

续表 3 2015 年医院鲍曼不动杆菌对 15 种
抗菌药物的药敏结果 (%)

抗菌药物	耐药率	中介	敏感率
庆大霉素(GEN)	78.9	0.3	20.8
亚胺培南(IPM)	78.7	0.7	20.6
头孢吡肟(FEP)	79.4	2.3	18.3
妥布霉素(TOB-NM)	78.3	1.2	20.5
哌拉西林/他唑巴坦(TZP)	75.9	3.0	21.1
头孢哌酮/舒巴坦(CSL-ND30)	55.0	17.1	27.9
替加环素(TGC-NM)	5.2	7.8	87.0

3 讨 论

鲍曼不动杆菌是一种不发酵糖类的革兰阴性菌,该菌的高临床分离率和严重耐药性,对免疫力低下患者、危重症患者威胁很大,成为医院感染的重要病原菌,且易在重症监护病房引起暴发流行,给临床治疗带来严峻挑战^[2-4]。

本院检测结果显示,疾病救治过程中侵入性检查破坏了患者呼吸道黏膜屏障,从而容易发生鲍曼不动杆菌感染。不同地区的耐药机制也各不相同^[5-6],各地及各个医院分析鲍曼不动杆菌的分布特征、耐药趋势等,对有效治疗鲍曼不动杆菌感染具有重要的临床意义。本院药敏结果显示对多类抗菌药物已呈现高度耐药性,耐药率高于 75% 的药敏试验有 13 种(占 15 种试验药敏的 86.7%),就是作为首选治疗鲍曼不动杆菌的碳氢霉烯类药敏亚胺培南的耐药率也达到了 78.7%,远高于 2009 年中国 CHINET 报道的 54.8%^[7]及美国 ICU 的 50.0% 耐药率^[8]。有研究表明感染耐碳氢霉烯类药物的鲍曼不动杆菌的患者其病死率高达 70.0%,而感染对碳氢霉烯类药物敏感的鲍曼不动杆菌的患者病死率仅为 25.0%^[9],因此,是否产生了耐碳氢霉烯类鲍曼不动杆菌对患者的治疗效果非常重要。

总之,鲍曼不动杆菌对抗菌药物耐药率升高与不规范使用抗菌药物存在一定关系。我国从 2015 年开始逐步停止门诊输液,就是一个强有力的抓手,然后提高标本送检率和药敏试验,在增强患者机体免疫力的同时,选择多种抗菌药物联合使用,

• 临床研究 •

也可以使用敏感的新药,尽可能地减少或延缓鲍曼不动杆菌耐药性的产生,防止鲍曼不动杆菌在医院内感染。

参考文献

[1] 饶丽华,涂建斌,王艳琴,等.多重耐药鲍曼不动杆菌感染的临床分布及耐药性分析[J].实验与检验医学,2015,33(6):730-732.

[2] 朱德妹,汪复,胡付品,等.2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.

[3] 何建方,沈翠芬,张晓祥,等.临床分离鲍曼不动杆菌的分布特征及耐药谱变迁[J].中国消毒学杂志,2012,29(1):41-43.

[4] 张晓兵,龚雅利,刘智勇,等.鲍氏不动杆菌的临床分布特征及耐药趋势分析.中华医院感染学杂志,2008,18(3):428-430.

[5] 郑卫东,陈娟,郭亮,等.鲍曼不动杆菌耐药性分析及治疗应对策略[J].国际检验医学杂志,2014,35(12):1597-1599.

[6] 彭敬红,黄汉菊,娄国平,等.鲍氏不动杆菌感染病区分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2009,19(2):220-222.

[7] 张小江,徐英春,俞云松,等.2009 年中国 CHINET 鲍曼不动杆菌细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2010,10(6):441-446.

[8] David M,Shlaes D,Sahm C,et al.The FDA reboot of antibiotic development[J].Anti Agents Chemother,2013,57(10):4605-4607.

[9] Spellberg B,Bonomo RA.The deadly impact of extreme drug resistance in Acinetobacter baumannii[J].Critical Care Medicine,2014,42(42):1289-1291.

