

[8] 崔君霞, 金李, 于华. 重型颅脑损伤患者气管切开早期采取不同吸痰方式的效果研究[J]. 中华护理杂志, 2013, 48(2):124-126.

[9] 陈漫玲, 林佩珠, 刘丽贞, 等. 重型颅脑损伤 150 例误吸急救与护理[J]. 齐鲁护理杂志, 2009, 15(21):30-31.

[10] 王爱凤, 葛东明, 张媛媛, 等. 延续性护理干预在重型颅脑

损伤患者居家护理中的应用[J]. 中华现代护理杂志, 2014, 20(3):304-305.

[11] 王均芳. 舒适护理在重型颅脑损伤患者中的应用[J]. 中国实用护理杂志, 2012, 28(3):30-31.

(收稿日期:2015-11-25 修回日期:2016-01-18)

• 临床探讨 •

交叉引物恒温扩增技术在结核分枝杆菌检测中的应用

毛秀军¹, 李世明¹, 葛晓励², 张国强³, 孙绍秋³, 王惠良⁴ (1. 河北省唐山市第四医院 063001; 2. 华北理工大学附属医院, 河北唐山 063009; 3. 河北省唐山市中心血站 063000; 4. 河北省唐山市滦南县医院 063500)

【摘要】 目的 探讨交叉引物扩增技术(CPA)快速检测系统在结核病诊断中的价值。**方法** 收集唐山市第四医院 2015 年 3~5 月 206 例结核病就诊患者的痰液标本, 其中肺结核患者 95 例(其中痰涂片阳性 26 例, 阴性 69 例), 非结核患者 111 例, 分别采用 RT-PCR 法实时荧光定量聚合酶链反应法(RT-PCR)检测标本中的结核分枝杆菌, 对结果进行统计分析。**结果** 涂片法、罗氏培养法、EasyNAT[®] TB-CPA 法检测初诊疑似肺结核患者痰液的灵敏度分别为: 27.37%(26/95)、50.53%(48/95)、56.84%(54/95)、51.58%(49/95)。以罗氏培养结果为诊断金标准, EasyNAT[®] TB-CPA 法灵敏度为 89.58%(43/48), 特异度 94.94%(150/158); RT-PCR 法的灵敏度为 83.33%(40/48), 特异度 94.30%(149/158); EasyNAT[®] TB-CPA 与 RT-PCR 法相比, 总体一致性为 98.54%(203/206), Kappa 指数值为 0.92。**结论** TB-CPA 法在检测痰液标本中具有较高的临床应用价值, 且方法简便、快速。

【关键词】 结核分枝杆菌; 恒温扩增; 培养法; 交叉引物扩增技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.041 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1107-03

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病, 是全球最具威胁的传染病之一。据世界卫生组织统计, 我国患结核病人数居世界第 2 位, 是全世界 22 个结核病流行严重的国家之一^[1]。结核病实验室检查是结核病诊断、治疗方案制定和治疗效果评估的重要依据。目前我国大多数实验室广泛采用细菌学检查方法, 包括抗酸杆菌痰涂片镜检和分枝杆菌分离培养^[2]。涂片检查简便、易行, 但阳性检查率较低^[3-4]; 分离培养法是目前结核病诊断的金标准, 具有很高的灵敏度, 但至少需要 3~8 周的时间, 但耗时较长, 不能满足结核病早期诊断的要求。随着分子生物学的发展, 近年来涌现出很多方法用于结核分枝杆菌的快速诊断及鉴定^[2]。然而, 以基因序列为基础的快速诊断方法虽然快速、敏感, 但仪器、设备和试剂比较昂贵。交叉引物扩增技术(CPA)是一种新的核酸恒温扩增技术, 也是中国首个具有自主知识产权的核酸扩增技术^[5-6]。CPA 是将核酸扩增反应的全过程均在同一温度(63±2)℃下进行, 不需要像实时荧光定量聚合酶链反应法(RT-PCR)那样经历几十个温度变化的循环过程。CPA 方法简单, 设备要求低, 可通过一次性肉眼判读结果, 且保持了核酸扩增快速、高灵敏度的特点, 适合在基层医院推广使用。本研究将 CPA 法与传统痰涂片镜检法、罗氏培养法和 RT-PCR 法痰标本中结核分枝杆菌的检测进行临床应用评价, 以期满足临床诊断的需求。

