，其品管策略就該朝向增加準確度與再現性之信賴度<sup>10</sup>。從多次的品管檢驗結果中（例如在不同日子進行、由不同的技術員操作、使用不同的儀器、或者採用不同批號的試劑），我們可以計算平均值以及兩倍的標準差。此數值可作為檢驗性能的允收下限。當同一個品管物使用於多項檢驗時，實驗室可用「Levey-Jenning 管制圖」來審視檢驗是否出現偏移<sup>11</sup>。

分子檢驗的另一項挑戰就是，當檢驗個案數量不多時，常規的品管方式就不太適用了，因此，實驗室就很難建立該項檢驗的管制圖。此外，若從成本方面考量，這類的檢驗品管也常花費太高。如果檢驗一例病人檢體，還要加上兩例品管物，那麼耗材成本就增加到三倍了。更極端的情況是，當業務量非常少的時候（譬如數星期中只有一例），甚至是「孤兒檢驗（orphan test）」（譬如一整年中只有一例而已）時，該怎麼確保品質呢？這類的挑戰會

隨著科技的發展而更為常見。譬如，以「次代定序（next-generation sequencing）」分析單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism; SNP）即可設計個人化的分子檢驗。然而「次代定序」有1%至8%的偽陰性率和3%至12%的偽陽性率，所以品管還是不能省的。

對於數量少的分子檢驗，甚至是「孤兒檢驗」，筆者認為以不同操作者「複檢（duplicate）」，不失為成本較低（耗材只增加到兩倍）的方法。若複檢採用一樣的檢驗方法，那麼監控的是隨機錯誤；如果複檢採用不一樣的檢驗方法，那麼可監控隨機錯誤和系統錯誤，但無法區分錯誤出於何者。因此，筆者建議複檢時採用不一樣的檢驗方法，因為當複檢結果不一致時，可採用相同的檢驗方法以釐清正確結果為何。然而，「複檢」並非常規之品管手段，因為一般咸信如果某項檢驗之可靠性需要以複檢來確定的話，那麼這項檢驗顯然不夠穩定到足以應用至臨床上<sup>12</sup>。然而，個人化醫療的時代已然來臨，傳統的品管已變得難以應付這類挑戰，這個問題甚至挑戰了各先進國家的醫療管理層面。至於美國最近醞釀的「個別化的品管計畫（Individualized Quality Control Plan）」，此法是否可解決這個棘手的問題，就讓我們拭目以待。

## 結語

雖然CLIA並未把分子檢驗視為專科或次專科，但從CLIA的角度來看，分子檢驗是高複雜性的檢測（high-complexity testing）。因此，品管在分子檢驗中扮演極重要的角色。一般而言，使用的器材若符合優良產品製造規範（good manufacturing practice;



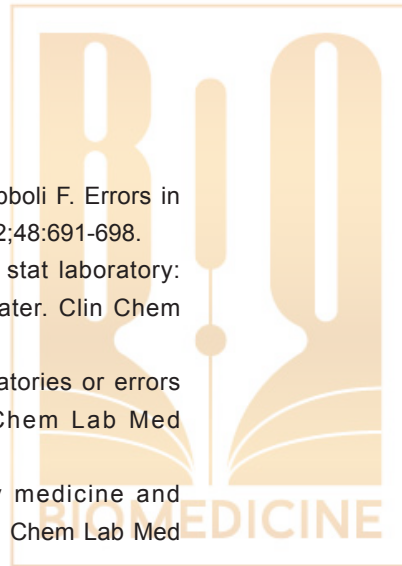
GMP) 或ISO 9000, 可減少品管的負擔。若在多重檢驗 (multiplex test) 中加入多樣品管物, 可提高偵錯的能力。對於個人化之分子檢驗, 在公認的品管規範還沒有出現前, 我們或許可依檢驗數量將分子檢驗品管以兩種方式來應付: 量多者以「Levey-Jenning 管制圖」管理; 量少者以「複檢」來管理。由於醫學實驗室或其所屬之組織為負法律責任之實體, 所以分子實驗室怎麼避免出現錯誤, 是品管的一大挑戰。

good laboratory proficiency and appropriate data analysis practices are essential. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19:10-18.

11. Westgard JO. Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem* 2003;40:593-611.
12. Toll AD, Liu JM, Gulati G, et al. Does routine repeat testing of critical values offer any advantage over single testing? *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:440-444.

## 參考文獻

1. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002;48:691-698.
2. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. *Clin Chem* 2007;53:1338-1342.
3. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-759.
4. Plebani M. Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:700-707.
5. Hudson KL, Murphy JA, Kaufman DJ, et al. Oversight of US genetic testing laboratories. *Nat Biotechnol* 2006;24:1083-1090.
6. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM, et al. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1997;336:823-827.
7. Lubin IM, Caggana M, Constantin C, et al. Ordering molecular genetic tests and reporting results: practices in laboratory and clinical settings. *J Mol Diagn* 2008;10:459-468.
8. Dequeker E, Ramsden S, Grody WW, et al. Quality control in molecular genetic testing. *Nat Rev Genet* 2001;2:717-723.
9. Hofgärtner WT, Tait JF. Frequency of problems during clinical molecular-genetic testing. *Am J Clin Pathol* 1999;112:14-21.
10. Shi L, Perkins RG, Fang H, Tong W. Reproducible and reliable microarray results through quality control:



生物醫學  
BIOMEDICINE JOURNAL