

• 首都医科大学专题 •

血涂片镜检法评估血小板聚集程度对血小板计数的影响

周 慧¹, 张骅阳^{2,3}

1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院医学检验科, 北京 100038;

2. 首都医科大学燕京医学院, 北京 100069; 3. 北京医院检验科, 北京 100005

摘要:目的 探讨通过血涂片镜检法评估血小板聚集程度, 并由此推算血小板计数假性减低的校正公式, 实现血小板的准确计数。方法 收集乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血发生血小板聚集, 同时枸橼酸钠抗凝血不发生血小板聚集的静脉血标本, 采用人工血涂片镜检法, 分析人工推片最佳推片血量、推片角度, 进行人机推片对比、人工推片重复性对比, 评估血小板聚集程度, 分析其与血小板计数假性减低程度的关系, 推算出血小板计数假性减低的校正公式。结果 45° 4 μ L 人工推片, 在体尾交界处观察 10 个油镜视野可更加客观地反映血小板聚集程度。通过回归方程的拟合, 血小板聚集率、血小板聚集数量、血小板聚集堆数与血小板假性减低程度呈良好的线性回归关系($R^2=0.905$)。可通过血涂片镜检法得出血小板聚集程度的 3 个参数, 利用回归方程计算出血小板假性减低的差值, 差值与已发生聚集的 EDTA-K₂ 抗凝血血小板数量之和, 即得出校正后的血小板数量。结论 通过血涂片镜检法计算血小板聚集率、血小板聚集数量、血小板聚集堆数 3 个参数, 可较好地校正血小板聚集造成的血小板计数假性减低, 实现血小板的准确计数, 该方法操作简便、经济, 具有较好的临床和基层应用价值。

关键词: 血涂片; 镜检法; 血小板聚集程度; 血小板计数假性减低**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.23.004 **中图法分类号:** R446.11**文章编号:** 1673-4130(2024)23-2834-05 **文献标志码:** A

Evaluation of the effect of platelet aggregation degree on platelet count by
blood smear microscopic examination

ZHOU Hui¹, ZHANG Huayang^{2,3}

1. Department of Laboratory Medicine, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Beijing Hospital, Beijing 100005, China

Abstract: **Objective** To explore the evaluation of platelet aggregation degree through blood smear microscopy and calculate the correction formula for false decrease in platelet count based on it, in order to achieve accurate platelet counting. **Methods** Venous blood samples with EDTA-K₂ anticoagulant causing platelet aggregation and sodium citrate anticoagulant not causing platelet aggregation. The manual microscopic examination of blood smears was used to analyze the optimal blood volume and angle for manual slide analysis. Human machine slide comparison and manual slide repeatability comparison were conducted to evaluate the degree of platelet aggregation, its relationship with the degree of false decrease in platelet count was analyzed, and the correction formula for false decrease in platelet count was calculated. **Results** The results showed that 45° 4 μ L of artificial smear, and observing 10 oil-immersion fields at the tail junction could more objectively reflect the degree of platelet aggregation. Through fitting of regression equations, platelet aggregation rate, platelet aggregation count, and platelet aggregation pile count showed good linear regression relationships with platelet pseudo-decrease ($R^2=0.905$). Three parameters of platelet aggregation could be obtained through blood smear microscopic examination. The difference in platelet pseudo-decrease could be calculated using the regression equation, the sum of the difference and the aggregated EDTA-K₂ anticoagulant platelet count result resulted in the corrected platelet count. **Conclusion** By using blood smear microscopy to calculate platelet aggregation rate, platelet aggregation quantity, and platelet aggregation pile number, three parameters could be effectively

corrected for false decrease in platelet count caused by platelet aggregation, achieving accurate platelet counting. The operation is simple, economical, and has good clinical and grassroots application value.

