


临床检验诊断与 临床应用

王瑞辉◎主编

 吉林科学技术出版社

临床检验诊断与临床应用

王瑞辉等◎主编

图书在版编目 (C I P) 数据

临床检验诊断与临床应用/ 王瑞辉等主编. — 长春:
吉林科学技术出版社, 2017.3
ISBN 978-7-5578-1936-1

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 058996号

临床检验诊断与临床应用

LINCHUANG JIANYAN ZHENDUAN YU LINCHUANG YINGYONG

主 编 王瑞辉等
出 版 人 李 梁
责任编辑 刘建民 韩志刚
封面设计 长春创意广告图文制作有限责任公司
制 版 长春创意广告图文制作有限责任公司
开 本 889mm×1194mm 1/16
字 数 500千字
印 张 17
印 数 1—1000册
版 次 2017年3月第1版
印 次 2018年3月第1版第2次印刷

出 版 吉林科学技术出版社
发 行 吉林科学技术出版社
地 址 长春市人民大街4646号
邮 编 130021
发行部电话/传真 0431-85635177 85651759 85651628
85652585 85635176

储运部电话 0431-86059116
编辑部电话 0431-86037565
网 址 www.jlstp.net
印 刷 永清县晔盛亚胶印有限公司

书 号 ISBN 978-7-5578-1936-1
定 价 50.00元

如有印装质量问题 可寄出版社调换

因本书作者较多,联系未果,如作者看到此声明,请尽快来电或来函与编辑部联系,以便商洽相应稿酬支付事宜。

版权所有 翻印必究 举报电话:0431-85677817

前 言

近年来,随着现代科学技术的迅猛发展,大量新技术、新设备、新方法引入到医学领域和临床实验室,检验项目不断增加、检验方法不断更新和发展,新方法的临床应用、现行方法的改进、提高了临床实验室诊断的特异性、灵敏度和准确度。随着检验技术的不断发展和临床的需要,一些新的检验项目被逐渐应用于临床,为了使临床医生了解新检验项目并更好地在临床应用,特编写了此书。

本书主要包括临床基础检验、临床化学检验、临床免疫学检验、临床血液学检验、临床微生物检验、采供血输血检验等内容。详细介绍了每一个检验项目的原理、临床意义等内容。请临床医师结合实际患者,以临床病症为基础,结合实验室项目要求,灵活运用多种实验室检测结果,以更快地确诊病情,更好地服务于病人。本书可供检验工作者、临床医护人员及医学院校的学生使用。

由于水平有限,书中难免会有不足和错误,敬请读者予以批评指正,并表示衷心感谢!

王瑞辉

山东省诸城市妇幼保健院

2017年1月



王瑞辉

男，1976年出生，诸城市妇幼保健院病理科主任，主管检验师，执业医师。毕业于潍坊医学院临床医学专业，大学本科，中共党员。自毕业以来从事临床检验、病理工作已二十余年，曾在中华期刊及省级杂志上发表多篇学术论文。多次参加过全国检验、病理学术研讨会，并担任中国医疗保健国际交流促进会病理专业委员会委员，潍坊市病理医师协会委员。多次到上级医院、院校进修学习，对各种体液标本、病理标本的临床检验、病理诊断及细胞学诊断积累了相当丰富的经验，对常见肿瘤的诊断及鉴别诊断有一定的专长。

目 录

第一章 临床基础检验	(1)
第一节 血细胞分析	(1)
第二节 尿液分析	(14)
第三节 粪便检验	(26)
第四节 浆膜腔积液检验	(35)
第五节 脑脊液检验	(42)
第二章 临床化学检验	(47)
第一节 肾功能试验	(47)
第二节 肝功能试验	(64)
第三节 胰腺功能试验	(74)
第四节 糖代谢试验	(75)
第五节 脂代谢试验	(80)
第六节 心肌损伤检查	(86)
第七节 电解质检查	(89)
第八节 血气与酸碱分析	(92)
第三章 临床免疫学检验	(102)
第一节 免疫功能试验	(102)
第二节 自身抗体检验	(110)
第三节 肝炎病毒感染标志物检验	(114)
第四节 肿瘤标志物检验	(122)
第五节 变态反应试验	(132)
第四章 临床血液学检验	(135)
第一节 骨髓细胞学检验	(135)
第二节 贫血相关检验	(146)
第三节 初期止血试验	(169)
第四节 凝血因子检验	(175)
第五节 抗凝血功能试验	(182)

