

HCV-RNA 检测的质量控制分析

宋 丽

(徐州市传染病医院检验科, 江苏徐州 221000)

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.075 文献标识码:B 文章编号:1673-4130(2014)17-2420-02

据世界卫生组织统计,全球丙型肝炎病毒(HCV)的感染率约为 3%,约 1.7 亿人感染了 HCV,每年新发丙型肝炎病例约 315 万例^[1],而丙型肝炎病毒核酸(HCV-RNA)的检测是判断丙肝病毒感染的直接证据。HCV-RNA 的实验室检测操作过程繁琐,影响因素较多。HCV-RNA 检测质量的好坏,将直接影响到疾病的诊断和疗效观察,因此,从事该项检测的实验室要建立一个良好的实验室实践准则(good laboratory practice, GLP),把实验室误差降到最低以便更好地服务于临床。GLP 强调从样品收集到报告发出后解释的全过程质量管理,包括实验条件、检测方法以及人员的管理和控制。从事该项检测的机构必须建立一个合理规范的实验室,该实验室必须通过国家卫生部或省级卫生厅验收合格,实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范,严格分为 4 个区:(1)试剂准备区,(2)标本处理区,(3)模板加入区(扩增区),(4)扩增产物分析区。笔者就所从事的 HCV-RNA 检测细节入手,分析了该检测方法再质量控制时的一些注意事项。

1 实验前质量控制

1.1 标本的采集、储存与运送 抽取患者空腹血液 2~3 mL 于含有 EDTA 或枸橼酸盐的抗凝管内,充分混匀。HCV-RNA 检测受饮食影响,HCV 易与血中脂质及脂蛋白结合,使检出率下降。HCV-RNA 的 PCR 包括 RNA 到 DNA 的转录,第一次 PCR 及第二次 PCR,其中任何步骤的问题均影响其检出^[2]。标本采集后应放在无菌带有盖子的容器中立即送检,因此标本的规范化采集是结果准确性的保证。

1.2 抗凝剂的使用 最好用含有 EDTA 或枸橼酸盐的抗凝管,不能使用肝素抗凝管,因为肝素是 Taq 酶的强抑制剂,且在核酸提取过程中难以去除,容易导致结果出现假阴性。如果用真空分离胶管,标本要放置足够时间,待纤维蛋白全部析出才能离心,因为纤维蛋白影响核酸的提取。

1.3 标本放置时间的影响 采血后尽快分离血,因为 HCV-RNA 放置时间过长,会出现病毒的降解,导致结果假阴性^[3]。标本要长时间保存,应保存于-70℃,并且要避免反复冻融。

1.4 试剂的选择 试剂质量问题是关系到 PCR 实验的成功与否,试剂的质量至关重要,试剂的质量问题涉及多个方面,如细胞的裂解、模板的抽提、引物位点的选择、Taq 酶的活性等等。试剂使用前要完全解冻,少量分装,用多少拿多少,避免反复冻融。

2 实验中质量控制

2.1 HCV-RNA 提取 HCV-RNA 的提取是实验室检测最关键的步骤,主要是临床标本及实验环境中大量存在对 RNA 具有强烈降解作用的 RNase 酶,该酶比较耐高温,不易失活,因而在提取 RNA 时,应避免 RNase 对标本的污染以及防止 RNase 对提取的 RNA 的降解^[4]。具体的解决方法有,离心管,吸头,还有配试剂的容器要高压灭菌。RNase 最主要的污染源是操作人员的手,要求用一次性无尘手套,因此整个实验

过程中要勤换手套,疑为污染,立刻更换手套。HCV-RNA 的提取最好在冰上操作,操作过程中注意吸头不要碰到管底沉淀物,吸取血清或血浆时注意不要吸到红细胞。逆转录成 cDNA 后,最好进行下一步实验,否则要转移上清液至灭菌离心管中,保存于-20℃待用。

2.2 防止气溶胶的污染 实验过程中为了防止气溶胶的污染,必须使用经高压灭菌且带滤芯的吸头,操作时做阴性对照,阳性对照,空白对照,与临床标本同步处理既可验证 PCR 反应的可靠性,又可以协助判断扩增系统的可信性。

