

• 论 著 •

荧光染色法与萘-尼染色法检测结核分枝杆菌的效果评价

李欣¹, 青清², 李多孚^{1△}

(1. 四川省南充市中心医院检验科, 四川南充 637000; 2. 南充市第二人民医院检验科, 四川南充 637000)

摘要:目的 比较荧光染色与抗酸染色(萘-尼染色)检测结核分枝杆菌的结果差异, 比较亚甲蓝液、Haris 苏木素液、高锰酸钾液作为荧光染色法复染试剂的效果。方法 采集疑似结核病症状的患者痰液标本 198 份, 分别进行萘-尼染色和荧光染色, 比较分析两种方法结核分枝杆菌检出率的差异。荧光染色分别用 0.3% 亚甲蓝液、0.5% Haris 苏木素液、0.5% 高锰酸钾液作为复染剂, 比较不同复染剂在荧光显微镜下镜检的效果。结果 萘-尼染色分枝杆菌检出率为 66.67% (132/198)。荧光染色分枝杆菌检出率为 94.9% (188/198), 其中, 亚甲蓝复染检出率为 94.95% (188/198)、苏木素复染检出率 94.44% (187/198)、高锰酸钾复染检出率为 94.44% (187/198), 与萘-尼染色比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 荧光染色法阳性检出率明显高于萘-尼染色法, 其中 0.3% 亚甲蓝液是一种良好的背景淬灭复染液。

关键词: 显微镜; 发光二极管; 荧光染色; 抗酸染色; 结核分枝杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)06-0745-03

Evaluation on effect of fluorescent staining and Ziehl-Neelsen staining methods for detecting Mycobacterium tuberculosis

Li Xin¹, Qing Qing², Li Duofu^{1△}

(1. Department of Clinical laboratory, Nanchong Municipal Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Department of Clinical laboratory, Nanchong Municipal Second People's Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To compare the results difference between the fluorescence staining and the acid fast staining (Ziehl-Neelsen staining) methods in the detection of Mycobacterium tuberculosis, and to compare the effects of the methylene blue solution, Haris hematoxylin solution and potassium permanganate liquid as the redyeing reagents of the fluorescence staining method.

Methods 198 sputum specimens collected from the patients with suspected tuberculosis symptoms and were performed the Ziehl-Neelsen staining and the fluorescence staining respectively For comparing the difference in the detecting rate of Mycobacterium tuberculosis between the two kinds of method. The fluorescence staining adopted 0.3% methylene blue solution, 0.5% Haris hematoxylin solution and 0.5% potassium permanganate solution as the redyeing reagents for comparing the effects of the fluorescence microscopic examination among different redyeing reagents. **Results** The detection rate of Mycobacterium tuberculosis was 66.67% (132/198) for the Ziehl-Neelsen staining, 94.9% (188/198) for the fluorescence stainings and 94.95% (188/198) for the methylene blue staining, in which the detection rate of methylene blue redyeing was 94.95%, which of hematoxylin redyeing was 94.44% (187/198) and which of potassium permanganate redyeing was 94.44 (187/198), the differences among them were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The fluorescent staining method has the higher positive detection rate of Mycobacterium tuberculosis than the Ziehl-Neelsen staining method, in which 0.3% methylene blue solution is a good background quenching redyeing solution.

Key words: microscope; light-emitting diode; fluorescence staining; acid fast staining; Mycobacterium tuberculosis

结核分枝杆菌检测阳性, 是临床诊断结核病的金标准。目前, 常用的实验室检测方法主要有涂片染色法和结核杆菌培养法, 由于结核杆菌培养的时间大约为 7~30 d 且阳性检出率不高, 因而实验室诊断结核病最常用的方法是萘-尼染色法和荧光染色法。2011 年世界卫生组织 (WHO) 推荐在荧光染色法中应用 LED 光源替代高压汞灯^[1]。笔者在应用中发现, 荧光染色法可供选择的复染液较多, 而复染液直接影响染色背景, 继而影响结果判断。因此, 本文对萘-尼染色法和荧光染色法检测结核杆菌的结果以及荧光法三种复染液的染色效果进行了比较分析, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1~5 月南充市中心医院就诊的疑似结核病患者 96 例。门诊患者 45 例 (每例患者采集深咳痰液标本 1 份), 住院患者 51 例 (每例采集连续 3 d 清晨痰液标本各 1 份), 共收集痰液标本 198 份。