1 资料与方法

1.1 一般资料 连续收集唐山市第四医院结核病专科门诊 2015 年 3~5 月初诊疑似者肺结核患者痰标本。纳入标准: (1)咳嗽咳痰超过 2 周因呼吸道症状接受检查的初诊可疑结核病患者; (2)同意留取合格的痰标本并进行检测; (3)痰标本量 ≥ 2 mL。就诊患者依照肺结核临床诊断流程参考文献^[7]。排除标准: (1)随访的结核病患者; (2)不签署知情同意的结核病患者; (3)已经使用抗结核药物治疗大约 2 周的患者; (4)试

验过程中, 因技术性因素造成结果缺失者。最终纳入 206 例患者, 年龄 16~70 岁, 平均(35.0±15.6)岁, 男 86 例, 女 40 例。经临床诊断的结核病患者 182 例, 其他肺部疾病患者 24 例。

1.2 仪器与试剂 萋-尼染色试剂(抗酸染色液)由本实验室自己配置; 罗氏培养基为外购杭州加伟生物技术有限公司; RT-PCR 试剂外购自 A 厂家(生产批号 20150112); 结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(恒温扩增试纸条法)由杭州优思达生物技术有限公司生产(批号 20150116); MK-10E 干式恒温金属浴为杭州奥盛仪器有限公司生产; PRC 仪器为 ABI7500 荧光 PCR 仪。EasyNAT[®] 核酸提取试剂(注射器法)由杭州优思达生物技术有限公司生产(批号 20150124)。

1.3 方法

1.3.1 痰涂片和培养 将收集的痰标本进行荧光法涂片镜检, 痰标本的收集和涂片镜检按照《痰涂片镜检质量保证手册》进行操作。荧光染色后镜检, 剩余标本依照痰液黏稠程度加入 2~3 倍 4% NaOH, 每次均设置空白对照^[8]。37℃ 温箱培养, 每周观察并及时记录结果。培养阳性的菌株采用硝基苯甲酸(PNB)培养基法进行分枝杆菌鉴定。

1.3.2 EasyNAT[®] TB-CPA 法检测 分别检测国家结核病参比实验室提供的结核核酸参考品(S1~S4), 结核分枝杆菌浓度(/mL)分别为 10³、10²、10、1^[9]。采用杭州优思达生物技术有限公司生产的 EasyNAT[®] 核酸提取试剂(注射器法)对结核分枝杆菌进行 DNA 的提取; 按照 EasyNAT[®] TB-CPA 操作说明进行操作, 15 min 后读取结果并记录试验结果^[10]。结果判读: 若检测 T 线和质控 C 线同时出现或检测 T 线显色时, 判读为阳性; 若只有质控 C 线出现时, 判定为阴性; 若质控线, 检测 T 线都未出现时, 结果为无效。查找原因, 可能是扩增抑制, 导致失败; 或试剂盒损坏导致失败。

1.3.3 RT-PCR 法检测 按照厂家试剂说明书操作, 使用

ABI7500 进行扩增和检测,并记录试验结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,4 种方法阳性检出率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;EasyNAT[®] TB-CPA 与 RT-PCR 检测结果一致性分析采用 Kappa 指数法,Kappa 值越大,说明结果一致性越高。Kappa 质在 0.4~0.7,提示吻合程度一般,大于 0.7,说明吻合较好。

