

夹层杯集菌离心涂片法与改良罗氏培养法检测抗酸杆菌的比较

简子娟¹, 胡培磊², 杨华林², 李艳冰¹, 彭 钧¹, 刘文恩¹

(1 中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008; 2 湖南省结核病防治所, 湖南 长沙 410205)

[摘 要] **目的** 评价夹层杯集菌离心涂片法(夹层杯法)检测抗酸杆菌的临床诊断价值。**方法** 收集 2008 年 7—12 月就诊于湖南省湘潭、湘乡、邵东和耒阳 4 个县(市)结核病防治部门共 1 190 例肺结核可疑症状者的 1 782 份痰标本(晨痰 642 份, 即时痰 1 140 份), 每份标本同时采用夹层杯法与改良罗氏培养法(培养法)平行处理, 对其检测结果进行比较。**结果** 对晨痰标本检测的阳性率, 培养法为 26.64%(171/642), 高于夹层杯法的阳性率 23.52%(151/642), 两者差异有显著性($\chi^2 = 4.56, P = 0.04$); 对即时痰标本检测的阳性率, 培养法为 23.33%(266/1 140), 高于夹层杯法的阳性率 18.07%(206/1 140), 两者差异有高度显著性($\chi^2 = 34.60, P = 0.00$)。夹层杯法对晨痰的阳性检出率高于即时痰($\chi^2 = 7.62, P = 0.01$); 培养法对晨痰的阳性检出率与即时痰比较, 差异无显著性($\chi^2 = 2.42, P = 0.12$)。**结论** 夹层杯法检测抗酸杆菌的阳性率低于培养法, 但简单、省时, 便于进行质量控制, 是一种很有推广价值的检测方法; 夹层杯法检测晨痰抗酸杆菌的阳性率较高, 故应尽量留取晨痰作抗酸杆菌检测。

[关键词] 结核; 结核分枝杆菌; 抗酸杆菌; 夹层杯集菌离心涂片法; 改良罗氏培养法

[中图分类号] R446.19 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)01-0026-04

Comparison of sandwich cup collecting bacteria and smear method and improved Lowenstein Jensen culture in detecting acid-fast bacilli

JIAN Zi-juan¹, HU Pei-lei², YANG Hua-lin², LI Yan-bing¹, PENG Jun¹, LIU Wen-en¹ (1 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2 Tuberculosis Prevention and Treatment Institute of Hunan Province, Changsha 410205, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the clinical diagnostic value of sandwich cup collecting bacteria and smear method (sandwich cup method) in the detection of acid-fast bacilli. **Methods** From July to December 2008, 1 782 sputum samples (including 642 morning sputum and 1 140 random sputum) were collected from people who were suspected to have pulmonary tuberculosis at tuberculosis prevention and treatment departments in 4 counties (cities) of Hunan Province. Each sample was dealt with sandwich cup method and improved Lowenstein Jensen(L-J) culture, respectively, the results were analyzed. **Results** The positive rate of L-J culture and sandwich cup method was 26.64%(171/642) and 23.52% (151/642) in morning sputum, respectively, there was significant difference between the two($\chi^2 = 4.56, P = 0.04$); The positive rate of L-J culture and sandwich cup method was 23.33%(266/1 140) and 18.07% (206/1 140) in random sputum respectively, there was significant difference between the two($\chi^2 = 34.60, P = 0.00$). The positive rate of sandwich cup method in morning sputum was significantly higher than that in random sputum($\chi^2 = 7.62, P = 0.01$), while the positive rate of L-J culture in morning and random sputum showed no statistical difference ($\chi^2 = 2.42, P = 0.12$). **Conclusion** The positive rate of sandwich cup method is lower than L-J culture in detecting acid-fast bacilli, but the former is simple, time-saving and easy to carry out quality control, and is worth popularizing in clinic. The positive rate of sandwich cup method in morning sputum is high, so morning sputum should be kept to detect acid-fast bacilli clinically.

