

临床推广使用价值。

参考文献

- [1] 袁为群,杨静,王咏梅.舒适护理在小儿先天性心脏病介入治疗术中的应用[J]. 贵州医药,2012,36(11):1044-1045.
- [2] 赵光英,李安梅,杨敏,等.小儿先天性心脏病介入治疗的舒适护理[J]. 当代护士(学术版),2013(9):70-71.
- [3] 王瑜.111 例小儿先天性心脏病介入治疗术的护理[J]. 海南医学,2011,22(4):150-151.

• 临床探讨 •

- [4] 杨翠琼.小儿先天性心脏病介入治疗围术期的护理干预[J]. 临床合理用药杂志,2014,7(12):148-149.
- [5] 冯方方,刘艳飞,黄峥,等.以家庭为中心的护理模式在小儿先天性心脏病介入封堵术护理中的应用现状[J]. 世界临床医学,2016,10(19):155-155.
- [6] 郝开颜.实施临床路径对小儿先天性心脏病介入封堵治疗的护理[J]. 全科护理,2012,10(12):1092-1093.

(收稿日期:2017-05-07 修回日期:2017-07-21)

冷球蛋白致血小板计数假性增多 1 例的分析

付兆强,闫 伟[△],汤小山,钟联平,温红祥

(中国人民解放军第四五五医院检验科,上海 200052)

摘 要:目的 对 1 例由冷球蛋白导致血细胞分析仪测定血小板假性增多的患者进行分析。方法 按照冷球蛋白检测要求进行标本采集和处理。标本采集后于室温放置 30、60、90、120 min 再上机检测,同时手工计数标本血细胞、血小板,观察各阶段标本血涂片细胞形态。对标本 37 ℃ 温浴血清、4 ℃ 冰箱静置 1 周所得的血清(静置上清液)及离心沉淀物溶解后的液体标本(冷沉淀溶液),进行总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、补体、免疫球蛋白检测,并进行免疫蛋白电泳分析。结果 患者末梢血涂片中的血小板计数明显低于血细胞分析仪检测结果,未见小红细胞及红细胞碎片等;血常规标本室温放置 60 min 后涂片,可见不定形物及不规则形红细胞;标本 37 ℃ 温浴 30 min 后涂片,不定形物消失,不规则形红细胞明显减少;37 ℃ 温浴血清进行免疫球蛋白定量检测,免疫球蛋白 M(IgM)水平增高,补体 C3、C4 水平减低;4 ℃ 静置上清液中球蛋白及 IgM 水平均低于 37 ℃ 温浴血清;37 ℃ 温浴血清及 4 ℃ 冷沉淀溶液免疫固定电泳结果为 IgM、κ 轻链阳性,4 ℃ 静置上清液免疫固定电泳结果为 κ 轻链阳性。结论 该患者为冷球蛋白 IgM 导致的血细胞分析仪测定血小板假性增多。

关键词:冷球蛋白; 血小板假性增多; 血细胞分析仪

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.22.045 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)22-3393-03

血小板检查是临床实验室血液学常规项目,是某些疾病诊断、治疗和预后判断的重要指标^[1]。随着科学技术的发展,血细胞分析仪在临床实验室得到广泛应用,大大提高了检测效率,并提供了众多手工方法所不能提供的实验参数。但是,血细胞分析仪也存在血细胞计数结果与实际值有一定差异的情况,特别是影响因素诸多的血小板计数(PLT)^[2]。本研究对近期本院发现的 1 例血细胞分析仪测定 PLT 结果假性增多的患者进行了分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,男,55 岁,2016 年 2 月 14 日因双下肢肿胀、瘀斑伴疼痛于本院就诊。自述 2 年 6 个月前出现双下肢进行性红斑,双足底疼痛,6 个月前外院确诊为小淋巴细胞淋巴瘤伴骨髓侵犯。入院查体:双侧腹股沟及腋窝可触及多个肿大淋巴结,胸背部、双侧前臂内侧及腹部可见散在红斑,双手背可见散在出血点,双下肢小腿可见斑片状瘀斑,左小腿可见散在水泡,左足可见散在出血点及足底肿胀。超声检查提示:胆囊结石,脾稍大,少量腹腔积液,双侧腹股沟多发淋巴结肿大,双下肢腘动脉壁上细小斑块形成。凝血检查:除 D-二聚体(D-D)略高外其余指标均正常。血浆鱼精蛋白副凝血试验(3P)阴性,网织红细胞百分率为 2.1%,直接、间接人球蛋白抗体试验均阴性。

