

临床检验数据与诊断

主编 董彦军 王清华 许祯杰 康从利



科学出版社

临床检验数据与诊断

主 编 董彦军 王清华 许祯杰
康从利

副主编 王 欢 杨 健 高 艳
李 晓 张 敏

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 欢 王清华 许祯杰
李 晓 杨 健 吴西彩
张 敏 高 艳 康从利
董彦军

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书共十章,紧密结合我国临床诊疗工作实际和临床检验新进展,对检验技术基础项目进行了详细的阐述,内容充实,文字简明,表达准确,十分易于医务人员掌握。本书为进一步统一和规范各医疗机构的临床检验操作行为带来帮助,进一步推动实验室室内质量控制和室间质量评价工作,促进检验医学的发展。

本书适合适合检验专业医生使用。

图书在版编目(CIP)数据

临床检验数据与诊断 / 董彦军等主编. —北京:科学出版社,2018. 11
ISBN 978-7-03-059286-6

I. ①临… II. ①董… III. ①临床医学—医学检验—教材 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 244232 号

责任编辑:胡治国 朱 华 / 责任校对:王萌萌

责任印制:张欣秀 / 封面设计:陈 敬

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 11 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2018 年 11 月第一次印刷 印张:16

字数:400 000

定价:139.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

检验技术的发展日新月异,特别是分子生物学、免疫学等检验技术进展更为迅速。新的检验技术、检验项目和检验方法不断进入临床实验室,其操作方法也应进一步规范。

全书共十章,紧密结合我国临床诊疗工作实际和临床检验新进展,对检验技术基础项目进行了详细的阐述。内容充实,文字简明,表达准确,十分易于医务人员掌握。相信本书的出版,会为进一步统一和规范各医疗机构的临床检验操作行为带来帮助,进一步推动实验室室内质量控制和室间质量评价工作,促进检验医学的发展。

尽管编者希望本书能融最实用、最前沿的检验知识和技术于其中,但在医学知识日新月异的今天,编撰中仍然会存在一些不足之处,望同志们不吝赐教,以便再版时修正和补充。

编 者

2018年5月

目 录

第一章 临床血液一般检验	(1)
第一节 血液一般检验标本的采集与处理	(1)
第二节 血细胞分析	(6)
第三节 血细胞形态学检查	(23)
第四节 红细胞沉降率测定	(35)
第五节 血液流变学检查	(37)
第二章 贫血的检验	(45)
第一节 溶血性贫血的检验	(45)
第二节 造血原料缺乏性贫血的检验	(71)
第三章 血栓与止血的检验	(79)
第一节 血栓与止血检验标本的采集与处理	(79)
第二节 血栓与止血自动化仪器检测的通用规则	(81)
第三节 血管壁和内皮细胞的检验	(83)
第四节 血小板的检验	(87)
第五节 凝血因子的检验	(95)
第六节 抗凝因子检验	(103)
第七节 病理性抗凝物质检验	(109)
第八节 纤溶系统的检验	(114)
第四章 血型血清学检查	(130)
第一节 ABO 血型鉴定	(130)
第二节 Rh 血型鉴定	(137)
第三节 其他血型鉴定	(141)
第四节 血型血清学常用检查方法	(143)
第五节 红细胞血型抗体筛查	(150)
第六节 红细胞血型抗体鉴定	(154)
第七节 交叉配血试验	(156)
第八节 胎儿新生儿溶血病的血型血清学检查	(159)
第五章 尿液检验	(166)
第一节 尿液标本的采集与处理	(166)
第二节 尿液理学检验	(168)
第三节 尿液化学检验	(168)
第四节 尿液有形成分检验	(180)
第六章 粪便检验	(188)
第一节 粪便标本的采集与处理	(188)
第二节 粪便理学检验	(189)

第三节	粪便隐血试验	(189)
第四节	粪便有形成分检验	(191)
第七章	精液检验	(193)
第一节	精液标本的采集与处理	(193)
第二节	精液理学检验	(193)
第三节	精浆果糖测定	(194)
第八章	阴道分泌物检验	(196)
第一节	阴道分泌物标本的采集与处理	(196)
第二节	阴道分泌物物理学检验	(196)
第三节	阴道分泌物化学检验	(197)
第九章	蛋白质测定	(198)
第一节	血清总蛋白测定	(198)
第二节	血清白蛋白测定	(202)
第三节	血清蛋白电泳	(207)
第四节	血清前白蛋白测定	(213)
第五节	血清转铁蛋白测定	(215)
第六节	血清铁蛋白测定	(217)
第七节	血清铜蓝蛋白测定	(218)
第八节	血清 α_1 -抗胰蛋白酶测定	(219)
第九节	血清 α_1 -微球蛋白测定	(220)
第十节	血清 α_2 -巨球蛋白测定	(222)
第十一节	血清 α -淀粉样蛋白测定	(223)
第十二节	血清视黄醇结合蛋白测定	(224)
第十三节	血清妊娠相关蛋白 A 测定	(225)
第十章	糖代谢测定	(227)
第一节	血液葡萄糖测定	(227)
第二节	口服葡萄糖耐量试验	(233)
第三节	糖化血红蛋白测定	(234)
第四节	糖化血清蛋白测定	(239)
第五节	血清 C 肽测定	(241)
第六节	血清胰岛素测定	(242)
第七节	脑脊液葡萄糖测定	(242)
第八节	尿液葡萄糖测定	(242)
第九节	血浆乳酸测定	(243)
第十节	血浆丙酮酸测定	(245)
第十一节	血清 β -羟丁酸测定	(246)
参考文献	(249)

