

内集合淋巴结和孤立淋巴滤泡,经淋巴管可达肠膜淋巴结及其淋巴组织,并大量繁殖,便可发生类伤寒型症状。

本次菌株分离出沙门菌为肠炎沙门菌 12 株,鼠伤寒沙门菌 9 株,斯坦利沙门菌 6 株,阿贡纳沙门菌 6 株,山夫顿堡沙门菌 6 株,德尔卑沙门菌 6 株,合计占总菌株的 80.0% 以上。其中肠炎沙门菌占 21.8%,与相关报道相符^[5]。55 株沙门菌对 15 种常用抗菌剂药敏实验结果表明,沙门菌对氨曲南、头孢匹美、头孢他啶、头孢曲松、环丙沙星、庆大霉素、亚胺培南、左氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦、复方新诺明等高度敏感,均无耐药现象。这与王丽华^[6]报道的沙门菌对庆大霉素敏感率降到 41.15%,复方新诺明敏感率也在下降不相符,原因可能是存在地区差异或沙门菌的耐药性发生变异。庆大霉素及第一、二代头孢类虽对沙门菌有良好的敏感性,但由于其不易渗入细胞内,故临床疗效差^[7],不推荐使用。环丙沙星、左氧氟沙星等喹诺酮类抗菌剂有良好的细胞渗透^[8],抗菌谱广,敏感率高,临床可参考选用。本组实验对妥布霉素有轻度耐药,但敏感性较强。对氨苄西林、呋喃妥因等药物敏感性较差,已出现较强的耐药性,在实际使用中应尽量避免选用,若不得不选用,也需严格注意其疗效。

• 个案与短篇 •

实时荧光定量 PCR 对乙肝 DNA 检测的影响因素

林 森,易 荣

(湖北省十堰市房县人民医院检验科 442100)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.065

文献标识码:C

文章编号:1673-4130(2012)01-0127-02

乙型病毒性肝炎(下称乙肝)是最常见的感染性疾病之一^[1-2],是由乙肝病毒(HBV)引起的、以肝脏炎性病变为主并可引起多器官损害的一种传染病,是中国当前流行最为广泛、危害性最严重的一种传染病。乙肝血清检测项目有:乙肝三系(又称乙肝两对半);前 S1、S2 抗原/抗体;HBV-DNA 定量测试等方法。实时荧光定量 PCR 技术是将荧光标志技术与 PCR 技术相结合,其检测 HBV-DNA 特异性高、快速、灵敏,故目前作为 HBV 增殖复制主要检测方法^[3-4]。目前,HBV-DNA 检测还没有统一的标准方法,同一份标本、不同仪器、不同试剂检测的结果相差比较大,甚至达到 1~2 个数量级。除了仪器和试剂因素外,实验室条件、标本因素、核酸提取方法等也是非常重要的因素。

1 实验室条件影响因素

临床基因扩增实验室采用 PCR 技术用于临床基因诊断,PCR 技术最大特点是具有较大扩增能力与极高的灵敏度,但令人头痛的问题是易污染,极其微量的污染即可造成假阳性的产生。《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法(卫医发[2002]10 号)》明确规定实验室硬件要求,临床基因扩增检验实验室原则上分为四个单独的工作区域:试剂贮存和准备区;标本制备区;扩增反应混合物配制和扩增区;扩增产物分析区,如使用全自动封闭分析仪器检测,此区域可不设,以及各区配备标准,此外,软件要求包括人员培训和操作规程也做了要求。因此,临床基因扩增检验实验室技术验收和规范化管理是 PCR 技术本身需要,也是在临床上顺利应用该技术的前提。

参考文献

- [1] 洪秀华. 临床微生物学检验[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2004:212.
- [2] 朱超,许学斌. 沙门氏菌属血清型诊断[M]. 上海:同济大学出版社,2009:390.
- [3] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:815-817.
- [4] 乔富渠. 沙门氏菌所致神经系统损害[J]. 右江医学,1983,33(1): 67-68.
- [5] 朱超,许学斌. 沙门氏菌属血清型诊断[M]. 上海:同济大学出版社,2009:133-135.
- [6] 王丽华. 209 株沙门氏菌对 13 种抗生素的敏感性分析[J]. 华夏医学,2000,13(2):101-102.
- [7] 吴财铭,孙延生. 344 株临床常见病原微生物分布及其耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(8):851-854.
- [8] 吴蓉. 泌尿系感染病原体分布及耐药性监测[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):271-272.

