

1175 - 1182

- 9 Wang L, Tang M. Puerarin facilitates T - tubule development of murine embryonic stem cell - derived cardiomyocytes [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34 (2) : 383 - 392
- 10 Liu S, Xu C. Puerarin alleviates aggravated sympathoexcitatory response induced by myocardial ischemia via regulating P2X3 receptor in rat superior cervical ganglia [J]. Neurochem Int, 2014, 70 : 39 - 49
- 11 Chen R, Xie M. Puerarin prevents isoprenaline - induced myocardial fibrosis in mice by reduction of myocardial TGF - β 1 expression [J]. J Nutr Biochem, 2012, 23 (9) : 1080 - 1085
- 12 Higashikuni Y, Kato M. Toll - like receptor - 2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin - 1β upregulation via nuclear factor κ B activation [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2 (6) : e000267
- 13 Wang HX, Han QY. NADPH oxidases mediate a cellular "memory" of angiotensin II stress in hypertensive cardiac hypertrophy [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 8 (179) : 897 - 907
- 14 Gutiérrez SH, del Castillo ER. Cardiac role of the transcription factor NF - κ B [J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2008, 8 (2) : 153 - 160
- 15 Gaspar - Pereira S, Townsend PA. The NF - κ B subunit c - Rel stimulates cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. Am J Pathol, 2012, 180 (3) : 929 - 939

(收稿日期:2015 - 01 - 06)

(修回日期:2015 - 01 - 12)

改良抗酸染色法在结核性浆膜炎临床诊断中的价值

郭永博 王 静 张 琳 杨 莉 冯国栋 杨毅宁 代 文 刘婷婷
贺 莹 边 婷 周惠敏 王 新 赵 钢

摘 要 目的 应用改良的抗酸染色法(改良法)对确诊的结核性浆膜炎患者进行回顾性诊断,并与传统的抗酸染色法(传统法)相比较,以评估改良法对结核性浆膜炎的临床诊断价值。**方法** 48例确诊结核性浆膜炎患者的浆膜腔积液同时送检改良法和传统法。其中,胸腔积液33例,腹腔积液15例。全部患者浆膜腔积液均为首次采集,采集时未经抗结核治疗(未治疗)患者28例,已进行抗结核治疗(已治疗)患者20例。**结果** 48例患者改良法和传统法抗酸杆菌检出率分别为58.33%(28/48)和6.25%(3/48),两者差异有统计学意义($P=0.000$);28例未治疗患者改良法抗酸杆菌检出率为71.43%(20/28),显著高于传统法3.57%(1/28, $P=0.000$);已治疗患者改良法抗酸杆菌检出率为40%(8/20),明显低于未治疗患者($P<0.05$)。改良法和传统法阳性标本细胞外均检出抗酸杆菌,改良法检出胞内菌,传统法则均未检出。**结论** 改良法显著提高了抗酸杆菌的检出率。而胞内菌的检出,对于判定细菌的存在则更具特异性。改良法极大地提高了诊断率,对于结核性浆膜炎患者的早期诊断和治疗,具有很高的临床应用价值。

关键词 改良抗酸染色 抗酸杆菌 结核分枝杆菌 浆膜腔积液 结核性浆膜炎

中图分类号 R52 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.020

Clinical Diagnosis Value of the Modified Ziehl - Neelsen Stain in the Tuberculous Serositis Patients Guo Yongbo, Wang Jing, Zhang Lin, et al. Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Shaanxi 710032, China

