

全自动血细胞分析流水线网织红细胞参数参考区间在儿科实验室适用性验证^{*}

曹 科¹, 马东礼^{1△}, 罗小娟¹, 周晨阳¹, 郎家庆¹, 谢辉辉¹, 王 丹¹, 陈运生¹, 杨斌让² (广东省深圳市儿童医院: 1. 检验科; 2. 儿童保健科 518038)

【摘要】 目的 验证 Sysmex-XN3000 全自动血细胞分析流水线网织红细胞参数参考区间是否适合于儿科实验室。**方法** 根据 ISO 15189:2012《医学实验室质量和能力的要求》和美国病理家协会对实验室质量管理的要求和实验室认可的要求, 参照美国临床和实验室标准化协会 C28-A3 文件推荐方法, 对引用厂家试剂说明书的 7 项网织红细胞参数的参考区间进行实验验证。**结果** 超过 90% 参考个体的网织红细胞绝对值、低荧光强度网织红细胞百分率、中荧光强度网织红细胞百分率、高荧光强度网织红细胞百分率和未成熟网织红细胞比率检测值落在厂家提供的参考区间以内, 超过 10% 参考个体的网织红细胞百分数和网织红细胞血红蛋白水平检测值落在厂家提供的参考区间以外。**结论** 厂家提供的网织红细胞参考区间不适合于儿科实验室, 应自建儿童参考区间。

【关键词】 网织红细胞计数; 健康儿童; 参考区间; 验证

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.02.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)02-0184-02

Applicability verification of reticulocytes parameters reference intervals of automatic blood cell analysis assembly line in pediatric laboratory^{*} CAO Ke¹, MA Dong-li^{1△}, LUO Xiao-juan¹, ZHOU Chen-yang¹, LANG Jia-qing¹, XIE Hui-hui¹, WANG Dan¹, CHEN Yun-sheng¹, YANG Bin-rang² (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Children Health Care, Shenzhen Municipal Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China)

【Abstract】 Objective To verify whether the reference intervals of reticulocytes parameters on Sysmex-XN3000 automatic blood cell analysis assembly line are suitable for the pediatric laboratory. **Methods** According to the items of ISO15189:2012 the Requirements of the Quality and Ability in Medicine Laboratory, requirements of laboratory accreditation and laboratory quality management by the Association of American Pathologists and the methods recommended by the C28 and A3 document of American Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the reference intervals of 7 reticulocytes parameters from the manufacturer's instructions were performed the laboratory verification. **Results** The detection results in reticulocyte absolute number, low fluorescence intensity reticulocytes percentage, middle fluorescence intensity reticulocytes percentage, high fluorescence intensity reticulocytes percentage and immature reticulocytes ratios in more than 90% of reference individuals were fallen within the reference intervals provided by the manufacturers, But the reticulocyte percentage and reticulocyte hemoglobin level in more than 10% of individuals were fallen outside the reference intervals provided by the manufacturers. **Conclusion** The reticulocytes reference intervals provided by the manufacturer are unsuitable for the pediatric laboratory. The children reference intervals should be established by the laboratory itself.

【Key words】 reticulocytes count; healthy children; reference interval; verification

参考区间是目前实验室最常用的解释检验报告的一个“决策支持工具”^[1]。正确的参考区间可以避免不必要的重复检测或临床干预, 建立可靠的检验项目参考区间是实验室的重要任务^[2]。根据 ISO 15189:2012《医学实验室质量和能力的要求》和美国病理家协会对实验室质量管理的要求和实验室认可的要求, 参照美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) C28-A3 文件推荐方法, 本研究对厂家试剂说明书提供 Sysmex-XN3000 全自动血细胞分析流水线 7 项网织红细胞参数 [网织红细胞绝对值 (RET#)、网织红细胞百分数 (RET%)、低荧光强度网织红细胞百分率 (LFR%)、中荧光强度网织红细胞百分率 (MFR%)、高荧光强度网织红细胞百分率 (HFR%)、未成熟网织红细胞比率 (IRF%)、网织红细胞血红蛋白水平 (RET-He)] 的参考区间进行实验验证, 探讨厂家提供的参考区间是否适合

