

主编 黄文方 刘 华

实用医学分析技术与应用



人民卫生出版社

实用医学分析技术与应用

主 编 黄文方 刘 华

副主编 杨明清 张朝明 唐 中 刘湘君 丁显平

编委(以姓氏笔画为序)

丁显平	王太重	王乐如	王治国	王学锋	王鸿利
王惠民	王智斌	冯仁丰	冯 驰	丛玉隆	乐家新
刘 华	刘湘帆	刘湘君	刘献华	何云才	陈允硕
陈宏础	杨明清	杨朝国	李 萍	张宁梅	张国元
张剑波	张朝明	吴泰相	居 军	周中华	周京国
段宝华	胡翊群	钟亚玲	唐 中	袁 红	耿 林
郭 健	郭晓兰	涂植光	黄文方	康文英	喻 华
董 巍	颜英俊				

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

实用医学分析技术与应用/黄文方等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2002

ISBN 7-117-05097-7

I. 实… II. 黄… III. 医学检验 IV. R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 056824 号

实用医学分析技术与应用

主 编: 黄文方 刘 华

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

印 刷: 三河市潮河印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 49

字 数: 1121 千字

版 次: 2002 年 10 月第 1 版 2002 年 10 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-05097-7/R·5098

定 价: 71.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

科学技术的迅速发展，新的分析技术、检验手段层出不穷、日新月异，并不断进入检验医学领域，使检验医学有了前所未有的发展，迫使我们学习新知识、解决新问题。基于以上原因，我们邀请了国内众多专家，经过共同努力完成了本书的编写。因考虑各专业新的分析技术发展不平衡，全书不拘一格，让作者各自尽材发挥，以便介绍。

本书安排如下：

1. 质量控制独成一章，全面介绍了质量控制的新知识和新方法，以强调质量控制的重要性。

2. 分子生物学在检验医学中的应用越来越突出，用两章较全面地介绍了分子生物学的基础知识和分析技术。

3. 血细胞分析技术和尿液分析技术最近几年有了飞速发展，各成一章，以便介绍。

4. 在生物化学分析技术一章中，生化分析仪一节着重介绍了仪器在使用中所需掌握的知识，在血气部分主要增加了病例分析的介绍。

5. 流式细胞技术运用非常广泛，本书独立一章，对其分析技术和应用作了较全面的介绍。

对检验医学相关的新知识也作了较全面的介绍，如循证检验医学、计算机网络技术、检验系统性能的证实、标准物质等。

本书在编写过程中受到众多专家的支持和帮助，在此表示由衷的感谢。同时感谢李焱鑫、传良敏、杨静等同志在本书的校对过程中给予的支持和帮助。

限于本人水平，本书难免有疏漏或不足之处，恳切希望读者和同道提出意见和建议。

黄文方 刘 华

2001.11.1

内 容 提 要

本书内容以实用为主, 主要介绍临床检验医学新的分析技术及新知识。全书分血液细胞分析技术、尿液分析技术、临床生物化学分析技术、免疫学分析技术、微生物自动鉴定技术、分子生物学技术、基因芯片技术、流式细胞技术、血栓与止血分析技术、检验系统性能的证实、质量保证、计算机网络在检验医学中的应用、循证检验医学、标准物质共十四章。

本书的主要读者对象是临床检验工作者和医学科研工作者, 同时也是医学检验专业学生的教学参考书。



目 录

第一章 血液细胞分析	1
第一节 血细胞分析仪的检测原理	1
第二节 血细胞分析仪的临床应用	15
第三节 血细胞分析仪的鉴定与校正	34
第四节 血细胞分析仪应用的全面质量管理	40
第二章 尿液分析技术与应用	48
第一节 尿液检查的发展史	48
第二节 尿干化学技术与应用	50
第三节 尿化学分析仪	55
第四节 尿沉渣检查	59
第五节 尿液常规检查全面质量管理	65
第三章 生化分析技术与应用	68
第一节 自动化生化分析	68
第二节 血气分析	97
第三节 电泳技术	117
第四章 免疫分析技术及应用	147
第一节 免疫血清制备与抗体纯化	147
第二节 单克隆抗体制备技术	180
第三节 免疫浊度测定	192
第四节 凝集反应	201
第五节 沉淀反应	217
第六节 酶标记分析技术	232
第七节 化学发光免疫分析技术	241
第八节 时间分辨荧光免疫分析技术	250
第九节 免疫荧光显微镜技术	259
第十节 放射免疫分析	270
第十一节 生物素与亲和素系统在免疫技术中的应用	277
第十二节 酶免疫细胞化学技术	283
第五章 微生物自动鉴定新技术	296

