

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.01.014

未成熟血小板的性能评价及在血小板减少性疾病中的应用

邱 凯, 刘志伟, 黄丽春, 孙德华[△]

(南方医科大学南方医院检验科, 广州 510515)

摘 要:目的 应用 Sysmex XN-20 全自动血细胞分析仪检测外周血中的未成熟血小板分数(IPF%) and 未成熟血小板绝对值(IPF#), 对其进行性能评价和建立参考区间, 探讨其在血小板减少性疾病中的应用价值。**方法** 对该分析仪检测 IPF% 和 IPF# 进行性能评价包括精密度、稳定性、携带污染和线性范围, 并与 Sysmex XE-5000 检测 IPF% 和 IPF# 进行相关性研究。检测 240 例健康人建立参考区间, 设立为健康对照组; 选择 111 例血小板减少性疾病患者作为疾病组; 特发性血小板减少性紫癜(ITP) 组与健康对照组绘制 IPF% 的受试者工作特征曲线。**结果** 该血细胞分析仪检测 IPF% 和 IPF# 的批内精密度正常、高值的变异系数(CV) 分别是 2.52%、2.32% 和 3.60%、1.93%, 批间 CV 为 1.8% 和 3.7%; 正常值、高值的 IPF% 和 IPF# 在 24 h 内 CV 分别为 8.4%、8.8% 和 4.4%、4.5%; IPF% 携带污染率为 0.16%, IPF# 携带污染率为 0.27%; IPF# 在 $(0 \sim 94.8) \times 10^9/L$ 成线性, 与 Sysmex XE-5000 检测 IPF% 和 IPF# 无相关性($P > 0.05$); 不同性别组之间差异无统计学意义($P > 0.05$), 参考范围 IPF%: 0.9%~4.5%, IPF#: $(3.7 \sim 9.7) \times 10^9/L$; ITP 组、骨髓增生异常综合征(MDS) 组与健康对照组相比较, IPF% 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 再生障碍性贫血(AA)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性非淋巴细胞白血病(AML) 与健康对照组相比较, IPF# 差异有统计学意义($P < 0.05$); IPF% 最佳临界值为 11.6%, 该点灵敏度 100%, 特异度 100%。**结论** 应用 Sysmex XN-20 全自动血细胞分析仪检测 IPF% 和 IPF# 精密度高、稳定性好、携带污染率极低、IPF# 线性范围宽广, 满足临床检测需求, 对血小板减少性疾病临床诊断、鉴别诊断和预后有一定临床应用价值。

关键词: Sysmex XN-20 全自动血细胞分析仪; 未成熟血小板; 血小板减少性疾病

中图法分类号: R446.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)01-0047-04

Performance evaluation of the immature platelet fraction and its application in thrombocytopenic diseases

QIU kai, LIU Zhiwei, HUANG Lichun, SUN Dehua[△]

(Department of Laboratory, Nanfang Hospital of Nanfang Medicine University,

Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective Using Sysmex XN-20 automatic hematology analyzer to detect the percentage of immature platelet fraction(IPF%) and the absolute number of immature platelet(IPF#) in the peripheral blood, to evaluate the performance of the IPF% and IPF# and establish a reference interval, to investigate the clinical significance in the thrombocytopenic diseases. **Methods** The performance of the analyzer for detecting IPF% and IPF# was evaluated, including precision, stability, carryover and the linear range, and correlated with Sysmex XE-5000 detection of IPF% and IPF#. In this research, 240 normal samples were used to form a reference interval and set for negative control group. 111 samples of the thrombocytopenic diseases were selected as positive group; Receiver operating characteristic curve between the ITP group and the healthy control group was drawn. **Results** The within-batch precisions of IPF% and IPF# for normal-level, high-level were 2.52%, 2.32% and 3.60%, 1.93%, the between-batch precisions were 1.8% and 3.7%; the stability of IPF% and IPF# for normal-level were 8.4%, 8.8% within 24 hours, the high-level were 4.4%, 4.5% within 24 hours; the carryover of IPF% was 0.16%, the carryover of IPF# was 0.27%; a linear relation of IPF# was observed from 0 to $94.8 \times 10^9/L$, which had no statistical difference with Sysmex XE-5000($P > 0.05$). No statistical difference was observed within gender($P > 0.05$), and the reference interval was determined as IPF% 0.9%~4.5% and IPF# $(3.7 \sim 9.7) \times 10^9/L$. In idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) group and myelodysplastic syndrome(MDS) group, IPF% had statistical significance compared with healthy control group($P < 0.05$); In aplastic anemia(AA), acute lymphoblastic leukemia(ALL) and acute nonlymphocytic leukemia(AML) group, IPF# had statistical significance compared with healthy control group($P < 0.05$). The IPF%

