

不同检验方法对慢性肝病的检验结果分析

赵月英(广西壮族自治区贺州市昭平县人民医院检验科 546800)

【关键词】 慢性肝病; 酶联免疫吸附试验; 胶体金层析法; 透明质酸
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.075 **文献标志码:**B **文章编号:**1672-9455(2012)21-2780-02

目前,慢性肝病是世界上一最为常见、最为广泛、危害也最为严重的病毒性肝炎^[1-2],所以,准确而快速地进行诊断,对慢性肝病的治疗以及预后非常重要,已经成为一项重大的研究课题。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本文的研究对象是本院 2011 年 1~12 月的 120 例住院的慢性肝病患者,其中男 72 例,女 48 例,年龄 23~78 岁,平均为 41.9 岁,不包括免疫耐受状态的乙型肝炎病毒(HBV)携带患者和丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)、甲型肝炎病毒(HAV)、戊型肝炎病毒(HEV)等肝炎病毒重叠感染的病例。另外,诊断符合相关规定。

1.2 方法 本文对 120 例患者进行慢性肝病检验时,共采用了以下 3 种方法:第 1 种是乙型肝炎病毒 e 抗原-酶联免疫吸附试验(HBeAg-ELISA)法,这种方法是采用 Personnel LAB 全自动酶标仪来测定的。第 2 种方法是血清透明质酸(HA)测定,其中 HARIA kit 是从其他机构购买的,并把血清 HA≥120 μg/L 设定成异常值。第 3 种方法是胶体金层析法检测,具体操作过程如下:胶体金的制备可以参照 Frens 的制备方法,过程是首先超纯水溶解氯金酸,让它的浓度达到 0.01%,之后取 100 mL 进行加热煮沸,再加入 1%的柠檬酸三钠溶液 1.0 mL,继续煮沸 15 min,当溶液的颜色由白色变成蓝色再变成红色,就成为制备好的胶体金溶液,将其放在室温下冷却备用。将测试条按照吸水滤纸、玻璃纤维滤纸、吸附着干燥的金标鼠抗 IgM 抗体以及硝酸纤维素膜的顺序依次相互重叠,并粘贴在白塑料片上。在完成这些准备工作之后,就可以就行慢性肝病的检验了,把测试条的加样端浸入到用生理盐水(1:10)稀释的待测血清中,深度应该把握在距吸附着金标抗体的玻璃纤维滤纸以下 8~10 mm 处,经过 5~10 min 后来判定结果,如果红色“+”出现,则判定是阳性,如果红色“1”出现则判定是阴性,如果没有红色线条出现,就说明测试条失效了。

1.3 统计学方法 率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

3 种检测方法具有不同的检出率,结果分别是 80.0%、49.6%和 91.6%,差异有统计学意义($P<0.05$)。由此可见,胶体金层析法检测具有很高的灵敏度度,要远远优于 ELISA 和血清 HA 检测,具体情况见表 1。

表 1 3 种检测方法对慢性肝病检测的阳性情况

检测方法	总例数	阳性数	阳性率(%)
HBeAg-ELISA	120	96	80.0
血清 HA	120	59	49.6
胶体金层析法	120	110	91.6

3 讨论

相关研究表明,HBeAg 和 HA 之间存在着密切的关系,当 HBeAg 为阳性时,HA 的异常率则会明显提高,并和 HBeAg 在阴性状态下的测定值存在明显差异。然而,在慢性肝病的检测中,这种方法的检出率并不高。采用 HBeAg-ELISA 进行检测,实践证明在慢性肝病患者中,低浓度 HBeAg 的比例很少,但是近年来却经常发现低浓度的 HBeAg 患者。所以,HBeAg-ELISA 这种检测技术已经落后了,它无法检测出隐性的 HBV 感染与低浓度 HBeAg 的 HBV 感染者。血清检测方法要优于 HBeAg-ELISA,但是同胶体金层析法仍存在一定的差距。胶体金层析法在慢性肝病的检验中应用比较广泛,因为这种检测方法具有方便、快捷和结果准确的多种特性,是目前临床上的一种重要的检测方法。

近几年来,人们经常采用诊断技术,如分子生物学技术来对肝脏疾病进行诊断。聚合酶链反应(PCR)能够检测与鉴定发酵中的一些特定菌,和传统的方法对比,其最大优点就是准确和快速。PCR 技术原理是经过一定程度的加热,让双链 DNA 发生裂解,变成 2 条单链,成为引物以及 DNA 聚合酶的模板,在减低温度之后,让寡聚核苷酸引物和 DNA 分子上的互补序列退火。一般情况下,退火的温度越高,其扩增的特异性就越好。之后,再升高温度,让 DNA 开始合成,通常 DNA 合成的片段越大,其需要的时间就越长。经过以上加热变性双链、引物退火以及链延伸的过程几次往复循环,每一次靶 DNA 都会扩增 1 倍。在 3~4 h 之后,靶 DNA 就会扩增很多倍。如今,PCR 技术能够大大增加 HBV DNA 检测的敏感范围,达到 50~100 copy/mL。

随着人类基因组计划的大力开展,基因芯片的研究迅速发展,对慢性肝病的检验也具有重要的作用^[3]。其中纳米探针有利于慢性肝病病毒的早期诊断以及疗效的提高。纳米探针就是探测单个活细胞的一种纳米传感器,其探头的尺寸是纳米量级的,在它插进活细胞之后,就能够探测出会引发肿瘤的早期 DNA 损伤。同时,采用 DNA 以及一些蛋白质特殊的性质,也可能制造分子器件。当前,学界研究的热点是“分子马达”以及硅-神经细胞体系等。由此可见,利用纳米技术,能够操纵单个生物大分子,这种技术在生物检验医学中具有重要的意义。但是,由于纳米技术的发展尚未成熟,加之多种因素的影响,现阶段在多数医院中并未应用这种技术来检测慢性肝病,行之有效的方法仍然是 PCR 技术。

综上所述,慢性肝病在我国人口中的比例逐渐上升,已经达到了 10%左右^[4-5],因此,及早检测出这种疾病,防止其传播,是非常重要的工作。现阶段,用于检验慢性肝病的方法有很多,如本文中提到的 3 种检验方法,目前在临床上都有所应用,而胶体金层析法的检验效果比较明显,值得推广。

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(南京金城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,现将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 DEPCoH₂O 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 无菌水蒸馏水代替标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 无菌水蒸馏水代替标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。