

临床分子诊断检验技术教学带教经验 思考与实践

陈久凯 谢在春 张战锋 庞志宇

作者单位: 510405 广东广州, 广州中医药大学第一附属医院检验科

通信作者: 庞志宇, Email: smilepzy@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2024.04.022

【摘要】 随着临床分子诊断检验技术在精准医学、肿瘤个体化、药物个体化、急危重症感染诊断中的应用, 未来或将成为主流检验学科。作为比较新的医学检验分支学科, 一些检验项目的开展尚处于起步阶段, 受临床普及应用的限制等因素, 实习单位和带教老师对本学科实习带教重视不够。实习带教单位如何做好学科建设和实习平台建设, 如何丰富实习内容培养实习学生, 如何提高实习效果是每位带教老师需要思考的问题。该文将临床分子诊断检验工作经验与医学检验学生带教工作相结合, 从临床基因扩增工作的岗前培训与完善教学资源和提升教学水平、将无核酸污染思维融入带教、重视操作流程和细节以提升实习效果以及指导带教检验结果的判读并提升解决问题的能力等方面, 为医学检验实习带教工作提供经验和启示。

【关键词】 实习带教; 临床分子诊断; 医学检验; 基因扩增实验室; 聚合酶链反应

Reflections and practice on teaching experience of clinical molecular diagnostic testing technology

Chen Jiukai, Xie Zaichun, Zhang Zhanfeng, Pang Zhiyu. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

Corresponding author: Pang Zhiyu, Email: smilepzy@163.com

【Abstract】 With the application of clinical molecular diagnostic testing technology in precision medicine, tumor individualization, drug individualization and diagnosis of acute and critical infections, it may become the mainstream laboratory discipline in the future. As a relatively new branch discipline of medical laboratory, some laboratory items are in the initial stage of development. Due to factors such as the limitations of clinical popularization and application, internship units and teaching instructors do not pay enough attention to the internship teaching of this discipline. How internship teaching units could do a good job in discipline construction and internship platform construction, how to enrich internship content and train internship students, and how to improve internship effectiveness are issues that every teaching instructor needs to think about. This article combines the work experience of clinical molecular diagnostic testing with the teaching work of medical laboratory students. This article will provide experience exchange and inspiration for improving medical laboratory internship teaching work from aspects such as pre-job training for clinical gene amplification work and improving teaching resources, enhancing teaching levels, integrating nucleic acid-free contamination thinking into teaching, focusing on operation processes and details to enhance internship effectiveness, guiding the interpretation of teaching and testing results, and enhancing the ability to solve problems.

【Key words】 Internship teaching; Clinical molecular diagnosis; Medical examination; Gene amplification laboratory; Polymerase chain reaction

临床基因扩增实验室是医院检验科亚分类学科实验室, 在临床检验中的作用越来越重要, 主要用于感染性病原微生物的检测、耐药基因检测、遗传性疾病基因检测、肿瘤的精准医疗和个体化用药基因位点检测、无创产前筛查等领域^[1]。临床分子诊断检验技术不仅在疾病的诊治中发挥作用, 也在公共卫生突发事件中具有重要作用, 如对甲型流感病毒和乙型流感病毒核酸进行检测。随着实时荧光定量

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、恒温扩增技术、高通量测序技术、数字 PCR 技术、液滴连续微流控 PCR 技术等临床分子诊断技术的快速发展和成熟应用, 该类诊断技术已成为医学检验技术发展的前沿方向^[2]。分子诊断是医学检验技术的一个新的重要分支领域, 专业性强且发展迅速, 该技术对检测环境、技术人员和仪器都有着更高的要求。医学检验技术专业实习学生在校通过课本

学习到的只是理论知识,而在医院检验科临床基因扩增实验室实习,积累临床分子诊断学实践操作技能是一名医学检验专业学生独立走向工作岗位必不可少的过程。目前,医学检验技术专业实习学生存在不能熟练掌握实验操作技能、用理论知识分析解决临床问题的能力不足、对新知识和新技术的学习不足以及对检验结果的判读学习不足等问题。本文通过探讨检验科临床基因扩增实验室分子诊断工作带教体会,阐述医学检验实习学生的带教问题和经验,为学生毕业后从事分子生物学检验工作打下扎实的基础。