Abstract Objective To compare modified Ziehl - Neelsen stain (MZN stain) with the conventional Ziehl - Neelsen stain of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) for the detection rate in tuberculous serositis patients and evaluate the diagnostic value of the modified ZN stain. **Methods** Samples of 48 patients diagnosed with Tuberculous serositis were stained by the conventional and modified ZN stain. There were 33 tuberculous pleurisy patients and 15 tuberculous peritonitis ones. Twenty - eight patients did not receive anti - tuberculosis treatment while 20 patients were undergoing treatment at the time of the samples being collected. **Results** Our modified method yielded a 58.33% (28/48) detection rate of *M. tuberculosis*, while the detection rate of the conventional one was 6.25% (3/48) ($P<0.001$). The detection rate were higher with the modified ZN stain than that with conventional one in untreated patients, which were 71.43% (20/28) and 3.57% (1/28, $P<0.001$), respectively. The detection rate of modified method in patients who were undergoing treatment was 40% (8/20) ($P<0.05$), which was obviously lower than that of the untreated patients. The extracellular acid - fast bacilli

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院消化内科(郭永博、王新),神经内科(王静、张琳、冯国栋、杨毅宁、代文、刘婷婷、贺莹、边婷、周惠敏、赵钢),病理科(杨莉)

通讯作者:王新,电子信箱 wangx@fmmu.edu.cn; 赵钢,电子信箱 zhaogang@fmmu.edu.cn

(AFB) could be identified both by modified and conventional method, while the intracellular AFB can be only detected by the modified stain but not the conventional one. **Conclusion** Compared with the conventional ZN stain, the modified one significantly increased the detection rate of *M. tuberculosis* in tuberculous serositis patients, especially the intracellular AFB can be detected by the modified by not conventional ZN stain. Therefore, the modified method would be of tremendous value in improving the diagnosis of tuberculosis.

Key words Modified Ziehl – Neelsen stain; Acid – fast bacilli; *Mycobacterium tuberculosis*; Dropsy of serous cavity; Tuberculous serositis

结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*, MTB) 是引起结核病的病原菌,可侵犯全身各组织器官。随着艾滋病、免疫抑制剂和 MTB 耐药菌株的出现,结核病的发生率大幅上升。MTB 培养是诊断结核病的金标准,但胸(腹)腔积液 MTB 培养阳性率仅 25% ~ 37%,传统的抗酸染色法 (Ziehl – Neelsen stain,传统法) 抗酸杆菌检出率更低,只有 3% ~ 5%,临床误诊、漏诊率高。而且 MTB 培养周期长,也使得患者得不到早期确诊和及时治疗。在脑脊液中建立的一种新的改良抗酸染色方法 (modified Ziehl – Neelsen stain,改良法),不仅快速简便和敏感度高,而且在细胞内、外均可检出抗酸杆菌,特异性高^[1,2]。笔者将此方法应用到结核性浆膜腔积液中,进行回顾性诊断,并与传统法相比较,以评估改良法在结核性浆膜炎临床诊断中的价值。

资料与方法

1. 研究对象:以 2013 年 5 ~ 9 月,第四军医大学西京医院、陕西省结核病院和西安市胸科医院诊断为结核性浆膜炎的住院患者为研究对象,48 例患者均符合全国结核病分类诊断标准,且抗结核治疗有效,并经随访确诊^[3]。全部患者浆膜腔积液均为首次采集,其中胸腔积液 33 例,均为单侧年龄,男性 29 例,女性 4 例,患者年龄 17 ~ 86 岁,平均年龄 48.09 ± 23.16 岁;腹腔积液 15 例,男性 6 例,女性 9 例,患者年龄 19 ~ 77 岁,平均年龄 45.00 ± 19.52 岁。采集时未经抗结核治疗患者 28 例,已进行抗结核治疗患者 20 例:其中治疗 1 ~ 28 天者 10 例,治疗 > 28 天者 10 例(其中 1 例耐药,2 例因肝功能受损未能持续抗结核治疗)。