1.2 仪器与试剂 采用希森美康 XT-1800i 血细胞分析仪及配套试剂,雅培 CI8200 全自动生化分析仪、日本积水试剂,贝克曼 IMMAGE 800 特定蛋白分析仪及配套试剂;乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝、促凝真空采血管购于 BD 医疗器械(上海)有限公司;血小板、白细胞和红细胞稀释液及瑞氏染色液均为自配试剂;凝血酶试剂购于西门子医学诊断产品(上海)有限公司;采用奥林帕斯 CX21 显微镜、血细胞计数板、37 ℃ 水浴箱、保温桶、湘仪 TDZS-WS 台式低速离心机、4 ℃ 冰箱、低温冷冻离心机。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 征得患者及家属同意后,参照相关文献中对冷球蛋白的检测要求,相关器具置 37 ℃ 预温,保温桶保温至床旁采集静脉血,采集 EDTA-K₂ 抗凝管及促凝管标本各 2 管,并及时保温检测。同时采集末梢血,20 μL 加入含 0.38 mL 血小板稀释液和白细胞稀释液的试管中,10 μL 加入含 1.99 mL 红细胞稀释液的试管中,并制作 4 张血涂片,用于手工计数白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、PLT,并进行细胞形态的观察。

1.3.2 测定方法 检测仪器状态正常,确认室内质控结果均在控后进行检测,室内质控品均购于上海市临床检验中心。立即用希森美康 XT-1800i 血细胞分析仪检测其中 1 支保温血常

[△] 通信作者,E-mail:13524678789@163.com。

规标本,随后将标本室温放置 30、60、90、120 min 后检测,同时手工计数 WBC、RBC、PLT,并观察血涂片中各类血细胞形态及分布情况。其余标本置 37℃水浴箱温浴 2 h 后,于 37℃(离心机空转 30 min,并在套管中加入温水)离心分离血清及血浆。立即在雅培 CI8200 全自动生化分析仪检测血清总蛋白(TP)、清蛋白(ALB),球蛋白(GLB)为 TP 减去 ALB 的计算结果;在贝克曼 IMMAGE 800 特定蛋白分析仪上检测血清中补体(C3 和 C4)、免疫球蛋白[免疫球蛋白 M(IgM)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 G(IgG)],类风湿因子(RF)、抗链球菌溶血素 O(ASO)的水平。剩余血清及血浆用 37℃预温的毛细滴管分别移至玻璃试管中,用于检测和鉴别冷沉淀物的水平及类型。标本于 4℃冰箱静置 1 周,取出后于 4℃,2 500 r/min 离心 30 min,定量检测上层血清 TP、ALB、GLB、C3、C4、IgM、IgA、IgG、RF、ASO 的水平。采用 4℃的 0.9%氯化钠溶液洗涤离心沉淀物 3 次,弃去上层生理盐水,37℃溶解后立即检测 TP、ALB、GLB 的水平,在已溶解的冷沉淀中加入凝血酶试剂定性检测血浆冷纤维蛋白原量。分别将 37℃温浴血清、4℃静置上清液及 4℃冷沉淀溶液送至第三方检验中心进行免疫固定电泳(IFE)定性检测,标本检测前置于 37℃水浴溶解变清后立即检测。

