

液基夹层杯技术检测抗酸杆菌应用性研究

杨华林 谭云洪 白丽琼 胡培磊
(湖南省结核病防治所 长沙 410013)

摘要: **目的** 评价液基夹层杯技术检测抗酸杆菌的应用价值。**方法** 收集 1 190 例肺结核可疑症状者的 642 份晨痰标本和 1 140 份即时痰标本, 每份痰标本均采用液基夹层杯技术、直接涂片查找抗酸杆菌技术和罗氏结核分枝杆菌培养技术进行检测, 比较直涂法、液基法与培养法对痰标本的阳性检出率, 并在以培养法为金标准的前提下考察液基法、直涂法的灵敏度和特异度, 同时评价晨痰和即时痰、1 次痰和 2 次痰对肺结核涂阳病人发现的差异。**结果** 液基法、直涂法和培养法对 642 份晨痰标本的阳性检出率分别为 23.5%、12.7% 和 26.6%, 对 1 140 份即时痰的阳性检出率分别为 18.1%、9.6% 和 23.3%。以培养法作为金标准, 液基法的灵敏度和特异度分别为 68.9% 和 95.8%, 并与直涂法相对应的指标差异有统计学意义($P < 0.05$)。液基法检测表明: 642 份晨痰阳性检出率显著高于 1 140 份即时痰阳性检出率($P < 0.05$)。**结论** 液基法能够提高痰标本的灵敏度, 特异度较高, 操作标准化, 且所需设备简单, 便于基层开展, 是一种可能具有推广价值的检测方法。

关键词: 结核, 肺/诊断; 分枝杆菌, 结核; 细菌学技术

通讯作者: 谭云洪(tanyunhong@163.com)

Application of liquid-based Peng's interlayer vessel technique on detecting acid-fast bacilli

Yang Hualin, Tan Yunhong, Bai Liqiong, Hu Peilei
Hunan institute for Tuberculosis control, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of liquid-based Peng's interlayer vessel technique on detecting acid-fast bacilli (AFB). **Methods** 642 morning sputum specimens and 1 140 timely sputum specimens were collected from 1 190 patients with suspected pulmonary tuberculosis, each sputum specimen was detected simultaneously by three methods as follow: liquid-based Peng's interlayer vessel technique, sputum smear and acid-fast staining microscopy (direct AFB) and Löwensteir Jensen (L-J) culture. **Result** Of 642 morning sputum specimens, the positive rates of Peng's interlayer vessel technique, direct AFB and L-J culture were 23.5%, 12.7%, 26.6%, re-

[9] Toman K. What are the advantages and disadvantages of fluorescence microscopy? In: Frieden T, ed. Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring questions and answers (2nd version). Geneva: World Health Organization, 2004: 31-34.

[10] Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Pamsay A, Cunningham J, Drbanczik R, Perkins M, Aziz MA, Pai M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6: 570-581.

[11] Cambanis A, Ramsay A, Wirkom V, Tata E, Cuevas LE. Irr-

vesting time in microscopy: an opportunity to optimise smear based case detection of tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis 2007; 11: 40-45.

[12] Bennedsen J, Larson SO. Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy[J]. Scand J Respir Dis, 1966, 47: 114-120.

(收稿日期: 2009-04-07)

(本文编辑: 张晓进)

spectively. Of 1 140 timely sputum specimens, their positive rates were 18. 1%, 9. 6% and 23. 3%, respectively. The positive rate of morning sputa was significantly higher than that of timely sputa ($P < 0.05$). Using L-J culture as golden standard, the sensitivity and specificity of Peng's interlayer vessel technique were 68. 9% and 95. 8%, respectively, which were significantly higher than those of direct AFB ($P < 0.05$). **Conclusion** The liquid-based Peng's interlayer vessel technique could increase the sensitivity of sputum detecting and had higher specificity. It was simple, convenient, easy to be standardized, and worthy to popularize as a diagnostic method of pulmonary TB.

Key words: tuberculosis, pulmonary/ diagnosis; *Mycobacterium tuberculosis*; bacteriological techniques

Correspondence to: Tan Yunhong (tanyunhong@163.com)

作为国家结核病控制规划(NTP)的重要组成部分,结核病人的细菌学检测不仅是发现传染源的主要途径和手段,也是结核病确诊和制订化疗方案、考核疗效、评价防治效果的可靠标准^[1]。结核病细菌学的诊断最基本的方法是“直接涂片找抗酸杆菌法”和“结核分枝杆菌罗氏培养分离法”^[2]。前者由于方法学本身的局限性,阳性率较低,后者虽然阳性率比较高,但培养周期长,需4~8周才能出结果。

