

是^[8-9]:(1)患者为继往感染,HCV-IgG 为一免疫学指标,在体内可以持续一段时间方渐消除或长期存在,但目前无病毒复制或 HCV-RNA 拷贝数低于检测下限而未检测出来。(2)引物及探针设计的原因,部分变异株没检出。(3)操作过程中受 RNA 酶降解出现假阴性。本次丙肝聚集性感染实验室检测采用了 ELISA 方法筛查 HCV 抗体,对抗体筛查阳性样本进一步检测 HCV-RNA 的流行病学调查方法。同时对市医院门诊样本检测 HCV 抗体和 HCV-RNA,51 例门诊样本中 HCV-IgG 抗体阳性 44 例,阳性率 86.27%,而 HCV 核酸阳性只有 28 例,阳性率仅 54.90%,差异有统计学意义($P<0.01$)。本次流行病学研究以 HCV-RNA 作为 HCV 感染的确诊标志。由于门诊样本来源为此次聚集性感染者,51 例样本中只有 7 例 HCV-IgG 抗体阴性,未检测到抗体阴性者中 HCV RNA 阳性病例,是此次研究中与以往报道不一致的地方^[9-10]。

由于 HCV-RNA 的 PCR 检测需要逆转录,在试验时除常规 PCR 要注意事项外,还应特别注意样本采集和处理时防止 RNA 酶的污染,所有实验用品均需为 DEPC 处理后不含 RNA 酶;在吸弃乙醇步骤应尽量吸干并不碰到沉淀,以缩短开盖烘干时间。尤为要注意消除由于样本污染引起的假阳性结果;此次应急检测出现 18 例抗体筛查阳性样本 HCV-RNA 全阳性现象,经进一步复查后只有 4 例 HCV-RNA 阳性,考虑为样本处理过程受到污染。在加乙醇沉淀时加样枪悬于样品处理管上方,连续加入乙醇没有更换加样枪吸头,为污染重要原因。作者建议在乙醇沉淀步骤用加样枪混匀沉淀(每次均更换吸头),不要震荡混匀,防止 RNA 丢失(沉淀经震荡后可能粘附在管口)造成实验结果误差。

• 检验技术与方法 •

痰标本中结核分枝杆菌培养及药敏检测结果分析^{*}

陈爱蓉¹,李建武¹,温贵华²

(1. 北京大学深圳医院,广东深圳 518035;2. 广东深圳宝安区慢病防治院 518036)

摘要:目的 探讨结核分枝杆菌在变色液体培养基中快速培养及药敏试验可靠性。方法 分别采用新型变色液体培养基和改良罗氏培养基对 198 例痰标本进行分枝杆菌培养及药敏试验,对比分析试验结果。结果 变色液体培养基及改良罗氏培养基检出阳性率分别是 37.9%和 37.4%。变色液体培养基试验结果平均时间为 28 d,耐药率分别为链霉素 8.00%、异烟肿 5.33%、利福平 4.00%和乙胺丁醇 4.00%;改良罗氏培养基试验结果平均时间为 62 天,耐药率分别为链霉素 8.11%、异烟肿 5.41%、利福平 4.05%和乙胺丁醇 4.05%;两者结果差异无统计学意义($P>0.05$)。多重耐药结果分别为 5.33%和 5.41%。结论 变色液体培养基是一种适合在基层实验室推广应用的结核分枝杆菌辅助诊断方法,具有快速、简单、灵敏度高的优点。

关键词:分枝杆菌,结核; 培养基; 抗药性,细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1860-03

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染病,可侵及许多脏器,以肺部受累形成肺结核最为常见^[1]。检出痰液中结核分枝杆菌一直是临床诊断肺结核或鉴别肺结核与其他肺病的主要依据。涂片找抗酸杆菌是最普及、经济的方法,但敏感性低、特异性差。改良罗氏培养法虽为金标准,但耗时长且阳性率低,不易标准化,均难以满足临床需要。缩短培养及药敏试验时间是世界防痨工作中亟待解决的研究课题之一。我国是结核病高发区,且近年结核病发病率有逐年增加的趋势^[2]。近年来,一些针对结核分枝杆菌快速检测方法陆续报道。本研究采

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:621-623.

