

特殊冷凝集标本对血细胞分析仪的影响及筛选方法

张俊峰 王彦春 魏殿军

作者单位:300211 天津市,天津医科大学第二医院检验科

【摘要】 目的 探讨冷凝集标本对血细胞分析仪检测结果的影响及有效的筛选和解决方法。**方法** 3 例冷凝集的血液标本经 37℃ 水浴后,首先用 SYSMEX 800i 进行检测,然后对结果仍异常的标本采用 3 种不同的仪器进行检测,并以手工镜检法为标准对检测结果进行比较。用 SYSMEX XN2000 自带的 Laboman EasyAccess 6.0 软件对冷凝集标本进行筛查分析。**结果** 3 例冷凝集标本经水浴后,2 例检测结果恢复正常。另外 1 例在不同血液分析仪上表现不一,与手工镜检法比较,RBC 在迈瑞 BC-3000 上检测的结果偏低,在 SYSMEX 800i 上偏高;WBC 在 SYSMEX 800i 上检测结果偏高,NEUT 在迈瑞 BC-3000 上的检测结果偏高,而在 SYSMEX 800i 偏低;LYMPH 在迈瑞 BC-3000 和 SYSMEX 800i 上的检测结果均偏低。所有指标在 SYSMEX XN2000 上的检测结果与手工镜检法基本一致。采用显微镜湿片观察法观察冷凝集标本,可在镜下看到血细胞逐渐分裂开并以各自的中心聚集。采用 Laboman EasyAccess 6.0 软件计算 MCH 和 MCHC,当 MCHC>400 g/L 时,可筛查出冷凝集标本。**结论** 冷凝集标本对不同血液分析仪的检测可能产生不同的影响,MCHC 结合湿片镜检法可作为冷凝集标本有效的筛选方法,37℃ 热水浴法为处理冷凝集标本的有效方法,采用准确度高的血细胞分析仪检测处理后的冷凝集标本可得到准确可靠的实验结果。

【关键词】 冷凝集;冷凝集素;血细胞分析仪;平均红细胞血红蛋白浓度;筛选
doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2015.02.017

冷凝集是指患者血液中含冷凝集素,当低于某个温度时血细胞发生凝集,当温度恢复到 37℃ 时,凝集消失,这种可逆的现象称为冷凝集现象。随着血液分析仪的更新换代、检测准确度的不断提高以及标准化操作流程的规范使得血常规复检率很低。对门诊量较大的医院,血常规常采用即采即测的方式,当检验结果明显异常时,可能是标本出现冷凝集现象,一般认为重新采血后立即上机检测可以排除冷凝集素的干扰,但笔者在工作中仍发现 3 例“即采即凝”(血液离体后即发生凝集,立即上机检测结果异常,但凝块要在数分钟后才会出现)的冷凝集标本。此类标本在门诊很容易漏检,特别是当采血管管壁呈细颗粒状时,外观与正常血相似,不容易发现异常,而且本文研究发现经热水浴处理后的某些标本仍能对不同血细胞分析仪的检测产生影响。在实际工作中,虽然此类标本很少,但若不及时发现,容易发出错误的报告,影响临床诊疗,甚至会出现严重的医疗事故,因此需引起重视。本文对我院 3 例冷凝集标本的检测处理方法进行总结,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 3 例即采即凝的血液标本,其中 2 例为我院门诊检测血常规的患者,1 号标本来自男性患者,2 号标本来自女性患者,年龄为 40~50 岁;另 1 例为我院在社区义诊时检测血常规的女性患者,68 岁,自述多次检查 RBC 数偏低。3 例标本均无脂血、溶血、黄疸,且排除其他特征性疾病。

1.2 仪器与试剂 采用日本 SYSMEX 800i 和 SYSMEX XN-2000 自动血细胞分析仪及配套试剂,迈瑞 BC-3000 血细胞分析仪及配套试剂检测 WBC、RBC、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、平均红细胞容积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)和血小板(platelet, PLT);采用 OLYMPUS CX21 双目显微镜进行 WBC、RBC 和 PLT 计数。仪器使用前均已校准,测定配套质控物,结果也均在靶值允许的范围内。