2. 方法:每例浆膜腔积液标本以“胸(腹)腔积液原因待查”(即盲法)的诊断同时送检改良法和传统法。结核菌染色液购自贝索公司。(1)改良法:载玻片经 3 – 氨丙基 – 3 – 乙氧基甲硅烷工作溶液处理后,晾干,备用。将 0.5ml 浆膜腔积液加入粟氏 FMU 细胞涂片沉淀器中,离心 3 ~ 5min (500 ~ 700r/min),待浆膜腔积液中的有形成分完全沉淀到玻片上后,取下涂片,4% 多聚甲醛固定 15min,水洗、晾干后浸泡于 0.3% Triton – 100 (曲拉通) 溶液 15min,0.1mol/L 磷酸盐缓冲液洗 3 次,晾干^[4]。含 0.3% TritonX – 100 石碳酸复红溶液,染色 5min,水洗;3% 盐酸乙醇脱色 1min,水洗,晾干;碱性亚甲蓝复染 5min,水洗。自然干燥后 10 × 100 倍镜检。(2)传统法:取 5ml 浆膜腔积液离心 15min (3000r/min),取沉淀物涂片,干透后进行 ZN stain,自然干燥后 10 × 100 倍镜检。

3. 结果判定:改良法和传统法所见抗酸杆菌均呈红色,非抗酸杆菌为蓝色。每 100 个视野找见 3 条以上抗酸杆菌者判为阳性。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。改良法与传统法的抗酸杆菌检出率比较,采用 McNemar χ^2 检验;改良法在未治疗患者和已治疗患者中的抗酸杆菌阳性检出率比较,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

48 例结核性浆膜炎患者浆膜腔积液改良法和传统法抗酸杆菌检出率分别为 58.33% (28/48) 和 6.25% (3/48),两者比较差异有统计学意义 ($P = 0.000$,表 1)。

表 1 48 例患者浆膜腔积液改良法与传统法的抗酸杆菌检测结果 (n)

改良法	传统法		合计
	阳性	阴性	
阳性	3	25	28
阴性	0	20	20
合计	3	45	48

28 例未治疗患者浆膜腔积液改良法和传统法的抗酸杆菌检出率分别为 71.43% (20/28) 和 3.57% (1/28),两者比较差异有统计学意义 ($P = 0.000$,表 2)。未治疗和已治疗的患者浆膜腔积液改良法的抗酸杆菌检出率分别为 71.43% (20/28) 和 40.00% (8/20),两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$,表 3)。

表 2 28 例未治疗患者浆膜腔积液改良法和传统法的抗酸杆菌检测结果 (n)

改良法	传统法		合计
	阳性	阴性	
阳性	1	19	20
阴性	0	8	8
合计	1	27	28

随着治疗时间的延长,改良法和传统法抗酸杆菌检出例数均呈下降趋势。但在治疗大于 28 天时间段的 10 例患者中仍有 3 例经改良法检出抗酸杆菌。

表3 未治疗患者与已治疗患者浆膜腔积液改良法的抗酸杆菌检测结果 (n)

治疗情况	改良法		合计
	阳性	阴性	
未治疗	20	8	28
已治疗	8	12	20
合计	28	20	48

改良法和传统法的阳性标本细胞外均检出抗酸杆菌。有22例患者经改良法检出胞内菌,传统法则均未检出。其中淋巴细胞内检出7例,单核细胞内检出7例,嗜中性粒细胞内检出2例,淋巴细胞内和单核细胞内同时检出5例,单核细胞内和嗜中性粒细胞内同时检出1例。

讨 论

结核性胸膜炎和结核性腹膜炎均为常见的结核性浆膜炎,分别占胸(腹)腔积液病因的30%~60%和37.5%。结核性浆膜炎的临床症状不典型,且常与其他原因(如肺炎、肝硬化和肿瘤等)所致的浆膜腔积液鉴别困难。结核性浆膜炎的常规、生化、结核抗体及腺苷脱氢酶等检查皆为间接性辅助诊断;结核感染T细胞斑点试验(TSPOT-TB)和GeneExpert虽有较高的特异性,但前者因浆膜腔积液的淋巴细胞数量较少,达不到检测所需,而常呈阴性,后者因较低的敏感度,极易漏诊^[5,6]。因此,虽然阳性率低,但抗酸染色仍是结核性浆膜炎确诊的主要依据之一。而如何提高抗酸杆菌的检出率,则是人们一直所关注的焦点。

