

用漂淨濃縮及直接塗片法檢查 結核桿菌的比較

田浩泉 傅貴文 邵濟鈞 張廣悅

(山東大學醫學院)

結核病是一種很討厭的慢性傳染病，因此，可靠的早期診斷實在是非常重要的。檢查結核桿菌的方法固然很多，但尚少有理想的；培養或動物接種，不特手續煩複，且費時日。將痰液標本作直接塗片檢查，則檢出率又太低，一般認為每毫升痰液內須含結核桿菌在十萬個以上時，方能找出^[1]；至於一般濃縮法^[2,3]，按 Рубинштейн 氏的意見，在直接塗片法不能檢出的場合下，可以有 20% 以上的陽性結果，惟因沉澱管內痰液的比重較高，雖用每分鐘 5,000 轉速率的離心器，結核桿菌仍不易沉下；蘇聯學者所創用的漂淨法，不特檢出率高，鏡檢時節省時間，且不需要複雜儀器或操作，可以說是最為理想。我們用漂淨、濃縮及直接塗片法檢查了 102 份結核病患者或疑似患者的痰液標本，有系統的作了比較，充分證實了漂淨法的優越性，謹將結果簡單報導，以求正於先進。

材料之搜集和處理

痰液標本均係用無菌容器分別由青島市結核病防治所及山東大學醫學院附設醫院取來。搜集後除用無菌手續進行直接塗片及濃縮外，並按下列步驟作漂淨檢查：

1. 挑選乾酪樣或黃色球狀痰塊約 5 毫升，放入大沉澱管中。
2. 加入等量 0.5% 氫氧化鉀液，用橡皮塞塞緊，以手指按住橡皮塞，用力振盪 3—5 分鐘，然後放入 56—60°C 水浴中 50—60 分鐘（後來根據莫斯科州結核病研究所的經驗^[4]，省去了加熱這一步驟；於振盪後在室溫中放置約 1 小時）。

誌謝：本文承山東大學醫學院馬瑞珍教授及青島市結核病防治所蔣東泉所長之鼓勵和協助，作者等表示衷心謝忱。

3. 用每分鐘 1,000 轉速度遠心沉澱 2 分鐘，使未液化之殘渣(包括膿細胞、上皮細胞、彈力纖維等)沉至管底。

4. 將上清液吸入 500 毫升容量之錐形瓶中，加入蒸餾水至瓶之半量，再加二甲苯 (Xylol) 2 毫升，以橡皮塞塞緊瓶口，用力振盪 20 分鐘。

5. 加蒸餾水至瓶頸 $\frac{2}{3}$ 處，顛倒混和數次，在室溫內靜置 15 分鐘，使泡沫完全上浮。

6. 用毛細吸管將錐形瓶頸處之漂浮物全部吸至一口徑約 10 毫米之細試管中，儘量避免水分之被吸出，將試管在室溫內靜置 15 分鐘。

7. 將清潔玻片放在 65°C 的封口水浴箱的玻璃蓋上，用毛細吸管由漂浮物之上、中、下三層內分別吸取標本，分別在玻片之中央進行塗片，漂浮物係集中塗佈於一點(直徑約 1—1.5 厘米，視漂浮物之混濁度而決定)。待 1 滴乾後，再在原處加上 1 滴，共加 5—10 滴(視漂浮物之粘稠度而定)。

8. 塗片乾燥後，將玻片傾斜，然後滴加醚或 Никифоров 氏的醇醚混合液(醚 1 份加純酒精 1 份) 3—5 滴，使向玻片一端流下，以除去油質；酒精則有固定標本之作用。

9. 按一般抗酸法染色，惟脫色時間通常不超過 30 秒。如 30 秒後退色尚不完全，則用新鮮配製之 5% 亞硫酸鈉溶液代替酸酒精，使完全退色，再用 1% 苦味酸水溶液染色 10 秒鐘作對比。

檢 查 結 果

一共檢查了 102 份結核病患者或疑似患者之痰液標本，這些患者中大多數業經用鏈黴素菸鹼醯肼等藥物治療。直接塗片法之檢出率為 24.5%，濃縮法為 35.29%，漂浮法為 47.05% (見表 1)。漂浮法之檢出率較濃縮法者高 11.76%，而較直接塗片法者高出 22.55%。

表 1 用直接塗片、濃縮及漂浮法檢查結核桿菌的比較

檢 查 方 法		直 接 塗 片 法	濃 縮 法	漂 浮 法
陽	性	25	36	48
陰	性	77	66	54
總	數	102	102	102
檢	出 率	24.5%	35.29%	47.05%

直接塗片或濃縮法，每個玻片上塗抹標本之面積亦使其與漂浮法者相仿，以便比較。直接塗片之面積使約能於 20 分鐘鏡檢完畢；濃縮法者則約於 15 分鐘鏡檢完畢；漂浮法者通常 10 分鐘即可鏡檢完畢。因此 54 份用三種方法檢查均為陰性之標本，用漂浮法亦較其他二法節省時間不少。