第六节	纤维蛋白溶解的检验	(186)
第五章	临床微生物检验	(192)
第一节	概 述	(192)
第二节	细菌形态学检测法	(197)
第三节	培养基	(200)
第四节	细菌的培养与分离技术	(203)
第五节	病原性球菌检测	(210)
第六节	肠杆菌科检验	(215)
第七节	厌氧性细菌检验	(223)
第八节	需氧或兼性厌氧革兰氏阳性杆菌检验	(232)
第九节	分枝杆菌属检验	(235)
第十节	衣原体检验	(236)
第十一节	支原体检验	(237)
第十二节	立克次体检验	(239)
第十三节	螺旋体检验	(240)
第十四节	病原体放线菌检验	(242)
第十五节	真菌检验	(243)
第六章	采供血与输血检验	(249)
第一节	供血者血液标本检查	(249)
第二节	受血者血液标本检查	(250)
第三节	血样本的处置和记录	(251)
第四节	红细胞血型抗体筛检和鉴定	(252)
第五节	交叉配血试验	(253)
第六节	输血技术	(254)
第七节	输血相关免疫检查	(259)
第八节	输血反应与输血传播性疾病	(264)
参考文献		(266)

临床基础检验

第一节 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,应对员工进行再培训和再评估。没有通过评估的人员应经再培训和再评审,合格后才可继续上岗,并记录。

6. 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,应制定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,制定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(WS/T 406—2012《临床血液学检验常规项目分析质量要求》)。要求至少每年对每台血液分析仪的性能进行评审。

2. 血液分析仪的校准应符合如下要求

依照卫生行业标准(WS/T 347—2011《血液分析仪的校准指南》)的要求实施校准;应对每一台仪器进行校准;应制定校准程序,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、贮存和使用的记录。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不要求实验室准备详细的采集说明,如骨髓样品的采集;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,宜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1小时内同时制备厚片和薄片。如超过1小时,应在报告单上标注处理时间。

(五) 检验程序

(1)应制定血细胞分析项目的标准操作程序。

(2)应制定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后,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、试剂批号以及消耗品等相同)时,可调用相同的参考区间。当临床需要时,应根据年龄和(或)性别分组建立参考区间。中国成人血细胞分析参考区间可采纳行业标准(WS/T 405—2012《血细胞分析参考区间》)。

(六) 检验程序的质量保证

1. 实验室内部质量控制应符合如下要求

(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,检测当天至少 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 天,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 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 1_{3s} 和 2_{2s} 规则。

(9) 失控报告:必要时宜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. 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,实验室应制定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应符合如下要求

(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(WS/T 406—2012《临床血液学检验常规项目分析质量要求》)。

(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 Hb 测定结果的准确性。

(一) 检测方法

1. 氰化高铁血红蛋白分光光度法

(1) 原理: 血红蛋白(除硫化血红蛋白外)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, 生成稳定的氰化高铁血红蛋白(HiCN)。用分光光度计检测时, 氰化高铁血红蛋白在波长 540 nm 处有一个较宽的吸收峰, 它在 540 nm 处的吸光度同它在溶液中的浓度成正比。

(2) HiCN 试剂如下。

氰化钾(KCN) 0.050 g

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

无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.140 g

非离子表面活性剂[可用 Triton X-100, Saponic218 等] 0.5~1.0 mL

分别溶于蒸馏水中, 混合, 再加蒸馏水至 1000 mL, 混匀。试剂为淡黄色透明溶液, pH 在 7.0~7.4, 用冰点渗透压仪测定的渗透量应在(6~7)mOsm/(kg·H₂O)。血红蛋白应在 5 分钟内完全转化为高铁血红蛋白。