第一节	微生物自动鉴定系统	296
第二节	全自动血培养系统	301
第三节	微生物自动鉴定系统的正确应用	302
第四节	细菌的耐药性及耐药菌的检测	309
第六章	分子生物学技术与应用	315
第一节	分子生物学技术的发展及在临床检验中的应用	315
第二节	分子生物学的基础理论	322
第三节	DNA 与 RNA 抽提法	328
第四节	核酸分子杂交	331
第五节	聚合酶链反应	340
第六节	核酸杂交-酶呈色用于 PCR 产物的测定	355
第七节	PCR-SSCP 技术	359
第七章	生物芯片技术及应用	363
第一节	发展概况	364
第二节	类型和特征	365
第三节	制备原理与方法	366
第四节	分析原理与方法	372
第五节	生物芯片技术的应用	384
第六节	生物芯片技术及其检测仪器的发展和展望	388
第七节	生物芯片和相关仪器	391
第八章	流式细胞技术及其应用	402
第一节	流式细胞仪(FCM)的基本结构和工作原理	402
第二节	流式细胞仪的主要技术指标	408
第三节	流式细胞仪的常用术语	410
第四节	流式细胞技术测定样本的制备	414
第五节	荧光染料的常用种类及特性	415
第六节	人细胞 CD 分化抗原的表达	417
第七节	流式细胞术计数血液中的网织红细胞	423
第八节	流式细胞术分析血液 HLA-B27 的表达	426
第九节	流式细胞术分析血小板的活化状态	428
第十节	流式细胞术分析淋巴细胞亚群	430
第十一节	流式细胞术检测细胞凋亡	435
第十二节	流式细胞术在 PNH 诊断中的应用	436
第十三节	流式细胞术在白血病免疫分型中的应用	437
第十四节	流式细胞术在其他领域中的应用	447

第九章 血栓与止血分析技术	449
第一节 血栓与止血常用仪器	449
第二节 出血与凝血机制	460
第三节 血小板分析技术	473
第四节 凝血因子分析技术	492
第五节 抗凝系统的分析技术	513
第六节 纤溶系统的分析技术	541
第七节 血管内皮细胞的分析技术	563
第八节 出血性疾病中的应用	570
第九节 血栓性疾病中的应用	586
第十章 检测系统性能的证实	606
第一节 检测系统及其基本性能	606
第二节 临床检验中的基体效应	608
第三节 标准品和校准品	611
第四节 重复性实验对精密度的估计	613
第五节 定量检验病人结果可报告范围评价实验	613
第六节 准确度性能评价	615
第七节 分析灵敏度(检测限)	617
第十一章 质量保证	620
第一节 基本概念	621
第二节 统计学基础	625
第三节 室内质量控制	630
第四节 室间质量评价	677
第五节 临床实验室的质量要求	684
第六节 计算机在实验室质量管理中的应用	692
第七节 质量管理与实验室认可	693
第十二章 计算机网络技术在检验医学中的应用	696
第一节 计算机网络概述	696
第二节 实验室信息管理系统	701
第三节 医学网络资源	714
第十三章 循证实验医学	731
第一节 循证实验医学的概念	731
第二节 循证实验医学的任务	732

第三节	诊断试验研究的设计原则	733
第四节	诊断试验研究的评价	737
第五节	诊断试验结果的应用	757
第十四章	标准物质	759

第一章

血液细胞分析

血液细胞分析是临床诊断工作中最常用的实验方法之一，传统的血液细胞分析主要使用手工显微镜计数的方法进行，包括将血液稀释用显微镜计数红、白细胞，血红蛋白与试剂结合形成衍生物比色定量及手工推片、染色、显微镜目测法作细胞分类。由于操作过程的随机误差、实验器材的系统误差及检测方法本身的固有误差，手工法细胞计数不但费时费力，实验结果的精确性、准确性也受影响，难以在大批量标本检查时及时发出报告。50年代库尔特先生利用电阻抗原理设计了血细胞计数仪，使血细胞计数的精密度提高了3~5倍，避免了繁重的目力计数，开创了血细胞分析的新纪元。70年代以后，由于计算机技术的飞速发展，血细胞分析的进展也很快。不仅血细胞分析仪测量结果的精确性、准确性不断提高，而且检测的参数也逐渐增多，还可将血小板、红细胞、白细胞的分布直方图打印出来，这对正确分析检测结果及报警原因提供了有用的信息。不但提高了医学检验的水平，还为临床提供了更多有用的实验指标，对于某些疾病的诊断与治疗具有重要的临床价值。