(收稿日期:2016-08-05 修回日期:2016-10-26)

连云港地区骨髓染色体 R 显带制备技术的影响因素及对策分析

史沛芹
(江苏省连云港第一人民医院检验科 222000)

摘 要:目的 连云港地区骨髓染色体 R 显带制备技术的影响因素及对策分析。方法 应用骨髓染色体 R 显带技术对血液病患者进行核型分析。结果 骨髓标本采集的数量和质量是影响制备成功与否的首要因素,收获标本的顺序,地域季节的差异,温度、湿度变化,操作人员的主观失误等都可导致最后结果的成败。结论 骨髓染色体 R 显带制备技术影响因素众多,其质量的好坏直接决定了核型分析,而染色体的核型分析检查对于恶性血液疾病患者的诊断分型和预后判断都具有相当重要的价值,故其现已成为恶性血液病患者常规检查不可或缺的项目。

关键词:骨髓染色体; R 显带制备技术; 影响因素; 对策分析
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.044 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)04-0542-03

染色体是遗传物质——基因的载体,控制人类形态,生理和生化等特征的基因呈直线排列在染色体上。骨髓染色体核型分析在恶性血液病的诊断、治疗及预后方面发挥着重要的作用。据统计,80%~85% 的白血病患者存在染色体核型异常。2001 年,世界卫生组织修改了造血系统疾病的分型规则,其中把染色体核型分析也作为分型依据,获得细胞遗传学资料对于

确定白血病的分类,决策治疗,判断预后极为重要,这使得染色体核型分析的作用显得更为重要^[1]。染色体 R 显带核型分析其带型鲜明,显带重复性强,除 Y 染色体外,其余染色体末端均呈深带,对揭示涉及染色体末端的缺失和易位特别有价值。特别适用于恶性血液病的染色体核型分析^[2]。

但是由于骨髓细胞染色体的制备到染色体核型分析整个过程复杂,影响因素众多。其中任何一项发生问题,每一步骤,每一环节都可导致最后结果的成败,良好的显带结果便得不到保证。常常出现可分析分裂象少,染色体粗短,且分散不良,带纹模糊不清,难以分析等现象,大大降低 R 带染色体核型分析的成功率,降低了其临床实用性^[3-4]。

1 材料与方法

1.1 标本来源 所有骨髓标本来自连云港市第一人民医院。

1.2 仪器与试剂 仪器为三洋 MCO-15AC 恒温培养箱、上海天平仪器厂 SDC-6 数据低温超级恒温槽、上海安亭科学仪器厂 LXJ-IIB 自动平衡离心机;试剂为 RPMZ 1640 培养液、Earle's 溶液、吉姆萨染液(Giemsa 液)等。

1.3 方法 用 0.2% 肝素抗凝的骨髓标本接种 1640 培养液,采用短期培养法和(或)直接法,收获细胞、滴片、显带、染色、显微镜或电脑下核型分析。

2 结果

在染色体制备技术操作过程中,常见的影响因素及问题:(1)骨髓标本采集的数量和质量是影响制备成功与否的首要因素。主要表现为接种细胞数过多,过少或细菌污染。标本抗凝没及时充分混匀会出现凝块,培养液的酸碱控制不佳,血液病患者多次抽取骨髓量的需要等。(2)低渗和固定顺序颠倒,低渗时间不足。低渗后,预固定前没有及时混匀,细胞固定成团,难以破膜。应用低渗液处理细胞时间的控制。(3)气候季节改变,温度湿度变化,制片时细胞悬液过浓或过淡,细胞堆积,染色体铺陈不开,或细胞过少,没有足够的分裂象可供分析。滴片高度不够或烘烤不及时、不充分均会影响染色体分散和显带质量。(4)显带时间温度把握不佳,致染色体带纹明暗对比不明显,带型难以分析。温度过高则染色体 DNA 变性过头,着色太浅,以致无带;或温度过低染色体 DNA 难以变性,着色太深,同样不显示带纹;染液的比例,染色时间的调整,染的过浓过深,染色体带纹深暗,无明暗对比,显微镜下难以分析;染的着色太浅,镜下难以观察到,容易忽略,造成分裂象分析不足。(5)其他影响因素。操作人员的主观失误,疾病本身的原因等。

3 讨论

染色体的制备方法影响因素众多,每一步骤,每一环节都可导致最后结果的成败,各个地区,各个实验室条件不一,在严格按照操作规程的基础上可根据自身实验室的条件加以改变,找到最适条件下的制备技术。针对以上问题,作者从骨髓细胞染色体标本采集、培养,以及染色等可能影响染色体制备成功率的环节不断进行探讨研究,以期获得更多形态良好、条带清晰的染色体以供分析。

针对病患骨髓标本增生程度不一,接种细胞数过多致营养象对缺乏以致细胞少分裂或不分裂;接种细胞数过少,没有足够的分裂象可供分析。根据要求其细胞的培养浓度浓度以 $(1\sim 2)\times 10^6/\text{mL}$ 为宜。一般当白细胞计数(WBC) $< 2\times 10^9/\text{L}$ 时,骨髓采取量应为 3 mL;WBC 在 $(2\sim 10)\times 10^9/\text{L}$ 时,