Key words: blood smear; microscopic examination; platelet aggregation degree; false platelet reduction degree of platelets

血小板计数作为临床检验最基础的检测项目之一,在心脑血管疾病、血栓类疾病、内分泌疾病及肿瘤患者的诊治中都起着重要的作用^[1-6]。但临床经常会出现因为血小板聚集而导致血小板计数假性减低的情况,可能造成对患者的误诊误治^[7-8]。血常规标本发生血小板聚集的原因包括血管外凝集、乙二胺四乙酸抗凝剂作用、冷凝集、老年人及孕妇的高凝反应、维生素 K₁ 等药物或饮食影响等^[9-11]。针对以上问题,检验人员通常采取重新采血、更换抗凝剂、加热温育、剧烈振荡^[12]、即刻采血即刻上机等方法纠正。但是这些方法存在增加与患者沟通难度、时效性差、破坏血液成分^[13]等问题,且在患者病情危重时无法实现。本研究从最基础的血涂片镜检法入手^[14],通过血涂片观察血小板聚集程度,结合电阻抗法检测血小板聚集前后血小板计数差值,推算血小板计数假性减低的校正公式,分析血小板聚集程度对血小板计数的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2023 年 9 月至 2024 年 3 月首都医科大学附属北京世纪坛医院就诊的 32 例患者,同时留取乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝静脉血标本 2 mL 和 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝静脉血标本 3 mL。所有标本均按照静脉采血行业标准规范采集,确认无凝丝凝块、无溶血、乳糜血、同侧抽血等影响试验结果的情况。所有标本均在室温条件下运输、检测和保存。

纳入标准:EDTA-K₂ 抗凝血血涂片镜检法可见血小板聚集,同时枸橼酸钠抗凝血血涂片镜检法无血小板聚集的患者。排除标准:(1)EDTA-K₂ 抗凝血和枸橼酸钠抗凝血血涂片镜检法均可见血小板聚集;(2)冷凝集、冷球蛋白血症等原因导致血小板以外的其他各系细胞出现自发聚集现象;(3)存在抽血不顺利或难以采血;(4)存在引起血小板计数假性增高原因[小红细胞,血管内溶血(大量红细胞碎片)];(5)存在引起血小板计数假性减低的其他原因(大血小板、冷凝集等)。根据纳入和排除标准,共纳入方法学研究标本 16 例,人机推片对比标本 16 例,人工推片重复性对比标本 20 例,血小板聚集程度与血小板计数假性减低程度相关性分析标本 32 例。

1.2 仪器与试剂 血小板计数仪器检测采用 Sysmex-XN9100 血细胞分析仪完成,应用 Sysmex XN-SP 推片机进行机器推片。将 EDTA-K₂ 抗凝血轻轻

颠倒混匀 8 次,人工制成血涂片,应用瑞氏染液对血涂片进行染色。观察视野选择血涂片体尾交界处,绝大部分红细胞呈较紧密单层排列、互不重叠。

1.3 方法

1.3.1 血涂片制备的方法学研究 (1)推片血量的影响:45° 4 μL,45° 7 μL,两种方法分别推片 1 张,分析两种情况的血小板聚集率及 10 个油镜视野下血小板聚集率变异系数(CV)的差异;(2)推片角度的影响:45° 4 μL,30° 4 μL,60° 4 μL,3 种方法分别推片 1 张,分析 3 种情况的血小板聚集率及 10 个油镜视野下血小板聚集率 CV 的差异;(3)人机推片对比:Sysmex-XN SP 推片机以 45° 4 μL 推片 2 张,作为参考基准,分析人工推片与机器推片两种方法的血小板聚集率及 10 个油镜视野下血小板聚集率 CV 的差异;(4)人工推片重复性对比:以 45° 4 μL 推片 3 张,若标本血小板聚集率 CV 在 8% 以内,即符合卫生行业标准《临床血液检验常用项目分析质量标准:WS/T406-2024》^[15]对于实验室的要求。

1.3.2 观察视野数的方法学研究 固定推片角度 45°,推片血量 4 μL,每张血涂片分别观察 10 个和 20 个油镜视野,分析 10 个油镜视野与 20 个油镜视野下血小板聚集率及其 CV。

1.3.3 血小板计数差值的计算 由于枸橼酸钠抗凝血中抗凝剂与血液比例为 1:9,为排除抗凝剂对血液标本的稀释作用,本试验将仪器测出的血小板数值除以 0.9 作为血小板计数的参照值(血小板未聚集),EDTA-K₂ 抗凝血(血小板已聚集)经仪器测出的血小板数值作为血小板计数的比较值,二者的差值作为本研究重要的分析指标,以下简称差值。

