

• 仪器使用与排障 •

某型全自动尿液分析仪在门诊患者尿路感染快速诊断中的应用

钟日辉¹, 黄松音^{1△}, 李文静²

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院检验科, 广州 510120; 2. 广州医学院检验系 2005 级 510180)

摘要:目的 探讨 Sysmex UF-1000i 全自动尿液分析仪(简称 UF-1000i 分析仪)细菌计数的准确度及在门诊患者尿路感染诊断中的价值。方法 测定仪器的重复性、线性、携带污染率;取疑为尿路感染门诊患者新鲜尿液标本 105 份,用 UF-1000i 分析仪测定,结合干化学结果,与尿细菌培养结果分析比较。结果 仪器的重复性、线性、携带污染率均在要求的范围内,UF-1000i 分析仪细菌计数与尿细菌培养结果,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结合尿液白细胞计数,与培养结果符合率达到 94.4%。结论 应用 UF-1000i 分析仪进行尿液细菌计数结合白细胞计数结果,可用于尿路感染快速诊断,但不能完全取代尿细菌培养法。

关键词: 集落计数;微生物; 泌尿道感染; 线性; 重复性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1425-02

尿路感染症(urinary tract infection, UTI)是临床常见感染性疾病,如果诊断延误,则有导致败血症的可能。UTI 的诊断有必要以排尿痛和尿频等临床症状为基础,通过尿检证明脓尿和细菌(尿培养法细菌数大于或等于 10^5 cfu/mL)的存在^[1]。尿细菌培养法是采用定量接种环在琼脂培养基上涂布定量尿标本,经过 1~3 d 培养,鉴定细菌种类和计算菌落数量来协助诊断。尿细菌培养法无法实现快速诊断;此外由于抗生素的广泛应用以及尿路感染患者在发病初期可能已应用抗生素治疗,导致部分 UTI 患者尿液培养细菌计数小于 10^5 cfu/mL 或无菌生长,对疾病的准确诊断造成一定的困扰。显微镜下确认细菌存在的革兰染色法,能够迅速获得有无细菌的判断结果,但该方法受到操作者技术水平的制约,无法定量,且涂片较难固定,漏检概率高^[2]。

日本 Sysmex 公司 UF-1000i 全自动尿液分析仪采用侧向散射光的检测和细菌专用通道,对尿中细菌各种细胞等有形成分进行核酸荧光染色和检测。为了给细菌进行特异性染色,该分析仪做了以下特别设计:对于染色液,使用了可与菌体内的核酸成分结合的 Sysmex 公司独有的荧光色素;对于稀释液,改进了试剂组成,使原来与微小细菌难以辨别的尿中微小黏液成分和尿中细胞的微小片段等所谓的“夹杂物”的影响减轻,所以能够检测微小细菌并准确计数^[3]。本研究对 UF1000i 细菌计数与培养结果进行比较分析,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 采集自中山大学孙逸仙纪念医院南院门诊可疑 UTI 患者的中段尿标本。

1.1.2 仪器和试剂 日本 Sysmex 公司 UF-1000i 全自动尿沉渣分析及配套试剂(包括质控品);尿干化学分析仪 Clinitek 500;江门凯林血平板与麦康凯平板;5 μ L 定量加样枪,5 μ L 定量接种环;革兰染液;无菌生理盐水。

1.1.3 质控菌株 选取大肠埃希菌标准菌株 ATCC25922 作为质控菌株。

1.2 方法

1.2.1 线性分析 取 UF-1000i 细菌计数大于或等于 10^6 /mL 的门诊患者新鲜尿液标本分别按 1:2、1:5、1:10、1:25、

1:50、1:100 的比例用正常尿液上清液进行稀释。每个稀释度测定 3 次,取均值为检测值,将检测值与期望值作比较,进行线性回归相关分析^[4]。判断依据与线性标准为 b 值在 (1 ± 0.05) 范围内,相关系数 $r \geq 0.975$, $r^2 \geq 0.95$ 。

