

应用痰模型涂片法检测抗酸杆菌结果分析*

刘庆福¹, 刘予东², 严秀丽², 邵德成³ (1. 山东省泰安市结核病防治中心参比实验室 271000; 2. 山东省泰安市泰山区疾病预防控制中心结核病防治科 271000; 3. 山东省泰安市宁阳县结核病防治所 271000)

【摘要】 目的 评价痰模型涂片法检测抗酸杆菌的应用价值。**方法** 应用组、研究组分别收集初诊活动性肺结核患者的痰标本 780 例、1 089 例,应用模型涂片法检测抗酸杆菌,两组检测结果采用 χ^2 检验进行比较。**结果** 应用组与研究组应用痰模型涂片法检测抗酸杆菌的阳性检出率分别为 29.74% (232/780)、31.68% (345/1 089) ($\chi^2=0.799; P>0.05$), 差异无统计学意义,5 项质量指标合格率均较高,分别为痰细胞(94.10%~94.21%)、痰膜大小(98.72%~98.99%)、厚薄(95.64%~96.14%)、染色(93.72%~94.49%)、痰膜脱落(97.18%~97.43%),两组痰涂片 5 项质量指标差异均无统计学意义(P 值均大于 0.05),说明应用组与研究组检测结果差异无统计学意义。**结论** 痰模型涂片法检测抗酸杆菌,实现了涂片标准化,提高了制片质量和阳性检出率,灵敏度高,重复性好,实用性强,简单易行,特别适合于基层实验室应用。

【关键词】 分枝杆菌; 结核; 痰; 细菌学技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.04.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)04-0385-03

The result analysis on the application of sputum membrane model on detecting mycobacterium tuberculosis LIU Qing-fu¹, LIU Yu-dong², YAN Xiu-li², SHAO De-cheng³ (1. Reference Laboratory, The Center of Tuberculosis Prevention and Control in Tai'an City, Shandong 271000, China; 2. Department of Tuberculosis Control, Disease Prevention and Control Center of Taishan District, Tai'an, Shandong 271000, China; 3. Tuberculosis Dispensary of Ningyang County, Taian, Shandong 271000, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of the establishing sputum membrane model to detect mycobacterium tuberculosis. **Methods** 1 089 and 780 sputum samples respectively from the initially diagnosed active pulmonary tuberculosis patients were collected as the experimental group and study group. The samples were detected with mycobacterium tuberculosis by sputum membrane model. Chi-square test was used to analyze the data. **Results** The experimental group and study group were detected the mycobacterium tuberculosis with the sputum membrane model respectively, and the positive rates were 29.74% (232/780) and 31.68% (345/1 089) ($\chi^2=0.799; P>0.05$). The difference had no statistical significance. The qualified rates of the five quality indicators were significantly high, namely the cells in sputum smear (94.10%—94.21%), sputum membrane size (98.72%—98.99%), thickness (95.64%—96.14%), dyeing (93.72%—94.49%), sputum membrane shedding pass rate (97.18%—97.43%). There were no statistically significant differences between the five quality indicators of the two groups ($P>0.05$), indicating that the test results of two groups had no significant difference. **Conclusion** The application of sputum membrane model to detect mycobacterium tuberculosis achieves smear standardization, as well as improves producer quality and the positive rate. This model is of high sensitivity, good reproducibility, and it is practical, simple and particularly suitable for the primary laboratory applications.