1.2 仪器与试剂 荧光显微镜: Olympus 公司 CX31 型, LED 光源。

1.3 方法

1.3.1 涂片 用竹签挑取痰液标本的脓样、血样或干酪样部分约 0.05~0.1 mL 于玻片正面的右侧 2/3 中央处, 均匀涂抹成 1.0 cm × 2.0 cm 椭圆形痰膜, 厚薄适中^[2]。每份痰液标本各涂 4 张, 室温下自然干燥后将痰膜片短时间加热固定。

1.3.2 萘-尼染色 抗酸染色试剂由康泰生物化学有限公司提供, 染色步骤严格按文献^[3]的方法操作。

1.3.3 荧光染色 荧光染色试剂按文献^[4]的方法配制。染色步骤: 将每份标本的 3 张痰液涂片短时间加热固定后放入湿盒中, 滴加经 37 °C 预热的金胺 O 染色剂覆盖, 37 °C 孵育 5 min, 水洗。加 5% 的盐酸乙醇脱色 1~2 min, 至外观无黄色为止, 水洗。将 3 张痰液涂片分别用 0.3% 亚甲蓝液、0.5% Haris 苏木素液、0.5% 高锰酸钾液复染 1~2 min, 水洗, 烤干, 待

检。记录不同使用不同复染液进行荧光染色的镜检结果。

1.3.4 镜检及结果判定 (1) 萋-尼染色用普通光学显微镜镜检(10×100 倍)观察。在淡蓝色背景下,结核分枝杆菌呈红色,其他细菌和细胞呈蓝色,判定标准参考文献[3]。(2) 荧光染色用荧光显微镜(10×40 倍)观察痰液涂片,在暗视野背景下,结核分枝杆菌呈亮绿色或黄绿色荧光,呈杆状或短棒状。判定标准参考文献[5],阴性:连续观察 50 个不同视野,未发现抗酸杆菌;阳性(报告抗酸杆菌菌数):每 50 视野 1~9 条;1+:每 50 视野 10~49 条;2+:每视野 1~9 条;3+:每视野 10~99 条;4+:每视野不少于 100 条。报告 2+ 至少观察 50 视野,3+、4+ 至少观察 20 个视野。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件,各组间率的比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

萋-尼染色法分别与荧光染色(3 种复染液)的检出率进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。细菌镜检结果

不超过 1+ 的标本,荧光染色(亚甲蓝、苏木素、高锰酸钾复染)与萋-尼染色的检出率比较,差异均有统计学意义(χ^2 分别为 12.890、12.890、10.10, $P < 0.05$)。其他细菌镜检结果的标本,荧光染色检出率与萋-尼染色检出率比较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 萋-尼染色与荧光染色结核分枝杆菌检测结果分析(n)

萋-尼染色结果	使用 3 种复染液的荧光染色结果					
	亚甲蓝		苏木素		锰酸钾	
	+	-	+	-	+	-
+	132	0	132	0	132	0
-	56	10	55	11	55	11
χ^2	51.063		48.768		48.768	
P	<0.01		<0.01		<0.01	

表 2 萋-尼染色与荧光组含结核分枝杆菌定量结果分析

检测方法	各镜检结果例数及所占比例[n(%)]				合计(n)	
	≤1+	2+	3+	4+		
萋-尼染色	39(19.7)	44(22.22)	21(10.6)	28(14.14)	132	
荧光染色	亚甲蓝	71(35.86)*	56(28.28)	29(14.65)	32(16.16)	188
	苏木素	71(35.86)*	50(25.25)	34(17.17)	32(16.16)	187
	高锰酸钾	67(33.84)*	57(28.79)	30(15.15)	33(16.67)	187

*: $P < 0.05$, 与萋-尼染色比较。

复核发现在亚甲蓝、苏木素和高锰酸钾 3 种复染方法中假阳性涂片数分别为 3、5 和 2 例,而假阴性涂片数分别为 12、15 和 11 例,3 种方法的灵敏度差异无统计学意义,特异度相差较大,见表 3。

表 3 使用 3 种复染液荧光显微镜检测效果评价(n=198)

复染试剂	真阳性 (n)	假阳性 (n)	真阴性 (n)	假阴性 (n)	灵敏度 (%)	特异度 (%)
亚甲蓝	176	3	7	12	93.6	70.0
苏木素	172	5	6	15	92.0	54.5
高锰酸钾	176	2	9	11	94.1	81.8

3 讨论

金胺 O 是一种荧光染料,它利用了结核杆菌的嗜酸性(在染液中加入石炭酸作为媒染剂)和对荧光染料的亲和性的特性,可以被染上荧光。即使某些长期服用药物的患者结核杆菌的抗酸性被破坏,但荧光性仍保留,使得抗酸染色为阴性,而在金胺 O 荧光染色中呈阳性[6]。