[2] Wang CC, Krantz E, Klarquist J, et al. Acute hepatitis C in a contemporary US cohort: modes of acquisition and factors influencing viral clearance[J]. J Infect Dis, 2007, 196(10): 1474-1482.

[3] Kondili LA, Chionne P, Costantino A, et al. Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population[J]. Gut, 2002, 50(5): 693-696.

[4] 王春艳,王凯,冯冬梅. PCR 法与 ELISA 法检测丙型肝炎病毒及乙型肝炎病毒比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2002, 37(4): 493-494.

[5] 何长辉. 丙型肝炎病毒检测方法的应用评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(10): 753, 755.

[6] 冯国钢. 抗-HCV 抗体与 HCV-RNA 定量检测相关性分析[J]. 吉林医学, 2011, 32(2): 244-245.

[7] 陈开慧. 探讨三种检测方法在丙型肝炎诊断中的应用价值[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 319-321.

[8] 雷秀霞,徐邦牢,明凯华,等. 两种荧光定量法检测 HCV-RNA 结果的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(9): 777-779.

[9] 张瑞,李金明. 丙型肝炎病毒感染临床检测程序的建立及结果报告与解释[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(10): 990-992.

[10] 陈兴智,谭庆芬,黄雁,等. 多民族无偿献血者 HCV 感染状况调查研究[J]. 重庆医学, 2009, 38(12): 1443-1444.

(收稿日期:2011-12-12)

用变色液体培养基快速一步法和改良罗氏培养基同步试验,并对结果进行分析比较,探讨不同培养方法阳性结果的检出时间和阳性检出率,为临床疾病的准确快速诊断提供理论依据,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 198 例标本来自 2010 年宝安区慢性病防治院结控项目,门诊有慢性咳嗽、咳痰 3 周以上或有咯血等症状,胸透有阴影的门诊初诊患者。痰标本要求抗结核治疗前采集,痰涂片及痰培养工作严格按照卫生部制订的标准工作手册要

^{*} 基金项目:深圳市科技计划项目(201003376)。

求进行^[3]。

1.2 仪器与试剂 分枝杆菌变色液体培养基由深圳市怡百世生物技术有限公司提供,是结核分枝杆菌快速一步法培养、鉴定及药敏试剂盒,其中药敏包含 4 种常用抗菌剂:链霉素(streptomycin, SM)、异烟肼(isoniazide, INH)、利福平(rifampicine, RFP)、乙胺丁醇(ethambutol, EMB)。对硝基苯甲酸(p-nitro benzo ic acid, PNB)培养基、改良罗氏培养基及其药敏培养基均由深圳市慢性病防治中心病原检验科提供,其中药敏培养基含有 SM、INH、RFP、EMB 4 种常规抗结核药物。

1.3 方法

1.3.1 痰标本采集及预处理 所有患者于抗结核治疗前采集合格的浓痰标本。取部分痰标本制备痰涂片,制备方法参照相关文献,并经抗酸染色后镜检,余下痰标本按试剂盒说明书要求进行培养前处理。

1.3.2 变色液体培养基培养 先将处理后的标本混匀后接种于变色液体培养基中,再待充分混匀后,取 200 μL 混匀液加入微孔板 1~6 或 7~8 中,每种药物有 2 个浓度,即 A 为低浓度, B 为高浓度。然后各加入无菌液体石蜡 50 μL,置 37 ℃ 培养,按试剂盒说明书要求观察颜色变化,分析判读并记录结果。

