

破碎红细胞检测研究进展*

崔婵娟, 张捷, 乔蕊 (北京大学第三医院检验科, 北京 100191)

摘要: 红细胞在血液循环中受到外在机械损伤而产生的破碎红细胞是诊断血栓性微血管病(thrombotic microangiopathy, TMA)的重要形态学线索。TMA 代表性疾病有血栓性血小板减少性紫癜(Thrombocytopenic purpura, TTP)、溶血尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)等, 尤其是近年来, 人们对移植相关血栓性微血管病的研究不断深入, 外周血破碎红细胞检测越来越受到关注。但是关于破碎红细胞形态学诊断标准及破碎红细胞诊断 TMA 阈值等问题, 由于工作人员个人经验、检测方法及疾病种类等差异, 目前各实验室还没有一个完全统一的标准。并且随着近年来自动血细胞分析仪检测外周血破碎红细胞技术的发展, 关于该技术检测方法的统一性、临床实用性及可靠性等问题也越来越受到人们的关注。该文将从手工检测方法及自动血细胞分析仪检测方法对目前临床上外周血破碎红细胞的检测进行总结。

关键词: 破碎红细胞; 血栓性微血管病; 光学显微镜; 自动检测仪

中图分类号: R446.113 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)02-001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.001

Research Progress in the Detection of Schistocytes

CUI Chan-juan, ZHANG Jie, QIAO Rui (Department of Laboratory Medicine, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Within the circulation, schistocytes are produced by extrinsic mechanical damage. Schistocyte is an important morphological clue to the diagnosis of thrombotic microangiopathy (TMA). The presence of schistocyte in the blood indicates the possibility of a thrombotic microangiopathy, in particular, the two major syndromes of thrombocytopenic purpura (TTP) and hemolytic uremic syndrome (HUS). In addition, with the increased study of hematopoietic stem cell transplantation associated thrombotic microangiopathy, the detection of schistocytes has been paid more and more attention. Because of the differences of observers, methods and diseases, there are no full consensus criteria about the morphological of schistocytes and threshold value for the diagnosis of TMA. Recently, with the development of automated red blood cells (RBCs) fragment count, the reliability and clinical utility of automated schistocytes count has also been paid attention by more and more people. They will summary the detection of schistocytes from the two aspects of manual microscopy and automated RBCs fragment count.

Keywords: regged red fiber; thrombotic microangiopathy; optical microscopy; automated RBCs fragment count

破碎红细胞是指在循环血液中, 红细胞由于外在机械损伤而产生的红细胞碎片。它被认为是诊断血栓性微血管病(thrombotic microangiopathy, TMA)的重要形态学线索^[1]。TMA 包括两个主要疾病: 血栓性血小板减少性紫癜(thrombocytopenic purpura, TTP)和溶血尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)^[1]。这两种疾病发病急骤, 如未及时治疗, 预后差, 死亡率高。同时 TMA 也是临床上异体造血干细胞移植后致命性严重并发症之一^[2]。近些年来, 一些研究指出, 破碎红细胞计数在监测异体造血干细胞移植后 TMA 方面具有重要作用, 也有研究指出可以将它作为评价预后的一项指标^[3,4]。因此, 这对破碎红细胞的检测提出了更高要求。目前由于破碎红细胞形态学标准、计数方法、自动检测仪种类及检测阈值等方面各实验室仍存在差异, 导致尚未形成完全一致的诊

断标准。以下将从上述几个方面并结合国际血液学标准化委员会(international council for standardization in haematology, ICSH)的推荐标准进行阐述。

1 外周血破碎红细胞光学显微镜检测

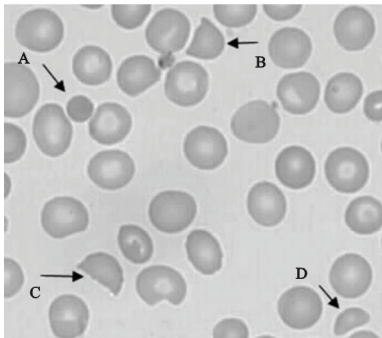
1.1 外周血破碎红细胞形态学检测 外周血破碎红细胞没有统一的形态学诊断标准是导致破碎红细胞计数重复性差的主要原因。关于破碎红细胞形态的描述, 不同文章中存在很大差异, 如不规则扭曲的红细胞、毛刺状红细胞、非典型深染球形红细胞、影红细胞等^[5,6]。2012 年 ICSH 在破碎红细胞形态诊断标准方面达成了共识^[1], 他们推荐破碎红细胞形态主要分为四种, 见图 1: ①形状不同的小片段: 不规则三角形, 边缘带棘或针角的棘形, 小新月体型; ②头盔状细胞; ③有角细胞: 比小片段略大, 有一对被半圆形凹段膜分离的骨针; ④微球红