为了提高细菌的检出率,湖南天骑医学新技术有限公司发明了液基夹层杯结核杆菌制片染色技术(以下简称液基法),其原理是将经过消化灭活处理的痰或其他标本置于具有符合光学要求基片的夹层杯中,经专业离心机离心后将标本中的细菌牢固附着基片上,并在夹层杯中直接进行染色,然后取出基片,封片于载玻片上,置显微镜下观察。2008年7月~12月份,我们采用液基夹层杯法与直接涂片找抗酸杆菌法(以下简称“直涂法”)、和改良罗氏结核分枝杆菌培养分离法(简称“培养法”)对肺结核可疑症状者同时进行抗酸杆菌检测,从而评价该项技术在基层实验室推广使用的可行性。

1 资料和方法

1.1 一般资料 在全省选取湘潭县、湘乡县、邵东县和耒阳市4个单位作为实验现场,以2008年7月~10月在4个县(市)疾病预防控制中心结核病防治科就诊的肺结核可疑症状者为研究对象。样本量计算:按 $\alpha = 0.05$ (双侧),容许误差为 $\delta = 0.08$,液基夹层杯法敏感度为 $p = 25\%$,特异度为 $q = 80\%$,则计算公式如下^[3]:

$$N = \left[\frac{u_{\alpha}}{\delta} \right]^2 (1-p)p$$

若按X线胸片异常者中10%的阳性率,则需检查112例肺结核可疑初诊病例,考虑10%的丢失率等,则约需纳入病例1232例。自2008年7月1日

起,在4个县的实验现场收集初诊肺结核可疑症状者的痰标本,每位可疑症状者2份,1份为晨痰,1份为即时痰。

1.2 方法

1.2.1 试剂和仪器 由天骑医学新技术有限公司提供夹层杯、TQ-12自动离心涂片机、KP-1快速干片机;贝索抗酸染液;罗氏培养基由省结核病防治所参比室制备。

1.2.2 检测方法 对每份痰标本同时采用液基夹层杯法、直涂法和罗氏培养法进行检测。液基夹层杯法见参考文献^[3],直接涂片法按《中国结核病防治规划——痰涂片镜检质量保证手册》^[1]的方法进行涂片、染色和镜检,罗氏培养法《结核病细菌学诊断操作规程》^[4]规定进行分离培养。

1.3 质量控制 直涂法质量控制按《中国结核病防治规划——痰涂片镜检质量保证手册》^[1],培养法质控按《结核病细菌学诊断操作规程》^[4]

1.4 统计方法 采用SPSS 13.0软件进行数据输入和统计分析。

2 结果

2.1 3种方法的阳性检查率 2008年7月~12月份4县共收集痰标本数为1782份,其中晨痰、即时痰分别为642份和1140份。晨痰:液基法、直涂法和培养法阳性检出率分别为23.5%、12.8%和26.6%;即时痰:3种方法的阳性检出率分别为18.1%、9.6%和23.3%;总检出率分别为20.0%、10.7%和24.5%(表1)。

2.2 液基法和培养法阳性检出率的比较 液基法和培养法阳性检出率的比较分析见表2。液基法和培养法对于晨痰标本阳性检出率的差异没有统计学意义($P > 0.05$),而即时痰标本阳性检出率的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 3种方法阳性检出率(%)

	直涂法			液基法				培养法				
	阳性		阴性	阳性		阴性		阳性		阴性		
晨痰	82	12.8	560	87.2	151	23.5	491	76.5	171	26.6	471	73.4
即时痰	109	9.6	1031	90.4	206	18.1	934	81.9	266	23.3	874	76.7
合计	191	10.7	1591	89.3	357	20.0	1425	79.9	437	24.5	1345	75.5

表2 液基法和培养法阳性检出率比较分析

液基法	培 养 法								
	晨 痰			即时痰			总 痰		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	117	34	151	184	22	206	301	56	357
阴性	54	437	491	82	852	934	136	1289	1425
合计	171	471	642	266	874	1140	437	1345	1782
$\chi^2 = 4.55, P < 0.05$			$\chi^2 = 34.62, P < 0.05$			$\chi^2 = 33.33, P < 0.05$			

表3 直涂法和培养法阳性检出率比较分析

直涂法	培 养 法								
	晨 痰			即时痰			总 痰		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	76	6	82	107	2	109	183	8	191
阴性	95	465	560	159	872	1031	254	1337	1591
合计	171	471	642	266	874	1140	437	1345	1782
$\chi^2 = 78.4, P < 0.05$			$\chi^2 = 153.1, P < 0.05$			$\chi^2 = 230.9, P < 0.05$			

