· 检验技术 ·

结核杆菌实验室甲醛终末消毒效果辅助评价方法建立*

刘敏, 卢春明, 梁佳元, 王磊, 杨立军, 赵卓

摘　要: 目的　建立一种便捷可靠的辅助评价结核杆菌实验室终末消毒效果的新方法。**方法**　首先以结核分枝杆菌复合群特异性插入序列 IS6110 为靶标自主设计引物 IS6110P, 并经结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的培养物验证其特异性和灵敏度; 其次, 采用 H37Rv 培养物抽滤膜经甲醛终末消毒后分别采用普通核酸提取法和完整基因组提取核酸法提取核酸, 再经 IS6110P 引物进行特异性 PCR 扩增验证其辅助评价甲醛终末消毒效果的情况, 同时对抽滤膜进行分离培养以验证其评价结果; 最后, 采集经甲醛终末消毒结核杆菌实验室内的拭子和大气样本采用上述方法检测, 并与分离培养结果相验证, 以检测该方法的评价效果。**结果**　IS6110P 可灵敏特异地对结核分枝杆菌进行扩增, 检测限可达 3.5 cfu/R; H37Rv 培养物抽滤膜甲醛终末消毒后经普通核酸提取扩增仍有特异性核酸片段检出, 而经完整基因组提取核酸扩增无特异性核酸片段检出; 终末消毒后的结核分枝杆菌实验室采用普通核酸提取仍可扩增出结核分枝杆菌特异性核酸片段, 而完整基因组提取核酸无特异性核酸扩增片段检出; 平行的结核分枝杆菌分离培养实验结果均为阴性。**结论**　采用 IS6110P 扩增结核分枝杆菌完整基因组的核酸提取物为辅助评价结核分枝杆菌实验室终末消毒效果的灵敏、便捷和可靠的新方法。

关键词: 结核分枝杆菌实验室; 终末消毒效果评价; 方法建立

中图分类号: R 521　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2016)11-1576-04　DOI: 10.11847/zgggws2016-32-11-35

Establishment of a supplementary evaluation method for mycobacteria laboratory's terminal disinfection

LIU Min, LU Chun-ming, LIANG Jia-yuan, et al (*Department of Tuberculosis Control and Prevention, Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shenyang, Liaoning Province* 110005, China)

Abstract: Objective　To explore a new method for supplementary evaluation on the efficiency of mycobacteria laboratory's terminal disinfection. **Methods**　First, *Mycobacterium complex* specific insert sequence IS6110 was used as a target sequence to design mycobacteria specific primer IS6110P independently, and the culture of mycobacteria standard strain H37Rv was used to test the primer's specificity and sensitivity. Second, H37Rv cultivation material pumping filtration membranes were used to evaluate the common nucleotide extraction and genome extraction after formaldehyde terminal disinfection for primer chain amplification. Third, both swab and air suction filter samples were collected to extract nucleotide for primer chain amplification by traditional method and genome extraction method separately. At the same time, mycobacteria were cultured for all of the samples to evaluate the efficiency of different methods. **Results**　Mycobacteria nucleotide could be amplified sensitively and specifically with IS6110P and the limit of the detection was as low as 3.5 colony forming unit (cfu)/R. After terminal disinfection, the PCR results of mycobacteria laboratory's smear samples were still positive with traditional method but negative with genome extraction method; meanwhile the mycobacteria culture tests were all negative. **Conclusion**　Using IS6110P as primers to amplify nucleotide extracted from samples of mycobactria laboratory with genome extraction is a sensitive, convenient and reliable evaluation method for the evaluation on the efficiency of mycobacteria laboratory's terminal disinfection.

