

• 论著 •

利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术的
诊断效果对比研究

李辉 谭耀驹 李洪敏 马晓光 邢进 郝宝林 赵雁林

【摘要】 目的 评价利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(GeneXpert Mtb/RIF)检测临床标本诊断结核病和耐利福平结核病的效能。**方法** 2011 年 1—5 月从解放军第三〇九医院、广州市胸科医院和河南省疾病预防控制中心 3 家单位,连续收集门诊就诊的 1971 例疑似结核病患者的痰标本,进行涂片、金标准培养和金标准比例法传统药敏试验和 GeneXpert Mtb/RIF 检测。应用 SPSS 11.5 统计软件对 GeneXpert Mtb/RIF 与不同检测方法进行敏感度和特异度分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 与涂片及培养比较, GeneXpert Mtb/RIF 检测 1968 例(1971 例中有 3 例污染排除)痰标本诊断结核病的敏感度和特异度分别为 93.27%(748/802)、91.93%(797/867)和 91.60%(1068/1166)、95.55%(1052/1101);与临床诊断比较, GeneXpert Mtb/RIF 检测 1945 例(1971 例中有 26 例无法定诊)痰标本诊断结核病的敏感度和特异度分别为 78.66%(822/1045)、98.67%(888/900);与金标准传统药敏试验比较, GeneXpert Mtb/RIF 检测 797 例标本诊断耐利福平结核病的敏感度和特异度分别为 97.92%(188/192)、100.00%(595/595)。**结论** GeneXpert Mtb/RIF 是一种检测痰标本诊断结核病及耐利福平结核病的快速简便、自动化、敏感度和特异度较高的分子生物学方法,适用于结核病和耐利福平结核病的临床诊断。

【关键词】 结核/诊断; 利福平; 抗药性, 细菌; 核酸扩增技术; 对比研究

Evaluation of GeneXpert Mtb/RIF assay for diagnosis of tuberculosis and rifampin-resistant tuberculosis LI Hui*, TAN Yao-ju, LI Hong-min, MA Xiao-guang, XING Jin, HAO Bao-lin, ZHAO Yan-lin. * The Tuberculosis Reference Laboratory, He'nan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 461005, China
Corresponding author: LI Hui, Email: lihui2005yan@126.com

【Abstract】 Objective To evaluate the performance of GeneXpert Mtb/RIF assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and rifampin-resistant tuberculosis (TB) in clinical samples. **Methods** The sputum samples were collected from all TB suspects who visited the outpatient departments of the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army and Guangzhou Chest Hospital, as well as the TB clinic of He'nan Provincial Center for Disease Control and Prevention (He'nan Provincial CDC) from January to May 2011. Smear microscopy, culture (golden-standard method), drug susceptibility testing (DST, conventional proportion method) and GeneXpert Mtb/RIF assay were respectively performed on each clinical sample. SPSS software version 11.5 was used for statistical analysis to compare the diagnostic sensitivity and specificity of GeneXpert Mtb/RIF assay and other examination methods, $P < 0.05$ was regarded as a significant difference. **Results** Sputum samples were collected from 1971 TB suspects. The samples from 3 suspected cases were contaminated and were excluded from the analysis. Thus 1968 suspected cases were involved in the analysis. Compared with the results of smear microscopy and culture, the sensitivity and specificity of GeneXpert Mtb/RIF assay for diagnosis of TB was 93.27%(748/802), 91.93%(797/867) and 91.60%(1068/1166), 95.55%(1052/1101) respectively; compared with the results of clinical diagnosis, the sensitivity and specificity of GeneXpert Mtb/RIF assay for diagnosis of TB was 78.66%(822/1045) and 98.67%(888/900) respectively; compared with the results of conventional DST, the sensitivity and specificity of GeneXpert Mtb/RIF assay for diagnosis of rifampin-resistant TB was 97.92%(188/192) and 100.00%(595/595) respectively. **Conclusion** GeneXpert Mtb/RIF assay is a rapid, simple and hand-free molecular diagnostic tool with high sensitivity and specificity for the diagnosis of TB and rifampin-resistant TB. It can be used for clinical diagnosis of TB and rifampin-resistant TB.

