

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.10.04

· 临床研究技术 ·

活体染色法在筛查尿液诱饵细胞中的应用

闫立志¹, 张时民² (1. 内蒙古包钢医院医学检验科, 包头 014010; 2. 北京协和医院检验科, 北京 100032)

摘要:目的 用活体染色法筛查长期使用免疫抑制剂的肾移植术后患者尿液中的多瘤病毒感染后的细胞, 即“诱饵细胞”。方法 留取 2019 年 1 月至 2020 年 4 月内蒙古包钢医院 106 例肾移植患者(服用免疫抑制剂在 3 个月以上)的尿液标本, 用未染色直接镜检法、沙黄-结晶紫(SM)染色法、阿利新蓝-派洛宁(S)染色法检查尿液中诱饵细胞, 对筛查出诱饵细胞的尿液标本做 BK 病毒(BKV)和 JC 病毒(JCV)核酸检测进行确证。结果 在 106 例肾移植术后患者的尿液标本中, 用未染色直接镜检法检出 12 例诱饵细胞, 阳性率 11.3%; 使用 SM 染色法或 S 染色法检出 21 例诱饵细胞, 阳性率 19.8%; 在 21 例检出诱饵细胞的尿液标本中, BKV 和(或)JCV 核酸阳性符合率为 95.2%, 其中 BKV 核酸阳性 6 例, 占 28.6%, JCV 核酸阳性 10 例, 占 47.6%, BKV 和 JCV 核酸同时阳性 4 例, 占 19.0%。结论 SM 染色法、S 染色法 2 种活体染色法是操作简单、快速而有效的尿诱饵细胞检测方法, 在筛查肾移植术后患者因长期使用免疫抑制剂而感染多瘤病毒方面有着重要意义。

关键词: SM 染色法; S 染色法; 诱饵细胞; BK 病毒; JC 病毒

中图分类号: R446

文献标志码: A

Application of in vivo staining for screening decoy cells in urine samples

YAN Lizhi¹, ZHANG Shimin² (1. Department of Clinical Laboratory, Baogang Hospital, Baotou 014010, Inner Mongolia; 2. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100032, China)

Abstract: Objective To screen polyomavirus-infected cells e.g., decoy cells, in urine of kidney transplantation patients received immunosuppressants for long-term by in vivo staining methods. **Methods** The urine samples from 106 patients who received kidney transplantation surgery and immuno-suppressants for more than 3 months were collected in Baogang Hospital from January 2019 to April 2020. The decoy cells were screened by direct microscopic examination without staining, Sternheimer-Malbin (SM) staining and Sternheimer staining (S staining) and confirmed by amplification of nucleic acid of BK and JC virus in the screened urine samples, thus the specific morphological changes in the cells were believed to be caused by the infection of these virus. **Results** Among the urine samples from 106 kidney transplantation patients, decoy cells were detectable in 12 cases (11.3%) by direct microscopy without staining and detectable in 21 cases (19.8%) by SM or S staining. Of the 21 samples with decoy cells, 20 cases (95.2%) were positive for BK and (or) JC viral nucleic acid, in which 6 cases (28.6%) were positive for BKV nucleic acid, 10 cases (47.6%) were positive for JCV nucleic acid and 4 cases (19.0%) were positive for both BKV and JCV nucleic acid. **Conclusion** Both SM and S staining were simple, rapid and effective methods for detecting decoy cells in the urine samples. The staining methods should be of important clinical significance for screening the patients infected with human polyoma virus after kidney transplantation surgery due to use of immunosuppressants for long-term.

Key words: SM staining; Sternheimer staining; decoy cells; BK virus; JC virus

诱饵细胞(decoy cells)是肾小管上皮细胞或尿路上皮细胞感染多瘤病毒(Polyoma virus, PV)后出现特征性变化的细胞。该类细胞胞核明显增大, 可见核内包涵体, 胞核呈毛玻璃样改变, 容易被误认为是肿瘤细胞, 所以称为“诱饵细胞”^[1]。肾移植术后长期服用免疫抑制剂增加了 PV 感染的风险, 当感染 PV 后可以引起移植肾功能损伤, 导致 PV 相关性肾病(Polyomavirus-associated nephropathy, PVAN)^[2-3]。在机体内 PV 也可以处于潜伏状态, 当机体免疫力低下时迅速激活和复制, 导致移植肾功能急剧下降甚至丧失^[3,4-7]。因此, 检测 PV 是预防 PVAN 的关键。人 PV 有 10 余种, 其中最常见的是 BK 病毒(BK virus, BKV)和 JC 病毒(JC virus, JCV)^[8]。检

