

报阳时间有统计学差异。

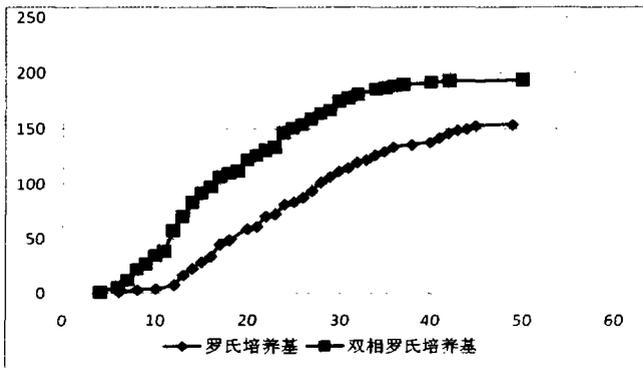


图 1. 两种培养基报阳时间和例数图

(横坐标表示报阳时间, 单位: d; 纵坐标表示阳性标本的总例数, 单位: 例。)

讨 论

结核病是严重危害人民群众健康的呼吸道传染病, 我国是全球 22 个结核病高负担国家之一。根据 2010 年全国第五次结核病流行病学调查结果, 估算我国全人群活动性肺结核患病率为 459/10 万, 其中传染性肺结核患病率为 66/10 万^[6]。提高结核病的检出率和缩短检测时间, 可以更加及时早期的发现结核患者, 使结核患者得到及时有效的治疗, 对于预防和控制结核病的传播具有重要的意义。结核菌的分离培养是结核病诊断的重要依据之一, 长期以来临床上使用的罗氏培养基, 由于其营养成分比较简单, 分枝杆菌特别是慢生长分枝杆菌的分离培养速度比较慢, 且对临床标本中的结核分枝杆菌的分离培养阳性率偏低。我国结核患者主要分布于农村、边远地区等经济条件较差的地区, 大多无法承受快速液体培养仪检测系统昂贵的检测费用, 因此针对我们结核病疫情特点, 急需开发既可以提高阳性检出率又可以缩短检测时间的价廉的结核分枝杆菌培养分离方法。

本研究所研制的双相罗氏培养基, 结合了罗氏培养基和液体培养基两种培养基的优势, 既可以通过罗氏培养基斜面上生长的菌落观察菌落形态, 又可以利用液体培养基丰富的营养成分加快分枝杆菌的生长。

本研究结果显示, 双相罗氏培养基与罗氏培养基相比较, 其阳性

率明显高于罗氏培养基, 其中涂片阳性痰标本中, 双相罗氏培养基的检测阳性率比罗氏培养基高 8 个百分点; 涂片阴性痰标本中, 双相罗氏培养基的检测阳性率比罗氏培养基高 6 个百分点。两种培养基的报阳检测时间比较, 双相罗氏培养基的报阳时间中位数比罗氏培养基提前 1 周左右。

双相罗氏培养基制备简单, 但是由于液体培养基营养成分比较丰富易污染, 本研究中双相罗氏培养基的污染率略高于罗氏培养基, 因此在使用双相罗氏培养基过程中痰标本的去污染液化处理必须要严格规范操作, 减少污染的几率。

综上所述, 双相罗氏培养基制备简单, 价格低廉, 既可以提高检测痰标本中的分枝杆菌的阳性检出率, 又可以缩短检测时间, 且不需要特殊的仪器设备, 适合在我国各级医疗机构, 特别是基层及资源相对匮乏的地区推广应用。

