

• 论 著 •

2017—2019 年重庆市自制抗酸染色标本室间质量评价结果分析

王淑玲, 颜 令, 徐兰兰, 张 震, 李 甜, 廖 璞[△]

中国科学院大学重庆医院检验科/重庆市人民医院检验科/重庆市临床检验中心, 重庆 400014

摘 要:目的 分析重庆市 2017—2019 年自制抗酸染色标本室间质量评价(EQA)结果,了解目前实验室人员的染色能力和读片能力,为提高该市抗酸染色显微镜检查质量寻找依据。方法 重庆市临床检验中心发放自制的抗酸染色标本,收集参加抗酸染色显微镜检查 EQA 的各实验室结果,对结果进行统计分析。结果 2017—2019 年参加重庆市抗酸染色显微镜检查 EQA 的实验室数从 2017 年的 58 家增加至 2019 年的 88 家,合格率从 2017 年的 96.6%增加至 2019 年的 97.7%。5 次抗酸染色显微镜检查 EQA,阴性标本符合率 97.8%,阳性标本符合率 98.1%,总体符合率 97.9%。结论 通过自制标本开展抗酸染色显微镜检查 EQA 工作,实验室对抗酸染色显微镜检查质量控制越来越重视,抗酸染色显微镜检查质量有明显改进,推动了抗酸染色显微镜检查结果的准确性、可比性,为临床诊疗提供快速可靠的依据。

关键词:室间质量评价; 抗酸染色; 显微镜检查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.11.025

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)11-1391-04

文献标志码:A

Analysis of the results of the external quality assessment of the homemade acid-fast staining specimens in Chongqing from 2017 to 2019

WANG Shuling, YAN Ling, XU Lanlan, ZHANG Zhen, LI Tian, LIAO Pu[△]

Department of Clinical Laboratory, University of Chinese Academy of Sciences

Chongqing General Hospital/Department of Clinical Laboratory, Chongqing People's Hospital/

Chongqing Center for Clinical Laboratory, Chongqing 400014, China

Abstract: Objective To analyze the results of external quality assessment (EQA) of self-made acid fast staining specimens in Chongqing from 2017 to 2019, to understand the dyeing ability and smear reading ability of laboratory personnel, and to find the basis for improving the quality of acid-fast staining microscopy in Chongqing. **Methods** The self-made acid-fast staining specimens were distributed by Chongqing Center for Clinical Laboratory, and the results of each laboratory participating in acid-fast staining microscope examination of EQA were collected and statistically analyzed. **Results** From 2017 to 2019, the number of laboratories for EQA inspection by acid-fast staining microscopy in Chongqing increased from 58 in 2017 to 88 in 2019, and the qualified rate increased from 96.6% in 2017 to 97.7% in 2019. Five times of acid-fast staining microscopic examinations of EQA, the coincidence rate of negative specimens was 97.8%, the coincidence rate of positive specimens was 98.1%, and the overall coincidence rate was 97.9%. **Conclusion** Through self-made specimens to carry out the EQA work of acid-fast staining microscopy, the laboratory pays more and more attention to the quality control of acid-fast staining microscopy, and the quality of acid-fast staining microscopy has been significantly improved, which promotes the accuracy and comparability of acid-fast staining microscopy results, and provides fast and reliable basis for clinical diagnosis and treatment.

Key words: external quality assessment; acid-fast staining; microscope examination

由于人类免疫缺陷病毒感染、人群老年化、空气污染等因素影响,结核病发病率逐年增高,其仍然是一个重要的公共卫生问题。世界卫生组织(WHO)最新发布的《2019 年全球结核病报告》显示,我国仍为全球 30 个结核病高负担国家之一,每年新发结核病患者约 90 万例,位居全球第 3 位^[1]。及时筛选出结

核菌人群,及时隔离及治疗,减少结核病传播已成为我国传染病防治的重点。用于诊断结核病的实验室技术虽然发生了变化,但直接痰涂片抗酸染色仍是诊断和监测结核病的最具成本效益的方法^[2]。痰涂片染色显微镜检查错误可能会导致无法发现感染结核病的患者,而未被检测到的患者可能会继续在社区中

作者简介:王淑玲,女,主管技师,主要从事临床微生物检验的研究。[△] **通信作者,** E-mail: liaopu2015@163.com。

本文引用格式:王淑玲,颜令,徐兰兰,等. 2017—2019 年重庆市自制抗酸染色标本室间质量评价结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(11): 1391-1394.

