

gender on red blood cell distribution width[J]. Clin Chem Lab Med, 2015, 53(2):e25-28.

[11] Lippi G, Salvagno GL, Guidi GC. Red blood cell distribution width is significantly associated with aging and gender[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(9):e197-199.

[12] Qiao R, Yang S, Yao B, et al. Complete blood count refer-
• 临床研究 •

ence intervals and age-and sex-related trends of North China Han population[J]. Clin Chem Lab Med, 2014, 52(7):1025-1032.

(收稿日期:2016-06-28 修回日期:2016-09-18)

肝素抗凝血浆对 HCV-RNA 检测结果的影响分析

陈子祥, 张小利[△], 朱红甜

(南京迪安医学检验所检验科 210001)

摘要:目的 探讨肝素抗凝血浆对 HCV-RNA 检测结果的影响及对策。方法 采用实时荧光定量法(qPCR)检测 68 例丙型肝炎患者的血清、肝素血浆及肝素血浆(稀释后)中 HCV-RNA 水平,并相互比较。结果 血清组 HCV-RNA 水平对数值为(4.24±0.31),血浆(原)组 HCV-RNA 水平对数值为(1.37±0.58),血浆(稀释后)组 HCV-RNA 水平对数值为(3.61±0.33)。结论 肝素对 HCV-RNA 检测有明显的抑制作用,通过用阴性血清稀释能一定程度减少肝素的抑制作用,提高 HCV 的检出水平。

关键词:肝素; qPCR; HCV-RNA; 核糖核酸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.052

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0123-02

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的传染病。虽然多数 HCV 感染者无临床症状,但感染后发展成肝炎的概率很高,有些甚至会转化为肝硬化、肝癌,严重影响人体健康。目前临床用于诊断丙型肝炎感染的主要实验室指标为抗-HCV 和丙型肝炎病毒核酸(HCV-RNA)荧光定量,因 HCV 感染到血清中出现抗-HCV 的窗口期一般在数周左右^[1],甚至有些抗-HCV 持续阴性,不能准确反映患者血液中 HCV 的实时水平,临床更侧重于 HCV-RNA 检测。实验室采用实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测 HCV-RNA,是通过一对特异性引物和一条荧光探针,在碱基和 Taq 酶的参与下,变性、退火、延伸,经 45 个循环,采集荧光信号,达到检测的目的。Taq 酶虽然具有高保真性、耐高温等特点,但其活性很容易受到肝素的抑制^[2-3],干扰 HCV-RNA 的检测,为了评价肝素对 HCV 荧光定量检测的影响,本文对 68 例丙型肝炎患者同时采集肝素抗凝与无抗凝剂血各一管进行 qPCR 分析,并对肝素钠抗凝血用阴性血清稀释后进行 qPCR 分析,来探讨消除肝素干扰的对策,现将结果在报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机收取本所 2016 年 6 月临床诊断丙型肝炎患者标本,每个患者均用无添加剂的干燥真空负压管和肝素钠抗凝真空负压管采集静脉血 3~4 mL,抗凝血颠倒混匀 5~8 次。标本室温静置 1 h 后,3 000 r/min,离心 5min,分离血清/血浆,备用。剔除溶血标本,以排除溶血对测定结果的影响,且标本无脂血、黄疸。阴性混合血清本,为本所近期体检,且乙型肝炎两对半、转氨酶均阴性的无黄疸、溶血标本制成。

1.2 仪器与试剂 肝素钠抗凝真空管由武汉致远公司提供;无添加剂的干燥真空管由北京健峰公司提供。仪器有罗氏 LightCycler 480 qPCR 扩增仪,贝克曼公司 Microfuge 22R 型高速冷冻离心机,杭州博日 CHB-100 恒温金属浴。试剂由上海科华提供,试剂批号为 16012511,质控品由康彻斯坦提供,质控品批号为 201603001。