2.3 实验室温度的影响 实验室温度应保持在 20~25℃,测定中温度波动范围不大于 0.5℃,否则就会影响实验结果的可靠性。

2.4 严格遵守操作规程 操作人员必须是经过专业培训人员,持有基因诊断上岗证的专业主管,并且具有一定的工作经验。

3 实验后质量控制

3.1 实验结果的判定 本组所用仪器为厦门安普利生物有限公司 GeneLight 9800 荧光定量扩增仪,试剂为广州达安试剂。如果增长曲线不呈 S 型曲线或 Ct 值为空白,则判断样品的 HCV-RNA 浓度小于检测极限。若增长曲线呈 S 型曲线且 Ct 值小于 30,则按以下方法判断:若样品的检测值小于 1.0×10^3 copies/mL,则判样品 HCV-RNA 总浓度即为检测值,若样品的检测值大于 1.0×10^8 copies/mL,则样品 HCV-RNA 总浓度大于 1.0×10^8 copies/mL。如果需要精确定量结果,可将提取后的样品稀释至线性范围内再检测。

3.2 实验结果核对 实验结束后,工作人员要认真核查实验结果,结合患者的临床资料对结果进行分析并发出实验报告。

3.3 废弃物的处理 使用过的离心管、吸头须置于 10% 的次氯酸钠溶液中浸泡,消毒后方可丢弃。实验完毕后,用 10% 的次氯酸钠或 75% 酒精擦拭工作台和移液器,打开紫外灯照射 2 h。

4 小 结

HCV 是导致慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的主要原因之一。大约有超过 75% 的 HCV 感染者发展为慢性感染,HCV 慢性感染和终末期肝病、肝细胞癌变密切相关^[5-6]。尽早诊断和治疗可望终止或延缓病变发展,从而改善患者预后,所以其实验室的检测必不可少。然而影响 PCR 扩增效率的因素很多,例如标本的提取效率、反转录效率的差异、扩增仪孔间温度的差异及各仪器间扩增效率的差异、实验人员操作中的随机误差、试剂之间的差异等等。这些都会影响到测定结果的可靠性^[7]。由于该检测方法烦琐,而且采用的质粒定量标准品不能很好地对样本处理及逆转录过程进行有效控制^[8],还有 HCV-RNA 的检测多为手工操作,操作者的熟练程度与 HCV-RNA 的检测结果密切相关,所以操作者除了严格按照质量控制的要求,更重要的是要有充分的责任心,注意每个实验细节,完善每

个操作步骤,确保检测结果准确无误。

参考文献

[1] Craxi A, Laffi G, Zignego AL. Hepatitis C virus (HCV) infection: a systemic disease[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 85-95.
[2] 谭跃, 黄淑媛, 刘勇. 丙型肝炎病人在治疗过程中 HCV-RNA 含量、血清抗 HCV 抗体及其生化指标的变化[J]. 国际医药卫生导报, 2009, 15(17): 8-11.
[3] 熊玉娟, 周华友. 不同保存条件对丙型肝炎病毒核酸稳定性的影响[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(6): 549-552.
[4] 罗娜, 张劲丰, 苏荣. HCV-RNA 载量与抗 HCV 阳性率及 ALT 异常率的相关性分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(13): 3334-3335.

• 检验科与实验室管理 •

[5] Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients[J]. Hepatology, 2006, 43(6): 1303-1310.
[6] Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection[J]. Int J Med Sci, 2006, 3(2): 47-52.
[7] 邵大晓, 宋琳, 李恒, 等. 内含 HCV RNA 病毒样颗粒的 HCV 荧光定量参考品的建立[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2008, 26(4): 246-248.
[8] 施柏林, 黄竺筠, 崔之础. HCV-RNA 荧光定量标准品制备的研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2010, 31(17): 2764-2766.

(收稿日期: 2014-04-20)

室前因素对检验结果的影响

黄余清

(重庆市奉节县人民医院检验科, 重庆 404600)

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 17. 076

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)17-2421-02

随着现代医学的飞速发展, 实验室诊断技术和水平也越来越高, 准确的实验结果为临床医生诊治患者提供了科学的诊断依据。准确、及时、有效、安全的实验结果对临床诊治患者将产生至关重要的影响, 实验室质量控制也日益受到重视和关注。分析前、分析中、分析后因素的是实验室控制的三个重要内容。分析前因素是指送检医生选择检测项目并开具检验申请单, 患者准备、标本采集、标本运送、等各个环节, 分析前因素决定了标本质量。标本质量是保证检验质量的前提。

