



临床检验通讯

2020 年第 2 期

2020 年 9 月 18 日

主办：检验科

主编：陈葳 副主编：王亚文

新型冠状病毒实验室检测专辑

随着新冠病毒的感染爆发，核酸检测方作为新冠病毒检测的“金标准”，得到了大家的普遍重视。实时荧光定量 RT-PCR 法是新型冠状病毒最广泛、最常用的检测方法。设计合格的 PCR 实验室对检测结果的准确性和安全性起到至关重要的作用。全国各市、县、地区医院及第三方检测机构，都纷纷开展此项工作，临床基因扩增检验实验室的建设如雨后春笋，但很多检验人员对实验室建设的核心问题缺乏了解，设计的实验室如何能够满足工作需要，其核心问题是如何避免生物污染和核酸污染。因此，实验室的平面布局、空调通风系统设计、气流控制等都是围绕这个核心问题进行的。本期检验通讯和大家分享一些建设经验和案例，希望给实验室建设的同志们一些帮助。

一、实验室功能分区及各区域防护要点

1. 根据《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》制定《临床基因扩增检验实验室基本设置标准》的要求，PCR 实验室一般由试剂储备区、标本制备区、扩增区、扩增产物分析区 4 个区域组成。

注：PCR 实验室区域的设置并不是一成不变的，以下几种情况需要说明：

- 1.1 如果样本在扩增之前需要粉碎处理，则需要增加一个区域用于样品的粉碎；
- 1.2 如果采用实时荧光 PCR 法，则扩增区和分析区可以合并为一个区；
- 1.3 如果采用全自动化 PCR 分析仪，则标本制备区、扩增区和扩增产物分析区可以合并为一个区。

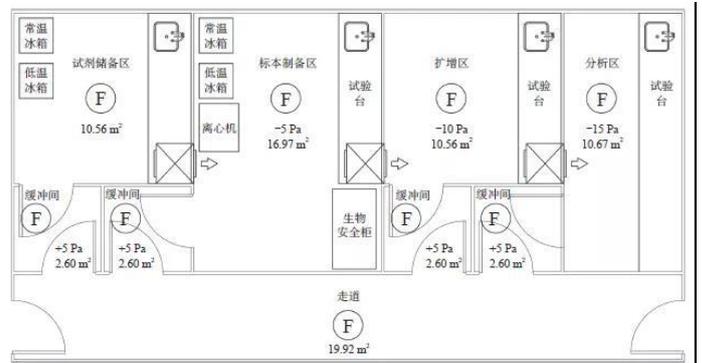


图 1：典型 PCR 实验室工艺平面图

2. 各区实验室功能、设备及防护要点

2.1 试剂储备区

该区域主要完成试剂和主反应混合液的储存、配制和封装工作。所有运送到该区域的试剂和材料不应经过其他区域，试剂和原材料应在本区内储存和制备。本区域的气压应相对外界保持正压。

该区域的设备主要有冰箱、天平、混匀器、低速离心机、加样器、超净工作台、可移动紫外灯等。

本区用于存储试剂和配置反应体系,因此要严防核酸产物及生物污染,试剂盒开封后,试剂盒中的阴阳性对照及标准品应转运至标本制备区冰箱保存。试剂、加样枪、容器及实验耗材要有序存放并做好标记,每日专人按工作量需要取用试剂及耗材,尽量避免人员流动带入的气溶胶污染。

2.2 标本制备区

该区域的功能是样本的保存、核酸提取和贮存、核酸加入扩增反应管。样本应直接运送至该区并储存在本区内,不得经过其他区域。

该区域的设备主要是生物安全柜、加样器、台式高速离心机、台式低速离心机、水浴锅、冰箱、混匀器和可移动紫外灯等。生物安全柜最好选用B II型,所有的吸入气流和垂直气流都经过高效过滤器过滤后排到室外,不再进入生物安全柜循环,可避免提取核酸在柜内反复循环,造成标本之间交叉“污染”,出现假阳性结果。

为了尽最大可能保护操作者,所有的感染性样本必须在生物安全柜里处理。新冠检测在此基础上要求操作者进行三级防护,打开采样管动作要轻柔缓慢,与操作者面部保持距离,尽量缩短打开的持续时间。尽可能避免产生气溶胶。

在防范生物污染的同时,本区还要防止标本间交叉污染,标本核酸模板在提取过程中,加样枪污染导致样本间污染;高浓度样本可随气溶胶或形成气溶胶而扩散,导致样本彼此间的污染;阳性质控品及标准品参与核酸提取过程造成交叉污染,自动化的核酸提取仪由于加温、振动等过程,在操作过程中气溶胶会可能会污染提取仪。由于在本区内加样操作可能产生气溶胶,为避免气溶胶扩散出去对外界造成污染,本区应对外界保持负压;同时本区

相对于扩增区以及扩增产物分析区为正压,以避免从邻近区进入本区的气溶胶污染。这样从实验室设计上杜绝核酸污染。

2.3 扩增区

该区域的功能是DNA扩增和扩增片段的测定。设备主要是核酸扩增仪。其中核酸扩增仪的电源应专用,并配备一个稳压电源或UPS,以防止由于电压的波动对扩增测定的影响。

模板在标本制备区加入反应体系放置传递窗,在本区上机完成PCR扩增,因此本区最重要的防控要点是核酸扩增产物对上游两区的污染,所有反应管绝对不允许打开管盖,机器运行结束后,取出PCR扩增产物用双层橡胶手套包裹扎紧后放入利器盒,密封直接带出实验室高压处理。对于气流压力的控制,相对于邻近区域为负压,以避免气溶胶从本区漏出。为避免气溶胶所致的污染,应尽量减少在本区内不必要的走动。