1.3.3 改良罗氏培养基培养 先将处理后的痰标本分别接种于改良罗氏培养基、PNB 鉴别培养基,经 37 ℃ 培养分型后取得的结核分枝杆菌菌株作为试验株。然后用试验株在改良罗氏药敏基上按常规比例浓度试验方法作 4 种常用抗结核药物敏感试验对照研究。操作过程严格按照《结核病细菌学检验规程》要求操作^[4]。

1.4 质量控制 全程用卡介苗(BCG)菌株进行质量监控,确保结果在质控范围内。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析。组间率的比较用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 痰涂片结果 198 例可疑患者送痰涂片阳性检出率为 27.8%(55/198)。

2.2 培养结果 55 例涂片阳性患者痰两法均培养阳性,另 143 例涂片阴性患者样本在快速变色液体培养基上培养阳性 20 例,在改良罗氏培养基上培养阳性 19 例,两法同是涂片阴性、培养阳性 19 例,见表 1。

表 1 两种培养基培养结果

培养方法	阳性例数(n)	阳性率(%)
变色培养基	75	37.9
罗氏培养基	74	37.4

2.3 4 种常用药物药敏结果 变色液体培养基一步法平均药敏结果时间为 28 d,改良罗氏培养基平均药敏结果时间为 62 d。两种方法 4 种常用药物药敏结果之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 两种方法 4 种常用药物耐药情况

药物名称	耐药株数(变/罗, n/n)	耐药率(变/罗, %/%)
SM	6/6	8.00/8.11
INH	4/4	5.33/5.41
RFP	3/3	4.00/4.05
EMB	3/3	4.00/4.05

变:变色培养基;罗:罗氏培养基(下同)。

2.4 多重耐药结果 多重耐药判断标准:对异烟肼(INH)和利福平(RFP)两种或两种以上抗结核药物耐药的结核分枝杆菌,结果见表 3。

表 3 两种方法多重耐药情况

药物名称	耐药株数(变/罗, n/n)	耐药率(变/罗, %/%)
INH+RFP	3/3	4.00/4.05
SM+INH+RFP	1/1	1.33/1.35
合计	4/4	5.33/5.41

3 讨 论

结核杆菌检查是确诊肺结核的最特异性方法,痰中找到结核杆菌是确诊肺结核的主要依据。传统的抗酸染色法查找结核杆菌阳性率低,容易漏诊;改良罗氏培养基虽然精确可靠,特异性高,但操作繁琐,耗时过长,通常需 4~8 周才能报告。除技术原因外,与痰标本的留取质量有密切相关^[5]。近年来各种新方法不断被临床应用,包括各种自动化检测仪器。据林波等^[6]报道,BD960 型全自动快速分枝杆菌培养仪的引入,很大程度的缩短了疾病的诊断和治疗时间。Mikhailovich 等^[7]用基因芯片检测结核分枝杆菌 rpoB 基因的点突变和基因重排来判定结核分枝杆菌对利福平的耐药性,在利福平耐药菌株中检出 30 个 DNA 突变体(约占所有耐药模式的 95%),检测时间缩短到 1.5 h。

本研究采用新型变色液体培养基和改良罗氏培养基对 198 例痰标本进行枝支杆菌培养鉴定及药敏试验,变色液体培养基检出阳性率为 37.9%,改良罗氏培养基检出阳性率为 37.4%,55 例涂片抗酸染色阳性两法培养均阳性,两法可比较好,特异性 100%。变色液体培养基结果平均检出时间比改良罗氏培养基缩短 34 d,明显提高了试验诊断速度。据王莉莉等^[8]报道变色液体培养基培养阳性天数比罗氏培养基平均提早 29 d。变色液体培养基法检出耐药率分别为 SM 8.00%、INH 5.33%、RFP 4.00% 和 EMB 4.00%;改良罗氏培养基检出耐药率分别为 SM 8.11%、INH 5.41%、RFP 4.05% 和 EMB 4.05%;两者结果差异无统计学意义($P>0.05$)。对结核杆菌进行耐药性试验是指导临床合理选择抗菌药物不可缺少的步骤,定期耐药监测对评价当地结核病控制效果,制定结核病控制策略具有重要意义^[9]。耐多药结核病(multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)指对异烟肼(INH)和利福平(RFP)两种或两种以上抗结核药物耐药的结核分枝杆菌。由于患者在抗结核治疗过程中的不规范用药和结核分枝杆菌自身生物因素特性,形成 MDR-TB 的扩散^[10]。2007~2008 年开展的全国耐药调查结果中,估算我国每年发生的 MDR-TB 肺结核患者数约 12 万,位居全球第 2 位^[11]。本研究两法检出 MDR-TB 结果分别为 5.33% 和 5.41%,因为样本偏少,并不能真实反映本地区多重耐药情况。

