

## 三种方法检测儿童肺泡灌洗液中结核分枝杆菌结果分析

牛 波<sup>1</sup> 刘建华<sup>1</sup> 曹丽洁<sup>1</sup> 帅金凤<sup>1</sup> 刘新锋<sup>1</sup> 池跃朋<sup>2</sup>

( 1. 河北省儿童医院 呼吸二科 河北 石家庄 050000; 2. 河北省胸科医院 二病区 河北 石家庄 050000)

**【摘要】**目的: 探讨直接涂片法、离心涂片法和玻片沉淀法三种抗酸染色技术检测儿童肺泡灌洗液中结核分枝杆菌对于活动性肺结核的诊断价值。方法: 对 40 例疑似肺结核患儿的肺泡灌洗液标本同时进行直接涂片法、离心涂片法和玻片沉淀法检测抗酸杆菌, 比较三种方法的阳性率。结果: 直接涂片法、离心涂片法和玻片沉淀法阳性率分别为 12. 5% ( 5/40)、30. 0% ( 12/40)、77. 5% ( 31/40), 与直接涂片法及离心涂片法比较, 玻片沉淀法的阳性率较高, 差异有统计学意义( 配对  $\chi^2 = 24. 04$ ,  $P < 0. 001$ ; 配对  $\chi^2 = 15. 43$ ,  $P < 0. 001$ ); 直接涂片法和离心涂片法比较, 差异有统计学意义( 配对  $\chi^2 = 5. 14$ ,  $P < 0. 05$ )。结论: 三种方法中, 玻片沉淀法阳性率最高, 它是一种快速、简便、经济的检验技术, 值得临床推广应用。

**【关键词】**肺泡灌洗液; 肺结核; 儿童

**【中图分类号】**R 725. 6 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2016. 01. 012

## Outcomes of detecting the *Mycobacterium tuberculosis* in the bronchoalveolar lavage fluid from children by three different acid-fast staining

NIU Bo, LIU Jianhua, CAO Lijie, SHUAI Jinfeng, LIU Xinfeng, CHI Yuepeng

No. 2 Department of Respiratory Diseases, Hebei Provincial Children's Hospital, Shijiazhuang 050000, China

**【Abstract】Objective:** To assess the diagnostic value of applying conventional smear, centrifugal smear and cytospin slides technique to detecting the *Mycobacterium tuberculosis* in the bronchoalveolar lavage fluid ( BALF) for diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. **Methods:** The BALF samples were obtained from 40 children suspected with tuberculosis and detected by technique of direct smear, centrifugal smear and cytospin slides, respectively. Then the positive rate was compared among the three techniques. **Results:** The positive rate was 12. 5% ( 5/40), 30. 0% ( 12/40) and 77. 5% ( 31/40) for direct smear, centrifugal smear and cytospin slides, respectively. Cytospin slide method demonstrated higher positive rate than the other two (  $\chi^2 = 24. 04$ ,  $P < 0. 001$ ;  $\chi^2 = 15. 43$ ,  $P < 0. 001$ ) and the difference was significant between direct smear and centrifugal smear method as well (  $\chi^2 = 5. 14$ ,  $P < 0. 05$ ) . **Conclusion:** Of the three laboratory studies for *Mycobacterium tuberculosis* in BALF from children, cytospin slide test may demonstrate highest positive rate, and is worthy of wider clinical recommendation because of its quick and simple process as well as low testing cost.

**【Keywords】** bronchoalveolar lavage fluid; pulmonary tuberculosis; children

基金项目: 河北省卫生厅重点科技研究计划( 20130397)

收稿日期: 2015-06-14

作者简介: 牛 波( 1978-), 女, 主治医师 ( 电话) 13833132393 ( 电子信箱) 24201475@qq. com;

池跃朋, 男, 主治医师 ( 电子信箱) chiyuepeng2013@163. com 通讯作者.

[10] 穆桂萍, 徐春莺, 翟长华. 新生儿窒息与心肌酶及血清胆红素动态变化的关系探讨[J]. 陕西医学杂志, 2010, 39( 1): 99 - 100, 125.

[11] 郭军, 高秋华, 杨中民, 等. 胆红素的抗氧化作用[J]. 生命的化学, 2002, 22( 2): 157 - 159.

[12] YAMADA N, YAMAYA M, OAKINAGA S, et al. Protective effects of heme oxygenase-1 against oxidant-induced injury in the cultured human tracheal epithelium[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999, 21( 3): 428 - 435.

[13] GEORGE EM, COLSON D, DIXON J, et al. Heme Oxygenase-1 At-

tenuates Hypoxia-Induced sFlt-1 and Oxidative Stress in Placental Villi through Its Metabolic Products CO and Bilirubin[J]. Int J Hypertens, 2012, 18( 6): 486053.

[14] CLARK JE, WONG RJ, JANG KY, et al. Heme oxygenase-1 deficiency promotes the development of necrotizing enterocolitislike intestinal injury in a newborn mouse model [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013, 304( 11): G991 - G1001.

[15] 郭鲁闽, 许韞, 于群. 新生儿高胆红素血症对心肌细胞的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12( 10): 784 - 785.

