

参考文献

- [1] 李国文, 蔺鹏珍, 张文斐. 慢性肝病伴糖代谢异常 48 例临床分析[J]. 山西医药杂志, 2012, 41(2): 182-183.
- [2] 孙艳丽, 于力, 王雪霏, 等. 200 例慢性肝病血清透明质酸的检测探究[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(3): 18-20.
- [3] 杨清, 张晓娜, 王胜, 等. 激活素 A 检测在慢性肝病诊断中的意义[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(3): 22.
- [4] 洗珍勇, 郑青. 慢性肝病患者血清一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶水平检测[J]. 中国热带医学, 2011, 10(1): 8-11.
- [5] 石亮, 伍利利, 林向阳, 等. 慢性肝病患者血清中的诊断指标临床意义探讨[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(1): 20-21.

(收稿日期: 2012-06-02)

聚合酶链反应实验室污染的发现及处理

毛源, 夏玲芝, 王晶(南京金域医学检验所有限公司基因室 210042)

【关键词】 聚合酶链反应; 实验室; 污染

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.076 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2012)21-2781-02

聚合酶链反应(PCR)是美国化学家 Kary Mullis 于 1983 年发明的^[1]。它用于对靶核苷酸进行体外扩增,产物以指数倍的增加,有着非常高的灵敏度和较高的特异性,从 20 世纪 90 年代中后期在国内医学实验室开始被应用开始,现在已经在临床医学检验方面发挥着越来越大的作用。但是由于其敏感性极高,微量的污染将造成实验失败,尤其是在实验过程中涉及阳性质粒或行 RT-PCR 操作时更易污染^[2]。我国卫生部 2002 年和 2010 年分别颁发了《临床基因扩增实验室管理暂行办法》和《医疗机构临床扩增实验室管理办法》,通过行政手段来规范基因扩增实验室的配置及扩增检测项目的质量,也说明了扩增检测如果控制不当非常容易污染。本实验室有段时间其中一个检测项目发生过污染情况,最后找到原因并进行了处理,把事情经过和处理办法报道如下。

1 实验室情况

1.1 实验室设置 本中心实验室分为试剂准备区、标本制备区、扩增及产物分析区 3 个区。试剂准备区储存 PCR 反应试剂;标本制备区进行标本提取、模板制备;扩增及产物分析区进行 PCR 扩增反应。3 个区相互独立,各区物品单独使用,配置的试剂及反应模板通过传递窗流通。人通过缓冲间气流变化而进行房间内进出。

1.2 使用试剂 检测乙型肝炎、丙型肝炎和一些感染性疾病如 CT-DNA、NG-DNA 等,均使用有国家食品药品监督管理局注册证的试剂盒。

1.3 操作人员 均参加过省临床检验中心的 PCR 专业培训,理论和操作均合格后取得 PCR 上岗证。

2 污染的发现

2011 年 11 月 1 次 HCV-RNA 实验发现,低值、高值质控均在控,NTC 为阴性,标准品也无异常,但发现(0~10E+03)的标本比较多,根据本科室阳性率的统计以及经验,觉得阳性率偏高,结果仍可能有疑问,复查该批实验室的所有阳性标本,结果发现>E+04 的标本结果无差异,但(0~10E+03)的标本 5 个中 4 个变为了阴性结果。由此证明确实有污染存在,但具体污染原因不清楚。

3 污染源的追踪

对于污染,本科室进行原因的追踪,因为质控和 NTC 均正常,而且仍然有阴性的临床标本,所以排除了试剂的污染。

由于污染的结果很低,而且现在的商品化的试剂盒都含有 UNG 酶,而且因为质控和 NTC 均正常,所以由扩增产物气溶胶造成的环境污染对原始模板的污染的可能性较小。本科室

还是在实验室各角落、操作台面、安全柜中放置空管,开盖放置 30 min,加入 500 μ L DEPC₀H₂O 和标本一样处理后检测,结果均为阴性,所以排除环境污染的可能。

主要还是怀疑标本提取过程中的高浓度标本在某个环节造成的污染。加样枪使用的都是带滤芯的枪头,再次验证带滤芯枪头的质量,在 100 mL 纯水中加入 1 mL 蓝墨水,用 20~200 μ L 的加样枪装上配套的有滤芯的枪头吸入超过 200 μ L 的配置好的蓝色液体,蓝色液体没有超过滤芯上面,所以排除了因为加样枪加样而导致的污染。

用 100 μ L 无菌水蒸馏水代替本来验证是否污染发生在加热模块,把 5 份含有 100 μ L 无菌水蒸馏水的 EP 管开盖在加热模块中 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min,之后按标本处理,扩增后检测结果全部为阴性,排除了污染发生在加热模块。

用 100 μ L 无菌水蒸馏水代替本来验证是否污染发生在离心机,把 5 份含有 100 μ L 无菌水蒸馏水的按正常流程处理到需要离心机离心时,开盖在离心机中离心。之后仍按标本处理,扩增后检测结果 5 份中有 4 份为阳性,结果均在 0~10E+03 之间,和最先发现污染的情况相同。所以我们怀疑当初的污染是在离心机中发生的。调查当初实验人员回忆那批实验的情况,当初确实发生了离心时有几个带柱子的离心管在离心过程中开盖的情况发生。

4 污染的排除

确定污染原因后,开始对污染源进行消除,用消毒液擦拭离心机内胆、离心管腔、离心机盖,开盖放置 24 h。第 2 天再次验证开盖离心的纯水标本 5 份,5 份结果均为阴性。由此说明污染已经排除。

5 讨论

PCR 本身高灵敏度的特性加上 PCR 标本提取过程中的多环节性均造成了此方法特别容易造成污染。对于 PCR 临床检测项目有明确的质控要求,但这些质控要求是 PCR 检测项目最基本的质控要求,在一般时候是可以起到监测污染和假阴性的发生,但对于某个环节污染造成的随机误差起到监测的效果有限。在这种情况下,如果实验室标本来源固定,检测方法和人员稳定,某一项目的阳性率也可以起到一定的质控作用,这也是发现 PCR 可能存在污染的重要途径之一。所以在一个成立了很久的临床 PCR 实验室,试剂稳定、人员稳定、标本来源稳定的情况下,尽可能按项目统计每次检测结果的阳性率,如果某次实验的阳性率明显异常,要认真关注一下是否有污染的发生。

PCR 污染产生的原因很多,有时很难找到具体的原因。

所以 PCR 实验室防止污染最好的办法还是预防。研究者应高度认识预防与抗污染的关系,应像预防传染病一样,提高思想认识,以“预防为主,治疗为辅”^[3]。对于实验室的消毒,要做到不遗漏每一个角落,而且每个消毒环节都要做到位。在实际工作中,一般操作台面是最容易污染的^[4],但对于加样枪、加热模块、离心机这些重要环节也要十分注意。本实验室污染原因是由离心机导致的,可能原因是离心机被离心时高浓度标本开盖后产生的气溶胶污染了离心机盖了,再次离心时离心机盖上的气溶胶颗粒在离心机气流作用下进入到开盖的离心管中,进入离心管后再在离心力的作用下进入离心管底部污染标本。所以污染的解决还是严格按照《医疗机构临床扩增检验实验室管理办法》中实验室工作导则规定进行工作,并对实验室内所有设备、台面、空间进行每日消毒,才能真正保证把 PCR 实验

室的污染降到最低。

参考文献

- [1] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:1.
- [2] 蒋会勇. PCR 试验加样过程中无 DNA 原则控制污染的探讨[J]. 诊断病理学杂志,2005,12(1):45-48.
- [3] 杜绍财. 实验加样器污染的解除方法及污染对微孔板杂交的影响[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(7):662-663.
- [4] 李园. PCR 实验室的消毒与防污染措施[J]. 检验医学与临床,2010,7(3):285-286

(收稿日期:2012-06-06)

抗酸染色技术在结核病诊断中的应用

陈华根,陈宇宁,刘冰,黄学斌,陈涛(四川省成都市新都区人民医院 610500)

【关键词】 抗酸染色技术; 结核病; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.077 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2012)21-2782-02

抗酸染色技术是利用一些细菌细胞壁脂质含量高,菌体内有分枝菌酸,被着色后而不易洗脱的原理来检测该类细菌,主要用于检测分枝杆菌属和奴卡菌属细菌^[1]。结核病是由结核分枝杆菌所致的慢性传染病,结核分枝杆菌富含脂质和分枝菌酸,因而可用抗酸染色技术进行检测。自 Koch1882 年发现结核分枝杆菌,并用美兰染色该菌,直到 Ziehl 和 Neelsen 技术采用(Ziehl-Neelsen 抗酸染色),迄今已 100 余年,Ziehl-Neelsen 抗酸染色技术一直是结核病诊断实验室的首选技术。虽然抗酸染色阳性涉及诸多菌种,并非结核分枝杆菌独有特性,但临床上和流行病学中常用查见抗酸杆菌作为结核病诊断的依据^[2]。因此,规范操作抗酸染色技术,掌握技术环节重点,保证检测结果准确,对于结核病的诊断具有重要意义。

1 标本的采集、保存和处理

抗酸染色诊断结核病所用标本有痰液、尿液、脓液、胸腔积液、腹水、脑脊液和病理组织等。标本的采集是抗酸染色的第 1 步,合格的标本是保证染色质量的重要环节。

1.1 痰液的采集 漱口后深咳肺部痰,盛于带旋口的塑料杯内,勿用蜡质纸杯。可采集即时痰、夜间痰和晨痰,晨痰最佳,连续 3 d 送检^[3-4]。如果咳嗽困难,可用雾化吸入、支气管镜刷检、支气管肺泡灌洗方法帮助采集,并能提高镜检阳性率^[5]。镜检阳性率由高到低的标本性状依次是干酪痰、黏液痰、血痰,尽量不用唾液。集菌痰处理法,留取深咳痰标本或 12~24 h 痰,如痰量少且黏稠时加适量蒸馏水(不超过 10 mL),标本经 121 ℃ 高压灭菌 15 min,冷却后使用。

1.2 脓液的采集 注意防止污染菌混入。

1.3 尿液的采集 留全部夜尿,静置 4~5 h 后,取容器底部尿液 10 mL,3 000 r/min 离心 30 min 后,留取沉渣。

1.4 胸腔积液及腹水和脑脊液的采集 处理方法同尿液标本。

1.5 病理组织采集 研磨混匀后涂片。不能及时涂片染色的标本,置 4 ℃ 保存。

2 涂片

合格的涂片是抗酸染色的重要步骤,也是保证染色质量的重要环节。涂片可分为直接涂片法和集菌涂片法,集菌涂片法

有两种方式,即漂浮集菌涂片法和离心集菌涂片法,(1)漂浮集菌涂片法:处理的痰液 5~10 mL 入 100 mL 容积的玻璃瓶中,加蒸馏水 20~30 mL(总量不超过瓶容积的 1/3),加二甲苯 0.3 mL,放振荡机上振荡 10 min(振荡机速率 2 400 r/min),取出平放台上,加蒸馏水至满瓶口,把标号的载玻片盖于瓶口上,放置 15~20 min,取下玻片平放台上。(2)离心集菌涂片法:处理后的痰液 5~10 mL(不超过 10 mL)置入 50 mL 离心管内,加蒸馏水至 50 mL,以 6 000~8 000 r/min 离心 20 min,取沉淀物涂片。

用折断的竹签茬端或接种环,挑取标本于玻片正面右侧 2/3 处均匀涂抹成 2.0 cm×2.5 cm 的卵圆形薄厚适宜的涂膜,自然干燥固定。

涂片的厚度要适当,太薄太厚都会影响镜检。涂片必须使用 95%乙醇擦拭脱脂过的清洁、干燥、无油污、无划痕的新载玻片,一张玻片涂 1 份标本,且一次性使用。

3 染色

抗酸染色法多用 Ziehl-Neelsen 染色,从试剂的配制到环节操作技术,相关技术规范都有明确的要求^[6]。染色步骤如下:涂片平放染色架上,加染色剂盖满涂膜,微火加热至染液呈现蒸汽,去火焰,染色 5~10 min(勿使染液呈现干涸)。水洗,加脱色剂盖满涂膜,脱色 3~5 min,至无红色。水洗,加复染剂盖满涂膜,直接涂片复染 30 min,集菌涂片复染 1~3 min,水洗,干后,镜检。

染色时间要把握适当,温度偏高时染色时间可缩短,反之则相反。脱色时间一定要把握好,脱色要彻底,否则片子呈红色,无法查找抗酸杆菌,但是脱色时间过长,片子呈空白,也无法镜检,要准确把握脱色时间。

也有实验报告认为,恒温水浴染色和常温染色效果优于推荐的染色方法^[7-8]。

4 结果报告和质量要求

(1)镜下计数 100 个视野(观察时间不少于 4 min),未发现抗酸菌者继续观察至 300 个视野,仍未发现抗酸菌者报告抗酸菌阴性(-)。(2)镜检 100~300 个视野找到抗酸杆菌 1~2 条者,报告抗酸杆菌可疑(±),或重新涂片或另留痰标本复查。