表4 直涂法和液基法阳性检出率比较

直涂法与 培养法的 符合情况	液基法与培养法的符合情况								
	阳性检出情况			阴性检出情况			总体情况		
	符合	不符合	合计	符合	不符合	合计	符合	不符合	合计
符合	180	3	183	1287	50	1337	1467	53	1520
不符合	121	133	254	2	6	8	123	139	262
合计	301	136	437	1289	56	1345	1590	192	1782
$\chi^2 = 112.3, P < 0.05$			$\chi^2 = 44.3, P < 0.05$			$\chi^2 = 27.8, P < 0.05$			

表5 3种方法中晨痰和即时痰阳性检出情况(例)

	液基法		直涂法		培养法	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
晨痰(642份)	151	491	82	560	171	471
即时痰(1140份)	206	934	109	1131	266	874
χ^2	116.5		304.4		57.0	
P	< 0.05		< 0.05		< 0.05	

2.3 直涂法和培养法阳性检出率的比较 直涂法和培养法对于痰标本中结核分枝杆菌的阳性检出率的比较分析见表3。直涂法和培养法对于晨痰标本和即时痰标本阳性检出率的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 液基法与直涂法的比较 直涂法和培养法对于痰标本中结核分枝杆菌的阳性检出率的比较分析见表4。灵敏度和特异度是诊断性试验中检验方法常用的2个重要的评价指标,以结核分枝杆菌培养作为结核病诊断的金标准,液基法的灵敏度和特异度分别为68.9%,95.8%;直涂法灵敏度和特异度分别为41.9%,99.4%。

2.5 3种方法中晨痰和即时痰标本检出率比较分析 在运用相同的方法的检测下,晨痰和即时痰标本阳性检查率比较分析,见表5。3种方法对于晨痰标本和即时痰标本阳性检出率的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

120多年前,由德国科学家 Robert · Koch 所创立的抗酸染色至今仍然是结核病细菌学实验室诊断的主要方法之一。相对于临床和实验室的其他诊断方法,高质量的直接涂片找抗酸杆菌法具有特异性高、技术相对简单、成本低廉和报告时间短等优势;另一方面,我国是全球22个高负担国家之一,结核病疫情比较严重,痰涂片抗酸杆菌镜检仍是我国开展结核病控制项目时最符合成本-效益原则的细菌学实验技术^[1]。

然而,痰涂片抗酸杆菌镜检敏感性低,通常痰液中抗酸杆菌的浓度达到5 000~10 000条菌/ml时才能得到阳性结果,因此如何增加痰涂片抗酸杆菌镜检敏感性,提高痰涂片抗酸杆菌镜检阳性率是结核病病人的细菌学检测工作的重要课题。为了评价该项技术的敏感性和在基层实验室推广使用的可行性,我们开展了液基夹层杯技术检测痰中抗酸杆菌的研究。

与直涂法一致的是,液基法仍然采用抗酸染色的方法并在显微镜下判读结果。液基夹层杯技术的

创新主要体现在离心集菌涂片方面,通过借鉴罗氏法结核分枝杆菌培养的前处理——痰标本消化技术,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的彭氏夹层杯底部的菌膜上,再进行染色、读片。离心集菌涂片的效果体现在涂片更为均匀和痰标本阳性检出率的提高。

本研究中,以培养法作为金标准,液基法诊断的灵敏度高于直涂法的灵敏度($P < 0.05$),而其特异度却低于直涂法($P < 0.05$)。液基法对于即时痰阳性标本的检出率低于培养法($P < 0.05$),而对于晨痰阳性标本的检出率与培养法差异无统计学意义($P > 0.05$)。液基法的阳性检出率与直涂法阳性检出率差异有统计学意义。可见液基法对于提高传染性结核病人发现率具有重要的意义。

同时,该检测方法收集标本的条件、标本量、染色温度、夹层杯菌膜面积、油镜每个视野的实际面积均容易被“标准化”,而便于开展室内质量控制和室内质量评估^[5]。同时,还可以通过抗酸杆菌自动阅片机、计算机报告系统、准确计算出每毫升所含细菌浓度。另一方面,液基法所需设备简单,便于基层开展^[3]。所以,液基法是一种可能具有推广价值的检测方法。

4 参考文献

- [1] 刘建军. 中国结核病防治规划——痰涂片镜检质量保证手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004,1.
- [2] 李锐,罗宽洋,罗慧,周世亮,龚利琼. 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.
- [3] 王惠民. 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] 方积乾,孙振球. 卫生统计学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003.
- [5] 王改,曹青山,王金绳,柴青峰,高建彬,张斌,来中海,尚好珍. 夹层杯集菌离心涂片法检测痰抗酸杆菌对肺结核诊断价值的研究[J]. 中国民康医学,2007,19(8),614.

(收稿日期:2009-4-29)

(本文编辑:张晓进)