(收稿日期:2011-10-10)

2 标本影响因素

2.1 抗凝血的影响 生理状态下,血清或者血浆中是含有基因组 DNA 片段的。在病理状态下,比如肝炎血清或血浆中 DNA 水平增加;感染病毒后也可出现病毒血症。HBV-DNA 检测一般都用血清或者血浆,因为血清或者血浆可以在感染乙肝病毒后出现乙肝病毒 DNA。EDTA 抗凝(紫管)血浆、枸橼酸钠(黑管)血浆都可以做 HBV-DNA PCR 检测。EDTA、枸橼酸钠虽然可以结合 Mg^{2+} ,但是在 PCR 体系中, Mg^{2+} 水平是充足的,不会受到影响。肝素是血液核酸检测常用的抗凝剂,但又被认为 PCR 反应的抑制剂^[5],肝素能抑制聚合酶的活性,极易造成假阴性结果。大量的实验证明,低水平肝素(<100 U/mL)水平对 HBV-DNA PCR 检测结果影响不大^[6]。中、高水平肝素(>500 U/mL)对 HBV-DNA PCR 检测有抑制作用,当肝素水平达 $1\ 250$ U/mL 时,直接煮沸裂解法和 NP240 煮沸裂解法已检测不到高水平 HBV-DNA。

2.2 标本存储的影响 由于标本量的限制以及 HBV-DNA 检测周期较长,大部分实验室不可能做到每天进行 HBV-DNA 检测,更不可能做到标本随到随做,因此,标本存储在 HBV-DNA 检测过程中也非常重要。临床标本中,HBV-DNA 是比较稳定的。室温和冰冻贮存条件下,HBV 标本的 HBV-DNA 水平差异无统计学意义($P>0.05$),即在 DNA 未降解前而干扰物质未大量产生时(如 48 h)的标本不会产生太大差异^[7]。由于细胞内的酶能够降解 DNA,因此,临床标本 HBV-DNA 的储存前提是及时分离血清或血浆。由于 DNA 在室温存在

降解,因此建议临床标本 HBV-DNA 的储存在-20℃以下环境。

2.3 溶血、脂血、黄疸的影响 血红素可以通过其卟啉环与 Taq 酶不可逆结合,从而抑制 Taq 酶的活性,因此从理论上说,溶血标本对 HBV-DNA 的检测有明显的影响。一些实验证明,各种溶血程度的 HBV-DNA 阳性标本进行检测,其结果与未溶血标本差异无统计学意义^[8],原因之一可能是血红蛋白经 100℃ 10 min 后,卟啉环已经被破坏,从而不能与 Taq 酶结合或血红蛋白已经变性,经过离心沉淀后,待测上清液中仅存其衍生物。另一原因可能是在提取核酸前,已先用浓缩液经高速离心沉淀 HBV 病毒颗粒并弃去上清,大大减少了干扰物质包括血红蛋白的水平。

理论上,脂血因素可造成 HBV-DNA 的检测结果偏低,主要原因有:脂血因素导致荧光猝灭,使得荧光信号强度降低;脂肪或其代谢产物能与 Taq 酶相互作用,抑制 Taq 酶的活性,扩增效率明显降低,导致检测结果降低。但许多实验证明,高血脂对检测结果也没有产生影响。黄翔等^[9]通过 PEG 沉淀煮沸方法发现,当胆固醇小于或等于 12 mmol/L,HBV-DNA 检测水平结果与胆固醇的水平不相关,说明 PEG 沉淀煮沸方法能有效地去除胆固醇,扩增效率不受影响。尹琦和徐玉婵^[7]发现,三酰甘油(TG)达 45.96 mmol/L 时,对检测结果也没有产生影响。造成脂血对 HBV-DNA 检测水平结果无影响的原因主要有以下几点:有些核酸提取方法能有效去除此类抑制因子;脂血中,TG 的密度低,血清标本在冷冻或冷藏保存后,经高速冷冻,离心,容易漂浮在上层,在弃去上清的时候可以去除大部分;标本处理过程中的多次稀释,干扰作用变得很小。