(3) 操作。

标准曲线制备: 将氰化高铁血红蛋白(HiCN)参考液稀释为四种浓度(200 g/L, 100 g/L, 50 g/L, 25 g/L), 然后以 HiCN 试剂调零, 分别测定其在 540 nm 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 $Y(A_{540}) = a + bX(C)$ 进行直线回归处理。

常规检测血红蛋白: 先将 20 μl 血用 5.0 mL HiCN 试剂稀释, 混匀, 静置 5 分钟后, 测定待检标本在 540 nm 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} ——患者待测 HiCN 在波长为 540 nm 的吸光值

C——血红蛋白浓度, g/L

a 为截距

b 为斜率

(4) 注意事项: ①血红蛋白测定方法很多, 但无论采用何种方法, 都应溯源至氰化高铁血红蛋白分光光度法的结果。②试剂应贮存在棕色硼硅有塞玻璃瓶中, 不能贮存于塑料瓶中, 否则会使 CN^- 丢失, 造成测定结果偏低。③试剂应置于 2~8℃ 保存, 不可冷冻, 结冰可引起高铁氰化钾破坏, 使试剂失效。④试剂应保持新鲜, 至少一个月配制一次。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 $> 20 \times 10^9/\text{L}$ 、血小板计数 $>$

700×10⁹/L及异常球蛋白增高也可出现混浊,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混浊,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)引起的混浊,可向比色液中加入少许固体氯化钠(约0.25 g)或碳酸钾(约0.1 g),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:首先以水稀释废液(1:1),再按每升上述稀释废液加入次氯酸钠35 mL,充分混匀后敞开容器口放置15小时以上,使CN⁻氧化成CO₂和N₂挥发,或水解成CO₃²⁻和NH₄⁺,再排入下水道;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(FeSO₄·7H₂O)50 g,氢氧化钠50 g,加水至1000 mL,搅匀制成悬液。每升HiCN废液,加上述碱性硫酸亚铁悬液40 mL,不时搅匀,置3小时后排入下水道,但该方法的除毒效果不如前者好。⑨HiCN参考液的纯度检查:波长450~750 nm的吸收光谱曲线形态应符合文献所述;A_{540nm}/A_{504nm}的吸光度比值应为1.59~1.63;用HiCN试剂作空白,波长710~800 nm处,比色杯光径1.0 cm时,吸光度应小于0.002。⑩血液标本使用静脉血,静脉血用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝。

2.十二烷基硫酸钠血红蛋白测定法

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KCN测定血红蛋白的方法,如十二烷基硫酸钠血红蛋白(sodium lauryl sulfate hemoglobin, SLSHb)测定方法,但其测定结果应溯源到HiCN分光光度法。

(1)原理:除硫化血红蛋白(SHb)外,血液中各种血红蛋白均可与十二烷基硫酸钠(sodium lauryl sulfate, SLS)作用,生成SLS-Hb棕色化合物,SLS-Hb波峰在538 nm,波谷在500 nm。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。

(2)试剂:①血液分析仪商品试剂。②自配试剂:60 g/L十二烷基硫酸钠的磷酸盐缓冲液:称取60 g十二烷基硫酸钠溶解于33.3 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,加Triton X-100 70 mL于溶液中混匀,再加磷酸盐缓冲液至1000 mL,混匀;SLS应用液:将上述60 g/L SLS原液用蒸馏水稀释100倍,SLS最终浓度为2.08 mmol/L。

(3)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5.0 mL置于试管中,加入待测血20 μl,充分混匀。5分钟后置540 nm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,获得相应的吸光度值,绘制出标准曲线。