1.3.4 血小板聚集程度的评价 分析血小板聚集程度与差值之间的联系,并引入血小板聚集率、血小板聚集率 CV、血小板聚集总数、血小板聚集堆数、每堆血小板聚集数 CV、每堆血小板聚集数的中位数、最大一堆血小板聚集数 7 个参数作为自变量,进行多变量拟合回归方程。试验中记录观察到的每个油镜视野下血小板聚集的数量、血小板总数、每堆血小板聚集的数量,并计算得出以下参数:血小板聚集率=(油镜视野下发生聚集的血小板总数/油镜视野下血小板的总数)×100%;血小板聚集率 CV=参与计数的各个油镜视野血小板聚集率标准差/各个油镜视野血小板聚集率均数;血小板聚集总数=各油镜视野发生聚集

的血小板数量之和;血小板聚集堆数=各油镜视野血小板聚集成堆的堆数之和;每堆血小板聚集数 $CV = \text{每堆聚集中包含的血小板数量标准差} / \text{每堆聚集包含的血小板数量均值}$;并通过统计描述计算出每堆血小板聚集数的中位数,筛选出其中聚集血小板数量最多的为最大一堆血小板聚集数。

1.3.5 校正公式 通过血涂片的观察得出血小板聚集程度的参数,利用回归方程计算出血小板假性减低的差值,差值与已发生聚集的 EDTA- K_2 抗凝血血小板数量之和,即得出校正后的血小板数量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据处理及统计分析。采用 S-W 检验进行正态性检验, $P > 0.20$ 为符合正态分布;符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验,不符合正态分布的数据以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数秩和检验。回归方程拟合应用多元线性回归进行拟合,应用步进法 (stepwise) 进行自变量的筛选 ($P < 0.05$) 和剔除 ($P > 0.1$)。资料满足独立性、线性趋势、残差正态性和方差齐性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血涂片制备的方法学研究结果

2.1.1 推片血量的方法学研究结果 经 S-W 检验,差值符合正态分布 ($P > 0.20$),经配对 t 检验分析,推片血量 $4 \mu\text{L}$ 与推片血量 $7 \mu\text{L}$ 时血小板聚集率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但推片血量 $7 \mu\text{L}$ 时血小板聚集率 CV 大于推片血量 $4 \mu\text{L}$ 时 CV ($P < 0.05$)。因此,推荐采用 $4 \mu\text{L}$ 推片血量进行推片。见表 1。

表 1 推片血量 $7 \mu\text{L}$ 与 $4 \mu\text{L}$ 时血小板聚集率、血小板聚集率 CV 比较

项目	$\bar{x} \pm s$	t	P
$7 \mu\text{L}$ 血小板聚集率 (%)	55.561 ± 3.239		
$4 \mu\text{L}$ 血小板聚集率 (%)	54.568 ± 3.393	0.948	0.358
$7 \mu\text{L}$ 血小板聚集率 CV	0.759 ± 0.062		
$4 \mu\text{L}$ 血小板聚集率 CV	0.678 ± 0.068	2.411	0.029

2.1.2 推片角度的方法学研究结果 经 S-W 检验,推片角度 45° 与 60° 差值、推片角度 45° 与 30° 差值结果均不符合正态分布 ($P < 0.20$),经非参数秩和检验分析,推片角度 45° 与 60° 时血小板聚集率比较差异无统计学意义 ($t = 1.862, P = 0.063$),但推片角度 45° 与 30° 时血小板聚集率比较差异有统计学意义 ($t = 2.585, P = 0.010$)。因此,人工推片时角度不可过小。

推片角度 45° 与 60° 血小板聚集率 CV 差值、推片角度 45° 与 30° 血小板聚集率 CV 差值结果均符合正

态分布 ($P > 0.20$),经配对 t 检验分析,推片角度 45° 时血小板聚集率 CV 小于推片角度 60° 时血小板聚集率 CV ($t = -2.433, P = 0.028$)。因此,人工推片时,建议推片角度最好在 45° 左右,不可过大或过小。

2.1.3 人机推片对比的方法学研究结果 采用 S-W 检验,差值符合正态分布 ($P > 0.20$),经配对 t 检验分析,人工推片与机器推片血小板聚集率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但人工推片血小板聚集率 CV 大于机器推片血小板聚集率 CV ($P < 0.05$)。因此,推荐有条件的情况下,采用机器推片,可更好保证标准化。见表 2。