传播疾病,或进行不必要的治疗。为了解本市各级实验室抗酸染色及显微镜检查能力,提高本市临床微生物抗酸染色显微镜检查能力,重庆市临床检验中心于 2017 年下半年开始开展抗酸染色显微镜检查室间质量评价(EQA),至今开展了 5 次,现将结果总结分析如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 脓肿分枝杆菌标准菌株 ATCC19977 (CICC10381)购自中国工业微生物菌种保藏中心。

1.1.2 自制 EQA 标本 在生物安全柜内刮取血平板上生长 3 d 的脓肿分枝杆菌,调菌悬液到 0.50 麦氏单位,2%胰蛋白酶 37℃消化临床脓痰 30 min,分别用消化后的痰液将菌悬液稀释 10 倍(4+)、50 倍(3+)、100 倍(2+)、200 倍(1+),取 10 μL 不同稀释倍数的菌悬液可制备成不同等级的样品,涂抹玻片中央呈 2 cm² 菌膜,经过稳定性和均一性评价合格后方可作为抗酸染色 EQA 标本^[3-4]。

1.2 方法

1.2.1 标本发放及检测 EQA 通过批量测试方式进行。重庆市临床检验中心向申请参加 EQA 的实验室发送未染色的涂片标本,由参加实验室人员自行染色,显微镜检查读片,然后由重庆市临床检验中心对读片结果进行分析评估。EQA 标本每年发放 2 次,每次 5 个标本。本市参加 EQA 的实验室按照通知,收到标本后立即检测,或放置室温保存并在规定日期前检测和上报检测结果。检测时按照实验室临床标本抗酸染色及显微镜检查操作规程进行。

1.2.2 数据收集 依据 CNAS-GL002:2018《能力验证结果的统计处理和能力评价指南》^[5],统计参评实验室对质量评价标本的测定结果与预期结果的符合程度。预期阴性报告阳性不得分;预期阳性报告阴性不得分;预期阳性与预期上下差 1 个数量级皆为符合得 20 分;预期阳性标本与预期上下差 2 个及以上数量级得 10 分。参照 WS/T 644-2018《临床检验室间质量评价》,根据符合率来判断参评实验室的能力是否合格(合格标准为大于等于 80 分)。对每一个检测项目的评价为:(某项目测定结果可接受标本数/某项目标本总数)×100=本次某项目测定得分,如果该项目得分大于等于 80 分则为满意(合格);对于所有检测项目的评价为:(所有项目测定结果可接受标本数/标本总数)×100=本次所有项目测定得分,如果所有项目得分大于等于 80 分则为满意(合格)^[6]。

1.3 统计学处理 采用 Excel 2016 对数据进行处理。计数资料以频数、率表示。

2 结 果

2.1 参加抗酸染色显微镜检查并上报数据的实验室数和合格率 参加该项目 EQA 的实验室数从 2017 年 58 家增加至 2019 年 88 家,合格率从 2017 年的 96.6%增加至 2019 年的 97.7%,见表 1。

表 1 2017—2019 年参加并上报数据实验室数和合格率

年份	样品数 (n)	回报数据 实验室数(n)	合格 实验室数(n)	不合格 实验室数(n)	合格率 (%)
2017 年	5	58	56	2	96.6
2018 年	10	76	70	6	92.1
2019 年	10	88	86	2	97.7

2.2 参加抗酸染色显微镜检查实验室级别构成和合格情况 参加 EQA 的单位主要是综合性二、三级医院和中医系统的实验室,民营医院实验室和独立实验室也逐步加入。2019 年综合性二级医院实验室 35 家,占 39.8%,综合性三级医院实验室 24 家,占 27.3%,系统实验室 20 家,占 22.7%。参加实验室合格率逐步上升,见表 2。

表 2 2017—2019 年参加 EQA 实验室级别构成和合格情况

实验室级别	2017 年(n=58)			2018 年(n=76)			2019 年(n=88)		
	合格 (n)	不合格 (n)	合格率 (%)	合格 (n)	不合格 (n)	合格率 (%)	合格 (n)	不合格 (n)	合格率 (%)
三级医院	17	0	100.0	20	2	90.9	23	1	95.8
二级医院	21	0	100.0	28	1	96.6	35	0	100.0
中医院	13	1	92.9	14	3	82.4	19	1	95.0
妇幼保健院	1	0	100.0	1	0	100.0	1	0	100.0
民营医院	2	1	66.7	5	0	100.0	6	0	100.0
独立实验室	2	0	100.0	2	0	100.0	2	0	100.0

