

cell cycle entry[J]. J Exp Med, 2012, 209 (13): 2409-2422.

[22] Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate[J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6321-6329.

[23] Fiegler N, Textor S, Arnold A, et al. Downregulation of the activating NKp30 ligand B7-H6 by HDAC inhibitors impairs tumor cell recognition by NK cells[J]. Blood, 2013, 122(1): 684-693.

[24] Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, et al. TGF- β and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells[J]. Brain, 2006, 129 (9): 2416-

2425.

[25] Baragaño Raneros A, Suarez-Álvarez B, López-Larrea C. Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: New targets for therapeutic intervention[J]. Oncoimmunology, 2014, 20(3): 28497.

[26] Kloess S, Huenecke S, Piechulek D, et al. IL-2-activated haploidentical NK cells restore NKG2D-mediated NK-cell cytotoxicity in neuroblastoma patients by scavenging of plasma MICA[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(1): 3255-3267.

(收稿日期: 2015-02-08)

• 综 述 •

网织红细胞相关参数的临床应用进展及检测注意事项

罗 莹 综述, 黄小虎 审校

(海口市职业病防治所检验科, 海南海口 570102)

关键词: 网织红细胞; 相关参数; 进展; 注意事项

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 15. 050

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)15-2244-03

网织红细胞(RET)是未完全成熟的红细胞,胞质内有残存的嗜碱性物质 RNA。RET 数量变化是反映骨髓造血功能的重要指标之一。近年来随着高端血细胞分析仪的普遍应用,扩大了 RET 的检测范畴,RET 相关参数的检测提供了大量的分析参数和研究信息,主要用于评估骨髓造血功能,同时也作为贫血、放疗化疗所致的骨髓抑制性贫血或疾病的诊断、治疗和监测观察等初筛指标。为保证结果的准确性,要重视检测的注意事项。

1 RET 检测技术的进展

1983 年,随着 Tanke 等^[1]应用流式细胞仪检测 RET,宣布 RET 检测进入新的时代。近年中高端全自动血液分析仪相继问世,推出 RET 相关参数的检测,则临床对 RET 参数的应用越来越广泛。运用全自动流式血细胞分析仪或全自动血细胞分析仪测得红细胞,可获得 RET 百分比(RET%)、RET 绝对值(RET#)、未成熟 RET 指数(IRF)、RET 成熟指数(RMI)、平均 RET 体积(MRV)、平均球形红细胞体积(MSCV)、高荧光强度 RET 百分比(HFR%)或绝对值(HFR)、中荧光强度 RET 绝对值(MFR)和低荧光强度 RET 绝对值(LFR)、RET 平均血红蛋白量(ChR)和 RET 血红蛋白含量(RET-He)等参数。大量研究证实^[2-4],运用全自动血液分析仪检测 RET 及其荧光强度的变化,主要用于评估骨髓造血功能,也可以作为某些贫血、放疗化疗所致骨髓抑制性贫血和恢复等疾病的较敏感指标,同时在某些疾病监测和预后中也具有重要的临床应用价值。

2 RET 相关参数解读

在分析骨髓造血状态的血液学参数中,RET 优于白细胞计数和血小板计数,而 RET%是评价红系造血最简单有效的方法;相比之下,RET#更准确反映红系造血功能;IRF 是光散射法血液分析仪采用流式激光细胞数和半岛体激光荧光染色技术测量 RET 内 RNA 含量,根据 RNA 与荧光染料结合后发出荧光强度得出 HFR、MFR、LFR 三种参数,荧光强度越强,RET 越幼稚。IRF 为 MFR 和 HFR 之和在三种荧光染色强度 RET 中的比例,计算公式: $IRF = (MFR + HFR) / (MFR +$

$HFR + LFR)$,其变化较 RET#变化更具有重要意义;RMI 为 HFR 和 MFR 之和与 LFR 之比值,计算公式: $RMI = (HFR + MFR) / LFR \times 100\%$,其临床意义与 IRF 相同;因 RET 是未成熟的红细胞,其体积往往大于正常红细胞,而 MRV 是观察促红细胞生成素疗效的稳定且较灵敏的指标,与 MSCV 联合应用于鉴别诊断遗传性球形红细胞增多症;HRL%或 HRL 是反映骨髓抑制和恢复的一项非常敏感的指标^[5];ChR 可实时评价骨髓红系造血的功能状态,是反映缺铁性贫血的灵敏指标,反映体内铁蛋白代谢的最新状态,该指标在贫血诊断与疗效观察中具有重要意义^[6-7];RET 和 IRF 仅反映 RET 数量变化,而 RET-He 则反映 RET 的质量变化,在缺铁性贫血治疗过程中具有更重要的意义,而且当机体处于炎症状态时该指标仍不受影响,RET-He 已越来越多地受到国内外学者的关注^[8]。