1.2.2 携带污染率分析 分别配制高值和低值菌液,先连续测定高值样本 3 次(结果为 H1、H2、H3),随即测定低值样本 3 次(结果为 L1、L2、L3),按公式携带污染率(%) = $(L1 - L3) / (H3 - L3) \times 100\%$,进行计算。判断依据与标准参照 Sysmex 仪器说明书,即携带污染率小于 0.05%。

1.2.3 重复性分析

1.2.3.1 批内精密度($CV_{批内}$ %) 配制新鲜菌液,充分混匀后连续作 20 次手动检测。判断依据与标准参照 Sysmex 仪器说明书即精密度($CV\%$)为 $\pm 20.0\%$ 。

1.2.3.2 批间精密度($CV_{批间}$ %) 用 UF-1000i 高、低两个水平质控品,按照仪器说明书要求分别充分混匀后检测,连续测定 20 d。判断依据与标准参照 Sysmex 仪器说明书,即 $CV\%$ 为 $\pm 20.0\%$ 。

1.2.4 患者标本检测

1.2.4.1 UF1000i 细菌计数 标本应用 UF-1000i 分析仪进行细菌定量计数。所有标本均在 30 min 内完成。

1.2.4.2 细菌培养和菌种鉴定 上机检测同时,取充分混匀的尿液 5 μ L 接种血平板和麦康凯平板,置 $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 温箱内培养 18~24 h,培养结果阳性的进一步鉴定细菌种类。

1.2.4.3 革兰染色镜检 采用非离心涂片法进行革兰染色镜检。

1.2.4.4 尿路感染诊断标准 参照文献^[1-2]。

1.2.4.5 仪器结果阳性判断标准 尿干化学分析仪 Clinitek 500 亚硝酸盐试验(NIT)阳性;UF-1000i 分析仪: $BACT \geq 10^5/\text{mL}$, $WBC \geq 26/\mu\text{L}$ ^[5]。

1.3 统计学处理 UF-1000i 分析仪细菌计数线性范围分析采用线性回归,计算 $Y = bX + a$;重复性分析为计算 $CV\%$,并与说明书的要求进行比较;患者标本数据用 χ^2 检验进行比较分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

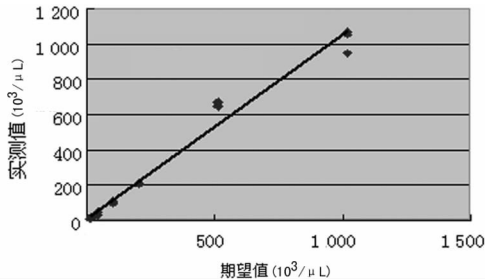
2 结果

2.1 线性分析 结果见图 1。

△ 通讯作者, E-mail:hsongyin@126.com。

2.2 携带污染率 L1、L2、H3 检测结果分别为 0.8、0.0、1 874.3 μL , 计算携带污染率为 0.043%。

2.3 重复性分析 对同一标本进行 20 次重复检测, 均值为 274 μL , 标准差为 0.147/ μL , $CV_{\text{批内}}\%$ 为 5.3。批间精密度分析结果见表 1。



$Y=1.044\ 4X+8.834\ 9, r^2=0.977\ 6, b=1.044\ 4$, 相关系数 $r=0.988\ 7, r^2=0.977\ 6$, 符合 b 值在 (1 ± 0.05) 范围内、 $r\geq0.975, r^2\geq0.95$ 的要求。

图 1 UF-1000i 分析仪线性分析结果

表 1 UF-1000i 分析仪 $CV_{\text{批间}}\%$ 分析结果

质控品	平均值(μL)	标准差(μL)	$CV_{\text{批间}}\%$
高值	740.69	32.085	4.33
低值	188.41	17.306	9.19