参考文献

- [1] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006.
 - [2] World Health Organization. Laboratory services in TB control. Part III: Culture. Geneva, 1998 (WHO/TB/98.258). Available at: http://www.who.int/entity/tb/publications/who_tb_98_258/en/index.html.
 - [3] World Health Organization. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing in low and medium-income settings. Geneva, 2007. Available at: http://www.who.int/tb/laboratory/policy_statements/en/index.html.
 - [4] 中华医学会结核学分会. 结核病诊断和治疗指南. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24: 70-74
 - [5] Martin A, Morcillo N, Lemus D, et al. Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-line anti-tuberculosis drugs. Int J Tuberc Lung Dis. 2005, 9(8):901-906. PMID: 16104638.
 - [6] 中华人民共和国卫生部, 卫生部介绍全国肺结核疫情现状, 网页地址: <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohjbyfkzj/s3590/201103/51027.htm>, 2011-03-21.
- (收稿日期: 2011-08-15)

SAT 技术在快速检测痰液的结核分枝杆菌中的应用

崔振玲, 沙巍, 黄晓辰, 郑瑞娟, 居金良, 胡忠义

(同济大学附属上海市肺科医院 \ 上海市结核 (肺) 重点实验室 上海 200433)

研究目的

评估 RNA 恒温扩增实时荧光检测技术 (SAT) 检测临床痰液标本中的结核分枝杆菌的灵敏度和特异性, 并和培养法进行比较。

研究背景

我国是全球 22 个结核病高负担国家之一。2010 年全国第五次结核病流行病学调查显示, 我国活动性肺结核患病率为 459/10 万, 其中传染性肺结核患病率为 66/10 万。结核患者的早期快速诊断是实现及早发现治疗结核患者的基础, 也是预防和控制结核病传播的关键。结核分枝杆菌检测是结核病诊断的重要依据之一。目前国内临床常用的检测方法是涂片法和培养法, 但两者特异性都不高, 培养法还存在检测时间较长的缺点, 即使是快速培养仪培养检测也耗时 1-6 周, 无法实现结核病快速检测。建立在核酸检测技术基础上的结核快速检测技术解决了这一问题。目前国内外已商品化结核核酸检测试剂多为建立在 PCR 技术的实时荧光检测试剂, 其检测靶标为结核分枝杆菌内的 DNA。由于扩增产物为 DNA, 操作不当易引发实验室内的交叉污染, 从而导致假阳性的结果。法国生物梅里埃公司的“结核分枝杆菌 AMPLIFIED-MTD 检测试剂”则是以 RNA 为检测靶标的检测试剂, 解决了 PCR 检测假阳性高的问题, 但是它的配套检测设备价格昂贵, 限制了

该检测试剂的推广应用。本研究评估的是基于 RNA 恒温扩增技术平台的、以 RNA 为检测靶标的核酸检测技术 (Simultaneous Amplification and Testing, SAT)。该技术以结核分枝杆菌特异的 16srRNA 为检测靶标, 在恒温条件下实现 RNA 的特异性扩增, 同时特异性的分子信标与靶标片段杂交后释放出荧光信号, 实现反应 RNA 的扩增过程, 由此判断待检样本中是否存在结核分枝杆菌。

研究方案

RNA 恒温扩增技术和罗氏培养基同时对 177 份痰标本进行检测, 对两种检测方法检测结果不符的标本, 用 real-time PCR 法检测。分析 SAT 技术相比罗氏培养的灵敏度、特异性和两者的检查符合率、对结核患者的检出率。

研究结果

以罗氏培养作为金标准, real-time PCR 为扩大金标, SAT 的灵敏度、特异度分别为 94.8% (92/97) 和 97.5% (78/80), SAT 与罗氏培养的符合率为 83.6% (148/177)。罗氏培养法和 SAT 对痰液标本的阳性检出率分别为 42.3% (75/177) 和 53.1% (94/177), 两者的阳性率经过卡方检验分析差异有统计学意义 ($\chi^2=4.527$, $p<0.05$)。

讨 论

结果显示 SAT 检测结核的灵敏度显著高于罗氏培养基, 对于罗氏培养阴性的结核患者痰标本, SAT 的检出率为 23.53% (24/102), 说明 SAT 具有较高的灵敏度, 有助于提高培阴结核的检出率。