2.3 2017—2019 年抗酸染色显微镜检查结果 抗酸染色显微镜检查各标本符合率在 88.2%~100.0%,见表 3。

2.4 实验室标本抗酸染色显微镜检查结果符合情况 5 次抗酸染色镜检 EQA,共发放阴性标本 1 158 份,阴性标本符合率 97.8%;发放阳性标本 772 份,阳性标本符合率 98.1%;总体符合率 97.9%,见表 4。

2.5 实验室标本抗酸染色显微镜检查错误结果分析 高假阳性(HFP)即阴性标本错误报告为 2+~4+;高假阴性(HFN)即阳性标本 2+~4+错误报告为阴性;低假阳性(LFP)即阴性标本报告为 1+及以下;低假阴性(LFN)即 1+及以下阳性标本错误报告为阴性^[7-8]。阴性标本 1 158 份,回报结果 HFP 错误的占 1.1%,LFP 错误占 1.1%;阳性标本 772 份,回报结果 HFN 错误的占 1.9%;1 930 份标本的总错误占 2.1%,见表 5。

2.6 实验室标本抗酸染色显微镜检查阳性结果量化误差(QE) 阳性级别判断上相差 2 个及以上数量级,例如将 4+报告为 1+/2+或将 1+/2+报告为 4+^[6-7],772 份阳性标本中有 42 份标本上报结果存在 QE,占 5.4%。

2.7 涂片抗酸染色仪器使用情况 使用全自动染片仪的实验室仅有 3 家,占 3.4%,96.6%实验室仍是传

统人工染色。

表 3 2017—2019 年抗酸染色显微镜检查结果				
年份	标本编号	预期结果	正确回报 实验室数(<i>n</i>)	符合率 (%)
2017 年(<i>n</i> =58)	201721	未发现抗酸杆菌	58	100.0
	201722	未发现抗酸杆菌	56	96.6
	201723	未发现抗酸杆菌	56	96.6
	201724	发现抗酸杆菌 4+	58	100.0
	201725	发现抗酸杆菌 3+	57	98.3
2018 年(<i>n</i> =76)	201811	未发现抗酸杆菌	73	96.1
	201812	发现抗酸杆菌 3+	76	100.0
	201813	未发现抗酸杆菌	72	94.7
	201814	发现抗酸杆菌 2+	67	88.2
	201815	未发现抗酸杆菌	72	94.7
	201821	未发现抗酸杆菌	75	98.7
	201822	未发现抗酸杆菌	76	100.0
	201823	未发现抗酸杆菌	75	98.7
	201824	发现抗酸杆菌 2+	76	100.0
	201825	发现抗酸杆菌 3+	76	100.0
2019 年(<i>n</i> =88)	201911	未发现抗酸杆菌	88	100.0
	201912	未发现抗酸杆菌	87	98.9
	201913	未发现抗酸杆菌	83	94.3
	201914	发现抗酸杆菌 2+	88	100.0
	201915	发现抗酸杆菌 3+	88	100.0
	201921	未发现抗酸杆菌	88	100.0
	201922	发现抗酸杆菌 2+	85	96.6
	201923	未发现抗酸杆菌	87	98.9
	201924	发现抗酸杆菌 3+	86	97.7
	201925	未发现抗酸杆菌	86	97.7

表 4 实验室标本抗酸染色镜检结果符合情况[<i>n</i> (%)]				
标本	<i>n</i>	标本符合情况		总符合
		阴性	阳性	
阴性	1 158	1 132(97.8)	—	—
阳性	772	—	757(98.1)	—
合计	1 930	—	—	1 889(97.9)

注：—表示无数据。

表 5 实验室标本抗酸染色显微镜检查 错误结果分类[<i>n</i> (%)]						
标本	<i>n</i>	错误结果				总错误
		HFP	HFN	LFP	LFN	
阴性	1 158	13(1.1)	—	13(1.1)	—	26(2.2)
阳性	772	—	15(1.9)	—	0	15(1.9)
合计	1 930	13(0.7)	15(0.8)	13(0.7)	0	41(2.1)