2 结 果

2.1 4 种方法的阳性检出率比较 在纳入的 206 例初诊患者中,95 例初诊肺结核患者结果见表 1。结核患者中,涂片法、罗氏培养法、EasyNAT[®] TB-CPA 法、RT-PCR 法的阳性检出率分别为 27.37%(26/95)、50.53%(48/95)、56.84%(54/95)、51.58%(49/95)。其中,EasyNAT[®] TB-CPA 的检出率最高,其次为 RT-PCR 法和罗氏培养法。

表 1 4 种方法的阳性检出率比较

方法	检测例数 (n)	阳性例数 (n)	阳性检出率 (%)
涂片法	95	26	27.37
罗氏培养法	95	48	50.53
EasyNAT [®] TB-CPA 法	95	54	56.84
RT-PCR 法	95	49	51.58

2.2 不同方法诊断效能比较 在纳入的 206 例初诊患者中,以罗氏培养法及生化鉴定结果为金标准,涂片法灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 47.92%、98.10%、88.46%、113.92%,EasyNAT[®] TB-CPA 法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 89.58%、94.94%、84.31%、98.10%,RT-PCR 法检测结核分枝杆菌的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 83.33%、94.30%、81.63%、99.37%。不同方法检测结果灵敏度、特异度比较见表 2。以罗氏培养法及生化鉴定结果为金标准,涂片法、EasyNAT[®] TB-CPA 法和 RT-PCR 的一致性 Kappa 指数分别为 0.83、0.77、0.54,其中 EasyNAT[®] TB-CPA 法和 RT-PCR 法与罗氏培养法结果吻合度较高。EasyNAT[®] TB-CPA 法与 RT-PCR 法结果的总体一致性为 98.54%(203/206),Kappa 指数值为 0.92,具有很高的-致性。对罗氏培养法结果为阳性的 48 株病原菌进行 PNB 培养基法鉴定,均为结核分枝杆菌。

表 2 不同方法检测灵敏度、特异度比较(n)

方法		罗氏培养法		
		阳性	阴性	总计
涂片法	阳性	23	3	26
	阴性	25	155	180
	总计	48	158	206
EasyNAT [®] TB-CPA 法	阳性	43	8	51
	阴性	5	150	155
	总计	48	158	206
RT-PCR 法	阳性	40	9	49
	阴性	8	149	157
	总计	48	158	206

3 讨 论

目前,结核病的诊断主要依据涂片、培养,其中痰培养是肺结核诊断的金标准,但由于痰培养周期较长,一般需要 3~8 周,且易污染,后期需要配合菌种鉴定做出诊断。常规涂片法阳性率较低,容易漏诊。所以结核病的早期诊断,对于控制结核病的传播具有十分重要的意义。随着分子生物学的发展,近年来涌现出很多方法可用于结核分枝杆菌的快速诊断及鉴定。结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(恒温扩增试纸条法)采用 CPA 技术,利用 2 对特异度引物、1 对促进引物、1 对特异度探针及 Best DNA 聚合酶,实现恒温[(63±2)°C]完成核酸的扩增和杂交过程,然后在密闭的一次性核酸检测装置中利用免疫层析乳胶标记试纸条检测技术,完成扩增产物的检测。一次性的核酸检测装置可以减少或避免扩增产物气溶胶造成的污染和假阳性^[11-12]。