2.4 UF-1000i 分析仪细菌计数和尿细菌培养法结果比较 对 105 份患者尿标本进行测定, UF-1000i 分析仪阳性率为 98.1%, 细菌计数均在 $10^5/\text{mL}$ 以上; 36 例符合尿路感染标准, 阳性率为 34.3%; 其余 69 例培养结果是菌落计数小于 $10^5/\text{mL}$, 或至少 2 种细菌生长; 尿细菌培养阳性结果为杆菌 91.4%, 球菌 8.6%, 与 UF-1000i 分析仪散点图判断显示基本一致。NIT 阳性 16 例, 占总例数的 15.2%, 占平板培养阳性的 44.4%; 73 例 $WBC\geq26/\mu\text{L}$, 占 69.5%; 尿细菌培养阳性中 WBC 阳性占 94.4%, WBC 和 NIT 均阳性占培养阳性 44.4%; 女性标本占总例数的 92.4%, 占平板培养阳性的 88.2%。UF-1000i 分析仪细菌计数和尿细菌培养两种方法的比较结果见表 2。

表 2 UF-1000i 分析仪与尿细菌培养结果比较*

	阳性例数	阴性例数	合计
UF-1000i 计数	105	0	105
平板培养结果	36	69	105
合计	141	69	210

*: χ^2 检验显示, 两种方法的阳性率比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.5 革兰染色镜检结果 UF-1000i 分析仪细菌计数达到 $10^6/\text{mL}$ 以上的标本中只有 10% 能在高倍镜下找到细菌; UF-1000i 分析仪计数小于 $10^6/\text{mL}$ 的标本, 均未能能在高倍镜下找到细菌。

3 讨 论

中华中医药学会日前发布的 2009 年公众尿路健康调查结果显示, UTI 是泌尿系统疾病中最为常见的一种, 约 50% 的女性至少患过 1 次泌尿系统感染, 20% 的女性则有多重感染。UF-1000i 分析仪采用红色半导体激光流式细胞测量技术和特

异性核酸荧光染色, 具有红细胞、白细胞等有形成分检测通道和尿中细菌检测专用通道。在专用细菌通道中, UF II SEARCH(BAC)Polymethine 染料和含有阳离子表面活性剂的酸性高渗缓冲液可去除所有含有亚硝酸的残留物, 并对细菌进行特异性核酸荧光染色; 辅助色素乙烯乙二醇溶媒则是非特异性染色抑制剂, 能抑制除细菌外其他杂质颗粒的非特异性染色, 因此能够以较高的精度检测微小细菌并计数, 有助于对可疑 UTI 患者的早期监测。

本研究中, 笔者验证了 UF-1000i 分析仪细菌测定的线性、重复性、批内精密度、批间精密度和携带污染率, 上述指标均符合仪器或质控品说明书要求。

本研究表明, 门诊患者新鲜中段尿标本 UF-1000i 细菌计数与尿细菌培养结果差异有统计学意义。在 105 份怀疑 UTI 的门诊患者尿标本中, UF-1000i 分析仪细菌计数均在 $10^5/\text{mL}$ 以上, 而传统平板接种培养结果符合 UTI 诊断标准的仅有 36 例, 阳性率为 34.3%。尿细菌培养受诸多因素影响, 导致培养阳性率较实际低, 如培养基的种类、质量对培养结果都有很大的影响。高尿酸浓度、pH 失常 (pH 在 5.0 以下或 8.5 以上)、使用药物等均抑制细菌的繁殖, 使培养细菌数减少, 而且可能会变成 L 型细菌^[6]。L 型细菌胞膜内因蛋白质含量较高导致渗透压高于胞膜外而引起形态变异, 培养中需要一定的高渗环境才能保持一定的细菌形态, 而普通平板不能培养出 L 型细菌, 导致常规尿培养检出率受限。UF-1000i 分析仪细菌计数包括活菌和失活菌, 而尿培养只能计数活菌数; 或是培养过程中细菌在琼脂培养基上可能为“静菌”, 不发育, 即正处于所谓的“不能培养状态”^[7], 也是尿培养与 UF-1000i 分析仪检测结果有差异的原因。