于儿科实验室, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 6 月在本院儿童保健科健康体检的 1 个月至 18 岁健康儿童及青少年 40 例作为研究对象。按照 CLSI 关于健康者的原则要求, 制订纳入标准: (1) 体格检查、生长发育正常, 主要脏器基本无症状及体征; (2) 检查前 1 个月无各种慢性感染; (3) 检查前 1 个月未接受过铁剂和输血治疗; (4) 个人无血红蛋白疾病史和贫血史, 无血红蛋白疾病家族史; (5) 血常规检查各项参数 [其中小于 6 岁婴幼儿血红蛋白 (Hb) > 110 g/L, 6~17 岁儿童 Hb > 120 g/L; 平均红细胞体积 (MCV) > 80 fL; 平均红细胞血红蛋白含量 (MCH) > 28 pg; 平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC) > 320 g/L] 及细胞直方图、散点图正常^[3]; (6) 血浆铁 12.8~31.3 μmol/L。为验证涵盖 1

^{*} 基金项目: 广东省深圳市科创委资助项目 (JCYJ20140416141331504)。

作者简介: 曹科, 男, 本科, 主管技师, 主要从事临床检验工作。△ 通讯作者, E-mail: madl1234@126.com。

个月至 18 岁健康儿童及青少年 7 项网织红细胞参数的参考区间的适用性,本实验选取的 40 例参考个体基本均匀分布于男、女性别的各年龄段。

1.2 仪器与试剂 日本 Sysmex-XN3000 全自动血细胞分析流水线,仪器配套校准品、质控品和试剂,检测血常规和 7 项网织红细胞参数;美国贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪配套试剂检测血浆铁。汕头金丰医疗器械科技有限公司生产的 1 mL EDTA-K₃ 抗凝管(EDTA-K₃ 1.5~2.0 mg/mL)和广州阳普医疗科技股份有限公司生产的 2 mL 微量元素专用肝素钠抗凝管(肝素钠 20 U/mL)。

1.3 质量控制 实验前配套校准品校准血常规及网织红细胞参数,每天用配套 3 种水平室内质控品监测血常规及网织红细胞各参数的稳定性,所有项目均在控,并参加卫生部临床检验中心的室间质量评价,结果合乎要求。血浆铁每天使用伯乐双水平质控血清检测,结果在控,参加广东省临床检验中心的室间质量评价,结果合乎要求。

1.4 方法

1.4.1 验证方法 参照 C28-A3 文件推荐方法^[4]要求进行验证:收集 1 组(20 例)健康未成年参考个体样本,男、女各 10 例,在 Sysmex-XN3000 全自动血细胞分析流水线上检测样本,网织红细胞参数检测结果 90%(18 例)落在现用参考区间以内,不超过 10%(2 例)结果落在现用参考区间以外,说明该参

考区间有效。若第 1 组实验数据 3 例或以上检测结果落在参考区间以外,则收集第 2 组数据重新检测,第 2 组检测数据不超过 2 例结果落在参考区间以外,可以认为验证有效。若第 2 组检测数据超过 2 例结果落在参考区间以外,则需进一步做自建参考区间的实验。

1.4.2 标本采集与检测 所有受试者于清晨仰卧位或坐姿由技术熟练的护士空腹抽取 1 mL 静脉血于 EDTA-K₃ 抗凝管和 2 mL 静脉血于肝素钠抗凝管中,轻轻颠倒抗凝管 5~8 次,剔除肉眼可见脂血、黄疸(肝素钠抗凝标本)或血凝(EDTA-K₃ 抗凝标本)不合格标本,剩余标本于 6 h 内完成血常规和 7 项网织红细胞参数的检测,24 h 内完成血浆铁的检测。需要说明的是所有检测标本均为常规体检剩余标本。

2 结果

2.1 健康参考个体情况 收集两组(共 40 例)健康未成年参考个体样本,每组男、女各 10 例,40 例参考个体均匀分布于 1 个月至 18 岁男、女各年龄段,每 1 岁男女至少 1 例标本,其中男童平均(8.4±5.2)岁,女童平均(8.5±5.0)岁。

2.2 7 项网织红细胞参数参考区间验证结果 见表 1。按照 C28-A3 文件推荐方法,先取 20 例健康参考个体进行验证,RET%和 RET-He 验证不通过,再取 20 例参考个体进行验证,同样 RET%和 RET-He 验证不通过。其余 5 项参数均通过验证。

表 1 7 项网织红细胞参数参考区间验证结果

项目	验证例数(n)	超区间例数(n)	超区间比例(%)	厂家参考区间	健康参考个体范围	验证结论
RET#	40	3	7.5	(17.00~70.10)×10 ⁹ /L	(26.20~92.90)×10 ⁹ /L	通过
RET%	40	7	17.5	0.43%~1.36%	0.60%~1.74%	不通过
LFR%	40	1	2.5	89.90%~99.40%	84.20%~99.20%	通过
MFR%	40	2	5.0	1.60%~9.50%	0.80%~13.00%	通过
HFR%	40	1	2.5	0.00%~1.70%	0.00%~2.20%	通过
IRF%	40	2	5.0	1.60%~10.50%	0.80%~15.20%	通过
RET-He	40	31	77.5	32.10%~38.80%	28.90%~34.60%	不通过