第一节 血细胞分析仪的检测原理

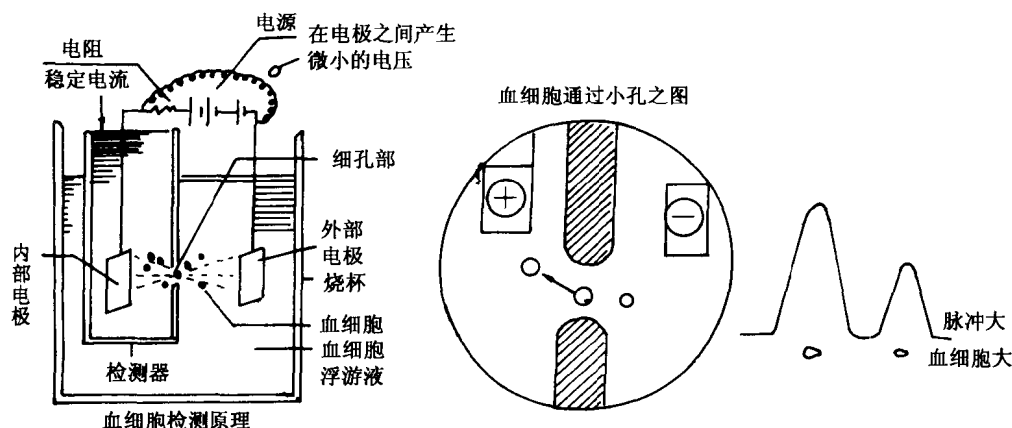
随着各种高新技术在血细胞分析仪中的应用，血细胞分析仪的检测原理不断完善，检测水平不断提高，各型号的仪器相继问世。但从根本上讲，其检测原理大致分为二部分：即电阻抗法与光散射法。

一、电阻抗法血细胞检测原理

（一）电阻抗法白细胞检测原理

1. 电阻抗法白细胞计数 20世纪50年代初，美国的库尔特先生(W.H.Coulter)发明并申请了粒子计数技术的设计专利，其原理是根据血细胞非传导性的性质，以对电解质溶液中悬浮颗粒在通过计数小孔时引起的电阻变化进行检测为基础，应用这一原理实现了血细胞计数的自动化。至今世界上使用的绝大多数血细胞分析仪仍采用电阻抗法

(electrical impedance)来进行血细胞计数和体积测定,这种方法也被称为库尔特原理(Coulter principle),如图 1-1 所示。



把用等渗电解质溶液(被称为稀释液, diluent)稀释的细胞悬液倒入一个不导电的容器中, 将小孔管(板), 也称为传感器(transducer)插到细胞悬液中。小孔管是电阻抗法细胞计数的一个重要组成部分, 其内侧充满了稀释液, 并有一个内电极, 外侧的细胞悬液中有一个外电极。检测期间, 当电流接通后, 位于小孔两侧的电极产生稳定的电流。稀释液通过小孔管壁上固有的小孔(直径一般 $< 100\mu\text{m}$, 厚度为 $75\mu\text{m}$ 左右)向小孔内部流动, 因为小孔周围充满了具有导电性的液体, 其电子脉冲是稳定的。如果供给的电流 I 和阻抗 R 是稳定的, 根据欧姆定律, 通过小孔的电压 E 也是不变的(这时 $E = IR$)。当一个细胞通过小孔时, 由于细胞的导电性质比稀释液要低, 在电路中小孔感应区内的电阻增加, 于瞬间引起了电压变化而出现一个脉冲信号, 称为通过脉冲。电压增加和变化的程度取决于非传导性细胞占据小孔感应区的体积, 即细胞体积越大, 引起的脉冲越大, 产生的脉冲振幅越高。脉冲信号经过下列步骤, 得出细胞计数结果。