为了验证 EasyNAT[®] TB-CPA 法检测临床痰标本的灵敏度和特异度,本研究分别采用痰涂片法、罗氏培养法、EasyNAT[®] TB-CPA 法和 RT-PCR 法对 206 例临床初诊疑似肺结核患者的痰标本进行检测。结果显示,结核患者中,涂片法、罗氏培养法、EasyNAT[®] TB-CPA 法、RT-PCR 法的阳性检出率分别为 27.37%(26/95)、50.53%(48/95)、56.84%(54/95)、51.58%(49/95)。EasyNAT[®] TB-CPA 法的阳性检出率明显高于涂片法,与常规罗氏培养法基本一致。以罗氏培养法为金标准,EasyNAT[®] TB-CPA 法的灵敏度为 89.58%,特异度为 94.94%,两种方法的一致性为 0.83,具有较高的一致性。RT-PCR 法的灵敏度为 83.33%,特异度为 94.30%。EasyNAT[®] TB-CPA 法与 RT-PCR 法在检测肺结核患者中,具有较高的一致性(Kappa 指数为 0.92),与参考文献^[13]结果一致。RT-PCR 法已经在临床诊断结核上广泛应用,其结果可以作为肺阴结核的诊断指标之一,检测时间为 3~4 h,但需要价格昂贵的荧光 PCR 仪器,对实验室条件、操作人员的技术均要求很高,限制了其在基层医院的应用^[14]。EasyNAT[®] TB-CPA 法检测结核分枝杆菌具有较高的灵敏度和特异度,可以在 2 h 内完成检测并出具报告,而且结果判读容易,通过肉眼观察是否有显色条带即可,对实验室操作人员能力要求较低、试剂可以常温运输等特点。因此,EasyNAT[®] TB-CPA 法非常适用于各级综合医院、专科医院和小型机县级医院开展结核分枝杆菌的检测新技术。

参考文献

[1] 廖丽.我国结核病流行现状及防治工作形式分析[J].中外医疗,2014,33(3):129-130.
 [2] 代旭雷,柳爱华,宝福凯,等.结核分枝杆菌的分子检测技术研究进展[J].现代预防医学,2012,39(8):2032-2034.
 [3] 李春林,孙峰.结核分枝杆菌检测方法临床诊断价值[J].检验医学与临床,2010,7(2):113-115.
 [4] Bates M,O'Grady J,Maeurer M,et al. Assessment of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis with gastric lavage aspirates in children in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive study [J]. Lancet Infect Dis, 2013,13(1):36-42.
 [5] Roetzler A,Diel R,Kohl TA,et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study[J]. PLoS Med,2013,10(2):

e1001387.

[6] Xu GL, Hu L, Zhong HY, et al. Cross priming amplification; mechanism and optimization for isothermal DNA amplification[J]. Sci Rep, 2012, 2: 246.

[7] 中华人民共和国卫生部. WS 288-2008 肺结核诊断标准[S]. 北京:人民卫生出版社, 2008.

[8] 陈保文, 沈小兵, 苏城, 等. 结核分枝杆菌 PCR 检测试剂盒国家参考品的研制[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(5): 605-607.

[9] 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[M]. 北京:中国教育文化出版社, 2006: 34.

[10] Fang RD, Li X, Hu L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 845-847.

[11] Ou X, Song Y, Zhao B, et al. A multicenter study of cross-priming amplification for tuberculosis diagnosis at peripheral level in China[J]. Tuberculosis, 2014, 94(4): 428-433.

[12] 赵婷婷, 孙文铮, 杨宇, 等. CPA 恒温扩增技术检测炭疽芽胞杆菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2014, 37(4): 247-250.

[13] 王华钧, 孙晓军, 金法祥, 等. 4 种结核分枝杆菌检测方法比较[J]. 中华医院感染学组织, 2012, 22(11): 2472-2474.

[14] 张建立, 李国刚, 董彬, 等. 恒温扩增试纸条法快速检测痰标本中结核分枝杆菌[J]. 医学动物防制, 2013, 29(10): 1093-1094.

