

• 经验交流 •

# 尿液自动化分析显微镜复检规则的建立及应用

徐卫益<sup>1</sup>, 陈保德<sup>1</sup>, 许青<sup>1</sup>, 张婷<sup>2</sup>

(1. 浙江大学医学院附属第一医院检验科, 浙江杭州 310003; 2. 台州医学院, 浙江台州 318000)

**摘要:**目的 通过对尿液干化学、有形成分分析和显微镜镜检结果的综合判断, 建立显微镜复检规则并对其进行应用评价。方法 收集 1 480 份患者中段尿标本, 其中 1 150 份用于建立显微镜复检规则, 330 份用于规则验证; 收集健康体检者尿液标本 301 份, 用于尿沉渣镜检和 UF-1000i 尿液有形成分分析仪参考范围的建立。以镜检结果为标准, 建立显微镜复检规则, 并计算复检规则的真阳性率、假阳性率、真阴性率、假阴性率和复检率对规则进行验证。结果 尿沉渣镜检的参考范围: RBC 为 0~4/HP, WBC 为 0~6/HP, 管型 0~偶见/低倍视野; UF-1000i 的参考范围: RBC 为 0~13.0/ $\mu$ L(男)、0~33.0/ $\mu$ L(女); WBC 为 0~10.0/ $\mu$ L(男)、0~19.0/ $\mu$ L(女); 上皮细胞(EC)为 0~6.0/ $\mu$ L(男)、0~25.0/ $\mu$ L(女), 管型(CAST)为 0~1.3/ $\mu$ L(男)、0~0.84/ $\mu$ L(女)。按照制定的复检规则, 1 150 份建立复检规则标本中需复检 547 份, 复检率 47.6%, 主要以干化学隐血(BLD)与有形成分分析仪红细胞(URBC)不符、尿干化学 PRO 与有形成分分析仪 CAST 不符为主。用于规则验证的 330 份标本中真阳性率 29.7%、假阳性率 30.6%、真阴性率 38.2%、假阴性率 1.5%、复检率 58.8%, 且假阴性病例中无严重或活动性肾病患者。结论 实验建立的显微镜复检规则假阴性低, 复检率适中, 是一套较完善的复检方案。

**关键词:** 尿液; 自动化分析; 参考范围; 复检规则

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.048

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2013)12-1589-03

对尿液中的某些化学和有形成分进行定性和(或)定量检测, 有助于泌尿系统疾病的诊断和病情监测<sup>[1-2]</sup>。随着尿液干化学分析的普及, 尤其是尿液有形成分分析仪的临床应用, 使尿液分析自动化程度不断提高, 但由于自动化分析方法的局限性、尿液标本分析前影响因素较多等原因, 自动化检测仍是一种过筛试验, 对于异常的自动化分析结果需进行镜检确认<sup>[3-4]</sup>。建立合理的显微镜复检规则有助于提高尿液分析的质量、规范尿液检验操作流程、改善工作效率。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2011 年 11 月至 2012 年 2 月门诊和住院患者 1 480 份中段尿标本, 男性 761 例, 女性 719 例, 年龄 2~89 岁, 中位年龄 48 岁。其中 1 150 份建立规则的标本来源本院肾脏病中心、泌尿外科、内分泌科、血液科、传染病科、消化内科、放化疗科、重症监护室等 30 多个临床科室。330 份用于规则验证的标本主要来源于肾脏病中心、泌尿外科、内分泌科等潜在阳性或假阳性的临床科室。所有标本采集按照《临床检验操作规程》第 3 版, 2 h 内完成所有检测。健康体检者标本: 收集 2011 年 11~12 月本院国际体检中心体检人员尿液标本 301 份, 用于建立显微镜镜检和 UF-1000i 尿有形成分分析仪参考范围。其中, 男性 163 例, 女性 138 例, 年龄 22~83 岁, 中位年龄 41 岁。所有被选者均未发现有泌尿系统相关疾病, 无心、脑、肝和肺等重要组织器官异常, 肝、肾功能、血糖检测均正常。