第一章 临床血液一般检验

临床血液一般检验是血液学检验最基础、最常用的一类检验项目,主要包括全血细胞计数、外周血细胞形态学检查、红细胞沉降率测定、血液流变学检查等。血液一般检验取材容易,检测便捷,是临床最常用的初筛项目之一。

第一节 血液一般检验标本的采集与处理

一、静脉血的采集

【原理】

利用负压的原理,使用真空采血管或注射器将针头刺入浅静脉后,通过真空负压控制定量采集静脉血或通过手工控制吸取一定量的静脉血。

【试剂与器材】

压脉带、垫枕和手套;70%乙醇溶液、消毒棉球或棉签;一次性无菌针头、持针器和真空采血管,或者使用注射器和试管;胶带。

【操作】

(1)对照申请单核对患者身份。

(2)采血部位的选择:患者取坐位或仰卧位,前臂置于桌面枕垫上或水平伸直。检查患者的肘前静脉,为使静脉血管充分暴露,可让患者握紧拳头,系上压脉带。采血人员可用示指触摸寻找合适的静脉,触摸时能感觉到静脉所在区域较周围其他组织的弹性大,一般肘臂弯曲部位或稍下区域是比较理想的穿刺部位。如在一只手臂上找不到合适的静脉,则用同样的方法检查另一只手臂。如需从腕部、手背或脚部等处的静脉采血,最好由有经验的采血人员进行操作。

(3)静脉穿刺的准备:选择好合适的穿刺部位后,放松压脉带,依照《医疗机构消毒技术规范》(WS/T 2012-367)的要求,使用70%~80%(体积分数)的乙醇溶液擦拭消毒2遍,作用3min,消毒范围强调以穿刺部位为中心,由内向外缓慢旋转,逐步涂擦,共2次,消毒皮肤面积应 $\geq 5\text{cm} \times 5\text{cm}$ 。

(4)静脉穿刺:①将患者的手臂置于稍低位置,在穿刺点上方约6cm处系紧压脉带,嘱受检者紧握拳头,使静脉充盈显露。采血人员一只手拿采血装置,另一只手的手指固定穿刺部位下方的皮肤,以使静脉位置相对固定。②手握持针器或注射器,保持穿刺针的方向和静脉走向一致,穿刺针与皮肤间的夹角约为 20° ,针尖斜面朝上。③将穿刺针快速、平稳地刺入皮肤和静脉。使用真空采血管时一只手固定住持针器和穿刺针,另一只手将真空采血管从持针器另一端推入;使用注射器时穿刺成功后右手固定针筒,左手解开压脉带,再缓缓抽动注射器针栓至采集所需血量。④血液开始流出即可解开压脉带,或者在开始采最后一管标本时立即解开压脉带,同时嘱患者松开拳头。⑤消毒干棉球压住穿刺点,拔出针头,嘱患者继续按压棉球并保持手臂上举数分钟,如

患者无法做到,则由采血人员按压穿刺点直至止血。⑥在静脉穿刺处贴上不会引起过敏的胶条以助止血,如穿刺点的按压力度和时间不够,可能会导致皮下出血,形成瘀斑。⑦来回颠倒采血管数次将标本和抗凝剂混匀,但不可剧烈摇晃。⑧将采血针弃于利器盒内。⑨按实验室要求在每支采血管上贴好标签。⑩如是门诊患者,嘱其静坐片刻,确认无头晕、恶心等不良反应后再允许患者离开。