【Key words】 Tuberculosis/diagnosis; Rifampin; Drug resistance, bacterial; Nucleic acid amplification techniques; Comparative study

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.06.013

作者单位:461005 郑州,河南省疾病预防控制中心结核病参比实验室(李辉、马晓光、邢进、郝宝林);广州市胸科医院检验科(谭耀驹);解放军第三〇九医院 全军结核病研究所(李洪敏);中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心 国家结核病参比实验室(赵雁林)

通信作者:李辉,Email:lihui2005yan@126.com

结核病作为危害严重的呼吸道传染病,世界卫生组织 1992 年宣布全球进入结核病紧急状态,至 2012 年全球新发结核病患者 860 万例,约有 130 万例死于结核病^[1]。耐药结核病被认为是阻碍全球结核病控制的主要因素之一,耐药结核病的概念从 1992 年的 MDR-TB 到 2006 年的 XDR-TB^[2],再到

2012 年又出现了所谓的 TDR-TB 的概念^[3], 结核分枝杆菌的耐药谱随着抗结核药物的使用越来越广泛。2013 年全球结核病报告显示全球仅有不足 1/5 的 MDR-TB 患者被发现, 而印度和中国 MDR-TB 患者的发现率不及 1/10^[1]。耐药结核病的实验室检测技术是影响患者发现的关键, 传统的实验室检查因敏感度低, 检测周期长, 不能及时发现耐药结核病患者, 影响了耐药结核病患者治愈率, 增加了传染概率。为提高耐药结核病患者发现, 分子生物学检测技术被逐步应用到结核病实验室检测领域, 世界卫生组织向全球结核病防治领域推荐了利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术 (GeneXpert Mtb/RIF, 以下简称“GeneXpert”) 分子生物学检测方法, 既能检测结核病又能检测耐利福平结核病, 结合 GeneXpert Dx 检测平台可以实现结核病和耐利福平结核病检测的高度自动化, 在 2.5 h 内获得结果^[4]。为探求该方法在我国结核病诊断中的应用价值, 本研究联合 3 家临床单位对 GeneXpert 检测结核病和耐利福平结核病的检测效能进行评估。

对象和方法

一、研究对象

根据地域分布, 本研究在 2011 年 1—5 月选择我国北部的解放军第三〇九医院、中部的河南省疾病预防控制中心和南部的广州市胸科医院作为研究现场, 连续纳入就诊的疑似结核病患者。纳入标准为咳嗽、咯痰时间超过 2 周, 因呼吸道症状接受检查的初治结核病疑似患者, 排除抗结核药物治疗超过 6 d 的结核病患者及标本不符合要求的患者。患者的选择和研究方法分别经过了 3 家单位伦理委员会的审核批准。

3 家单位共纳入 2019 例患者, 共收集了 1971 例患者的痰标本和 138 例患者的支气管肺泡灌洗液标本, 剔除标本类型不符合要求的 138 例支气管肺泡灌洗液标本患者, 共纳入患者 1971 例。其中男 1350 例 (68.49%), 女 621 例 (31.51%); 年龄 2~95 岁, 平均年龄 (45±16.31) 岁; 北京 709 例 (35.97%), 河南 700 例 (35.51%), 广州 562 例 (28.51%)。

二、研究方法

1. 标本采集: 痰标本参照《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[5] 收集痰液标本, 无痰患者可采用雾化引痰采集标本。患者留取的痰液标本, 由检验人员检查样品质量: 样品量在 3~5 ml, 样品性状属于干酪痰、褐色血痰或含少量新鲜血液的血痰、黏液痰者为合格的标本; 痰液样品不合格者, 如唾液样