(4)参考区间:(仪器法,静脉采血)。

成年男性:130~175 g/L

成年女性:115~150 g/L

新生儿:180~190 g/L

婴儿:110~120 g/L

儿童:120~140 g/L

(5)注意事项:①注意选用CP级以上的优质十二烷基硫酸钠[CH₃(CH₂)₃SO₄Na, MW288.38]。②本法配方溶血力很强,不能用同一管稀释标本同时测定血红蛋白和白细胞计数。③其他环保的血红蛋白测定方法还很多,如碱羟血红蛋白测定法等。④建议各临床实验室对参考区间进行验证后,采纳使用。⑤为保证结果的可靠性,应尽可能使用静脉血进行检测。

(二)临床意义

1.生理性降低

主要见于生理性贫血,如生长发育迅速而导致造血原料相对不足的婴幼儿、妊娠中后期血容量明显增

加而引起血液稀释的孕妇,以及造血功能减退的老年人。

2. 病理性降低

见于各种贫血,常见原因有:①骨髓造血功能障碍,如再生障碍性贫血、白血病、骨髓瘤、骨髓纤维化;②造血物质缺乏或利用障碍,如缺铁性贫血、铁粒幼细胞贫血、巨幼细胞贫血(叶酸及维生素 B₁₂ 缺乏);③急慢性失血,如手术或创伤后急性失血、消化道溃疡、寄生虫病;④血细胞破坏过多,如遗传性球形红细胞增多症、阵发性睡眠性血红蛋白尿、异常血红蛋白病、溶血性贫血;⑤其他疾病(如炎症、肝病、内分泌系统疾病)造成或伴发的贫血。

3. 生理性增高

见于生活在高原地区的居民、胎儿及初生儿、健康人进行剧烈运动或从事重体力劳动时。

4. 病理性增高

分为相对性增高和绝对性增高。相对性增高通常是由于血浆容量减少,致使血液中有形成分相对增多形成的暂时性假象,多见于脱水血浓缩时,常由严重呕吐、多次腹泻、大量出汗、大面积烧伤、尿崩症、大剂量使用利尿药等引起。绝对性增高多与组织缺氧、血中促红细胞生成素水平升高、骨髓加速释放红细胞有关,见于:①原发性红细胞增多症:为慢性骨髓增生性疾病,临床较为常见,其特点为红细胞及全血容量增加导致皮肤黏膜暗红,脾大同时伴有白细胞和血小板增多。②继发性红细胞增多症:见于肺源性心脏病、阻塞性肺气肿、发绀型先天性心脏病及异常血红蛋白病等;与某些肿瘤和肾脏疾患有关,如肾癌、肝细胞癌、子宫肌瘤、卵巢癌、肾胚胎瘤和肾积水、多囊肾、肾移植后;此外,还见于家族性自发性促红细胞生成素浓度增高,药物(雌激素、皮质类固醇等)引起的红细胞增多等。

在各种贫血时,由于红细胞内血红蛋白含量不同,红细胞和血红蛋白减少程度可不一致。血红蛋白测定可以用于了解贫血的程度,如需要了解贫血的类型,还需作红细胞计数和红细胞形态学检查,及与红细胞其他相关的指标测定。

三、红细胞计数

红细胞计数(red blood cell count, RBC)可采用自动化血液分析仪或显微镜检查法进行检测,以前者最为常用。血液分析仪进行红细胞计数的原理是电阻抗原理,在仪器计数结果不可靠(如红细胞数量较低、存在干扰等)需要确认、不具备条件使用血液分析仪时,可采用显微镜检查法进行红细胞计数。

(一) 检测方法

1. 血液分析仪检测法

(1)原理:主要使用电阻抗原理进行检测。有的仪器采用流式细胞术加二维激光散射法进行检测,全血经专用稀释液稀释后,使自然状态下的双凹盘状扁圆形红细胞成为球形并经戊二醛固定,这种处理不影响红细胞的平均体积,红细胞通过测量区时,激光束以低角度前向光散射测量单个红细胞的体积和红细胞总数,可使红细胞计数结果更加准确。