cut-off for a diagnosis of ITP was 11.6%, the sensitivity was 100% and specificity was 100%. **Conclusion** The determination of IPF% and IPF# by the Sysmex XN-20 have high precision, good stability, very low carryover and good linear range of the IPF#, meeting the need of clinical determination, they have certain clinical application values in the clinical diagnosis, differential diagnosis and prognosis of the thrombocytopenia disease.

Key words: Sysmex XN-20 automatic hematology analyser; immature platelet fraction; thrombocytopenia disease

未成熟血小板(IPF)是骨髓巨核细胞新近释放入外周血的血小板,不含核或DNA成分,却含有少量的mRNA和粗面内质网,保留了合成少量蛋白质的能力,它是血循环中最年轻的血小板。IPF体现了骨髓巨核细胞的血小板生成状态,能反映骨髓的血小板生成能力。Sysmex XN-20全自动血细胞分析仪在检测全血时PLT-F通道可检测出未成熟血小板分数(IPF%)和未成熟血小板绝对值(IPF#),本研究对其进行性能验证和建立参考区间,并探讨其在血小板减少性疾病中的临床应用价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 健康对照组 2016年5月6日至8日对广州市240例健康成人的标本进行检查,年龄18~35岁,其中男120例、中位年龄29岁;女120例、中位年龄28岁;体检正常(体检内容包括血常规、尿常规、肝肾功能、血糖、血脂、X线胸片、B超、心电图等)。

1.1.2 疾病组 选择选取2016年3—6月南方医院血液科和小儿科门诊及住院患者111例,其中特发性血小板减少性紫癜(ITP)组24例、再生障碍性贫血(AA)组21例、急性淋巴细胞白血病(ALL)组25例、急性非淋巴细胞白血病(AML)组28例、骨髓增生异常综合征(MDS)组13例。ITP组、AA组均为初诊尚未治疗的患者,全部病例诊断符合血液病诊断及疗效标准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集所有研究对象静脉血,乙二胺四乙酸二钾抗凝,4 h以内完成检测。检测所有研究对象的IPF%和IPF#。

1.2.2 仪器与试剂 Sysmex XN-20血细胞分析仪及原厂配套试剂(日本Sysmex公司)。试验前用Sysmex XN CAL PF对PLT-F进行校准。试验中按仪器操作程序进行检测调试,配套e-check高、中、低值质控物进行测试,所有分析用参数结果均在要求范围内。

1.2.3 性能评价 (1)精密度:参照美国临床实验室标准化协会(NCCLS)EP5-A2文件^[1]的要求,批内精密度用新鲜全血标本(正常值、高值)连续测定10次,计算均数($\bar{x}$)、标准差(s)、变异系数(CV);批间精密度用仪器配套质控品连续测定20 d,计算 $\bar{x}$ 、 s 、CV。(2)稳定性:分别选取正常值(IPF%为3.8%、IPF#为 $7.2 \times 10^9/L$)、高值(IPF%为20.2%、IPF#为 $36.4 \times$

$10^9/L$)2份标本,在室内(4~8℃保存)对正常值、高值的标本每隔2、4、6、8、24 h检测来观察其稳定性。

(3)携带污染率:从血细胞分析仪已检测出IPF值的同一批标本中选择高值(IPF%为34.5%,IPF#为 $76.8 \times 10^9/L$)和低值(IPF%为4.9%,IPF#为 $4.1 \times 10^9/L$)血标本各1份,按检测3次高值,再检测3次低值的顺序测定,按公式 $(L1-L3)/H \times 100\%$ 计算携带污染率(L1为第1次低值标本所测值,L3为第3次低值标本所测值,H为3次高值标本所测均值)。(4)线性:参照NCCLS EP-6A文件^[2]进行线性评价,取新鲜IPF#高值标本($95.6 \times 10^9/L$)1份,用Sysmex XN-20稀释液按100%、80%、60%、40%、20%、10%、0%的比例稀释。将标本混匀,在PLT-F模式下对高值标本及每个稀释度标本连续测定3次,分别记录各水平IPF#平均值。将平均值作为实测值,与稀释浓度理论值作比较,进行线性回归分析计算 $Y=aX+b$,要求a值在 1.00 ± 0.05 范围内、相关系数($R^2 > 0.975$)。(5)与XE-5000的相关性:将同一份临床标本用Sysmex XE-5000血细胞分析仪检测IPF%和IPF#的结果与用Sysmex XN-20血细胞分析仪检测的结果做统计学相关性分析,共测20份标本,计算 r 。

