

其中镜检是 IFD 实验室检查中最简单、直接与实用的诊断方法。无菌部位标本镜检阳性,可诊断为真菌感染,但检出率较低,阴性结果不能排除诊断。痰等带菌标本只有镜检发现大量菌丝或假菌丝才有诊断意义。培养是 IFD 实验室检查的经典方法,若来源于无菌部位的标本有真菌生长,即可确定为真菌侵袭性感染。但对痰、脓液、粪便等标本真菌培养阳性则应谨慎判断,不能简单地视为 IFD 或者污染,必须密切结合临床做出诊断^[8]。

不过,痰培养虽然操作方便,但易受抗菌剂使用、菌群失调等相关因素的影响,所用时间也较长(1~2 周)。为实现真菌感染的早发现、早治疗,本研究用前期建立的 PCR 法对 194 份痰标本进行扩增,并与痰培养和培养后 PCR 做比较,结果发现直接 PCR 法具有更高的敏感性,检测更为快速(约 4 h)、方便,而且通过对 PCR 产物测序可以实现真菌种属的鉴定。由于不同真菌的耐药有所差异,所以种属鉴定有助于临床实现 IFD 的个性化治疗,促进患者的预后,并有利于节约卫生资源。为了避免假阳性,作者对标本的采集、运送、分析全过程进行了控制,防止外界真菌的污染。同时在检测过程中,设置了内对照,扩增人 GAPDH 基因,以提示标本采集处理不当或存在扩增抑制现象,避免假阴性发生,确保检测结果的准确性和可靠性。不过,本方法仅进行真菌定性检测,无法鉴别真菌定植与侵袭性感染。在多数情况下,条件致病真菌仅在合适的部位定植而不引起感染,但当机体的抵抗力下降、菌群失调或天然屏障结构破坏,定植真菌会引起侵袭性感染,并导致严重的临床后果。可见,定植真菌的检测对危重患者也能起到一定的预警作用^[5]。

总之,虽然 PCR 检测无法鉴别真菌定植与感染,至今还未被批准用于侵袭性真菌病的临床诊断,但由于该方法具有高度的灵敏性和特异性^[10-11],建议将 PCR 法与其他检测方法联合应用,同时结合患者临床症状及影像学特征,以提高 IFD 的确诊率,减少经验性用药或非必要的预防性用药^[12]。

参考文献

[1] Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ

transplantation; interim results of a prospective multicenter surveillance program[J]. *Med Mycol*, 2005, 43(Suppl 1): 49-58.

[2] 廖万青. 侵袭性真菌感染的实验室诊断[J]. *检验医学*, 2010, 7(25): 503-506.

[3] Maertens J, Meersseman W, Van Bleyenbergh P. New therapies for fungal pneumonia[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2009, 22(2): 183-190.

[4] Andrew MB, Christopher JL, Sarah JM, et al. Molecular identification of pathogenic fungi[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(Suppl 1): i7-i12.

[5] Lau A, Chen S, Sleiman S, Sorrell T, et al. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology[J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(9): 1185-1222.

[6] Khot PD, Ko DL, Fredricks DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons development of broad-range fungal PCR assay[J]. , 2009, 75(6): 1159-1165.

[7] 曹国君, 赵筑, 彭奕冰, 等. 真菌基因组 DNA 的提取和通用 PCR 检测方法的建立[J]. *检验医学*, 2011, 26(11): 773-778.

[8] 廖万清, 陈敏. 侵袭性真菌病的诊断: 现状与展望[J]. *菌物学报*, 2011, 30(1): 5-11.

[9] 武建国. 关注侵袭性真菌感染的实验诊断[J]. *临床检验医学*, 2010, 28(2): 87-89.

[10] Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2009, 7(10): 1201-1221.

[11] Khot PD, Ko DL, Hackman RC, et al. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid[J]. *BMC Infect Dis*, 2008, 29(8): 73.

[12] Suarez F, Lortholary O, Buland S, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(11): 3772-3777.

(收稿日期: 2012-02-01)

• 检验技术与方法 •

UF-500i 全自动尿沉渣分析仪在细菌计数中应用的探讨

万 芳, 杜利军, 陈 恒, 钟翠雯
(同江医院检验科, 广东佛山 528300)

摘要:目的 评价 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数的性能。方法 将大肠埃希菌用生理盐水倍比稀释成理论细菌浓度分别为 9 000、5 400、2 700、1 350、675、337.5、168.75 CFU/μL, 用培养法验证配制菌液的实际浓度。同样的方法配制大肠埃希菌与表皮葡萄球菌及大肠埃希菌、表皮葡萄球菌(1:1)混合菌液, 用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数。比较理论浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果的差异。结果 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪测定大肠埃希菌、表皮葡萄球菌及大肠埃希菌与表皮葡萄球菌混合菌液细菌计数结果远低于理论浓度。结论 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪用于细菌计数时, 由于细菌的聚集性, 对于泌尿系感染常见细菌, 所测定的细菌个数远低于实际细菌数。