**1.2 仪器与试剂** 日本 Sysmex UF-1000i 尿有形成分分析仪及其配套试剂、质控品和校准品; 日本 AKRAY 公司 AX-4280 尿液干化学分析仪及其配套试纸条、质控品和校准品。CX 31 光学显微镜购自日本 Olympus 光学工业株式会社。定量离心管由温州倍可特公司提供; Fast Read-10 尿沉渣计数板由 Sysmex 提供。

## 1.3 方法

**1.3.1 尿液自动化分析** 留取 12 mL 尿液标本于定量离心管中, 在 2 h 内分别用于干化学分析仪 AX-4280(简称干化学)和尿有形成分分析仪 UF-1000i(简称尿流式)进行尿常规检测, 所得资料输入电脑存档。

**1.3.2 尿沉渣显微镜检查** 将仪器检测后的尿标本尿量调整到 10 mL 刻度线(尿量不够的剔除实验)后, 400×g 离心 5 min, 用一次性塑料吸管吸去上清液 9.8 mL, 留下的 0.2 mL 沉淀物混匀后吸取 20  $\mu$ L 充入 Fast Read-10 尿沉渣计数板进行计数。先用低倍镜(10×10)观察全片, 计数管型(CAST)。再用高倍镜(10×40)观察 10 个视野, 计数每个视野的 RBC、WBC、结晶、类酵母菌数量。每份标本由两位主管技师进行双盲检测<sup>[5]</sup>, 取均值作为尿沉渣显微镜镜检结果。

**1.3.3 尿液干化学、尿沉渣镜检、尿流式分析的阳性判断标准** 尿液干化学中的 RBC、WBC 和 PRO 以达到阳性阈值以上为阳性,  $\geq 1+$  为阳性,  $< 1+$  为阴性; 尿沉渣镜检和尿流式检测结果以大于等于各自参考范围判断为阳性, 小于各自参考范围判断为阴性。

**1.3.4 显微镜复检规则的建立** 结合 1 150 份尿液干化学、尿流式和显微镜镜检结果, 以尿 PRO  $\geq 1+$ 、隐血(BLD)与 UF-1000i RBC 计数(URBC)不符、中性粒细胞脂酶(LEU)与 UF-1000i WBC 计数(UWBC)不符、BLD 与 URBC 相符但 UF-1000i 结晶计数(X' TAL)  $> 0$ 、UF-1000i 类酵母菌计数(UYLC)  $> 0$ 、尿 PRO  $\pm$  或阴性但 UF-1000i 管型(UCAST)  $> 1.30$  为复检规则的基本模式, 相互组合建立复检方案。

**1.3.5 复检规则的评估** 选取阳性或潜在阳性标本 330 份进行尿液自动化分析和显微镜镜检, 以显微镜镜检结果为标准, 评估复检规则筛选的真阳性率、假阳性率、真阴性率、假阴性率和复检率。

**1.4 统计学处理** 建立参考范围的数据采用 MedCalc-version 9.4.2.0 软件统计, 复检规则评估采用 Excel 2003 统计。

## 2 结果

**2.1 尿沉渣镜检的参考范围** RBC 为 0~4/HP, WBC 为 0~6/HP, CAST 0~偶见/低倍视野。

表 1 尿流式细胞和管型参考范围(/ $\mu$ L)

性别	RBC	WBC	EC	CAST
男	0~13.0	0~10.0	0~6.0	0~1.3
女	0~33.0	0~19.0	0~25.0	0~0.84

2.2 UF-1000i 尿有形成分分析仪细胞与 CAST 参考范围见表 1。

2.3 尿液自动化分析显微镜复检规则 按照尿干化学、尿沉

渣镜检和尿流式检测结果阳性判断标准,分析 1 150 份用于建立复检规则的尿液检测结果,建立复检规则,见表 2。按照此规则 1 150 份标本中需复检 547 份,复检率为 47.6%。