细菌散点图的分布可以粗略反映尿液中的细菌偏向球菌或杆菌, 其细菌通道通过前向角散射光强度 (FSC)、前向角散射光宽度 (FSCW)、荧光强度 (FLH) 对细菌进行检测^[8]。UF-1000i 分析仪不能区分污染菌和感染菌, 但通过散点图可以判断是单一菌, 还是复合菌; 是杆菌, 还是球菌。结合白细胞计数及 NIT 的结果进行综合分析, 有利于 UTI 的诊断。本研究中, 尿细菌培养阳性结果为杆菌的占 91.4%, 8.6% 为球菌, 与 UF-1000i 分析仪散点图判断显示基本一致。

白细胞分析阳性 ($\geq26/\mu\text{L}$) 对判断泌尿系统感染有重要意义。本研究中, 105 份门诊患者尿液, 共发现 73 例 (69.5%) 白细胞数至少为 $26/\mu\text{L}$, 尿细菌培养阳性标本中白细胞达阳性标准的占 94.4%; 73 例白细胞分析阳性标本中, 37 例 UF1000i 分析仪细菌计数也达到或超过 $10^5/\text{mL}$, 但尿细菌培养结果为至少 2 种菌生长, 数量也少于 $10^5/\text{mL}$, 此结果提示中段尿中的菌可能是污染菌, 也可能是非感染性肾病^[9], 不能满足诊断 UTI 的要求。

NIT 阳性也是支持 UTI 的一个辅助诊断指标^[10]。在 105 份尿液标本中, 16 例 NIT 阳性, 与尿细菌培养结果符合率达 100%, 占尿细菌培养阳性标本的 44.4%。目前临床多认为 NIT 阳性为诊断泌尿系统细菌感染的特异性指标, 但阳性率较低, 且 NIT 结果受细菌种类、体内硝酸盐含量、尿液膀胱内滞留时间及药物影响。

UF-1000i 分析仪操作简单、快速, 对尿细菌检测无主观因素干扰, 有较好的重复性和敏感性, 为临床检 (下转第 1435 页)

统计学意义($\chi^2=1.44, P=0.23$), 见表 3。

表 3 治疗前 HBeAg 与 YMDD 变异的关系(n)			
组别	n	HBeAg(+)	HBeAg(-)
YMDD 变异组	50	21*	29*
YMDD 未变异组	50	27	23

*: $P>0.05$, 与 YMDD 未变异组比较。

3 讨 论

拉米夫定是目前广泛用于抗 HBV 的药物, 但长期应用使 HBV 对拉米夫定产生耐药突变已成为突出问题。YMDD 变异是 HBV 对拉米夫定耐药的主要原因, 研究其相关因素对病情监测、药物疗效评价及进一步治疗方案的确定具有重要的临床价值。

目前, YMDD 变异与拉米夫定治疗前 HBV DNA 水平的相关性研究, 国内外已有报道, 但结论却不一致。早期可能与病例选择缺乏严格的对照有关, 有学者报道认为病毒载量与 YMDD 变异的产生无关, 但更多的学者提出病毒载量与 YMDD 变异的产生显著相关, HBV DNA 水平越高, YMDD 变异的产生率越高^[7-8]。本研究结果亦显示, YMDD 变异组治疗前病毒载量水平高于 YMDD 未变异组, 两者间差异有统计学意义($t=2.245, P<0.05$), 高滴度的 HBV DNA 水平可能是导致 YMDD 变异的相关因素。

本研究通过对 YMDD 变异与拉米夫定治疗前 ALT 水平和 HBeAg 状态的关系研究发现, 服用拉米夫定前 ALT 水平较低者(ALT<2ULN)发生 YMDD 变异的比例相对较高, 而治疗前 ALT 较高时(ALT>5ULN)发生变异的比例相对较低, 但两者在统计学上尚无差异, 可能和本组病例数较少有关。虽然 HBeAg 是病毒复制的指标, 但亦未发现 YMDD 变异与

HBeAg 有关, 与谢琴秀等^[9]的报道相似。

参考文献

[1] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease[J]. N Engl J Med, 2004, 351(10): 1521-1531.

