

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 14. 016

Cellavision DM96 高级红细胞应用软件在裂红细胞分析中的应用评价

程 翔,王刚强[△],胡恩亮,赵 媛,贾晶媛,郑善奎,郝晓柯
空军医科大学第一附属医院全军临床检验医学中心,陕西西安 710032

摘 要:**目的** 评价 Cellavision DM96 高级红细胞应用软件在裂红细胞检测方面应用价值。**方法** 选取 57 例患者及 60 例健康人血液标本,分别用人工镜检及 Cellavision DM96 自动图像分析系统自动检测裂红细胞。**结果** 与人工镜检相比,使用 Cellavision DM96 进行裂红细胞计数时,批内精密度、日间精密度及检测者间比对变异系数均较低。Cellavision DM96 自动检测灵敏度高,但特异度较差;人工修正后,与人工镜检有很好的 consistency。Cellavision DM96 自动检测裂红细胞均值较人工镜检略高。**结论** 使用 Cellavision DM96 高级红细胞应用软件自动计数裂红细胞是一种精密度良好,灵敏度及特异度均符合临床需求,检测较准确,易于临床工作及教学使用的工具,有助于裂红细胞检测的标准化。

关键词:裂红细胞; 血细胞计数; 人工镜检
中图法分类号:R-331 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2019)14-2009-04

Value of Cellavision DM96 Advanced Red Blood Cell Software on schistocyte analysis
CHENG Xiang, WANG Gangqiang[△], HU Enliang, ZHAO Yuan, JIA Jingyuan, ZHENG Shanluan, HAO Xiaoke
PLA Center for Clinical Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of AFMU, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract:**Objective** To evaluate value of Cellavision DM96 Advanced Red Blood Cell (RBC) Software on schistocyte analysis. **Methods** A total of 57 samples of hospitalized patients and 60 samples of controls were analyzed. Schistocyte counts were evaluated with the reference manual microscopic method comparing the automated count on Cellavision DM96, both before and after reclassification. **Results** Compared with the manual microscopic count, within-run, between-run and between-observer coefficients of variation were lower when counted by Cellavision DM96. After reclassification, method comparison studies revealed good agreement with the manual microscopic method, with slightly higher values of schistocytes for the automated analysis. **Conclusion** The Cellavision Advanced RBC Software provides a sensitive and reproducible measurement of schistocyte in peripheral blood, but still requires manual revision in specificity. Further more, it is an easy-to-use software and an excellent teaching tool that might contribute to standardization in the investigation of schistocyte-related conditions.

Key words:schistocyte; blood cell count; microscopic

裂红细胞是红细胞在血液循环时由于机械损伤所产生的碎片。外周血中裂红细胞增多是一种异常现象,常提示机械性溶血性贫血的可能性,特别是血栓性微血管病(TMA)。导致 TMA 主要包括两种疾病:血栓性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒症综合征^[1],如果不及时治疗,预后较差。外周血出现裂红细胞的其他原因还包括骨髓移植相关的 TMA、心脏瓣膜疾病和心功能障碍、先兆子痫、巨幼细胞性贫血和弥散性血管内凝血等^[2-3]。因此,对裂红细胞的定性和定量检测具有重要的临床意义。目前,通常使用显微镜对外周血涂片中的裂红细胞进行计数,该方法步骤烦琐,且不同阅片者之间变异性较大。近年来关于裂红细胞的鉴别和计数出现了较为详细的形态学标

准^[4-5],然而由于计数方法的不同(全片浏览或准确计数)、计数血涂片的面积不同,对裂红细胞的检测仍然很难标准化。由于判断标准不同很可能导致不同的诊断结果,从而影响治疗效果。近年来,自动化数字细胞形态分析仪为形态学检验的标准化做出了很大的贡献,但目前主要应用于白细胞检测中,不太适合用于红细胞形态的检测及裂红细胞的鉴定和计数^[6]。Cellavision DM96 高级红细胞软件已经可用于红细胞高级形态分析^[7-9],该应用软件将红细胞初步预分类为 21 个形态学类别(包括裂红细胞)。本研究评价了 Cellavision DM96 高级红细胞软件对裂红细胞的分析价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用 EDTA 抗凝试管采集 57 例患