关键词:全自动尿沉渣分析仪; 细胞培养技术; 细菌计数

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1636-02

以流式细胞术为基本原理的自动分析仪来对尿液进行细菌计数, 具有简单、快速、不需离心、重复性好和准确性高等优点, 成为辅助诊断尿路感染的较好的过筛方法。Sysmex 新推

出的 UF-500/1000i 尿沉渣分析仪系列, 增配了细菌专用通道, 对于细菌的分辨有更强的准确性与特异性。为了解 UF-500i 尿沉渣分析仪细菌计数的特点, 作以下相关研究。

1 材料与方 法

1.1 材料 用于配制菌悬液的细菌均来自本院检验科微生物实验室分离鉴定的临床阳性标本。

1.2 仪器与试剂 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪及配套试剂(包括质控品)来自日本希森美康医用电子有限公司;血平板与麦康凯平板由安图生工有限公司提供;Phoenix100 全自动微生物鉴定仪(美国 BD 公司)及配套试剂;PhoenixSpec™ 比浊计(美国 BD 公司);Proline 单道可调移液器。

1.3 方 法

1.3.1 菌悬液的配制及菌液浓度的验证 用生理盐水配制 0.15 麦氏浓度大肠埃希菌液(0.5 麦氏浓度菌液理论上应该有 1.5×10^8 CFU/mL),用生理盐水倍比稀释,分别配制 9 000、5 400、2 700、1 350、675、337.5、168.75 CFU/ μ L 的理论菌液浓度。将不同浓度的菌悬液用生理盐水作 200 倍稀释,混匀,取 5 μ L 稀释好的菌液接种于血平皿培养 18~24 h 作细菌计数,每个浓度接种 3 块平皿,计算菌落个数时取平均值。分析理论菌数与培养菌落个数之间的关系。

1.3.2 细菌培养与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结

果的相关性分析 将 1.3.1 所配制的 9 000、5 400、2 700、1 350、675、337.5、168.75 CFU/ μ L 浓度菌液,用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪作细菌计数(分别测定 3 次,求均值),记录检测结果并分析理论浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数相关性。

1.3.3 不同菌种理论浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数相关性分析 用 PhoenixSpec™ 比浊计配制 3 份不同菌种 0.15 麦氏浓度的菌液,本次实验选择大肠埃希菌、表皮葡萄球菌及表皮葡萄球菌与大肠埃希菌(1:1)混合菌悬液,按 1.3.2 步骤,分析 3 种菌液理论浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数之间的关系。

2 结 果

2.1 理论细菌浓度与培养细菌浓度的相关性分析 理论细菌浓度为 9 000、5 400、2 700、1 350、675、33.5、168.75 CFU/ μ L 时,培养为 8 040、5 320、2 520、1 340、640、260、160 CFU/ μ L,以理论细菌浓度为 X 轴,培养细菌浓度为 Y 轴,绘制相关性直线,相关系数 r 为 0.998,相关性见图 1。

表 1 理论细菌浓度与 3 种菌悬液 UF-500i 细菌计数结果(CFU/ μ L)

UF-500i 细菌计数	理论细菌浓度						
	9 000	5 400	2 700	1 350	675	337.5	168.75
大肠埃希菌	741.7 \pm 50.4	357.7 \pm 54.3	173.9 \pm 24.4	81.8 \pm 4.0	43.6 \pm 17.2	23.8 \pm 5.6	12.2 \pm 2.5
表皮葡萄球菌	99.0 \pm 8.0	82.8 \pm 10	29.8 \pm 4	15.2 \pm 4	7.2 \pm 0.6	4.9 \pm 4.4	4.6 \pm 3.3
混合菌	226.5 \pm 30.3	155.6 \pm 12.6	71.4 \pm 8.1	33.1 \pm 3.2	21.2 \pm 6.4	11.2 \pm 4.2	4.2 \pm 1.5

方差齐性检验, $P > 0.05$, 3 个样本组方差齐同;单因素方差分析, $P < 0.05$, 认为 3 样本总体均数差异有统计学意义。

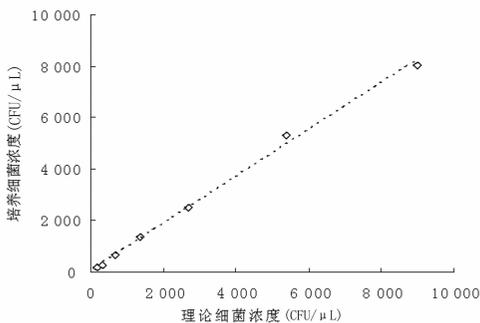
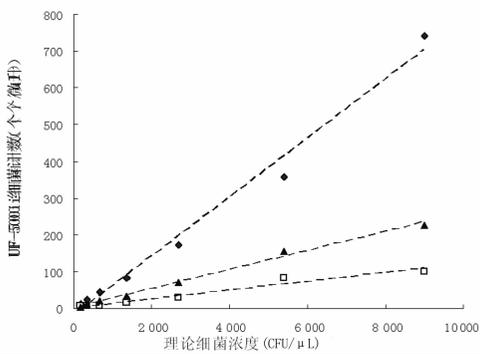