【Key words】 mycobacterium; tuberculosis; sputum; bacteriological techniques

痰涂片检测抗酸杆菌作为发现传染源、选择化疗方案、考核评价疗效的重要手段,在现代结核病控制工作中占有不可或缺的位置。就方法学而言,痰涂片抗酸染色检测抗酸杆菌并不复杂,关键是如何提高抗酸杆菌的阳性检出率,因此,加强痰标本采集、染色剂制备、涂片制备、染色、显微镜镜检、结果报告等环节的质量控制,特别是涂片制备是提高制片质量的关键环节之一。为了提高制片质量和抗酸杆菌阳性检出率,及时发现传染性肺结核患者,泰安市结核病防治中心刘庆福^[1]带领的课题组研发出了痰模型涂片法检测抗酸杆菌,它通过对照玻片下面的标准膜,在玻片正面均匀涂抹成 10 mm×20 mm 椭圆形痰

膜,有效控制了痰膜涂抹大小,从而实现了制片标准化,提高了制片质量和抗酸杆菌阳性检出率^[1]。宁阳县结核病防治所 2010 年 1 月至 2012 年 6 月初诊的活动性肺结核患者,作为应用组应用痰模型涂片法检测抗酸杆菌,现将应用组检测结果与刘庆福等^[1]报道的研究组检测结果对比分析如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 应用组 收集宁阳县结核病防治所 2010 年 1 月至 2012 年 6 月初诊的活动性肺结核患者,经临床、放射、检验医生会诊,挑选排菌可能性较大的肺结核患者为检测对象,如肺

* 基金项目:山东省泰安市科技发展计划(编号:20113060)。

空洞、肺实变、支气管播散等患者共计 260 例,诊断标准见文献[2]。其中肺空洞 21 例,男 11 例,女 10 例,年龄 17~72 岁,平均(37±10.2)岁;肺实变 67 例,男 32 例,女 35 例,年龄 19~81 岁,平均(50±13.9)岁;支气管播散 172 例,男 98 例,女 74 例,年龄 14~69 岁,平均(36±12.7)岁。每位患者按要求留取当日即时痰、夜间痰、次日晨痰 3 份痰标本送检,共计 780 份,留痰前的健康教育由检验人员采用示范法^[3]指导患者留痰,即语言加动作给患者示范漱口刷牙、轻咳弃去咽喉部异物、深吸气猛咳等整个留痰过程。当日即时痰为患者就诊时深咳出的痰液,次日晨痰为次日晨起后用力深咳出的痰液,夜间痰为当日晚至次日晨在夜间深咳出的痰液。

1.1.2 研究组 收集泰安市结核病防治院、泰安市泰山区疾病预防控制中心在 2010 年 1~12 月初诊的活动性肺结核患者,经临床、放射、检验医生会诊,挑选排菌可能性较大的肺结核患者为研究对象,如肺空洞、肺实变、支气管播散等患者,诊断标准见文献[2]。其中肺空洞 29 例,男 16 例,女 13 例,年龄 18~70 岁,平均(39±11.5)岁;肺实变 87 例,男 48 例,女 39 例,年龄 21~87 岁,平均(52±14.6)岁;支气管播散 247 例,男 129 例,女 118 例,年龄 16~73 岁,平均(36±12.7)岁。每位患者按要求留取当日即时痰、夜间痰、次日晨痰 3 份痰标本送检,共计 1 089 份。留痰方法同应用组。

1.2 实验方法 应用组与研究组实验方法完全相同。

1.2.1 模型涂片法 涂片时将洁净的玻片放入旋转式抗酸杆菌涂片标准模型板玻片槽内,用折断的竹签在端挑取痰标本的脓样、干酪样、黏液样等可疑部分约 0.05~0.1 mL,对照玻片下面的标准膜,在玻片正面均匀涂抹成 10 mm×20 mm 椭圆形痰膜。

1.2.3 染色镜检 染色在旋转式抗酸杆菌涂片标准模型板上进行,往痰膜上加石碳酸复红溶液,加热至有蒸气出现,切不可沸腾,染 5 min,旋转 90°弃去复红染液并用水冲洗干净,加 3% 的盐酸乙醇脱色至红色完全脱去,旋转 90°弃去盐酸乙醇并用水冲洗干净,加亚甲蓝复染 1 min,旋转 90°弃去亚甲蓝染液并用水冲洗干净。干后油镜读片,读片时从左向右观察相邻的视野,当玻片移动至痰膜一端时,纵向向下转换一个视野,然后从右向左观察,依次类推。

