

## 改良抗酸染色法对儿童结核性脑膜炎诊断价值分析

曹晓娜<sup>1</sup> 邵艳新<sup>2</sup> 高 卿<sup>1</sup> 苏 一<sup>1</sup> 魏 媛<sup>1</sup> 冯建纯<sup>2</sup>

( 1. 辛集市第一人民医院 儿科 河北 辛集 052360; 2. 河北省胸科医院 检验科 河北 石家庄 050000)

**【摘要】**目的: 探讨改良抗酸染色法在儿童结核性脑膜炎诊断中的价值。方法: 应用 BACTEC MGIT 960 培养法、离心涂片法、改良抗酸染色法同时对 30 份临床诊断为结核性脑膜炎的儿童脑脊液标本进行检测。结果: BACTEC MGIT 960 培养法、离心涂片法及改良抗酸染色法的阳性率分别为 13. 3% ( 4/30) 、3. 33% ( 1/30) 、56. 7% ( 17/30) 。改良抗酸染色法与 BACTEC MGIT 960 培养法、离心涂片法比较差异均有统计学意义(  $P < 0. 005$ ) 。结论: 改良抗酸染色法诊断儿童结核性脑膜炎阳性率明显提高, 值得临床推广应用。

**【关键词】**脑脊液; 改良抗酸染色法; BACTEC MGIT960 培养法; 结核分枝杆菌

**【中图分类号】**R 725. 1 **【文献标识码】**A

**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 06. 017

## Diagnosis of tuberculous meningitis in children by modified Ziehl-Neelsen stain

CAO Xiaona ,SHAO Yanxin ,GAO Qing ,SU Yi ,WEI Yuan ,FENG Jianchun

Department of Pediatrics ,The First People's Hospital of Xinji City ,Xinji 052360 ,China

**【Abstract】Objective:** To assess the clinical value of applying modified Ziehl-Neelsen stain to diagnosis of tuberculous meningitis in children. **Methods:** The cerebrospinal fluid( CSF) was detected in 30 cases confirmed clinically as tuberculous meningitis by BACTEC MGIT 960 culture system ,centrifuged smear test and modified Ziehl-Neelsen stain ,respectively and the results were compared for the positive accuracy. **Results:** The positive rate by BACTEC MGIT 960 culture system ,centrifuged smear test and modified Ziehl-Neelsen stain was 13. 3% ( 4/30) ,3. 33% ( 1/30) and 56. 7% ( 17/30) ,respectively and the difference was significant(  $P < 0. 005$ ) . **Conclusion:** The modified Ziehl-Neelsen stain can be more sensitive in rapid diagnosis of tuberculous meningitis in children ,and is worthy of wider clinical recommendation.

**【Key words】** cerebrospinal fluid; modified Ziehl-Neelsen stain; BACTEC MGIT 960 culture system; Mycobacterium tuberculosis

收稿日期: 2015-05-03

作者简介: 曹晓娜( 1981-) ,女,主治医师 ( 电话) 15633037060 ( 电子信箱) jj\_yjy@163. com;

冯建纯,男,主管技师 ( 电子信箱) 68752145@qq. com,通讯作者.

[10] Harvey P ,Roger B D ,Jeffrey K *et al.* Comparison of three remission induction regimens and two postinduction strategies for the treatment of acute nonlymphocytic leukemia: a cancer and leukemia group B study[J]. Blood ,1987 ,69( 5) : 1441 - 1449.

[11] 卞寿庚 ,郝玉书 ,王志澄 ,等. 急性非淋巴细胞白血病强烈化疗 91 例疗效观察[J]. 中华内科杂志 ,1990 ,29( 1) : 22 - 25.

[12] 林茂芳 ,曾波航 ,吴佳丽 ,等. 61 例成人急性非淋巴细胞白血病诱导化疗 HA 和 DA 的比较[J]. 临床血液学杂志 ,1992 ,5( 1) : 1 - 4.

[13] 秘营昌 ,薛艳萍 ,俞文娟 ,等. HA 为基础的三药方案治疗急性髓系白血病疗效分析及与染色体核型的关系[J]. 中华血液学杂志 ,2005 ,12( 26) : 705 - 709.

[14] 米瑞华 ,魏旭东 ,张艳莉 ,等. DEA 与 DHA 两种化疗方案诱导治疗急性髓系白血病疗效比较[J]. 中华血液学杂志 ,2010 ,31( 11) : 767 - 768.

[15] 叶佩佩 ,牧启田 ,陈菲菲 ,等. HAA 方案诱导治疗成人初发急性髓系白血病 236 例疗效观察[J]. 中华血液学杂志 ,2013 ,34( 10) : 825 - 829.

[16] Jin JI ,Wang JX ,Chen FF *et al.* Homoharringtonine-based induction regimens for patients with de-novo acute myeloid leukaemia: a multicentre ,open-label ,randomised ,controlled phase 3 trial [J]. Lancet Oncol ,2013 ,14( 7) : 599 - 608.

