

文章编号 1006-8147(2018)04-0357-04

论著

萋-尼氏抗酸染色法和金胺O荧光染色法在结核分枝杆菌痰涂片检测中的对比

赵慧^{1,2}, 王春花², 孙蕊², 谢彤², 穆成², 王志锐², 巨韩芳², 朱泽¹

(1.天津医科大学病原生物学系,天津 300070;2.天津市结核病控制中心结核参比室,天津 300041)

摘要 目的:比较萋-尼氏抗酸染色法(简称Z-N)和金胺O荧光染色法(简称荧光染色)在痰涂片镜检中对结核分枝杆菌的检测效果差异。方法:纳入580份痰标本,挑取相同部位制成两份涂片,分别使用Z-N和荧光染色进行染色镜检,比较两种方法的阳性检出率、阳性分级标准及读片时间上的差异。将涂片后余下的痰标本采用全自动分枝杆菌检测/药敏系统做液体培养。结果:Z-N法阳性检出率为10.8%,荧光染色法为15.3%,两种方法比较差异有统计学意义($P<0.05$)。对两种方法每一级别的结果进行 χ^2 检验,结果表明两种染色方法在各个分级没有统计学差异($P>0.05$)。荧光染色法的读片时间要明显短于Z-N。结论:荧光染色阳性检出率略高于Z-N,证明荧光染色法是一种快速、灵敏的检测方法,对肺结核的临床诊断具有重要意义。

关键词 结核分枝杆菌;荧光染色法;萋-尼氏抗酸染色法;荧光显微镜;图像采集系统

中图分类号 R52

文献标志码 A

Comparison between Z-N staining method and Auramine O fluorescent staining method in detection of mycobacterium tuberculosis in sputum smear

ZHAO Hui^{1,2}, WANG Chun-hua², SUN Rui², XIE Tong², MU Cheng², WANG Zhi-rui², JU Han-fang², ZHU Ze¹

(1. Department of Pathogen Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tuberculosis Reference Laboratory, Tianjin Center for Tuberculosis Control, Tianjin 300041, China)

Abstract Objective: To compare the difference of mycobacterium tuberculosis detection effect between Z-N staining method and Auramine O fluorescent staining method in microscopy of sputum smear. **Methods:** Two smears were prepared for the same site of 580 clinical sputum specimens. Two smears were followed with Z-N and fluorescent staining respectively. The difference between two methods including positive detection rate, the standard of positive classification and time of reading were compared. At the same time, phosphate buffer was used to make 60 copies of smear negative control, staining by Z-N and fluorescence respectively. The remaining sputum specimens were tested by automatic Mycobacterium detection / drug sensitivity system for liquid culture. **Results:** The positive detection rate using Z-N was 10.8%, that of fluorescent staining was 15.3%, and the difference between two methods were considered statistically significant ($P<0.05$). The results showed that there was no statistical difference between the two staining methods in each grade ($P>0.05$). **Conclusion:** The positive detection rate of fluorescence staining is slightly higher than Z-N. It is proved that fluorescence staining is a fast and sensitive detection method, and it may provide important reference for the clinical diagnosis of tuberculous pleuritis.

Key words mycobacterium tuberculosis; fluorescent staining; Zeihl-Neelsen staining; fluorescence microscope; image acquisition system

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种慢性传染性疾病,我国是全球高负担国家之一^[1]。结核病的诊断与防治一直是我国结核病控制工作面临的重点。早期快速诊断对于结核病的治疗和预防控制起着重要的作用。结核分枝杆菌分离培养实验耗时较长,使用固体改良罗氏培养基(Lowenstein-Jensen, L-J)培养常常需要20 d~2个月,即使采用较先进的全自动分枝杆菌检测/药敏系统做液体培养也需要7~20 d左右。实验室最常用的方法是痰标本直接涂片法,此法操作简单、价格低廉,但是操作起来比较费时,而基层痰检实验室在涂片量大的情况下1 d