测 PV 的方法有很多, 而检测尿液中诱饵细胞是一种有价值且无创的筛选 PVAN 的方法^[9]。诱饵细胞可以通过多种染色法检出, 活体染色法就是其中一种, 沙黄-结晶紫(Sternheimer-Malbin, SM)染色法与阿利新蓝-派洛宁(Sternheimer, S)染色法都是活体染色法, 染色原理相同, 可以使细胞快速着色, 染色后的细胞结构清晰, 与背景色对比鲜明^[10]。本研究收集大量病例, 观察 SM 染色法与 S 染色法 2 种活体染色法在尿液诱饵细胞检测方面的性能。

1 材料和方法

1.1 标本及来源 收集 2019 年 1 月至 2020 年 4 月内蒙古包钢医院 106 例肾移植患者尿液标本, 其中

男 74 例,女 32 例,年龄 17~65 岁,患者均服用免疫抑制剂 3 个月以上。用洁净的一次性尿沉渣管收集患者 2 份清洁中段尿液标本各 10 mL,其中一份用于镜检筛查诱饵细胞,另一份标本在镜检诱饵细胞阳性时用于 PV 核酸检测。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),Olympus BX43 显微镜(日本奥林巴斯公司),BKV、JCV 核酸检测试剂盒(北京鑫诺美迪公司),SM 染色液、S 染色液(珠海 BASO 公司)。

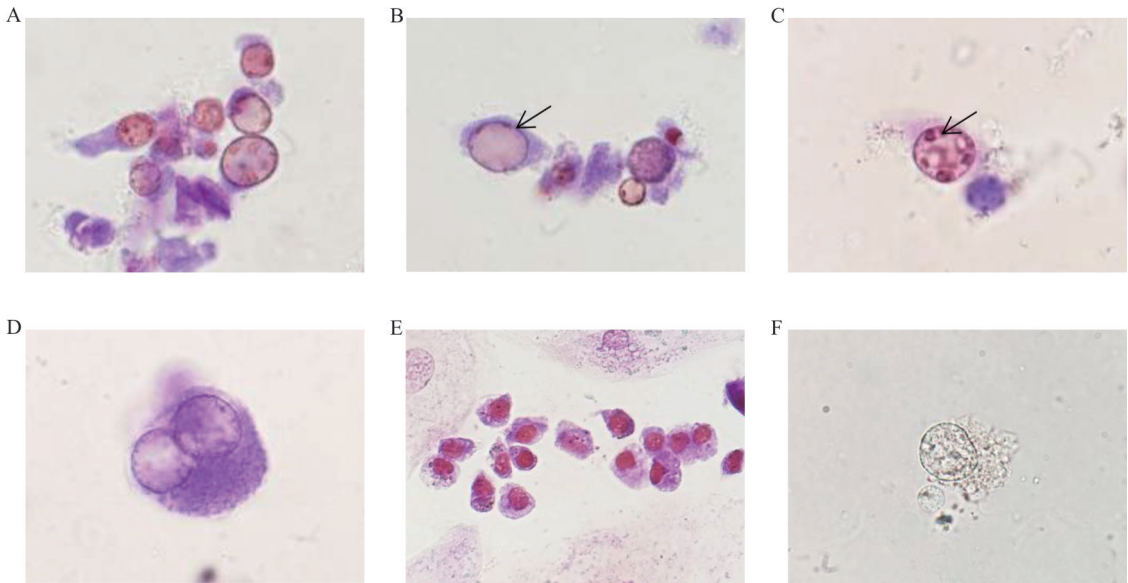
1.3 标本处理及染色 将留取的 10 mL 尿液标本以 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,留 0.2 mL 尿沉渣,将尿沉渣充分混匀,取 20 μ L 标本滴加到载玻片,盖一张盖玻片,用普通光学显微镜检查诱饵细胞。将剩余尿沉渣分成 2 管,按照标本与染色液 10:1 的比例,分别加入 SM 染色液和 S 染色液,用一次性吸管在管底轻轻混匀,染色时间 1 min,取 20 μ L 染色后标本加至清洁载玻片上,盖一张盖玻片,用普通光学显微镜检查诱饵细胞,并用数码照相设备拍摄图片。