[17] O'Brien S ,Kantarjian H ,Keadng M *et al.* Homoharringtonine therapy induces responses in patients chronic myelogenous Leukemia in late chronic phase[J]. Blood ,1995 ,86( 9) : 3322 - 3332.

[18] Zhong LY ,Li QH ,Huang ZL *et al.* Regimen containing perarubicin for the treatment of newly diagnosed young patients with acute myeloid leukemia[J]. Ai Zheng ,2009 ,28( 6) : 619 - 625.

结核性脑膜炎(结脑)是由于结核分枝杆菌(结核菌)侵犯脑膜引起的非化脓性炎症,是最严重的结核病,约占肺外结核病的6%,预后较差,病死率高达15%~30%,误诊率高<sup>[1]</sup>,存活者可遗留不同程度的后遗症,如智力低下和(或)运动障碍等<sup>[2]</sup>。通过抗酸染色或培养在脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中发现结核菌是明确结脑诊断的“金标准”<sup>[3]</sup>。但是离心涂片法的阳性率很低,培养法所需时间一般在4~8周左右,很多患者由于不能及时确诊而延误治疗。在2013年5月~2015年2月期间,我们共对30例临床诊断为结脑的儿童脑脊液标本分别用BACTEC MGIT 960培养法、改良抗酸染色法<sup>[4-5]</sup>、离心涂片法进行检测,探讨改良抗酸染色法对儿童结脑的诊断价值。

## 1 资料与方法

1.1 标本来源 本组30份CSF标本均取自辛集市第一人民医院2013年5月~2015年2月按临床诊断标准<sup>[6]</sup>诊断为结脑的儿童,其中男童17人,女童13人,年龄11个月~14岁,平均(7.8±1.5)岁,按送检先后纳入实验,均为有脑膜刺激征后初次送检的CSF。

1.2 临床特点 30例患者中,浸润型肺结核11例,合并血行播散型肺结核14例,骨结核3例,颈腋下淋巴结结核2例。临床症状以不同程度的发热、恶心、呕吐、盗汗、食欲不振、惊厥、烦躁、瘫痪、颈强直、视力障碍为主要表现,头颅影像学检查异常者29例。

1.3 脑脊液其他检查 颅压升高28例;白细胞数升高并且为以嗜中性粒细胞为主的混合细胞学反应30例;蛋白定量为0.45~2.0 g/L者27例, >2.0 g/L 3例;糖定量<2.5 mmol/L 29例,正常1例;氯化物<120 mmol/L者29例,正常1例。

1.4 材料 玻片离心沉淀仪(Thermo Cytospin4型);BD公司BACTEC MGIT 960全自动结核菌快速鉴定仪;低温离心机;抗酸染色液;培养箱等。

## 1.5 检测方法

1.5.1 BACTEC MGIT 960培养法 取2 mL混匀的无菌CSF加入无菌离心管中,以3000 r/min低温离心15 min,小心将上清液尽量多地倒入含有消毒剂的容器中,加入0.5 mL的PBS混匀。将营养添加剂Growth Supplement倒入杂菌抑制剂PANTA试剂瓶,充分混匀,然后加入到MGIT液体培养管中,每管0.8 mL,最后加入0.5 mL标本进行培养。仪器报告阳性后取出行抗酸染色确认,阴性结果直接

记录。

1.5.2 离心涂片法 取2 mL CSF加入一次性塑料管中,以3000 r/min低温离心15 min,轻轻弃掉上清液,吹打混匀试管底部沉渣进行涂片,火焰固定后,滴加石炭酸复红染液,染色10 min,3%盐酸酒精脱色1 min,美蓝复染0.5 min,水洗,自然干燥,然后用油镜检查并记录结果。详细内容参照《痰涂片镜检质量保证手册》<sup>[7]</sup>。

1.5.3 改良抗酸染色法 取0.5 mL混匀的CSF加入Cytospin-4型玻片离心沉淀仪中,以450 r/min离心5 min(玻片用多聚赖氨酸处理),取出玻片干燥后抗酸染色,油镜镜检。

1.6 统计学方法 分别计算3种方法的阳性率,采用SPSS 15.0统计软件进行分析,阳性率比较采用 $\chi^2$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CSF结核菌培养 30例CSF结核菌培养阳性4例,阳性率13.3%,细菌的初生长时间为28~45 d。CSF的性状与培养阳性率直接相关,4例毛玻璃样混浊的CSF结核菌培养完全阳性。

2.2 改良抗酸染色法与BACTEC MGIT 960培养法、离心涂片法检测结果比较 30例CSF标本中,改良抗酸染色法阳性17例,阳性率56.7%,改良抗酸染色法明显高于BACTEC MGIT 960培养法,差异有统计学意义(配对 $\chi^2 = 11.05, P < 0.005$ ,表1);离心涂片法阳性1例,阳性率3.33%,改良抗酸染色法明显高于离心涂片法,差异有统计学意义(配对 $\chi^2 = 14.07, P < 0.005$ ,表2)。