2 结 果

血细胞分析仪检测采集后 37℃保温标本及室温放置 30、60、90、120 min 标本所得结果,与手工计数比较,WBC、RBC 值差异不大。PLT 计数方面,仪器检测结果随室温放置时间变长而增多,且始终明显高于手工计数结果。末梢血涂片中血小板明显减少,未发现小红细胞、红细胞碎片等,血常规标本室温放置 60 min 后,涂片中可见不定形物及不规则形红细胞,标本置于 37℃预温 30 min 后涂片,不定形物消失,不规则形红细胞明显减少。见表 1。

血清及血浆冷球蛋白定性检测结果均为阳性,标本置于 4℃冷蛋白沉淀析出,置于 37℃水浴中,析出的冷蛋白很快溶解。血浆冷纤维蛋白原定性阴性,在已溶解的冷沉淀物中加入凝血酶,未发生凝固现象。

37℃离心分离的血清标本与标本 4℃静置 1 周后离心所得上清液中的 IgM 检测结果差异较大,前者 IgM 水平明显高于参考区间,后者 IgM 水平在参考区间内,两者相差 6.17 g/L。37℃离心血清标本及冷沉淀溶液 IFE 定性结果为 IgM、κ轻链阳性,4℃静置上清液 IFE 定性结果为 κ轻链阳性。见表 2。

表 1 血细胞分析结果

检测项目	WBC(×10 ⁹ /L)		RBC(×10 ¹² /L)		PLT(×10 ⁹ /L)		PCT(%)	血红蛋白(g/L)	HCT(%)
	仪器	手工	仪器	手工	仪器	手工			
末梢血(室温)	—	5.9	—	2.89	—	29*	—	—	—
静脉血									
37℃保温	6.28	—	2.86	—	132	—	0.13	94	29.4
放置 30 min	6.41	6.1	2.92	3.07	284	31*	0.28	97	29.7
放置 60 min	6.33	6.0	2.87	2.91	601	27*	0.55	95	29.3
放置 90 min	6.44	—	2.90	—	888	31*	0.74	96	29.3
放置 120 min	6.38	—	2.89	—	1 163	33*	1.04	93	29.0

注:—表示为未检测;*表示标本在 37℃水浴 15 min 后立即充池计数;WBC 参考区间为(3.97~9.15)×10⁹/L,RBC 参考区间为(4.09~5.74)×10⁹/L,PLT 参考区间为(85~303)×10⁹/L,PCT 参考区间为 0.108%~0.272%,血红蛋白参考区间为 131~172 g/L,HCT 参考区间为 38.0%~50.8%

表 2 不同温度血清及冷沉淀物检测结果

检测项目	TP(g/L)	ALB(g/L)	GLB(g/L)	C3(g/L)	C4(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)	IgG(g/L)	RF(IU/mL)	ASO(IU/mL)
37℃血清	58.0	29.3	28.7	0.30	0.08	7.96	0.85	10.90	20	38.5
4℃上清液	52.0	29.2	22.8	0.29	0.07	1.79	0.84	10.60	20	38.2
4℃冷沉淀	6.0	0.0	6.0	—	—	—	—	—	—	—

注:—表示为未检测;TP 参考区间为 60.0~83.0 g/L,ALB 参考区间为 37.0~53.0 g/L,GLB 参考区间为 20.0~30.0 g/L,C3 参考区间为 0.79~1.52 g/L,C4 参考区间为 0.16~0.38 g/L,IgM 参考区间为 0.46~3.04 g/L,IgA 参考区间为 0.82~4.53 g/L,IgG 参考区间为 7.51~15.60 g/L,RF 参考区间为小于 20.0 IU/mL,ASO 参考区间为小于 116.0 IU/mL

3 讨 论

冷球蛋白是含有类风湿因子和单克隆或多克隆免疫球蛋白、由 B 淋巴细胞增殖产生、在血清中 37℃以下(一般 0~4℃)易发生沉淀而在 37℃时可再溶解的病理性免疫球蛋白。该蛋白质在血涂片中表现为细胞外的沉淀物,小、亮、薄、不定