表 2 人机推片对比聚集率、血小板聚集率 CV 比较

项目	$\bar{x} \pm s$	t	P
人工推片血小板聚集率 (%)	54.568 ± 3.393		
机器推片血小板聚集率 (%)	54.101 ± 3.050	0.538	0.599
人工推片血小板聚集率 CV	0.759 ± 0.062		
机器推片血小板聚集率 CV	0.683 ± 0.057	3.103	0.007

2.1.4 人工推片重复性对比的方法学研究结果 共纳入 20 例标本用于人工推片重复性对比试验,分别重复推 3 张,各标本血小板聚集率 CV 均在 8% 以内,符合相关实验室要求。在推片角度、推片血量固定的情况下,人工推片可以满足对血小板聚集率的稳定评价的要求。见图 1。

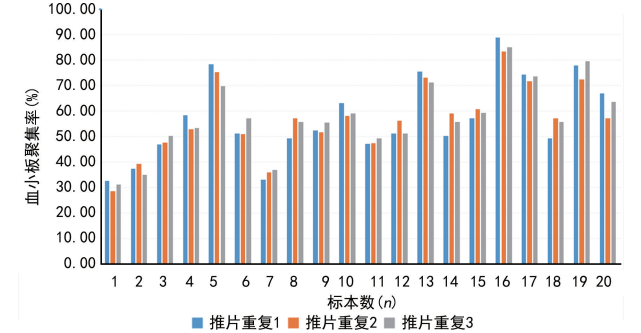


图 1 20 例标本重复 3 次人工推片的血小板聚集率分布图

2.2 观察视野数的方法学研究结果 经 S-W 检验,差值不符合正态分布 ($P < 0.20$),经非参数秩和检验分析,观察 10 个油镜视野与观察 20 个油镜视野两种方式的血小板聚集率比较差异无统计学意义 ($P = 0.172$)。观察 10 个油镜视野可较好地反映血小板聚集率。

2.3 血小板聚集程度与血小板计数假性减低程度的相关性分析 推片角度 45° 、推片血量 $4 \mu\text{L}$ 时血小板聚集重复性较好。因此,应用在此条件下制成血涂片,观察血小板聚集程度。经多元线性回归分析,方程共纳入 3 个自变量:血小板聚集总数、血小板聚集率、血小板聚集堆数 ($P < 0.001$),即差值与以上 3 个

变量存在线性回归关系($r=0.725、0.892、0.655$)。见图 2~4。

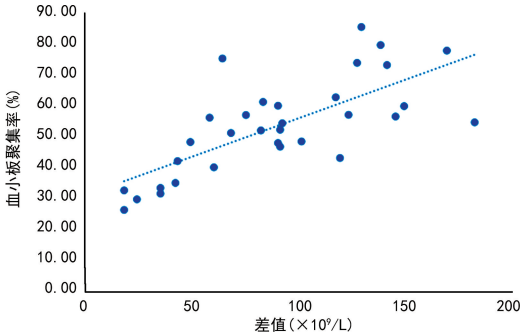


图 2 血小板聚集率与差值散点图

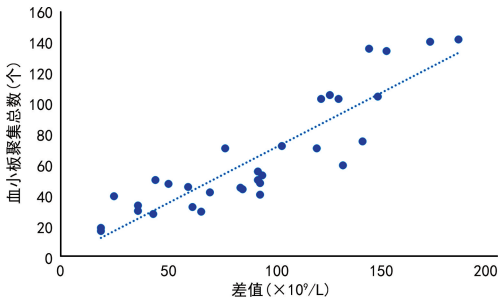


图 3 血小板聚集总数与差值散点图

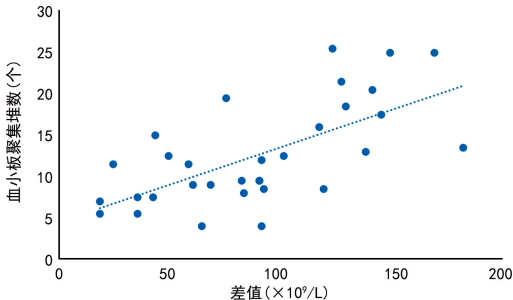


图 4 血小板聚集堆数与差值散点图

以差值为因变量 Y, 回归方程为 $Y=-17.317+1.151\times\text{血小板聚集率}+1.058\times\text{血小板聚集总数}-1.721\times\text{血小板聚集堆数}$ 。该回归模型的决定系数 $R^2=0.905$, 即在差值的变化中, 有 90.5% 是由血小板聚集率、血小板聚集总数、血小板聚集堆数这 3 个参数来解释。见表 3。