3 RET 相关参数的临床意义

RET 相关参数直接反映了骨髓红系的造血功能,目前主要在评价骨髓增生能力、判断贫血类型、评价贫血疗效和骨髓移植前后监测、放疗和化疗的监测、某些疾病以及药物疗效等方面临床参考价值。

3.1 评价骨髓增生能力 健康成人 RET 参考区间 $(24 \sim 84) \times 10^9 / L$,RET 增多,表示骨髓造血功能旺盛,各种增生性贫血均可增多,溶血性贫血增加尤为显著;而 RET 减少,是无效红细胞造血的指征,见于非增生性贫血,如铁、铜、维生素 B6、维生素 B12 缺乏、慢性病贫血,如慢性炎症、恶性肿瘤、慢性肾衰竭、再障等。

3.2 判断贫血类型 余寿益等^[9]研究发现,缺铁性贫血(IDA)患者 RET 相关参数中 RET%、RET#、IRF、HFR%、HFR 较健康对照组稍高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);而 MRV、MSCV 较健康对照组低($P < 0.01$),从而证实 IDA 患者 RET 参数与成熟红细胞参数均呈小细胞性变化,也证实此类患者外周血红细胞平均体积明显减低这一事实。溶血性贫血患者由于骨髓代偿能力明显增强,大量新生的 RET 释放到外周血中,导致外周血中 RET#及 HFR 明显增多,最多可占红系 70%以上^[9],其相关参数都显著增高,能提示溶血的严重程

度和类型^[10]。肾性贫血的主要因素为促红细胞生成素(ERO)合成障碍,除 IRF%较健康对照组低外,其他参数与健康对照组差异无统计学意义^[11]。RET 减少为再生障碍性贫血诊断依据之一,参数除 MRV、MSCV 外,其他参数较健康对照组低($P<0.01$)^[12]。在大细胞贫血(如巨幼细胞性贫血、恶性贫血、骨髓增生异常综合征)诊断中,未经药物治疗和输血的情况下,大细胞贫血 IRF 明显增高^[13],LFR 轻度降低、MFR 和 HFR 升高^[14]。

3.3 骨髓移植后监测骨髓造血恢复 进行骨髓移植后第 21 天,通常网织红细大于 $15\times 10^9/L$ 表示无移植并发症;如骨髓开始恢复造血功能,主要敏感指标为 HFR 和 MFR 的升高,而后 RET 升高。因此 RMI 的改变更为灵敏。临床上通常采用 RET%和中性粒细胞绝对值(ANC)进行骨髓移植后造血功能恢复的监测,但 RET 从释放到进入血液循环过程中影响因素较多,需时较长,而 ANC 的缺陷是在临床感染和排斥反应时也会受到影响。骨髓移植后监测造血功能恢复的研究发现,首先增高的是 HFR 和 IRF,其次是 ANC,再次是 RET%和白细胞总数,最后是血小板^[15]。因此,HFR 和 IRF 在骨髓移植后造血功能恢复早期监测优于白细胞、血小板、RET%和 ANC。

3.4 放疗和化疗中造血功能的监测 肿瘤放疗、化疗过程中监测骨髓造血功能的抑制与否,RET 分析优于传统的外周血小板和白细胞监测,因放、化疗患者极易受到感染,白细胞情况不能准确如实反映患者造血功能状况,而且 HFR 的增高较白细胞的增加早数天,进行 RET 的动态观察可以指导临床适时调整治疗方案,避免造成严重的骨髓抑制。长期化疗如导致骨髓抑制,HFR 和 MFR 降低早于血小板和白细胞,停止治疗至第 15 天后,HFR 和 MFR 上升至正常范围,早于 RET 和白细胞^[16]。有研究报道,恶性肿瘤患者开始化疗后,如出现骨髓抑制,RET#下降,随后 HFR 和 MFR 也逐步降至最低水平,此时 RET 几乎全部由 LFR 构成;停止化疗后第 15 天,MFR 首先开始升高,HFR 在 1 d 后随之升高,直至第 25 天后,RET#升高至接近正常水平^[17]。因此,IRF 的动态观察可指导临床在放疗和化疗过程中适时调整治疗方案,避免造成严重的骨髓抑制。