品, 需进一步指导后获取标本重新送检。

2. 显微镜检查和分离培养: 采集纳入研究对象的可疑结核病患者痰标本, 处理标本之前, 保存在 2℃~8℃ 条件下, 3 d 内完成标本的处理。按照《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[5] 的要求使用染色液 (珠海贝索生物技术有限公司) 进行萋-尼染色镜检; 同时对痰标本进行金标准分离培养, 分离培养前处理按照中国防痨协会《结核病诊断实验室检验规程》^[6] 碱处理直接法进行, 即根据痰标本黏稠程度加入 1~2 倍体积的 4% NaOH, 涡旋振荡使标本均匀化, 室温放置约 15 min, 使用无菌吸管分别吸取 0.1 ml 的消化液接种于 2 管酸性罗氏培养基 (珠海贝索生物技术有限公司) 上, 37℃ 恒温培养; 接种后的痰消化液备用。

3. 菌种鉴定和药敏试验: 痰标本分离培养的阳性产物按照《结核病诊断实验室检验规程》^[6] 进行对硝基苯甲酸 (PNB) 培养基生长试验进行菌种鉴定, PNB 培养基浓度为 500 μg/ml。

痰标本分离阳性培养物耐利福平药敏试验按照《结核病诊断实验室检验规程》^[6] 比例法进行, 利福平培养基浓度为 40 μg/ml。药敏及鉴定培养基均由珠海贝索生物技术有限公司提供。

4. GeneXpert 检测: 接种后的痰标本消化液按照 GeneXpert Mtb/RIF (Cepheid 公司, 美国) 操作说明书上的步骤进行, 在装有消化液的 50 ml 离心管中加入 pH 值 6.8 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 至 45 ml, 拧紧螺旋盖, 涡旋振荡器上振荡 30 s, 3000×g 离心 20 min, 弃去上清液, 加入 2 ml PBS, 并于涡旋振荡器上振荡重新悬浮, 悬浮液存放于 2℃~8℃, 在 12 h 内完成检测。无菌吸管移取 0.5 ml 的悬浮液至螺旋盖试管中并加入 1.5 ml 的 GeneXpert 样品试剂 (SR), 在涡旋振荡器上振荡 10 s, 室温放置 5 min, 然后使用 GeneXpert 提供的专用吸管转移样本至专用的样本反应盒 (GeneXpert Mtb/RIF Cartridge), 将样本反应盒放入 GeneXpert Dx (美国 Cepheid 公司) 仪器的样本舱中, 进行 DNA 提取、PCR 扩增和结果的检测, 通过专用软件判读结果。

5. 质量控制: 河南省疾病预防控制中心、广州市胸科医院和解放军第三〇九医院的结核病实验室均通过了国家结核病参比实验室药敏熟练度测试; 3 家单位年均固体培养污染率均小于 5%; 3 家单位均统一进行了 GeneXpert 检测方法和 GeneXpert Dx 仪器操作的专门培训。

6. 统计学分析: 应用 SPSS 11.5 统计软件对 GeneXpert 与不同检测方法进行敏感度和特异度分

析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;对 GeneXpert 与传统药敏试验进行一致性检验($Kappa$ 检验), $Kappa$ 值 ≥ 0.75 认为二者一致性很好^[7]。

结 果

一、诊断情况

1971 例纳入患者依据《WS 288-2008 肺结核诊断标准》^[8] 诊断为结核病患者 1045 例(53.02%),诊断为非结核病患者 900 例(45.66%);实验室检测结果阴性而临床症状又疑似结核病的患者 26 例(1.32%),但患者出院时仍无法做最后的确诊,作为无法定诊。

二、细菌学检测结果

1971 例标本涂片显微镜检查,其中涂片阳性 804 例(40.79%),涂片阴性 1167 例(59.21%);1971 例标本进行培养,其中 3 例(北京 1 例、河南 2 例)污染(3 例污染均包含在 26 例无法定诊患者中),培养阳性结果 901 例(45.78%),培养阴性 1067 例(54.22%);经菌种鉴定为结核分枝杆菌 867 例(96.23%),非结核分枝杆菌 34 例(3.77%)。867 例结核分枝杆菌感染者进行利福平传统药敏试验者 797 例,对利福平耐药 194 例(24.34%)。