(1) 放大: 由于血细胞通过微孔时产生的脉冲讯号非常微弱, 不能直接触发计数电路, 因此必须通过电子放大器, 将微伏讯号放大为伏级脉冲讯号。

(2) 阈值调节: 在一定范围内调节参考电频的大小, 使计数结果尽可能符合实际。

(3) 甄别: 各种微粒通过微孔时均可产生相应的脉冲讯号, 讯号电频(脉冲幅度)与微粒大小成正比。因此除血细胞外, 血中的细胞碎片、稀释液中的杂质微粒均可产生假讯号, 使计数结果偏高。所谓甄别, 就是利用甄别器根据阈值调节器提供的参考电频, 将低于参考电频假讯号去掉, 以提高细胞计数的准确性。

(4) 整形: 经放大和甄别后的细胞脉冲讯号的波形尚不一致, 必须经过整形器调整为形状一致标准的平顶波后, 才能触发电路。

(5) 计数: 血细胞的脉冲信号经过放大、甄别、整形后, 送入计数系统。各型血细胞分析仪的计数系统不同, 通过各种方式得出计数结果。

在进行血细胞测定之前, 必须用稀释液对全血标本在仪器外部或内部进行一定比例

的稀释,一般用 1:251 的稀释倍数来测量白细胞。例如库尔特公司的 JT 系列血细胞分析仪是用 6ml 稀释液来稀释 28 μ l 全血,为了使红细胞全部被破坏,再加入 1ml 溶血剂(Lyse)使红细胞膜破裂,释放出血红蛋白,仅留下红细胞膜微小的残余部分。仪器将从白细胞计数池中测量到的大于 35fl 的电子脉冲的数量作为白细胞计数,根据细胞稀释倍数进行计算,得到正确的白细胞计数结果。

2. 电阻抗法白细胞分群 从电阻抗法的原理可以看出不同体积的白细胞通过小孔时产生的脉冲大小不同,而不同类型的白细胞(如淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞)经溶血剂作用后有明显的差异,因此根据脉冲的大小,即可人为地将血内的白细胞分成几群(2 分群、3 分群)。目前临床应用中称之为“2 分类”、“3 分类”血细胞分析仪的概念是不确切的,因为所谓白细胞分类是指在显微镜下观察经染色的血涂片,根据细胞形态(包括细胞的胞体大小、胞浆的颜色及量的多少、核的形状及染色质的特点综合分析)得出准确的均一的细胞群,也就是说分类结果淋巴细胞是 25%,意味着分类 100 个白细胞中准确地有 25 个淋巴细胞。而电阻抗法白细胞“分类”实际上是根据体积大小的分群,其测量标准只是根据细胞体积的大小,而体积大小并不是细胞形态的唯一指标。比如经溶血剂作用后有些嗜碱性粒细胞可落入小细胞群,而大淋巴细胞可落到“中间”或“大细胞群”,显微镜下单核细胞较粒细胞体积大,而经溶血剂作用后粒细胞的体积大于单核细胞。因此在解释血细胞分析仪白细胞“分类”的结果时视为的所谓“淋巴”,在仪器分类时只认定为小细胞群,在这群体中可能 90% 的白细胞是淋巴细胞,而绝不是均一的细胞群体,在病理情况下这种差异更大,这也就是为什么专家们反复强调电阻抗法白细胞“分类”不能代替显微镜涂片检查之所在。

那么,仪器是如何进行细胞分群的呢?

目前很多仪器在给出细胞数据结果外,同时提供出细胞体积分布图形,这些可以表示出细胞群体分布情况的图形被称为直方图(histogram)。它可以显示一特定细胞群中的平均细胞体积、细胞分布情况和是否存在明显的异常细胞群。直方图是由测量通过感应区的每个细胞脉冲累积而得到的,根据库尔特原理可以在计数的同时进行分析测量。如