1.2.4 结果判断 分级报告标准依据《中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)》^[4]。抗酸杆菌阴性:连续观察 300 个不同视野,未发现抗酸杆菌;报告抗酸杆菌菌数:1~8 条抗酸杆菌/300 视野;抗酸杆菌阳性(1+): 3~9 条抗酸杆菌/100 视野;抗酸杆菌阳性(2+): 1~9 条抗酸杆菌/10 视野;抗酸杆菌阳性(3+): 1~9 条抗酸杆菌/视野;抗酸杆菌阳性(4+): 抗酸杆菌大于或等于 10 条/视野。

1.3 质量控制

1.3.1 室内质控 新配制染色剂用泰安市结核病防治中心制备的已知结果的阳性和阴性质控片进行检测,质控片制备和染色剂检测方法见文献[5];报告阳性结果由 3 名实验室工作人员同时确认,阴性结果由 2 名实验室工作人员同时阅片确认。

1.3.2 室间质控 应用组、研究组均由泰安市结核病防治中心参比实验室盲法抽取痰涂片进行复检。应用组抽样方法:根据样本量表确定抽取痰涂片 50 张,抽样间距=痰涂片总数 780/抽片数 50=16,查随机数字表确定第一张涂片序号为 5,在应用组 780 张痰涂片中,从第 5 号起,每间隔 16 抽取 1 张涂片,直到抽满 50 张。研究组抽样方法:根据样本量表确定抽取痰涂片 80 张,抽样间距=痰涂片总数 1 089/抽片数 80=14,

查随机数字表确定第一张涂片序号为 3,在研究组 1 089 张痰涂片中,从第 3 号起,每间隔 14 抽取 1 张涂片,直到抽满 80 张。

1.3.3 痰涂片质量控制标准 痰细胞数平均大于或等于 10 个/视野,痰膜大小 10 mm×20 mm±5%,痰膜厚薄每视野平均 2~3 层,痰膜脱落小于或等于 10%痰膜面积,染色背景着色,痰膜呈均匀亮蓝色,无红色斑块。

1.3.4 阳性符合率和阴性符合率的计算公式 阳性符合率(%)=原始结果阳性数/复检结果阳性数×100;阴性符合率(%)=原始结果阴性数/复检结果阴性数×100。

1.4 统计学方法 模型涂片法应用组与研究组阳性检出率、痰涂片制备和染色合格情况比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰标本的性状 应用组在送检的 780 份痰标本中,干酪痰、脓痰、血痰、黏液痰等合格标本 724 份,占 92.82%,唾液、口水等不合格标本 56 份,占 7.18%。研究组在送检的 1 089 份痰标本中,干酪痰、脓痰、血痰、黏液痰等合格标本 1 036 份,占 95.13%,唾液、口水等不合格标本 53 份,占 4.87%。应用组、研究组痰标本性状见表 1。

表 1 应用组、研究组痰标本性状

标本性状	应用组		研究组	
	痰标本数(n)	占有率(%)	痰标本数(n)	占有率(%)
干酪痰	141	18.08	215	19.74
脓痰	189	24.23	243	22.31
血痰	38	4.87	46	4.23
黏液痰	356	45.64	532	48.85
唾液	36	4.62	26	2.39
口水	20	2.56	27	2.48
合计	780	100	1 089	100

2.2 应用组、研究组模型涂片法制作的痰涂片镜检结果 模型涂片法制作的痰涂片应用组阳性检出率为 29.74%(232/780),研究组阳性检出率为 31.68%(345/1 089),应用组比研究组阳性检出率低 1.94%,无统计学意义($\chi^2=0.799, P=0.371$),两组阳性检出率差异无统计学意义。应用组、研究组应用模型涂片法制作的痰涂片镜检结果见表 2。

表 2 两种痰涂片方法的镜检结果(n)