操作上 SAT 检测标本前处理过程与罗氏培养前处理相同, 菌体裂解过程仅需 15min 超声裂解, 检测时间仅需 1h, 整个过程操作简

单。此外 SAT 检测不需要特殊的仪器设备, 在一般实验室常规配备的 real-time PCR 仪即可以进行检测。若能开发出与 SAT 检测技术相配套的价廉的检测仪器将更加有利于该检测技术的推广应用。SAT 检测痰标本中结核分枝杆菌仅需 2h, 可作为一种快速检测痰标本中结核分枝杆菌的方法。

(收稿日期: 2011-08-19)

液基夹层杯技术用于基层实验室结核病诊断的可行性研究

宋红焱¹ 杨丹丹¹ 邵燕¹ 李明² 唐国锋³ 朱玮² 朱澄玉³ 陈诚¹ 许卫国¹

(1. 江苏省疾病预防控制中心 南京 210009; 2. 泰兴市疾病预防控制中心 泰兴 225400; 3. 江阴市疾病预防控制中心 江阴 214400)

摘要: 目的 评价液基夹层杯法在基层实验室用于结核病诊断的可行性及安全性 方法 在两个县级结核病实验室, 对 385 例疑似肺结核患者的 754 份痰标本同时采用液基夹层杯法与直接痰涂片法进行镜检, 结合临床诊断, 比较 2 种方法的阳性检出率, 并进一步比较两种方法对不同性状、不同时间收集的痰标本的阳性率 结果 液基夹层杯法、直接痰涂片法对 754 份痰标本的阳性检出率分别为 23.5%、16.8%, 检测结果有统计学意义 ($P < 0.05$), 液基夹层杯法阳性检出率明显高于直接涂片法; 不同性状、不同时间采集的痰标本采用两种方法的检测结果, 亦有统计学差异 (P 值均小于 0.05)。安全性试验发现经消化液处理的痰标本, 培养 8 周后未见结核分枝杆菌生长。结论 液基夹层杯法提高了疑似肺结核患者细菌学检查阳性检出率, 且操作简单、安全性高, 适合在基层实验室应用及质量控制, 是一种很有推广价值的检测方法。

关键词: 分枝杆菌, 结核; 痰、集菌检测技术

通讯作者: 许卫国, E-mail: jsjkmck@163.com

基金项目: 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项 “江苏省防治艾滋病、病毒性肝炎和结核病等重大传染病规模化现场流行病学和干预研究” 课题 (2009ZX10004-904)

结核病是一种长期危害人类健康的重大传染病之一, 我国是全球仅次于印度的第二大结核病高负担国家, 对结核病做出快速、准确的诊断一直是结核病控制工作中的难点, 目前我国结核病防治规划结核病实验室检查主要方法是直接痰涂片镜检 (以下简称直涂法), 该方法操作简便, 成本低廉, 但敏感度低, 而传统的罗氏培养法周期较长 (4-8 周), 目前最快的液体培养也需要 10 天左右, 并且在痰标本前处理及后期培养过程中可能导致结核杆菌死亡, 产生假阴性, 此外部分实验室也采用传统的集菌法进行检测, 但也存在操作过程繁琐、安全性不高等不足, 如何研发、推广应用结核病病原体检测新技术是目前世界卫生组织、国内外结核病控制机构和组织所共同致力的工作。本文探讨了国家科技重大专项研究的结核病诊断新技术—液基夹层杯法抗酸杆菌检验技术 (以下简称液基法) 在基层实验室应用的可行性, 参照国际结核病诊断新技术的评价方法, 进行了验证评价。

资料和方法

一、一般资料

按照项目要求, 收集重大专项示范区江苏省泰州市泰兴市结核病门诊及无锡市江阴市结核病门诊 2010 年 1 月至 8 月初诊疑似肺结核病人 385 例, 每位患者按要求分别采集即、夜、晨三份痰标本, 将符合要求的痰标本 (标本量 $> 2\text{ml}$) 同时采用直涂法及液基法检测结核分枝杆菌。