形性是其特征,在室温下(18~25℃)易快速生成。冷球蛋白可分为 3 种型:1 型为单克隆型冷球蛋白,大多为单克隆性 IgM 或 IgG;2 型为单克隆-多克隆混合型冷球蛋白,由 2 种 Ig 成分构成的免疫复合物,1 种为单克隆型(多为 IgM),另 1 种为多克隆型(多为 IgG);3 型为多克隆混合型,由 2 种或 2 种以

上多克隆免疫球蛋白构成[由多克隆型免疫球蛋白抗体(多为 IgM)与其他免疫球蛋白(如 IgG、IgA)结合形成免疫复合物],有时还可能含补体成分(如 C3)。1 型冷球蛋白和冷纤维蛋白原在 4℃ 放置 3~18 h 即可沉淀,混合型冷球蛋白(2 型或 3 型)常需 72 h 以上才会沉淀。沉淀物可呈絮状、结晶状或胶凝块^[3-4]。冷球蛋白血症是指血清中出现冷球蛋白。该病可分为原发性、继发性和家族性 3 种。原发性者原因不明,遗传与家族发病相关。继发性者常见于患感染性疾病、自身免疫性疾病、恶性肿瘤、某些皮肤病等疾病的患者。其临床症状主要是皮肤紫癜、关节疼痛、肾功能损伤和雷诺现象等,诊断主要依据是血清中检出冷球蛋白。血清中可能出现 2 种类型的冷蛋白,即冷纤维蛋白原与冷球蛋白。冷纤维蛋白原是纤维蛋白原和纤维蛋白的复合物,血清不出现冷沉淀,仅在血浆中出现沉淀。冷球蛋白在血清和血浆均可出现冷沉淀。测定冷球蛋白目前尚无国际统一的标准方法,且无公认的参考区间^[5],报道分析方法多样^[6-7]。笔者通过比较 37℃ 温浴血清及标本 4℃ 静置上清液 C3、C4、IgM、IgA、IgG、RF、ASO 的水平,结合 37℃ 温浴血清、4℃ 静置上清液和冷沉淀溶液中 TP、ALB、GLB 水平,以及 IFE 结果综合分析,认为本例患者血液中存在冷球蛋白。

本例冷球蛋白血症的发现源于血细胞分析仪出现 PLT 异常增多($2.414 \times 10^9/L$),但血细胞分析仪显示血小板直方图曲线正常、无干扰。为明确 PLT 的真实水平,采用手工进行血小板的计数,并采用血涂片观察血细胞形态,得出 PLT 水平为 $77 \times 10^9/L$,涂片中血小板及白细胞减少,形态大致正常,成熟红细胞呈不规则形。与临床医师沟通得知本例患者 2 月 4 日在当地医院检测 PLT 为 $1.306 \times 10^9/L$,与本次手工结果明显不符。血常规标本室温放置 4 h 后,观察发现血浆与血细胞间有 1 层白色沉淀物,标本 3 000 r/min 离心 10 min,该沉淀物能有效地将血浆和血细胞分离,沉淀物在高倍镜下形同尿液中非晶形盐类结晶。患者血标本在低于 37℃ 的室温环境下即出现冷沉淀,结合患者为小淋巴细胞淋巴瘤,既往检测抗核抗体阳性,且出现双下肢肿胀、瘀斑、肾功能损伤及双下肢组织坏死等临床表现,综合分析认为本例患者为冷球蛋白导致血细胞分析仪测定红细胞假性增多。常温条件下希森美康 XT-2000i/1800i 血细胞分析仪电阻抗法主要将小于 35 fL 的颗粒认定为血小板,患者血常规标本中形成的冷沉淀颗粒可能使血细胞分析仪将小冷沉淀颗粒归类为血小板,导致了 PLT 假性增多。