1.3 方法

1.3.1 仪器法 采用 EDTA-K₂ 抗凝剂的真空采血管于肘静

脉处采集静脉血 2 ml, 混匀后立即用 SYSMEX 800i 血细胞分析仪进行检测, 实验室温度恒定在 25 ℃。首先, 标本检测完后放在 37 ℃水浴, 30 min 后观察未发现管内壁有凝集颗粒, 混匀后立即上机检测, 其次, 对于结果异常的标本分别用 SYSMEX 800i, SYSMEX XN2000 和迈瑞 BC-3000 血细胞分析仪进行检测, 检测过程进行严格保温。每种仪器重复做 3 次, 取平均值。

1.3.2 手工法 严格按照《临床检验基础实验指导》第 2 版^[1]操作规程分别对 RBC、WBC、PLT 进行计数。37 ℃水浴 30 min 后同时制备血涂片 3 张, 推片后立即置于 37 ℃烤箱内烘干, 采用瑞氏染色进行白细胞分类计数^[2], 载玻片也应提前进行预热。

1.4 凝集素滴度测定 用生理盐水将血浆在 32 孔板上依次做 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32... 倍比稀释, 每孔 200 μl, 并于各孔加 4% 的自身 RBC 悬液 50 μl, 置 4 ℃冰箱过夜, 取出后轻轻摇动, 观察有无 RBC 凝块。若无凝块判为阴性, 有凝块判为阳性, 并报告无凝块时的最高稀释倍数。

1.5 MCH、MCHC 的计算 采用 Laboman EasyAccess6.0 软件对 MCH、MCHC 进行分析, MCH、MCHC 的计算公式如下。

$$MCH = Hb / RBC$$

$$MCHC = Hb / HCT = Hb / MCV \times RBC$$

当发生凝集时, RBC 诸多参数会受到影响, 由于 MCV 可能升高, 也可能正常; Hb 相对恒定, MCH、MCHC 变化较为明显且能体现 RBC 参数的基本信息, 因此以 MCH、MCHC 为代表

进行分析。

2 结果

2.1 3 例凝集标本对同种血液分析仪的影响 由表 1 可见, 3 例凝集标本经热水浴后, 1 号标本和 2 号标本的各项检测指标均恢复正常; 3 号标本的 RBC 和 PLT 参数恢复正常, 而 WBC 较水浴前有所降低。3 例标本 RBC 聚集形成的凝块大小均随滴度的增加有增大的趋势。3 号标本因凝集素对 WBC 产生不同影响, 故选用不同血液分析仪进行分析。

2.2 不同血液分析仪对 3 号凝集标本检测的比较 以手工镜检法为标准, 三种仪器检测结果与手工镜检法结果分别进行比较, 结果显示, 3 种仪器的 PLT 与手工镜检法结果无明显区别, 而迈瑞 BC-3000 和 SYSMEX 800i 的 NEUT% 及 LYMPH% 的检测方法与手工镜检法有所不同, 迈瑞 BC-3000 的 RBC 偏低, 而 SYSMEX 800i 的 WBC 偏高。SYSMEX XN2000 的 RBC、WBC、NEUT% 和 LYMPH% 结果与手工镜检法结果基本一致, 见表 2。

2.3 3 号标本水浴后三种仪器直方图与散点图的比较 迈瑞 BC-3000 的 RBC 偏低且 RBC 直方图的右侧有一个小波峰, 而其他两台仪器并没有出现, 说明 RBC 检测过程中又重新发生了聚集, 记录该实验室室温为 18 ℃(该患者为社区义诊时发现的, 该实验室仪器为迈瑞 BC-3000); SYSMEX 800i 的 WBC 计数偏高, 散点图显示异常; SYSMEX XN2000 的 WDF 和 WNR 散点图完整清晰, 见图 1~图 3。