组别	阴性	阳性					合计
		1~8 条	1+	2+	3+	4+	
应用组	548	18	96	50	41	27	232
研究组	744	39	131	63	71	41	345
合计	1292	57	227	113	112	68	577

2.3 应用组、研究组模型涂片法痰涂片制备和染色情况 应用组与研究组应用模型涂片法制作的痰涂片痰细胞、痰膜大小、厚薄、染色、痰膜脱落 5 项质量指标合格率均较高,两组痰涂片 5 项质量指标差异均无统计学意义(P 值均大于 0.05),差异无统计学意义。不同质量指标应用组、研究组痰涂片制备和染色结果比较见表 3。

2.4 室间质控情况 泰安市结核病防治中心参比实验室盲法抽取应用组模型涂片法制作的痰涂片 50 张,复检结果为定性、

分级准确,原始结果与复检结果阳性符合率 100.00%,阴性符合率 100.00%,痰涂片质量符合国家标准。同时盲法抽取研究组模型涂片法制作的痰涂片 80 张,复检结果为定性、分级准确,原始结果与复检结果阳性符合率 100.00%,阴性符合率 100.00%,痰涂片质量符合国家标准。应用组、研究组模型涂片法制作的痰涂片原始结果与复检结果对照情况见表 4。

表 3 不同质量指标应用组、研究组痰涂片制备和染色结果比较

质量指标	应用组(n=780)		研究组(n=1 089)		χ^2 值	P 值
	合格(n)	合格率(%)	合格(n)	合格率(%)		
痰细胞	734	94.10	1 026	94.21	0.010	0.919
大小	770	98.72	1 078	98.99	0.303	0.582
厚薄	746	95.64	1 047	96.14	0.294	0.588
染色	731	93.72	1 029	94.49	0.494	0.482
脱落	758	97.18	1 061	97.43	0.109	0.742

表 4 应用组、研究组模型涂片法制作的痰涂片原始结果与复检结果对照情况(n)

组别	结果	阳性		痰细胞数	痰膜大小	痰膜厚薄	染色背景着色	痰膜脱落
		阳性	阴性					
应用组	原始结果	14	36	47	50	48	47	49
	复检结果	14	36	48	50	49	47	49
研究组	原始结果	28	52	76	80	77	76	78
	复检结果	28	52	77	80	78	76	78

(注:应用组、研究组模型涂片法制作的痰涂片初检与复检时,阳性、阴性痰涂片张数,痰细胞数、痰膜大小、痰膜厚薄、染色背景着色、痰膜脱落分别符合质量控制标准的痰涂片张数)

3 讨论

痰涂片检测抗酸杆菌操作简单,快速、价廉,特异性较高,是最普及、最经济的方法,也是中小实验室和基层实验室的主要检验方法。但是目前开展的目测涂片法制片质量和阳性检出率低,这已是不争的事实,国内也有诸多相关报道^[6]。要提高痰涂片检测抗酸杆菌的阳性检出率,留取合格的痰标本是前提,制作高质量的痰涂片是提高阳性检出率的关键^[7]。从表 1 可以看出,应用组、研究组分别留取了 92.82%、95.13% 的合格痰标本,为提高阳性检出率打下了良好基础,在挑取痰标本可疑部分 0.05~0.1 mL 的前提下,涂片时涂抹过大,可导致痰膜过薄,痰细胞数量过少,镜检时观察相同数量的视野,就会降低阳性检出率,反之,涂抹过小,导致痰膜过厚,继而引起染色不均,痰膜脱落,镜检模糊不清,也会降低阳性检出率。如何提高制片质量和阳性检出率,成为痰涂片检测抗酸杆菌亟待解决的问题,应用组应用刘庆福等研发的痰模型涂片法检测抗酸杆菌结果显示,模型涂片法可有效控制影响因素,提高制片质量和阳性检出率。

