

· 论 著 ·

根据中国人群血小板生物参考区间修改及验证显微镜复检规则

王 凤, 王 贞, 王衍晶[△], 张风华

(大连医科大学附属第一医院检验科, 辽宁大连 116011)

摘要:目的 根据中国人群血小板生物参考区间的调整修改并验证血小板显微镜复检规则, 探讨其是否适合该院实验室血细胞分析的需求。方法 回顾性分析根据中国人群血小板生物参考区间的调整, 修改该院实验室 Sysmex XE-5000 全自动血细胞分析仪血小板显微镜复检规则并比较规则修改前后推片复检率、镜检血小板聚集阳性率的不同。结果 血小板显微镜复检规则修改前血小板推片复检率为 1.94%, 复检规则修改后血小板推片复检率为 3.99%, 复检规则修改后推片复检率显著增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 根据新版中国人群血小板生物参考区间, 修改该院实验室血小板复检规则, 能提高显微镜复检率, 有效避免血小板假性减少的漏检, 适合该实验室血细胞分析的需求。

关键词:血细胞分析仪; 血小板聚集; 血小板假性减少

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.09.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)09-1190-03

According to the platelet of Chinese people biological reference interval change the microscope review rules

Wang Feng, Wang Zhen, Wang YanJing[△], Zhang Fenghua

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

Abstract: Objective To discuss change the platelet counts by microscope rule by the platelet of Chinese people biological reference range in this laboratory blood analysis requirement. **Methods** Retrospectively analyzed according to the platelet of Chinese people biological reference range change the lab Sysmex XE-5000 automatic blood cell analyzer platelet review rules. Change the platelet counts by microscope rules, the differences between the microscopy rate and the microscopic examination of the platelet aggregation rate. **Results** Before change the platelet counts by microscope rules the microscopy rate was 1.94%. After change the platelet counts by microscope rules the microscopy rate was 3.99%, after change the platelet counts by microscope rules pushing blood piece rate increased significantly, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** According to the platelet of Chinese people biological reference range change the lab platelet review rules. We can increase the rate of microscopy, and effectively avoid the pseudothrombocytopenia and accurately guide clinical treatment.

Key words: hematology analyzer; platelet aggregation; pseudothrombocytopenia

全自动血细胞分析仪检测血小板, 由于受到检测原理及样本等各种不确定因素的限制, 其计数的准确性备受关注^[1]。EDTA 依赖性血小板聚集等因素常导致血小板计数假性减少, 若经显微镜复检就会得到及时矫正。因此, 合理的小血小板复检规则在血细胞分析中至关重要。本院实验室参考国际血液学复检专家组和中国血液学复检专家组制定的标准^[2-3], 结合本院专家建议, 曾制定过血小板复检规则并严格执行。原卫生部颁布的行业标准明确规定了中国人群血小板参考区间, 本院实验室根据新版行业标准修改了血小板显微镜复检规则, 本研究试图探讨修订后的小血小板显微镜复检规则是否适合本院实验室血细胞分析的需求。

1 材料与与方法

1.1 样本来源 收集大连医科大学附属第一医院 2013 年 3~12 月门诊和住院患者的 EDTA-K₂ 抗凝的血常规样本。复检规则修改前以血小板小于 $80 \times 10^9/L$ 的样本设置为镜检规则, 2013 年 3 月 1 日至 4 月 30 日的血常规样本总数为 23 737 例; 修改后以血小板小于 $125 \times 10^9/L$ 的样本设置为镜检规则, 2013 年 9 月 1 日至 10 月 31 日的血常规样本总数为 21 771 例。

1.2 仪器与试剂 Sysmex XE-5000 血液分析仪、SP-1000i 自动推片染片机及配套试剂由希森美康公司提供; 双目显微镜由

日本 Olympus 公司提供; 瑞氏染液由珠海贝索生物技术有限公司提供; EDTA-K₂ 真空抗凝管由阳普医疗公司提供。

1.3 方法

1.3.1 仪器的校准与调试 严格按照 Sysmex XE-5000 操作手册进行质控及样本检测。仪器按要求进行日常保养及维护, 每天采用原厂配套高、中、低值质控物对仪器进行日常监测, 确保仪器处于正常工作状态, 仪器性能符合规定要求。

1.3.2 显微镜复检 SP-1000i 自动推片染片机制成厚薄均匀, 头、体、尾分明的血涂片。依据《全国临床检验操作规程》^[4], 在显微镜油镜下选择血涂片体、尾交界处, 按城垛状移动观察有无血小板聚集现象。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件包进行统计学分析, 样本率的检验采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板显微镜复检规则修改前后推片复检率及血小板聚集阳性率比较 2013 年 3 月 1 日至 4 月 30 日的血常规样本总数为 23 737 例, 根据镜检规则其推片例数为 461 例, 推片复检率为 1.94%, 血小板聚集例数 22 例, 阳性率为 4.77%。血小板复检规则修改后, 2013 年 9 月 1 日至 10 月 31 日的血常规样本总数为 21 771 例, 推片例数为 868 例, 推片复检率为 3.99%, 血小板聚集例数 42 例, 阳性率为 4.84%。两者推片复