荧光染色法镜检时结核杆菌在暗视野背景下发出亮绿色或黄绿色荧光,与蓝黑色背景反差很大,对比鲜明,非常明显容易被发现。荧光染色读片放大倍数为 400 倍,所观察的视野面积较大,报告阴性结果读片 50 个视野(通常需 2 min 左右),可加快阅片速度。而抗酸染色镜检读片放大倍数为 1 000 倍,油镜观察视野范围小,与荧光法观察相同面积比较,所需时间长,报告阴性结果需读片 300 个视野或需阅片 5 min 左右,镜检人员容易出现视觉疲劳。故荧光染色法可以提高工作效率。

本研究将荧光染色与萋-尼染色结果比较,阳性检出率两组之间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。通过观察发现,差异

主要表现在对镜检结果不超过 1+ 标本的检测,即含菌量少的痰液标本。这表明涂片荧光染色法较萋-尼染色法灵敏度高,与研究报道一致[5,7-8]。显然,荧光染色法最大的优点是可减少假阴性,对于那些病变活动性轻、排菌量较少的肺结核诊断可以减少漏诊的机会。

复染直接影响染色背景的效果,因而有必要对复染液进行选择。将荧光组分别用 0.3% 亚甲蓝液、0.5% Haris 苏木素液、0.5% 高锰酸钾液作为复染剂,比较不同复染剂的染色效果。本文结果显示,3 种方法的灵敏度基本相同,可达 90% 以上;但特异度存在明显差异(表 3),特别是苏木素组相对较低。其原因是,苏木素液配制复杂,长期存放可能出现沉淀,使用时需经过滤,且染色后非特异性荧光还是明显较多;荧光显微镜下,背景呈蓝紫色或紫红色,而结核杆菌呈黄绿色荧光,背景和被检物呈色反差不大,部分标本在判别时还需要借助油镜辨认。亚甲蓝液配制简单,染色背景蓝色清新,杂质少,非特异荧光少,与呈黄绿色荧光的结核杆菌反差明显清晰,容易辨认。高锰酸钾是一种优越的背景荧光淬灭剂,其溶液配制简单,染色背景黑色清晰,非特异荧光较少,结核杆菌呈现亮黄绿色或橘黄色荧光,容易辨认;但高锰酸钾有毒,浓溶液或结晶对皮肤有腐蚀性,刺激性,可至人体灼伤,属于管制化学品,已经限制使用。

综合以上因素,研究者认为涂片检测结核杆菌,在条件许可的实验室,采用荧光染色法,并且应用 0.3% 亚甲蓝液作为荧光染色的背景染液是最佳选择。

参考文献

[1] Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection(下转第 748 页)

2.2 仪器结果变异 见表 3。

2.3 新鲜血检测结果 见表 4。表 4 中可以看出,4 台仪器重复性很好,表示仪器精密度高。以参加卫生部室间质评结果优秀的 CA620 血细胞分析仪为参比仪器,计算另外几台仪器与参考仪器的偏差,选取 1/2 CLIA'88 允许误差为标准,结果偏差在以下范围内:RBC±3%,HCT±3%;WBC±7.5%;PLT±12.5%;HGB±3.5%,可接受;经计算所有指标均在可接受范围内,表示 4 台仪器之间,检测结果一致性高。

表 3 各台仪器测定结果检测结果变异(%)

项目	RBC	MCV	HCT	PLT	WBC	HGB
CA620(参考)	1.1	0.3	1.2	2.2	0.8	0.9
CA620(365)	1.0	0.5	1.2	3.9	2.4	0.6
M 系列(677)	0.7	0.6	1.3	3.8	0.4	3.6
M 系列(678)	0.2	1.8	1.8	3.9	0.5	2.4

表 4 4 台仪器检测同一新鲜血结果($\bar{x} \pm s$)

仪器	RBC($\times 10^{12}/L$)	MCV(fL)	HCT(%)	PLT($\times 10^9/L$)	WBC($\times 10^9/L$)	HGB(g/L)
CA620(参考)	4.21±0.05	96.6±0.31	40.7±0.48	159.0±3.00	4.98±0.04	137±1.22
CA620(365)	4.17±0.04	94.6±0.48	39.5±0.48	156.0±6.00	4.99±0.12	135±0.76
M 系列(677)	4.18±0.03	95.9±0.13	40.1±0.29	163.0±7.00	4.87±0.10	135±0.84
M 系列(678)	4.17±0.04	95.4±0.42	39.8±0.40	162.0±7.00	4.85±0.10	134±0.55