注：—表示无数据。

3 讨 论

WHO 在 2017 年 11 月全球结核病部长级会议上重申了到 2030 年终止结核病流行的宣言。印度(27%)、中国(14%)和俄罗斯(9%)是全球耐药结核病负担最大的 3 个国家,我国控制结核疫情形势相当严峻,发现病例的创新方法将有助于降低结核病发病率^[9]。结核分枝杆菌细胞壁内富含的脂质和分枝菌

酸,可抵抗盐酸酒精的脱色,苯酚复红将其染成红色。随着实验室诊断技术的发展,很多先进的技术被应用,如 Gene Xpert MTB/RIF 检测具有准确、快速、安全等优点,但费用昂贵;培养法虽然灵敏度高,而且能鉴定到菌种和药敏试验,但是操作繁琐,培养时间较长,报告阳性的时间可长达 12 周^[10]。涂片抗酸染色目前仍是各级实验室检测结核分枝杆菌的基本方法。WHO 宣布,控制结核病最佳策略的重要一步是通过痰涂片显微镜检查来识别可疑患者,在涂片中找到结核杆菌是确诊结核的金标准^[11]。医学实验室认可和各级医院评审都对抗酸染色提出要进行室内质控和参加 EQA 的要求。为了加强标本抗酸染色显微镜镜检的准确性,促进实验室内部人员结果的一致性,重庆市临床检验中心于 2017 年在全国较早地开展了抗酸染色显微镜检查 EQA。目前抗酸染色 EQA 包括实验室现场评价、盲法复检以及批量测试。现场评价的优点是能直接观察实验室实际工作,能核实并验证设备和耗材,因此有利于发现问题;缺点是工作时间短,工作强度大,而且花费高。盲法复检是组织者现场抽取实验室保存的阳性和阴性标本片子送到另一个实验室显微镜检查,这种方式可评估显微镜检查结果,但不能更好地评估实验室染色过程。本中心自制抗酸染色涂片标本,以批量测试方式发放到参与实验室,可以发现抗酸染色过程和显微镜检查方面存在的问题。

随着实验室建设规范化及质控意识日益增强,本市各级医学实验室积极参加 EQA,由 2017 年最初的 58 家增加至 2019 年的 88 家实验室,综合三级医院由 17 家增加至 24 家,综合二级医院由 21 家增加至 35 家,中医系统实验室由 14 家增加至 20 家,民营医院由 3 家增加至 6 家。经过 5 次 EQA 项目的开展,实验室总合格率从 96.6%上升至 97.7%,抗酸染色显微镜检查正确率明显提高,这也正是抗酸染色显微镜检查 EQA 开展的目的体现。

2017—2019 年共发放涂片标本 1 930 张,阳性标本符合率为 98.1%,阴性标本符合率为 97.8%,总符合率 97.9%。在埃塞俄比亚南部,SHARGIE 等^[12]进行了一项盲目复查研究,结果显示总体错误为 3.2%,总符合率为 96.8%。本市抗酸染色镜检总符合率稍高于此文献报道。

201814 号标本有 9 家实验室发生了 HFN 结果,是符合率最低的标本。本中心对此进行了调查分析发现,本次发放的 5 个标本中 201814 号标本制备时标本性质不如其他 4 个标本黏稠,该标本更容易脱色,造成有些实验室染色呈阴性。这提醒实验室抗酸染色时由于标本性质的不同,具体脱色时间应根据标本情况决定,否则易产生假阳性或假阴性。201913 号标本 5 家实验室报告了 LFP,实验室忽略了阴性片子的质控。报告假阳性和假阴性结果都是重大的错误,本市室间质评项目总错误率为 2.1%,阴性标本检测

回报结果假阳性率达到 2.2%。MOSISSA 等^[13]报道不染色标本有 1.6%假阳性率,比本市实验室自己染色标本假阳性低。假阳性结果会造成严重后果,会因误诊而对病人造成伤害,增加社会成本,并导致对实验室提供的服务失去信心。假阳性结果可能与实验室专业人员培训水平有关,如染色技术、实验室人员显微镜检查技术、批量测试等因素引起。假阳性结果预防措施:注意染色质量问题,染液结晶会误认成抗酸杆菌;染色时玻片保持一定距离,相互彻底分开,避免菌漂移污染;染色时勿使玻片染液干燥;染色时标本按一定顺序摆放;保证染色完毕标本标签完整可视。