* 基金项目: 首都临床特色应用研究(Z141107006614003), 国家自然科学基金(81550041)。

作者简介: 崔婵娟(1986-), 女, 研究生, 研究方向: 临床检验诊断学, E-mail: chanjuancui@126.com。

通讯作者: 乔蕊, Tel: 010-82265751。

细胞:小、圆形、高密度、深染,中心淡染区缺失,该形态只有在上述3种细胞形态出现时才归为破碎红细胞。



A. 微球细胞;B. 有角细胞;C. 头盔细胞;D. 小新月体形细胞

图1 破碎红细胞形态

在计数破碎红细胞时,首先要观察该涂片中破碎红细胞是否是主要的异形细胞,因为上述四种形态破碎红细胞在非TMA时也会出现类似形态^[1],应注意鉴别。如小新月体型红细胞与地中海贫血中出现的镰刀红细胞;微球红细胞与遗传球形红细胞增多症中出现的球形红细胞;有角细胞也可出现在葡萄糖-6-磷酸酶(G6PD)缺乏症患者中。地中海贫血^[7]患者血红蛋白S(HbS)溶解度下降,在氧张力低的毛细血管区,HbS形成管状凝胶结构,导致细胞扭曲成镰刀状红细胞,外周血涂片中几乎均为镰刀细胞,它的大小较小新月体型破碎红细胞大。遗传性球形红细胞增多症^[8]是一种红细胞膜缺陷性溶血性贫血,红细胞失去了正常两面凹的圆盘形而变成球形,TMA时出现微球型破碎红细胞较遗传性球形红细胞小,并且只有在其他形态破碎红细胞出现时才归为破碎红细胞。G6PD缺乏症^[9]患者中G6PD酶活性减低导致还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)减少,还原型谷胱甘肽等抗氧化损伤物质缺乏,导致高铁血红素生成和珠蛋白变性,可利用高铁血红蛋白还原试验与TMA中出现的有角细胞破碎红细胞相鉴别。

1.2 外周血破碎红细胞计数诊断TMA阈值 外周血破碎红细胞计数时,首先要保证涂片质量。涂片厚度要适宜,在靠近片尾处计数,但要避开毛刷状的片尾。用光学显微镜进行观察,ICSH推荐物镜可用40×,50×,60×,目镜可用10×,12.5×,也可以用油镜进行观察,计数至少1000个红细胞中破碎红细胞所占百分比^[1]。

破碎红细胞在健康人外周血涂片中所占的比例上限,不同实验室各不相同,但通常均小于1%。如Burns等^[10]人对119健康人进行外周血涂片检测,结果显示健康人破碎红细胞比例上限为0.19%;Burns等^[11]人的试验结果显示健康人破碎红细胞比例上限为0.2%,同时他们还对其他一些

非TMA疾病患者进行外周血破碎红细胞检测,结果显示,肾脏衰竭患者外周血涂片破碎红细胞比例上限为0.6%,先兆子痫孕妇为0.45%,人工心脏瓣膜换瓣的患者为0.48%,均<1%。

ICSH推荐在没有其他疾病诊断迹象时,当外周血破碎红细胞计数百分比超过1%时,强烈提示TMA。在诊断移植相关TMA时,国际工作组(international working group, IWG)推荐通常采用较高阈值4%(伴有血小板的减少,乳酸脱氢酶的增高,血红蛋白浓度减低,结合珠蛋白减低)^[4]。同时ICSH指出上述破碎红细胞检测阈值只适用于成年人。因为在刚出生婴儿外周血涂片中出现破碎红细胞是很常见的,如健康新生儿外周血破碎红细胞可达1.4%~1.9%,早产儿可达4.9%~5.5%^[12]。有时临床高度怀疑TMA,但外周血涂片中未见破碎红细胞,此时应每天进行外周血涂片检测,因为有时外周血破碎红细胞可能会延迟几天出现,但也有少数情况下TMA外周血不出现破碎红细胞^[13]。