【注意事项】

(1)采血部位通常选择肘前静脉,如此处静脉不明显,可采用手背、手腕、腘窝和外踝部静脉;幼儿可采用颈外静脉。

(2)使用真空采血管前应仔细阅读厂家说明书。使用前勿松动一次性真空采血管盖塞,以防采血量不准。

(3)使用注射器采血时,切忌将针栓回推,以免注射器中气泡进入血管形成气栓,造成严重后果。

(4)采血过程中应尽可能保持穿刺针位置不变,以免血流不畅。

(5)压脉带捆扎时间不应超过 1min,否则会使血液成分的浓度发生改变。

(6)如果一次需要采集多管血液标本时,应按以下顺序采血:血培养管-需氧、血培养管-厌氧、凝血项管、无抗凝剂管(含或不含促凝剂和分离胶)、有抗凝剂管。

(7)如遇受检者发生晕针,应立即拔出针头,嘱其平卧。必要时可用拇指压掐或针刺人中、合谷等穴位,嗅吸芳香氨酊等药物。

二、末梢血的采集

【试剂与器材】

(1)一次性使用的无菌采血针。

(2)70%乙醇棉球。

(3)一次性手套和消毒干棉球。

(4)不同检测所需特殊器具(如用于制作血涂片的玻片、微量移液管、血细胞计数稀释液、微量血细胞比容测量管)。

【操作】

(1)采血部位:成人以环指或中指的指尖内侧为宜;特殊患者(如烧伤),必要时可从足跟部两侧或大拇指采血;婴儿理想的采血部位是足底面两侧的中部或后部,针刺的深度不应超过 2mm,靠近足底面后部的针刺深度不应超过 1mm。

(2)可轻轻按摩采血部位,使其自然充血,用 70%乙醇棉球消毒局部皮肤,待干。

(3)操作者用左手拇指和食指紧捏穿刺部位两侧,右手持无菌采血针,自指尖内侧迅速有力地穿刺,即刻拔出采血针并弃于利器盒内。

(4)用消毒干棉球擦去第一滴血,按需要依次采血。采血顺序:血涂片、EDTA 抗凝管、其他抗凝管、血清及微量采集管。

(5)可轻柔按压周围组织以获得足量的标本。

(6)采血完毕,用消毒干棉球压住伤口,止血片刻。

【注意事项】

(1)所选的采血部位要避开冻疮、炎症、水肿和瘢痕等患处;除特殊情况外,不宜从耳垂采血。

(2)不宜从婴儿的手指及脚后方跟腱处采血,以防止可能造成骨组织和神经组织的损伤。

(3)采血部位宜保持温暖,有利于血液顺畅流出。

(4)消毒皮肤后应待乙醇挥发,皮肤干燥后方可采血,否则流出的血液不呈圆滴状,也可能导致溶血。

(5)穿刺深度一般不超过2mm;针刺后,稍加按压以血液能流出为宜。

三、抗凝剂的选用

血液一般检验常用的抗凝剂有以下3种。

1. 枸橼酸钠(柠檬酸钠) 枸橼酸能与血液中的钙离子结合形成螯合物,从而阻止血液凝固。市售枸橼酸钠多含2个分子的结晶水,分子量(MW)为294.12,常用浓度为109mmol/L(32g/L)。枸橼酸钠与血液的比例多采用1:9(V:V)。常用于凝血试验和红细胞沉降率测定(魏氏法血沉测定时抗凝剂为0.4ml加血1.6ml)。

2. 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,分子量为336.21)或乙二胺四乙酸二钾(EDTA- $\text{K}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,分子量为404.47) 抗凝机制与枸橼酸钠相同。全血细胞分析用EDTA- $\text{K}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,1.5~2.2mg可阻止1ml血液凝固。由于EDTA- Na_2 溶解度明显低于EDTA- K_2 ,故EDTA- K_2 特别适用于全血细胞分析,尤其适用于血小板计数。由于其影响血小板聚集及凝血因子检测,故不适合做凝血试验和血小板功能检查。

3. 肝素 是一种含有硫酸基团的黏多糖,分子量为15000,与抗凝血酶结合,促进其对凝血因子XII、XI、IX、X和凝血酶活性的抑制,抑制血小板聚集从而达到抗凝的目的。通常用肝素钠盐或锂盐粉剂(125U=1mg)配成1g/L肝素水溶液,即每毫升含肝素1mg。取0.5ml置小瓶中,37~50℃烘干后,能抗凝5ml血液。适用于血气分析及电解质、钙等测定,不适合凝血象和血液学一般检查,因其可使白细胞聚集并使血涂片产生蓝色背景。

四、血涂片制备

【器材】

清洁、干燥、无尘、无油脂的载玻片(25mm×75mm,厚度为0.8~1.2mm)。

【操作】

血涂片制备方法很多,目前临床实验室普遍采用的是手工推片法,即用楔形技术制备血涂片的方法,在载玻片近一端1/3处,加1滴(约0.05ml)充分混匀的血液,握住另一张边缘光滑的推片,以30°~45°使血滴沿推片迅速散开,快速、平稳地推动推片至载玻片的另一端。