之内无法得出结果,这样的现状远远不能满足结核病临床和防治工作的需要。近年来,荧光染色技术得到了飞速发展,作为一种研究方法或实验手段,已被广泛地应用于医学科学领域内各种基础理论研究和临床诊断。目前,金胺O荧光染色也逐渐应用在结核分枝杆菌的痰涂片检测上。本文对传统的萋-尼氏抗酸染色法(简称Z-N)和荧光染色两种染色方法在结核分枝杆菌痰涂片镜检过程中的检测效能进行了初步的比较分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 580例标本均来自于2012年8~12月天津市结核病控制中心门诊部收取的病人送

作者简介 赵慧(1981-),女,主管检验技师,硕士在读,研究方向:病原微生物;通信作者:朱泽, E-mail: 13920922609@126.com。

检痰液。

1.1.2 试剂和仪器 抗酸染色试剂盒和金胺 O 染色试剂盒, 购自珠海贝索生物技术有限公司, LED 荧光显微镜 (carl ZEISS Primo Star iLED), 图像采集系统 (ZEN.exe 1.0.1.0), Milli-Q Integral 3 (A 10), NUAIR class II 生物安全柜 (MODEL NO. NU-425-600E), BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson & Company)。

1.2 方法

1.2.1 标本的确认 痰标本排除口水痰后纳入研究范围。确认纳入的当天, 每份痰标本取相同位置痰液制成两张涂片。

1.2.2 涂片染色镜检 每份痰样品各涂片 2 张, 分别进行 Z-N 和荧光染色。染色时, Z-N 法复红染色时采用加热 5 min, 荧光染色采用金胺 O 冷染 15~20 min。镜检时, Z-N 法在 1000× 镜下观察, 金胺 O 法在 400× 镜下观察。具体的方法及报告标准参见文献^[9]。

1.3 阴性对照组实验 用高压灭菌后的磷酸盐缓冲液 (PBS pH=6.8) 作为样本, 制作 60 张涂片, 30 张为一组, 第一组采用 Z-N 法涂片, 第二组采用荧光染色法涂片。

1.4 分枝杆菌全自动分枝杆菌检测/药敏系统培养 采用 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌检测系统进行样本培养, 实验方法及结果判定参照文献^[9]。

1.5 读片时间统计 对纳入的 580 张涂片进行读片时间的记录, 统计两种染色法对同一标本各自的读片时间。

1.6 质量控制 所有参与研究的人员都是经过统一培训的实验室技术人员。纳入标本的涂片和镜检, 均由同一实验人员完成。

1.7 统计学处理 两率之间的比较采用 χ^2 检验, 两种方法读片时间上的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 即为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Z-N 法和荧光染色法与培养结果的比较 580 份痰标本抗酸染色法阳性检出率为 10.8%, 荧光染色法阳性率为 15.3%, 两种方法比较差异有统计学意义 ($\chi^2=5.118, P < 0.05$) (表 1, 图 1)。

表 1 Z-N 法和荧光染色法与培养结果的比较

Tab 1 Comparison between Z-N and fluorescent staining and culture

染色方法	标本数	阳性涂片数	阳性率/%
抗酸染色	580	63	10.8
荧光染色	580	89	15.3
培养	580	132	22.8

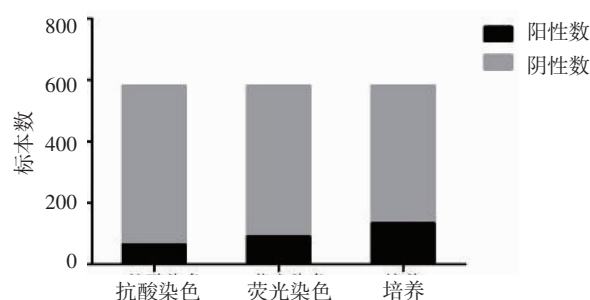


图 1 两种染色方法及培养阳性数的比较

Fig 1 Comparison between two staining methods and positive number of culture

2.2 不同检测方法的结果分析 见表 2、3。两种染色方法的诊断符合率无统计学差异 ($\chi^2=1.917, P > 0.05$), 见表 4; Z-N 正确诊断指数 (即约登指数=灵敏度+特异度-1) 为 0.398 7, 荧光染色正确诊断指数为 0.545 8。

表 2 Z-N 法与培养的检测结果分析 (n)

Tab 2 Analysis of the results of Z-N and culture (n)

染色方法	培养 +	培养 -	总计
抗酸染色 +	55	8	63
抗酸染色 -	77	440	517
合 计	132	448	580

表 3 荧光染色法与培养的检测结果分析 (n)

Tab 3 Analysis of the results of fluorescent staining and culture (n)

染色方法	培养 +	培养 -	总计
荧光染色 +	76	13	89
荧光染色 -	56	435	491
合 计	132	448	580

表 4 两种染色方法检测对比

Tab 4 Comparison between two staining methods

染色方法	灵敏度/%	特异度/%	诊断符合率/%	正确诊断指数
抗酸染色	41.67	98.21	85.34	0.3987
荧光染色	57.58	97.10	88.10	0.5458

2.3 对每一例标本在两种染色方法中进行分级比较 对每一级别的结果进行 χ^2 检验, 结果表明两种染色方法在各阳性分级比较中没有统计学差异 ($P > 0.05$)。另外, 在阴性对照组 30 例中, 有 1 例在荧光染色时, 20× 物镜下见到两条疑似结核杆菌, 在油镜下确认为并非结核杆菌 (表 5、6)。

表 5 实验组 Z-N 染色和荧光染色结果的分级比较 [n(%)]

Tab 5 Classification comparison between Z-N and fluorescent staining in the experimental group [n(%)]

组别	标本数	阳性分级					总计
		±	1+	2+	3+	4+	
抗酸	580	7(11.1)	16(25.4)	17(27.0)	14(22.2)	9(14.3)	63
荧光	580	10(11.3)	29(32.6)	23(25.8)	15(16.9)	12(13.5)	89
χ^2		0.0005788	0.9144	0.02479	0.6886	0.01995	
P		0.9808	0.3390	0.8749	0.5007	0.8877	

表 6 阴性对照组 Z-N 染色和荧光染色的结果

Tab 6 Results of Z-N and fluorescent staining in negative control group

方法	阴性对照数	结果		假阳性率/%
		-	±	
抗酸染色	30	30	0	0
荧光染色	30	29	1	3.33

2.4 两种方法读片时间比较 观察 580 张涂片,抗酸染色累计用时 2 505 min,平均用时 4.32 min/张;荧光染色累计用时 1 220 min,平均用时 2.10 min/张。两种方法的时间用 *t* 检验,结果具有显著的统计学差异($P<0.01$)。可见,荧光染色法的效率远远高于抗酸染色法。见表 7,图 2~9。

表 7 两种染色方法的读片时间分析

Tab 7 Analysis of the reading time by the two methods

检测方法	总数	总时间/min	平均时间/min
抗酸染色	580	2 505	4.32
荧光染色	580	1 220	2.10

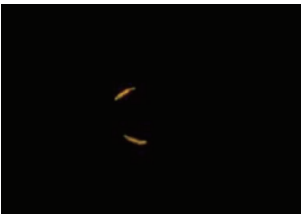


图 2 荧光染色+(10×40)
Fig 2 Fluorescent staining+ (10×40)



图 3 荧光染色++(10×40)
Fig 3 Fluorescent staining++ (10×40)



图 4 荧光染色+++ (10×40)
Fig 4 Fluorescent staining +++ (10×40)

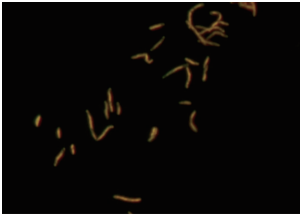


图 5 荧光染色++++ (10×40)
Fig 5 Fluorescent staining++++ (10×40)

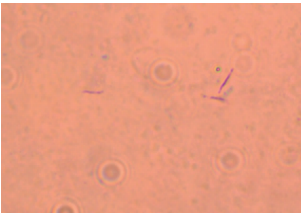


图 6 抗酸染色+(10×100)
Fig 6 Z-N+(10×100)



图 7 抗酸染色++(10×100)
Fig 7 Z-N++(10×100)

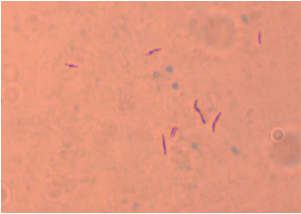


图 8 抗酸染色+++ (10×100)
Fig 8 Z-N+++ (10×100)

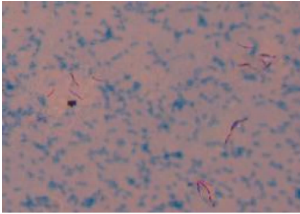


图 9 抗酸染色++++ (10×100)
Fig 9 Z-N++++ (10×100)

3 讨论

随着实验室诊断技术的进步,分子检测技术被更多地运用到痰标本检测中。其中多色巢式荧光定量 PCR(Xpert MTB/RIF)无论在灵敏度还是特异度方面都远远高于传统的细菌学检测^[3],但是考虑到明显的成本效益和普及程度,痰涂片镜检在国家结核病控制规划中仍是最有效的病人发现方法,传统的萆-尼氏染色镜检是目前国内主要的镜检方式^[4]。不论是从结核病控制、流行病学调查和研究,还是从临床诊疗的角度看,分枝杆菌的分离培养都是结核病病原学诊断的“金标准”^[2]。本次研究中,以分枝杆菌培养结果为参照分析,荧光染色灵敏度(57.58%)高于 Z-N 灵敏度(41.67%),而两种方法的特异度相差不大,诊断符合率也无统计学差异($\chi^2=1.917, P>0.05$);在正确诊断指数(即约登指数=灵敏度+特异度-1)方面,荧光染色(0.545 8)要高于 Z-N (0.398 7),而约登指数越高,说明筛查实验的效果越好,真实性越大。综合多组实验数据,说明荧光染色法诊断效果优于抗酸染色法。

有文献报道^[5]荧光染色法检测痰中结核杆菌的灵敏度高,特异性和准确率也比较高。也有报道称^[6],荧光染色法特异性与抗酸染色法相似,但敏感性平均要高 10%,本次实验结果与其相一致。也有报道^[7]显示,对于结果为 1+ 的标本,两种染色方法的检出率差异有统计学意义,而对于结果为 ±, 2+, 3+, 4+ 的标本,两种方法的检出率无明显差异,表明两者阳性率的差异主要体现在含菌量较少的痰液标本。本实验与其研究并不一致,这可能与本次实验标本收集时间短,数据少有关。

在操作上,抗酸染色法较荧光染色法繁琐,加热时易产生气溶胶。荧光染色镜检抗酸杆菌在暗色背景下会发出橙黄色荧光,醒目易发现。并且荧光染色在 20×物镜视野大,镜检速度快,而抗酸染色 100×油镜视野小,镜检速度较慢。镜检时间的分析显示,镜检 580 份涂片,荧光染色法的镜检时间要远远低于抗酸染色法的镜检时间。这对工作效率的提高有着重要的意义。有资料表明,荧光染色的假阳性率可高达 5.9%,本研究结果与之相近,在 30 例阴性对照标本中,其中有 1 例在荧光染色时,20×物镜下见到两条疑似结核杆菌,在油镜下确认为并非结核杆菌。故对于菌量少的样本,在高倍镜下观察仍为疑似者,要在油镜下再次确认其形态,方可得出结论。另外,实验中造成假阳性可能原因为荧光染色镜检使用的放大倍数(400×)较 Z-N 法镜检(1 000×)低,所以在菌量少的情况下,加上杂质也会

有荧光显色的干扰,镜下对菌体形态不容易辨认^[8]。

本研究结果表明,荧光染色镜检的敏感度比 Z-N 法镜检提高 15%多,特异度并没有明显降低;另外荧光染色镜检可以明显缩短读片时间,且染色无需加热。所以使用荧光染色法镜检痰涂片,是一种快速、灵敏的检测方法^[9-11]。同时,该方法若配套图像采集系统,能更直观的看到菌体情况,为临床诊断和患者提供更快捷、更直接的报告方式。荧光染色法更适用于日工作量较大,并且人员镜检经验丰富的实验室。

参考文献:

- [1] WHO. Global Tuberculosis Report 2015[R]. Geneva: World Health Organization, 2015:1-2
- [2] 赵雁林. 结核病实验室诊断技术培训教程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014:12, 32
- [3] 黄芳, 党丽云, 孙惠平, 等. 三种分子生物学诊断技术对结核病诊断价值的比较[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(9):680
- [4] 李欣, 青青, 李多孚. 荧光染色法与萋-尼染色法检测结核分枝杆菌的效果评价[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(6):745
- [5] 肖静, 杨元好, 金瑛, 等. 荧光染色法检测痰中结核杆菌的应用[J]. 贵阳中医学院学报, 2013, 35(4):1002
- [6] Steingart K R, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review[J]. Lancet Dis, 2006, 6(9):570
- [7] 张立, 周洪经, 冯爽. 荧光染色法在结核分枝杆菌检测中的应用[J]. 山东医药, 2014, 54(7):55
- [8] 曾希鹏, 张小芬, 陈焯, 等. 2 种染色方法查找痰中结核杆菌的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(23):3402
- [9] 夏辉, 赵冰, 李强, 等. 发光二极管荧光显微镜在基层应用的多中心研究[J]. 中国防痨杂志, 2011, 9(33):592
- [10] 桂静, 李金莉, 王峰. 荧光染色法与萋-尼氏抗酸染色法检测痰液中抗酸杆菌的对比观察[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11):2836
- [11] 毛小芳, 杨敏, 谢英, 等. 金胺“O”荧光染色 LED 显微镜检测痰中抗酸杆菌的应用[J]. 实验与检验医学, 2016, 34(1):82

(2017-12-30 收稿)

文章编号 1006-8147(2018)04-0360-03

论著

TCT、活检病理在宫颈上皮瘤变及早期宫颈癌诊断中的价值分析

曲首辉, 鲍志敏, 刘荣欣

(郑州市第一人民医院产二科, 郑州 450003)

摘要 目的:探讨液基薄层细胞学(TCT)、术前活检病理在宫颈上皮瘤变(CIN)、早期宫颈癌诊断中的价值。方法:选取经手术后病理学最终确诊的 276 例 CIN 患者、19 例宫颈癌患者进行回顾性分析,所有患者均接受了术前 TCT 检查、活检病理学检查,以术后最终病理检查结果作为金标准,判断两种方法鉴别诊断 CIN、宫颈癌的临床价值。结果:TCT 诊断 CIN、鳞状细胞癌(SCC)结果与最终病理学诊断结果的相关性分析 $R=0.522, P<0.001$;术前活检病理诊断 SCC、CIN 结果与最终病理学诊断结果的相关性分析 Spearman $R=0.831, P<0.001$;TCT 鉴别诊断 CIN、SCC 的灵敏度为 54.71%、特异度为 63.16%、漏诊率为 45.29%、误诊率为 36.84%;术前活检病理鉴别诊断 CIN、SCC 的灵敏度为 99.28%、特异度为 78.95%、漏诊率为 0.72%、误诊率为 21.05%。结论:对于 CIN 及宫颈癌患者,活检病理学诊断较 TCT 具有更高的临床价值,与术后病理学结果的相关性更高。

关键词 液基薄层细胞学;活检病理;宫颈上皮瘤变;宫颈癌

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

宫颈癌是女性常见肿瘤之一,本病高发年龄集中于 35~45 岁,但近年来逐步呈年轻化趋势。高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染、性行为及分娩次数过高、营养不良、卫生条件较差等是宫颈癌的重要危险因素^[1]。随着宫颈细胞学筛查的逐步推广,宫颈癌及宫颈上皮瘤变的早期发现和治疗率逐年增高,宫颈癌死亡率明显下降^[2]。液基薄层细胞学(thinprep cytologic test, TCT)、术前活检

病理是宫颈癌及其他癌前病变的主要细胞学筛查方式^[3]。为分析 TCT 与术前活检病理在宫颈上皮瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)、早期宫颈癌诊断中的价值,本研究对 CIN 和早期宫颈癌患者的临床资料进行回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取我院 2013 年 1 月-2016 年 1 月经手术后病理学最终确诊的 276 例 CIN 患者、19 例宫颈癌患者,年龄 27~59 岁(45.4 岁 \pm 15.0 岁),孕次 1~5 次(2.9 次 \pm 1.3 次),产次 1~4 次(2.1 次 \pm

作者简介 曲首辉(1976-),女,副主任医师,研究方向:妇产科危重症及并发症, E-mail: facaifacai6501@163.com。