Key words: mycobacteria laboratory; evaluation on terminal disinfection efficiency; method development

结核病是世界卫生组织(World Health Organization, WHO)唯一宣布进入全球紧急状态的疾病, 据 2000 年流行病学调查结果, 中国已有 5.5 亿感染者, 其中免疫功能正常者的 10% ~20% 会在一生中的某个时段发病, 而结核病与艾滋病双重感染者则每年的发病风险可高达 >10%, 故我国的结核病防控形式不容乐观[1-2]。结核分枝杆菌为结核病的病原体, 主要经呼吸道传播且感染剂量极低, <10 个结核分枝杆菌即可使人患病, 最低感染剂量仅为 1 个活菌, 传染性极强[3]。在国务院办公厅印发的全国结核病防治规划(2011—2015)[4]中明确规定 >80% 的县级结核病实验室开展痰培养、100% 的地市级结核病实验室开展药敏试验、100% 的省级结核病实验室开展快速菌种鉴定, 因此今后从事结核分枝杆菌活菌操作的实验室数量将大大增加, 相应的生物安全问题不容忽视, 尤其是结核实验室终末消毒

* **基金项目**: 辽宁省科技厅计划项目(2013225079); 辽宁省科技厅卫生安全重点实验室项目(2007403016)
作者单位: 辽宁省疾病预防控制中心结核病防制所, 沈阳 110005
作者简介: 刘敏(1971 -), 女, 辽宁辽阳人, 主任技师, 博士, 主要从事传染病预防控制及病原微生物检测工作。
通讯作者: 赵卓, E-mail: zhaozhuo699@163.com
数字出版日期: 2016 - 8 - 10 14:10
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160810.1410.008.html

效果评价方法,我国尚缺乏相应的国家或行业标准。本研究致力于建立一种新的简易快捷的结核杆菌实验室终末消毒辅助效果评价方法,具体内容如下。

1　材料与方法

1.1　标准菌株　结核分枝杆菌标准菌株(H37Rv, ATCC27294)由中国疾病预防控制中心结核病控制中心参比实验室提供。

1.2　主要试剂与仪器　DNA 基因组提取试剂盒(DNA Microbiome Kit,德国 Qiagen 公司,Cat No. 151030517);聚酯纤维拭子(美国 fisher 公司,Cat No. FIS23 - 400 - 122);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,Cat No. 10009218);PCR 反应预混液(Go Taq® Colorless Master Mix,美国 Promega 公司,Cat No. 0000128320);琼脂糖(Vetec 公司,Cat No. WXBB1741V);甲醛(国药集团化学试剂有限公司,Cat No. 10010018),100 bp DNA lader(TransGen Biotech 公司,Cat No. I100220)。甲醛熏蒸器(型号 F50,北京克力爱尔生物有限公司);大气采样器(型号 DFC - 3BT,江苏建湖电子仪器仪表厂);NUAIRE 生物安全柜(型号 NU - 430 - 400E,美国 Nuaire 公司);组织匀浆器(型号 TissueLyser LT,德国 Qiagen 公司);超声波破碎仪(型号 S30,德国 Elma 公司);低温冷冻离心机(型号 Z36HK,美国 Thermal 公司);LifeTech 基因扩增仪(型号 Tc - 96,杭州博日科技有限公司);恒温混匀器(型号 MS - 100,杭州奥盛仪器有限公司),移液器(芬兰 Biohit 公司);涡旋震荡混合器(型号 MX - F,东胜公司);凝胶成像仪(型号 Bioimaging,美国 UVP 公司);隔水式电热恒温培养箱(型号 PYX - DHS,上海跃进医疗器械厂)。

1.3　方法

1.3.1　结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的活菌悬液及滤膜的制备　取新鲜培养结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的单个生长菌落,滴加生理盐水研磨稀释至 1 个麦氏比浊,再 10 倍稀释至 10^{-5},制成系列菌悬液备用。取双份 10^{-4} 及 10^{-5} 稀释菌悬液 100 μL 涂 7H10 平板以进行菌落计数。同时取 10^{-2} 稀释菌悬液 1 mL 经 0.45 μm 滤膜过滤,制备含 H37Rv 活菌的滤膜(20 张)备用。