本研究表明,对于结核性浆膜炎患者,改良法抗酸杆菌检出率均明显高于其传统法(P 均=0.000),这与结核性脑膜炎的结果一致^[1,2]。尤其在未治疗患者,改良法的抗酸杆菌检出率达到71.43%,显著高于传统法的3.57%,其优越性不言而喻。结核性浆膜炎诊断率的提高,对于患者的早期诊断和及时治疗都具有十分重要的临床意义。

本研究发现,经过抗结核治疗且病情好转的患者,其抗酸杆菌的检出率明显下降,随着抗结核治疗的时间延长和临床疗效显现,抗酸杆菌的载量有所下降,也验证了改良抗酸染色的敏感性。1例耐药和2例未持续抗结核治疗的患者,改良法亦从其浆膜腔积液中检出了抗酸杆菌,提示本改良法不仅可用于早期诊断,而且在及时反映患者病情变化、监测用药及疗效观察等方面,也具有参考意义。

本研究发现,改良法有22例患者检出胞内菌,传

统法则均未检出。与传统法完全将细胞破坏的方法不同,本改良法采用粟氏FMU细胞涂片沉淀器和特殊处理的载玻片,能够使浆膜腔积液中的细胞完整性得到最大程度的保留,并通过TritonX-100,使胞内菌能够更好地着色。存在于细胞外的抗酸杆菌,常由于形态的不典型,难以与杂质相鉴别。胞内菌的检出,则可以有效地避免与杂质的混淆,对细菌存在的判定更具特异性。

本研究不仅在单核细胞和嗜中性粒细胞内检出抗酸杆菌,也首次在人类浆膜腔积液的淋巴细胞内检测到抗酸杆菌的存在。长期以来,淋巴细胞一直被认定没有吞噬功能。但在对结核性脑膜炎患者脑脊液的研究中,笔者首先发现并检测到CD20⁺B细胞和CD3⁺T淋巴细胞内的抗酸杆菌,只是这些细胞的亚型目前尚不清楚^[1,2]。此外,小鼠腹腔积液中存在B1-B淋巴细胞也具有吞噬和杀灭细菌的作用^[6,7]。

综上所述,改良法无论是在提高抗酸杆菌检出率,还是在增强对抗酸杆菌判定的客观性方面,都比传统法显著和有效。因此,在浆膜腔积液中采用改良法检测抗酸杆菌,对于结核性浆膜炎患者的早期诊断和治疗,具有很高的临床应用价值,且该方法快速、简便易操作,适合在广大的基层医院开展。

参考文献

- Chen P, Shi M, Feng GD, et al. A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying *De Novo* intracellular mycobacterium tuberculosis and improving detection of extracellular *M. Tuberculosis* in cerebrospinal fluid [J]. Clin. Microbiol, 2012, 50(4):1166-1170
- Feng GD, Shi M, Ma L, et al. Diagnostic accuracy of intracellular mycobacterium tuberculosis detection for tuberculous meningitis [J]. Am Respir Crit Care Med, 2014, 189(4):475-481
- 中华医学会临床诊疗指南·结核病分册 [J]. 北京:人民卫生出版社, 2004. 12:11
- 栗秀初, 楼玉珍. 脑脊液细胞玻片离心沉淀仪的改进及其使用价值 [J]. 神经精神疾病杂志, 1981, 7(4):256
- Porcel JM, Palma R, Valdés L, et al. Xpert® MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2013, 17(9):1217-1219
- Gao JX, Ma XY, Gu WJ, et al. Novel function of murine B1 cells: Active phagocytic and microbicidal abilities [J]. Eur J Immunol, 2012, 42:982-992
- Parra D, Rieger AM, Li J, et al. Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to D4⁺ T cells [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2012, 91(4):525-536

(收稿日期:2015-01-19)

(修回日期:2015-01-29)