【注意事项】

(1)血涂片应呈舌状,头、体、尾三部分清晰可分。

(2)在空气中晃动推好的血涂片,使其尽快干燥。天气寒冷或潮湿时,应于37℃恒温箱中保温促干,以免细胞变形缩小。

(3)涂片的厚薄、长度与血滴的大小、推片与载玻片之间的角度、推片时的速度及血细胞比容(Hct)有关。一般认为血滴大、角度大、速度快则血膜厚;反之则血膜薄。Hct高于正

常时,血液黏度较高,保持较小的角度,可得满意结果;相反,Hct 低于正常时,血液较稀,则应用较大角度、较快的推片速度。

(4)血涂片应在 1h 内染色或在 1h 内用无水甲醇(含水量<3%)固定后染色。

(5)新购置的载玻片常带有游离碱质,必须用约 1mol/L HCl 浸泡 24h 后,再用清水彻底冲洗,擦干后备用。用过的载玻片可放入含适量肥皂或其他洗涤剂的水中煮沸 20min,洗净,再用清水反复冲洗,用蒸馏水最后浸洗后擦干备用。使用时,切勿用手触及载玻片表面。

(6)血涂片既可直接用非抗凝的静脉血或毛细血管血,也可用 EDTA 抗凝血制备。由于 EDTA 能阻止血小板聚集,故在显微镜下观察血小板形态时非常合适。但 EDTA 抗凝血有时能引起红细胞皱缩和白细胞聚集,因此最好使用非抗凝血制备血涂片。

(7)使用 EDTA-K₂ 抗凝血样本时,应充分混匀后再涂片。抗凝血样本应在采集后 4h 内制备血涂片,时间过长可引起中性粒细胞和单核细胞的形态学改变。注意,制片前,样本不能冷藏。

五、血涂片染色

(一) 瑞氏染色法

【原理】

瑞氏(Wright)染色法使细胞着色既有化学亲和作用,又有物理吸附作用。各种细胞由于其所含化学成分不同,对染料的亲和力也不一样,因此,染色后各种细胞呈现出各自的染色特点。

【试剂】

(1) 瑞氏染液

瑞氏染料	0.1g
甲醇(分析纯)	60.0ml

瑞氏染料由酸性染料伊红和碱性染料亚甲蓝组成。将瑞氏染料放入清洁干燥研钵里,先加少量甲醇,充分研磨使染料溶解,将已溶解的染料倒入棕色试剂瓶中,未溶解的再加少量甲醇研磨,直至染料完全溶解,甲醇全部用完为止,即为瑞氏染液。配好后放室温,1 周后即可使用。新配染液效果较差,放置时间越长,染色效果越好。久置应密封,以免甲醇挥发或氧化成甲酸。染液中也可加中性甘油 2~3ml,除可防止甲醇过早挥发外,也可使细胞着色清晰。

(2) pH 6.8 磷酸盐缓冲液

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.3g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄)	0.2g

加少量蒸馏水溶解,再加蒸馏水至 1000ml。

【操作】

以血涂片染色为例。

- (1)采血后推制厚薄适宜的血涂片(见血涂片制备)。
- (2)用蜡笔在血膜两头画线,然后将血涂片平放在染色架上。
- (3)加瑞氏染液数滴,以覆盖整个血膜为宜,染色约 1min。

(4)滴加约等量的缓冲液与染液混合,室温下染色5~10min。

(5)用流水冲去染液,待干燥后镜检。

【注意事项】

(1)pH对细胞染色有影响。由于细胞各种成分均由蛋白质构成,蛋白质均为两性电解质,所带电荷随溶液pH而定。对某一蛋白质而言,如环境 $\text{pH} < \text{pI}$ (pI 为该蛋白质的等电点),则该蛋白质带正电荷,即在酸性环境中正电荷增多,易与酸性伊红结合,染色偏红;相反,则易与亚甲蓝结合,染色偏蓝。因细胞着色对氢离子浓度十分敏感,为此,应使用清洁中性的载玻片,稀释染液必须用pH 6.8缓冲液,冲洗片子必须用中性水。

(2)未干透的血膜不能染色,否则染色时血膜易脱落。

(3)染色时间的长短与染液浓度、染色时温度及血细胞多少有关。染色时间与染液浓度、染色时温度成反比;染色时间与血细胞数量成正比。

(4)冲洗时不能先倒掉染液,应用流水冲去,以防染料沉淀在血膜上。

(5)如血膜上有染料颗粒沉积,可用甲醇溶解,但需立即用水冲掉甲醇,以免脱色。

(6)染色过淡,可以复染。复染时应先加缓冲液,创造良好的染色环境,而后加染液,或加染液与缓冲液的混合液,不可先加染液。

(7)染色过深可用水冲洗或浸泡在水中一定时间,也可用甲醇脱色。

(8)染色偏酸或偏碱时,均应更换缓冲液重染。

(9)瑞氏染液的质量好坏除用血涂片实际染色效果评价外,还可采用吸光度比值(ratio of absorption, RA)评价。瑞氏染液的成熟指数以 $\text{RA} (A_{650\text{nm}}/A_{525\text{nm}}) = 1.3 \pm 0.1$ 为宜。