三、GeneXpert 检测结果

1. 涂片标本的 GeneXpert 检测敏感度和特异度:在 1968 例涂片检测标本中涂片阳性 802 例(40.75%),涂片阴性 1166 例(59.25%),涂片阳性标本经 GeneXpert 检测,结果阳性 748 例;涂片阴性标本经 GeneXpert 检测,结果阴性 1068 例(表 1)。相对于涂片标本,GeneXpert 检测结核病敏感度为

93.27%(748/802),特异度为 91.60%(1068/1166)。

2. 培养标本的 GeneXpert 检测敏感度和特异度:867 例培养阳性的标本中,GeneXpert 检测结果阳性 797 例(91.93%),培养阴性(包括鉴定为非结核分枝杆菌)的 1101 例标本中,GeneXpert 检测阴性 1052 例(表 1);相对于培养标本,GeneXpert 检测结核病敏感度和特异度分别为 91.93%(797/867)、95.55%(1052/1101)。

3. 临床诊断标本的 GeneXpert 检测敏感度和特异度:1045 例临床诊断为结核病的样本中痰涂片阳性 790 例,涂片检测结核病敏感度为 75.60%(790/1045),特异度为 98.67%(888/900);培养阳性为 854 例,培养检测结核病敏感度为 81.72%(854/1045),特异度为 98.56%(887/900)(表 2)。1045 例临床诊断结核病标本中,GeneXpert 检测阳性 822 例,900 例临床诊断为非结核病的标本中,GeneXpert 检测阴性 888 例(表 1);对于临床诊断的标本,GeneXpert 检测结核病敏感度为 78.66%(822/1045),特异度为 98.67%(888/900)(表 2)。比较痰涂片、培养和 GeneXpert 3 种方法对临床诊断为结核病标本检测的敏感度和特异度,3 种方法的敏感度差异有统计学意义($\chi^2 = 11.675, P = 0.003$),3 种方法的特异度差异无统计学意义($\chi^2 = 0.055, P = 0.973$)。

GeneXpert 检测涂片标本、培养标本和临床诊断 3 种标本诊断结核病的敏感度和特异度,差异均有统计学意义($\chi^2 = 112.118, P = 0.000; \chi^2 = 54.416, P = 0.000$)。GeneXpert 检测与金标准培

表 1 GeneXpert 检测涂片标本、培养标本和临床诊断的结果(例)

GeneXpert	涂片(1968 例)		培养(1968 例)		临床诊断(1945 例)	
	阳性	阴性	阳性	阴性	结核病	非结核病
阳性	748	98	797	49	822	12
阴性	54	1068	70	1052	223	888
合计	802	1166	867	1101	1045	900

表 2 1945 例临床诊断标本涂片、培养、GeneXpert 检测结果

检测方法	检测结果	临床诊断(例)		敏感度(%)	特异度(%)
		结核病	非结核病		
涂片(例)	阳性	790	12	75.60	98.67
	阴性	255	888		
培养(例)	阳性	854	13	81.72	98.56
	阴性	191	887		
GeneXpert(例)	阳性	822	12	78.66	98.67
	阴性	223	888		

注 敏感度 = 真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数) $\times 100\%$; 特异度 = 真阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数) $\times 100\%$

养的一致率[一致率=(真阳性数+真阴性数)/总检测数 $\times 100\%$]为 93.95%[(797+1052)/1968], *Kappa* 值为 0.868 >0.75 , 说明两种检测方法结果有很好的一致性。

4. GeneXpert 检测结核利福平耐药:在进行传统利福平药敏试验的 797 例标本中,有 10 例 GeneXpert 检测利福平检测信号较弱,被判为无效结果(1.25%), GeneXpert 检测出利福平耐药 188 例,利福平敏感 599 例;与金标准传统药敏试验比较, GeneXpert 检测利福平耐药结核病的敏感度为 97.92%(188/192), 特异度为 100.00%(595/595), 一致率为 99.49%(783/787), *Kappa* 值为 0.986 >0.75 , 说明两种检测方法结果有极好的一致性。