2.4 显微镜湿片观察法检测 3 号标本的结果 将 3 号标本

表 1 3 例标本水浴前后 SYSMEX 800i 检测结果

编号	处理	WBC (10 ⁹ /L)	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/L)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/L)	PLT (10 ⁹ /L)	凝集素滴度	肉眼凝集
1	水浴前	6.94	0.94	146	95.7	155.3	1622	162		小凝块
	水浴后	6.89	4.25	142	95.2	33.4	351	157	1:2048	未见
	手工镜检法	6.90	4.30	-	-	-	-	155		-
2	水浴前	8.11	2.03	128	120.1	63.1	525	130		粗沙粒状
	水浴后	8.13	3.07	126	119.2	41.0	344	134	1:512	未见
	手工镜检法	8.10	3.10	-	-	-	-	130		-
3	水浴前	17.05	0.77	135	96.6	99.9	1810	421		细沙粒状
	水浴后	13.40	3.76	137	104.5	36.4	349	400	1:64	未见
	手工镜检法	5.70	4.10	-	-	-	-	400		-

表 2 3 种仪器与手工镜检法对 3 号标本检测的结果比较

不同仪器	RBC (10 ¹² /L)	WBC (10 ⁹ /L)	NEUT (%)	LYMPH (%)	PLT (10 ⁹ /L)	Hb (g/L)
迈瑞 BC-3000	2.16	5.30	50.8	35.6	414	135
SYSMEX 800i	3.76	13.40	27.8	46.6	400	137
SYSMEX XN2000	4.15	5.50	35.4	54.1	403	139
手工镜检法	4.10	5.70	40.0	51.0	400	-

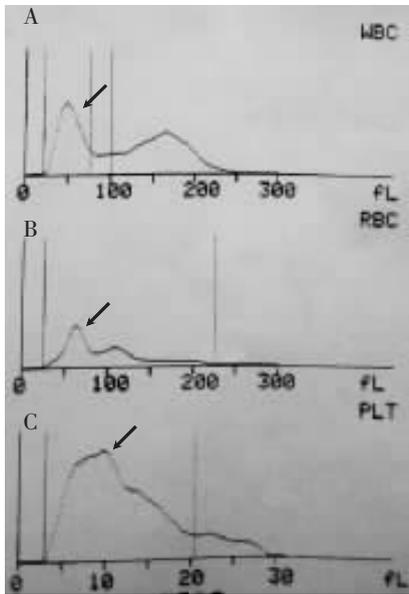


图 1 迈瑞 BC-3000 检测 3 号标本的血细胞直方图
注:A 箭头所示为 WBC;B 箭头所示为 RBC;C 箭头所示为 PLT

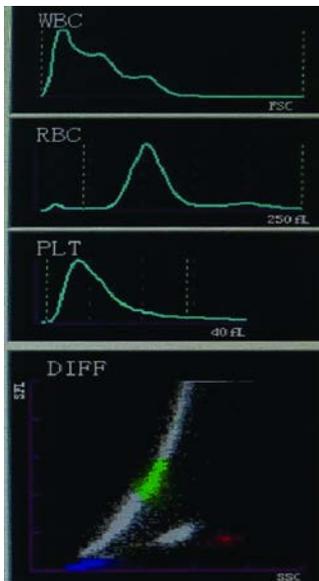


图 2 SYSMEX 800i 检测

3 号标本的血细胞直方图和 WBC 散点图

推片后立即在显微镜下观察,可以看到均匀的血细胞逐渐分裂开并以各自的中心聚集,各个细胞团之间仍存在散在的单个细胞,见图 4。

2.5 MCH、MCHC 的检测结果 用 SYSMEX NX2000 自带的 Laboman EasyAccess6.0 软件对我院 2013 年 11 月到 2014 年 5 月期间 SYSMEX NX-2000 上的 15 474 份血常规检测结果进行筛查性分析。当结果过滤条件设置为 MCH> 48 pg(超过上限值的 50%)时仍有 5 例,而某些透析的患者 MCH 可达 50 pg 以上,无特异性;当设置为 MCHC> 400 g/L(超过上限值的 10%)时,仅有待筛查的冷凝集标本与之吻合。