[Key words] tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; acid-fast bacilli; sandwich cup collecting bacteria and smear method; improved Lowenstein Jensen culture

[Chin Infect Control, 2011, 10(1): 26-29]

[收稿日期] 2010-06-12

[基金项目] 国家科技重大传染病专项课题资助(2008ZX10301)

[作者简介] 简子娟(1984-), 女(汉族), 江西省樟树市人, 硕士研究生, 主要从事临床微生物学研究。

[通讯作者] 刘文恩 E-mail: liuwenen@hotmail.com

结核病是由结核分枝杆菌(MTB,一种抗酸杆菌)引起的传染性疾病,与 MTB 接触的一半人群会被感染,被感染者终生都将有成为结核病患者的危险性,其中有 10% 的人 would 发病。目前,全球范围内对结核病的关注日益增强,据世界卫生组织报告,全世界 1/3 的人口感染或曾经感染过结核,因而结核病仍是全球的一个重要公共卫生问题^[1]。

MTB 感染的实验室诊断主要包括细菌学检测、免疫学诊断、分子生物学诊断 3 方面技术,但各有利弊。痰涂片细菌学检查具有确诊意义,但检出率低;MTB 培养时间太长;分子生物学诊断作为临床诊断,需要特殊仪器设备,技术相对复杂,对实验室条件和操作人员的要求较高,现阶段难普遍推广。如何快速诊断和治疗,对防止结核病的传播意义重大,因此寻找一种特异、敏感、早期、快速、简便的结核病实验室诊断方法是大家共同期盼的。目前,一项基于液基薄层技术的结核病诊断新技术——夹层杯集菌离心涂片法(简称夹层杯法)逐步发展起来。本研究比较了该方法和培养法对抗酸杆菌的检测情况,从而评价该方法在结核病诊断方面的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源 从湖南省随机抽取湘潭、湘乡、邵东和耒阳 4 个县(市)结核病防治部门作为实验现场,以 2008 年 7—12 月在 4 个实验现场就诊的 1 190 例肺结核可疑症状者为研究对象。自 2008 年 7 月 1 日起,收集上述研究对象的痰标本共 1 782 份,其中晨痰 642 份,即时痰 1 140 份。每份标本同时采用夹层杯法和培养法平行处理,并对其结果进行比较分析。

1.2 试剂与仪器 夹层杯法抗酸染色液试剂盒、夹层杯、消化液(主要成分为强氧化剂、蛋白消化剂)、TQ-12 自动离心涂片机、KP-1 快速干片机,均为湖南天骑医学新技术有限公司产品。改良罗氏培养基,由国际防痨和肺病联合会(IUATLD)推荐配方,本实验室自行配制。

1.3 标本留取 按《痰涂片镜检质量保证手册》要求,留取清晨深咳出的痰液和即时痰分别约 3~5 mL,于密闭的无菌痰杯中记录痰量。取适量痰液,严格按照《结核病诊断细菌学检验规程》^[2]操作,接种于改良罗氏培养基中,同时将剩余标本于规定检测时间内进行夹层杯法检测。

1.4 改良罗氏培养法 首先进行标本处理:选择干酪样、脓性痰液标本,加 2 倍量 35 g/L 氢氧化钠处理液(黏稠标本适当增加处理液量),充分振荡,置 37℃ 水浴箱消化 15 min,期间振荡 2 次,3 000 r/min 离心 10 min,倾去上清液,沉淀物混匀备用。然后接种:取上述备用沉淀物 0.1 mL 接种于罗氏培养基中,置 36℃ 孵育箱内培养。刚开始时,于第 3 天和第 7 天各观察 1 次,以后每周观察 1 次,有菌落生长者,经涂片抗酸染色确认后报告阳性,8 周后未见菌落生长者为阴性。

1.5 夹层杯法

1.5.1 工作原理 夹层杯内经消化完全的痰液中的有形成分(抗酸杆菌、细胞等),经离心涂片机离心,均匀涂布于夹层杯内底面(内底为 0.1 mm 厚透明材料,半径 11.6 mm),经干燥、固定,在夹层杯中直接抗酸染色、干燥,并用取片针顶出内底,经封片等步骤后,镜下检测抗酸杆菌。