检率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),血小板聚集阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 血小板复检规则修改后不同时间段血小板聚集阳性率比较 血小板复检规则修改后,2013 年 9 月 1 日至 10 月 31 日推片例数为 868 例,阳性例数为 42 例,血小板聚集阳性率 4.84%;2013 年 9 月 15 日至 12 月 20 日推片例数为 1 832 例,阳性例数为 107 例,血小板聚集阳性率 5.84%,两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 血小板复检规则修改后不同数值段血小板聚集阳性率比较 复检规则修改后,2013 年 9 月 15 日至 12 月 20 日血小板为小于 $80 \times 10^9/L$ 的样本中,推片例数为 728 例,血小板聚集例数为 41 例,阳性率为 5.63%;血小板为 $(80 \sim 125) \times 10^9/L$ 的样本中,推片例数为 1 104 例,血小板聚集例数为 66 例,阳性率为 5.98%,两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 血小板减少患者主要分布科室情况 血小板减少患者主要分布在血液风湿免疫科、介入治疗科、肾内科、消化科、心内科和神经内科等。其中以血液风湿免疫科(20.20%)复检率最高,而镜检血小板聚集阳性率以血液风湿免疫科(1.9%)最低,以健康体检部(20.5%)镜检阳性率最高。

3 讨论

全自动血细胞分析仪测定血小板的原理目前多为经典的电阻抗法。但该法的影响因素较多,计数存在误差。为了确保血小板计数的准确性, Sysmex XE 系列血细胞分析仪将电阻抗法和流式细胞术激光散射法有效地结合起来对血小板进行准确的测定。根据电阻抗计数原理,血细胞计数有一定的计数阈,血小板计数阈一般在血小板体积为 $2 \sim 30$ fL,当血小板体积大于 30 fL 或小于 2 fL 时,这些血小板将不被纳入血小板计数范围,使血小板计数假性减低^[5];并且计数红细胞和血小板都是在同一计数池内,当存在小红细胞及其碎片时,由于其体积与血小板相似,仪器将部分小红细胞及其碎片误计为血小板而导致检测结果偏高^[6]。此类情况仪器将显示其血小板直方图的异常并报警。正常血小板直方图通常主要集中在 $2 \sim 15$ fL,一般在 $25 \sim 30$ fL 的某一点与横坐标重合,直方图是一条呈偏态分布的单峰光滑曲线。当大血小板增多时,曲线峰会右移,在大于 30 fL 的某一点与横坐标重合。当存在小红细胞的干扰,曲线峰的右侧抬起并且尾部上翘。当存在聚集的血小板时,曲线峰会降低,如果以小于 20 fL 血小板聚集为主,曲线峰的右侧会抬起并且呈现拖尾状,不与横坐标重合;如果以大于 20 fL 血小板聚集为主,曲线峰会变得低平右侧无明显抬起,并且在白细胞直方图上 35 fL 左右会有一个小峰出现^[7]。通过血小板直方图的观察,可以初步了解血小板计数减少或增多的大致原因。Sysmex XE-5000 的光学法测定血小板是在测定网织红细胞的通道,通过反映细胞数量和表面体积的低角度散射光和反映核酸浓度的高角度散射荧光识别血小板。血小板内含有少量的核酸,而成熟的红细胞内没有核酸,所以血小板高角度散射光的强度比成熟红细胞强,因此可以很好地将血小板和成熟红细胞在散点图上有效区分^[8]。用光学法测定血小板可初步纠正因大血小板或巨大血小板、小红细胞以及破碎的红细胞等引起的血小板假性减少或增高,再经过血涂片显微镜复检,观察血小板大小、形态、数量及是否存在干扰及有无血小板聚集等现象^[9],与直方图相对应以此验证并及时纠正血小板数量。

原卫生部于 2012 年 12 月 25 日颁布了行业标准 WS/T 405-2012《血细胞分析参考区间》,明确规定中国人群血小板参

考区间为 $(125 \sim 350) \times 10^9/L$,且要求大型三甲医院必须尽快按照文件规定修改血细胞分析的参考区间。本实验室在行标规定之前已制定血细胞分析的镜检规则,其中血小板小于 $80 \times 10^9/L$ 即进行推片复检,在此行标基础上,2013 年 5 月份将血小板复检界限值提升到 $125 \times 10^9/L$ 。