1.2.4 建立参考区间 对240例健康成人的标本结果进行统计分析计算参考区间。

1.3 统计学处理

1.3.1 数据极值的处理 按照NCCLS C28-A2^[3]文件的D/R规则判断极值是否为同质个体。D=全部数据最大(小)-临近最大(小)值,R=全部数据最大值-全部数据最小值。若 $D/R < 1/3$ 则保留极值,证明来源于同质个体,若 $D/R > 1/3$ 则去除极值,以同样方法再对临近极值进行处理。若有离群点被剔除后,应即将其他数据补上。

1.3.2 统计学方法 采用SPSS22.0软件进行数据统计,如正态分布,则用 $\bar{x} \pm 1.96s$ 得出95%参考范围,正态性检验采用Kolmogorov-Smirnov检验分析;如不呈正态分布则用百分位数法确定2.5%和97.5%位数的参考限,以此确定参考区间。多组间数据比较采用Kruskal-Wallis检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。对ITP组与健康对照组绘制受试者工作特征(ROC)曲线,确定临界值。

2 结果

2.1 Sysmex XN-20检测性能评价分析

2.1.1 精密度 批内精密度结果见表 1,批间精密度 IPF% 的 CV 值为 1.8%、IPF# 的 CV 值为 3.7%,批内及批间 CV 均小于 5%。

表 1 Sysmex XN-20 检测 IPF 的批内精密度比较						
标本	IPF%(%)			IPF#(×10 ⁹ /L)		
	$\bar{x}$	s	CV(%)	$\bar{x}$	s	CV(%)
正常值	3.27	0.08	2.52	9.2	0.33	3.60
高值	19.44	0.45	2.32	76.84	1.48	1.93

2.1.2 稳定性 正常值 IPF% 和 IPF# 在 24 h 内 CV 为 8.4%、8.8%,高值 IPF% 和 IPF# 在 24 h 内 CV 为 4.4%、4.5%,见图 1。

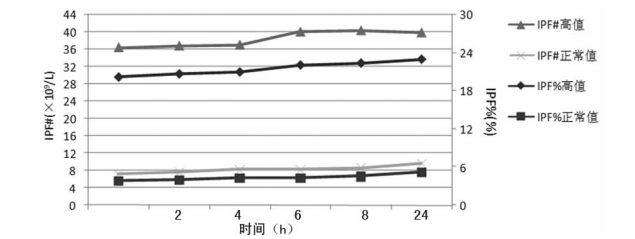


图 1 IPF 稳定性

2.1.3 携带污染率 IPF% 携带污染率为 0.16%,IPF# 携带污染率为 0.27%。

2.1.4 线性范围 因 IPF% 经稀释后数值不变,因此未做线性检测。由图 2 可知斜率 a 值在 1.00±0.05 范围内, $R^2>0.975$,IPF# 在 (0~94.8)×10⁹/L 成线性。

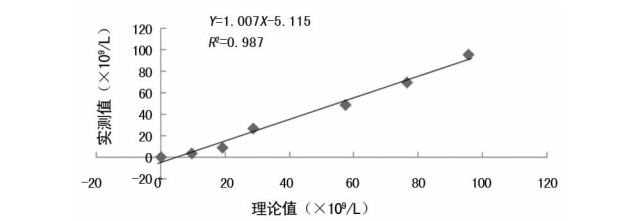


图 2 IPF# 线性范围

2.1.5 相关性分析 应用 Sysmex XN-20 与 Sysmex XE-5000 检测 IPF% 的 $R^2=0.351$, $P>0.05$;两种仪器 IPF# 的 $R^2=0.321$, $P>0.05$,二者无相关性。

2.2 参考区间 经正态性检验 IPF% 和 IPF# 240 例健康者数据不服从正态分布 ($P<0.05$),故用百分位数法(95%)确定参考范围,男女组经 K-W 检验差异无统计学意义 ($P>0.05$),合并为一组(240 例)。参考范围 IPF%:0.9%~4.5%,IPF#:(3.7~9.7)×10⁹/L。