1.5.2 操作步骤 (1)标本处理:将标本 3~5 mL 加 2 倍体积消化液,混匀,置室温约 30 min,期间摇动数次。如标本过于黏稠,可适当延长消化时间,待消化完全。用一次性塑料吸样管移取消化好的标本 3 mL 于液基集菌杯内,放入 TQ-12 自动离心涂片机中以 4 000 r/min 离心 8 min,倾去上清液、沥干,将集菌杯放入 KP-1 快速干片机内烘干、固定(注:标本经消化液处理后,抗酸杆菌已灭活,不会造成环境污染)。(2)染色镜检:按试剂盒说明书步骤在杯中进行染色完毕,自然干燥或烘干后,用专用取片针顶出夹层片,使涂菌面向下,置载玻片(已滴加中性树胶),用镊子轻压,防止气泡,油镜检查。

1.6 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,率的比较采用 McNemar 检验或 χ^2 检验,所有检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰检情况 4 个实验现场痰检情况见表 1。

2.2 夹层杯法和培养法对痰中抗酸杆菌阳性检出的比较 在 642 份晨痰标本中,通过夹层杯法检测阳性 151 份,阳性率 23.52%;培养法检测阳性 171 份,阳性率 26.64%;培养法检测阳性率高于夹层杯法,差异有显著性($P < 0.05$)。在 1 140 份即时痰标本中,通过夹层杯法检测阳性 206 份,阳性率 18.07%;培养法检测阳性 266 份,阳性率 23.33%;

培养法检测阳性率高于夹层杯法, 差异有高度显著性($P < 0.01$), 详见表 2。

夹层杯法检测晨痰和即时痰的阳性率分别为 23.52%、18.07%, 两者比较, 差异有高度显著性

($P < 0.01$); 培养法检测晨痰和即时痰的阳性率分别为 26.64%、23.33%, 两者比较, 差异无显著性($P > 0.05$), 详见表 3。

表 1 2008 年 7—12 月湖南省 4 县(市)结核病防治部门的痰检情况(份, %)

Table 1 Detection results of sputum at tuberculosis prevention and treatment departments in 4 counties (cities) of Hunan Province between July-December, 2008 (case, %)

| 实验现场 | 晨痰 | | | 即时痰 | | |
|------|--------|------------|------------|--------|------------|------------|
| | 标本数(份) | 阳性标本 | | 标本数(份) | 阳性标本 | |
| | | 夹层杯法 | 培养法 | | 夹层杯法 | 培养法 |
| 湘潭 | 83 | 28(33.73) | 33(39.76) | 194 | 67(34.54) | 85(43.81) |
| 湘乡 | 58 | 8(13.79) | 17(29.31) | 222 | 27(12.16) | 48(21.62) |
| 邵东 | 197 | 41(20.81) | 46(23.35) | 420 | 50(11.90) | 58(13.81) |
| 耒阳 | 304 | 74(24.34) | 75(24.67) | 304 | 62(20.39) | 75(24.67) |
| 合计 | 642 | 151(23.52) | 171(26.64) | 1 140 | 206(18.07) | 266(23.33) |

表 2 夹层杯法和培养法对同一痰标本中抗酸杆菌阳性检出比较(份)

Table 2 Comparison in the positive rates of acid-fast bacilli from the same types of sputum samples detected with sandwich cup and culture method (case)

| 痰样 | | 培养法 | | 合计 | χ^2 | <i>P</i> |
|-----|------|-----|-----|-----|----------|----------|
| | | 阳性 | 阴性 | | | |
| 晨痰 | 夹层杯法 | 阳性 | 117 | 34 | 4.56 | 0.04 |
| | | 阴性 | 54 | 437 | | |
| | 合计 | 171 | 471 | | | |
| 即时痰 | 夹层杯法 | 阳性 | 184 | 22 | 34.60 | 0.00 |
| | | 阴性 | 82 | 852 | | |
| | 合计 | 266 | 874 | | | |