者及 60 例健康体检者的血液标本。57 例患者中,包括血液系统恶性肿瘤 18 例,非血液系统恶性肿瘤 16 例,肾功能不全 9 例,自身免疫性疾病 3 例,早产儿 2 例,TMA 4 例,肝硬化 5 例(含肝硬化移植 1 例)。所有标本均来自本实验室,于标本采集后 2 h 内完成检测。

1.2 仪器与试剂 SP-10 全自动推片机(日本 Sysmex 公司),Cellavision DM96 分析仪(瑞典 Cellavision DM96 公司),瑞姬染色液(贝索生物技术公司),Olympus 显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方法

1.3.1 人工镜检分析裂红细胞 裂红细胞包括盔形红细胞、红细胞碎片和微球红细胞。通过在 40 倍物镜下分析 10 个显微镜视野(每个视野约 1 000 个红细胞)中的裂红细胞(包括所有形态学类别)。由两位经验丰富的阅片者进行形态学和平均值的统计分析;人员间比对需 6 名阅片者参加。

1.3.2 Cellavision DM96 自动分析裂红细胞 Cellavision DM96 自动图像分析系统上进行自动化的裂红细胞计数。该系统可进行白细胞分类和血小板估算。除了已确定的 6 种红细胞形态学类别(红细胞大小不均、畸形红细胞、嗜多色性红细胞、红细胞淡染、大红细胞、小红细胞)外,Cellavision DM96 高级红细胞软件提供完整的红细胞预分类结果,将红细胞分为 17 种,包括体积异常(红细胞大小不均、小红细胞、大红细胞),形态异常(红细胞增多症、靶形红细胞、裂红细胞、盔形红细胞、镰状红细胞、球形红细胞、椭圆形红细胞、卵形红细胞、泪滴红细胞、孔隙细胞、棘状细胞),以及染色异常(嗜多色红细胞、淡染红细胞)。因此,分析仪采集单个红细胞后分类到 17 个形态中的一个类别,并显示结果(该结果后称预分类结果);阅片者验证并对红细胞预分类结果重新调整分类(该结果后称人工修正结果)。每种形态红细胞所占比例以

百分比(%)形式表示。

该软件分类时,可区分裂红细胞和盔形红细胞;且将微球红细胞归类于球形红细胞。在本试验中,阅片者手工将盔形红细胞和微球红细胞统一归类为裂红细胞。

分别计算预分类结果和人工修正结果。由两位经验丰富的阅片者进行形态学和平均值的统计分析;人员间比对,需 6 名阅片者参加。

1.4 统计学处理 使用 Microsoft Excel 2010 和 MEDCALC 软件进行数据处理及统计分析。区内精密密度、区间精密密度及人员之间比对使用变异系数(CV)进行计算。方法间的相关性分析通过 Passing-Bablok 回归测定回归线的斜率和截距,并通过 Bland-Altman 方法图形显示比例和恒定偏差。通过受试者工作特征(ROC)曲线确定最佳截断值(cut-off 值)。

2 结 果

2.1 批内精密密度 分别选取裂红细胞高水平(30/1 000)和低水平(4/1 000)标本各 1 例推片后,同一张血涂片使用 Cellavision DM96 连续分析 10 次,并使用显微镜连续阅片 10 次。结果见表 1。Cellavision DM96 自动分类的预分类结果及人工修正结果的 CV 均低于人工镜检分析的 CV;Cellavision DM96 自动分类的预分类结果及人工修正结果的均值均高于人工镜检分析的均值。

2.2 日间精密密度 分别选取裂红细胞高水平(30/1 000)和低水平(4/1 000)标本各 1 例推片后,同一张血涂片使用 Cellavision DM96 连续分析 5 d 每日分析 2 次,来评估日间精密密度。结果见表 1。Cellavision DM96 自动分类的预分类结果及人工修正结果的 CV 均低于人工镜检分析的 CV(除低水平预分类结果);Cellavision DM96 自动分类的预分类结果及人工修正结果的均值均高于人工镜检分析的均值。