1.3.2　核酸提取方法

1.3.2.1　常规超声破碎法提取核酸　将待提取核酸的微量离心管置于超声波破碎仪中,37 kHz 超声 15 min,静置 15 min 后 3 000 g 离心 5 min,取上清置于 200 μL 微量离心管中,备用。

1.3.2.2　完整细菌全基因组核酸的提取　按 DNA 基因组提取试剂盒提供的方案提取,其中组织裂解部分为采用 Tissue Lyser LT 在 50 Hz 裂解 10 min,并将其中第 4 步加入 20 μL 蛋白酶 K,56 ℃、600 r/min 孵育 30 min 优化为加入 20 μL 蛋白酶 K,4 ℃孵育 18 h,而后 56 ℃、600 r/min 孵育 30 min,最后核酸洗脱体积为 50 μL。

1.3.3　PCR 引物设计及扩增反应条件　以结核分支杆菌复合群特异性插入序列 IS6110 为靶标,采用 Primer 5 软件自主设计特异性核酸扩增引物 IS6110P、并经 GeneBank 特异性比对后合成引物、进行聚合酶链式反应,其中上游引物序列为 IS6110P - F:5′-TAC GGT GCC CGC AAA GTG-3′,下游引物序列为 IS6110P-R:5′-CGC CAG CCC AGG ATC CTG CGA GCG T-3′。扩增体系组成为:1.3.2.2 中提取的模板 5 μL、上下游引物各 1 μL(10 μmol/L)、Go Taq® Colorless Master 2 × Mix 25 μL、ddH_2O 18 μL,总体积 50 μL。扩增条件为:95 ℃预变性 10 min、35 个循环,每循环中 95 ℃变性 30 s、60℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s,最后产物末端 72 ℃延伸 10 min。以 1% 琼脂糖电泳检测鉴定扩增产物,凝胶成像仪下观察记录结果。

1.3.4　实验室终末消毒方法　操作过结核杆菌的实验室,试验完成后将实验室内温度调至 > 25 ℃、相对湿度 70% 左右时,于实验室四角及中央约 1.6 m 高度各放置 1 个含 4 张 H37Rv 活菌滤膜的平皿,而后按每立方米实验室空间使用 15 mL 36% 的甲醛使用量进行熏蒸。将相应体积的甲醛溶液及中和剂氨水分别加入甲醛发生器的 A、B 槽中,人员退出消毒区域后,关闭消毒区域与外界相通的门、传递窗以及送排风系统等,遥控启动甲醛蒸汽发生器进行熏蒸,熏蒸时间≥8 h。熏蒸后消毒区域继续密闭 24 h 再充分通风换气[5-6]。

1.3.5　培养法检测消毒灭菌效果

1.3.5.1　标准指示菌检测消毒灭菌效果　在实验室消毒前于实验室四角及中央约 1.6 m 高度各放置含 4 张 H37Rv 活菌滤膜的平皿,消毒结束后首先合上平皿盖子,置于无菌密封袋中。在生物安全柜内用无菌剪刀将经甲醛终末消毒后的 H37Rv 活菌滤膜均分,一份用于核酸检测,一份如下述处理培养:将滤膜置于 15 mL 无菌离心管中,加入 2 mL 无菌生理盐水充分涡旋震荡 3 min,而后加入等体积 4% NaOH 涡旋震荡 30 s;静置 15 min 后接种酸性罗氏培养基,37 ℃培养 4 周观察结核分枝杆菌生长情况。

1.3.5.2　沉降法检测空气总菌落数　在实验室中央以及四角约 1.6 m 高度各放置 1 个普通营养琼脂平板。琼脂开盖沉降 15 min 后密闭放入 37 ℃培养箱培养 48 h[7]。