3 讨论

目前,冷凝集现象的报道已较为常见,如何解决冷凝集

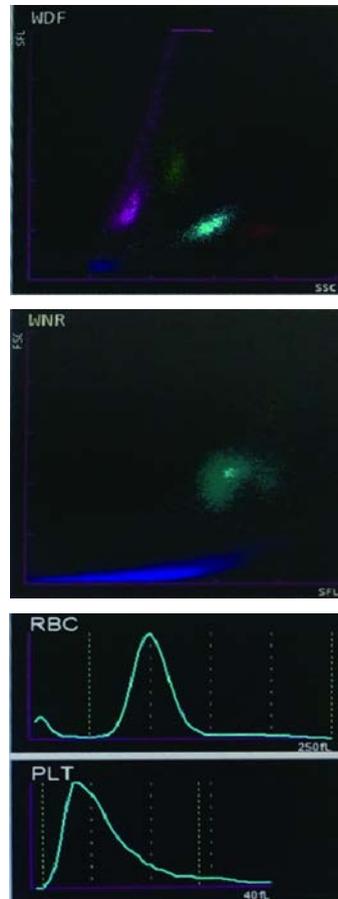


图 3 SYSMEX XN2000 检测

3 号标本的 WDF、WNR 散点图和 RBC、PLT 直方图

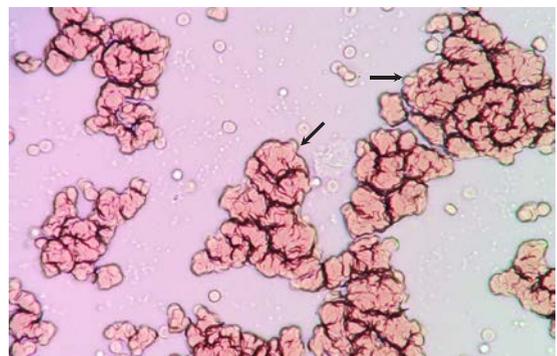


图 4 显微镜湿片观察法

观察 3 号标本的血细胞状态(×400,瑞氏染色)

注:箭头所示可见血细胞聚集

对血常规检测的影响,在以往的研究中多偏向于热水浴的方法,本实验中有 3 例冷凝集标本,1 例经热水浴后并不能完全解决问题,这与以往报道^[3]相一致。3 号标本对 3 种不同仪器的检测结果产生不同的影响,这可能与不同仪器的检测原理和所受的干扰因素不同有关。①迈瑞 BC-3000 无论重新采血还是热水浴后,RBC 均偏低且 RBC 直方图的右侧有一个小波峰,而其他两台仪器并没有出现,说明 RBC 经温度较低的进样针、反应器、检测器时又重新发生了聚集,这与室温有关,可见保证实验室温度很重要^[4]。而 WBC 在分类时也发生

错误,这与三分类分析仪的分类原理有关。冷凝集素不仅可以凝集 RBC,也可凝集 WBC 和 PLT^[5]。冷凝集素通过影响 WBC 大小而影响其分类。迈瑞 BC-3000 作为三分类分析仪的代表仍广泛使用于一级医院,除直方图外可供参考的信息较少,很容易误诊漏诊。②SYSMEX 800i 采用核酸荧光染色和前向散色光两种方法同时对 WBC 进行计数,WBC 计数偏高主要与 RBC 膜质溶解不全有关^[6];③SYSMEX XN2000 采用双荧光染料,3R 复检规则、检测速度快等优点,从而保证了结果的准确性。一般来说,设计更精密的仪器由于方法学上的先进性使其受干扰的因素少,从而结果准确性更高^[7]。

本文研究认为即采即凝标本的发现要比解决冷凝集素干扰更具有临床意义,而冷凝集标本的判定不能仅从肉眼对标本的外观来判断,应选择一种有效的筛查方法最大范围的避免临床的误诊漏诊。由于 SYSMEX XN2000 的准确度和重复性较好,所以用其自带的 Laboman EasyAccess6.0 软件进行筛查,由于该仪器采血量较大,筛查标本排除 5 岁以下儿童及新生儿。选用 MCHC 作为筛选指标有 3 个理由:①通过软件筛查发现 MCHC 相对特异;②公式计算法: $MCHC = HB / HCT = HB / RBC \times MCV = HB / RBC \times (V1 + V2 + V3 + \dots + Vn) / RBC = HB / V1 + V2 + V3 + \dots + Vn$, $n = RBC$ 数,正常情况下血液分析仪是把细胞看作或者处理为球形检测的,冷凝集时,正常 RBC 为双凹盘状,可抽象的看成“碟子”,冷凝集的程度与“碟子”叠在一起的程度有关;③丛玉隆等^[8]认为 MCHC 是一个相对恒定的值,其浮动均值可以用于质控的监测。所以当 SYSMEX XN2000 上 $MCHC > 400 \text{ g/L}$ 时要高度怀疑是冷凝集标本,此时可重新采血后立即湿片镜检,观察显微镜下 RBC 是否发生聚集。由此可见,MCHC 不仅可以作为贫血指标进行检测,而且应作为一个常规指标对冷凝集进行筛查。