采用 McNemar 检验

表 3 夹层杯法和培养法对不同痰标本中抗酸杆菌阳性检出比较

Table 3 Comparison in the positive rates of acid-fast bacilli from the different types of sputum samples detected with sandwich cup and culture method

| 方法 | 痰样 | 标本数(份) | 阳性标本(份, %) | χ^2 | <i>P</i> |
|------|-----|--------|------------|----------|----------|
| 夹层杯法 | 晨痰 | 642 | 151(23.52) | 7.62 | 0.006 |
| | 即时痰 | 1 140 | 206(18.07) | | |
| 培养法 | 晨痰 | 642 | 171(26.64) | 2.42 | 0.12 |
| | 即时痰 | 1 140 | 266(23.33) | | |

3 讨论

培养法检测结核菌虽然有较高的阳性率, 但培养周期太长, 需 4~6 周, 始终无法实现结核菌的快速检测, 不利于结核病的早发现, 早治疗, 难以满足临床需要^[3]。研究人员始终在不断探索快速检测结核菌的方法, 如直接涂片法、厚涂法; 富集试验, 如沉淀集菌法和漂浮集菌法; 结核抗体检测法等, 但效果均不理想^[4-5]。有研究表明聚合酶链反应(PCR)

法检测结核菌具有很高的敏感性和特异性^[5], 但实验室条件要求高, 不利于普通和基层医院开展。

近年来, 一项基于液基薄层技术的结核病辅助诊断新技术——夹层杯集菌离心涂片法逐步发展起来。液基细胞学技术是一种将标本通过细胞处理液处理, 经比重液离心后, 去除干扰成分, 收集余下的目标细胞制成超薄层细胞, 该技术目前主要用于妇科宫颈癌筛查方面的检查^[6]。近期国内有学者对于该方法在肺癌诊断中的价值进行了评估, 研究结果显示^[7], 通过痰液标本检测肺癌细胞, 液基细胞学要

好于传统涂片法,具有明显的优越性。后来,研发人员根据此技术开发了一种快速检测结核菌的新技术,命名为夹层杯集菌离心涂片法,简称夹层杯法。该方法是将痰液使用特制的痰液消化液消化,并结合高速震荡,使痰标本充分液化而有利于其中的抗酸杆菌沉淀于特制彭氏杯底部的菌膜上,再进行染色、读片,比原来的涂片法及培养法收集抗酸杆菌的范围更广泛,更完全,其检查结果更具代表性^[8]。

本研究结果显示,对 642 份肺结核可疑患者的晨痰进行改良罗氏培养,其阳性率为 26.64%,与许蕴怡^[9]等报道的培养阳性率 31.0% 较一致;同时,夹层杯法的阳性率为 23.52%,与李锐^[10]等的研究结果相符。经统计学分析,培养法对晨痰和即时痰标本的检测阳性率均高于夹层杯法,但夹层杯法与传统的涂片染色法的阳性率(15%左右)^[11]相比,有了很大的提高。而且有研究报道^[12],直接涂片染色法检测为阳性的标本经液基结核菌集菌制片技术检测均为阳性。夹层杯法突破了培养法无法克服的难题,且除了速度快以外,该方法较培养法还有很多优势:可对标本体积定量,对夹层片和油镜面积定量,从而准确计算单位体积痰液中抗酸杆菌的含量;操作更加安全、简便,由于取材→固定→烤片→染色均在彭氏杯中进行,标本经消化液处理后抗酸杆菌已灭活,显微镜阅片时也无须与含菌面接触,大大减少了检验工作人员的感染和实验室的污染。