表 1 批内精密密度与日间精密密度比较

项目	人工镜检				Cellavision DM96 预分类				Cellavision DM96 人工修正后			
	低水平		高水平		低水平		高水平		低水平		高水平	
	均值	CV(%)	均值	CV(%)	均值	CV(%)	均值	CV(%)	均值	CV(%)	均值	CV(%)
批内精密密度	4.1	12.1	30.3	5.5	21.2	9.0	39.4	4.5	6.2	9.4	35.2	2.0
日间精密密度	4.4	12.3	30.4	6.5	17.9	14.0	40.1	6.2	5.4	10.1	34.0	4.1

注:均值指每 1 000 个红细胞中出现的裂红细胞数量

2.3 人员间比对 为了评估不同人员之间的阅片差异,6 名阅片者同时使用人工镜检和 Cellavision DM96 自动分析 5 份标本。Cellavision DM96 分析时,以人工修正结果作为最终结果。结果见表 2。人工镜检检测时观察者 CV 的平均值为 67.6%,而 Cellavision DM96 人工修正结果平均值为 42.4%。

2.4 方法学比较 Cellavision DM96 自动分析预分

类结果和人工修正结果的裂红细胞计数与金标准(两名经验丰富的阅片者的平均人工镜检计数结果)进行比较。Bland-Altman 和 Passing-Bablok 散点图见图 1~4。对预分类结果计数和人工镜检计数之间的相关性进行 Passing-Bablok 回归分析发现,截距为 1.109(95%CI: -3.43~2.93),斜率为 3.147(95%CI:1.33~6.00),相关系数为 0.85(95%CI:0.76~

0.90; $P<0.0001$), 见图 1。人工修正结果, 截距为 0.345 (95% CI : 0.045~0.879), 斜率为 0.311 (95% CI : 0.056~0.770), 相关系数为 0.98 (95% CI : 0.96~0.99; $P<0.0001$), 见图 2。

表 2 不同检测者之间比对结果

标本号	人工镜检			Cellavision DM96 人工修正后		
	均值	SD	CV	均值	SD	CV
1	16.1	7.1	44	25.2	5.50	22
2	1.5	1.2	80	4.2	2.35	56
3	4.7	2.7	57	10.5	3.68	55
4	3.8	2.8	74	10.8	4.10	38
5	1.2	1.0	83	4.1	1.68	41