(二) 瑞氏-吉姆萨复合染色法

【原理】

吉姆萨染色原理与瑞氏染色相同,但提高了噻嗪染料的质量,加强了天青的作用,对细胞核着色效果较好,但对中性颗粒着色较瑞氏染色法差。因此,瑞氏-吉姆萨(Wright-Giemsa)复合染色法可取长补短,使血细胞的颗粒及胞核均能获得满意的染色效果。

【试剂】

(1)瑞氏-吉姆萨复合染液:取瑞氏染粉1g、吉姆萨染粉0.3g,置洁净研钵中,加少量甲醇(分析纯),研磨片刻,吸出上层染液。再加少量甲醇继续研磨,再吸出上层染液。如此连续几次,共用甲醇500ml。收集于棕色玻璃瓶中,每日早、晚各振摇3min,共5日,以后存放1周即能使用。

(2)pH 6.4~6.8磷酸盐缓冲液

磷酸二氢钾(无水) 6.64g

磷酸氢二钠(无水) 2.56g

加少量蒸馏水溶解,用磷酸盐调整pH,加水至1000ml。

【操作】

瑞氏-吉姆萨染色方法基本上与瑞氏染色法相同。

(三) 30 秒快速单一染色法

【试剂】

(1) I 液: 储存液。

瑞氏染粉	2.0g
吉姆萨染粉	0.6g
天青 II	0.6g
甘油	10.0ml
聚乙烯吡咯烷酮(PVP)	20.0g
甲醇	1000ml

(2) II 液: 磷酸盐缓冲液(pH 6.2~6.8)。

磷酸二氢钾	6.64g
磷酸氢二钠	0.26g
苯酚	4.0ml
蒸馏水加至	1000ml

(3) 应用液: I 液、II 液按 3:1 比例混合放置 14 日后备用。

【操作】

将染液铺满血膜或将血片浸入缸内, 30s 后用自来水冲洗。

(四) 快速染色法

【试剂】

(1) I 液

磷酸二氢钾	6.64g
磷酸氢二钠	2.56g
水溶性伊红 Y	4.0g(或伊红 B 2.5g)
蒸馏水	1000ml
苯酚	40ml

煮沸, 待冷后备用。

(2) II 液

亚甲蓝	4g
蒸馏水	1000ml
高锰酸钾	2.4g

煮沸, 待冷后备用。

【操作】

把干燥血涂片浸入快速染液的 I 液中 30s, 水洗, 再浸入 II 液 30s, 水洗待干。

第二节 血细胞分析

一、血细胞分析的质量要求

(一) 人员

1. 实验室专业技术人员 应有明确的岗位职责, 包括标本的采集与处理, 样本检测, 质

量保证,报告的完成、审核与签发,检验结果的解释等岗位的职责和要求。

2. 形态学检查技术主管 应有专业技术培训(如进修学习、参加形态学检查培训班等)的考核记录(如合格证、学分证及岗位培训证等),其他形态学检查人员应有定期培训及考核记录。

3. 血液形态学检验人员的配置 宜满足工作需求,如血细胞分析复检标本的数量在每日100份以下时,宜配备2人;复检标本量在每日100~200份时,宜配备3~4人;若采用自动化仪器进行形态学筛查时,可适当减少人员数量。

4. 应有人员培训计划 包括但不限于如下内容:培训目的、时间和培训内容(包括专业理论和操作技能)、接受培训人员、可供使用的参考资料等。

5. 应每年评估员工的工作能力 对新进员工,尤其是从事血液学形态识别的人员,在最初6个月内应至少进行2次能力评估。当职责变更时,或离岗6个月以上再上岗时,或政策、程序、技术有变更时,应对员工进行培训和评估。没有通过评估的人员应经再培训和再评估,合格后才可继续上岗,并记录。

6. 其他 工作人员应对患者隐私及结果保密并签署声明。

(二) 设施与环境条件

(1) 实验室应具备满足工作需要的空间。

(2) 如设置了不同的控制区域,应制订针对性的防护措施及合适的警告。

(3) 应依据所用检测设备和实验过程对环境温湿度的要求,制订温湿度控制要求并记录。温度失控时应有处理措施并记录。

(4) 应有足够的、温度适宜的储存空间(如冰箱),用以保存临床样品和试剂,设置目标温度和允许范围,温度失控时应有处理措施。

(三) 实验室设备

1. 血液分析仪的性能验证 新仪器使用前应进行性能验证,内容至少应包括精密度、正确度、可报告范围等,验证方法和要求见卫生行业标准(《临床血液学检验常规项目分析质量要求》WS/T406-2012)。要求至少每年对每台血液分析仪的性能进行评审。