1.4 BKV、JCV 核酸检测 对发现诱饵细胞的尿液标本进行 BKV、JCV 核酸检测。将标本颠倒混匀,振荡 15 s,取 1 mL 移至 1.5 mL EP 管中,13 000 r/min

离心 10 min 后弃去上清液,加入 50 μ L 裂解液,然后用吸头将沉淀挑起,吹吸 5 次,提取核酸,再进行 PCR 反应。反应条件:UDG 酶反应,37 $^{\circ}$ C,2 min;预变性,95 $^{\circ}$ C,3 min;变性,94 $^{\circ}$ C,15 s;退火、延伸、荧光信号采集,60 $^{\circ}$ C,35 s,循环 40 次;仪器冷却,25 $^{\circ}$ C,1 min。结果分析:反应结束后,根据 PCR 仪说明书及荧光曲线调整基线和阈值,基线的起始点设定在 5~8 之间,终止点设定在 12~15 之间,阈值线通常设定在 1 000~5 000 之间,分析各标本的 Ct 值和相应的初始浓度。

2 结果

2.1 SM 染色法镜检诱饵细胞的形态学特征 诱饵细胞体积明显增大,胞体大小不一,形状不规则,SM 染色后胞质为蓝紫色,胞核紫红色;胞质量多少不一,呈粗颗粒状,胞核大,明显偏位,核膜增厚,核质比偏高;核染色质结构破坏,呈粗颗粒或块状,胞核呈空泡样改变,部分细胞可见核内病毒包涵体,少量细胞胞核脱出,仅见裸核。肾小管上皮细胞感染 PV 形成的诱饵细胞见图 1A~D,正常的肾小管上皮细胞见图 1E,未染色诱饵细胞见图 1F。

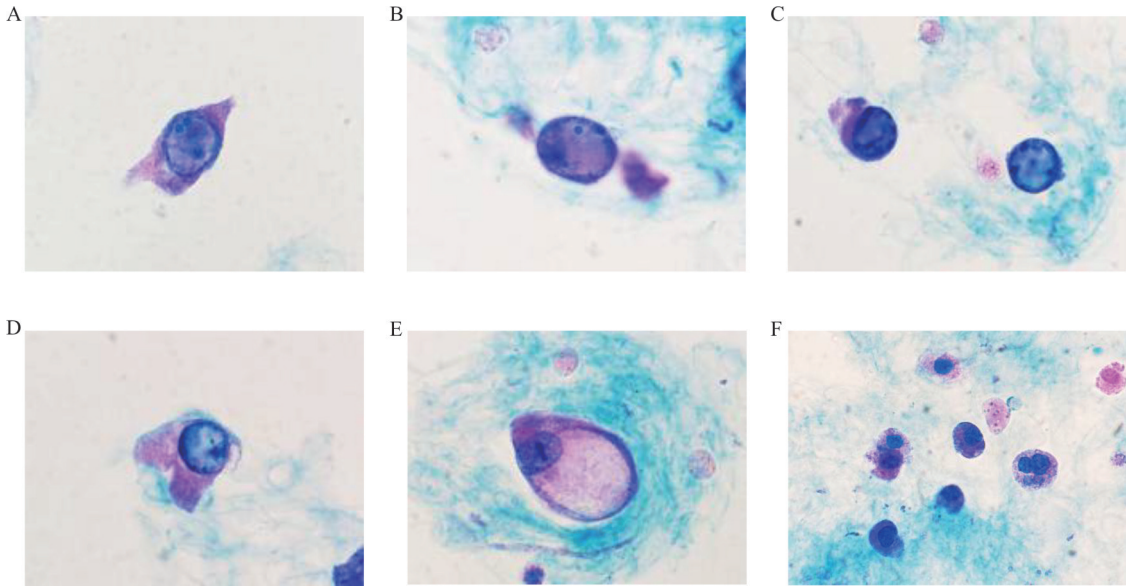


注:A,诱饵细胞体积大小不等,胞质呈蓝紫色,胞核呈紫红色,可见包涵体颗粒;B,箭头所指为诱饵细胞,胞体增大,胞核呈空泡样改变,核膜明显增厚;C,箭头所指为诱饵细胞,胞体不完整,胞核明显增大,可见核内包涵体;D,双核诱饵细胞,胞体增大,胞核呈气球样;E,正常肾小管上皮细胞,胞体不规则,体积偏小,胞质紫红色,胞核深红色,呈颗粒状;F,未染色诱饵细胞。

图1 尿沉渣 SM 染色与未染色镜检检出诱饵细胞($\times$ 1 000)

2.2 S 染色法镜检筛查诱饵细胞的形态学特征 诱饵细胞形态学特征同尿沉渣 SM 染色,胞质和胞核着色略有不同,尿沉渣 S 染色后胞质为紫红色,胞核深蓝色,包涵体颗粒呈深蓝色。S 染色后的细胞

结构更加清晰,颜色对比明显。肾小管上皮细胞感染 PV 形成的诱饵细胞见图 2A~D,尿路上皮细胞感染 PV 发生形态学变化,见图 2E,正常的肾小管上皮细胞见图 2F。