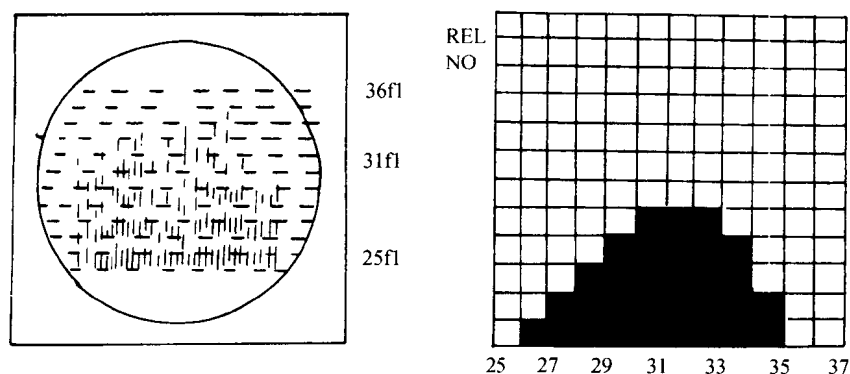


图 1-2 直方图与脉冲信号的关系示意图

左图:细胞通过脉冲;右图:根据脉冲信号得出的直方图

图 1-2 所示, 左图为示波器显示的所分析细胞的脉冲大小, 右图为相应的体积分布直方图, 横坐标为体积, 纵坐标为相对数量。血细胞分析仪在进行细胞分析时将每个细胞的脉冲数据根据其体积大小被分类并储存在相应的体积通道中。每个通道收集的数据被统计出相对数量(REL No.)表示在“Y”轴上, 体积数据以 fl 为单位表示在“X”轴上。

例如在进行白细胞体积分析时, 仪器计算机部分可以将白细胞体积从 30 ~ 450fl 分为 256 个通道(channel), 每个通道为 1.64fl, 细胞根据其大小被分别放在不同的通道中, 从而得到白细胞体积分布的直方图, 见图 1-3 所示。

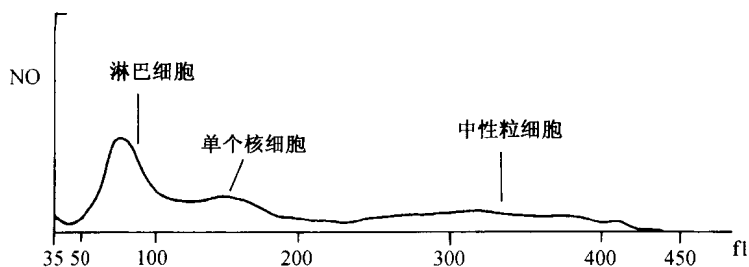


图 1-3 白细胞体积分布直方图

电阻抗测定方法得到的白细胞分类数据是根据白细胞体积直方图计算得来的, 如图 1-4 所示。

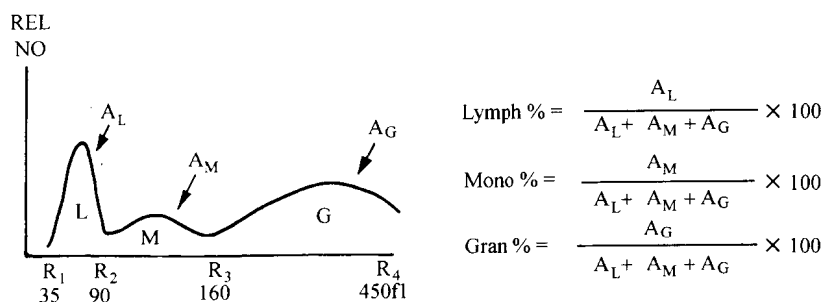


图 1-4 白细胞分类计数计算方法示意图

经过溶血剂处理后的白细胞根据体积大小可以初步确认其相应的种类: 第一亚群(小细胞群)是淋巴细胞(LYM), 第二亚群是单个核细胞群(MONO), 也被称为中间细胞(MID); 相当于粒细胞的细胞群(GRAN)位于第三亚群(大细胞群)。例如图 1-4 中, 位于 35 ~ 90fl 的颗粒被计数为淋巴细胞, 90 ~ 160fl 的颗粒被计数为单个核细胞, 160fl 以上的颗粒被计数为粒细胞。仪器根据各细胞群所占总体的比例计算出各细胞群的百分比, 如果与该标本的白细胞总数相乘, 即得到各项的绝对值。需要注意的是, 由于各厂家血细胞分析仪使用的稀释液和溶血剂的成分不完全相同, 对白细胞膜的作用程度不同, 所以仪器对各种白细胞区分界限的规定有所不同, 在使用时不应随意更换生产厂家的试剂, 以防止造成错误的报告。

由于白细胞计数池中除加入一定量的稀释液外还加入了溶血剂, 此溶血剂一方面使

红细胞迅速溶解，另一方面使白细胞胞浆经细胞膜渗出，胞膜紧裹在细胞核或存在的颗粒物质周围。经此处理后的白细胞体积与其自然体积无关，含有颗粒的经溶血剂处理后的粒细胞比无颗粒的单核细胞和淋巴细胞的体积要大些，虽然其真实体积与单核细胞相等或更小。白血病细胞、异型淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、浆细胞、嗜碱性粒细胞等多出现在单个核细胞区域，少数也可见于淋巴细胞或粒细胞区。所以白细胞直方图并不能代表其自然状况，但可以用来判断白细胞各亚群的分布情况。