表 3 逐步回归后的回归方程系数

模型	未标准化系数		<i>t</i>	<i>P</i>
	β	<i>SE</i>		
常量	-17.317	9.446	-1.833	0.077
A	1.058	0.116	9.150	<0.001
B	1.151	0.207	5.557	<0.001
C	-1.721	0.697	-2.470	0.020

注: A 为血小板聚集总数; B 为血小板聚集率; C 为血小板聚集堆数。

差值与已发生聚集的 EDTA-K₂ 抗凝血血小板数量之和, 即得出校正后的血小板数量, 此为血小板数量的校正公式。

3 讨 论

在临床工作中, 经常可能遇到采用各种方法均无法纠正的血小板聚集情况, 严重影响血小板计数的准确性, 因此探讨对此类标本实现血小板准确计数的方法, 具有良好的临床实用价值。

对于发生了血小板聚集的血常规标本, 其性质已发生改变, 尤其是均一性无法保证, 因此对血小板计数的准确性带来了很大挑战。考虑到这类标本的非均质性, 可能会对试验结果带来不确定性, 本研究设计了一系列探索条件, 以保证血涂片制备条件和观察视野数的标准化, 并为后续回归方程拟合奠定了基础。

目前鲜见文献对血小板聚集程度的评价提出明确指标, 本研究尝试采用血涂片镜检法, 通过能够获得的参数, 提炼出可能反映血小板聚集程度的指标, 尤其是结合标本的非均质性, 纳入了血小板聚集率、血小板聚集率 CV、血小板聚集总数、血小板聚集堆数、每堆血小板聚集数 CV、每堆血小板聚集数的中位数、最大一堆血小板聚集数 7 个参数, 经过筛选, 纳入血小板聚集总数、血小板聚集率、血小板聚集堆数 3 个变量拟合入回归方程, 为血小板聚集程度的评价指标做出了探索性研究。

通过观察和统计学计算, 笔者推荐推片角度 45°, 推片血量 4 μL 这一条件进行此类标本推片, 本研究结果显示, 当推片角度较小时, 油镜视野下红细胞排布较为分散, 易出现分布不均的情况, 呈单层紧密排列的区域相较于 45° 时更少, 容易出现不存在血小板的视野, 导致每视野血小板聚集率 CV 较大。而推片角度 60° 时血小板容易出现重叠, 边界不清, 影响血小板计数的准确性, 因此血小板聚集率 CV 较大。推片血量 7 μL 时也会出现类似问题。本研究结果显示, 观察 10 个油镜视野与观察 20 个油镜视野两种方式的血小板聚集率比较差异无统计学意义 ($P=0.172$)。同时, 由于检测人员和时间有限, 缺乏检测人员之间的对比, 使得本研究无法准确评估检测人员个体间的差异。后续笔者将通过扩大样本量, 增加观察视野数, 增加检测人员之间的比对等试验, 进行更广泛地观察和研究, 以期得出适用性更广的校正公式。

参考文献

[1] SANG Y, ROEST M, DE LAAT B, et al. Interplay between platelets and coagulation[J]. Blood Rev, 2021(46):100733.
[2] HOLINSTAT M. Normal platelet function[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(2):195-198. (下转第 2843 页)