3.5 肝硬化患者骨髓造血功能评判指标 肝脏有储藏血液和调节血量的功能,当肝脏发生病变时,吸收营养和代谢能力相应减退,易造成机体营养不良以及维生素 B12、叶酸和铁等营养成分缺乏,最终导致巨幼细胞性贫血^[18]或缺铁性贫血。有研究报道,肝硬化组和健康对照组间 RET%和 IRF 比较差异有统计学意义($P<0.05$),因此 RET%和 IRF 可作为反映肝硬化患者骨髓造血功能监测的指标^[19]。

3.6 急性心肌梗死住院患者病死率的预测因子 有研究报道,心肌梗死组 RET#高于健康对照组;心肌梗死 RET#增高组住院病病死率高于 RET#正常组。因此,RET#增高可作为急性心肌梗死住院患者病死率增加的预测因子^[20]。

3.7 RET 的效应药物 RET% $>1.5\%$;铁剂、维生素 B12 和叶酸;RET% $<0.5\%$;硫唑嘌呤、氯霉素、卡马西平。

4 RET 及其相关参数检测的注意事项

4.1 放置时间对检测结果的影响 由于临床要求进行 RET 及其相关参数检测的标本量少,有些实验室会集中几天的标本统一进行检测,刘艳红等^[21]研究发现,非贫血患者采血后至 72 h 内,RET#和 RET%检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),IRF%、HFR%、MFR%、LFR%的结果至 72 h 时检测结果开始出现明显变化;贫血患者 RET#和 RET%采血后 48 h 内检测结果差异比较无统计学意义($P>0.05$),而 72 h 时出

现明显降低,IRF%、HFR%、MFR%、LFR%的结果从 24 h 时即出现明显改变。因此,原则上对凡需要进行 RET 及其相关参数检测的标本,最好在 24 h 内检测方能确保结果的准确性。

4.2 存放温度对检测结果的影响 由于 RET 离体后会在体外继续从 HFR、HFR 至 LFR 发育成熟,因此 LFR 转变为成熟 RBC 导致 LFR 的减少和 HFR、MFR 的相对比例增加,而 RET 总量会逐渐减少^[22]。杨平等^[23]研究发现,标本在 2~8℃条件下保存,RET%、RET#、HFR%和 IRF 在 72 h 内无明显变化;而在 18~25℃条件下保存,24 h 后各参数结果明显减低,这可能是由于室温条件下,细胞代谢快,RET 成熟较快所致;IRF 在低温条件下能稳定 72 h,在室温时,48 h 后结果明显减低;MRV 和 MSCV 两项参数无论在高温或室温保存,24 h 后检测结果明显升高。

4.3 检测方法对结果的影响 RET 计数的方法 ICSH 及我国卫生部临床检验中心推荐使用 Miller 窥盘计数法,由于计数中所能达到的最低可信限随着计数细胞总数的增加而增高,因此,在全自动血液分析仪准确的前提下,其计数的总数远远大于手工 Miller 窥盘计数法,其最低可信限也明显高于手工法。另外 Miller 窥盘计数法还受到染液的质量、涂片的薄厚、染色的效果有关,受到人为因素影响较大;相比之下,全自动分析法测定 RET 具有精密度好、准确度高、检测速度快、标本不需预处理等优点。

4.4 药物影响 许多药物可引起外周血 RET 变化,可导致 RET 假阳性的药物有解热药、氯喹、左旋多巴、奎宁等;导致 RET 假阴性的药物有硫唑嘌呤、氯霉素、甲氨嘌呤等^[24]。

5 小 结

高端全自动血液分析仪具有分析 RET 及其参数功能,为临床各种疾病的诊断、治疗监控和预后提供了越来越丰富的信息,随着 RET 新参数的不断发展,将带来更加广阔的医学研究方向和应用前景,值得推广应用。