本文对修改前后镜检阳性率等的回顾性比较分析发现,血小板复检规则修改后因血小板临界值的改变,推片例数明显增多,推片比例明显较修改前增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),但血小板聚集阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明尽管阅片量增大,但真正发现因血小板聚集引起的假性血小板减少并未明显增多,绝大多数患者血小板减少是真性减少。考虑复检规则修改后工作人员的适应能力和执行情况,收集修改初期(2013 年 9 月 1 日至 10 月 31 日)及修改后长期(2013 年 9 月 15 日至 12 月 20 日)样本比较分析,发现复检阳性率间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明显微镜复检岗位人员已明确修改后复检规则,执行情况良好。

本研究血小板小于 $80 \times 10^9/L$ 与血小板为 $(80 \sim 125) \times 10^9/L$ 的血小板聚集阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明血小板假性减少的患者血小板数分布区间很广泛,进一步证明了根据新版行标修改血小板复检规则的必要性。

对血小板减少患者的分布科室情况分析,发现主要来源于血液风湿免疫科,占镜检样本的 20.20%,但镜检后发现血小板聚集的阳性率却最低,仅为 1.9%,这说明血液风湿免疫科的患者血小板减少多为真性减少,血小板假性减少的情况很少出现。相反,健康体检部及其他科室镜下血小板聚集阳性率较高,说明这些科室尤其是健康体检人群存在血小板假性减少的现象,在平时血细胞复检时更应严格执行血小板镜检规则,避免对血小板假性减少的漏检,引起临床误诊误治。

通过本研究,笔者认为当全自动血细胞分析仪检测发现血小板计数减少时,尤其是初诊患者,一定要先排除抽血方法不当引起的凝集,再用仪器复查并同时做血涂片染色显微镜复检,细致观察是否有血小板之间彼此聚集成片的现象。当镜检发现存在血小板大小异常时,应用流式细胞术激光散射荧光染色法进行血小板检测,此方法还可以有效避免小红细胞或红细胞碎片对血小板测定的干扰^[10]。对因 EDTA 依赖性血小板聚集等引起的血小板假性减少,采用更换抗凝剂(用枸橼酸钠)抗凝或者是采用零添加抗凝剂试管,在仪器旁采血,选择手动模式快速检测来纠正。必要时也采用经典的计数盘人工显微镜计数方法,来准确计数血小板数量^[4]。

综上所述,根据中国人群血小板生物参考区间,将血小板复检规则由血小板小于 $80 \times 10^9/L$ 修改为血小板小于 $125 \times 10^9/L$ 是正确的。提高的复检率,适合本院实验室血细胞分析的需求。修定的血小板复检规则在提高复检率的同时,保证了检验结果的正确性和可靠性。希望通过全新的血小板显微镜复检规则,将更加准确可信的检测结果反馈给临床,更好地指导临床诊断及治疗。

参考文献

- [1] 黄媛,黄春梅,李建英,等. XN-2000 血液分析仪低值 PLT 计数复检规则的制定[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(1): 48-51.
- [2] 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.

T2DM 中,UMA 均是 DR 的一个重要的风险因素^[6-7]。

本研究中,随着 DR 的发展,即在 DR 的不同进展阶段,UMA 逐渐增高,提示 DR 的发展与肾功能进行性损伤联系密切。此外,在 T2DM 患者中,随着 DR 的发展,CRP 水平逐渐升高,且与 UMA 呈显著正相关,提示 DR 患者 UMA 增高与慢性炎症有关。新近的一项研究对包含 5 127 例亚洲多种族人群的观察发现,CRP 作为炎症因子可加重 UMA 排泄率,升高的 CRP 水平和 UMA 及大量清蛋白尿均呈独立正相关,且该相关性不依赖于糖尿病、高血压等其他疾病^[8]。此外,大量的研究数据表明,在 DN 患者的肾组织,血清或尿液中,相关炎症因子如 CRP、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-18 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等均呈显著高表达^[9]。有研究还发现,CRP 能够刺激视网膜血管内皮细胞产生过量的氧自由基,使细胞膜上的脂肪酸产生过氧化物,引起血管内皮细胞功能损伤,视网膜血管逐渐形成^[10]。因此,CRP 在包括 DR 及 DN 的糖尿病微血管并发症的发生发展中起着重要作用。