本市室间质评项目阳性标本检测回报结果假阴性率为 1.9%,MOSISSA 等^[13]研究报道假阴性率高达 9.7%,AYANA 等^[14]研究报道假阴性率高达 15.0%,远远高于本市结果。这与 MOSISSA 研究标本数为 32 个,AYANA 研究标本数为 80 个,都远远低于本市标本数有关。假阴性结果患者可能不会接受治疗,从而导致进一步的社区传播和结核病的防控失败。通过将上报假阴性结果的标本回收发现,由于标本脱色过度,造成假阴性。假阴性结果预防措施:先阅读室内质控片是否在控;报告阴性前,阅片满足 300 个视野。

本市 QE 率高达 5.4%,QE 反映大家在阅片时存在一个以上数量差异,这个数据低于 MOSISSA 等^[13]报道的不染色标本的 11.6%。造成 QE 原因有染色时加热不充分,未能使抗酸杆菌充分着色;观察涂片视野数量不足;阳性涂片的分级报告标准掌握差。这要加强人员培训和实验室间比对,逐步实现结果一致性。

抗酸染色显微镜检查对染色过程和显微镜镜检都有要求。目前本市实验室抗酸染色使用染片仪有 3 家,绝大多数都是人工进行染色。针对人工染色,更需要做好室内质控,保证试剂的有效性和人员操作的正确性。显微镜镜检与一般检测不同,要求人员具有丰富的形态学工作经验,具备一定的临床知识和综合分析能力。在实际工作中,由于标本性质、细菌本身对染液的亲和力以及细菌受到药物影响后形态的变异等,往往给实验室镜检人员对细菌的认知带来很大的困难,这要靠培训和实践经验来提高对细菌辨识能力^[15]。

EQA 可发现和纠正常规工作中的问题。通过自制标本开展抗酸染色显微镜检查 EQA 工作,实验室对抗酸染色显微镜检查质量控制越来越重视,抗酸染色显微镜检查质量有明显改进,推动了抗酸染色显微镜检查结果的准确性、可比性,为临床诊疗提供快速可靠的依据,为结核病控制发挥积极作用。

参考文献

[1] HARDING E. WHO global progress report on tuberculosis elimination[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(1): 19.
[2] Tuberculosis Division International Union Against Tuber-

culosis and Lung Disease. Tuberculosis bacteriology-priorities and indications in high prevalence countries; position of the technical staff of the Tuberculosis Division of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9(4): 355-361.
[3] 张震,郭攀,王淑玲,等. 抗酸染色室间质量评价质控片的标准化制备及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(10): 1252-1255.
[4] 中国合格评定国家认可委员会. 医学领域定性检测能力验证实施指南: CNAS-GL021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
[5] 中国合格评定国家认可委员会. 能力验证结果的统计处理和评价指南: CNAS-GL002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
[6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验室间质量评价: WS/T 644-2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
[7] APHL, CDC, IUATLD, et al. External quality assessment for AFB smear microscopy[S]. Washington, DC, USA: APHL, 2002.
[8] 赵雁林, 刘宇红, 姜广路, 等. 中国结核病防治规划: 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京: 北京协和医科大学出版社, 2009: 32-36.
[9] MACNEIL A, GLAZIOU P, SISMANIDIS C, et al. Global epidemiology of tuberculosis and progress toward meeting global targets-worldwide, 2018[J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2020, 69(11): 281-285.
[10] MAGALHÃES J L O, LIMA J F D C, ARAUJO A A, et al. Microscopic detection of Mycobacterium tuberculosis in direct or processed sputum smears[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2018, 51(2): 237-239.
[11] GRAF P. An expanded DOTS framework for effective tuberculosis control[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2002, 6(5): 378-388.
[12] SHARGIE E B, YASSIN M A, LINDTJORN B. Quality control of sputum microscopic examinations for acid fast bacilli in southern Ethiopia[J]. Ethiop J Health Dev, 2005, 19(2): 104-108.
[13] MOSISSA L, KEBEDE A, MINDAYE T, et al. External quality assessment of AFB smear microscopy performances and its associated factors in selected private health facilities in Addis Ababa, Ethiopia[J]. Pan Afr Med J, 2016, 24(6): 125-135.
[14] AYANA D A, KIDANEMARIAM Z T, TESFAYE H M, et al. External quality assessment for acid fast bacilli smear microscopy in eastern part of Ethiopia[J]. BMC Res Notes, 2015, 8(10): 537-543.
[15] REJI P, AGA G, ABEBE G. The role of AFB microscopy training in improving the performance of laboratory professionals: analysis of pre and post training evaluation scores[J]. BMC Health Serv Res, 2013, 13(10): 392-398.