许多新技术新仪器的应用大大提高了结核病的诊断准确性和及时性,但是,因为技术水平和经济方面的限制,基层单位却无法开展应用。因此,结核病实验诊断方法的发展首先应该强调满足患者的需要^[12],而不是对高、新、尖技术的片面追求。快速变色液体培养法是一种适合在基层实验室推广应用的方法,具有快速、简单、灵敏度高的优点。

参考文献

[1] 叶任高. 内科学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2002:84.
[2] 余春开,冯瑞娥. 结核分子生物学诊断技术的研究进展[J/CD]. 中

华肺部疾病杂志(电子版),2011,4(4):324-329.

[3] 卫生部结核病控制中心. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2009:7-14.

[4] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 2006.

[5] 徐秀琴,张惠霞,徐秀霞. 肺结核患者痰标本质量对抗酸杆菌的影响及护理对策[J]. 临床肺科杂志, 2010,15(2):142-143.

[6] 林波,颜建国. 结核分枝杆菌快速培养及药物敏感性试验的临床意义[J]. 中国民族民间医药,2011,07:96.

[7] Mikhailovich VM, Lapa SA, Gryadunov DA, et al. Detection of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by hybridization and polymerase chain reaction on a specialized TB-microchip[J]. Bull Exp Biol Med, 2001,131(1):94-98.

• 检验技术与方法 •

高碘酸钠法检测冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量方法的探讨

杨 夏,赵 磊,白旭华
(新疆乌鲁木齐兵团血站质管科 830002)

摘 要:目的 用高碘酸钠法检测冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量,对检测方法和监测流程进行探讨、评价。方法 由于国内应用较多的甘油含量化学检测法,在血站的实际检测中存在技术方法上的不足,本文借鉴《中华人民共和国药典》甘油测定法对其进行了改进;针对血站日常监测冰冻解冻去甘油血液制品按照国家标准规定留样后面临的矛盾,本文进行了探索并改进了检测方法,与原标准比较;对此建立的检测方法和流程进行了测试评价。结果 用此法检测甘油含量的相关度较高($r=0.999\ 9$);检测回收率平均为 98.7%;检测 $CV\leq 3.2\%$;可采用 10 mL 取样量替代 15 mL 取样量。结论 本文建立的实验方法和监测流程更符合血站实际工作需要,可以达到操作简单、准确监控冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量的目的。

关键词:红细胞; 血液保存; 高碘酸钠法; 甘油

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.031 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)15-1862-03

为了延长红细胞的保存期,国内外普遍采用甘油作为保护剂对红细胞进行深低温冰冻保存^[1],此项技术有效缓解了临床稀有血型紧急用血状况,对采供血机构调剂血液库存储备以应对血液偏型或突发事件所导致的“血荒”也起到了一定作用。需要注意的是:甘油具有保水作用,其意外进入人体会导致机体血容量增加,引起患者不适,在患者有妊娠、高血压等自身血容量比较高的情况下,不良症状会加重,严重者甚至有生命危险。在使用冰冻解冻红细胞之前,必须经过洗涤去除甘油保护剂,要控制洗后红细胞中甘油残留量小于或等于 10 g/L 作为底线^[2],消除甘油对人体产生的不良作用,保证输注后的红细胞能够正常发挥生理功能。本站已在 2009 年将冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量的监测作为质量控制的常规工作,开展此项检测工作中作者遇到过一些问题,并对问题进行了探讨,现将本站的检测方法和经验介绍如下。