2.4 扩增产物分析区

该区域的功能是扩增产物的分析。主要设备有加样枪、电泳仪、杂交仪、DNA测序仪、酶标仪和洗板机等。

该区域可能会用到某些可致基因突变的有毒试剂,应特别注意实验人员的安全防护。该区域对扩增产物开盖加样,因此本区属于核酸重污染区,一定要严格防控核酸产物污染。对于气流压力的控制,压力应为最低,相对于邻近区域为负压,以避免气溶胶从本区漏出。为避免气溶胶所致的污染,与实验无关人员均不得在此区逗留,尽量缩短加样时间,减少在本区内的不必要的走动。

3. 人流与物流

3.1 进入实验室区域工作人员应该按照以下路径:

走道→缓冲间→实验区

3.2 工作人员退出实验室的路径为：

实验区→缓冲间→走道

进入各个区域必须严格按照单一方向进行，不同的工作区域使用不同的工作服(例如不同的颜色)。工作人员离开时，不得将工作服带出。这种人员的单向流动可以降低因人员的流动带来的交叉污染风险。所有的物品进入实验区必须经过双扉互锁传递窗，利用传递窗消毒后才可进入，实验室内所有物品也必须经过传递窗才可以传递到实验室以外的清洁公共区。这种物品有组织的单向流动可以降低物品的差错和混淆的风险。

二、PCR 实验室通风空调系统

1. 实验室温湿度要求

不同于血液制品、疫苗等有低温低湿洁净区域的需求，PCR 实验室一般来说对温湿度没有严格要求，考虑实验人员的人体舒适性，环境温湿度的设计参数控制在下表所示的范围内。

参数	冬季	夏季
温度/°C	18~24	25~28
湿度/%	40~70	40~70

2. 空气过滤及气流要求

由于 PCR 实验室在加样操作过程中可能产生气溶胶，为避免气溶胶扩散出去对外界造成污染，同时为了避免各房间之间通过风管系统交叉污染，实验室建议采用全新风系统。新风经热湿处理及三级(初效+中效+高效/亚高效)过滤后送入室内；各房间排风口单独设置高效或亚高效过滤器。

气流组织上，PCR 实验室空调系统通常采用

上送下排式的非单向流送风方式。房间上部送风口尽量均匀布置，且与生物安全柜操作面或其他有气溶胶操作地点的正上方保持一定距离；房间下部利用室内排风夹道上设置的排风口排风，排风口底部距地面 0.1m，排风夹道需设置于室内被污染风险最高的区域，排风口前面不应有障碍物遮挡。

3. 压力需求及控制

根据实验流程，PCR 实验室一般设有试剂储存和试剂准备区、标本制备区、扩增区、扩增产物分析区等 4 个区域，每个区域均设置有独立的缓冲间。

根据《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》的通知，为满足洁污分流和防止交叉感染等要求，PCR 实验室空气流向需遵循单一方向进行，即只能从试剂储备区→标本制备区→扩增区→扩增产物分析区进行，通过对房间的送回(排)风量进行控制，使房间按照工艺设计要求建立相应的压力梯度，从而防止污染物的进入或扩散。

另外，PCR 实验室内通常有生物安全柜、通风柜等生产设备，这类设备排风量大且使用时间有间隔性，并不与空调系统运行时间一致，这就导致有这些设备的房间在设备启停的时候很容易失压，原本正常的压力梯度瞬间就破坏了。这正是 PCR 实验室空调系统设计的难点所在。

4. 典型空调原理图

4.1 基于文中 PCR 实验室的工艺布局，设计出该类实验室的典型原理图，如图 2 所示。

域。尽量减少在实验区内不必要的走动以减少交叉污染的可能性。

6. 实验室要注意风向和各区压力差，相对压差必须遵循从试剂准备区至产物分析区方向由高到低的趋势。

7. 扩增产物分析区是最主要的扩增产物污染源，废液不能在实验室中倾倒，必须经消毒液浸泡消毒后在远离实验室的地方弃掉，用过的吸头等一次性材料也应经消毒液浸泡消毒后统一处理，如焚烧等。扩增产物分析区可能会用到某些可致基因突变和有毒试剂，应特别注意实验人员的安全防护。

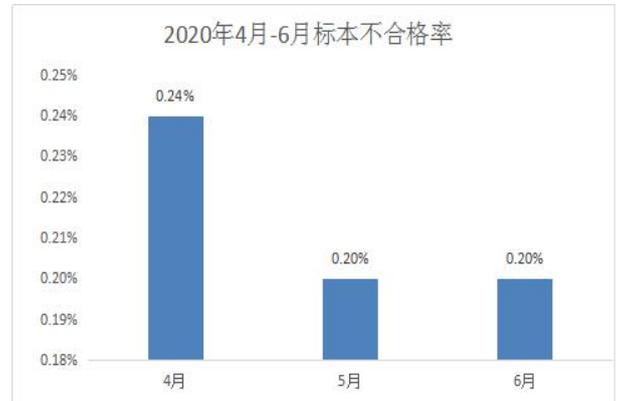
8. 实验室要注意风向和各区压力差，相对压差必须遵循从试剂准备区至产物分析区方向由高到低的趋势。