研究结果同时也显示了夹层杯法与培养法检测结果有不一致的情况。本研究中表现为,在晨痰检测中有 54 份培养阳性而夹层杯法阴性,34 份培养阴性而夹层杯法阳性;同样在即时痰检测中,有 82 份痰检培养阳性而夹层杯法阴性,22 份培养阴性而夹层杯法阳性。引起夹层杯法阳性而培养阴性最主要的原因可能有:(1)结核患者经过了药物治疗;(2)体内出现了细胞壁缺损的 L 型细菌,导致分离结果呈阴性;(3)标本中的细菌为死菌。引起培养阳性而夹层杯法阴性的原因可能有:(1)患者排菌量太低;(2)镜下所见细菌形态不典型;(3)与沉渣的量有关,难免有染片太厚而不利于细菌观察的情况;(4)与染色和镜检的技术有关。当然,本研究者认为可能还有其他的原因可待进一步研究,以提高夹层杯法与培养法的符合率。此次研究中,培养法对抗酸杆菌检测的阳性率高于夹层杯法,但 2 种检测方法各有优点。痰培养仍是目前诊断结核病的主要方法,其可以对死、活细菌进行鉴定,是化学治疗反应的主要检测指标;并且培养法可以进行药敏试验,其结果在指

导临床用药及耐药监测方面有十分重要的意义。夹层杯法简单快速、安全,对死、活细菌均能检出,且可以弥补培养法不能培养出治疗后死菌的缺点。

另外,在此次研究中,夹层杯法对晨痰的阳性检出率明显高于即时痰,因此,在临床工作中应该尽可能地收集晨痰进行检测,以提高检出率。标本的质量对结核菌的检测有很大影响,痰液要求新鲜,除细胞学检查要求在上午 9~10 时留痰外,其他检查以留取清晨第 1 口痰作标本最适宜。留痰时,患者以清水漱口 3 次,然后用力咳出气管深处的痰。而即时痰可因痰量少,或者留取的痰标本混入唾液或鼻咽分泌物等原因而影响抗酸杆菌的检测。

夹层杯法检测抗酸杆菌简单省时、阳性率高,且便于进行质量控制,收集抗酸杆菌的范围更广泛,更完全,其检测结果更具有代表性,操作安全简便,为结核菌的检测提供了一项新的方法,是一种很有推广价值的检测方法。此外,临床上要尽量留取晨痰进行结核菌的检测,以提高阳性率。

[参 考 文 献]

- [1] 郭凌,范立东. 结核病发病率回升因素调查分析[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(7):1414-1433.
- [2] 王甦民,朱建华,张立兴,等. 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.
- [3] Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples [J]. Clin Microbiol, 2003,41(12):5355-5365.
- [4] 李锋,朱敏. 结核病的实验室诊断技术[J]. 国际呼吸杂志,2006,26(10):793-794.
- [5] 张翊,卢建平,叶森,等. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志,2006,28(1):14-17.
- [6] 金燕燕,王伟,傅燕萍. 薄层液基细胞涂片技术的应用与分析[J]. 浙江临床医学,2008,10(9):1252.
- [7] 庄鹏晖,张学斌. 液基细胞学和传统涂片法在痰标本诊断肺癌中的价值比较[J]. 西安交通大学学报,2007,28(2):164-166.
- [8] 尚好珍,席秀娥,王金锦,等. 夹层杯集菌离心涂片法检测抗酸杆菌对肺结核诊断的价值[J]. 新乡医学院学报,2007,24(5):493-494.
- [9] 许蕴怡,罗晓红,易小萍,等. 四种结核分枝杆菌检测方法的比较[J]. 现代医院,2007,7(10):61-62.
- [10] 李锐,罗宽洋,罗慧,等. 夹层杯集菌离心涂片法检测抗酸杆菌的应用及评价[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(1):1084.
- [11] 李伟峰,屈艳红,罗道宝,等. 两种方法对结核杆菌检测率的比较[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(1):61-62.
- [12] 梁湘辉,宋婕,刘文恩. 液基集菌制片技术检测抗酸杆菌的临床应用研究[J]. 中国抗痨杂志,2009,31(2):86-89.