随着全球结核病发病率的上升,儿童结核病也随之增加<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织报道,2013年,全球有900 百万人罹患结核病,约55 万例为儿童<sup>[2]</sup>。在中国,卡介苗接种率虽然很高,但每年仍约有100 万新发病例<sup>[3]</sup>,儿童感染率约为0.5%~2%。由于儿童肺结核临床表现和体征不典型,痰标本难得,致使不易取得病原学证据,误诊误治情况十分常见。在2012年8月~2014年12月期间,我院共对40例疑似肺结核患儿进行了纤维支气管镜检查,同时进行肺泡灌洗,分别用直接涂片法、离心涂片法和玻片沉淀法对灌洗液进行抗酸染色检测,以了解不同技术对儿童肺结核诊断的效率,探讨玻片沉淀抗酸染色法对儿童肺结核的诊断价值。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 病例来源于河北省儿童医院,2012年8月~2014年12月共40例疑似肺结核患儿经筛选入组,男性26例,女性14例,年龄1~12岁,其中1~3岁6例,3~5岁12例,5~12岁22例。入组病例的诊断均符合中华医学会儿科分会制定的儿童肺结核临床诊断标准<sup>[4]</sup>,且行纤维支气管镜检查前,三次痰涂片抗酸染色阴性或无痰,但胸部X线提示有活动性肺结核特征。所有病例均符合儿科支气管镜术指南<sup>[5]</sup>的检查适应证,检查前患儿家属均签署了知情同意书。

1.2 临床表现和体征 40例患儿中,咳嗽33例(24例为刺激性干咳,9例为痉挛性咳嗽),22例为不规则发热,16例为低热,2例为中高热,盗汗10例,乏力、消瘦13例,呼吸困难3例,胸痛2例,痰中带血丝1例;肺部体征无明显异常者13例,有干湿啰音者17例,呼吸音弱者7例,叩诊呈浊音者3例。

1.3 影像学检查 40例患儿胸部X线平片检查:双肺粟粒状影1例,左上肺空洞形成1例,左肺上叶浸润病灶5例,右肺上叶浸润病灶2例,少量胸腔积液3例。X线平片无明显异常的28例患者,行胸部CT检查:有小斑片浸润影、纤维条索状影10例,纵隔淋巴结和(或)肺门淋巴结肿大11例,左肺上叶高密度影并纵隔淋巴结肿大6例,无明显异常1例。

1.4 仪器检查 采用Olympus P260F纤维支气管镜检查。7岁以下的儿童采用异丙酚静脉复合麻醉,7岁以上儿童采用利多卡因气管内黏膜表面麻醉。患儿取仰卧位,纤维支气管镜经鼻腔进入,仔细检查声门、气管、隆突、各肺段支气管黏膜病变情况,对影像学确定的病灶部位重点检查,然后经导管注入适量生理盐水,收集灌洗液。

1.5 仪器及材料 玻片离心沉淀仪(Thermo Cytospin4型);低温离心机;抗酸染色液等。

### 1.6 检测方法

1.6.1 直接涂片法 取混匀的灌洗液直接涂布在玻片上,大小为1 cm×2 cm,固定后,滴加石炭酸复红染液,染色10~15 min,3%盐酸酒精脱色1 min,美蓝复染0.5~1 min,水冲洗后自然干燥,然后用油镜检查。详细过程参照《痰涂片镜检质量保证手册》<sup>[6]</sup>。

1.6.2 离心涂片法 取2 mL灌洗液加入一次性试管中,以3000 r/min在4℃下离心15 min,用吸管轻轻吸取上清液弃掉,混匀试管底部沉渣进行涂片,涂布面积1 cm×2 cm。然后行抗酸染色及镜检。

1.6.3 玻片沉淀法 将1 mL灌洗液与2 mL 4%氢氧化钠在漩涡振荡器上充分混匀,取0.5 mL混合液加入玻片离心沉淀仪中,以450 r/min离心5 min,取出玻片干燥后进行抗酸染色及镜检。

1.7 统计学处理 分别计算3种方法的阳性率,采用SPSS 19.0软件对数据进行分析,3种方法间的比较采用两两配对卡方检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 2 结果

40例灌洗液标本中,玻片沉淀法阳性31例,阳性率77.5%,直接涂片法阳性5例,阳性率12.5%,玻片沉淀法明显高于直接涂片法,差异有统计学意义(配对 $\chi^2 = 24.04, P < 0.001$ ,表1);离心涂片法阳性12例,阳性率30.0%,玻片沉淀法明显高于离心涂片法,差异有统计学意义( $\chi^2 = 15.43, P < 0.001$ ,表2);直接涂片法阳性率低于离心涂片法,差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.14, P < 0.05$ ,表3)。