1 注重岗前培训,打好实习基础

1.1 岗前培训的必要性和重要性 在进入临床基因扩增实验室正式工作前,中青年工作人员需要进行岗前培训学习,根据法律法规要求,临床基因扩增实验室开展的基因检测由国家卫生健康委临检中心负责管理。在广东省,人员进入医疗机构临床基因扩增实验室工作前需要参加广东省临检中心举办的岗前培训,并取得合格证。

随着分子生物学技术的发展,分子诊断技术被越来越广泛地应用于临床检验工作中,实习学生未来将越来越多地从事临床分子诊断工作。近年来越来越多的实习学生选择毕业后读研深造,而在科研和学习中也需要用到分子诊断技术。因此,在本科阶段提前进行临床基因扩增实验室岗前培训是有必要和有前瞻性的^[3]。

对实习学生进行岗前培训可以提升检验科作为实习带教单位的教学质量,创新教育教学新方向,打造先进的实习带教团体。岗前培训能在短时间内集中提高检验技术人员的理论知识水平,为进入临床工作岗位打下坚实的基础,在岗前培训中快速掌握临床技能操作理论知识,使参加培训的人员能快速适应工作。医学检验专业实习学生在学校学习的是临床分子生物学的基础理论,对临床检验技能操作理论知识掌握匮乏,理论联系实际和分析解决问题的能力以及基础知识的储备都不够。因此,与进入临床基因扩增实验室工作的带教老师一样,医学检验实习学生也需要进行岗前培训学习。

1.2 岗前培训内容 岗前培训的内容应重点介绍分子生物学检验技术的特点,比较分子诊断技术与其他检验技术的区别,提升医学检验专业实习学生对分子诊断技术的理解,如分子生物学的敏感度和特异度、方法的优点和缺点、分子生物学目前应用

于临床的检验项目、检验项目的临床意义以及分子生物学技术应用于科研的现状和前景,使学生对分子诊断技术有全面的了解^[4]。

临床基因扩增实验室的岗前培训内容包括标本的采集、储存、运输,实验室的规章制度,实验室的设计构造,实验室目前开展的检测项目,不同分区房间的使用功能,每日工作内容和 workflows,实验仪器的操作使用,“无核酸、无污染”的概念,临床基因扩增实验室仪器检测的基本原理和方法,分子诊断技术应用于临床的发展前沿技术方法等内容。通过岗前培训可使学生快速了解本科室临床基因扩增实验室,除了本科室的岗前培训内容,还可参考临床基因扩增培训班的学习内容,扩展培训范围。

2 完善教学资源,提升教学水平

2.1 目前教学中存在的问题 在检验科临床基因扩增实验室成立并取得临床基因扩增实验室资格后,开展的检验项目较少,因此实习学生的实践操作机会少,动手能力较弱。① 临床分子诊断学是一门年轻的学科,临床基因扩增实验室的中青年教师存在经验不足问题,不能准确把握带教的内容和深度。② 临床基因扩增实验室的检测项目人工操作步骤多且复杂,对操作者的动手能力要求较高,短时间内无法培训实习学生达到操作要求。③ 实习学生在检验科临床基因扩增室的实习时间较短,即使学生的学习能力很强,由于在临床基因扩增室的轮转时间短,也有可能带教老师缺乏足够的带教动力和热情。④ 由于临床需求少,开展的检测项目不多,临床科室对项目不熟悉,标本量少,本着严格检验质量控制(质控)的原则,大部分操作由带教老师完成,实习学生大部分时间只是观摩,或参与标本离心编号和录入实验室信息系统等工作,实际动手进行检测操作的机会较少。