2 外周血破碎红细胞检测进展 近年来,一些研究指出新一代自动血细胞分析仪(如Sysmex XE-2100, ADVIA 120等)可以对破碎红细胞片段进行分析。该方法成本低、检测速度快、简单易行,并且重复性好,稳定性可持续接近24h,可以很好地辅助人工显微镜检测外周血破碎红细胞^[14]。目前自动血细胞分析仪检测外周血破碎红细胞片段主要有两种技术,一种是利用前向散射角和RNA/DNA荧光强度在网织红细胞通道中进行检测^[15],如Sysmex XE-2100(图2);另一种是利用检测血小板时所使用的光散射度来获得体积和折射指数^[16],从而对破碎红细胞片段进行分析,如ADVIA120。

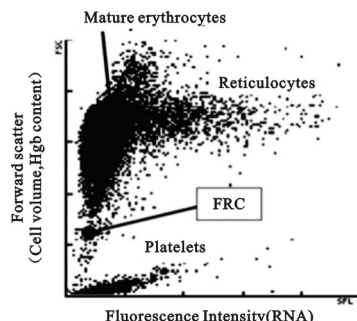


图2 自动血细胞分析仪XE-2100检测破碎红细胞片段

Lesesve等^[17]人利用ADVIA 120自动血细胞分析仪及光学显微镜分别对破碎红细胞进行研究。ADVIA 120利用检测血小板时所使用的光散射度(低角度2~3°,高角度5~15°)获得体积和折射指数(体积V<30 fl,折射率>1.4)对破碎红细胞片段进行研究。结果显示ADVIA 120与人工显

显微镜检测相关性好,相关系数为 0.727 4(95% CI: 0.628 5~0.801 9);当 ADVIA 120 检测破碎红细胞阈值设为 0.25%时,灵敏度很高达 100%,特异度较低为 20%,阴性预测值可达 100%。因此,建议当仪器检测破碎红细胞阳性时,应进一步进行人工显微镜检测破碎红细胞。此外该研究还对其他诊断 TMA 的阈值进行检测效能分析,见表 1。

表 1 不同破碎红细胞阈值下检测 TMA 灵敏度、特异度、阴性预测值及阳性预测值

项 目	阈值 (破碎红细胞%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
ADVIA 120	0.25	100	17.1	23.0	100
	1.0	88.5	87.6	63.9	96.8
显微镜检测	0.2	100	66.7	42.6	100
	0.5	96.2	93.3	78.1	98.9

Abe 等^[15]人利用 Sysmex XE-2100 自动血细胞分析仪对破碎红细胞片段进行研究。该仪器是利用前向散射角和 RNA/DNA 荧光强度原理,对破碎红细胞片段进行分析。ROC 曲线结果显示当检测阈值设为 1.2%时,诊断 TMA 的灵敏度为 90%,特异度为 96%,曲线下面积为 0.986。同时该研究还分别描述了健康人、TTP 及骨髓移植后 TMA 破碎红细胞百分比(表 2),结果显示 TMA 患者破碎红细胞百分比明显高于健康人。Jekarl 等^[18]人对 Sysmex XE-2100 检测破碎红细胞片段进行精密度的评价(表 3),结果显示该仪器检测破碎红细胞精密度很高,变异系数(coefficient of variation, CV)均小于 1.5%。同时,该研究还显示手工镜检破碎红细胞与 Sysmex XE-2100 检测破碎红细胞片段相关性较好,相关系数 0.461($P < 0.001$)。Banno 等^[14]人也同样进行 Sysmex XE-2100 检测破碎红细胞片段精密度研究,结果显示高值检测样本 CV 为 1.42%,而低值检测样本 CV 为 6.32%。

表 2 健康人、TTP 及骨髓移植后 TMA 破碎红细胞百分比

组 别	破碎红细胞(%)	
	平均值	95%CI
健康人	0.04	0.00~0.205
TTP	4.91	0.91~9.05
骨髓移植后 TMA	2.4	1.32~5.09

表 3 Sysmex XE-2100 检测破碎红细胞片段精密度评价

组 别	$\bar{x} \pm s(\%)$	CV(%)
SP	1.86 \pm 0.096	1.0
SN	0.05 \pm 0.053	1.0
NOM	0.069 \pm 0.085	1.23