1 材料与方法

1.1 样品来源 2009~2011 年本站制备的冰冻解冻去甘油红细胞血液。

1.2 仪器与试剂 甘油(天津市百世化工有限公司),钨酸钠(天津市河东区红岩试剂厂), H_2SO_4 (四川西陇化工厂),高碘酸钠(天津市博迪化工有限公司),乙二醇(天津基准化学试剂有限公司),氢氧化钠(天津市大茂化学试剂厂),邻苯二甲酸氢钾(纯度为:99.8%,天津市光复精细化工研究所),分析天平(精密到 0.000 1 g,德国赛多利斯)。

1.3 甘油标准溶液的配制 精密称取甘油 10.1 g(纯度为 99%),置于 100 mL 的容量瓶中,用生理盐水溶解并稀释至刻度,配成 100 g/L 的储备液。分别取储备液 2.0、4.0、6.0、

[8] 王莉莉,张莹蓉,胡忠义. 分枝杆菌快速变色培养基应用初探[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(8):460.

[9] 赵永,梁庆福,林建,等. 福建省西南地区 451 例肺结核耐药监测分析[J]. 中国热带医学,2011,11(10):1238-1239.

[10] 陈宇宁,郭平. 结核分枝杆菌耐多药研究进展[J]. 基层医学论坛,2012,16(10):1321-1322.

[11] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008)[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:49.

[12] Lemaire J F, Casenghi M. New diagnostics for tuberculosis: fulfilling patient needs first[J]. J Int AIDS Soc, 2010,13(1):40.

(收稿日期:2011-12-11)

8.0、10.0、12.0 mL 置于 100 mL 的容量瓶中,用生理盐水稀释至刻度,制成含甘油 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 g/L 的甘油标准溶液。

1.4 甘油含量测定

1.4.1 制备血滤液 准确吸取混匀后冰冻解冻去甘油红细胞 5、7.5、10、15 mL,见表 1。依照表 1 所示加入相应量的蒸馏水,混匀,静置 3~5 min,再加入相应量的 16.5%钨酸钠及 1 N H_2SO_4 ,充分混匀,用定性滤纸过滤制备得到血滤液。

1.4.2 甘油残留量的测定 精密吸取血滤液 10 mL,加入 2.14%高碘酸钠溶液 50 mL,摇匀,暗处放置 15 min 后,加 50%乙二醇溶液 10 mL,摇匀,暗处放置 20 min,加酚酞指示剂 0.5 mL,用氢氧化钠(0.1 mol/L)滴定至红色,30 s 内不褪色,滴定结果用空白试验校正。每 1 mL 氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 9.21 mg 的甘油^[3]。根据消耗氢氧化钠溶液的毫升数,依照下列公式计算样品甘油含量。

$$\text{甘油含量(g/mL)} = \text{NaOH(mL)数(样品-空白)} \times 0.009\ 21 \times \frac{\text{滴定 NaOH 浓度}}{0.1} \div \text{血滤液(mL)数} \times \frac{V}{S}$$

注意:以上所用氢氧化钠(0.1 mol/L)滴定液使用前要进行浓度标定,标定步骤为:取在 105℃干燥至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.6 g,精密称定,加新沸过的冷水(避免水中的 CO_2 对标定的影响)50 mL 振摇,使其尽量溶解;加酚酞指示液 2 滴,用本液滴定;在接近终点时应使邻苯二甲酸氢钾完全溶解,滴定至溶液显粉红色。每 1 mL 的氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 20.42 mg 的邻苯二甲酸氢钾^[3]。依照下列公式计算滴定液浓度: