

• 检验技术与方法 •

液化集菌法检查痰中结核分枝杆菌的应用评价\*

文 岚,田 斌,陈发明,王孝君,郭彦昌,张 兵,张如胜,欧新华  
(长沙市疾病预防控制中心,湖南长沙 410001)

**摘 要:****目的** 探讨使用糜蛋白酶“液化集菌”检查痰中结核分枝杆菌的应用价值。**方法** 对 56 例拟诊肺结核病例的 161 份痰标本直接涂片和“液化集菌”后的沉渣滴冷冻玻片后分别进行 ZN 和金胺“O”染色,并将阅片结果进行统计分析。**结果** “液化集菌”后取用沉渣滴片 ZN 染色的阳性率高于直接涂片 ZN 染色;“液化集菌”后取用沉渣滴片金胺“O”染色 LED 显微镜检查阳性率明显高于沉渣滴片 ZN 染色普通光学显微镜检查, $\chi^2$  值为 105.551 和 104.593, $P=0.000$ 。**结论** “液化集菌”处理痰标本可以提高痰涂片检查结核分枝杆菌的敏感性,应用金胺“O”染色结合 LED 显微镜检查进一步扩大了这种优势。

**关键词:**分枝杆菌,结核; 显微镜检查; 糜蛋白酶  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.042 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)16-2151-02

肺结核患者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、制定化疗方案、观察疗效及判断预后的可靠标准<sup>[1]</sup>。目前结核病实验室检查主要依靠痰涂片直接显微镜检查,有研究显示 50% 以上的新发排菌肺结核患者由痰涂片直接显微镜检查作出诊断<sup>[2]</sup>。该方法的主要缺点是灵敏度不稳定,介于 20%~60%,也有研究显示其敏感性可以达到 80%<sup>[3-5]</sup>。针对这一特点国内外有研究人员进行痰标本的前处理或借助特殊的仪器和设备等措施改进了痰涂片直接显微镜检查的方法,并取得了较为满意的结果<sup>[6-9]</sup>。本研究对直接涂片和“液化集菌”两种方法进行比较,评价“液化集菌”检查痰中结核分枝杆菌的应用价值。

1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 收集辖区内区县级结核病防治机构 2012 年 1~6 月门诊拟诊肺结核患者 56 例,年龄(56.31±12.14)岁,男 43 例,女 13 例。每例患者收集痰标本 3 份,即时痰、夜间痰和晨痰各 1 份。由于 2 份痰标本小于 2 mL 和 5 份痰标本为唾液未进行检测,其余 161 份标本被纳入研究。

**1.2 仪器与试剂** LED 显微镜由德国 ZEISS 公司提供。ZN 和金胺“O”染色试剂由贝索企业公司提供、糜蛋白酶购自上海第一生化药业有限公司。

**1.3 方法** 将痰标本先行直接涂片,然后对剩余痰标本进行“液化集菌”后的沉渣滴冰冻载玻片。“液化集菌”的操作过程如下:在标本内加入 100 U/mL 的糜蛋白酶(V 酶:V 痰约 1:1),置 37℃ 水浴摇床内,液化时间为 5~30 min 不等,观察痰标本外观均匀无团块即停止液化,放入离心机内 3 000 r/min 离心 25 min,弃上清保留底部约 0.5 mL 沉渣。并用一次性塑料滴管吹打混匀并吸取上述沉渣垂直距冰冻载玻片 15~20 cm 处滴一滴(约 0.1 mL)在玻片上,滴片后在载玻片上形成直径大约为 0.5~0.8 cm 的沉渣膜。待直接涂片和沉渣滴片自然干燥后火焰固定,然后分别进行 ZN 和金胺“O”染色。

**1.4 质量控制** 每批次实验均设阴、阳性对照各一份,涂片、染色及结果判读参照文献<sup>[10]</sup> 执行。阅片由 3 人分别进行,每人阅片前打乱玻片顺序并重新编号,阅片工作完成后对 3 份结果进行汇总。若每张玻片 2 人或 3 人结果一致,则认定该玻片的结果为此一致的结果。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,采用 McNemar-Bowker 检验, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 两种方法的检测结果比较** 直接涂片共检出阳性标本

85 份,而沉渣滴片共检出 98 份阳性标本,阳性率分别为 52.8% 和 60.9%,阳性率有所提高,但有 1 张直接涂片 ZN 染色阳性而沉渣滴片 ZN 染色结果为阴性。对两种方法检查结果进行 McNemar-Bowker 卡方检验发现  $\chi^2=105.551$ , $P=0.000$ ,差异有统计学意义,见表 1。

表 1 两种方法的检查结果比较(n)			
直接涂片 ZN 染色	沉渣滴片 ZN 染色		合计
	阳性	阴性	
阳性	84	1	85
阴性	14	62	76
合计	98	63	161

**2.2 沉渣滴片 ZN 染色和沉渣滴片金胺“O”染色法比较** 沉渣滴片金胺“O”染色检出阳性标本 108 份,阳性率为 67.1%,较沉渣滴片 ZN 染色阳性检出率提高 6.2%。对两种方法检查结果进行 McNemar-Bowker 卡方检验发现  $\chi^2=104.593$ , $P=0.000$ ,差异有统计学意义,见表 2。

表 2 两种方法的检查结果对比(n)			
沉渣滴片 ZN 染色	沉渣滴片金胺“O”染色		合计
	阳性	阴性	
阳性	96	2	98
阴性	12	51	63
合计	108	53	161

3 讨 论

对痰标本进行简单的前处理在一定程度上实现提高痰涂片镜检结核分枝杆菌方法的灵敏度,是一个既不需要高昂的成本又相对不耗时的手段,一些研究机构或研究者都在朝这一方向努力<sup>[6-7,9]</sup>,以尽量弥补痰标本直接涂片显微镜检查结核分枝杆菌的不足,也都取得了较为满意的结果。与上述研究相比,本研究对直接涂片 ZN 染色和沉渣滴片 ZN 染色两种方法、沉渣滴片 ZN 染色和沉渣滴片金胺“O”染色两种方法进行了两两比较,结果显示对痰标本“液化集菌”后的沉渣滴片进行显微镜检查结核分枝杆菌可显著提高阳性检出率;把离心沉淀集菌同 LED 显微镜技术结合起来,不仅进一步提高肺结核痰涂片显微镜检查方法的敏感性,并在一定程度上提高了工作人员舒适度。若以目镜放大倍率为 10 倍、视场数为 18,进行荧

\* 基金项目:长沙市科技局资助项目(K1104052-21)。

光模式阅片时选用 20 倍物镜,在选用普通明场模式时选用 100 倍油镜,且每张涂片或滴片采用荧光模式阅片时观察 50 个视野,粗略计算可知沉淀集菌结合 LED 显微镜阅片比痰标本普通显微镜阅片大概可以提高两个数量级的检测能力。另经过多次反复的实验发现采用冷冻玻片所制作的滴片在染色的过程中极少出现过痰膜脱落的现象。

值得注意的是在操作时为了尽可能保持玻片处于较低湿度和干燥状态,研究者采用的做法是将 6 张的玻片用干燥的纱布或报纸包裹成独立包装后放在相对密闭的铁或铝制盒子内放在冰箱的-20℃冻柜内冻存,随用随取。此方法制作的滴片可以复染,有潜力满足目前中国结核病防治规划提出的室内质量控制和室间质评的要求,这一点优于某些方法,但结果阳性等级应当如何界定尚需通过多中心和大样本量的研究。另外本研究的缺点是样本量不大,没有对糜蛋白酶的用量与痰标本性状和作用时间的关系进行作详细分析,对离心沉渣留存 0.5 mL 的量是否合适没有进一步探讨等。

总之,“液化集菌”处理痰标本可以提高痰涂片检查结核分枝杆菌的阳性率,应用金胺“O”染色结合 LED 显微镜检查进一步扩大了这种优势。

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] Pio A, Luelmo F, Kumaresan J, et al. National tuberculosis pro-