讨 论

一、GeneXpert 检测结核病的效能分析

分子检测方法是基于检出病原体的特异基因而获得疾病信息,结核病分子检测就是检测痰或其他标本中结核分枝杆菌或耐药结核分枝杆菌的特异 DNA 或 RNA 片段,从而诊断结核病或耐药结核病。诊断结核病或耐药结核病的实验室方法有很多种^[9], GeneXpert 为世界卫生组织推荐的检测结核病和对利福平耐药结核病的方法,该方法检测结核病使用了靶基因 *rpoB* 特异序列,此特异性靶序列不同于常用的 *IS6110* 靶基因。*IS6110* 基因在不同结核分枝杆菌中拷贝数分布不同,甚至在某些结核分枝杆菌中不存在,且 *IS6110* 为结核分枝杆菌复合群所共有,而 *rpoB* 特异序列仅存在于结核分枝杆菌,有着种群特异性,本研究显示 GeneXpert 检测涂片、培养和临床诊断标本的特异度分别为 91.60%、95.55%和 98.67%,虽然诊断不同标本的检测特异度存在一定的差异,但特异度均高于 90%,这同其他研究结果相一致^[10-11]。

GeneXpert 使用了半定量巢式荧光定量 PCR,理论上能获得较高的检测敏感度。但本研究针对不同的检测标本 GeneXpert 敏感度显示了差异,对于涂阳标本的检测敏感度最高(93.27%),而临床诊断标本的敏感度最低(78.66%);同时特异度也显示了差异,对于检测临床诊断标本的特异度最高(98.67%),而涂阳标本的特异度最低(91.60%);这显示了同种方法在检测不同标本时,敏感度和特异度之间需要寻求平衡,但 GeneXpert 检测不同标本均显示了很高的特异度。本研究对结核病患者标本检测的 GeneXpert 敏感度(78.66%)高于涂片(75.60%),但低于培养(81.72%),这与对 GeneXpert 检测限

的研究结果相一致^[12];当不同浓度的结核分枝杆菌掺入到阴性痰标本中, GeneXpert 最低可以检测到 131 CFU/ml,显微镜检查能检测出结核分枝杆菌的范围在 5000~1000 CFU/ml,而培养可以检测出 10~100 CFU/ml 的结核分枝杆菌。作为分子方法的 GeneXpert 对痰标本诊断结核病,虽然研究显示了同金标准培养方法有很高的一致性,但其检测敏感度仍低于金标准。

二、GeneXpert 检测利福平耐药结核病的效能分析

本研究 GeneXpert 检测耐利福平结核病的敏感度和特异度达到了 95%以上,与传统药敏试验的一致率达到 99.49%。利福平作为重要的抗结核药物,被世界卫生组织推荐为治疗结核病的一线药物,但耐利福平结核病危害严重,世界卫生组织将同时对一线药物利福平和异烟肼耐药的结核病称为 MDR-TB, MDR-TB 的治疗时间长,治疗费用昂贵及治愈率低,已成为结核病控制的难题。耐利福平结核分枝杆菌会发生编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 基因突变,且突变多集中于 81 bp 的核心突变区,但我国不同地域利福平耐药菌株的 *rpoB* 基因突变频率不尽相同^[13],而 GeneXpert 是通过检测 *rpoB* 基因片段核心突变区而诊断耐利福平结核病。本研究中 GeneXpert 通过检测不同地域标本,获得了很高的敏感度、特异度以及同金标准传统药敏试验很高的一致性,显示了在我国检测结核分枝杆菌耐利福平的诊断价值。