如果标本中有未成熟细胞、异常细胞或非典型细胞，有些三项分类的血细胞分析仪在报告单上可打出警告信号(flags)“R”，并能指出哪一个区域有异常细胞、异常细胞的种类等。所提示的警告信号的种类、异常区域见图 1-3，原因见表 1-1。

表 1-1 引起警告信号的原因

警告信号	直方图异常区域	可能原因
R0 或 R1	淋巴细胞左侧区域	血小板凝集，巨大血小板，疟原虫，有核红细胞，不溶解红细胞，异常淋巴细胞，冷凝球蛋白等
R2	淋巴和单个核细胞之间	异型淋巴细胞，异常淋巴细胞，原幼细胞，浆细胞，嗜酸性粒细胞，嗜碱性粒细胞
R3	单个核和粒细胞间	未成熟粒细胞，异常细胞，嗜酸性粒细胞
R4	粒细胞右侧区域	粒细胞增多症
RM	多区异常	由以上多种原因引起

根据白细胞分类结果可以将血细胞分析仪分为两种：一类能报出淋巴细胞、单个核细胞和粒细胞三项的百分比和绝对值，被称为三分群(three-part differential)血细胞分析仪；另一类只能给出淋巴细胞和粒细胞两项的百分比和绝对值(two-part differential)，被称为两分群血细胞分析仪。为了保证白细胞分类结果的可靠性，两项分类结果很难正确反映病人的状况，难以用于白细胞分类的筛选。三分群血细胞分析仪的报警功能可以提高结果的准确性，这类仪器可以用于对血常规检查标本进行白细胞分类的筛选。国内外有很多文章介绍三项分类的准确性及临床应用，与人工显微镜白细胞分类计数结果相比，淋巴细胞和粒细胞有良好的相关性，相关系数 >0.9 ，警报提示系统也较可靠。认为此类仪器对综合性医院病人的分析结果准确可靠，可以作为人工分类的筛选手段。它操作简便，检测速度快，在计数血细胞的同时得到分类结果，可大大提高工作效率。对于仪器检测出的阳性标本应该做进一步的显微镜检查，对一些特殊病例，如怀疑有血液病的病人，即便仪器没打出警告信号，也应做人工涂片检查，为了使结果更加准确可靠，应该根据医院的具体情况定出白细胞分类筛选的规则，如除有警告信号外，白细胞计数、仪器分类结果异常或其他血细胞指标有异常时，也应做人工分类显微镜检查，以免漏诊。

(二) 电阻抗法红细胞测试原理

根据血细胞分析仪各参数检测原理的不同，可分为三个部分。

1. 红细胞数(RBC)和红细胞比积(HCT)迄今, 绝大多数血细胞分析仪使用电阻抗法进行红细胞计数和红细胞比积测定, 其原理同白细胞检测一样。红细胞通过小孔时形成相应大小的脉冲, 脉冲的多少即红细胞的数目, 脉冲的高度代表单个脉冲细胞的体积。脉冲高度叠加, 经换算即可得红细胞比积。有的仪器先以单个细胞高度计算红细胞平均体积(MCV), 再乘以红细胞数得出红细胞比积。仪器根据所测单个细胞体积及相同体积细胞占总体的比例, 可打印出红细胞体积分布直方图。稀释的血液进入红细胞检测通道时, 其中含有白细胞, 红细胞检测的各项参数均含有白细胞因素。由于正常血液有形成分中白细胞的比例很少(红细胞:白细胞约为 750:1), 故白细胞因素可忽略不计。在某些病理情况下, 如白血病, 白细胞明显增加而又伴严重贫血时, 均可使所得的各项参数产生明显误差。

2. 血红蛋白(HGB)含量测定 任何类型、档次的血细胞分析仪, 其血红蛋白测定原理都是相同的。被稀释的血液加入溶血剂后, 红细胞溶解, 释放血红蛋白, 后者与溶血剂中的有关成分结合形成血红蛋白衍生物, 进入血红蛋白测试系统, 在特定波长(一般在 530~550nm)下比色, 吸光度的变化与液体中的血红蛋白含量成正比, 仪器便可显示其浓度。不同系列血细胞分析仪配套溶血剂的配方不同, 形成的血红蛋白衍生物亦不同, 吸收光谱各异, 但最大吸收均接近 540nm。这是因为国际血液标准委员会(ICSH)推荐的氰化高铁(HiCN)法, HiCN 的最大吸收在 540nm。校正仪器必须以 HiCN 值为标准。大多数系列血细胞分析仪的溶血剂内均含有氰化钾, 与血红蛋白作用后形成氰化血红蛋白(注意不是氰化高铁血红蛋白), 其特点是显色稳定, 最大吸收接近 540nm, 但吸收光谱与 HiCN 有明显不同。此点在仪器校正时应十分注意。