2.2 问题的解决方法 针对以上问题,本实验室做出教学改革和临床基因扩增实验室的发展改革,包括到临床科室调研,根据临床检测需求由检验科讨论和论证,增加检测项目,丰富教学资源和仪器设备等。随着临床分子诊断技术的成熟,检验试剂成本大幅下降,使临床教学资源得以丰富,临床检测项目由以前的常规乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV) DNA 和丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV) RNA 定量、人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)分型和定量、地中海贫血(地贫)基因、EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV) DNA、结核分枝杆菌 DNA 检测,增加了 HPV

分型、HPV 低危型和高危型定性、沙眼衣原体 DNA 定量、上下呼吸道病毒核酸、细胞色素 P450 同工酶 (CYP2C19) 基因、亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 基因、线粒体乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase, ALDH) 基因检测。本着提升实习学生实践技能和动手操作能力的目的,在保证临床标本检验质量的前提下,放手不放眼,鼓励实习学生多动手操作。随着常规临床标本量的增多,新检验项目的开展以及新检测技术和仪器的使用,带教老师的带教经验不断丰富,实习学生不仅能参与标本检验前的采集运输和标本的实验室信息系统录入,还能熟悉检验项目和仪器的标准作业程序 (standard operating procedure, SOP),学习检验结果的分析和结果的临床意义等。针对中青年带教老师带教经验不足的问题,通过传帮带、以赛促教以及完善责任管理制度、带教考核制度、年度优秀带教老师评比制度,提升中青年老师的带教水平,加强教学建设。

3 认识临床基因扩增实验室环境,将“无核酸”思维融入带教工作

临床基因扩增实验室对环境的要求比较严格,PCR 作为临床基因扩增实验室最常用的检测技术,可以在短时间内将模板核酸扩增至数百万倍,因此具有较高的敏感度,但是高敏感度带来的问题是容易产生核酸污染,污染可存在于物体表面或者以气溶胶的形式存在于空气中,一旦污染就容易产生假阳性结果,影响检验质量。虽然污染难以消除,但可以有效预防,因此,在实习带教中,如何将“无核酸、无基因”这一重要工作理念融入课堂教学^[5-6],做好临床基因扩增实验室的质控管理工作,是分子诊断检验带教老师的重要教学内容。

实习学生进入临床基因扩增实验室之前必须了解实验室的设计分区以及因地制宜、方便工作的理念,一般临床基因扩增实验室分为试剂配制区、样本制备区、扩增区、产物分析区,理解分区工作的意义,根据每个区域的核酸有无以及多少,树立临床基因扩增实验室的清洁和污染概念。气流从试剂准备区的正压区流向产物分析区的负压区,清洁空气的流向是从试剂准备区到样本制备区,再到扩增分析区,最后流向产物分析区。每个区域的实验物品(如加样枪、耗材、清洁工具等)严禁互换混用,防止不同分区相互污染。工作人员进入不同区域工作时应更换对应工作区的实验服,防止核酸污染。为保证

检测质量可靠,实习学生进入临床基因扩增实验室前应充分了解临床基因扩增实验室的工作环境和操作流程,避免无意识造成严重污染,影响工作进行和结果的准时报告。

由于污染来源于阳性样本、阳性质控品、扩增产物,实习学生在提取样本时需要掌握的技能有:① 使用自动核酸提取仪提取样本和阳性质控品时应及时更换搅拌套,在实验前后擦拭清洁提取仪;② 采用加热裂解法人工提取核酸时容易引起 EP 管盖爆开,造成阳性样本气溶胶污染;③ 注意潜在高浓度阳性样本和其他样本的交叉污染,避免手套接触阳性样本和加样枪沾染阳性样本引起的交叉污染。在分析临床基因扩增产物时,实习学生需要掌握的技能有:① 实时荧光定量临床基因扩增检测无需开盖,污染可能性较低,但扩增反应的八联管会因加热导致管盖爆开,引起扩增产物泄露;② 在临床基因扩增反应后需要开盖进行产物分析的操作中,应避免开盖操作可能引起的环境和手套污染,掌握开盖方法,用左手开盖,右手关闭盖子,避免左右手交叉开关盖子引起的交叉污染;③ 污染处理也是临床基因扩增实验室培养实习学生“无核酸、无基因”思维的关键,无论是样本提取还是扩增产物分析,一旦出现潜在标本泄露,均应当作阳性标本处理,沾染手套和污染实验服需及时更换,漏洒在物体表面或地面需用次氯酸和水反复擦拭清洁,如出现气溶胶污染,需进行紫外线照射以及开窗通风,消除污染。在临床基因扩增实验室工作,只有将“无核酸、无基因”的思维融入每一个工作环节,才能避免假阳性结果,保证检验结果真实可靠。“无核酸、无基因”的思维有利于实习学生以后顺利进入工作岗位,也为读研后进行临床分子生物学实验打下坚实的实践基础。