1.3.5.3　沉降法检测结核分枝杆菌活菌数　方法

同沉降法检测空气总菌落数,但使用 7H10 琼脂取代普通营养琼脂,且在沉降结束后用封口膜密封平皿并置于密闭的塑料盒中以防干燥,培养时间为 4 周[8]。

1.3.6　结核分枝杆菌特异性核酸快速检测

1.3.6.1　样本采集

1.3.6.1.1　标准指示菌终末消毒后样本收集 见 1.3.5.1。

1.3.6.1.2　拭子擦拭样本采集　同时采用 2 支聚酯纤维拭子经无菌生理盐水湿润后涂抹待检物品表面,涂抹面积为平面 5 × 5 cm^2。其中对于实验室墙面、生物安全柜台面、生物安全柜外表面、实验台面、冰箱表面、实验室门等具有较大表面积的四角及中央进行涂抹采样,而对于实验台面把手、冰箱表面把手、实验室门把手以及离心机、恒温金属浴、超声波破碎仪、漩涡震荡混合器和加样器等则只对操作者经常接触的关键部位进行采样[9]。

1.3.6.1.3　空气抽滤样本采集　空气抽滤样本采集使用 0.3 μm 滤膜,以 5 L/min 的流速在 1.5 m 的高度于实验室的四角及中央采集 1 min 和 5 min 的样本各 1 次[10]。

1.3.6.2　样本预处理

1.3.6.2.1　标准指示菌终末消毒后样本的预处理　将 1.2.5.1 中的一半滤膜置于含 2 mL 无菌生理盐水的无菌 15 mL 离心管中,充分润湿后涡旋混匀 10 min,静置 15 min,取悬液 1 mL 分置于 2 只 1.5 mL无菌微量离心管中各 0.5 mL,备用。

1.3.6.2.2　拭子擦拭样本的预处理　于生物安全柜中将每一部位采集的 2 支聚酯纤维拭子分别置于含 0.5 mL 无菌生理盐水的 1.5 mL 无菌微量离心管中,充分挤压后涡旋混匀 5 min,备用。

1.3.6.2.3　空气抽滤样本的预处理　于生物安全柜中将空气滤膜置于含 2 mL 无菌生理盐水的无菌 15 mL 离心管中,按 1.3.6.2.1 的方法处理备用。

1.3.6.3　不同方法提取核酸　将 1.3.6.2 中预处理的样本平均分为 2 份,分别按上述 1.3.2.1 和 1.3.2.2 的方法提取核酸。

1.3.6.4　PCR 扩增　PCR 扩增反应条件同 1.3.3,其中阳性对照为 1.3.2.1 中超声破碎的 100 倍稀释菌悬液。

1.3.7　结核分支杆菌分离培养验证 PCR 结果　在生物安全柜内分别取 1.3.6.2 中预处理的样本各 100 μL,加入等体积 4% NaOH 涡旋震荡 30 s,静置 15 min 后接种酸性罗氏培养基,37 ℃培养 4 周观察结核分枝杆菌生长情况。

2　结　果

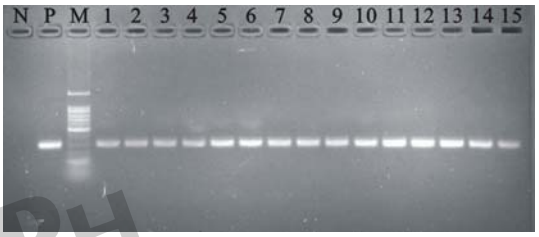
2.1　H37Rv 菌悬液菌落计数结果　2 个 10^{-4}稀释菌悬液涂布 7H10 平板上分别有 6 个和 8 个典型结核分枝杆菌菌落生长,10^{-5}稀释菌悬液涂布 7H10 平板未见菌落生长。

2.2　不同方法提取结核分枝杆菌核酸 PCR 反应扩增结果　2 种提取方法均于 10^{-4}稀释菌悬液中扩增出阳性目的片段条带,10^{-5}稀释菌悬液偶有扩增。

2.3　培养法检测甲醛终末消毒效果　在观测时限内,标准指示菌检测消毒灭菌效果、沉降法检测空气总菌落数的普通琼脂培养和培养法检测结核分枝杆菌的 7H10 琼脂培养均未见细菌生长。