参考文献

- [1] Tanke HJ, Rothbarth PH, Vossen JM, et al. Flow cytometry of reticulocytes applied to clinical hematology[J]. Blood, 1983, 61(6):1091-1097.
- [2] 黄少莹,陈梅,卢淮武.地中海贫血患者网织红细胞检测参数的临床意义.实用医技杂志,2007,14(11):1403-1404.
- [3] 李玉芹,杨明清,钟亚玲,等. RET/IRF 和 MCV/RDW 及骨髓检查联合检测在贫血诊断中的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2008,12(7):879-880.
- [4] 蔡应木,熊晓阳,林静华,等. RET、HLR、IRF 作为外周血干细胞移植后骨髓造血重建指标的应用研究[J]. 中国校医,2008,22(2):205-206.
- [5] 彭黎明,杨慧,江虹,等. Sysmex RAM-1 与 FCM 定量分析网织红细胞的比较研究. 华西医科大学学报,2002,33(3):456-460.
- [6] Fishbane S, Galgano C, Langley RC Jr, et al. Reticulobin content in the evaluation of iron status of hemodialysis patients[J]. Kidney Int, 1997, 52(1):217-222.
- [7] 孙学健. 网织红细胞的新参数[J]. 临床和实验医学杂志, 2007, 6(6):160-161.
- [8] 黄少莹,王月芳,杨慧,等. 1-3 岁健康儿童年龄相关的网织红细胞血红蛋白含量参考范围的测得[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(7):767-770.
- [9] 余寿益,田华琴,陈海生. 缺铁性贫血患者网织红细胞参数测定临床意义[J]. 医药论坛杂志, 2006, 27(11):17-19.
- [10] 徐勇,张婕婕. 地中海贫血患者网织红细胞多参数分析的意义[J]. 国外医学:临床生物学与检验学分册, 2005, 26(1):1-2.

[11] 吴惠玲,张大莲,高晓玲,等. 肾性贫血患者网织红细胞参数的变化及临床意义[J]. 现代诊断与治疗,2008,19(6):324-325.

[12] 袁利月,宋欣,诸越谨. 不同类型贫血患者网织红细胞相关参数检测及临床意义[J]. 现代实用医学,2012,24(5):533-534.

[13] 汪建军,余艳丽,任超杰,等. 网织红细胞参数在大细胞贫血诊断中的初探[J]. 临床输血与检验,2013,15(1):39-41.

[14] 黄开泉,张淑芳,刘漪. 贫血患者网织红细胞及其荧光强度检测的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(10):879-881.

[15] 虞秀兰,何友华,王雪明. 未成熟网织红细胞参数在骨髓移植中的应用[J]. 中国血液流变学杂志,2005,15(4):668-670.

[16] 顾瑛,刘薇芬,雷鸣. 肿瘤患者化疗构成中网织红细胞参数的动态分析[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(12):1136-1137.

[17] 郭学松,王潮,蔡姝. 网织红细胞成熟指数在恶性肿瘤化疗前后动态变化的临床意义[J]. 现代医药卫生,2011,27(10):1497-1498.

[18] 储洁,黄先国. 网织红细胞相关参数在肝脏疾病的临床应用[J]. 安徽医科大学学报,2004,35(5):409-410.

[19] 林静华,焦晓阳,陈晓洁,等. 网织红细胞参数在肝硬化患者中的变化及意义[J]. 中国热带医学,2008,8(6):975-976.

[20] 郑扣龙,张清. 急性心肌梗死患者外周血网织红细胞绝对值的相关研究[J]. 黑龙江医药,2010,16(23):924-925.

[21] 刘艳红,李艳,何颖,等. 静脉全血放置时间对网织红细胞参数结果的影响[J]. 检验医学,2013,28(2):134-136.

[22] 李雪光,梁月桂,王薇,等. 采血后体外放置时间对网织红细胞计数的影响[J]. 中华检验医学杂志,1996,19(6):32.

[23] 杨平,贾娟,李桂才,等. 温度及存放时间对网织红细胞计数的影响及实验室各参数参考值的建立[J]. 职业与健康,2013,29(11):1335-1337.

[24] 刘成玉. 临床检验基础[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2013:39.