4 熟悉工作流程,注重实验操作,提升实习效果

虽然临床分子诊断学的快速发展使现代医学检验技术飞速发展,但由于其样本多样性且操作复杂的限制,不能像生化分析仪一样进行全自动分析检测,且大部分样本需要根据试剂盒说明书手工操作提取核酸,实习学生有更多动手操作的机会。临床基因扩增实验室标本的基本检测流程为标本分类、标本编号、核酸提取、扩增反应液配制,然后将加入提取的核酸模板转移至实时荧光定量临床基因扩增仪扩增,或使用普通 PCR 扩增仪进行扩增电泳或膜杂交分析,最后分析报告结果,处理已检测标本。根据标本的类别不同,实习学生需了解不同标本的

前处理方法,分类处理采集保存的标本:使用宫颈分泌物标本检测沙眼衣原体 DNA 和 B 族链球菌 DNA,要先将拭子上的脱落细胞洗脱浓缩;使用血液标本检测 HCV 和 HBV 核酸,需先离心制备血浆;细胞内 EBV 核酸提取要用单核细胞分离液采用密度梯度离心法分离单核细胞;结核分枝杆菌检测需要提前消化痰液,使痰液液化。在实际操作中需熟练掌握不同类型的核酸提取方法,不同于科研实验标本的核酸提取,临床检验标本的核酸提取需要稳定快速高效,实习学生要掌握临床检验标本核酸提取的原理和方法,如热裂解法、磁珠法、柱提取法、化学裂解法,核酸提取的成功与否直接关系到最后的检测结果,掌握不同核酸提取方法的优缺点,可为分析判断报告准确的结果提供理论依据。

在核酸提取过程中应培养实习学生良好的工作习惯,分子诊断项目操作复杂,检测过程耗时较长,一旦失败就要投入双倍的时间和经济成本再次检测,因此,注重培养实验过程中的细节把握能力十分重要,如按编号顺序放置标本、EP 管离心固定开口方向、开盖操作避免液体泄漏、实验结束将加样枪调至最大量程、高速冷冻离心机关机前要开盖关机、八联管上机离心前要做好编号标记等。由于临床基因扩增检测项目比较精密,反应体系只有 20~50 μL ,加入的样本模板最少的只有 1~2 μL 。对于定量检测项目,多 1 μL 或少 1 μL 会导致结果出现较大的偏差,因此临床基因扩增实验室对加样量要求精准,对使用加样枪的要求更高,如何提高加样准确度以及如何使用加样枪不仅需要掌握技巧方法,而且需要多动手操作,轮转至临床基因扩增实验室的实习生对加样枪的使用技能和熟练程度得到了很大的提升。用于实时荧光定量临床基因扩增的试剂主要储存在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,为了保证试剂的稳定性,使用前需要充分溶解,震荡混匀并离心。用于临床标本检测的试剂(如临床基因扩增反应液和酶)通常是分开储存的,用于 HPV 分型检测的反应液往往有多管不同型别,添加酶时应注意防止漏加。检测 HBV-DNA 和 HCV-RNA 等项目需要在反应液或提取试剂中添加内标。在添加反应液或试剂后应对八联管进行编号,避免人为出错,在上机前应离心破坏反应体系液面的大气泡,并确认和检查 PCR 反应程序,以严谨细心的工作态度,培养实习学生的临床检验工作能力。