(收稿日期: 2015-10-25 修回日期: 2015-12-21)

• 临床探讨 •

老年病区与非老年病区铜绿假单胞菌耐药性差异

卢亚林, 何咪霖(中国人民解放军第一六一医院检验科, 武汉 430010)

【摘要】 目的 了解老年病区铜绿假单胞菌的耐药性特点, 为临床合理使用抗菌药物治疗提供参考。方法 将某三甲医院微生物实验室从 2012 年 6 月至 2015 年 6 月间检出的 992 株铜绿假单胞菌分为老年病区和非老年病区两组, 统计它们对临床常用的 20 种抗菌药物的药敏情况, 并比较分析两组间的耐药性差异。结果 从老年病区分离到的铜绿假单胞菌对 20 种抗菌药物的敏感率均低于非老年病区, 对其中 13 种抗菌药物的敏感率在两组间差异有统计学意义($P < 0.05$), 敏感率在 50.0% 以上的抗菌药物在非老年病区组中有 7 种, 而在老年病区组中只有 3 种; 多重耐药铜绿假单胞菌在老年病区和非老年病区的分离率分别为 78.6% 和 50.7%。结论 老年病区铜绿假单胞菌对抗菌药物的耐药性更加严重, 老年病区医师一定要根据药敏报告有针对性使用抗菌药物, 避免盲目用药导致该菌的耐药性进一步恶化。

【关键词】 老年病区; 铜绿假单胞菌; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.08.042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)08-1109-03

铜绿假单胞菌是医院感染主要病原菌^[1-2], 也是老年病区感染最常见病原菌之一^[3]。老年病区患者大多数有基础疾病, 免疫力低下, 并发症较多, 容易发生医院内感染, 为了解老年病区铜绿假单胞菌的耐药性特点, 为临床合理使用抗菌药物治疗提供参考, 本文对老年病区与非老年病区铜绿假单胞菌耐药性差异进行了分析。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2012 年 6 月至 2015 年 6 月从某三甲医院住院患者各类标本中分离到的铜绿假单胞菌, 共 992 株(同一患者同部位重复分离菌株以 1 株计), 其中 276 株来自老年病区, 716 株来自非老年病区。

1.2 质控菌株 铜绿假单胞菌 ATCC27853、嗜麦芽窄食单胞菌 ATCC17666, 购自卫生部临床检验中心。

1.3 仪器 VITEK 2 Compact 细菌鉴定仪及其配套鉴定和药敏测试卡片(法国生物梅里埃公司), 普通培养箱及二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher 公司)。

1.4 方 法

1.4.1 细菌培养 按《全国临床检验操作规程》(第 3 版)要求进行细菌培养, 标本接种于哥伦比亚血琼脂平板和嗜血杆菌巧克力平板, 分别置普通培养箱和二氧化碳培养箱培养。

1.4.2 细菌鉴定 对获得的纯培养用 VITEK 2 Compact 及

GN 卡片进行鉴定。

1.4.3 药敏试验 用 VITEK 2 Compact 及 GN13 卡片进行测试, 包括: 头孢唑林、阿米卡星、环丙沙星、亚胺培南、头孢曲松、头孢他啶、庆大霉素、哌拉西林、呋喃妥因、头孢噻肟、头孢吡肟、哌拉西林/他唑巴坦、头孢替坦、左氧氟沙星、氨苄西林、氨曲南、氨苄西林/舒巴坦、妥布霉素、复方磺胺甲噁唑等。头孢哌酮/舒巴坦药敏试验采用 K-B 法, 药敏纸片为英国 OXOID 公司产品, 按临床实验室标准化协会(CLSI)2013 年版规定操作。

1.4.4 质量控制 GN、GN04 卡片及头孢哌酮/舒巴坦纸片用铜绿假单胞菌 ATCC27853、嗜麦芽窄食单胞菌 ATCC17666 进行质量控制。

1.5 统计学处理 按菌株来源将 992 株铜绿假单胞菌分为老年病区和非老年病区两组, 原始数据用 WHONET5.3 软件进行分析, 统计学分析采用 SPSS17.0 软件, 计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 老年病区与非老年病区铜绿假单胞菌药敏结果 从老年病区分离到的铜绿假单胞菌对 20 种抗菌药物的敏感率均低于非老年病区, 对其中 13 种抗菌药物的敏感率在两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。