[2] DiMarco V, Marzano A, Lampertico P, et al. Clinical outcome of HBeAg-negative chronic hepatitis B in relation to virological response to lamivudine[J]. Hepatology, 2004, 40(5): 883-891.

[3] 张照华, 孟红. 乙型肝炎病毒 YMDD 变异研究进展[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2008, 2(1): 64-66.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(3): 324-329.

[5] 商庆华, 徐传镇, 卓海龙, 等. 脑组织乙型肝炎病毒感染与病毒载量的关系[J]. 中华传染病杂志, 2004, 22(1): 55-57.

[6] 刘传苗, 张欣欣, 张东华, 等. 实时荧光聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒聚合酶基因变异[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(1): 37-39.

[7] Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, et al. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan[J]. Intervirology, 2003, 46(2): 182-189.

[8] Yuen MF, Sablon E, Hui CK, et al. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy[J]. Hepatology, 2001, 34(8): 785-791.

[9] 谢琴秀, 许家璋, 郜玉峰, 等. 拉米夫定治疗后发生 YMDD 变异的相关因素分析[J]. 中华传染病杂志, 2005, 23(3): 314-317.

(收稿日期: 2011-04-13)

(上接第 1426 页)

验提供了方便、快捷的检验模式, 可以作为 UTI 初筛检查。由于影响因素较多, 不能成为单一的诊断标准, 但结合仪器白细胞检测结果, 与培养法的符合率可达 94.4%。临床可根据 UF1000i 分析仪细菌和细胞计数、尿干化学检查结果和患者临床表现, 进行快速综合判断, 尽管不能完全代替传统细菌培养, 但可尽量避免误判、漏判; 对尿细菌培养为阴性而疑为 UTI 的患者, 可通过 UF-1000i 分析仪多个参数联合判断, 做出正确的诊断。UF-1000i 分析仪尿液检测结果也可疗效的动态观察。

参考文献

[1] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008, 528-532.

[2] 李光辉. 尿路感染的诊断与治疗[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2001, 1(1): 58-60.

[3] Okata H, Horie S, Kawashima Y. The basic performance of bacteria counting for diagnosis of urinary tract infection using the fully automated urine particle analyzer UF-1000i[J]. Sysmex J, 2007,

17(2): 95-103.

[4] 赖利华, 邓济, 彭楷, 等. Sysmex UF-1000i 尿液有形成分分析仪的性能评价[J]. 重庆医学, 2009, 38(19): 2404-2408.

[5] 齐杰, 潘健, 韩江, 等. 尿流式有形成分及干化学分析在尿路感染诊断中的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 630-634.

[6] 吴向军, 梁红春, 郭春玲. 尿路感染患者中细菌 L 型培养的意义[J]. 中国微生态学杂志, 2008, 20(6): 601-602.

[7] Anderson M, Bollinger D, Hagler A, et al. Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 753-758.

[8] 范云蓉, 甘超, 漆涌, 等. UF-1000i 全自动尿有形成分分析仪对尿路感染的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6): 635-638.

[9] 管娜, 丁洁. 白细胞尿与非泌尿系感染性肾脏疾病[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(12): 1084-1086.

[10] 孙占芹. 亚硝酸盐阳性在尿液分析中的意义[J]. 中国实用医药, 2009, 4(11): 79-80.

(收稿日期: 2011-04-13)