1.3 方法

1.3.1 模板制备 整个标本提取过程严格按照规范进行。200 μL 待测样本,加入 40 μL 去抑制剂,混匀,5 000 r/min 离心 30 s,置于 70 °C 金属浴中孵育 10 min;5 000 r/min 离心 30 s,加入 220 μL 无水乙醇,充分混匀,5 000 r/min 离心 30 s;将上述液体转移至核酸提取柱,13 000 r/min 离心 1 min,弃废液,加洗涤液 700 μL,13 000 r/min 离心 1 min,加 50 μL 洗脱液,备用。对肝素抗凝血浆,除原血提取模板外,另外通过阴性混合血清 1:10 进行稀释提取 1 份,其他提取过程不变。

1.3.2 测定方法 qPCR 法,总反应体积为 40 μL,反应程序:50 °C、25 min;94 °C、2 min;94 °C、10 s,55 °C、15 s,72 °C、15 s,共 5 个循环;94 °C、10 s,60 °C、45 s,共 45 个循环。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析,所有实验室数据均通过取其反对数 log 值,转换后,进行配对 t 检验,并计算阳性符合率,阳性符合率=检测结阳性例数/临床确诊病例数。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清、肝素血浆(稀释后)、肝素血浆(原)HCV-RNA 水平 采用罗氏 LightCycler 480 qPCR 扩增分析系统检测血清 HCV-RNA、肝素血浆 HCV-RNA(稀释后)、肝素血浆 HCV-RNA 水平对数值数据见表 1。

表 1 血清、肝素血浆(稀释后)、肝素血浆(原) HCV-RNA 水平原始数据

编号	血清 HCV-RNA	血浆 HCV-RNA (稀释后)	血浆(原) HCV-RNA
1	3.4	3.2	0.0
2	4.3	3.9	2.6
3	5.0	4.7	3.1
4	4.4	4.0	0.0
...
65	3.9	3.5	0.0
66	4.3	3.4	2.7
67	4.1	3.6	3.0
68	3.9	3.2	2.1

[△] 通信作者, E-mail:chenzx@dagene.net.

2.2 3 组 HCV-RNA 测定结果比较 首先对 68 例丙型肝炎患者血清、血浆、稀释血浆的 HCV-RNA 测定结果进行对数处理,然后血清组分别与血浆(原)组、血浆(稀释后)组进行比较。血清组的 HCV-RNA 测定结果为 4.24 ± 0.31 ,高于血浆(原)组的 HCV-RNA,差异有统计学意义($P < 0.05$),相关系数 $r^2 = 0.13$,阳性符合率仅 12%;血浆(稀释后)组的 HCV-RNA 比血清组低,差异有统计学意义($P < 0.05$),相关系数 $r^2 = 0.87$,阳性符合率为 93.5%。通过稀释,检测结果较血浆(原)组的 HCV 高,阳性符合率提高 81.5%。见表 2。

表 2 3 组 HCV-RNA 测定结果比较($\bar{x} \pm s, n=68$)

组别	HCV-RNA 水平	95%CI
血清组	4.24 ± 0.31	3.51~5.02
血浆(原)组	1.37 ± 0.58	0.72~3.03
血浆(稀释后)组	3.61 ± 0.33	3.10~4.90

3 讨 论

肝素是一种阴离子物质,肝素抗凝是通过结合凝血因子和抗凝因子 III,达到抗凝的效果,在 PCR 或 qPCR 中,肝素同样会与 Taq 酶产生类似的结合,从而降低了 PCR 反应体系中 Taq 酶的浓度,间接抑制了其活性。有文献报道肝素酶可以有效解决此问题^[4-5],但是因其较贵和不稳定,限制了其在临床检测中使用。笔者根据这一思路,用阴性混合血清来稀释肝素标本,达到降低肝素在反应体系中的水平,最终检测结果乘以稀释倍数。实验数据表明稀释后 HCV 的结果与血清 HCV 结果

• 临床研究 •

间阳性符合率达到了 93.5%,相关系数 r^2 也由未稀释前的 0.13 提高到了 0.87。qPCR 对实验室环境、标本、设施及设备要求比较高,要求用 EDTA 抗凝血或血清标本送检^[6]。若是肝素抗凝血送检,建议采用阴性血清稀释的方法来降低肝素的干扰,但检测的结果会较实际低(影响量可能与肝素残留量有关),结果仅供临床参考,不能作为血液中 HCV 水平或治疗效果评价的依据。