为了减少溶血剂的毒性, 避免含氰化血红蛋白衍生物检测后的污物处理, 近年来有些血细胞分析仪使用非氰化溶血剂(如 SLS-Hb)。实验证明, 形成的衍生物与 HiCN 的吸收光谱相似, 实验结果的精确性、准确性达到含有氰化物溶血剂的同样水平, 既保证了实验质量, 又避免了试剂对分析人员的毒性和环境污染。

3. 各项红细胞指数检测 同手工法一样, 红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)、红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞体积分布宽度(RDW), 均根据仪器检测的红细胞数、红细胞比积和血红蛋白含量的实验数据, 经仪器内存程序换算出来, 计算公式分别为:

$$MCV (\text{fl}) = \frac{\text{每升血液中红细胞比积}}{\text{每升血液中红细胞个数}} = \frac{HCT \times 10^3 \times 10^{12}}{RBC/L}$$

$$MCH (\text{Pg}) = \frac{\text{每升血液中血红蛋白量}}{\text{每升血液中红细胞个数}} = \frac{HGB (\text{g/L}) \times 10^{12}}{RBC/L}$$

$$MCHC (\text{g/L}) = \frac{\text{每升血液中血红蛋白量}}{\text{每升血液中红细胞比积}} = \frac{HGB (\text{g/L})}{HCT}$$

RDW 由血细胞分析仪测量获得, 是反映周围血红细胞体积异质性的参数。当红细胞通过小孔的一瞬间, 计数电路得到一个相应大小的脉冲, 不同大小的脉冲信号分别贮存在仪器内装计算机的不同通道, 计算出相应的体积及细胞数, 经统计处理而得出 RDW。由于 RDW 来自十几秒内近万个红细胞的检测数据, 不但可以克服测量红细胞直径时人为制片条件和主观因素的影响, 还比 P-J 曲线能更直接、客观、及时地反映红细

胞大小不等的程度,对贫血的诊断有重要意义。RDW 的参考值范围见表 1-2。

表 1-2 RDW 的参考值范围

作者	例数	RDW ($X + 1.64SD$)	使用仪器	报告时间(年)
Bassman	229	< 13.9	Coulter S-Senior	
Mc Clure	90	< 14.8	Coulter plus V	1985
Robert	29	< 12.1	Coulter S-plus	1985
Marti	61	< 48 (RCSDW)	Sysmex E-500	1987
丛玉隆	81 (儿童)	< 14.6	Cell-Dyn 1500	1990
	70 (成年)	< 14.0		
	60 (老年)	< 13.8		
丛玉隆等	2013	< 14.9	Coulter JT 等	1996

多数仪器用所测红细胞体积大小的变异系数表示,即 RDW-CV,也有的仪器采用 RDW-SD 报告方式。有研究报告指出,在计算 RDW-CV 时,受红细胞体积大小的影响($CV = SD/X$),在某些病例中不能真实反映红细胞大小、离散的情况,而 RDW-SD 可以弥补这一不足。

(三) 电阻抗法血小板测试原理

血小板随红细胞一起在一个系统中进行检测,根据不同的阈值,计算机分别给出血小板与红细胞数目,血小板分别储存于 64 个通道内,直方图范围在 2~30fl 之间。值得注意的是,不同仪器的血小板直方图范围不一,如: Coulter JT 为 2~20fl、CA-610 为 2.9~27fl、SF-3000 为 2~30fl。MPV 就是此平整曲线所含的群体算术平均体积,所以,MPV 也就是血小板体积分布直方图的产物。为了使血小板计数更准确,有些仪器专门设置了增加血小板准确性的技术,如鞘流技术、浮动界标、拟合曲线等。