我們並抽樣的將 27 份標本用三種方法比較鏡檢所需時間：漂浮法不特檢出率最高，而陽性標本檢出所需時間亦最少，多數情形下無需變動視野即可找到結核桿菌。其檢出所需時間平均為 % 分鐘；濃縮法者為 % 分鐘；而用直接塗片法則需 7.2 分鐘。

在液化痰液時，如果省去了加熱這一步驟，可以節省手續，但常可使液化不完全，因此塗片時雜質較多，鏡檢時不如加熱者之清晰。此外，徐氏^[5]曾建議用 1% 食鹽水代替蒸餾水以減低痰液之粘滯性，並使泡沫較為穩定；同時，因食鹽水之比重較高，有利於結核桿菌的上浮。但我們試驗的結果，並不很理想，塗片乾燥後，有時因有食鹽結晶而妨礙染色和鏡檢，而檢出率並未增高。

我們檢查結果，證實漂浮物上層（油層）中結核桿菌最少，更因無蛋白質吸附之故，在染色時易將細菌沖掉；漂浮物之中層（泡沫層之上部）結核桿菌最多，雜質亦少，染色時細菌不易被沖掉，鏡檢時視野清晰，故最適於塗片；漂浮物之下層（泡沫層之底部）則不特結核桿菌較少，且雜質多，妨礙鏡檢。

按 Pottenger 氏^[6]報告，若用鹼性複紅 12 克、99% 酒精 120 毫升、石碳酸 50 毫升，加蒸餾水至 1,000 毫升配成之染液，可增加結核桿菌之檢出率；我們亦依照該氏之方法，將塗有標本之玻片放於 65°C 封口水浴箱玻蓋上，用上述染液染色 15 分鐘，冷卻 2—3 分鐘，加 3% 鹽酸酒精 30 秒，用 70% 酒精沖洗 10 秒，再加新鮮配製的 5% 亞硫酸鈉溶液使完全退色，水洗後，用 1% 苦味酸水溶液染色 10 秒。結果除因此種染液之滲透力較強，結核桿菌之着色較好外，對檢出率並無影響，這或者與我們檢查的標本數目尚少有關係。

討 論

用漂浮法檢查結核桿菌，係蘇聯學者 Потенжер 氏於 1951 年首先報告，其各個步驟的原理的解釋見徐濤氏的文章^[5]。

本方法應用範圍很廣，凡一切可被液化標本，皆可應用漂浮法，除痰液外，尚可應用於下列標本：（1）尿：可先行用離心器沉澱，然後再進行漂浮。（2）枝

氣管洗液：先麻醉受檢者之喉門，用注射器和導管將生理食鹽水 20 毫升從喉門注入，食鹽水便會自動噴出，可收集噴出液進行漂浮。(3) 胃液：於早晨空腹時抽取胃液，或以生理鹽水洗胃，取洗滌液進行漂浮。根據蘇聯學者們的報告，用本法檢查可疑患者，檢出率比痰液更高，其效果不亞於培養或動物接種，本法對無痰之疑似患者或小兒尤為有用。(4) 脊髓液：如脊髓液中蛋白質與細胞太多，可按痰液方法辦理，否則可直接進行漂浮。(5) 糞便：取膿液部分液化漂浮，或將粘液狀物加等量飽和食鹽水，攪拌均勻，靜置 5—10 分鐘，使結核桿菌等上浮，然後取上層液再進行漂浮。(6) 滲出液：體腔滲出液含蛋白質較多，故一般應照痰液方法處理。(7) 牛羊奶：Дрябина 氏^[7]用漂浮法檢查沒有結核病症狀而結核菌素試驗陽性之乳牛乳樣品 92 份，8 例找出結核桿菌，此 8 例再用一般濃縮法加以檢查，僅 2 例陽性。Дрябина 氏所用方法係將牛乳樣品 50 毫升，加入等量 0.5% 氫氧化鉀液，振盪混和，置 56—60°C 水浴中半小時，取出冷卻後，加入 0.5—1 毫升二甲苯及 60—80 毫升蒸餾水，用橡皮塞塞緊瓶口，小心振盪 10 分鐘，乃將混合液傾入一狹口頸之玻瓶中，在室溫中靜置 45—60 分鐘，再按痰液方法進行塗片和染色。