图 1 理论细菌浓度与培养细菌浓度相关性图



◆: 大肠埃希菌; ▲: 混合菌液; □: 表皮葡萄球菌。

图 2 理论细菌浓度与 3 种菌悬液 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数相关性

2.2 不同菌种理论浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数相关性分析 大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌与

表皮葡萄球菌(1:1)混合菌液理论细菌浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果见表 1, 相关系数 r 分别为 0.993、0.978、0.997, 以理论细菌浓度为 X 轴, UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数为 Y 轴, 绘制相关性图, 见图 2。

3 讨 论

Sysmex UF-500/1000i 全自动尿沉渣分析仪系列增配了细菌专用通道, 通过细菌、细胞特异性染色专用试剂与能够高灵敏度检测微细粒子的检测部的组合, 能够对尿中所含杆菌属(如大肠菌)和球菌属(如葡萄球菌)进行高速、高精度区分和定量计数。高精度检测出约 5×10^3 个/毫升(5 个/微升)以上尿中细菌的能力, 线性范围达 5~10 000 个/微升, 对于细菌的分辨有更强的准确性与特异性。众多学者也认为该仪器的性能优良, 可用于临床实验室对尿路感染的快速诊断^[1-2]。

但在实际工作中, 由于尿液标本含有上皮细胞、红细胞及一些结晶等, 细菌计数结果并不能代表实际的细菌浓度, 查找对 UF-1000i 全自动尿沉渣分析仪进行准确度评价相关资料, 目前多采用两种方法进行准确度评价, 一种使用 Sysmex 质控品^[2-3], 一种使用细菌培养法^[4], 但是对 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪评价较少, 考虑到 Sysmex 质控品每天开机即做, 合格后方进行临床标本的检测, 为更好了解 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪在细菌计数中的性能, 本实验配制了符合仪器线性范围 $10^2 \sim 10^4$ CFU/ μ L 浓度的大肠埃希菌悬液, 先进行培养细菌计数, 确定所配浓度。实验结果表明, 使用比浊仪配制的菌液浓度与培养细菌浓度相关性较好, 准确度较高, 与吴华军等^[4]研究相同。同样的菌液用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数, 结果却出现较大的偏差。为了证明此种偏差不是由不同菌种带来的, 需要配制不同种类(下转第 1649 页)

1.4 统计学处理 所有数据均输入 SPSS13.0 统计软件进行处理,用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

对 50 例临床酶免 HBV 阳性样本进行检测,PCR 实验检测 HBV 阳性 44 例,阴性 6 例,与 Architect 化学发光法结果相符,新创酶免法测 50 例全为阳性,Ortho 酶免法测阳性 42 例,阴性 8 例。新创试剂 S/CO < 0.9 的阳性样本经 PCR 实验确证存在假阳性,而 Ortho 试剂存在假阴性,具体见表 1。

表 1 41 例临床酶免 HBV 阳性样本 3 种方法检测结果的比较

检测方法	阳性样本 S/CO		阴性样本	
	n	PCR 确证阳性(n)	n	PCR 确证阳性(n)
Ortho ELISA	37	37	8	2
	5	5	—	—
新创 ELISA	40	40	0	0
	10	4	—	—
Architect 化学发光	44	44	6	0

$\chi^2 = 8.10, P < 0.05, 3$ 种检测方法的阳性检出率比较。

3 讨论

目前 HBV 感染血清学标志物是临床实验室最主要的检测项目,临床检测以酶免技术为主;但因病毒在流行的过程中存在变异的可能,且酶免法检测试剂对不同毒株的检出能力也有所不同。因此,HBV 检测结果可能存在少量的假阴性^[1]。本实验中发现,Ortho 酶免法 HBV 检测阴性的 8 例阴性样本经 PCR 确证有 2 例为阳性;而经确证实验后发现新创酶免法 HBV 检测 6 例为假阳性,表明如果用酶免法检测 HBV 存在漏检或误诊成乙型肝炎的风险。而结合 Architect 化学发光法检测乙型肝炎病毒,发现检测结果与确证实验相符,其联合检测可提高临床诊断的准确性。