9. 定期清洁实验室，不同的区各有自己专用的抹布，台面、仪器、吸头盒、桌面、地面等接触面都需用不同浓度的含氯消毒剂擦拭清洗干净，仪器表面用 75% 酒精擦拭，危险区要多清洁，有条件的实验室宜采用全外排式送风。

从 PCR 实验室平面功能分区、实验室设备、人物流线、温湿度、气流组织、压力控制以及典型空调原理图进行了设计分析，提出了 PCR 实验室按照四个区域设计为宜，实验室设备的布置不仅考虑实用，同时要兼顾疏散，人物流要单向流动，温湿度需满足人员舒适度，气流组织和压力控制保证气流单向流动防止气溶胶污染，同时在房间内设定、变风量阀应对生物安全柜开启和关闭时房间的压差扰动。在设计合理的实验室条件下，只有遵循规范的实验操作和严格的实验室管理才能确保实验结果的可靠性和准确性。

四、2020 年第 2 季度不合格标本统计分析报告

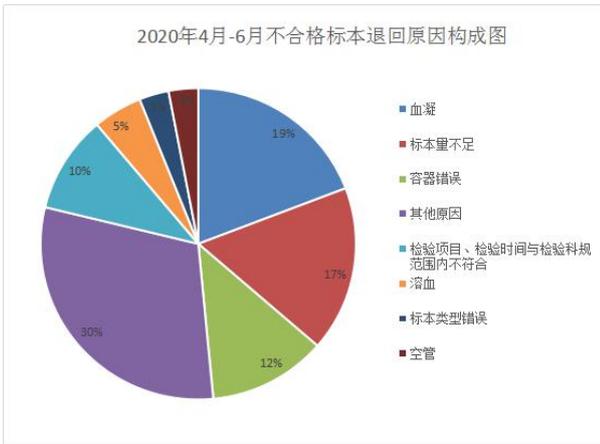
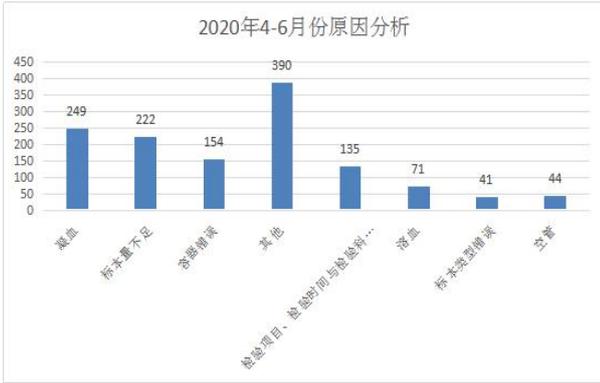
1. 检验科 2020 年第二季度总接收标本总数为 605039 份标本，不合格标本数为 1306 份标本，占总标本比率为 0.22%，其中 4 月接收标本数为 176975 份标本，不合格标本数为 435 份标，占标本的比率为 0.24%；5 月接收标本数为 203725 份标本，不合格标本数为 404 份标，占标本的比率为 0.20%、6 月接收标本数为 224339 份标本，不合格标本数为 467 份标，占标本的比率为 0.20%。



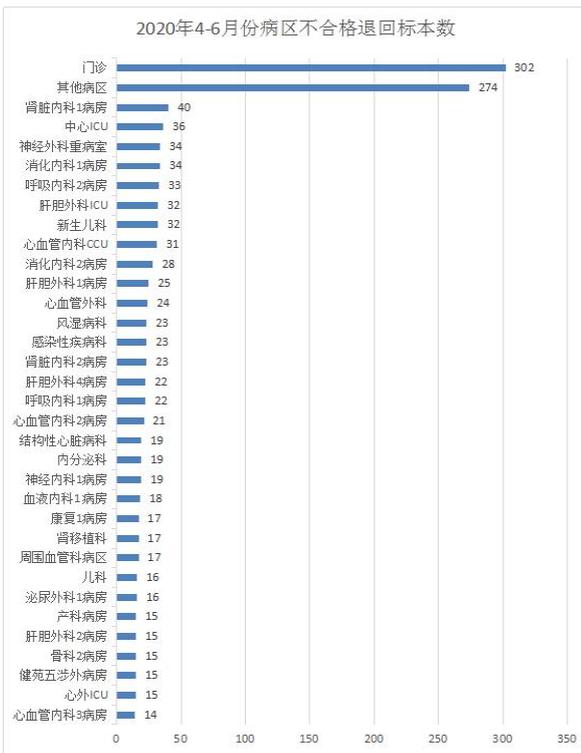
2. 不合格标本原因分析：

在所有不合格标本中，血凝标本 249 份占 19%、标本量不足于检验需要量的标本 222 份占 17%、容器错误的标本 154 份占 12%、检验项目、检测时间与检验科规定范围内不相符的标本 135 份占 10%、肿瘤男女开错条码的标本 21 份占 2%、溶血标本 71 份占 5%、标本类型错误的标本 41 份占 3%、空管标本 44 份占 3%和其他不同原因的标本 369

份占 28%。



4.退回不合格标本前五位科室为门诊，肾脏内科1病区，中心ICU，消化内科1病区和神经外科重症病房。



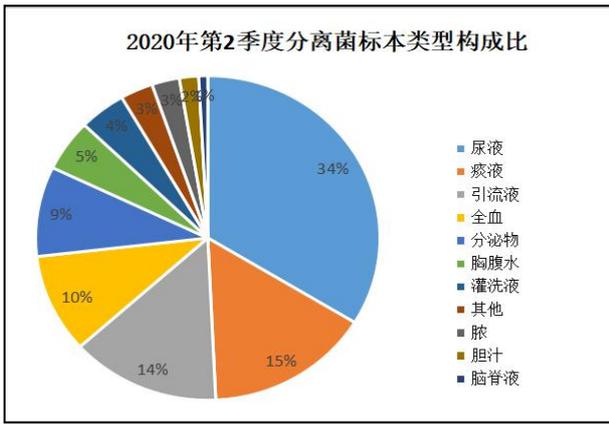
五、2020年第2季度细菌耐药监测

1. 细菌分布

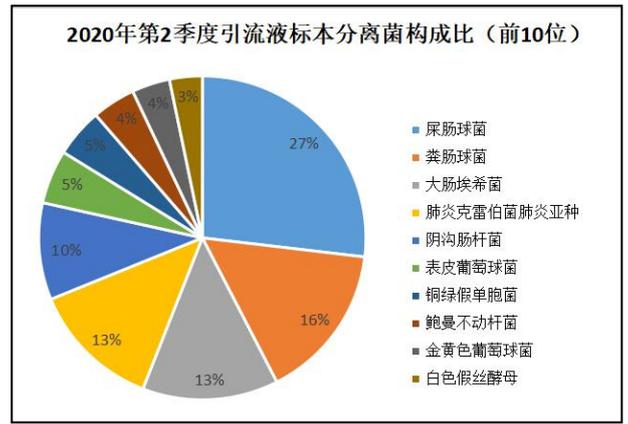
2020年第2季度我院共送检16044份标本，分离出病原菌3336株，非重复性病原菌1886株，分离率11.75%，其中肠杆菌科细菌700株，占37.11%，非发酵菌260株，占13.78%，葡萄球菌301株，占15.95%，肠球菌246株，占13.04%，链球菌82株，占4.34%，念珠菌133株，占7.05%，其162株，占8.58%，其中分离数量位于前十位的细菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌肺炎亚种、屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、表皮葡萄球菌、白色假丝酵母、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌。细菌分布与上季度相比，大肠埃希菌依然位于首位，其余细菌分布变化不大，具体分布见下表。



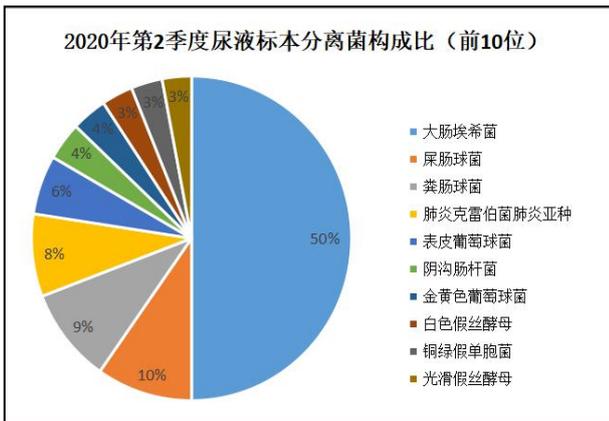
2020年第2季度分离菌分布（前20）



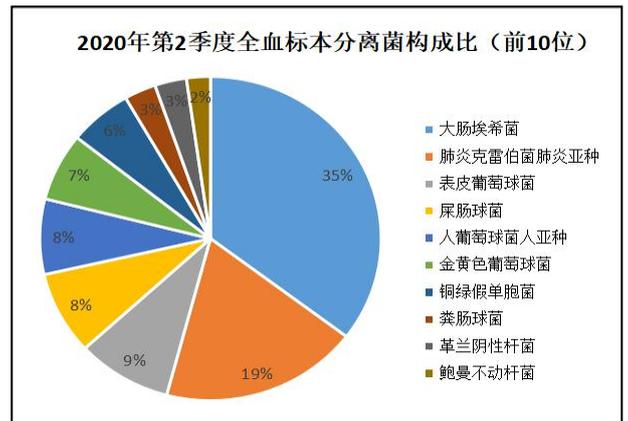
2020年第2季度分离菌标本类型构成比



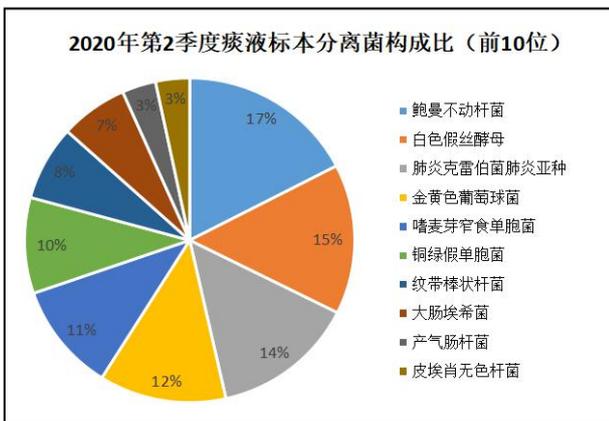
2020年第2季度引流液分离菌构成比



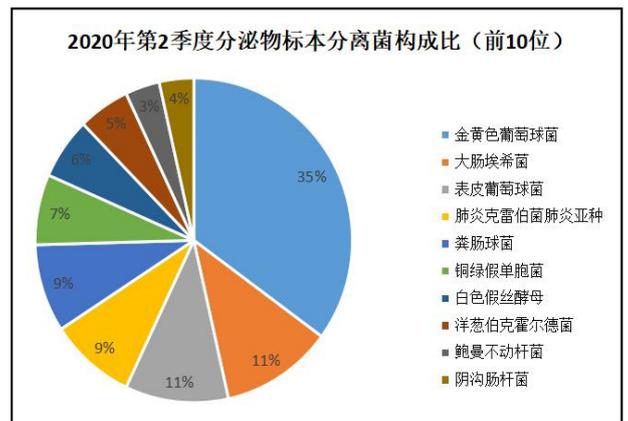
2020年第2季度尿液标本分离菌构成比



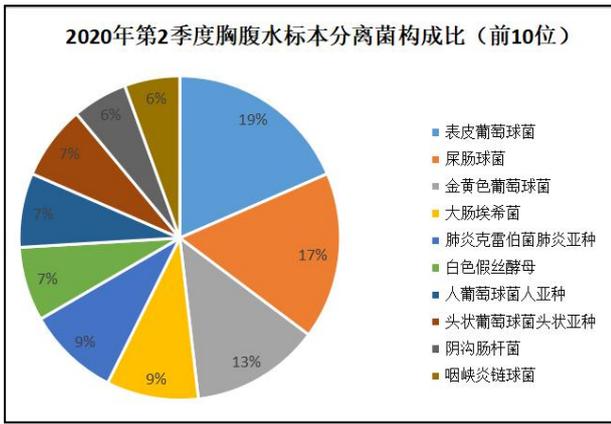
2020年第2季度全血标本分离菌构成比



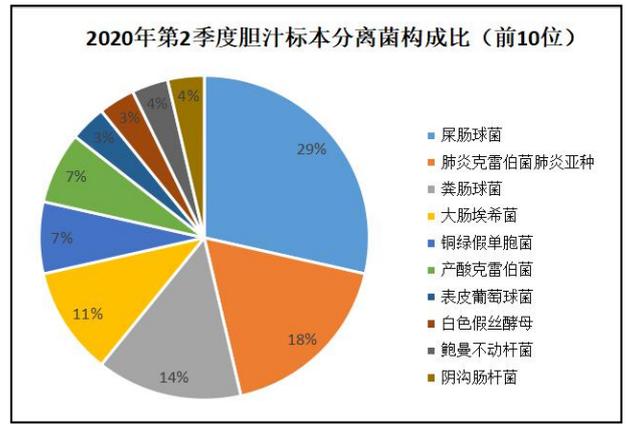
2020年第2季度痰液标本分离菌构成比



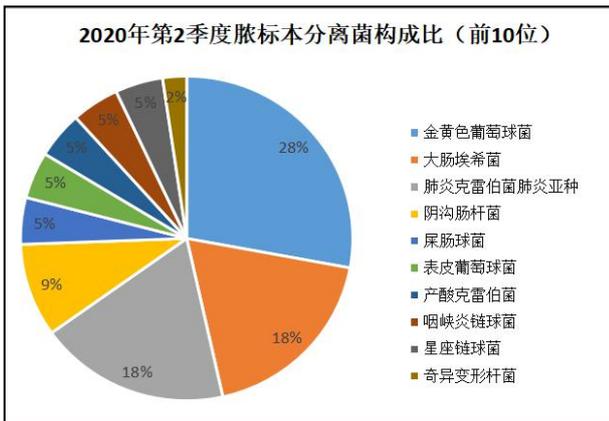
2020年第2季度分泌物标本分离菌构成比



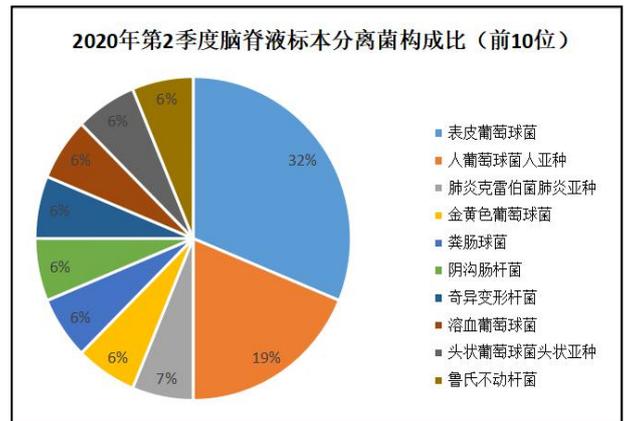
2020年第2季度胸腹水标本分离菌构成比



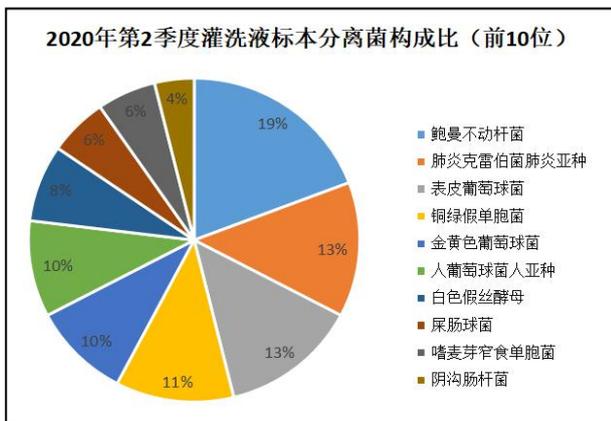
2020年第2季度胆汁标本分离菌构成比



2020年第2季度脓标本分离菌构成比



2020年第2季度脑脊液标本分离菌构成比



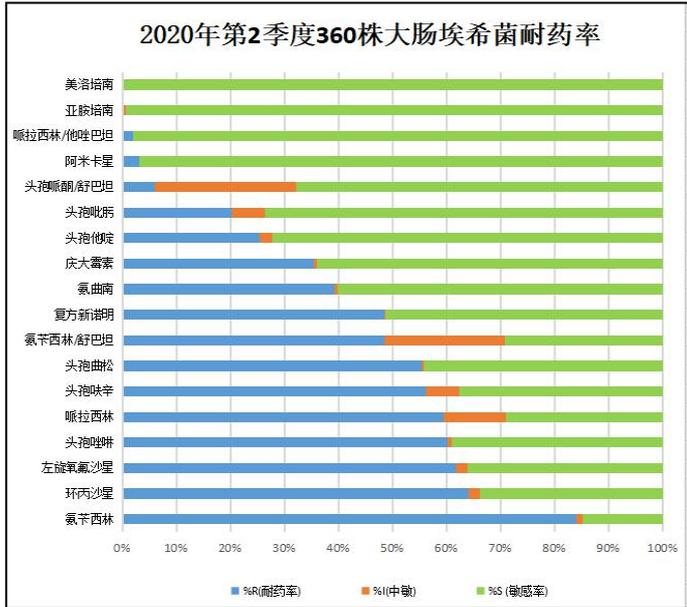
2020年第2季度灌洗液标本分离菌构成比

2. 耐药性分析

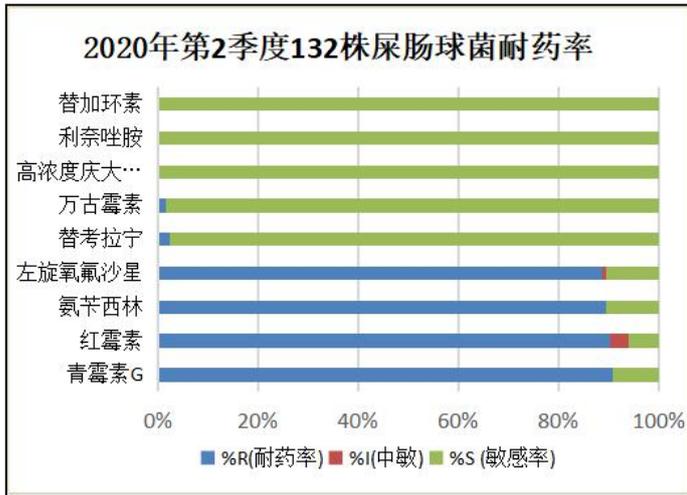
2.1 2020年第2季度主要分离菌的耐药性分析

肠杆菌科细菌中主要以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为主，敏感性较好的抗生素是碳青霉烯类、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星；非发酵菌中主要以鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌为主，鲍曼不动杆菌对替加环素耐药率最低（1.6%），其次是米诺环素（16.7%），对其他常用抗生素耐药率大多在50-90%；铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药率最高（31.1%），对其他抗生素耐药率均小于30%；葡萄球菌中以金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌为主，未发现耐万古霉素及利奈唑胺分离株；肠球菌中以屎肠球菌和粪肠球菌为主，屎肠球菌耐药率远远高于粪肠球菌，耐利奈唑胺粪肠球菌检出率（4.2%）

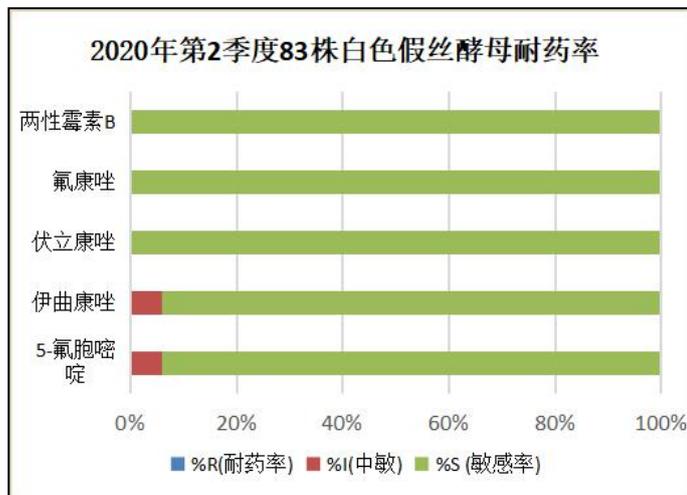
与上季度相同；各分离菌耐药率见下图。



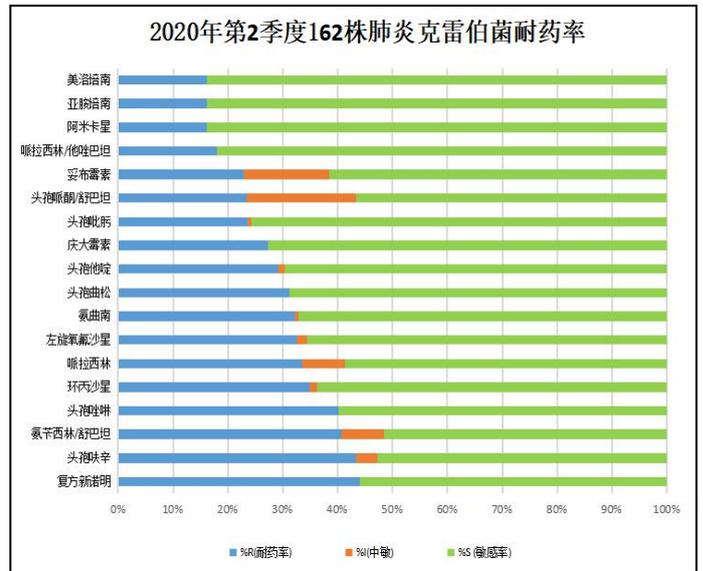
2020年第2季度大肠埃希菌耐药率



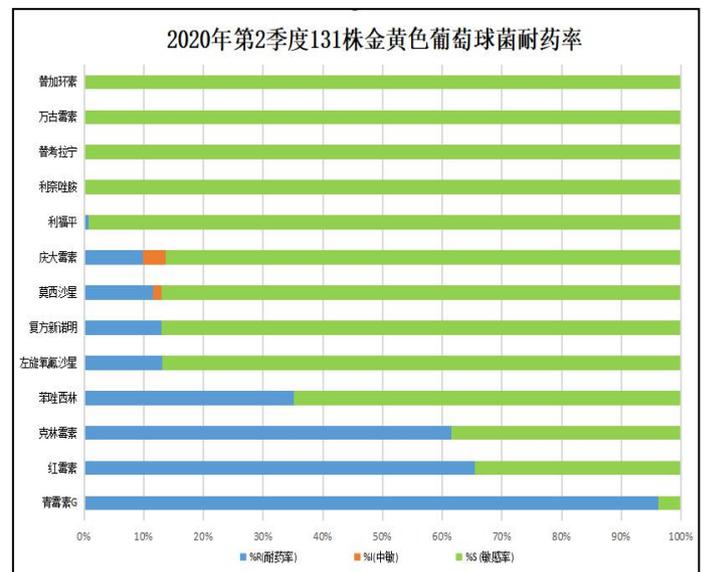
2020年第2季度屎肠球菌耐药率



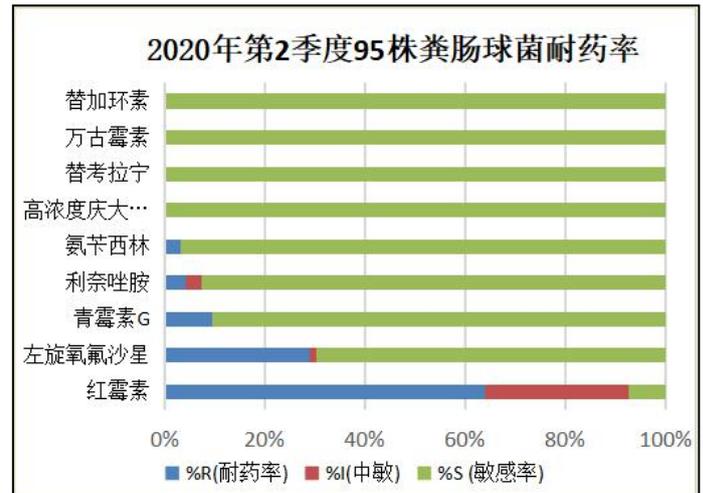
2020年第2季度白色假丝酵母菌耐药率



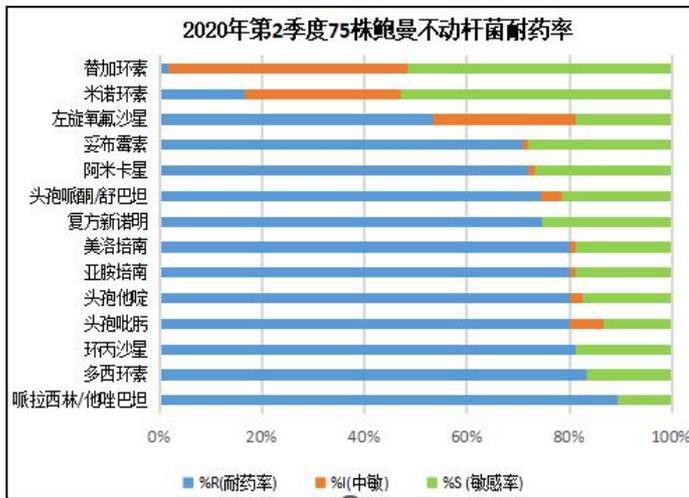
2020年第2季度肺炎克雷伯菌耐药率



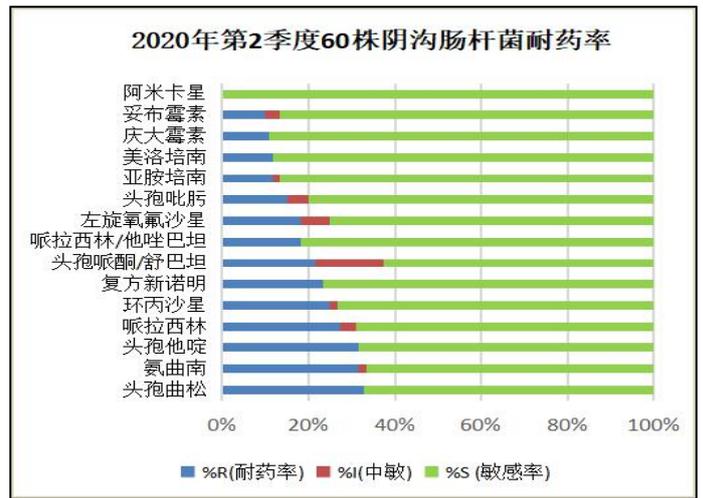
2020年第2季度金黄色葡萄球菌耐药率



2020年第2季度粪肠球菌耐药率



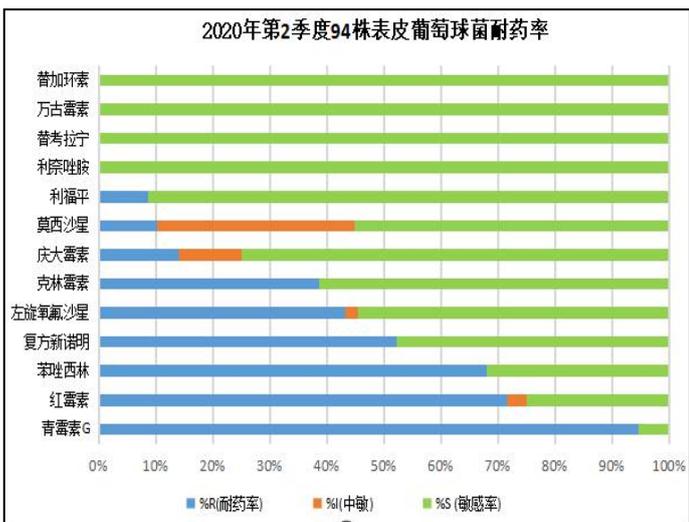
2020年第2季度鲍曼不动杆菌耐药率



2020年第2季度阴沟肠杆菌耐药率



2020年第2季度铜绿假单胞菌耐药率



2020年第2季度表皮葡萄球菌耐药率

2.2 多重耐药分析

根据监测数据：大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 的检出率分别为 55.5%和 31.2%，大肠 ESBLs 检出率比上季度有所下降，肺炎克雷伯菌 ESBLs 检出率比上季度有明显上升；CRE 检出率分别 0.3%和 16.1%，CRE 大肠比上季度下降 1%，CRE 肺炎克雷伯菌比上季度下降 3.5%，第 2 季度检出 CRE46 株，以肺炎克雷伯菌为主，肝胆 ICU、肾移植、肝胆外科、康复科检出 CRE 例数分别为 8 株、5 