表1 玻片沉淀法与直接涂片法检测结果比较

玻片沉淀法	直接涂片法		合计
	+	-	
+	5	26	31
-	0	9	9
合计	5	35	40

配对 $\chi^2 = 24.04, P < 0.001$ 。

表2 玻片沉淀法与离心涂片法检测结果比较

玻片沉淀法	离心涂片法		合计
	+	-	
+	11	20	31
-	1	8	9
合计	12	28	40

配对 $\chi^2 = 15.43, P < 0.001$ 。

表3 直接涂片法与离心涂片法检测结果比较

直接涂片法	离心涂片法		合计
	+	-	
+	5	0	5
-	7	28	35
合计	12	28	40

配对  $\chi^2 = 5.14$   $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

我国结核病人位居世界第二位,仅次于印度<sup>[7]</sup>。随着多重耐药菌株的出现、艾滋病等免疫缺陷患者的增多、人口流动频繁以及治疗预防体系不完善,结核病疫情不容乐观<sup>[8]</sup>。儿童肺结核病在我国属于常见病、多发病,临床诊断主要根据症状、体征、影像学、PPD 试验、结核病接触史等。但是由于缺乏典型的症状、体征,极易误诊为呼吸道感染,所以儿童肺结核的早期实验室诊断尤为重要。痰涂片抗酸染色或痰结核分枝杆菌(结核菌)培养阳性是诊断结核病的“金标准”<sup>[9]</sup>,但是涂片的敏感性低,培养所需时间长,一般在2~8周才能获得结果<sup>[10]</sup>。很多患儿取得痰标本十分困难,纤维支气管镜检查技术,不仅可以直接观察病变部位,还解决了标本采集的问题,通过肺泡灌洗可以得到标本,然后再通过其他技术进行检测,明显提高了诊断效率。灌洗液的检测方面,近些年应用的PCR技术,虽然提高了阳性率,但是对实验室的条件要求高,假阳性问题难以解决;GENE Xpert 技术阳性率高,但是仪器昂贵,收费高,在中国还未普遍应用。虽然抗酸染色阳性率不高,但其以经济、简便、快速的优势仍在全国普遍应用,如何在抗酸染色方面进行进一步的应用研究很少有人关注。玻片离心沉淀仪以往主要应用于细胞收集方面,很少有研究者将此技术用于检测结核分枝杆菌,Chen P 等<sup>[11-12]</sup>把此技术应用到结核性脑膜炎的诊断方面,使得敏感度从传统离心涂片法的3.3%提高到了82.9%。本研究将此技术应用到灌洗液方面,使得阳性率达到77.5%,远高于直接涂片法的12.5%和离心涂片法的30.0%。

直接涂片、离心涂片抗酸染色法的检出上限为5000~10000条/mL结核菌,虽然涂布面积为1cm×2cm(10000个视野),但是只检测300个视野,阳性率不高。离心涂片法虽然起到了一定的浓集效

果,但是由于结核菌的密度小于水,很难通过高速离心使结核菌完全沉淀下来,在弃掉上清和转移涂片的过程中会造成结核菌的丢失。玻片沉淀法在离心的过程中,液体成分被滤纸吸收,结核菌直接沉淀到玻片上,不涉及浮力的影响以及转移损失的问题,并且涂布面积小(直径6mm),达到了高度浓缩的目的,所以检出率得以明显提高,其设备简单,30min即可出结果,明显优于传统直接涂片法和离心涂片法。综上所述,玻片沉淀法快速、简便、经济、诊断儿童肺结核阳性率高,对于早期诊断意义重大,值得结核病相关单位推广应用。

### 【参考文献】

- [1] ATKINSON P, TAYLOR H, SHARLAND M, *et al.* Resurgence of paediatric tuberculosis in London [J]. Arch Dis Child 2002; 86: 264-265.
- [2] WHO. Global tuberculosis report 2014. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en).
- [3] 鲍磊,李涛,卢水华,等.  $\gamma$ 干扰素释放试验在儿童肺结核诊断中的价值[J]. 微生物与感染 2014; 9(2): 96-101.
- [4] 中华医学会呼吸学组. 儿童肺结核的临床诊断标准和治疗方案[J]. 中华儿科杂志 2006; 44(4): 249-251.
- [5] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 儿科支气管镜协作组. 儿科支气管镜术指南(2009版)[J]. 中华儿科杂志 2009; 47(10): 740.
- [6] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志 1996; 18(2): 80-85.
- [7] 吴红兵, 肖长生. 104例儿童结核误诊原因分析[J]. 中国防痨通讯 2002; 24(6): 358.
- [8] XUE Q, WANG N, XUE X, *et al.* Endobronchial tuberculosis: an overview. [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30(9): 1039-1044.
- [9] ZUMLA A, RAVIGLIONE M, HAFNER R, *et al.* Tuberculosis [J]. N Engl J Med 2013; 368(8): 745-755.
- [10] SIDDIQI K, LAMBERT ML, WALLEY J. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence [J]. Lancet Infect Dis 2003; 3(5): 288-296.
- [11] CHEN P, SHI M, FENG GD, *et al.* Highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular M. tuberculosis in cerebrospinal fluid [J]. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1166-1170.
- [12] FENG GD, SHI M, MA L, *et al.* Diagnostic Accuracy of Intracellular Mycobacterium tuberculosis Detection for Tuberculous Meningitis [J]. Am J Respir Crit Care Med 2014; 189(4): 475-481.