2. 血液分析仪的校准要求 依照卫生行业标准(《血细胞分析的校准指南》WS/T 347-2011)的要求实施校准;应对每一台仪器进行校准;应制订校准程序,内容包括校准物的来源、名称,校准方法和步骤,校准周期等;应对不同吸样模式(自动、手动和预稀释模式等)进行校准或比对;可使用制造商提供的配套校准物或校准实验室提供的定值新鲜血进行校准;至少6个月进行一次校准。

3. 试剂与耗材的要求 应提供试剂和耗材检查、接收、储存和使用的记录。商品试剂使用记录应包括使用效期和启用日期,自配试剂记录应包括试剂名称或成分、规格、储存条件、制备或复溶日期、有效期、配制人等。

4. 电源配置 必要时,实验室可配置不间断电源(UPS)和(或)双路电源以保证关键设备的正常工作。

5. 设备故障原因分析 设备发生故障后,应首先分析故障原因,如设备故障可能影响了方法学性能,于故障修复后,可通过以下合适的方式进行相关的检测、验证:可校准的项目实施校准;质控物检验;与其他仪器或方法比对;以前检验过的样品再检验。

(四) 检验前程序

(1) 所有类型的样品应有采集说明(一些由临床工作人员负责采集的样品如骨髓样品不要求实验室准备详细的采集说明;但实验室需提出相关要求,如合格样品的要求和运输条件等)。

(2) 血细胞分析标本的采集应使用 EDTA 抗凝剂,除少数静脉取血有困难的患者(如婴儿、大面积烧伤或需频繁采血进行检查的患者外,尽可能使用静脉穿刺方式采集标本;血液与抗凝剂的体积比一般为 9:1)。

(3) 应根据检验项目明确列出不合格标本的类型(如有凝块、采集量不足、肉眼观察有溶血的标本等)和处理措施。

(4) 用于疟原虫检查的静脉血标本,应在采集后 1h 内同时制备厚片和薄片。如超过 1h,应在报告单上标注处理时间。

(五) 检验程序

(1) 应制订血细胞分析项目的标准操作程序。

(2) 应制订血细胞分析的显微镜复检标准并对复检标准进行验证;要求复检后结果的假阴性率 $\leq 5\%$;应用软件有助于显微镜复检的有效实施;显微镜复检应保存记录;复检涂片至少保留 2 周。

(3) 应规定检测结果超出仪器线性范围时的识别和解决方法(如对血样进行适当稀释和重复检验)。

(4) 当检测样本存在影响因素(如有核红细胞、红细胞凝集、疟原虫、巨型血小板等)时,对仪器检测结果可靠性的判定和纠正措施应有规定。

(5) 如使用自建检测系统,应有程序评估并确认精密度、正确度、可报告范围、参考区间等分析性能符合预期用途。

(6) 可由制造商或其他机构建立参考区间,由使用相同分析系统的实验室对参考区间进行验证或评审。实验室内部有相同的分析系统(仪器型号、试剂批号及消耗品等相同)时,可调用相同的参考区间。当临床有需要时,应根据年龄和(或)性别分组建立参考区间。我国成人血细胞分析参考区间可采纳行业标准(《血细胞分析参考区间》WS/T 405—2012)。

(六) 检验程序的质量保证

1. 实验室内部质量控制要求

(1) 质控品的选择:宜使用配套质控品,使用非配套质控品时应评价其质量和适用性。

(2) 质控品的浓度水平:至少使用 2 个浓度水平(正常和异常水平)的质控品。

(3) 质控项目:认可的所有检测项目均应开展室内质量控制。

(4) 质控频度:根据检验标本量定期实施,检测当日至少 1 次。

(5) 质控图:应使用 Levey-Jennings 质控图;质控图或类似的质量控制记录应包含以下信息:检测质控品的时间范围、质控图的中心线和控制界线、仪器/方法名称、质控品的名称、浓度水平、批号和有效期、试剂名称和批号、每个数据点的日期、操作人员的记录。

(6) 质控图中心线的确定:血细胞计数质控品的测定应在不同时段至少检测 3 日,使用 10 个以上检测结果的均值画出质控图的中心线;每个新批号的质控品在日常使用前,应通