项目实施分为两个阶段: 预实验和验证阶段, 预实验阶段为期一个月, 实验人员按照项目要求, 同时采用两种方法对标本进行处理, 目的在于使实验室人员熟悉项目的各项要求, 并熟练掌握液基夹层杯技术的操作流程, 为后期项目顺利开展提供良好的基础。预实验阶段, 泰兴、江阴两个项目点全部常规涂片和液基法涂片由泰州市疾控中心结核病实验室进行复核。预实验结束, 由江苏省结核病参比实验室对两个项目点进行考核, 复核及考核结果合格后进入验证阶段, 且预实验数据不纳入统计范围, 在验证阶段, 采用的质量控制方式为泰州市疾控对两个点每个月随机抽取 30% 的玻片进行复核, 及时发现并解决项目运行中产生的问题。

二、试剂和仪器

液基法所用试剂及仪器均由湖南天骑医学新技术有限公司提供: 抗酸染色液、彭氏杯为湘药管械 (准) 字 2005 第 2410002; 其专利号为: 200420036036. 7、200520049875. 7; 消化液注册号: 湘 (怀) 食药监械 (准) 字 2005 第 1410005 号、TQ212 型自动离心涂片机、

KP21 型快速干片机、抗酸杆菌自动阅片计算机报告系统; 贝索抗酸然也; 罗氏培养基由江苏省结核病参比室制备。

三、质量控制

质量控制参照《中国结核病防治规划—痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[1]

(一) 标本来源及要求

标本来自江苏省泰州市泰兴市结核门诊、无锡市江阴市结核门诊的初诊疑似病人, 每位患者按照要求取即、夜、晨三份痰液, 所有入选病例均符合《中华人民共和国传染病防治法》规定管理的传染病诊断标准 (试行)

(二) 直涂法

按《中国结核病防治规划—痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[1] 进行涂片、染色、镜检。

(三) 液基夹层杯法

液基法的技术原理是将经过消化灭活的痰标本置于符合光学要求的基片的夹层杯中, 经离心后将标本中的细菌牢固的附着在基片上, 在夹层杯中直接进行染色, 取出基片于载玻片上, 镜检。

操作流程: 每份痰标经常规的直接涂片萘尼染色后, 在剩余的全部标本 ($> 2\text{ml}$) 加入 2 倍于标本的标本消化液, 振荡至痰块消散, 置于快速干片机内 60°C 加热 10 ~ 15 分钟, 吸取痰消化液于夹层杯中, 用涂片机主机 4500 转 / 分钟离心 5 分钟。离心完成后从离心机内轻轻取出夹层杯, 倾去液体, 置于快速干片机内烘干表面水分, 滴加 95% 酒精, 固定数秒钟, 倾去多余的酒精, 滴加抗酸染色液 A 液 3 ~ 5 滴, 置于干片机内 60°C 加温染色 5 分钟, 小量流水沿杯壁轻轻冲洗, 沥干。滴加 B 液 3 ~ 5 滴, 脱色至无色 (约 1 分钟), 小量流水洗净, 沥干。滴加 C 液 4 ~ 6 滴, 染色 1 ~ 3 分钟, 水洗, 置于快速干片机内 60°C 烘干。用取片针将夹层杯内底顶出, 用镊子夹出基片, 用吸水纸印干表面水分, 烘干后标本正面向下, 用中性胶封片, 揭除背面保护膜后, $100\times$ 油镜镜检。并同时采用图像系统记录检验结果。

(四) 液基夹层杯法安全性试验

选取 4+ 的痰标本进行液基法安全性试验, 设定不同的痰消化液比例, 不同的消化时间, 加热与否, 将处理后的消化液接种到罗氏培养基, 37°C 培养, 观察其生长情况。

四、统计学处理

Microsoft excel 录入数据, 配对资料采用配对 χ^2 和确切概率