2.3 各组血液疾病检测结果比较 ITP 组、MDS 组的 IPF% 与健康对照组差异均有统计学意义 ($P<0.05$),AA、ALL、AML 组的 IPF% 与健康对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。ITP 组的 IPF# 与健康对照组差异无统计学意义 ($P>0.05$),AA、ALL、AML 组的 IPF# 与健康对照组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组疾病 IPF 检测结果比较[M(P _{2.5} ~P _{97.5})]			
组别	n	IPF%(%)	IPF#(×10 ⁹ /L)
ITP 组	24	24.7(18.2~31.2)*	6.6(4.5~8.8)
MDS 组	13	9.9(5.4~14.4)*	3.1(0.9~5.3)*
AA 组	21	3.2(2.3~4.2)	0.8(0.5~1.1)*
ALL 组	25	2.9(2.1~3.8)	1.1(0.7~1.4)*
AML 组	28	2.8(1.9~3.8)	1.6(0.4~2.8)*
健康对照组	240	2.7(2.5~2.9)	6.2(5.8~6.6)

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$

2.4 ITP 组与健康对照组绘制 IPF% 的 ROC 曲线及临界值 ITP 组与健康对照组 IPF% 曲线下面积为 1,与 A=0.5 相比较,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。根据统计结果中各可能切点的灵敏度和特异度,计算约登指数。以约登指数最大的切点为临界点,确定 IPF% 最佳临界值为 11.6%。该点灵敏度 100%,特异度 100%,约登指数 1。见图 3。

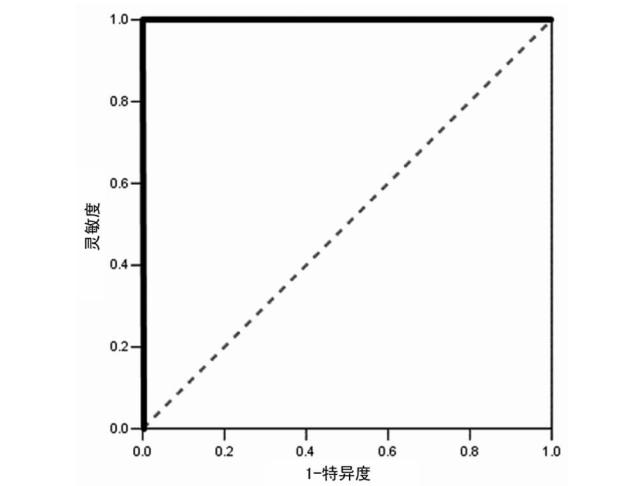


图 3 ITP 组与健康对照组 IPF% 的 ROC 曲线

3 讨论

Sysmex XN-20 全自动血细胞分析仪 PLT-F 通道是利用荧光色素给血小板染色,采用流式细胞测量法(FCM)根据前向散射光和荧光强度的差异,明确地区别血小板和其他的血细胞。根据检测数据绘制出二维散点图,将荧光强度较强的区域划分为 IPF。通过上述试验结果可见该仪器检测 IPF 精密度高,稳定性好,携带污染率极低,线性范围宽广,可以满足临床检测要求。干细胞移植后为了预防发生严重出血并发症,会进行预防性的血小板输注,但血小板浓缩制剂的使用期限为采血后 72 h,为此必须事前预约,供给量也非常少,成本较高给患者带来负担的同时还会带来不良反应。通过监测 IPF,根据 IPF 的一过性增加^[4]可预测血小板恢复,避免了血小板输血。在肿瘤化疗患者,化疗停药后骨髓造血功能恢复,IPF 增加早于血小板数量的增加^[5],监测 IPF 可了解肿瘤患者骨髓恢复的情况,指导临床用药及肿瘤治疗中化疗时机的选择。

Sysmex XN-20 与 XE-5000 的 IPF% 及 IPF# 检测结果无相关性, 由于当前检测 IPF 没有参考方法, 因此分析两种型号仪器检测结果的差异原因有两点: (1) 荧光染料的变化, PLT-F 的荧光染料以噶嗪为主, 可以有效去除白细胞碎片^[6]、红细胞碎片、小红细胞的干扰; (2) 计算机分析方式的改变, 避免标本中存在的微小血小板漏检。因此与 XE-5000 相比, Sysmex XN-20 全自动血细胞分析采用血小板特异性荧光染料相对可以得到更精确的 IPF。