三、GeneXpert 检测技术的优点和局限性

GeneXpert 配合 GeneXpert Dx 仪器自动完成从结核分枝杆菌 DNA 提取、扩增、产物检测到结果报告^[14],全部检测过程仅需要 2.5 h,与 4 周获得结果的传统药敏试验比较,实现了结核病和利福平耐药的快速检测。为保证检测结果的稳定可靠, GeneXpert 设计了 2 个质量控制点,样本质量控制 (SPC) 和探针信号控制 (PCC), SPC 监测 DNA 提取过程的正确性及检测样本对实时定量 PCR 的干扰性; PCC 检测探针的荧光信号监测 PCR 反应是否正常进行。但是 GeneXpert Mtb/RIF 需要配套价格昂贵的 GeneXpert Dx 仪器才能实现对结核病和耐利福平结核病的检测;此外,该方法仅能检测利福平缺乏对异烟肼的检测,不能诊断出 MDR-TB^[15];这些均会限制其在我国结核病诊断中的广泛应用。

总之, GeneXpert 是检测结核病和耐利福平结核病的快速简便、自动化、特异度和敏感度较高的分子诊断方法,适用于结核病控制中临床诊断结核病

及耐利福平结核病。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. Geneva: World Health Organization, 2013.
- [2] Raviglione MC, Smith IM. XDR tuberculosis-implications for global public health. N Engl J Med, 2007, 356(7):656-659.
- [3] Udawadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, et al. Totally drug-resistant tuberculosis in india. Clin Infect Dis, 2012, 54(4): 579-581.
- [4] World Health Organization. Tuberculosis diagnostics automated DNA test[DB/OL]. Geneva: World Health Organization, 2010(2010-12-07)[2014-04-01]. http://www.who.int/tb/features_archive/xpert_factsheet.pdf.
- [5] 赵雁林, 刘宇红, 姜广路, 等. 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. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009.
- [6] 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.
- [7] 张治国, 欧喜超, 孙倩, 等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术检测痰标本中结核分枝杆菌及其耐药性的研究. 中国防痨杂志, 2013, 35(1): 13-16.
- [8] 中华人民共和国卫生部. WS 288-2008 肺结核诊断标准. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1-3.
- [9] 柳正卫, 黄玉, 赵雁林. 结核分枝杆菌基因突变检测方法研究进展. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 748-751.
- [10] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [11] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert Mtb/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.
- [12] Weyer K, Mirzayev F, Migliori GB, et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert Mtb/RIF. Eur Respir J, 2013, 42(1): 252-271.
- [13] 李辉, 马晓光, 石洁, 等. 线性探针法 MtbDRplus 用于涂阳肺结核的耐多药检测研究. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(2): 380-383, 386.
- [14] Lawn SD, Nicol MP. Xpert® Mtb/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. Future Microbiol, 2011, 6(9): 1067-1082.
- [15] 胡忠义. 结核病耐药性检测技术进展及存在的问题和对策. 中国防痨杂志, 2013, 35(11): 865-867.

(收稿日期: 2014-04-17)

(本文编辑: 郭萌)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国防痨杂志》关于电子文献著录的格式要求

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志, 是必选著录项目]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问途径.

1. 在线数据库: 举例如下。

- [52] Who's Certified [DB/OL]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists, 2000 [2001-05-08]. <http://www.abms.org/newsearch.asp>.

- [53] Jablonski S. Online multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) syndromes [DB/OL]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 1999(2001-11-20)[2002-12-12]. http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

2. 电子公告: 举例如下。

- [54] 萧钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19)[2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

- [55] OCLC Online Computer Library Center, Inc. History of OCLC [EB/OL]. [2006-04-08]. <http://www.oclc.org/about/history/default.htm>.

3. 计算机程序: 注意此文献的出版地和出版者的表示。

- [56] Scitor Corporation. Project scheduler[CP/DK]. Sunnyvale, Calif.: Scitor Corporation, 1983.

不同文献类型的标志代码为: 普通图书: M; 会议录: C; 汇编: G; 报纸: N; 期刊: J; 学位论文: D; 报告: R; 标准: S; 专利: P; 数据库: DB; 计算机程序: CP; 电子公告: EB. 电子文献载体及其标志代码: 磁带(magnetic tape): MT; 磁盘(disk): DK; 光盘(CD-ROM): CD; 联机网络(online): OL.

注: 专著、论文集中析出文献[A], 其他未说明的文献类型[Z].

本刊编辑部