3 讨论

网织红细胞计数是判断骨髓红系造血情况和疗效观察的重要指标^[4]。检测方法有人工镜检法、血细胞分析仪法等方法,血细胞分析仪法具有结果准确,检测快速,影响因素少,便于掌握等优点,是目前应用的主流方法^[5]。日本 Sysmex 公司最新推出的 Sysmex-XN 系列全自动血细胞分析流水线,其网织红细胞计数原理是分析仪吸入一定体积的全血标本,先将一部分标本用 CELLPACK DFL 按 1:200 自动稀释,然后加入 Fluorocell RET(含聚甲烯次甲基荧光染料),对网织红细胞进行染色,最后将染色后标本导入鞘流式检测系统,测定前向散射光和侧向荧光强度,根据荧光强度将网织红细胞分成 HFR、MFR、LFR 3 个区域,荧光强度越高表示网织红细胞越幼稚,通过计算得出 RET# 等 7 种参数。

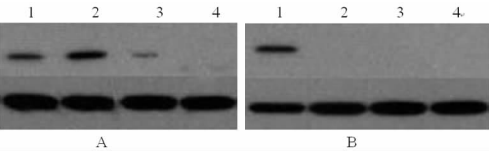
检验项目的参考区间受种族、年龄、性别、生长发育、检测仪器等众多因素的影响而有差异^[6-7]。因此每个实验室应建立自己的生物参考区间,引用文献或厂家的说明书必须非常慎重^[8]。目前国内外较少见 Sysmex-XN 系列全自动血细胞分析流水线 7 项网织红细胞参数的儿童参考区间的报道,所以作者优先引用厂家提供的参考区间,并按要求进行了验证。

本验证结果显示,虽然超过 90%参考个体的 RET#、LFR%、MFR%、HFR%和 IRF%检测值落在厂家提供的参考区间以内,通过验证,但超过 10%参考个体的 RET%和 RET-He 的检测值落在厂家提供的参考区间以外,未通过验证。7 项参数同时由仪器测定得出,因此,厂家提供的网织红细胞参考区间不适用于本儿科实验室,应建立本实验室的参考区间。

本研究将在最近一段时间,筛选足够数量的健康未成年标本,建立起儿科实验室网织红细胞参数的参考区间,更好地为本地区儿童医疗保健工作提供优质服务。

参考文献

[1] Jones G, Barker A. Reference intervals[J]. Clin Biochem Rev, 2008, 29(Suppl 1): 93-97.
[2] 王洪亚, 张捷. 建立检验项目参考区间的探讨[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(7): 548-550.
[3] 王卫平. 儿科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 351-352.
[4] 乐家新, 丛玉隆, 兰亚婷, 等. 网织红细胞计数与分群测定及临床应用探讨[J]. 临床检验杂志, 2003, (下转第 188 页)



注: A 为 ANXA2-siRNA 0.25 μg ; B 为 ANXA2-siRNA 0.50 μg ;
1 为阴性对照; 2~4 为 ANXA2-siRNA1~3。

图 4 各靶点对 ANXA2 表达的干扰效率

3 讨 论

RNAi 是由双链 RNA 介导的、转录后水平特异沉默同源靶基因的现象,是一种新兴的基因阻断技术,在细胞与组织模型的研究中均取得了满意的效果^[6]。早期 RNAi 片段大多为化学合成,其效应短暂,现多将 RNAi 序列设计成小发卡结构,克隆入质粒或病毒载体,转染靶细胞,达到长期、稳定表达 siRNA 的目的。慢病毒表达载体携带信息量大,可整合到宿主基因组内稳定表达,是介导 RNAi 的理想载体。本实验设计采用慢病毒载体携带不同 RNAi 的靶点质粒(ANXA2-siRNA1~3),取得了较好的干扰效率。