过检测确定质控品均值,制造商规定的“标准值”只能作为参考。

(7)标准差的确定:标准差的计算方法参见《临床实验室定量测定室内质量控制指南》GB/T 20468—2006。

(8)失控判断规则:应规定质控规则,全血细胞计数至少使用 13s 和 22s 规则。

(9)失控报告:必要时应包括失控情况的描述、核查方法、原因分析、纠正措施及纠正效果的评价等内容;应检查失控对之前患者样品检测结果的影响。

(10)质控数据的管理:按质控品批次或每月统计 1 次,记录至少保存 2 年。

(11)记录:实验室负责人应对每批次或每月室内质量控制记录进行审查并签字。

2. 其他 所开展的检验项目应参加相应的室间质评,要求使用相同的检测系统检测质控样本与患者样本;应由从事常规检验工作的人员实施室间质评样品的检测;应有禁止与其他实验室核对上报室间质评结果的规定;应保留参加室间质评的结果和证书。实验室应对“不满意”和“不合格”的室间质评结果进行分析并采取纠正措施。实验室负责人应监控室间质量评价活动的结果,并在评价报告上签字。

3. 对未开展室间质评检验项目的比对要求 应通过与其他实验室(如使用相同检测方法的实验室、使用配套系统的实验室)比对的方式,判断检验结果的可接受性,并应满足如下要求。

(1)规定比对实验室的选择原则。

(2)样品数量:至少 5 份,包括正常和异常水平。

(3)频率:至少每年 2 次。

(4)判定标准:应有 $\geq 80\%$ 的结果符合要求。当实验室间比对不可行或不适用时,实验室应制订评价检验结果与临床诊断一致性的方法,判断检验结果的可接受性。每年至少评价 2 次,并有记录。

4. 实验室内部结果比对要求

(1)检验同一项目的不同方法、不同分析系统应定期(至少 6 个月)进行结果的比对。血液分析仪等血液学检测设备,确认分析系统的有效性并确认其性能指标符合要求后,每年至少使用 20 份临床标本(含正常和异常标本)进行比对(可分批进行),结果应符合卫生行业标准(《临床血液学检验常规项目分析质量要求》WS/T 406-2012)。

(2)应定期(至少每 3 个月 1 次,每次至少 5 份临床样本)进行形态学检验人员的结果比对、考核并记录。

(3)比对记录应由实验室负责人审核并签字,记录至少保留 2 年。

(七) 结果报告

(1)如收到溶血标本,宜重新采集,否则检验报告中应注明标本溶血。

(2)危急值通常用于患者血液检验的首次结果。

二、血红蛋白测定

氰化高铁血红蛋白(hemoglobin cyanide, HiCN)分光光度法是世界卫生组织(WHO)和国际血液学标准化委员会(International Council for Standardization in Haematology, ICSH)推荐的参考方法,该方法的测定结果是其他血红蛋白测定 Hb 方法的溯源标准。常规实验室多使用血液分析仪或血红蛋白计进行测定,无论采用何种原理的测定方法,均要求实验室

通过使用血液分析仪配套校准物或溯源至参考方法的定值新鲜血实施校准,以保证血红蛋白测定结果的准确性。

(一) 检测方法

1. HiCN 分光光度法

【原理】

除硫化血红蛋白(SHb)外,血红蛋白中的亚铁离子(Fe^{2+})被高铁氰化钾氧化成高铁离子(Fe^{3+}),血红蛋白转化成高铁血红蛋白。高铁血红蛋白与氰根离子(CN^-)结合,生成稳定的HiCN。用分光光度计检测时,HiCN在波长540nm处有一个较宽的吸收峰,它在540nm处的吸光度同它在溶液中的浓度成正比。

【试剂】

HiCN 试剂

氰化钾(KCN) 0.050g

高铁氰化钾[$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 0.200g

无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.140g

非离子表面活性剂[可用聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100),Saponic218等]

0.5~1.0ml

以上试剂分别溶于蒸馏水中,混合,再加蒸馏水至1000ml,混匀。试剂为淡黄色透明溶液,pH为7.0~7.4,用冰点渗透压仪测定的渗透量应在6~7mOsm/kg· H_2O 。血红蛋白应在5min内完全转化为高铁血红蛋白。

【操作】

(1)标准曲线制备:将HiCN参考液稀释为4种浓度(200g/L、100g/L、50g/L、25g/L),然后以HiCN试剂调零,分别测定其在540nm处的吸光值。以血红蛋白浓度(g/L)为横坐标,其对应的吸光度为纵坐标,在坐标纸上描点。用 $Y(A_{540}) = a + bX(G)$ 进行直线回归处理。