3 讨 论

在血站,血细胞分析仪主要用于成分血捐献前的筛查和血液产品的质量检测。《献血者健康检查要求》GB18467-2011 规定,对于捐献成分血的献血者,要预测采后血小板数,并且要求捐献单采血小板的献血者,HCT ≥ 0.36 ;采前 PLT $\geq 150 \times 10^9/L$ 且 PLT $\leq 450 \times 10^9/L$;预测采后 PLT $\geq 100 \times 10^9/L$ 。《全血及成分血质量检测标准》GB18469-2012 对红细胞和血小板类产品均有相应的含量要求,而所有这些指标检测均是依靠血细胞分析仪完成,故血站血细胞分析仪检测结果的一致性,关系到献血者健康和血液产品质量,是血液质量控制中的关键环节。由于不同血细胞分析仪原理、性能之间的差异^[1-2],在各自校准的前提下,分别测定同一标本得出的结果并不完全一致^[3-7],定期做好仪器之间的比对,提高血站血细胞计数仪之间的一致性十分重要^[8-9]。

通常血站都有多台血细胞分析仪,但是不可能每一台仪器都参加卫生部室间质评,本中心用新鲜全血作为标本^[10-12],以参加卫生部室间质评结果优秀的仪器为参比仪器,建立新鲜全血在多台仪器间的比对体系,有效保证了不同型号血细胞分析仪检测结果的一致性和准确性。

参考文献

[1] 彭黎明,王鸿利.我国临床血液学检验亟待解决的问题[J].中华检验医学杂志,2005,28(8):235-236.

[2] 丛玉隆.血液学体液学检验与临床释疑[M].北京:人民军医出版社,2004:294-298.

[3] 何平,姚舒生.同一品牌不同类型血液分析仪检测结果的可比性研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(7):774-775.

[4] 赵秋剑,薛海鲸,刘存慧.两种血细胞分析仪间比对方法探讨[J].国际检验医学杂志,2008,29(10):960.

[5] 展凤霞,王谦,杨晓静,等.新鲜全血代替校准物在多系列血液分析仪上的应用[J].临床检验杂志,2003,22(3):167.

[6] 石巍,严开斌.不同品牌血液分析仪检测结果的比对分析[J].国际检验医学杂志,2012,33(5):597-598.

[7] 李荣辉,徐明鑫,孙立群,等.血细胞分析常见问题的探讨[J].国际检验医学杂志,2013,34(2):250-251.

[8] 滕晓梅.多种血液分析仪间的结果比对分析[J].医学理论与实践,2010,23(3):334-335.

[9] 周文虹,邱少雄.同室间不同品牌血细胞分析仪的校准及分析结果比对观察[J].海南医学,2010,21(4):105-106.

[10] 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].2版.上海:上海科学技术文献出版社,2004:23.

[11] 戴隽.新鲜血在校准血液细胞分析仪的应用[J].江西医学检验,2003,21(3):205-206.

[12] 伏攀,李春碧.用新鲜全血校准血细胞分析仪的方法[J].中国医学创新,2010,7(6):130-133.

(收稿日期:2014-09-18)

(上接第 746 页)

of Mycobacterium tuberculosis complex and drug resistance[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(11): 1350-1355.

[2] 中国防痨协会基础专业委员会.结核病诊断细菌学检验规程[M].北京:中国教育文化出版社,2006:30-37.

[3] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:791-798.

[4] 朱育连,谢飞来,王旭洲.金胺 O 荧光染色检测石蜡切片中偶发分枝杆菌的体会[J].诊断病理学杂志,2012,19(4):313-314.

[5] 陈燕梅,钱明,江勇,等.荧光染色发光二极管显微镜检测结核分枝杆菌的效果分析[J].中国防痨杂志,2011,33(9):585-587.

[6] 卢星梅,董磊,黄卡特,等.金胺 O 荧光染色与抗酸染色用于石蜡包埋组织结核杆菌检测的对比分析[J].浙江实用医学,2012,17(2):140-142.

[7] 尚美,刘冠,赵立平,等.发光二极管荧光显微镜实验室诊断效果评价[J].中国防痨杂志,2010,32(5):275-278.

[8] Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G. et al. Performance of three LED-based fluorescence microscopy systems for detection of tuberculosis in Uganda[J]. PLoS One, 2010, 5(12): 15206.

(收稿日期:2014-11-18)