1 加强与临床科室的交流与沟通

分析前因素的各个环节往往是由临床医生和护士完成, 而临床医生和护理部门普遍认为检验质量仅仅是检验科的事情, 因此, 加强与临床科室的交流与沟通保证标本质量是保证检验质量的先决条件。需要向临床科室宣传检验科所测项目对标本的要求, 减少各种影响检测结果的因素, 如药物、饮食、运动、禁食时间、各种生理变异等对检验结果的影响, 规范采血操作规程, 掌握采血要领, 让临床采血人员了解标本质量对检验结果的影响, 让患者了解到配合标本采集的重要性。除此之外, 临床医生需要合理地选择检验项目, 开具合格的送验申请单。根据临床实验室管理办法相关规定, 临床医生开具的送检申请单, 要能提供足够的被检测者信息, 至少包括: 患者姓名、性别、年龄、服药史、特殊的病理变化、临床诊断、与检验有关的既往病史、检验项目、标本采集时间、采集时患者状态、是否空腹及空腹时间等相关信息。有文献报道, 医师开出的检验申请单不合格占 15%, 主要是信息提供不全, 从而反映出临床医生对检验申请单的信息完整性不够重视, 应加强与临床医师的交流, 让临床医生配合检验医生, 为检验科提供更多准确的患者情况, 以保证检验质量的准确和可靠^[1]。

2 采集标本前的准备

2.1 采血者的准备 医务人员要熟悉各种干扰因素对实验结果的影响, 在采血前为取得合格标本, 要事先将所测项目的准备要点, 注意事项告知患者, 争取患者的配合并在饮食、起居、活动等方面加以控制。

2.2 患者准备

2.2.1 患者状态 运动和情绪对很多检测项目会产生影响, 有报道血糖升高可由情绪过度紧张引起, 饭后、剧烈运动、寒冷、极度恐惧也会造成白细胞总数和中性粒细胞一过性升高。运动后由于能量消耗, 剧烈呼吸、出汗导致体液量及分布都发生改变, 可造成丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶、肌酸激酶等一过性升高^[2], 因此医务人员采集标本前应嘱咐患者在采血前避免剧烈运动、保持安静。

2.2.2 患者饮食 很多检验项目对饮食有很严格的要求, 由于进食成分, 饮食习惯对标本的化学成分和含量都有影响, 同时血液许多项目的参考值是以空腹血为统计样本^[3], 因此在标本采集前, 医务人员一定要与患者进行沟通, 向患者解释所查项目对饮食的要求, 如进食后可引起血脂和血糖增高, 甚至出现肉脂血症, 高脂饮食后三酰甘油水平是空腹的 10 倍, 因此做血脂检测最好素食 3 d。高核酸饮食可使血尿素氮、尿酸增高, 过度饥饿可引起蛋白质、血糖水平降低, 某些特殊项目的检查如内生肌酐清除率检测前 3 d 禁食肉类, 以免出现外源性肌酐的干扰, 一般主张采血前应禁食 12 h, 采血前 1 d 的晚餐应以清淡为主、禁止暴饮暴食。

2.2.3 服药状况 抽血前应尽量避免服药、输液等情况, 消除某些药物对检验结果的干扰, 例如: 维生素 C 可引起肌酐、尿酸、胆红素、AST/ALT、葡萄糖升高, 脂肪乳可使部分生化项目结果增高^[3], 口服黄体酮成分的避孕药引起血清胆固醇升高, 利尿药增加血钠和血钾浓度, 非那西相、别嘌呤醇、氨基水杨酸、雄激素、环磷酰胺、异烟肼、磺胺药等等可使血清碱性磷酸酶、胆红素、ALT、AST 浓度或活性升高, 吗啡可使血清淀粉酶、脂肪酶、氨基转移酶、碱性磷酸酶、胆红素等升高, 大麻可使血钾、钠、氯、尿素和胰岛素升高, 而使肌酐、尿酸、血糖降低, 药物对检验结果的影响与药物浓度呈正相关, 因此在病情可控的情况下, 应尽量故检验采样时尽量停药对检验结果有影响的药物, 避开血药浓度的高峰期, 临床医生在判读检验结果时亦应充分考虑药物的影响。

2.2.4 烟、酒、茶、咖啡对检测结果的影响 血红蛋白升高是