(2)常规检测血红蛋白:先将20 μl 血用5.0ml HiCN试剂稀释,混匀,静置5min后,测定待检标本在540nm下的吸光值,按下面公式计算,从而得出待检标本的血红蛋白浓度。

$$C = \frac{A_{540} - a}{b} = (A_{540} - a) \times \frac{1}{b}$$

式中, A_{540} 为患者待测HiCN在波长为540nm的吸光值; C 为血红蛋白浓度,g/L; a 为截距; b 为斜率。

【注意事项】

(1)血红蛋白测定方法很多,但无论采用何种方法,都应溯源至HiCN分光光度法的结果。

(2)试剂应储存在棕色硼硅具塞玻璃瓶中,不能储存于塑料瓶中,否则会使 CN^- 丢失,造成测定结果偏低。

(3)试剂应置于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,不可冷冻,结冰可导致高铁氰化钾被破坏,使试剂失效。

(4)试剂应保持新鲜,至少1个月配制一次。

(5)氰化钾是剧毒品,配试剂时要严格按剧毒品管理程序操作。

(6)脂血症或标本中存在大量脂蛋白可产生浑浊,可引起血红蛋白假性升高。白细胞

数 $>20\times 10^9/L$ 、血小板计数 $>700\times 10^9/L$ 及异常球蛋白增高也可出现浑浊,均可使血红蛋白假性升高。煤气中毒或大量吸烟引起血液内碳氧血红蛋白增多,也可使测定值增高。若因白细胞数过多引起的浑浊,可离心后取上清液比色;若因球蛋白异常增高(如肝硬化患者)引起的浑浊,可向比色液中加入少许固体氯化钠(约0.25g)或碳酸钾(约0.1g),混匀后可使溶液澄清。

(7)测定后的HiCN比色液不能与酸性溶液混合(目前大都用流动比色,共用1个废液瓶,尤须注意这一点),因为氰化钾遇酸可产生剧毒的氢氰酸气体。

(8)为防止氰化钾污染环境,比色测定后的废液集中于广口瓶中处理。废液处理如下所示。①首先以水稀释废液(1:1),再每升上述稀释废液加入次氯酸钠35ml,充分混匀后敞开口放置15h以上,使 CN^- 氧化成 CO_2 和 N_2 挥发,或水解成 CO_3^{2-} 和 NH_4^+ ,再排入下水道。②碱性硫酸亚铁除毒:硫酸亚铁和KCN在碱性溶液中反应,生成无毒的亚铁氰化钾,取硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)50g,氢氧化钠50g,加水至1000ml,搅匀制成悬液。每升HiCN废液,加上上述碱性硫酸亚铁悬液40ml,不时搅匀,置3h后排入下水道,但该方法的除毒效果不如前者好。

(9)HiCN参考液的纯度检查:①波长450~750nm的吸收光谱曲线形态应符合文献所述;② $RA(A_{540nm}/A_{504nm})$ 应为1.59~1.63;③用HiCN试剂作空白,波长710~800nm处,比色杯光径1.0cm时,吸光度应小于0.002。

(10)血液标本使用静脉血,静脉血用EDTA- K_2 抗凝。

2. 十二烷基硫酸钠血红蛋白(sodium lauryl sulfate hemoglobin, SLS-Hb)测定法 由于HiCN法会污染环境,对环境保护不利。为此各国均相继研发不含氰化钾测定血红蛋白的方法,如SLS-Hb测定方法,但其测定结果应溯源到HiCN分光光度法。

【原理】

除SHb外,血液中各种血红蛋白均可与十二烷基硫酸钠(又称月桂硫酸钠, sodium lauryl sulfate, SLS)作用,生成SLS-Hb棕色化合物,SLS-Hb波峰在538nm,波谷在500nm,本法可用HiCN法定值的新鲜血,对血液分析仪进行校准或绘制标准曲线。

【试剂】

(1)血液分析仪商品试剂。

(2)自配试剂如下所示。①60g/L SLS的磷酸盐缓冲液:称取60g SLS溶解于33.3mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,加TritonX-100 70ml于溶液中混匀,再加磷酸盐缓冲液至1000ml,混匀。②SLS应用液:将上述60g/L SLS原液用蒸馏水稀释100倍,SLS最终浓度为2.08mmol/L。

【操作】

(1)按血液分析仪操作说明书的要求进行操作。

(2)末梢血检测方法(适用于婴幼儿、采血困难的肿瘤患者等):准确吸取SLS应用液5.0ml置于试管中,加入待测血20 μ l,充分混匀。5min后置540nm下以蒸馏水调零,读取待测管吸光度值,查标准曲线即得SLS-Hb测定法结果。

(3)标准曲线绘制:取不同浓度血红蛋白的全血标本,分别用HiCN法定值。再以这批已定值的全血标本,用SLS-Hb测定法测定,获得相应的吸光度值,绘制出标准曲线。

【参考区间】

仪器法,静脉采血:成年男性130~175g/L;成年女性115~150g/L;新生儿180~190g/L;