注: 均值指每 1 000 个红细胞中出现裂红细胞的数量

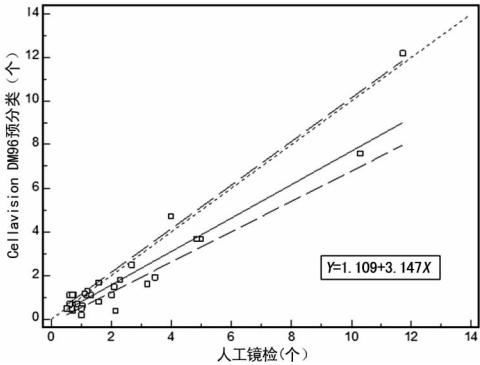


图 1 Cellavision DM96 预分类与人工镜检结果的 Bland-Altman 散点图

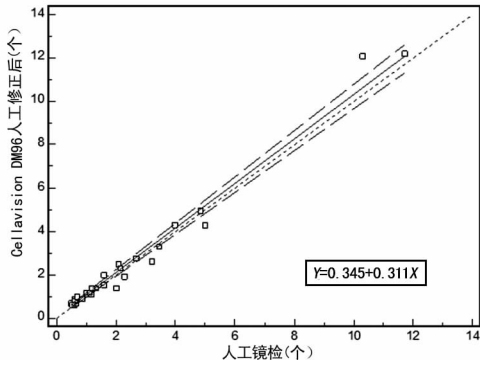


图 2 Cellavision DM96 人工修正后与人工镜检结果的 Bland-Altman 散点图

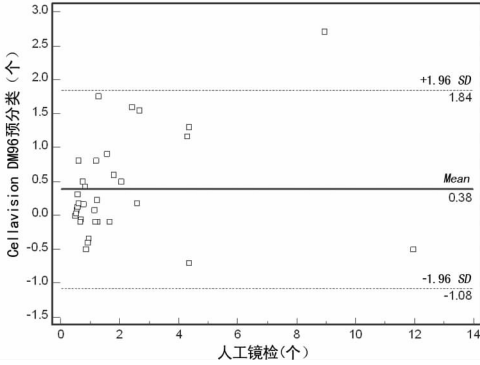


图 3 Cellavision DM96 预分类与人工镜检结果的 Passing-Bablok 相关性散点图

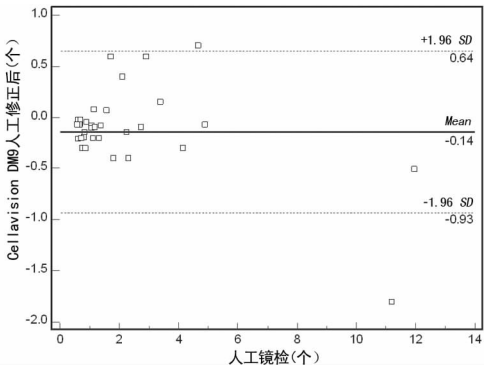


图 4 Cellavision DM96 人工修正后与人工镜检结果的 Passing-Bablok 相关性散点图

2.5 灵敏度和特异度 使用 ROC 曲线来评估将 Cellavision DM96 自动分析用于筛查是否具有分析裂红细胞的能力, 见图 5、6。使用人工镜检(两名经验丰富的阅片者的平均人工镜检计数结果)作为参照方法, 以 cut-off 值为 5/1 000, 作为区分阴性 ($<5/1\,000$) 和阳性 ($\geq 5/1\,000$) 的标准。在 Cellavision DM96 预分类时, 以 8/1 000 为 cut-off 值, ROC 曲线下面积为 0.89 (95% CI : 0.79~0.94), 灵敏度为 93.8%, 特异度为 81.6%, 见图 5。人工修正后结果, ROC 曲线下面积为 0.99 (95% CI : 0.95~1.00) 以 5/1 000 为 cut-off 值, 灵敏度为 96.2%, 特异度为 95.9%, 见图 6。

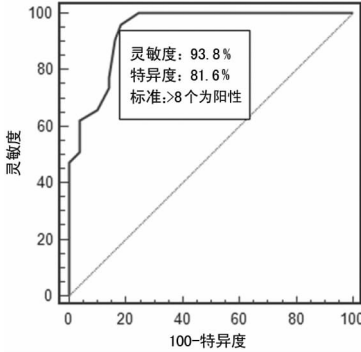


图 5 Cellavision DM96 分类 ROC 曲线

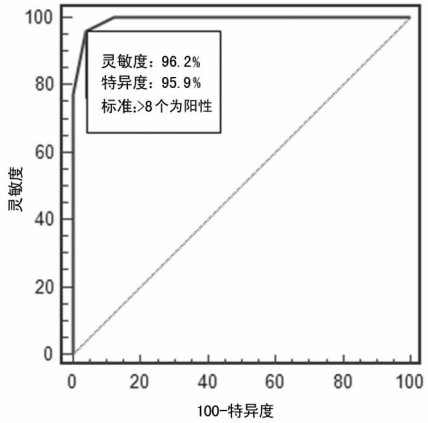


图 6 Cellavision DM96 人工修正结果 ROC 曲线

2.6 重新分类情况 依据人工修正前后结果分析,

裂红细胞假阳性率(指将其他类型红细胞计入裂红细胞)较高,为 56%,其中正常红细胞占 21%,泪滴红细胞占 1%,其他非红细胞占 34%;假阴性率(指将裂红细胞计入其他类型红细胞)为 23%,未能正确分类的红细胞中,正常红细胞占 7%,泪滴红细胞占 5%,棘红细胞占 11%。