通过以上回归方程得出血小板假性减低的差值,

多方法学检测 2 657 例血清自身抗体结果的回顾性分析*

车冬丽¹,程亭瑄²,杜金龙¹,刘 晴¹,田 野¹,史丽娜¹,王晓宁¹,谢 菲¹,古 缘¹,谭延国^{1△}

1. 首都医科大学附属复兴医院检验科,北京 100038;2. 首都医科大学医学检验系,北京 100038

摘 要:目的 探讨常见自身抗体检测中不同方法学的检出情况,为自身抗体的检测策略提供依据。

方法 分析 2 657 例同时使用间接免疫荧光(IIF)法检测抗核抗体(ANA)和免疫印迹(IB)法检测抗核抗体谱(ANAs,共 15 种靶抗原特异性抗体),使用 IIF 法、酶联免疫吸附试验(ELISA)和 IB 法同时检测抗双链 DNA 抗体(抗 dsDNA 抗体),以及 2 348 例同时使用 IIF 法检测抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)和 ELISA 检测 ANCA 谱[髓过氧化物酶抗体(抗 MPO 抗体)、抗蛋白酶 3 抗体(抗 PR3 抗体)]的结果。**结果** (1)ANA 检出率显著高于 ANAs(57.77% vs. 30.64%, $P<0.001$),检出 ANA 者中,40.78%检出至少一种特异性抗体,且所有检出 ANAs 者中,未检出 ANA 者占 23.10%。(2)检出 ANA 者以低滴度为主, $\leq 1:320$ 者占总检出例数的 84.95%,但滴度越高者,ANAs 特异性抗体的检出率越高:依次为 1:100 的 29.63%、1:320 的 48.56%、1:1 000 的 77.78%和 $\geq 1:3 200$ 的 92.42%。(3)在检出 ANAs 者中,抗 Scl-70 抗体、抗 PM-Scl 抗体、抗 PCNA 抗体在检出 ANA 者中的占比显著低于未检出 ANA 者($P<0.001$)。(4)ELISA 对抗 dsDNA 抗体的检出率最高(4.14%),高于 IIF 法和 IB 法(均 $P<0.001$),且后两种方法检出率比较差异有统计学意义($P<0.001$);即便如此,IIF 法和 IB 法检测抗 dsDNA 抗体仍对 ELISA 具有一定的补充作用。(5)IIF 法对 ANCA 的检出率显著高于 ELISA 对 ANCA 谱的检出率(9.16% vs. 2.43%),但检出抗 MPO 抗体和/或抗 PR3 抗体者中,仍有 47.37%(27/57)未检出 ANCA。**结论** 用于自身抗体检测的不同方法检测效能明显不同,根据循证医学制订正确的检测策略尤为必要。

关键词:抗核抗体; 抗核抗体谱; 抗中性粒细胞胞浆抗体; 抗双链 DNA 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.23.005

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2024)23-2838-06

文献标志码:A

Retrospective analysis of 2 657 serum autoantibodies results detected by multiple methods*

CHE Dongli¹,CHENG Tingxuan²,DU Jinlong¹,LIU Qing¹,TIAN Ye¹,SHI Lina¹,
WANG Xiaoning¹,XIE Fei¹,GU Yuan¹,TAN Yanguo^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. College of Clinical Laboratory Medicine, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Abstract: Objective To investigate the performance of different methods in common autoantibody detection, and to provide basis for the detection strategy of autoantibody. **Methods** A total of 2 657 cases were included in this study, whose serum antinuclear antibody (ANA) by indirect immunofluorescence method (IIF) and antinuclear antibody spectrum (ANAs, a total of 15 antibodies) by immunoblot method (IB) were tested simultaneously, and anti-double strand DNA antibody (anti-dsDNA antibody) were tested by IIF, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and IB. ANCA and ANCA spectrum [anti-myeloperoxidase antibody (anti-MPO antibody), anti-protease 3 antibody (anti-PR3 antibody)] were tested by IIF and ELISA respectively in 2 348 cases. **Results** Firstly, the detection rate of ANA was significantly higher than that of ANAs (57.77% vs. 30.64%, $P<0.001$). Among the specimens detected with ANA, 40.78% detected at least one specific antibody positive. Among the specimens detected with ANAs positive, ANA was not detected in 23.10% of cases. Secondly, the ANA positive cases were mainly of lower titers, and cases with titer of $\leq 1:320$ accounted for 84.95% of the total detected cases. But the higher the titer, the higher the detection rate of ANAs specific antibodies (29.63% in 1:100, 48.56% in 1:320, 77.78% in 1:1 000, 92.42% in $\geq 1:3 200$). Thirdly, among the specimens detected ANAs positive, the composition ratios of anti-Scl-70, anti-PM-Scl and anti-PCNA antibodies in ANA positive cases was significantly lower than those in ANA negative cases

* 基金项目:首都医科大学教育教学改革研究课题项目(2023JYY266)。

作者简介:车冬丽,女,主管技师,主要从事临床检验诊断学方向的研究。△ 通信作者, E-mail: tanyanguo61@126.com。