(2)仪器与试剂:血液分析仪及配套试剂(如稀释液、清洗液)、配套校准物、质控物。

(3)操作:使用稀释液和特定装置定量稀释血液标本;检测稀释样本中的细胞数量;将稀释样本中的细胞数量转换为最终报告结果,即每升全血中的红细胞数量。不同类型血液分析仪的操作程序依照仪器说明书规定。

(4)参考区间:(仪器法,静脉采血)。

成年男性:(4.3~5.8)×10¹²/L;成年女性:(3.8~5.1)×10¹²/L。

2. 显微镜计数法

(1)原理:显微镜检查方法用等渗稀释液将血液按一定倍数稀释并充入细胞计数板(又称牛鲍计数板)的计数池,在显微镜下计数一定体积内的红细胞数,经换算得出每升血液中红细胞的数目。

(2)试剂与器材:①赫姆(Hayem)液:氯化钠 1.0 g,结晶硫酸钠(Na₂SO₄·10H₂O)5.0 g(或无水硫酸

钠 2.5 g),氯化汞 0.5 g,分别用蒸馏水溶解后混合,再用蒸馏水加至 200 mL,混匀、过滤后备用;如暂无赫姆(Hayem)液,可用无菌生理盐水替代;②改良 Neubauer 血细胞计数板、盖玻片;③普通显微镜。

(3)操作:①取中号试管 1 支,加红细胞稀释液 2.0 mL;②用清洁干燥微量吸管取末梢血或抗凝血 10 μ l,擦去管外余血后加至红细胞稀释液底部,再轻吸上层清液清洗吸管 2~3 次,然后立即混匀;③混匀后,用干净微量吸管将红细胞悬液充入计数池,不得有空泡或外溢,充池后静置 2~3 分钟后计数;④高倍镜下依次计数中央大方格内四角和正中 5 个中方格内的红细胞。对压线红细胞按“数上不数下、数左不数右”的原则进行计数。

(4)结果计算:红细胞数/L=5 个中方格内红细胞数 $\times 5 \times 10 \times 200 \times 10^6 = 5$ 个中方格内红细胞数 $\times 10^{10} = \frac{5 \text{ 个中方格内红细胞数}}{100} \times 10^{12}$

式中: $\times 5$:5 个中方格换算成 1 个大方格; $\times 10$:1 个大方格容积为 0.1 μ l,换算成 1.0 μ l; $\times 200$:血液的实际稀释倍数应为 201 倍,按 200 是便于计算; $\times 10^6$:由 1 μ l 换算成 1 L。

(5)注意事项:①显微镜计数方法由于计数细胞数量有限,检测结果的精密度较差,适用于红细胞数量较低标本的检测;②红细胞的聚集可导致计数不准确;③如计数板不清洁或计数板中的稀释液蒸发,也会导致结果增高或错误;④配制的稀释液应过滤,以免杂质、微粒等被误认为细胞。

(二)方法学评价

临床实验室主要使用血液分析仪进行红细胞计数,不仅操作简便、检测快速,重复性好,而且能够同时得到多个红细胞相关参数。使用配套校准物或溯源至参考方法的定值新鲜血实施校准后,可确认或改善检测结果的准确性。某些病理状态下(如白细胞数过高、巨大血小板、红细胞过小、存在冷凝集素等),仪器检测结果易受干扰,需使用手工法进行确认。手工法是传统方法,无需特殊设备,但操作费时费力,结果重复性较差,在常规检测中已较少使用。

(三)临床意义

1.生理性降低

主要见于生理性贫血,如婴幼儿、妊娠中后期孕妇以及造血功能减退的老年人等。

2.病理性降低

见于各种贫血,常见原因有:①骨髓造血功能障碍,如再生障碍性贫血、白血病、骨髓瘤、骨髓纤维化;②造血物质缺乏或利用障碍,如缺铁性贫血、铁粒幼细胞贫血、巨幼细胞贫血;③急慢性失血,如手术或创伤后急性失血、消化道溃疡、寄生虫病;④血细胞破坏过多,如溶血性贫血;⑤其他疾病造成或伴发的贫血。