目前常规血小板的计数方法包括电阻抗法、光学法、荧光法和显微镜法。国际血液学标准化委员会(ICSH)推荐的参考方法是应用流式细胞术检测 PLT 水平。电阻抗法适用于常规标本的筛检,对于大血小板有漏检的情况,而细胞碎片、小红细胞等干扰会导致计数不准确。因此,对出现血小板报警提示的标本,必须通过其他方法复检。光学法可以解决大血小板漏检,以及细胞碎片和小血小板的干扰问题,但重复性稍差,且需在网织红细胞通道测定。荧光法解决了大血小板和其他杂质的干扰,且在低值血小板有更好的准确性和重复性。显微镜法虽然重复性差,误差大,但为最直观的计数方法,可作为仪器法的必要补充^[8]。ICSH 推荐的流式细胞术检测对人员、技术等

要求较高,常规血小板检测工作中使用较少^[9]。本实验室采用手工计数及血涂片镜检对电阻抗法血小板结果异常的标本进行复查,可得出相对准确的 PLT。

冷球蛋白检测分析前的质量控制尤为重要,标本采集器材、运送、接收后保存、分离血清及检测均需在 37℃ 恒温条件下进行,检测样品的提取和运输是关键。经过洗涤和分离后的冷沉淀进行冷球蛋白的定量和分型对于患者的后续治疗和预后具有重要意义^[10]。笔者采用 IFE 和毛细管区带电泳(CZE)2 种方法对患者的冷蛋白进行免疫分型,结果略有不同。IFE 分析检测到多克隆 IgG 和单克隆 IgM κ 轻链,而在 CZE 分析中除检测到多克隆 IgG 外,还检测到单克隆 IgM κ 轻链和多克隆 IgA λ 轻链^[11]。根据试验结果,患者血液标本在低于 37℃ 的环境下即出现冷沉淀现象,通过对 37℃ 温浴血清及 4℃ 静置上清液 TP、ALB、GLB、C3、C4、IgM、IgA、IgG、RF、ASO 水平,以及 37℃ 温浴血清、4℃ 静置上清液和冷沉淀溶液 TP、ALB、GLB、IFE 结果与患者临床表现进行综合分析,推断本例患者为小淋巴细胞淋巴瘤继发性冷球蛋白血症,可能是 1 型单克隆性 IgM 冷球蛋白。

参考文献

- [1] 刘成玉,罗春丽.临床检验基础[M].5 版.北京:人民卫生出版社,2012.
- [2] 田麦,李卉.血细胞分析仪测定血小板假性升高的原因及探讨[J].中国医疗前沿,2012,7(20):54-55.
- [3] 于连辉,王庚,郭野,等.冷球蛋白血症致血小板计数假性正常 1 例[J].临床检验杂志,2014,32(10):799-800.
- [4] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2015:422-423.
- [5] 周丽艳,谈介凡,王殿华.冷球蛋白血症致假性血小板增多 1 例[J].中华检验医学杂志,2011,34(12):1163-1164.
- [6] Motyckova G, Murali M. Laboratory testing for cryoglobulins[J]. Am J Hematol, 2011, 86(6):500-502.
- [7] Ongen B, Aksungar B, Cicek B, et al. Hepatitis C virus positive patient diagnosed after detection of atypical cryoglobulin[J]. World J Clin Cases, 2016, 4(3):81-87.
- [8] 华江,潘扬.不同检测方法计数血小板的准确性评价[J].临床检验杂志,2015,33(1):12-13.
- [9] 陈娟,董晶,彭赛辉,等. PLT-F 计数低值血小板的准确性评价[J].实验与检验医学,2016,34(3):288-290.
- [10] Anis S, Abbas K, Mubarak M, et al. Vasculitis with renal involvement in essential mixed cryoglobulinemia: case report and mini-review[J]. World J Clin Cases, 2014, 2(5):160-166.
- [11] Ongen B, Aksungar FB, Cicek B, et al. Hepatitis C virus positive patient diagnosed after detection of atypical cryoglobulin[J]. World J Clin Cases, 2016, 4(3):81-86.