RNAi 现象是 1995 年人们在线虫体内首先发现的,其作用机制可概括为外源性或内源性 dsRNA 在 Dicer 酶切割下形成 siRNA,后者与特异性酶结合生成 RNA 诱导的沉默复合体(RISC),介导同源 mRNA 的降解。Dicer 酶在 RNAi 的调控中起着非常重要的作用,它属于 RNA 酶家族,进化上非常保守,能识别 dsRNA 并将其降解为 siRNA^[7-8]。外源 dsRNA 进入细胞与 Dicer 结合形成 Dicer-dsRNA 复合物,Dicer 酶发挥 RNase 活性作用将 dsRNA 切割为 siRNA,后者与 RNAi 特异性酶如 Ago-2 等结合,形成 RNA 诱导沉默复合体(RISC),RISC 经 ATP 酶激活后,解开与之结合的 siRNA 双链,并通过碱基配对,在 siRNA 指导下序列特异性降解同源 mRNA,达到阻止靶基因表达,使基因沉默的目的^[9]。不同靶位点的 RNA 作用效果差别很大,故需要根据同一条 mRNA 的不同靶位点设计多个 siRNA。Holen 等^[10]研究发现一般转录起始位点、编码区 3'末端干扰效率较差。

本实验根据上述原理,在 ANXA2 mRNA 序列中筛选出的 3 个靶位点并把此编码 DNA 接入慢病毒载体 pGCSIL-GFP。重组后的载体 ANXA2-siRNA 与 ANXA2 过表达载体 pEGFP-N1-ANXA2 共转染 293T 细胞以检测干扰效率。经 Western blotting 检测,三者对 ANXA2 的表达均有一定的干扰作用,当加入干扰质粒浓度提高到 0.50 μg 时,三者均能有效干扰 ANXA2 蛋白表达,其中 ANXA2-siRNA3 在加入的干扰质粒浓度为 0.25 μg 及 0.50 μg 时均能高效干扰外源性 ANXA2 的表达,完全满足后续实验的要求。ANXA2-siRNA3 干扰效率高、干扰效果稳定,故选择 ANXA2-siRNA3 进行后续试验。

实验发现细胞密度和细胞状态对转染效率也有影响,如果转染时细胞密度过低或细胞处于非最佳生长状态,细胞转染效率也会降低,转染前 24 h 更换新鲜培养基可提高转染率。

参考文献

[1] Fabrizio M, Francesca RS, Cristiano A, et al. Subclinical atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: focus on β 2GPI-specific T cell response[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34 (3):661-668.

[2] Kwon M, Yoon CS, Jeong W, et al. ANXA2-S100A10 heterotetramer, a novel substrate of thioredoxin[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(25):23584-23592.

[3] Zhang JL, McCrae KR. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2-glycoprotein I antibodies[J]. *Blood*, 2005, 105(5):1964-1969.

[4] Anna B, Jonathan NT, Chaim P. High antiphospholipid antibody levels are associated with statin use and may reflect chronic endothelial damage in non-autoimmune thrombosis: cross-sectional study[J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65(6):551-556.

[5] Tong M, Viall CA, Chamley LW. Antiphospholipid antibodies and the placenta: a systematic review of their in vitro effects and modulation by treatment[J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21(1):97-118.

[6] Siqing S, Yong L, Peilin H, et al. Inhibition of B7-H4 gene expression by RNA interference (RNAi) in lung cancer A549 cell line[J]. *Eur Respir J*, 2011, 38(55):1489.

[7] Johanson TM, Lew AM, Chong MM. MicroRNA-independent roles of the RNase III enzymes Drosha and Dicer [J]. *Open Biol*, 2013, 3(10):130-144.

[8] Scherer L, Rossi JJ. Recent applications of RNAi in mammalian systems [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2004, 5(3):355-360.

[9] 李铁军, 康楷, 宋建宁, 等. RNA 干扰抑制结肠癌细胞血管内皮生长因子表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27 (8):14-18.

[10] Holen T, Amarzguoui M, Babaie E, et al. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(9):2401-2407.

(收稿日期:2015-05-11 修回日期:2015-10-03)

(上接第 185 页)

21(4):231-233.

[5] 李筱梅, 付秋英, 程志忠, 等. 2 种网织红细胞计数方法的比较[J]. *临床检验杂志*, 2005, 23(2):134.

[6] 尚红, 陈文祥, 潘柏申, 等. 建立基于中国人群的临床常用检验项目参考区间[J]. *中国卫生管理标准*, 2013, 4(1):17-21.

[7] Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, et al. Reference intervals for a complete blood count determined on differ-

ent automated haematology analysers; Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2002, 40(1):69-73.

[8] 王佳, 汪小蓉, 符布清. 血细胞生物参考区间适用性验证探讨[J]. *检验医学与临床*, 2008, 5(22):1369-1370.

(收稿日期:2015-07-09 修回日期:2015-09-03)