表 2 尿液自动化分析显微镜复检规则

序号	规则描述	序号	规则描述
1	PRO≥1+	22	LEU-UWBC+,BLD+URBC+,但 X'TAL>0
2	BLD-URBC+	23	LEU+UWBC-,且 YLC>0
3	BLD+URBC-	24	LEU-UWBC+,且 YLC>0
4	LEU+UWBC-	25	LEU+UWBC-,且 PRO<1+,但 UCAST>1.30
5	LEU-UWBC+	26	LEU-UWBC+,且 PRO<1+,但 UCAST>1.30
6	BLD+URBC+,但 X'TAL>0	27	BLD+URBC+,但 X'TAL>0,且 PRO<1+但 UCAST>1.30
7	YLC>0	28	PRO<1+,但 UCAST>1.30,且 YLC>0
8	PRO<1+,但 UCAST>1.30	29	PRO≥1+,BLD-URBC+,且 LEU-UWBC+
9	PRO≥1+,且 BLD-URBC+	30	PRO≥1+,BLD-URBC+,且 LEU+UWBC-
10	PRO≥1+,且 BLD+URBC-	31	PRO≥1+,BLD+URBC-,且 LEU-UWBC+
11	PRO≥1+,且 LEU-UWBC+	32	PRO≥1+,BLD+URBC-,且 LEU+UWBC-
12	PRO≥1+,且 LEU+UWBC-	33	PRO<1+,但 UCAST>1.30,BLD-URBC+,且 LEU-UWBC+
13	PRO≥1+,且 BLD+URBC+,但 X'TAL>0	34	PRO<1+,但 UCAST>1.30,BLD-URBC+,且 LEU+UWBC-
14	PRO≥1+,且 YLC>0	35	PRO<1+但 UCAST>1.30,BLD+URBC-且 LEU+UWBC-
15	BLD-URBC+,且 LEU-UWBC+	36	PRO<1+,但 UCAST>1.30,BLD+URBC-,且 LEU-UWBC+
16	BLD-URBC+,且 LEU+UWBC-	37	PRO≥1+,LEU-UWBC+,BLD+URBC+,但 X'TAL>0
17	BLD+URBC-,且 LEU-UWBC+	38	PRO≥1+,LEU+UWBC-,BLD+URBC+,但 X'TAL>0
18	BLD+URBC-,且 LEU+UWBC-	39	PRO≥1+,且 BLD-URBC+,YLC>0
19	BLD+URBC-,且 PRO<1+,但 UCAST>1.30	40	PRO≥1+,且 BLD+URBC-,YLC>0
20	BLD-URBC+,且 PRO<1+,但 UCAST>1.30	41	PRO≥1+,且 LEU-UWBC+,YLC>0
21	LEU+UWBC-,BLD+URBC+,但 X'TAL>0	42	PRO≥1+,且 LEU+UWBC-,YLC>0

2.4 330 份阳性或潜在阳性的临床标本通过复检规则评判结果显示假阳性率为 30.6%(101/330),真阳性率为 29.7%(98/330),真阴性率为 38.2%(126/330),假阴性率为 1.5%(5/330),复检率为 58.8%(194/330)。

2.5 复检规则假阴性病例分析 该复检规则假阴性率为 1.5%,满足复检规则评判标准假阴性率应小于 5%的要求。对假阴性 5 例逐个分析,主要漏检为透明管型、真菌孢子和颗粒管型,见表 3。在 4 例管型假阴性病例中,尿干化学 PRO 试验均为阴性,肌酐浓度均正常(本院血清肌酐参考范围为男 59~104 μmol/L;女 45~84 μmol/L)。2 例漏检颗粒管型的病例中管型数量分别为 1/μL 和 2/μL。

表 3 5 例假阴性病例资料分析

样本号	性别	年龄 (岁)	临床诊断	PRO 结果	假阴性项目	Cr (μmol/L)
177	男	89	胃癌	阴性	透明管型 2/μL	84
187	女	38	腮腺癌	阴性	真菌孢子 0~2/HP	49
234	男	77	肝硬化	阴性	透明管型 34/μL	100
243	女	54	胆总管结石	阴性	颗粒管型 1/μL	30
250	女	64	右上肺炎	阴性	颗粒管型 2/μL	52