温度、滴度与冷凝集现象存在一定的关系。冷凝集素具有宽热辐的特点,国内外^[9-12]有 37℃、35.6℃及 4℃时发生冷凝集的报道,且本文中 3 例标本温度阈值较高。冷凝集素滴度在很低时亦可发生凝集,国外^[12,13]有滴度在 1:8,1:64 时发生凝集文献报道。当滴度大于 1:2000 时出现肉眼可见的凝块^[14],结合本文研究的结果,我们认为凝集块的大小与冷凝集素的滴度有关,凝集发生与否与温度有关。

对冷凝集标本处理的方案有很多种,并没有固定的模式,应结合实际情况考虑。目前主要方法有重新采血立即检测法、37℃热水浴法、血浆置换法、血浆置换和水浴结合法,本文研究采用热水浴加高型号 SYSMEX XN 系列分析仪,结合 WDF、WNR 散点图也得到满意的检测结果。

综上所述,虽然现在的血液分析仪已达到了相当完善的

程度,但仪器提供的信息只是一种提示,不能代表标本的真实情况。在标本量较大的医院,尤其是门诊可先用 MCHC 加湿片观察法进行筛查,然后尝试热水浴后用 SYSMEX XN 系列进行检测,结合 WDF、WNR 散点图和仪器提示信息进行判断,以提高实验室的工作效率。但我们在工作中不能盲目的依赖机器,必要时仍需要手工镜检确认、修正后才能发出完整的检验报告,为临床的诊治提供准确可靠的实验室依据。

4 参考文献

- 1 刘玉成,主编.临床检验基础实验指导.第 2 版.北京:人民卫生出版社,2003,14-15,27-31.
- 2 丛玉隆,王淑娟,主编.今日临床检验学.第 1 版.北京:中国科学技术出版社,1998,73-74.
- 3 张时民.一例严重冷凝集标本的血常规检验解决方案.实用检验医师杂志,2011,2:122-124.
- 4 骆婷婷.一例冷凝集标本在不同温湿度中检测结果分析.检验医学,2013,28:955-956.
- 5 唐仁强.红细胞冷凝集对全自动血细胞分析仪检验结果的影响.国际检验医学杂志,2013,34:767.
- 6 陈斌,周小棉.全自动血细胞分析仪中白细胞假性计数研究进展.国际检验医学杂志,2009,30:240-241,244.
- 7 曾素根,余江,曾婷婷,等. Sysmex 公司血液分析仪的干扰因素分析判断及处理程序.检验医学,2010,25:244-246.
- 8 丛玉隆,金大鸣,王鸿利,等.中国人群成人静脉血细胞分析参考范围调查.中华医学杂志,2005,83:1201-1205.
- 9 赵玉平,徐艳,沈琳,等. Ham's 试验阳性的自身免疫性溶血性贫血实验指标分析.罕少疾病杂志,2004,11:1-3.
- 10 曾令军,李莉,吴庆,等.高效价冷凝集素对血常规检测结果的影响及消除方法探讨.罕少疾病杂志,2011,18:2-6.
- 11 Jeong J, Lee HK, Choi ES, et al. Acute exacerbation of cold agglutinin disease during operation. Korean J Anesthesiol, 2013, 65: S125-S126.
- 12 Kalra A, Singh K, Sahoo M, et al. Cold agglutinin disease detected during open heart surgery. Indian J Hematol Blood Transfus, 2014, 30: 62-63.
- 13 Ercan S, Caliskan M, Koptur E. 70-year old female patient with mismatch between hematocrit and hemoglobin values: the effects of cold agglutinin on complete blood count. Biochem Med (Zagreb), 2014, 24: 391-395.
- 14 Heni M, Saur SJ. Blood clotting at room temperature in cold agglutinin disease. Blood, 2013, 121: 4975.

(收稿日期:2015-04-17)

(本文编辑:张志成)