注:SP. 破碎红细胞阳性;SN. 破碎红细胞阴性;NOM. 健康人。

上述这些研究结果显示,自动血细胞分析仪检测破碎红细胞性能很好,虽然其对 TMA 诊断的特异性低,但诊断的阴性预测值很高,并且该方法还具有检测成本低、速度快、简单易行等特点。针对这些特点,ICSH^[1]推荐可将自动血细胞分析仪检测破碎红细胞作为实验室常规检测项目,当出现阳性时,可用人工显微镜检测进一步确认;也可将其作为人工显微镜检测外周血破碎红细胞的重要辅助手段。ICSH 指南推荐检测外周血破碎红细胞流程见图 3。

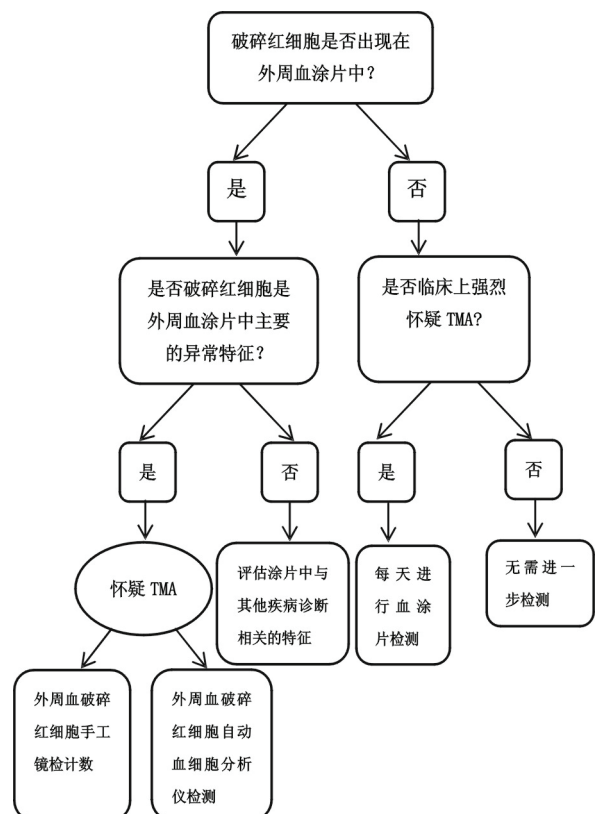


图 3 ICSH 指南推荐检测外周血破碎红细胞流程

3 外周血破碎红细胞检测与临床结合 血栓性血小板减少性紫癜(TTP)又称微血管血栓-出血综合征,临床上以 30~40 岁女性多见,主要表现为发热、出血、微血管性溶血性贫血、肾损害和神经症状,被称为 TTP 五联征。本病发病急骤,进展迅速,未作治疗的患者病死率高,预后差。在组织学方面典型表现为由血小板及纤维蛋白组成的血栓,且在任何组织(如脑、肾脏、心、脾脏)的小血管内均可发现,这是导致血小板大量消耗和红细胞机械损害的主要原因。

Cuttorman 等指出 TTP 诊断标准如下:主要表现为:①溶血性贫血,外周血可见破碎红细胞($> 1\%$);②血小板计数 $< 100 \times 10^9/L$ 。次要表现有:①发热;②神经系统症状;③肾损害。2 个主要表现+任何 1 个次要表现,诊断即可成立。

移植后 TMA 是干细胞移植术后严重致死性并发症之一。目前血液骨髓移植临床试验毒性组织委员会(BMT-CTN)和国际工作组(IWG)在制定移植后 TMA 时均强调了破碎红细胞对诊断的价值^[18]。BMT-CTN 诊断移植后 TMA 的标准^[18]:①外周血涂片中破碎红细胞每高倍视野>2个;②新出现血清中 LDH 活性>500 IU/L;③新出现没有其他原因可解释的肾衰竭和/或神经系统症状;④直接和间接抗人球蛋白试验均阴性。

溶血尿毒症综合征(HUS)是一种以微血管性溶血性贫血、血小板减少和急性肾损伤为主要临床表现的疾病。好发于婴儿和学龄儿童。各种有害因素引起的血管内皮损伤是 HUS 发病的始动因素,随后血管内皮损伤引起级联反应导致血小板大量消耗,小血管内血栓形成,红细胞通过病变部位受机械作用发生溶血性贫血,产生破碎红细胞。在该病的诊断中也提出了外周血涂片破碎红细胞诊断的重要性。