2.4　不同方法提取甲醛终末消毒后标准指示菌核酸 PCR 扩增结果

2.4.1　常规核酸提取扩增结果(图 1)　20 个标准指示菌样本及阳性对照均可见强阳性目的片段扩增条带,阴性对照无目的片段扩增条带。



注:N:阴性对照;P:阳性对照;M:100 bp ladder 分子量标准;1 ~ 15:标准指示菌滤膜超声提取物。

图 1　常规核酸提取扩增标准指示菌电泳分析结果

2.4.2　完整细菌全基因组核酸提取扩增结果(图 2)　20 个标准指示菌样本均未见阳性扩增条带,同时提取的阳性对照可见强阳性目的片段扩增条带。

注:N:阴性对照;P:阳性对照;M:100 bp ladder 分子量标准;1 ~ 15:标准指示菌滤膜完整细菌全基因组提取物。

图 2　完整细菌全基因组核酸提取扩增电泳分析结果

2.5　不同方法提取甲醛终末消毒后实验室样本核酸 PCR 扩增结果

2.5.1　常规核酸提取扩增结果(图 3)　拭子样本中生物安全柜台面、实验台面、冰箱把手和门把手均检出结核分枝杆菌特异性核酸扩增条带(274 bp),其中生物安全柜的 10 个拭子样本中出现 2 次。空气抽滤样本中未见阳性扩增条带。阴性结果未列出。

2.5.2　完整细菌全基因组核酸提取扩增结果　拭子样本和空气抽滤样本均未见阳性扩增条带,同时提取的阳性对照可见强阳性目的片段扩增条带。

中国公共卫生 CPH

注：N：阴性对照；P：阳性对照；M：100 bp ladder 分子量标准；1、2：加样器；3、4：实验室墙面；5～8：生物安全柜台面；9：门把手；10：冰箱把手；11～15：实验室台面。

图 3　常规核酸提取扩增电泳分析结果

2.6　结核分枝杆菌培养验证 PCR 结果　全部拭子样品和空气抽滤样品培养均未见菌落生长。

3　讨　论

目前，结核实验室消毒效果评价尚缺乏相应国家及行业标准，而随着结核病防控工作的进一步深入，今后中国将有愈来愈多的实验室开展与结核分枝杆菌活菌操作有关的实验，与其相关的生物安全问题不容忽视。而结核分枝杆菌生长缓慢，每 16～18 h 才分裂 1 次，故采用常规分离培养方法进行结核分枝杆菌实验室的终末消毒评价耗时较长，需数周至数月，影响了实验室的高效利用，故本文致力于探讨一种可快速对结核分枝杆菌实验室终末消毒效果进行辅助评价的可靠方法。

众所周知，常规核酸检测方法非常容易受到核酸污染而产生假阳性结果，尤其是甲醛熏蒸消毒主要是使消毒对象菌体的蛋白及核酸变性以达到杀灭病原微生物之目的，尽管该病原微生物已无生物活性，但仍可有部分残存游离的核酸片段被扩增而出现假阳性，因而常规核酸提取检测的方法不完全适用于甲醛熏蒸消毒的效果评价。之前有报道指出可以采用普通分子生物学检测方法进行生物安全三级实验室的甲醛熏蒸终末消毒检测[11]，但该文在检测前对实验室进行了擦拭，此步骤可能影响了实验结果的客观性。本文数据亦显示，经甲醛熏蒸终末消毒后，在生物安全柜、实验台面、冰箱把手和门把手等易污染的重点部位普通分子生物学检测方法均可出现阳性扩增结果，而沉降法检测空气总菌落数及结核分枝杆菌培养结果均为阴性，证明该检测结果为假阳性，故常规核酸检测方法并不可取。

本研究针对甲醛熏蒸后结核分枝杆菌菌体蛋白变性、抵抗蛋白酶消化能力大大减弱的特点，采用 Qiagen 公司的 DNA Microbiome Kit 试剂仅提取具有完整菌体结构细菌的完整基因组核酸，并对提取方法进行了针对性的优化，适当延长消化时间以破坏残存菌体的细胞壁结构，甚至进一步消化基因组核蛋白，从而最大限度地降低死菌及残存核酸片段造成的假阳性干扰，以建立高效、便捷、可靠的辅助检测甲醛终末消毒效果的新方法。