临床基因扩增实验室的仪器主要有核酸提取

仪、实时荧光定量临床基因扩增仪、普通临床基因扩增仪、恒温扩增仪等,学习仪器操作 SOP 能使學生快速掌握仪器的使用方法,如核酸提取仪的开机、耗材的添加、试剂的添加以及提取运行模板的选择。要求实习学生掌握不同临床基因扩增仪的使用方法,尤其是实时荧光定量临床基因扩增仪器的新项目运行模板的设置、变性、退火、延伸的温度和时间设置、探针染料的选择、用于科研项目时染料的选择等,熟练掌握各种临床基因扩增仪的使用方法,能提升本科阶段的专业技能水平,初步掌握科研技术。

5 培养结果判读和报告能力,提升解决问题的能力

临床基因扩增实验室的检测结果分为定量分析结果和定性分析结果,对结果进行分析的前提是掌握实时荧光定量临床基因扩增检测原理(即荧光共振能量转移原理)。掌握仪器操作技能,熟悉仪器使用原理,让实习学生理解提取的核酸原始浓度与扩增曲线的循环阈值(cycle threshold, CT)呈反比,基线下的背景荧光信号形态和扩增曲线开始起跳的阈值;建立对临床基因扩增反应曲线的认知,典型的临床基因扩增曲线呈 S 形,分为基线期、指数扩增初期、指数扩增期、平台期 4 个阶段。

定量分析以 HBV-DNA 检测结果分析为例,在对 HBV-DNA 进行检测时除了检测样本,每批次检测均带有 4 个标准品对标本 HBV-DNA 进行定量计算,设置高值和低值两个阳性质控品和一个阴性质控品。带领实习学生理清结果判读的流程:①调整截断值位置与多数扩增曲线的指数扩增初期交叉,计算扩增 CT 值或交叉点值(cross point, CP);②查看内标通道扩增反应曲线,如反应孔内标通道没有典型的 S 形扩增曲线则视为核酸提取或扩增无效,不能报告结果;③查看 HBV-DNA 检测通道的 4 条标准曲线位置并调整截断值,计算出标准曲线、斜率、扩增效率,判断质控数值是否在控;④查看目标检测通道和内标检测通道是否出现异常扩增曲线,此时带教老师可以向实习学生讲解出现异常扩增曲线的可能因素,扩展核酸提取知识,结合 HBV-DNA 核酸提取,讲解各种核酸提取方法的优缺点。由于本实验室 HBV-DNA 核酸提取采用化学裂解法,提取核酸纯度受某些因素(如黄胆、溶血、脂血等)干扰,干扰因素会抑制或影响内标和目标片段的扩增,影响扩增反应曲线,从而干扰标本检测。带教老师在进行结果报告的实习带教时,应根据不同的检测项目区分结果判读的方法和技巧,以发出真

实准确的结果为前提,遵守职业道德,以患者为中心,以身作则,带领实习学生在临床分子诊断的实习过程中形成正确的职业观,在面对问题标本时做出正确决策。

在报告结果时应让实习学生全程参与,熟悉流程,理清工作思路和注意事项,确保结果准确可靠。在审核报告前必须查看内标扩增曲线是否为典型的 S 形扩增曲线,查看质控是否在控,核对实验室信息系统(laboratory information system, LIS)中的信息与仪器数据是否一致,核对标本录入 LIS 标号与仪器编号是否一致,查看与检测项目相关的检测结果。如审核 HBV-DNA 结果时需查看表面抗原检测结果;审核 HCV-RNA 结果时需查看抗体检测结果;审核地中海贫血基因检测结果时,需要查看血红蛋白电泳和血液分析结果。带教老师总结上述工作经验,讲解结果报告的注意事项,有利于提升实习学生的实践技能。

采用问题基础教学法(problem-based learning, PBL),由带教老师向实习学生提出报告结果中遇到的问题,给学生自主思考问题的机会,培养和提升实习学生独立解决工作中遇到问题的能力,PBL 教学法是以学生为中心,以问题为导向,由老师引导,学生自主学习^[7-8]。以报告 HBV-DNA 为例,1 例 45 岁中年男性肝癌患者乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)为阴性,HBV-DNA 为 192 kU/L,将 HBsAg 阴性和 HBV-DNA 拷贝阳性这一矛盾结果展现给学生,进行引导式提问:① HBV-DNA 结果在截断值附近,结果有没有问题,在方法学上探讨结果的真伪;② 如果结果不是真的,如何排除结果为假;③ 如果结果为真,如何解释这一现象。老师引导学生,在正常情况下 HBsAg 为阴性时,HBV-DNA 检测结果也为阴性,鉴于临床分子生物学方法的高敏感度,容易发生污染导致假阳性结果,引导学生判断是否污染,排除因污染导致假阳性结果,鼓励学生进行发散思维,从实验的各个环节寻找产生污染的可能,如首先从其他标本结果大致排除污染,包括从阴性质控品和截断值附近的阳性标本数量等方面判断,另外可以分析实验过程中是否有阳性质控品污染,或观察最近几天 HBV-DNA 检测结果的阳性率等。对于污染产生的假阳性结果,结合之前“无核酸、无污染”的知识,引导学生解决问题,消除污染,向临床发出准确的检测结果。在非污染情况下,引导学生以医务工作者的思维,根据自身专业知

识,科学谨慎地做出正确处理,如采用原试剂和原方法复查,或在不同实验室采用不同方法复查,结合查看病例病史,在前后结果一致的情况下可考虑发出报告,在前后结果不一致的情况下查找原因,正确处理,总结经验。引导学生查阅资料,解释出现这一现象的原因,激发学生的探索和学习热情。通过培养实习学生结果判读的能力,提升学习兴趣,加强学生对现代化仪器使用方法的掌握。

6 小结

随着临床分子诊断检验技术在精准医疗、个体化用药、感染性疾病诊断、遗传和生殖等领域的应用,国产试剂的研发生产和替代使临床分子诊断学在未来可能成为检验医学领域的主流学科。以往由于临床分子诊断检验项目受技术和经济条件的限制,开展的检验项目较少,实习带教单位对其重视不足,作为检验行业生力军的带教老师,有责任和义务做好带教工作,重视医学检验技术专业实习学生的带教工作,不断加强对专业知识和带教技能的学习,总结经验,加强与同行的交流,提升自身带教水平,希望能够通过本文与检验专业同行共同探讨临床分子诊断学带教方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 何启田,谢丽.临床分子生物学检验实习带教体会[J].继续医学教育,2023,37(7):149-152. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6763.2023.07.038.
- 欧静,吴桐,董晗,等.感染性疾病的分子诊断新方法及其临床应用[J].生命的化学,2023,43(5):697-703. DOI: 10.13488/j.smhx.20230054.
- 李东梅,杨怡,王晟,等.医学检验专业学生在分子生物实验室实习带教模式的探索与实践[J].实用检验医师杂志,2023,15(2):218-220. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.02.026.
- 汪顺瑶,邓雅媛,陈诗,等.精准医疗时代背景下临床分子诊断创新型人才的培养策略[J].保健医学研究与实践,2023,20(11):136-140. DOI: 10.11986/j.issn.1673-873X.2023.11.25.
- 黄小晔,彭丽,梁剑琦,等.不同方法处理核酸片段的对比研究[J].检验医学与临床,2023,20(9):1313-1315. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.09.030.
- 蔡贞,李书芬,籍会彩,等.医学检验专业分子诊断实习带教方法探讨[J].分子诊断与治疗杂志,2022,14(5):899-902. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2022.05.045.
- 周琳,何杰,龙丹,等.双语教学结合 PBL 教学法在分子诊断学理论教学中的应用[J].中国高等医学教育,2022,(11):104-105. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1701.2022.11.052.
- JAGANATHAN S, BHUMINATHAN S, RAMES M. Problem-based learning: an overview [J]. J Pharm Bioallied Sci, 2024, 16 (Suppl2): S1435-S1437. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_820_23.

(收稿日期:2024-05-15)

(本文编辑:邵文)