上述这些血栓性微血管病的诊断中均强调了外周血破碎红细胞检测的重要性。由于血栓性微血管病表现为发病急骤,如未及时治疗,预后差,死亡率高。因此,当临床医师怀疑患者可能存在上述疾病时,应迅速进行外周血破碎红细胞的检测。与其他指标相比,外周血破碎红细胞的检测简便快捷,可以迅速得到结果以辅助临床医师诊断并指导下一步治疗。

4 小结与展望 血栓性微血管病发病急骤,如未及时治疗,预后差,死亡率高,因此备受关注。外周血破碎红细胞是诊断 TMA 的重要实验室指标,可以辅助临床医师迅速作出诊断并指导下一步治疗。因此,当临床怀疑患者可能存在 TMA 时,应及时进行外周血破碎红细胞的检测。自动血细胞分析仪检测外周血破碎红细胞片段的应用,越来越受到人们关注,尤其近年来,在异体造血干细胞移植后 TMA 发病率增高的情况下,研究者对自动血细胞分析仪检测外周血破碎红细胞的实验室性能及诊断 TMA 临床效能等方面均进行了大量研究。该方法检测成本低、速度快、简单易行,并且诊断 TMA 的灵敏度及阴性预测值均很高,可以作为手工显微镜检测外周血破碎红细胞的重要辅助手段。

参考文献:

- [1] Zini G, D'Onofrio G, Briggs C, et al. ICSH recommendations for identification, diagnostic value, and quantitation of schistocytes[J]. *Int J Lab Hematol*, 2012, 34(2):107-116.
- [2] Moake JL. Thrombotic microangiopathies[J]. *N Engl J Med*, 2007, 347(8):589-600.
- [3] Lesesve JF, Alla F, Dugue F, et al. Evaluation of schistocyte monitoring after haematopoietic stem cell

- transplantation[J]. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2011, 33(4):343-356.
- [4] Ruutu T, Barosi G, Benjamin RJ, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group [J]. *Haematologica*, 2007, 92(1):95-100.
- [5] Dacie JV, Lewis SM. *Practical Hematology* [M]. 4th Ed. London J&A Churchill, 1968.
- [6] Glassy EF. *Color atlas of hematology. An illustrated field guide based on proficiency testing* [M]. IL Northfield: College of American Pathologists, 1998: 1-370.
- [7] Yawn BP, Buchanan GR, Afeniyi-annan AN, et al. Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members [J]. *JAMA*, 2014, 312(10):1033-1048.
- [8] Comité Nacional de Hematología, Donato H, Crisp RL, et al. Hereditary spherocytosis: Review. part I. history, demographics, pathogenesis and diagnosis [J]. *Arch Argent Pediatr*, 2015, 113(1):69-80.
- [9] Luzzatto L, Seneca E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with ongoing clinical implications [J]. *British Journal of Haematology*, 2014, 164(4):469-480.
- [10] Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T. Laboratory measurement of schistocytes [J]. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2007, 29(2):149-151.
- [11] Burns ER, Lou Y, Pathak A. Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. *American Journal of Hematology*, 2004, 75(1):18-21.
- [12] Garzia M, Di Mario A, Rossi E, et al. Automated screening for schistocytes with two hematology analyzers. Abstract Book XVIII International ISLH Symposium, Skokie IL [M]. Abstract No A-86, 2005.
- [13] Daram SR, Philipneri M, Puri N, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura without schistocytes on the peripheral blood smear [J]. *Southern Medical Journal*, 2005, 98(3):392-395.
- [14] Banno S, Ito Y, Tanaka C, et al. Quantification of red blood cell fragmentation by the automated haematology analyzer XE-2100 in patients with living donor liver transplantation [J]. *Clinical and Laboratory Haematology*, 2005, 27(5):292-296.
- [15] Abe Y, Wada H, Yamada E, et al. The effectiveness of measuring for fragmented red cells using an automated hematology analyzer in patients with thrombotic microangiopathy [J]. *Clinical Applications in Thrombosis and Hemostasis*, 2009, 15(3):257-262.
- [16] Lesesve JF, Salignac S, Lecompte T, et al. Automated measurement of schistocytes after bone marrow transplantation [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2004, 34(4):357-362.
- [17] Lesesve JF, Salignac S, Alla F, et al. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination [J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2004, 121(5):739-745.
- [18] Jekarl DW, Kim Y, Lim J, et al. Fragmented red cell as a possible favorable prognostic marker of hematopoietic stem cell transplantation associated thrombotic microangiopathy [J]. *J Clin Lab Anal*, 2015, 29(6):444-450.