检测结果显示，经甲醛熏蒸终末消毒后的指示菌 H37Rv 在采用传统方式提取核酸扩增时仍呈现强阳性，而采用本法时检测结果为阴性，与分离培养的阴性结果相一致。

经甲醛熏蒸终末消毒后的实验室现场采样检测亦显示，采用传统核酸检测方式检测时在易污染的重点部位均可出现阳性扩增结果，而本方法无阳性结果出现，与验证试验的阴性分离培养结果一致。

另外，由标准菌悬液培养计数结果可知，10^{-3}稀释的 H37Rv 菌悬液浓度约为 700 cfu/mL，则经过完整细菌全基因组核酸的提取后约在 PCR 反应体系中加入了相当于 3.5 cfu 的结核分枝杆菌基因组核酸进行扩增，由此可见本方法的检出限至少为 3.5 cfu的活菌数，与 Dalovisio 等[12]的检测结果较为一致，具有较高的灵敏度。而本文采用的引物是自主设计的 IS6110P，其靶基因为结核分枝杆菌复合群特异性的插入序列 IS6110，该序列不但已广泛用于结核分枝杆菌的分型和分子流行病学研究，特异性高，且由于相当数量的菌型具有 >1 个拷贝的 IS6110，故检测的灵敏度亦相应增加[13]。例如，结核分枝杆菌的标准株 H37Rv 即具有 16 个拷贝。

综上所述，本文方案可灵敏地检测出痕量的具有生物活性的结核分枝杆菌，且可在最大限度上避免由死菌和残存核酸片段造成的假阳性结果，不失为评价结核分枝杆菌实验室经甲醛熏蒸终末消毒后消毒效果的较好方法。

中国公共卫生 CPH

参考文献

[1] 王黎霞. 中国结核病防治工作现状分析[J]. 中国公共卫生，2012，28(4)：413－414.

[2] 徐彩红，富韵婷，阮云洲，等. 中国 6 省复治肺结核患者耐药情况调查[J]. 中国公共卫生，2016，32(1)：59－61.

[3] 中华医学会呼吸病分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志，2006，29(10)：651－655.

[4] 国务院. 全国结核病防治规划(2011—2015 年)[EB/OL]. [2011－11－17]. http://www.gov.cn/zwgk/2011－12/06/content_2012869.htm.

[5] 韩友圻，刘玉京. 甲醛熏蒸消毒多因素影响作用的研究[J]. 消毒与灭菌，1989，6(3)：132－138.

[6] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 北京：中华人民共和国卫生部，2002.

[7] 中华人民共和国卫生部. WS/T 367－2012 医疗机构消毒技术规范[S]. 北京：中华人民共和国卫生部，2012.

[8] 赵雁林，王黎霞，成诗明，等. 分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册[M]. 北京：人民卫生出版社，2013：16－35.

[9] 中华人民共和国卫生部. GB/T 18204.4－2013 公共场所卫生检验方法 第四部分：公共用品用具微生物[S]. 北京：中华人民共和国卫生部，2013：11－12.

[10] 王钰卓，王雅玲，孙力军，等. 不同生物实验室气载真菌检测分析[J]. 中国公共卫生，2009，25(9)：1149－1150.

[11] 李研，陈省平，赖小敏，等. 生物安全三级实验室甲醛熏蒸消毒灭菌效果评价[J]. 中国医药生物技术，2012，7(6)：463－465.

[12] Dalovisio JR, Montenegro-James S, Kemmerly SA, et al. Comparison of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) direct test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens[J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(5)：1099－1106.

[13] Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis from basic science to patient care (I 版)[M]. 兰州：兰州大学出版社，2009：58－60.

收稿日期：2016－04－06　　（吴少慧编辑　郭薇校对）