胆红素对实验的干扰主要在于其本身的光吸收作用,通过对不同水平胆红素标本的 HBV-DNA 测定,未发现有明显的干扰现象。原因可能也与标本处理过程中胆红素丢失和多次稀释有关。

3 核酸提取方法的影响

临床上采用不同核酸提取方法对荧光定量 PCR 技术检测血清 HBV-DNA 结果和抗干扰能力差异很大。不同 HBV-DNA 核酸提取方法对同一临床标本 HBV-DNA 核酸提取效率差异很大。陈晓东等^[10]认为,磁珠核酸提取法应该作为首选方法,其与直接煮沸裂解法和沉淀煮沸裂解法差异有统计学意义($P<0.01$ 和 0.05);NP240 煮沸裂解法提取效率偏低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。其中直接煮沸裂解法提取效

率最低,与磁珠核酸提取法相差两个数量级。李金明等^[11]发现,在 HBV-DNA PCR 检测时,煮沸裂解法不适合用来处理血清标本,而应使用核酸纯化方法。梅玉峰等^[12]发现,浓缩裂解液煮沸法在 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 四种浓度范围内,比直接裂解液煮沸法测量结果高 20~40 倍。

总之,实时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的影响因素很多,应该做到:实验室硬件和软件要达到要求,实验室要通过上一级卫生部门验收才能使用,从而减少污染;选取合适的核酸提取方法;未能及时做的标本放置在一-20℃以下冰箱保存。2 μL 加样枪的质量也是很重要的因素,2 μL 加样枪不精密、不准确,所得结果重复性和准确性将受到很大的影响。

参考文献

[1] 吴箕,沈佐君.乙型肝炎病毒基因型的中国国内研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(7):703-704.

[2] 梅玉峰,黄敏,陈丽娟. HBV-DNA 阳性乙肝感染者血清学标志物临床分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(9):1004-1005.

[3] 程钢,何蕴韶,周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. 中华医学检验杂志,1999,22(6):135-138.

[4] 周玉宝,刘芳,武易. 慢性乙型肝炎患者血清学指标综合评价[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):165-166.

[5] Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, et al. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells[J]. J Clin Lab Anal, 1999,13(3):133-140.

[6] 陶志华,谢耀盛,周武,等. 不同标本对荧光实时定量 PCR 法测定 HBV-DNA 结果的影响[J]. 临床检验杂志,2001,19(6):345-346.

[7] 尹琦,徐玉婵. 影响 HBV DNA 测定的标本因素[J]. 临床检验杂志,2008,26(4):133-134.

[8] 郭华国,姚正国. 脂血、血红蛋白、胆红素标本对乙肝病毒 DNA 定量测定的影响[J]. 微循环杂志,2006,16(1):32-33.

[9] 黄翔,王晖,周志明,等. 溶血和脂血标本中乙肝病毒 DNA 提取方法的选择与评价[J]. 华中医杂志,2004,28(2):123-124.

[10] 陈晓东,陶志华,周武. 核酸提取方法在聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸中的评价[J]. 中华医学检验杂志,2002,25(4):212-214.

[11] 李金明,王露楠,邓巍. 标本处理对聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸的影响[J]. 中华检验医学杂志,2000,23(6):337-339.

[12] 梅玉峰,黄敏,危艳顺. 浓缩裂解煮沸法在荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 中的应用[J]. 检验医学与临床,2009,6(5):359-360.

(收稿日期:2011-07-20)

(上接第 114 页)

患者无小事,对于每一份检验结果都要重视,它关系到每位患者的命运,因此做到以上几点至关重要,要培养一个合格的医学生,使他们成功地走上工作岗位,实习阶段带教老师的教学是很重要的。因此,带教老师的工作态度、严谨教学及学术观点等对学生的影响也是很重要的。对于检验实习生,严格地做到以上几点,这是以后工作好的开始。

参考文献

[1] 余江,王华忠,何学贤,等. 临床检验实习生的技能带教体会[J].

检验医学教育,2009,16(3):31-32.

[2] 李丽华,申志红,叶丹. 检验科实习生带教方法探讨[J]. 检验医学与临床,2009,6(5):393-394.

(收稿日期:2011-10-08)

我刊刊文周期已大幅缩短,欢迎投稿!