株、5 株、5 株；耐碳青霉烯类 CR-AB 和 CR-PA 检出率分别为 80%和 31.1%，CR-AB 和 CR-PA 检出率均比上季度有所上升，CR-AB 主要集中在中心 ICU、肝胆 ICU、心外 ICU，CR-PA 主要集中在肝胆外科、肝胆 ICU、中心 ICU；金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌 MRS 检出率分别 35.1%和 68.1%，金葡和表皮葡萄球菌 MRS 检出率均比上季度有所下降。多重耐药菌检出率见下表。

时间 耐药类型	2020 年第2季度 检出率% (本季度)	2020 年第1季度 检出率% (本季度)	2019 年第2季度 检出率% (去年同季 度)
E.Col (大肠杆菌)	0.3	1.3	1.5
CRE (肺炎克 雷伯菌)	16.1	19.6	29.9
CR-PA	31.1	26.1	29.3
CR-AB	80	77.8	88.7
MRSA	35.1	39.3	35.6
VRE	1.5 (尿肠) 0 (粪肠)	0.9 (尿肠) 0 (粪肠)	0.7 (尿肠) 0 (粪肠)

时间 耐药类型	2020年第2季度检 出率% (本季度)	2020年第1季度检 出率% (本季度)	2019年第2季度检 出率% (去年同季度)
CRE (大肠杆菌)	0.3	1.3	1.5
CRE (肺炎克雷伯菌)	16.1	19.6	29.9
CR-PA	31.1	26.1	29.3
CR-AB	80	77.8	88.7
MRSA	35.1	39.3	35.6
VRE	1.5 (尿肠) 0 (粪肠)	0.9 (尿肠) 0 (粪肠)	0.7 (尿肠) 0 (粪肠)

责任编辑：曾晓艳

不合格标本分析：雷静晶

细菌耐药监测统计分析：李雯

细菌耐药监测审核：雷金娥