注:A,诱饵细胞胞质呈紫红色,胞核深蓝色;B,诱饵细胞胞核脱出,呈空泡样,可见核内包涵体;C,诱饵细胞核质比明显偏高,核膜增厚,可见核内包涵体;D,诱饵细胞胞体增大,核膜明显增厚;E,尿路上皮细胞感染 PV,胞核增大,胞质呈挖空样;F,正常肾小管上皮细胞,体积小,胞质呈紫红色,胞核深蓝色,染色质呈颗粒状。

图 2 尿沉渣 S 染色镜检检出诱饵细胞结果(×1 000)

2.3 诱饵细胞检查结果 在 106 例长期服用免疫抑制剂肾移植患者的尿液标本中,用未染色直接镜检法检出 12 例诱饵细胞,阳性率 11.3%,而使用 SM 染色法或 S 染色法检出 21 例诱饵细胞,阳性率 19.8%。对 21 例尿液镜检出诱饵细胞的标本,检测 BKV、JCV 核酸共计 20 例,阳性符合率 95.2%,其中 BKV 核酸阳性 6 例,占 28.6%;JCV 核酸阳性 10 例,占 47.6%;BKV 和 JCV 核酸同时阳性 4 例,占 19.0%。

3 讨论

未染色直接镜检法筛查诱饵细胞,细胞结构不清,核内包涵体不易观察,容易漏检。活体染色法最大的优势是染色后的细胞结构清晰,保持细胞原有形态,不会因制片等因素造成细胞形态发生变化,而且操作简单、染色快速,不易漏检。本研究选用 SM 染色法和 S 染色法,通过实验发现 2 种染色法诱饵细胞检出率相同。在实验过程中发现,2 种染色法易受尿液 pH 影响,染色后的细胞胞质与胞核颜色略有差别。在尿液诱饵细胞分类过程中,部分病例中同时伴有吞噬细胞不同程度的增多。此外,部分病例尿路上皮细胞可见典型的“挖空”现象,这些细胞形态的改变,可能与 PV 感染相关。

4 参考文献

cytology in detection of decoy cells in renal transplant patients: Report of five cases and review of literature[J]. *Diag Cytopathol*, 2020, 48(3): 222-227.

[2] 韩永, 郭晖. 肾移植术后 BK 病毒感染的病理学研究进展[J]. *实用器官移植电子杂志*, 2019, 7(5): 391-395.

[3] 陈徐涛, 杨诗聪, 汪敏, 等. 移植肾多瘤病毒肾病合并急性排斥反应的病理特征分析[J]. *中华器官移植杂志*, 2018, 39(9): 547-552.

[4] 粟大明, 金昱, 苗芸. BK 多瘤病毒与移植受者新发泌尿系肿瘤相关性的研究现状[J]. *中华器官移植杂志*, 2019, 40(1): 48-51.

[5] 汪敏, 李军, 陈徐涛, 等. JC 病毒肾病的临床病理特点和预后(附四例报告)[J]. *中华器官移植杂志*, 2018, 39(7): 407-411.

[6] 彭畔新, 杨志豪. 肾移植术后人类 BK 多瘤病毒感染的诊断与治疗研究进展[J]. *国际移植与血液净化杂志*, 2018, 16(1): 11-14.

[7] 黄刚, 吕东明, 朱媛. 移植肾 BK 病毒肾病的防治和预后[J]. *实用器官移植电子杂志*, 2017, 5(6): 429-435.

[8] Demey B, Tinez C, Francois C, *et al*. Risk factors for BK virus viremia and nephropathy after kidney transplantation: a systematic review[J]. *J Clin Virol*, 2018, 109: 6-12.

[9] Chen TW, Chen CY, Lin NC, *et al*. How to improve the positive predictive value of urinary decoy cell surveillance for polyomavirus BK-associated nephropathy in kidney transplant patients[J]. *Transplant Proc*, 2016, 48(3): 924-928.

[10] 苏兆亮, 顾可梁, 陈巧林, 等. 尿沉渣 6 种染色方法的应用比较[J]. *临床检验杂志*, 2004, 22(3): 202-203.

(收稿日期:2020-08-07)
(本文编辑:王海燕)

[1] Tummidi S, Kothari K, Agnihotri M, *et al*. Diagnostic utility of urine