3.1 模型涂片法提高了阳性检出率 从表 2 可以看出,应用组、研究组模型涂片法阳性检出率分别为 29.74%、31.68%,均明显高于国内相关报道^[8]。分析原因:一是为了评价模型涂片法检测抗酸杆菌的应用价值,挑选了初诊的活动性肺结核患者,即临床认为排菌可能性较大的肺结核患者为研究对象,这应该是提高幅度过大的主要原因^[9]。二是检验人员示范法指导患者留取了合格的痰标本以及仔细挑取了可疑标本涂片;三是模型涂片法提高了阳性检出率。应用组应用结果显示模型

涂片法有效控制了痰涂片检查抗酸杆菌的实验程序,提高了制片质量,从而提高了阳性检出率。

3.2 模型涂片法实现了涂片标准化 模型涂片法是在挑取痰标本一定量(0.05~0.1 mL)的前提下,对照玻片下面的标准模(10 mm×20 mm)涂抹,控制了痰膜的面积,既然痰量、面积都已固定,也就控制了痰膜厚薄,与此同时,由于痰膜厚薄适宜,也就提高了染色效果,避免了痰膜脱落,提高了制片质量。另外,可根据工作量大小制作数量不等的痰膜模型,在旋转式抗酸杆菌涂片标准模型板上染色,通过染色板旋转,实现了水洗同步,避免了痰片之间染色时间上的差异,大大提高了工作效率和染色效果^[10]。

从表 3 可以看出,应用组与研究组应用模型涂片法制作的痰涂片痰细胞、痰膜大小、厚薄、染色、痰膜脱落 5 项质量指标合格率均基本一致,两者差异无统计学意义,说明该方法重复性好,精密度高,减少了人为误差,实现了涂片标准化。

3.3 模型涂片法制作的痰涂片符合国家标准 痰涂片室内质控最重要的意义是保证检验质量的准确可靠。从表 4 可以看出,盲法抽取应用组与研究组应用模型涂片法制作的痰涂片,原始结果与复检结果的阳性、阴性和痰涂片 5 项质量指标都具有很高的符合率,各项指标均符合国家标准,说明模型涂片法的检测结果是准确可靠的。

总之,痰模型涂片法检测抗酸杆菌,实现了涂片标准化,提高了制片质量和阳性检出率,灵敏度高,重复性好,实用性强,简单易行,特别适合于基层实验室应用。

参考文献

- [1] 刘庆福,刘予东,严秀丽.痰模型及目测涂片法检测抗酸杆菌的比较研究[J].中国防痨杂志,2012,34(6):364-368.
- [2] 王陇德.结核病防治[M].北京:中国协和医科大学出版社,2004.
- [3] 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,2006,30-37.
- [4] 卫生部疾病预防控制局.中国结核病防治规划实施工作指南(2008年版)[M].北京:中国协和医科大学出版社,2009,10-19.
- [5] 赵雁林,姜广路,夏辉,等.结核菌痰涂片显微镜检查标准化培训教材[M].北京:人民卫生出版社,2009.
- [6] 陈中秀,谢清波,周凤荣.聚集沉淀涂片与直接涂片抗酸染色法检测抗酸杆菌的应用比较[J].中国防痨杂志,2009,31(4):225-226.
- [7] 穆洮俊,刘红艳,李晴,等.甘肃省结核病痰涂片省对县间质量控制结果分析[J].中国防痨杂志,2009,31(8):457-460.
- [8] 李国红,苗润青,贾艳辉,等.1 284 份痰标本分枝杆菌涂片镜检与培养结果分析[J].中国防痨杂志,2011,33(8):492-495.
- [9] 宋红焕,孟尔旺,时金艳,等.痰标本采集、储存及运输过程对培养结果影响的分析[J].中国防痨杂志,2011,33(6):372-376.
- [10] 刘庆福.模板涂片法检测抗酸杆菌的临床应用价值[J].国际检验医学杂志,2010,31(10):1094-1098.