3.生理性增高

见于生活在高原地区的居民、胎儿及新生儿、剧烈运动或重体力劳动的健康人。

4.病理性增高

分为相对性增高和绝对性增高。相对性增高通常是由于血浆容量减少,致使血液中有形成分相对增多形成的暂时性假象,常由严重呕吐、多次腹泻、大面积烧伤、尿崩症、大剂量使用利尿药等引起。绝对性增高多与组织缺氧、血中促红细胞生成素水平升高、骨髓加速释放红细胞有关,见于:①原发性红细胞增多症:为慢性骨髓增殖性肿瘤,临床较为常见;②继发性红细胞增多症:见于肺源性心脏病、慢性阻塞性肺气肿及异常血红蛋白病等;与某些肿瘤和肾脏疾患有关,如肾癌、肝细胞癌、卵巢癌、肾移植后;此外,还见于家族性自发性促红细胞生成素浓度增高,药物(雌激素、皮质类固醇等)引起的红细胞增多等。

四、血细胞比容测定

血细胞比容(hematocrit, Hct)可采用离心法或血液分析仪进行测定。微量离心法是国际血液学标准化委员会(ICSH)推荐的参考方法。临床实验室主要使用血液分析仪测定 Hct,血液分析仪的检测结果应

通过校准溯源至参考方法。

(一) 检测方法

1. 血液分析仪检测法

(1)原理:仪器检测 Hct 的原理分为两类:一类是通过累积细胞计数时检测到的脉冲信号强度得出;另一类是通过测定红细胞计数和红细胞平均体积的结果计算得出, $Hct = \text{红细胞计数} \times \text{红细胞平均体积}$ 。

(2)仪器与试剂:血液分析仪及配套试剂、校准物、质控物、采血管等耗材。

(3)操作:按血液分析仪说明书的要求进行操作。

(4)参考区间:(仪器法,静脉采血)。

成年男性:0.40~0.50;成年女性:0.35~0.45。

(5)注意事项:血标本中有凝块、溶血、严重脂血等因素可导致检测结果不可靠。

2. 毛细管离心法

(1)原理:离心法是将待测标本吸入孔径一致的标准毛细玻璃管并进行离心,血细胞与血浆分离并被压紧,通过测量血细胞柱和血浆柱的长度即可计算出血细胞占全血的体积比。

(2)试剂与器材:①抗凝剂:以 EDTA-K₂ 为最好。②毛细管:毛细管用钠玻璃制成,长度为 75 mm ± 0.5 mm;内径为 1.155 mm ± 0.085 mm;管壁厚度为 0.20 mm,允许范围为 0.18~0.23 mm。③毛细管密封胶:应使用黏土样密封胶或符合要求的商品。④高速离心机:离心半径应大于 8.0 cm,能在 30 秒内加速到最大转速,在转动圆盘周边的 RCF 为 10 000~15 000 g 时,转动 5 分钟,转盘的温度不超过 45℃。⑤刻度读取器,如微分卡尺。

(3)操作:①将血标本与抗凝剂混匀时,动作应轻柔,避免血液中产生过多气泡。②利用虹吸作用将抗凝静脉血吸入毛细管内,反复倾斜毛细管,使血柱离毛细管两端的距离分别大于 0.5 cm。③将毛细管未吸血液的一端垂直插入密封胶,封口。密封胶柱长度为 4~6 mm。④将毛细管编号,按次序放置于离心机上。密封的一端朝向离心机圆盘的周边一侧。⑤RCF 至少为 10 000×g,离心 5 分钟。⑥取出毛细管,测量其中红细胞柱、全细胞柱和血浆柱的长度。红细胞柱的长度除以全细胞柱和血浆柱的长度之和,即为血细胞比容。