3 讨 论

传统的尿常规检验方法为尿干化学分析后将标本离心镜

检,观察每高倍或每微升中的有形成分含量,此方法仍然是尿液有形成分检查的“金标准”,但操作比较繁琐,容易受到主观因素的影响,不适合大批量标本的检测。随着尿液有形成分分析仪在临床的应用,解决了手工操作主观因素大、工作量限制的问题,提高了尿液检测的准确性,但同时也带来了一些问题。由于尿液标本有形成分的复杂性、不稳定性;尿液有形成分分析仪检测原理的局限性,使得检测结果容易受到一些因素(如结晶、细菌、上皮细胞、黏液丝、真菌孢子等)的干扰,造成结果不准确甚至错误,影响临床对疾病的诊断、治疗和疗效观察。因此,一般认为全自动尿液分析只是一种过筛试验,需制定完善的显微镜复检规则,对触发规则的尿液标本按照手工显微镜操作规程对其进行复检,以保证尿液常规检验质量。

为了制定本实验室尿液复检规则的阳性判断值,笔者进行了显微镜镜检和 UF-1000i 尿有形成分分析仪参考范围的调查,结果显示显微镜镜检参考范围与《临床检验基础》第 4 版尿沉渣涂片参考范围相符<sup>[6]</sup>。UF-1000i 尿有形成分分析仪参考范围与陈雨等<sup>[7]</sup>报道的不一致,主要为 RBC、WBC 的参考范围较宽,但与 Sysmex 公司提供的参考范围比较接近,原因可能与本研究的群体、留样方式的不同所致。

本次研究留取了 1 150 份尿液标本用于复检规则的建立,根据阳性判断标准,以 6 个基本模式互相组合形成 42 条复检规则,通过 330 份临床阳性或潜在阳性标本验证,复检率为

58.8%，与陈雨等<sup>[7]</sup>报道的较一致，但比马骏龙等<sup>[8]</sup>报道的高得多，原因可能为后者试验时对检测结果进行了等级差设置增加了结果的匹配度，但其未考虑尿液结晶、类酵母菌对检测结果的影响。本实验将尿液结晶、类酵母菌检测结果一起编进了复检规则中，提高了复检率。规则验证假阴性率为 1.5%，参照血液复检规则评价假阴性率应小于 5% 的标准<sup>[9]</sup>，且在发生假阴性的 5 例病例中未出现严重的、活动性的肾脏疾病，该规则验证通过。

在充分发挥尿液自动化分析优势的同时，通过合理的设置规则及软件支持。智能化地筛选需显微镜复检标本，加快尿常规检测的速度，提高检验质量，使尿液常规检验逐步规范化、标准化。

参考文献

[1] Dos Santos JC, Weber LP, Perez LR. Evaluation of urinalysis parameters to predict urinary-tract infection[J]. Braz J infect dis, 2007, 11(5):479-481.

[2] Delanghe J. New screening diagnostic techniques in urinalysis[J]. Acta Clin Belg, 2007, 62(3):155-161.

• 经验交流 •

[3] 丛玉隆, 马骏龙. 尿液有形成分镜检与自动化检测方法学利弊和互补分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6):609-611.

[4] 顾可梁. 尿液有形成分检查的难点与疑点[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(6):605-608.

[5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006:275-276.

[6] 熊立凡, 刘成玉. 临床检验基础[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008:169-174.

[7] 陈雨, 程闽, 李薇, 等. 自动化尿液干化学和有形成分分析复检规则的制定和应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(6):501-506.

[8] 马骏龙, 丛玉隆, 陆玉静, 等. 尿干化学和流式细胞术联合用于尿液有形成分镜检筛选的研究与应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(6):494-500.

[9] Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis[J]. Lab Hematol, 2005, 11(2):83-90.