针对目前国内临床检测乙型肝炎病毒仍以酶免技术为主的现状,不利于乙型肝炎的早期诊断、预防与控制。因此,临床诊断应对 HBV 阳性的样本作进一步确证。但由于 PCR 检测试剂和仪器非常昂贵,作者使用几种试剂和检测方法对 HBV 血液检测阳性结果进行分析,以期建立简便、经济、适合国内临床实验室的 HBV 确证实验方案。建议在临床检验中使用化学发光法与酶免法联合检测,对可疑的样本再作 PCR 实验分析来提高临床诊断的正确率。虽然本文仅对两种进口试剂和 1 种国产试剂联合检测的可行性进行了初步探讨,但不排除仅使用国产试剂联合检测用于确证的可能性,具体国产试剂的选择、搭配数量以及阳性预期值情况有待进一步的研究^[2-7]。

参考文献

- [1] 赵江燕,毛焱,桑叶,等. 两步法及中和试验在 HBsAg 检测中的应用[J]. 临床输血与检验, 2004, 6(3): 23.
- [2] 黄新宝,李新艳,姚德耀. 血液检验阳性结果的复核与相关质量体系建立[J]. 中国输血杂志, 2008, 11(11): 867.
- [3] 杨淑珍,李静,秦丽梅. ELISA 法检测乙型肝炎病毒标记物的质控[J]. 黑龙江医学, 2000, 5(3): 287-290.
- [4] 林秀珍. 乙型肝炎病毒前 S1 抗原及其检测的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(9): 899.
- [5] 闵福援,孙桂珍,王建,等. 前 S1 抗原在乙型肝炎诊断及判断预后的作用[J]. 中华医学检验杂志, 2004, 4(5): 224-226.
- [6] 任芙蓉,龚晓燕,李京京,等. 献血员丙型肝炎病毒抗体酶免法检测试剂的测量值与其真阳性的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(4): 255-258.
- [7] Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L, et al. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus[J]. MMWR Recomm Rep, 2003, 52(RR23): 1-13.

(收稿日期: 2011-12-25)

(上接第 1637 页)

细菌悬液验证,根据陈玉兰等^[5]报道的泌尿系感染革兰阴性杆菌中以大肠埃希菌为主要病原菌,在革兰阳性菌中以凝固酶阴性葡萄球菌为主。由于表皮葡萄球菌为人体较常见黏膜正常菌群之一,所以此次实验首选表皮葡萄球菌,并配制表皮葡萄球菌与大肠埃希菌 1:1 混合菌液,理由为中段尿取样有易污染的缺点。实验结果表明,与理论浓度相比,用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数结果远低于实际细菌浓度,并且表皮葡萄球菌悬液及表皮葡萄球菌与大肠埃希菌 1:1 混合菌液,与大肠埃希菌悬液相比,结果更低,怀疑标本在稀释过程中放置时间太长,修正实验条件,重复实验,仍得出类似的结果。回顾检测数据,发现每次检测红细胞计数都有不同的数值,初步推断,使用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数,采用流式细胞技术,通过专用的细菌通道,尿有形成分在其中以单行队列穿过^[6],对于容易聚集的细菌,当菌团体积超过一定大小时,仪器会自动默认为其他物质。在本次实验中,可能默认为红细胞。为了证实推断,尝试配制更高浊度(0.15~0.5 麦氏点)的细菌悬液,相当于 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ μ L 浓度,用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数时,测定结果均为 10^3 CFU/ μ L,因为所配制的悬液浓度不在仪器的线性范围内,所以此实验仅用于验证相关推测,结果未详细列出。本次实验仅挑选泌尿系感染较常见的大肠埃希菌与表皮葡萄球菌,是否可

以同样推断其他菌种,还需要下一步验证。

综上所述, Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪用于细菌计数时,由于细菌的聚集性,对于泌尿系感染常见细菌,所测定的细菌个数远低于实际细菌数。临床检测中由于尿液标本成分的差异,影响细菌计数的原因更多,本实验仅从体积大小方面解释原因,是否还有其他影响因素,有待日后进一步研究。

参考文献

- [1] Tang J, Zhang Y, Xu DW, et al. Evaluation of the Sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(12): 577-582.
- [2] 赖利华,邓济蛙,彭楷,等. Sysmex UF-1000i 尿液沉渣分析仪的性能评价[J]. 重庆医学, 2009, 38(19): 2404-2408.
- [3] 张娟安,肖秀林,孙光辉. UF-1000i 尿液沉渣分析仪的性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 386-388.
- [4] 吴华军,吕青山,侯史文,等. UF-1000 尿液分析仪在尿路感染诊断中的应用[J]. 实用医学, 2010, 15(4): 324-326.
- [5] 陈玉兰,李华建,张惠. 泌尿系感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(1): 137-139.
- [6] 于辉,任新艳. UF-1000i 全自动尿沉渣分析仪原理及临床应用[J]. 中国医疗设备, 2010, 25(8): 46-47.

(收稿日期: 2011-12-30)