本研究还显示,在包括 NDR、NPDR 及 PDR 的所有 T2DM 患者中,UMA 和 CRP 与病程、FBG、HbA1c 及 HOMA-IR 均呈显著正相关,提示随着 T2DM 的进展,高糖血症及胰岛素抵抗程度影响 DR 患者 UMA 及炎症水平,且它们可能通过相互作用影响患者的肾功能。FBG 及 HbA1c 均为反映糖尿病患者血糖控制状况的指标,并且与 HOMA-IR 关系密切,与 FBG 相比,HbA1c 的个体差异较小,且可以反映患者过去数周的血糖控制情况。Hsu 等^[11]一项前瞻性队列研究表明,T2DM 患者的 HbA1c 水平和 UMA 呈独立正相关。该研究团队的另一项研究显示,T2DM 患者的 HOMA-IR 与 UMA 呈显著正相关,且胰岛素抵抗程度能独立预测 UMA 水平^[12]。Bahceci 等^[13]研究表明,炎症、高糖血症及胰岛素抵抗均为 T2DM 患者发展为心血管疾病的风险因素,且三者有协同效应,该研究同样显示 CRP 与 FBG、HbA1c 及 HOMA-IR 呈正相关,与本研究结果一致。

总之,本研究显示 DR 患者 UMA 和 CRP 水平升高且呈正相关,两者均与 FBG、HbA1c 及 HOMA-IR 呈正相关,提示 DR 的发展与肾损伤联系密切,慢性炎症、高糖血症及胰岛素抵抗可能通过影响肾功能参与 DR 的发生与发展,且三者可能有协同作用。

参考文献

[1] Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease[J]. Br J Ophthalmol, 2002, 86(4): 363-365.

[2] Tarr JM, Kaul K, Chopra M, et al. Pathophysiology of diabetic retinopathy[J]. ISRN Ophthalmol, 2013, 20(13): 343-360.

[3] Mita T, Watada H, Uchino H, et al. Association of C-reactive protein with early-stage carotid atherosclerosis in Japanese patients with early-stage type 2 diabetes mellitus[J]. Endocr J, 2006, 53(5): 693-698.

[4] Chuengsamarn S, Rattanamongkolgul S, Jirawatnotai S. Association between serum uric acid level and microalbuminuria to chronic vascular complications in Thai patients with type 2 diabetes[J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(2): 124-129.

[5] Zhang H, Wang J, Ying GS, et al. Diabetic retinopathy and renal function in Chinese type 2 diabetic patients[J]. Int Urol Nephrol, 2014, 46(7): 1375-1381.

[6] Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Reyes-Torres J, et al. Relationship between diabetic retinopathy, microalbuminuria and overt nephropathy, and twenty-year incidence follow-up of a sample of type 1 diabetic patients[J]. J Diabetes Complications, 2012, 26(6): 506-512.

[7] Boelter MC, Gross JL, Canani LH, et al. Proliferative diabetic retinopathy is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes[J]. Braz J Med Biol Res, 2006, 39(8): 1033-1039.

[8] Sabanayagam C, Lee J, Shankar A, et al. C-reactive protein and microalbuminuria in a multi-ethnic Asian population[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(4): 1167-1172.

[9] Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF. Diabetic nephropathy and inflammation[J]. World J Diabetes, 2014, 5(3): 393-398.

[10] Tomic M, Ljubic S, Kastelan S. The role of inflammation and endothelial dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy[J]. Coll Antropol, 2013, 37(Suppl 1): 51-57.

[11] Hsu CC, Chang HY, Huang MC, et al. HbA1c variability is associated with microalbuminuria development in type 2 diabetes: a 7-year prospective cohort study[J]. Diabetologia, 2012, 55(12): 3163-3172.

[12] Hsu CC, Chang HY, Huang MC, et al. Association between insulin resistance and development of microalbuminuria in type 2 diabetes: a prospective cohort study[J]. Diabetes Care, 2011, 34(4): 982-987.

[13] Bahceci M, Tuzcu A, Ogun C, et al. Is serum C-reactive protein concentration correlated with HbA1c and insulin resistance in type 2 diabetic men with or without coronary heart disease[J]. J Endocrinol Invest, 2005, 28(2): 145-150.

(收稿日期: 2015-11-11)

(上接第 1191 页)

[3] XE-2100 血细胞分析复检标准制定协作组. Sysmex XE-2100 自动血细胞分析和白细胞分类的复检规则探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(7): 752-757.

[4] 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: 136-137.

[5] 孙育. 96 例血细胞分析仪检测血小板计数假性减少原因分析与纠正[J]. 医学综述, 2013, 19(21): 4021-4022.

[6] 范小斌, 罗燕飞. 两种血小板计数方法的比较及其评价[J]. 广州医学院学报, 2012, 40(5): 59-61.

[7] 郑文芝. 临床基础检验学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012:

106-109.

[8] Dai Q, Zhang G, Lai C, et al. Two cases of false platelet clumps flagged by the automated hematology analyzer Sysmex XE-2100[J]. Clin Chim Acta, 2014, 429(4): 152-156.

[9] 李文雅, 郝明. 浅谈血涂片镜检在血常规检验中的重要意义[J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(12): 2744-2745.

[10] 凌勋, 周道银, 惠小阳, 等. 荧光染色法与电阻抗法检测血小板方法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(10): 717-718.

(收稿日期: 2016-01-28)