骨髓采取量应为 2 mL;WBC 在 $(10\sim 50)\times 10^9/\text{L}$ 时,骨髓采取量应为 0.5 ~ 1 mL;WBC $> 50\times 10^9/\text{L}$ 时,骨髓采取量应 0.2~0.5 mL。这样可以使得培养的细胞浓度处在其最适生长浓度范围中。细胞生长处于最佳状态,分裂指数最高^[5]。抽取骨髓标本前用 0.2% 的肝素充分湿润针筒,及时混匀。针对血液病患者多次抽骨髓量的不足,当外周血中白细胞计数大于 $10\times 10^9/\text{L}$,原、幼细胞数 $> 10\%$,也可采用外周血进行培养。骨髓培养的培养基一般为含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,要求 pH 7.0~7.2。培养基偏酸,则细胞发育不良;偏碱则细胞易于固缩,两者均可导致分裂象减少。接种时注意无菌操作,避免细菌污染而致培养失败。

操作时严格按照顺序先低渗处理,再进行固定。骨髓标本 30 min 为宜,低渗时间过长,会导致细胞破碎和染色体人为丢失,染色体过分肿胀,造成形态结构模糊影响显带;低渗时间过短,则会导致染色体铺展不开,分散不佳。尤其注意在低渗液处理细胞后加 1 mL 固定液进行预固定前要用吸管沿管壁轻轻混匀,防止细胞沉淀,加入固定液后胞膜不易破碎,导致染色体不分散。

细胞悬液以滴到片上细胞均匀平铺分散为佳。因季节温差,连云港地区海洋气候,空气湿度较大,难以把握,带纹明暗对比不明显,边缘毛刺样,可在批次统一滴片后放在 37 °C 温箱中 24 h 后显带,规范化操作可很好地解决此问题。

要求最适的 Earle's 平衡盐溶液 pH 为 6.5,水浴锅温度要求维持在 $(87.5\pm 0.1)^\circ\text{C}$ ^[5-6],标本温育时间和 Earle's 溶液的 pH 呈正比,而和温度成反比。pH < 6.0 ,或温度过高则染色体 DNA 变性过头,着色太浅,以致无带;pH > 7.0 ,或温度过低染色体 DNA 难以变性,着色太深,同样不显示带纹。显带温育时间 60~120 min,实验室应根据自身实验条件找出最佳适合时间。本科通过多次实验选择 70、75、80 min 能获得满意带纹。姬姆萨染色,可自配试剂也可用市售吉姆萨染液 PBS:Giemsa 原液为 10:1,染色前可将染液在 37 °C 温箱预温后再染,很好地解决了季节温差所造成的染色不良。

染色体制备技术属手工操作,步骤繁琐。要求工作人员耐心,细致。严格按照操作步骤,任何一步的操作失误都会影响后面的核型分析,甚至失败给患者造成不必要的痛苦,在这方面应加强操作人员的责任心,要求认真,细致,每一步骤无差错,减少主观失误。对于正在化疗或化疗刚结束的患者,骨髓中化疗药物浓度较高,抑制细胞有丝分裂,此时抽取骨髓易导致染色体培养失败,可建议患者在化疗间歇期末进行检查^[6-7]。另外由于疾病本身的原因,部分患者其标本分裂象少,染色体形态差,可采用两种或以上制备方法可以提高相类标本的成功率。

骨髓染色体 R 显带制备技术影响因素众多,其质量的好坏直接决定了核型分析,而染色体的核型分析检查对于恶性血液病患者的诊断分型和预后判断都具有相当重要的价值,染色体改变是影响其预后的独立因素^[8],故其现已成为恶性血液病患者常规检查不可或缺的项目。尽管荧光原位杂交(FISH)、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)等技术的应用促进了恶性血液病的研究,提高了恶性血液病的染色体异常检出率,从而加强了对疾病异质性的认识。但是这些检测方法只能针对一直的常见的少数融合基因,而不能像常规核型分析那样

能对整个基因组的染色体数目和结构异常同时进行检测。因此这些技术不能完全替代常规的骨髓染色体分析,临床及实验室应视患者情况联合应用,骨髓染色体核型分析仍然是诊断疾病、判断预后及疗效监控的首选,为血液病患者的诊断、治疗、预后、疗效监测等提供重要有效的依据。

参考文献

[1] 张之南,沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:103-115.

[2] 薛永权. 白血病染色体研究:新发现与新进展[J]. 中华医学杂志,2007,87(8):508-511.

[3] 过宇,谢新,卢大儒. 血液病染色体检查失败因素分析[J]. 上海医学检验杂志,1998,13(2):102-103.

[4] 李永刚,朱宝生. 骨髓细胞染色体制备方法的改进[J]. 云

南医药,1999,20(1):21-22.