(4)注意事项:①采血应顺利,防止溶血及组织液混入;②同一标本的测量结果之差不可大于 0.015;③测量红细胞柱的长度时,不能将白细胞和血小板层计算在内;④离心机应符合要求。

(二) 方法学评价

临床实验室主要使用血液分析仪进行 Hct 检测,其优点是检测速度快,精密度良好,适合批量标本的检测,使用配套校准物或溯源至参考方法的定值新鲜血实施校准后,可确认或改善检测结果的准确性;常规条件使用的离心法操作简单,但检测速度较慢,结果准确性易受离心条件的影响,在临床实验室较少使用。

(三) 临床意义

Hct 不仅与红细胞数量的多少有关,而且与红细胞的体积大小及血浆容量的改变有关。Hct 是诊断贫血的主要实验室检查指标之一,也是影响全血黏度的重要因素和纠正脱水及酸碱平衡失调时治疗的参考指标。

1. Hct 增高

常导致全血黏度增加,呈现血液高黏滞综合征。临床研究表明,高血细胞比容与血栓形成密切相关,在诊断血管疾病的血栓前状态中也有显著意义。Hct 增高临床常见于:①各种原因所致的血液浓缩,使红细胞数量相对增多,如严重呕吐、腹泻、大量出汗、大面积烧伤等;②真性红细胞增多症;③继发性红细胞增多(如高原病、慢性肺源性心脏病等)的患者红细胞数量绝对增多,Hct 可显著增高。

2.Hct 减低

见于:①正常孕妇;②各种类型贫血,如急慢性出血、缺铁性贫血和再生障碍性贫血,但 Hct 减少的程度与 RBC、Hb 的减少程度并非完全一致;③继发性纤维蛋白溶解症患者;④应用干扰素、青霉素、吡喹酮(消炎痛)、维生素 A 等药物的患者。

五、红细胞平均指数

(一)原理

临床不仅要根据红细胞计数、血红蛋白浓度及血细胞比容的变化对贫血进行诊断,还要利用 RBC、Hb 及 Hct 的数值,计算出红细胞平均指数,帮助对贫血做形态学分类,初步判断贫血的原因以及对贫血进行鉴别诊断。红细胞平均指数分别为:平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)和平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)。

(二)计算方法

1.平均红细胞体积(MCV)

平均红细胞体积是指每个红细胞的平均体积,以飞升(fl)为单位。

$$MCV = \frac{\text{每升血液中红细胞比容(L)} \times 10^{15}}{\text{每升血液红细胞数(个)}}$$

举例:患者红细胞数为 $3.6 \times 10^{12}/L$,血细胞比容为 0.392。

因为 $1 L = 10^{15} fl$,即

$$MCV = \frac{0.392 \times 10^{15}}{3.6 \times 10^{12}} = 109 fl$$

2.平均红细胞血红蛋白含量(MCH)

平均红细胞血红蛋白含量是指每个红细胞内所含血红蛋白的平均量,以皮克(pg)为单位。

$$MCH = \frac{\text{每升血液中血红蛋白浓度(g)} \times 10^{15}}{\text{每升血液红细胞数(个)}}$$

举例:患者红细胞数 $3.6 \times 10^{12}/L$,血红蛋白为 136 g/L。

因为 $1 g = 10^{12} pg$,即

$$MCH = \frac{136 \times 10^{12}}{3.6 \times 10^{12}} = 38 pg$$

3.平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)

平均红细胞血红蛋白浓度是指平均每升红细胞中所含血红蛋白浓度(g/L)。

$$MCHC = \frac{\text{每升血液中血红蛋白 g 数(g/L)}}{\text{每升血液红细胞比容(L/L)}}$$

举例:患者血红蛋白 136 g/L,血细胞比容为 0.392。

$$MCHC = \frac{136}{0.392} = 347 g/L$$

(三)临床意义

1.MCV

MCV 增高见于红细胞体积增大时,见于各种造血物质缺乏或利用不良引起的巨幼细胞贫血、酒精性肝硬化、获得性溶血性贫血、出血性贫血再生之后和甲状腺功能减退等。MCV 降低见于红细胞减小时,见于慢性感染、慢性肝肾疾病、慢性失血、珠蛋白生成障碍性贫血(地中海贫血)、铁缺乏及铁利用不良等引