錯誤的防範：欲使檢查結果準確可靠，必須避免錯誤的發生，除了嚴格遵守操作方法外，還應注意下列事項：(1) 在進行漂浮法時不得以自來水代替蒸餾水，尤其是放置較久的自來水，往往可含有腐物寄生性抗酸菌，在形態上很難和結核桿菌相區別。Клебанова 氏^[8]曾由自來水管採取 42 份水樣，用漂浮法檢查，全部發現有抗酸菌，17 份水樣並用漂浮法所得之泡沫層材料作培養，有 10 份分離出純菌，復經動物試驗證明為腐物寄生性抗酸菌。(2) 一切操作應按無菌方法辦理。用過玻璃器皿須高壓滅菌，再在清潔液內浸泡 24 小時，然後取出用水沖洗，用肥皂以試管刷洗淨，復用水沖洗，最後用蒸餾水沖洗，務使徹底清除前次檢查時偶而膠着在器皿上的結核菌以及用自來水洗刷時落入器皿中的腐物寄生性抗酸菌。玻片最好用新的，因復紅染液每易留於舊玻片之劃痕中，致誤認為結核桿菌。用過的橡皮塞或胃管等經滅菌後，亦應用肥皂和刷子洗刷，用自來水沖洗後也必須再用蒸餾水清洗，勿使有抗酸菌附着。Клебанова 氏^[8]用漂浮法檢查蒸餾水，34 次用徹底清洗之器皿，都未發現抗酸菌，另 36 次用一般清洗之器皿，結果有 33 次找到了抗酸菌。(3) 在判斷結果時，應想到正常人體可有腐物寄生性抗酸菌之存在，這種可能性在尿、胃液或耳內排出液的檢查時較痰為多

見，因此在非典型病例，應加作培養或動物接種。(4) 結核桿菌固然可從肺部活動性或非活動性病灶由痰吞嚥入胃，但肺部以外結核病變內之菌，亦可循淋巴徑路而進入胃內^[9]；因此在洗胃液中發現結核桿菌，僅能證實機體內有結核感染存在，而不能據以確定病變之部位以及活動性。(5) 操作中的一些細節亦應注意；例如：1. 染色或脫色時切忌將塗片放入染色缸內，因為假使有結核桿菌從塗片脫落而浮游於染色缸液體內，乃可粘附於陰性塗片上。2. 沖洗塗片以用蒸餾水為宜。3. 如用吸墨紙吸乾塗片，則每張紙祇可應用 1 次，以免將結核菌帶到第 2 張塗片上。4. 於塗片上滴加顯微鏡油時，不可使玻棒觸及塗片，否則易將菌帶入油瓶內。5. 每次檢查帶有結核桿菌的塗片後，應用拭鏡紙揩抹油鏡頭，再進行檢查第 2 片。6. 蒸餾水應盛裝於清潔玻璃容器內，以免腐物寄生性抗酸菌之污染，必要時應用漂浮法檢查所用之蒸餾水，作為對照。

總 結

用漂浮法檢查結核桿菌，不特應用範圍廣，且不需要複雜儀器和手續，故任何簡單實驗室均可日常應用。

漂浮法也和其他直接檢查方法一樣，不能將結核桿菌和其他抗酸性桿菌相區別，但如結合患者的症狀以及結核菌素試驗陽性等情形，按蘇聯學者 Дрябина 氏等之意見，認為可以證明在顯微鏡下所見者為結核桿菌。

作者等將漂浮、濃縮及直接塗片法作了有系統的比較，共檢查了 102 份痰液標本，充份證實了漂浮法的優越性。

參 考 文 獻

- [1] Jordan, E. C. Textbook of bacteriology. 1947, p. 580.
- [2] 謝少文、周輯五：林氏細菌學檢查法。北京健康書店，1951，73 頁。
- [3] 于復新：實驗診斷學。華東醫務生活社，1952，126 頁。
- [4] 轉引姚家祥：介紹蘇聯常用的結核桿菌濃縮法。中級醫刊，1954 年 3 月，56 頁。
- [5] 徐濤：結核桿菌浮游濃集法之原理及應用範圍。中華結核病科雜誌，1954 年 1 月，30 頁。
- [6] 張華基：實驗診斷學。杭州新醫書局，1952 年，244 頁。
- [7] 轉引許邦憲譯：用漂浮法查驗牛乳中的結核桿菌感染。蘇聯醫學 33 頁，上海時代出版社，1952 年 11 月。
- [8] Клебанова, А. А. и Скрубина, Л. Е. Возможные Ошибки при Исследовании Методом Флотации, Проблемы Туберкулеза, 1953, 6, стр 63.
- [9] 轉引陳鏘露：現代結核病實驗室診斷方法。蘇聯醫學，1953 年 2 月，10 頁。

A COMPARATIVE STUDY OF THE FLOATATION METHOD AND THE DIRECT SMEAR METHOD FOR THE DETECTION OF TUBERCLE BACILLI

TIEN, H. C., FU, K. W., SHAO, C. C. AND CHANG, K. Y.

Department of Bacteriology, Shantung University Medical College

Floation method has been found to be simple and widely applicable to a variety of specimens for the detection of tubercle bacilli in clinical materials. In the present comparative study, 102 specimens of sputa were examined when the floatation method has been found to give the highest percentage of positive findings as well as a great economy of time in the search of the organisms under the microscope. Although the method shared with most microscopic methods in its failure to differentiate pathogenic mycobacteria from the saprophytic forms, if the clinical data are carefully analysed, a preliminary report is justified.