参考文献

[1] 杨静,黄锦江,刘小琦.丙型肝炎病毒核心抗原检测技术的应用评价[J].国际检验医学杂志,2011,32(14):1567-1568.
 [2] 林森,易荣.实时荧光定量 PCR 对乙肝定量检测的影响因素[J].国际检验医学杂志,2012,33(1):127-128.
 [3] 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(2):133-134.
 [4] 陈银,叶逢春,况莹,等.肝素酶的研究进展[J].中国生物工程杂志,2007,27(8):118-120.
 [5] 谭晓青,崔慧雯.以肝素酶为靶点的抗肿瘤药物研究进展[J].药物生物技术,2014,21(6):563-566.
 [6] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2014.

(收稿日期:2016-07-25 修回日期:2016-10-02)

铜绿假单胞菌医院感染分布及耐药性分析

李 强¹,吴正华²

(江苏省盐城市阜宁县人民医院:1. 检验科;2. 医院感染管理科 224400)

摘 要:目的 了解该院铜绿假单胞菌(PAE)的分布及耐药情况,为合理应用抗菌药物和预防控制医院感染提供依据。**方法** 对该院 2010 年 1 月至 2015 年 12 月临床检出的 203 株 PAE 的临床科室分布及对 10 种抗菌药物的耐药性作回顾性分析,采用 DL-96 MIC 法或 K-B 纸片扩散法进行药敏试验,按美国临床实验室标准化委员会(CLSI)标准判断结果。**结果** PAE 的检出以痰标本多见,占 71.92%(146 株);PAE 在呼吸科的检出明显高于其他病区;PAE 对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率最低,为 6.5%,检出泛耐药 PAE(PDRPA)3 株,占 1.48%。**结论** 该院 PAE 的耐药形势 2013 年以后好转,呼吸病房是该院预防控制的重点科室,临床医生应根据标本来源,PAE 的分布和耐药情况,合理选用抗菌药物。

关键词:铜绿假单胞菌; 耐药性; 抗菌药物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.053

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0124-03

铜绿假单胞菌(PAE)是革兰阴性杆菌,属于非发酵菌中的假单胞菌属,是引起医院感染最常见的条件致病菌之一,它广泛分布在自然界环境的水、空气与土壤之中,常定植于健康人皮肤、黏膜、呼吸道、胃肠道等部位,当人体免疫力低下时,往往成为机会致病菌导致医院感染,PAE 是呼吸科、重症监护病房(ICU)医院感染的重要病原菌之一,因其易定植、变异和耐药机制的复杂性等特征,使其成为临床抗菌治疗中亟待解决的难题,国外有报道 PAE 感染病死率高达 5.1%^[1],随着抗菌药物、免疫抑制剂、肿瘤化疗等药物的广泛应用,导致医院感染源、易感人群和感染途径大大增加,使医院感染呈日益严重的趋势。为探讨本院 PAE 医院感染的现状,为临床提供诊断和治疗依据,笔者对 203 株 PAE 及其感染病例进行了临床与实验室探讨,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 2010 年 1 月至 2015 年 12 月,本院各科室送

检的各类临床标本培养出的 203 株 PAE(同一患者相同部位重复分离的菌株仅选 1 株进行统计),其中耐亚胺培南 PAE 25 株。标本来源为痰液 146 份,脓液 25 份,尿液 16 份,血液 15 份,其他标本 1 份。

1.2 质控菌株 PAE ATCC 27853 由卫生部临床检验中心提供。

1.3 细菌培养与鉴定、药敏试验 按照《全国临床检验操作规程》第 3 版进行细菌分离培养,细菌鉴定与药敏试验采用 DL-96 微生物鉴定、药敏系统结合 K-B 纸片扩散法,药敏结果按照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)标准判读结果。

1.5 统计学处理 采用 DL-96 软件和 Microsoft Excel 2007 进行数据录入和分析,分析方法为一般频数分布。

2 结 果

2.1 菌株情况 2010 年 1 月至 2015 年 12 月本院住院医院感染患者感染性标本中共分离 PAE 203 株,标本来源及构成见