本研究应用 Sysmex XN-20 全自动血液分析仪对 240 例健康成人进行血细胞分析, 得出 95% 参考范围为 IPF%: 0.9%~4.5%; IPF#: (3.7~9.7) × 10⁹/L。初诊为 ITP 的患者 IPF% 明显高于健康对照组^[7], 由于 ITP 患者血小板相关自身抗体与血小板结合导致单核-巨噬系统对血小板吞噬、破坏增加、寿命缩短, 外周血中血小板破坏过多及骨髓巨核细胞增生相关联, 导致更多新生的血小板释放入外周血使 IPF% 升高^[8]。初诊为 AA 的患者 IPF# 明显低于健康对照组, AA 是由多种原因引起的骨髓造血功能衰竭的一组综合病症, 骨髓中的巨核细胞减少, 血小板生成出现障碍, 新生血小板减少, 与 ITP 不同, 此结果表明 IPF% 与 IPF# 可以鉴别生成障碍还是破坏过多引起的血小板计数减少^[9]。从 ROC 曲线得到 IPF% 最佳临界值为 11.6%。该点灵敏度 100%, 特异度 100%, 以此对 ITP 与健康人区分的准确性最高。因此 IPF 可以用于 ITP 临床诊断以及 ITP 和 AA 鉴别诊断。与健康对照组比较, MDS 的 IPF% 差异有统计学意义, 从 SUGIMORI 等^[10]研究可知高 IPF 的病例中 100% 都有染色体异常, 预后不良的 5 号和 7 号染色体异常出现概率较大, 可以用于治疗、预测的辅助检验, IPF 的高低可以区分预后好坏。

参考文献

[1] NCCLS. evaluation of precision performance of quantative
(上接第 46 页)
展[J]. 吉林中医药, 2015, 35(4): 430-432.
[11] 伊蒙, 谢红浪. 糖尿病肾脏疾病治疗的研究进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(5): 461-465.
[12] 马志忠, 王杏林. 糖化血红蛋白与糖尿病及其并发症的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(6): 799-800.
[13] 张体华, 王明. 糖尿病肾病患者炎症水平, 免疫功能及与肾脏病变的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(10): 1524-1526.
[14] 赵涛, 毕会民. 2 型糖尿病患者脂联素与炎症因子相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(9): 1243-1244.
[15] 刘妍妍, 周家俊. 炎症因子在糖尿病肾病中的作用及中医药治疗研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24

measurement methods; approved guideline second edition; EP5-A2[S]. Wayne, PA; NCCLS, 2004.
[2] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures; EP6-A [S]. Wayne, PA; NCCLS, 2003.
[3] NCCLS. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline; C28-A2[S]. 2nd ed. Wayne, PA; NCCLS, 2000.
[4] MURONOI T, KOYAMA K, NUNOMIYA S, et al. Immature platelet fraction measured on the Sysmex XN hemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation [J]. Eur J Haematol, 2016, 93(2): 150-156.
[5] 江虹, 吕瑞雪, 曾婷婷, 等. 应用血细胞分析仪检测网织血小板比率在肿瘤患者化疗中的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(2): 184-186.
[6] BRIGGS C, LONGAIR I, KUMAR P, et al. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(11): 1024-1030.
[7] ABE Y, WADA H, TOMATSU H, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction[J]. Thromb Res, 2006, 118(4): 463-469.
[8] 孙德华, 裴宇容. 网织血小板检测在血液系统疾病诊断中的初步应用[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(6): 581-583.
[9] 郭晓珺, 邵平阳, 朱培林, 等. 网织血小板测定对血小板减少疾病诊断价值的探讨[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(1): 41-43.
[10] SUGIMORI N, KONDO Y, SHIBAYAMA M, et al. Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome; a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis [J]. Eur J Haematol, 2009, 82(1): 54-60.

(收稿日期: 2017-07-15 修回日期: 2017-09-18)

(11): 1248-1251.
[16] UZUN S, OZARI M, GURSU M, et al. Changes in the inflammatory markers with advancing stages of diabetic nephropathy and the role of pentraxin-3[J]. Ren Fail, 2016, 38(8): 1193-1198.
[17] 张红, 章向成, 朱大龙, 等. 炎症反应与糖尿病肾病[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2015, 35(1): 49-52.
[18] 苏弘薇, 康省, 龙艳, 等. 糖尿病肾病与血糖波动和炎症因子的关系探讨[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(3): 273-276.

(收稿日期: 2017-07-18 修回日期: 2017-09-12)