起的贫血等;其他原因引起的贫血 MCV 一般正常,如再生障碍性贫血、急性失血性贫血和某些溶血性贫血等。

2.MCH

增高见于各种造血物质缺乏或利用不良的大细胞性贫血(如巨幼细胞贫血)、恶性贫血、再生障碍性贫血、网织红细胞增多症、甲状腺功能减退等。MCH 降低见于慢性感染、慢性肝肾疾病、慢性失血等原因引起的单纯小细胞性贫血和铁缺乏及铁利用不良等原因引起的小细胞低色素性贫血,也可见于妊娠、口炎性腹泻等,急性失血性贫血和某些溶血性贫血的 MCH 检测结果多为正常。

3.MCHC

增高见于红细胞内血红蛋白异常浓缩,如烧伤、严重呕吐、频繁腹泻、慢性一氧化碳中毒、心脏代偿功能不全、遗传性球形红细胞增多症和相对罕见的先天性疾病。MCHC 降低主要见于小细胞低色素性贫血,如缺铁性贫血和珠蛋白生成障碍性贫血。患者的 MCHC 结果通常变化较小,可用于辅助监控血液分析仪检测结果的可靠性和标本异常等情况,如 MCHC 高于 400 g/L 提示仪器检测状态可能有错误,也可能是标本出现了冷凝集。

(四)注意事项

(1)由于以上三个参数都是间接算出的,因此红细胞数、血红蛋白浓度和血细胞比容的检测数据必须准确,否则误差很大。

(2)应结合红细胞形态学进行贫血种类的分析。

六、白细胞计数

白细胞计数(white blood cell count, WBC)可使用血液分析仪或显微镜进行检测,以前者最为常用。在血液分析仪计数结果异常(如白细胞数量较低、存在干扰等)需要确认或没有条件使用血液分析仪时,可采用手工显微镜法进行白细胞计数。

(一)检测方法

1.血液分析仪检测法

(1)原理:进行白细胞计数的原理主要有电阻抗法和光散射法。即血液经溶血素处理后,在鞘流液的带动下白细胞逐个通过血液分析仪的细胞计数小孔或激光照射区,引起小孔周围电阻抗的变化或产生特征性的光散射,对应的脉冲信号或光散射信号的多少即代表白细胞的数量。

(2)仪器与试剂:血液分析仪及配套试剂(如稀释液、溶血剂、清洗液)、配套校准物、质控物。

(3)操作:使用稀释液和特定装置定量稀释血液标本;检测稀释样本中的细胞数量;将稀释样本中的细胞数量转换为最终报告结果,即每升全血中的白细胞数量。不同类型血液分析仪的操作程序依照仪器说明书规定。

(4)参考区间:(仪器法,静脉采血)。

成年人: $(3.5\sim 9.5)\times 10^{12}/L$ 。

(5)注意事项:血液应与抗凝剂充分混匀,避免产生凝块;同时应避免标本出现溶血。存在冷球蛋白、冷纤维蛋白原、红细胞抵抗溶血和高甘油三酯等影响因素均会干扰白细胞计数结果。

2.显微镜计数法

(1)原理:手工计数时用白细胞稀释液将血液稀释一定倍数并破坏成熟的红细胞,然后将稀释后的标本充入细胞计数板(又称牛鲍计数板)的计数池,在显微镜下计数一定体积内的白细胞数,换算出每升血液中白细胞的数量。

(2)试剂与器材:①白细胞稀释液:冰醋酸 2 mL;蒸馏水 98 mL;10 g/L 亚甲蓝溶液 3 滴(混匀过滤后备用)②其他:显微镜、改良 Neubauer 血细胞计数板等。