gramme review: experience over the period 1990-1995[J]. Bull World Health Organ, 1997, 75(6): 569-581.  
[3] 樊学军, 孙敏. 结核病实验室诊断技术的比较研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2005, 28(3): 160-162.  
[4] 成诗明. 痰涂片阴性活动性肺结核的诊断与管理[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2009: 2-3.  
[5] Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(9): 570-581.  
[6] 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, 33(9): 592-595.  
[7] 杨华林, 谭云洪, 白丽琼, 等. 液基夹层杯技术检测抗酸杆菌应用性研究[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(5): 279-282.  
[8] Khutlang R, Krishnan S, Dendere R, et al. Classification of Mycobacterium tuberculosis in images of ZN-stained sputum smears[J]. IEEE Trans Inf Technol Biomed, 2010, 14(4): 949-957.  
[9] Daley P, Michael JS, SK, et al. A pilot study of short-duration sputum pretreatment procedures for optimizing smear microscopy for tuberculosis[J]. PLoS One, 2009, 20; 4(5): e5626.  
[10] 中国疾病预防控制中心. 中国结核病防治规划痰涂片镜检标准操作及质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 7-14.

(收稿日期: 2013-01-28)

• 检验技术与方法 •

应用 Westgard 方法评价决定图判断测定方法的可接受性

傅光祥, 郭富饶, 隆维东, 陈 平

(重庆市巴南区人民医院检验科, 重庆 401320)

**摘要:**目的 应用 Westgard 方法评价决定图判断常规生化项目在日立 7600-010 检测系统上分析性能的可接受性。方法 定量测定各个实验项目的日间变异系数和不准确度(偏倚),应用 Westgard 方法评价决定图,将 26 个常规生化项目的变异系数和偏倚与要求的允许总误差(TEa)作比较,判断检测系统的分析性能可否接受。**结果** 在该检测系统上,26 个常规生化项目中,仅有 γ-谷氨酰基转移酶(GGT)、尿素(Urea)、总钙(TCa<sup>2+</sup>)需要进行方法的改进和性能的重新评估。**结论** 非标准化生化检测系统检测结果的准确性和量值溯源与标准化检测系统还存在一定差距。检测系统的性能可接受性是保证检测结果准确性的重要前提。应用 Westgard 方法评价决定图判断生化检测系统的分析性能,简便易行,判断直观,适合临床实验室应用。

**关键词:**不精密度; 不准确度; 标准化方法判定图; 质量控制

**DOI:**10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 16. 043 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)16-2152-03

标准化检测系统是指完成一个检验项目所涉及的仪器、试剂、校准品、质控品、检验程序、仪器保养等的组合<sup>[1]</sup>;使用这样的检测系统对患者标本进行检验,其检验结果具有溯源性和可比性<sup>[2]</sup>。检测系统的性能可否接受,是决定检测系统能否应用于常规工作的前提。判断实验方法的可接受性可依据所观测的误差大小,即随机误差和系统误差,分别用不精密度(CV)和不准确度(*Bias*)表示,二者结合在一起即为检测系统的总误差水平<sup>[3]</sup>。应用 Westgard 方法性能评价决定图对标准检测系统性能评价已多有报道<sup>[4-5]</sup>。本文应用此方法对非标准检测系统,根据室内质控的日间 CV 和同期参加卫生部临床检验中心的室间质评结果,将本科室日立 7600-010 检测系统的常规生化项目进行性能评价,判断其分析性能可否接受。

1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** 日立 7600-010 自动生化分析仪,除钾,钠,氯为日立原装试剂和原装标准品外,其余项目为某国产试剂及

其配套复合校准品、英国朗道正常值(批号 UN614)和病理值(批号 UN413)质控品组成。

**1.2 评价项目** 包括本实验室常规开展的 26 个生化检测项目:钾(K<sup>+</sup>)、钠(Na<sup>+</sup>)、氯(Cl<sup>-</sup>)、总钙(TCa<sup>2+</sup>)、ALT、AST、总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、总胆红素(TBil)、碱性磷酸酶(ALP)、γ-谷氨酰基转移酶(GGT)、葡萄糖(GLU)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)、无机磷(P)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白质胆固醇(LDL-C)、载脂蛋白 A-1(ApoA-1)、载脂蛋白 B(ApoB)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、α-羟丁酸脱氢酶(HBDH)、淀粉酶(AMY)。所有项目均按本科室标准操作程序完成。

1.3 方法

**1.3.1 不精密度评价** 根据本科室 2012 年 1~8 月份的室内质控原始结果进行统计分析,去除超过±3s 的数据,计算累积均值( $\bar{x}$ )、标准差(*s*)和日间 CV,分析日间 CV 是否在于允许不