[5] 张鹏宇,张龙进,罗静. 染色体短期培养法的改良及在白血病患者染色体核型分析中的应用[J]. 西安交通大学学报(医学版),2016,37(2):288-291.

[6] 张玮玮,胡成进. 血液病骨髓染色体制备的影响因素[J]. 实用医药杂志,2012,29(4):369-371.

[7] 薛永权. 谈谈怎样进行镜下染色体核型分析[J]. 诊断学理论与实践,2012,11(5):539-540.

[8] Vardiman JW, Thiele, Arber DA, et al The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rational and important changes[J]. Blood, 2009, 114(5):937-951.

(收稿日期:2016-08-04 修回日期:2016-10-25)

• 临床研究 •

区域化多实验室检测项目测量不确定度综合评估报告

宗春辉¹,赵 辉¹,王远忠²,王玉兰³,李 刚⁴

(1. 山东省泰安出入境检验检疫局 271000;2. 山东省济南出入境检验检疫局 250014;
3. 山东省日照出入境检验检疫局 276808;4. 山东省济宁出入境检验检疫局 272000)

摘 要:**目的** 分析影响测量不确定度的因素,评估实验室检测项目的测量不确定度。依据测量不确定度对测量进行合格评定,进一步提高检验结果的质量。**方法** 采用“自上而下”的方法评定与测量过程相关的实验室检测项目检验结果的不确定度,利用实验室内测量复现性数据评定测量不确定度,利用各实验室提供的各检测项目的质控数据分别计算测量平均值、标准偏差(*s*)和变异系数(*CV*)。**结果** *s*和*CV*在数值上与实验室内测量复现性引入的测量不确定度和实验室内测量复现性引入的相对测量不确定度相等,得出5个实验室各个检测项目的测量不确定度各分量。**结论** 利用从室内质控中获得的测量数据计算出的*s*和*CV*可以真实、可靠地反映检测数据的分散性,依此可以评估检测项目的测量不确定度。

关键词:医学实验室; 测量不确定度; 测量不确定度分量; 标准差; 变异系数

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 04. 045 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)04-0544-02

测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性,与测量结果相联系的参数。测量不确定度的评估在检验医学中越来越多地被应用,用于提高检验结果质量。根据测量不确定度的定义,测量不确定度的大小与评定时所考虑的因素有关。医学实验室中检验结果受到多方面的影响,通过测量不确定度的评估可得知导致结果不确定的主要因素是什么,进而可进行改进。医学实验室中检测项目的测量不确定度影响因素很多,在测量过程中有许多引起测量不确定度的来源,可包括采样、样品制备、样品部分的选择、校准品、参考物质、输入量、所用设备、环境条件、样本状态和操作人员的变更^[1]。当不确定度与检测结果有效性或应用相关,或当客户的指令中有要求,或当不确定度影响到规范限度的符合性时,检测报告中还需要包括有关不确定度的信息^[2]。然而,对医生来说,大多数测量不确定度的数据似乎没有直接的临床价值,但在特定临床机构中它可能有利于患者治疗。对于实验室来说,理解和掌握检测报告的临床应用很重要,如果报告明显影响临床解释和患者治疗,实验室应识别测量不确定度的各种信息。

1 材料与方法

1.1 标本来源 以实验室典型检测项目生化丙氨酸氨基转移酶(ALT)的质控品作为样品,在各次检测试验中均使用该质

控品进行质量控制。

1.2 方法 实验室用于检测该项目的设备全自动生化分析仪,各实验室所用设备厂家型号均为常规所用仪器。实验室各检测项目常规使用的检测试剂,其规格、批号等在实验室内均可溯源。按照 CNAS-TRL-001:2012《医学实验室-测量不确定度的评定与表达》技术报告的指导,经分析实验室各检测项目所使用的检测方法或检测系统,可采用自上而下的方法评定与测量过程相关的实验室检测项目检验结果的不确定度。测量不确定度是经典误差理论不断发展和完善而来的,两者之间存在必然联系^[3-4]。从理论上讲,“自上而下”方法评定测量不确定度是基于正确度和实验室内测量复现性进行测量不确定度评定的方法。偏移(系统误差)和实验室内测量复现性(随机误差)是实验室分析(测量)过程测量不确定度的最重要的两个分量。因此,利用实验室内测量复现性数据评定测量不确定度,使实验室内测量复现性引入的测量不确定度分量为测量复现性与相对的实验室内测量复现性的比值,在量值上是相等的,只是表达的含义不同^[5]。收集5个捆绑实验室典型检测项目的室内质控数据,生化项目选择 ALT。收集各实验室每个检测项目最近的60个室内质控数据,计算标准差(*s*)和变异系数(*CV*)。此时的*s*和*CV*在数值上与实验室内测量复现性引入