3 讨 论

本研究旨在评估 Cellavision DM96 高级红细胞应用软件在估算裂红细胞数量中的表现。Cellavision DM96 自动分析重新分类之前,红细胞软件表现出非常高的灵敏度,但特异度较差,提示需要重新分类。在本研究中,56%最初被分类为棘红细胞的红细胞必须重新分类到其他类别(假阳性细胞);23%的其他类型红细胞人工修正结果被确认为裂红细胞(假阴性细胞)。Cellavision DM96 对裂红细胞的检测具有极其重要的临床应用价值^[2-3],然而本研究选取的 60 例健康人群血涂片中,也会出现少量裂红细胞。因此,确立合适的裂红细胞 cut-off 值非常重要。Cellavision DM96 自动分析人工修正结果,最佳 cut-off 值为 5/1 000,此时灵敏度和特异度均较高(分别为 96.2%和 95.9%),与人工镜检的相关性也较高。在文献[10]中,将裂红细胞 $<5/1\ 000$, $5/1\ 000\sim 10/1\ 000$, $>10/1\ 000$ 作为“健康”、“可疑”和“疾病”标准。本研究结果说明,Cellavision DM96 自动检测可满足临床需求,作为实验室检测裂红细胞的工具。

在精密度检测时,无论是人工镜检还是 Cellavision DM96 自动检测,CV 均较低(2.0%~12.3%);而在不同检测者间的比对中,CV 极高,Cellavision DM96 自动检测 CV 均值为 42.4%,人工镜检 CV 均值高达 67.6%。原因在于,不同人员对裂红细胞识别水平参差不齐,同时也说明在对裂红细胞的检测中,检测者的识别水平是最大的影响因素。然而,无论是精密度检测还是检测者间比对,Cellavision DM96 自动检测裂红细胞的 CV 均低于人工镜检检测。因此,Cellavision DM96 自动检测更适合实验室检测裂红细胞,同时,Cellavision DM96 的强大教学功能更有利于实验室内工作人员形态学识别水平的提高。

本研究发现,Cellavision DM96 自动检测的裂红细胞平均值均高于人工镜检检测。说明电脑对每个红细胞的处理更为精确,而人工镜检检测漏检可能性更大。在研究中,始终将人工镜检作为检测裂红细胞的金标准,然而研究结果表明,Cellavision DM96 在裂

红细胞的检测中较金标准更有优势。

综上所述,使用 Cellavision DM96 自动检测裂红细胞是一种精密度、灵敏度较高的实验室检测方法;经仪器预分类后,通过人工重新分类,其特异度符合临床需求,易于临床工作及教学使用,有助于裂红细胞相关疾病诊治的标准化。

参考文献

- [1] MOAKE J L. Thrombotic microangiopathies[J]. N Engl J Med, 2002, 347(8): 589-600.
- [2] SHATZEL J J, TAYLOR J A. Syndromes of thrombotic microangiopathy[J]. Med Clin N Am, 2017, 101(2): 395-415.
- [3] LESESVE J F, MARTIN M, BANASIAK C, et al. Schistocytes in disseminated intravascular coagulation[J]. Int J Lab Hematol, 2014, 36(4): 439-443.
- [4] TATSUMI N, LEWIS S M. Restructuring of international council for standardization in haematology (ICSH) in Asia[J]. Int J Hematol, 2002, 76(Suppl 1): S281-S285.
- [5] LESESVE J F, FENNETEAU O, CYNOBER T, et al. Role of the biologist in the study of schistocytes[J]. Ann Biol Clin (Paris), 2003, 61(5): 505-512.
- [6] 陈荣发, 余玲玲, 陈小青, 等. CellavisionDM96 血细胞形态分析系统与显微镜镜检分类比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(9): 1387-1388.
- [7] 沈惠颖, 林孝怡, 杨慧, 等. Cella Vision DM96 自动化数字图像分析系统红细胞形态分类的性能评价[J]. 检验医学, 2018, 33(5): 56-58.
- [8] NAKASHIMA M O, DOYLE T J, PHELANLEWIN K, et al. Assessment of semi-quantitative grading of red blood cell abnormalities utilizing images from the Cellavision DM96 compared to manual light microscopy[J]. Int J Lab Hematol, 2017, 39(5): e110-e112.
- [9] CRIEL M, GODEFROID M, DECKERS B, et al. Evaluation of the red blood cell advanced software application on the Cellavision DM96 [J]. Int J Lab Hematol, 2016, 38(4): 366-374.
- [10] HUH H J, CHUNG J W, CHAE S L. Microscopic schistocyte determination according to International Council for Standardization in Hematology recommendations in various diseases[J]. Int J Lab Hematol, 2013, 35(5): 542-547.

(收稿日期:2019-01-09 修回日期:2019-04-02)