(收稿日期:2012-12-18)

# RT-PCR 对原发性肝癌中 ASPP2 基因检测的意义

李 靖

(深圳市龙岗区坪地人民医院检验科, 广东深圳 518117)

**摘 要:****目的** 探讨逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对原发性肝癌中 ASPP2 基因检测的意义。**方法** 选择原发性肝癌手术患者 36 例, 所有患者手术切除 30 min 内收集癌组织和癌旁组织, 另选 20 例正常肝组织作为对照。各组患者行 RT-PCR 半定量检测 ASPP2 水平, 患者术后进行为期 1 年的随访, 观察 ASPP2 mRNA 表达与患者年龄、性别、肿瘤直径、临床分期、癌栓形成、淋巴结转移以及术后复发等病理指标的相关性。**结果** 肝癌组织中的 ASPP2 水平为(0.53±0.19), 显著高于癌旁组织(0.71±0.15)和正常肝组织(0.85±0.19)中的 ASPP2 含量, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。ASPP2 mRNA 表达水平与肿瘤的临床分期、肿瘤直径以及术后复发情况密切相关( $P<0.05$ )。**结论** ASPP2 在肝癌组织中呈现低表达, ASPP2 表达的降低预示着肿瘤患者的不良预后, 对 ASPP2 的检查能够对肝癌的早期诊断及确定治疗方案提供可靠依据。

**关键词:**原发性肝癌; 逆转录聚合酶链反应; ASPP2; 基因检测

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.049 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2013)12-1591-02

肝癌恶性程度高、病情进展快、患者早期往往没有明显症状, 而一旦出现症状, 往往已属于中晚期<sup>[1]</sup>。目前甲胎蛋白(AFP)作为肝癌标志物的检出率约占 60%~70%, 仍不能满足临床上对肝癌的诊断。P53 凋亡刺激蛋白(ASPP)家族包括 ASPP1、ASPP2 以及 iASPP 三个成员, ASPP 家族成员主要功能为调控 P53 的凋亡功能<sup>[2]</sup>, 而 P53 细胞凋亡通路是人类肿瘤发生过程中最常见的通路, 本研究采用逆转录 PCR(RT-PCR)方法检测了原发性肝癌患者癌组织及癌旁组织 ASPP2 mRNA 表达情况, 并探讨其与肝癌患者预后的相关性, 现报道如下。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选自本院 2008 年 6 月至 2010 年 6 月收入的原发性肝癌手术患者 36 例, 男 25 例, 女 11 例。患者年龄 45~68 岁, 平均年龄(54.3±9.4)岁, 所有患者手术切除 30 min 内, 收集癌组织和癌旁组织(距离癌组织 2 cm 内)标本并置于一 135℃冰箱内备用, 所有肿瘤组织均行病理检测确诊为原发性肝癌。另选 20 例正常肝组织标本作为对照。

**1.2 引物设计及合成** ASPP2 基因引物由 GeneBank 报道的

人类 ASPP2 及  $\beta$ -actin mRNA 的基因系列设计的 PCR 引物, ASPP2 引物系列, 上游:5'-CGA GAG TGA TTG CCA TTT GG-3'; 下游:5'-AAT CTG TTG CTG CTG GCG AG-3', 扩增片段长 310 bp。 $\beta$ -actin 上游:5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3'; 下游:5'-ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC-3'。

**1.3 RT-PCR** 总 RNA 的提取: Trizol 裂解细胞后, 进行总 RNA 提取, 并测量 RNA 含量以及纯度。cDNA 的合成: PCR 反应总体积 30  $\mu$ L, 反应条件 42℃ 60 min, 95℃ 5 min, 终产物 cDNA 置于 4℃ 时保存。PCR 反应: 采用合成的 cDNA 作为模版并进行 PCR 扩增反应, 反应条件 93℃ 40 s, 64℃ 40 s, 72℃ 50 s, 循环 30 次, 最后 72℃ 8 min。取 6  $\mu$ L PCR 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 采用 ImageStone-5000 系统对获得的条带行半定量分析。以 ASPP2 与  $\beta$ -actin 比值为 ASPP2 相对含量。

**1.4 随访指标** 患者术后进行为期 1 年的随访, 观察 ASPP2 mRNA 表达与患者年龄、性别、肿瘤直径、临床分期、癌栓形成、淋巴结转移以及术后复发等相关情况。

**1.5 统计学处理** 数据采用 SPSS13.0 统计学软件进行处