(收稿日期:2015-05-10)

• 综 述 •

布鲁菌感染临床实验诊断技术研究进展

贾 微¹综述,陶元勇^{2△}审校

(1. 潍坊医学院医学检验学系,山东潍坊 261053;2. 潍坊医学院附属医院检验科,山东潍坊 261031)

关键词:布鲁菌病; 诊断; 检测

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 15. 051

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2246-03

布鲁菌病是由布鲁氏杆菌引起一种人兽共患传染病,感染的患者大多以长期发热、多汗、关节痛及肝脾肿大为主要症状。近年来,我国布鲁菌病形势严峻,发病率逐年增长,Li 等^[1]研究表明在 2004~2010 年间布鲁菌病的流行及复发呈现空间多相性分布,成年人发病男性多于女性,且多集中在 30~49 岁。另外,分布于中国北部的病患以农牧民居多,而在中国南方则主要集中于餐饮服务者,工人及退休人员,城市地区发病率有所上升。面临如此严峻的形势,加强临床实验室的检测力度并形成统一的筛选及确诊检验模式是十分重要的。本文就临床实验室的人类布鲁菌病检测研究进展作一综述。

1 细菌学培养技术

细菌学培养技术是临床实验室最常用的分离方法,是布鲁菌病疫情判定,临床诊断中最直接的证据。目前血液中布鲁氏菌的分离率呈上升趋势^[2]。现临床采取菌血症时期双侧双瓶的策略进行标本的留取,通常经 BACT/ALERT 3D 全自动血培养仪培养 3~5 d 左右,仪器需氧瓶阳性结果报警,转种至血琼脂平板经 37℃、5%CO₂ 培养 24 h,光滑型菌落形态为湿润、透明、光滑的小菌落,粗糙型为灰褐色粘稠状,镜下为细沙样革兰阴性球菌或球杆菌。经全自动细菌鉴定仪鉴定结果为布鲁氏菌。为了提高血培养的检出率,Mantur 等^[3]利用溶解离心技术使急性病例的检出率可达 91%,慢性病例可达 71%。除血培养之外,骨髓、脓液、关节液、滑囊液均报道分离出该菌^[4-5]。据报道,金亮^[6]在脑脊液标本中分离并鉴定出羊布鲁菌,提示临床医生如遇诊断不明的脑膜炎患者,应考虑脑脊液的细菌培养,以排除布鲁菌性脑膜炎。目前细菌学培养是分离布鲁氏菌的“金标准”,但由于其培养周期长,分离鉴定困难,因此易造成漏诊误诊。

2 免疫学检测技术

2.1 特异性血清凝集性试验

目前国内外用于检测诊断布鲁

菌病的特异性血清凝集性试验方法主要有平板凝集试验(PAT)、虎红平板凝集试验(RBPT)、试管凝集试验(SAT)。PAT 和 RBPT 在临床上主要用于早期大面积快速筛查^[7],SAT 是布鲁菌病血清学检测的定量试验,是我国法定布鲁菌病确诊试验^[8]。这些方法都是针对血清中布鲁氏菌脂多糖 O-链的抗体进行检测,但是其 O-链中含有的抗原位点与多种细菌极为相似,如小肠结肠炎耶尔森菌 O: 9^[9]、大肠埃希菌 O157: H7^[10]、假单胞菌 555、福氏土拉伦菌、鼠伤寒沙门菌^[11]、甲型副伤寒沙门氏菌^[12]等。因此存在的交叉反应造成的假阳性增加了鉴别上的困难。为此,国内外研究者对排除布鲁菌存在的交叉反应进行了诸多探索,如免疫斑点试验、抗原吸收试验、应用 McAb 鉴别试验等。因此,临床利用这些方法诊断时要充分考虑临床症状及交叉菌的检查排除。尽管如此,特异性血清凝集性试验的优点仍不能被忽视,其试剂稳定易保存,操作简便,且在国际上有统一的判定标准^[13],故广泛应用于临床医疗机构及疾控中心。

2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA) 我国从上世纪 80 年代初鲁齐发等就开启了 ELISA 方法在人类布鲁菌病诊断方面的诊断技术。他从布鲁菌病疫区获得的不同时期的布鲁菌病患者血清用 ELISA 进行检测,与 SAT 和 CFT 进行比较,得出在急性期、慢性期血标本 ELISA 试验的阳性率明显高于其他两种试验。同时 Mantecón Mde 等^[14]发现 ELISA 检测抗 S 型布鲁菌 LPS 的 IgG 已经被用作区分人类布鲁菌病的急慢性感染的参考指标,但仍需结合其他指标综合诊断。由于其酶的催化效率很高,可使测定达到很高的灵敏度,同时优化检测靶点,大大提高了检测的特异度,现国际上已成熟并广泛应用 ELISA 于人类布鲁菌病的诊断^[15]。目前,检测人类布鲁菌病的 ELISA 方法主要有间接 ELISA、夹心 ELISA、斑点 ELISA。

2.2.1 间接 ELISA(i-ELISA)

该法用于检测血清中布鲁杆