表1 改良抗酸染色法与BACTEC MGIT 960培养法检测结果比较

改良抗酸染色法	BACTEC MGIT 960 培养法		合计
	+	-	
+	4	13	17
-	0	13	13
合计	4	26	30

表2 改良抗酸染色法与离心涂片法检测结果比较

改良抗酸染色法	离心涂片法		合计
	+	-	
+	1	16	17
-	0	13	13
合计	1	29	30

2.3 预后 根据患儿的年龄、体质量、身体状况、病情严重程度及肝、肾功能,给予 HRZ/HRZS 方案抗结核治疗,同时应用糖皮质激素减少炎性渗出、甘露醇降颅压等对症治疗,30 例患者中有 25 例好转,好转率为 83.3%;3 例因病情危重放弃治疗;另 2 例治疗无效死亡,离心涂片阳性的患者最早死亡。出院 1 年后随访,放弃治疗 3 例均死亡,总病死率为 16.7%。

### 3 讨论

随着结核病疫情的回升,成人结核病的增加引起儿童结核病增多现象十分明显。我国第四次结核流行病学抽样调查显示 0~14 岁儿童结核感染率为 9%,感染人数约为 2608.1 万<sup>[8]</sup>。儿童结脑在小儿结核病中最为严重,由于儿童免疫力低,结脑症状特异性差,诊断困难,易误诊误治,造成不良后果甚至死亡。儿童结脑的早期诊断十分重要,如能早期诊断及合理治疗,则可降低致残率和病死率<sup>[9]</sup>。目前,临床医生主要以 CSF 培养、抗酸染色、免疫学、PCR、常规和生化等检测结果作为结核菌感染的诊断指标,其中病原学检查是诊断的“金标准”,其常用方法是培养法和离心涂片抗酸染色镜检法。

结核菌培养常采用改良罗氏培养法,一般需要 4~8 周,培养周期长,不利于早期诊断,BACTEC MGIT 960 培养法虽较改良罗氏培养法快速,但也在 1 个月左右,由于脑脊液中结核菌数量极小,此法的检出时间未见明显缩短。离心涂片抗酸染色镜检法虽然简便、经济、设备要求低,但是其检出限位 5000~10 000 条/mL 结核菌才能被检出,检出率极低,一般在 0~10%。脑脊液中结核菌有两个特点,数量极少、密度小于水的密度,以致难以通过离心完全沉淀。上述两种方法都用到了离心的步骤,此步骤目的是浓集结核菌,但是在此过程中造成了本来就数量极少的结核菌的进一步丢失,其主要原因有:①结核菌密度小,在静置情况下往上漂浮,很难通过离心使结核菌完全沉淀到管底,在弃掉上清时引起丢失。②巨大离心力使得本来量就很少的结核菌紧紧地贴

在管壁,很难完全吹打下来,在转移的过程中造成丢失。③在抗酸染色的过程中,需要几次水洗,部分结核菌会掉下来。改良抗酸染色法应用了 Cytospin 玻片离心沉淀仪,它有效地克服了离心过程的缺点,在甩片过程中,液体成分被滤纸吸收,结核菌直接沉淀在玻片上,没有弃上清和转移损失的问题,有形成分沉淀面积(直径 6 mm)远远小于涂片法,实现了浓集的目的。改良抗酸染色法设备较简单,价格低,一份标本检测时间只需 30 min。本研究中,此法较 BACTEC MGIT 960 培养法和离心涂片法具有明显的差异性。

综上所述,改良抗酸染色法快速、简便、高效、经济、便捷、诊断儿童结脑阳性率高,有助于早期诊断,值得临床推广应用。

### 【参考文献】

[1] 冯玉麟,刘之荣,张尚福,等. 结核性脑膜炎 129 例的临床与病理[J]. 中华结核与呼吸杂志, 1997, 20(3): 161-163.

[2] Murakami S, Takeno M, Oka H, et al. Diagnosis of tuberculous meningitis due to detection of ESAT-6-specific gamma interferon production in cerebrospinal fluid enzyme-linked immunospot assay [J]. Clin Vaccine Immunol 2008, 15(5): 897-899.

[3] Mathai A, Radhakrishnan VV, George SM. A newer approach for the laboratory diagnosis of tuberculous meningitis [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2001, 39(4): 225-228.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 赵钢, 杜芳. 结核性脑膜炎临床诊断思路 [J]. 中国现代神经疾病杂志, 2013, 13(1): 1-4.

[7] 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.

[8] 全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告 [J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(2): 65-86.

[9] 范永琛. 儿童结核性脑膜炎的早期诊断和鉴别 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84(20): 1743-1744.