二、光散射法血细胞检测原理

前面详细阐述了电阻抗法检查白细胞、红细胞、血小板计数及相关参数的工作原理。由于操作简单、少量血液检测、瞬时可得出多项实验参数,给临床医生的诊断、鉴别诊断、观察疗效带来了很大方便,使血细胞分析仪迅速在全世界普及,至今方兴未艾。然而血细胞膜不能透过低频电流,电阻抗法白细胞分类计数只能根据测量溶血剂作用细胞后的细胞体积变化,将白细胞分成几个群体(如二步法分成淋巴细胞和非淋巴细胞,三步法分成淋巴细胞、中间细胞和粒细胞),不能分析细胞浆及核的特点,即使有的仪器能将嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞进行半定量(所谓的五分类),也总是根据体积大小各直方图的变化,估计细胞数值在某个范围(如嗜酸性粒细胞小于 $\times \times$ 个,嗜碱性粒细胞小于 $\times \times$ 个),并没有从细胞内部的结构分析。不难看出这种细胞分类法粗糙、干扰因素较多,结果不够稳定。文献报道,即使是质量较高的血细胞分析仪,其细胞分类的假阳性率为 6%~48%,假阴性率为 5%~8%,为了能从细胞大小及内部结构全面分析细胞,进而得到较准确的白细胞分类计数,自 80 年代中期以来,各种高科技技术分别

或联合应用于血液细胞分析, 各种系列更先进的仪器相继问世。下面根据其工作原理分别进行介绍。

(一) 光散射法白细胞检测原理

1. 光散射与细胞化学技术联合应用于白细胞分类计数 应用此原理是 Bayer 公司生产的 ADVIA120 血细胞分析仪, 其利用激光散射和过氧化物酶染色技术进行白细胞分类计数。此类仪器有四个测量通道, 即: 血红蛋白测量通道、红细胞/血小板测量通道、嗜碱性粒细胞测量通道和过氧化物酶测量(细胞分类)通道, 其作用原理见图 1-5。

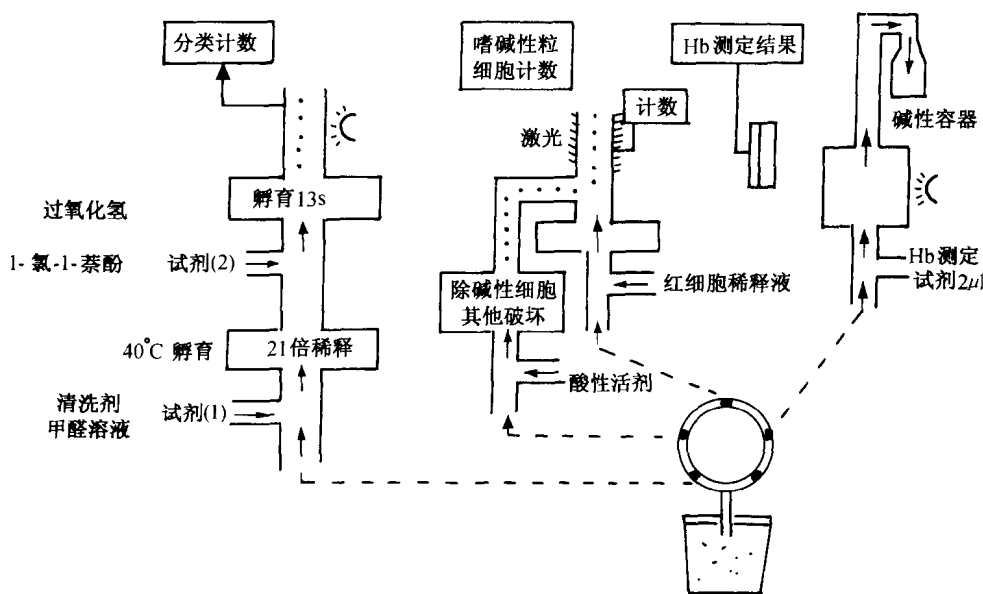


图 1-5 激光与细胞化学联合检测原理

(1) 过氧化物酶通道检测原理: 众所周知, 嗜酸性粒细胞有很强的过氧化物酶活性, 中性粒细胞有较强的过氧化物酶, 单核细胞次之, 而淋巴细胞和嗜碱性粒细胞无此酶。如果将血液经过氧化物酶染色, 胞浆内即可出现不同的酶化学反应, 由此构成了此种仪器的分析基础。从图 1-5 可以看出, 仪器的分血器将 $12\mu\text{l}$ 血加入到含有清洗剂和甲醛的高渗液体(21 倍稀释)并孵育 20 秒, 其中清洗剂(含有非离子活性剂)使细胞破坏, 甲醛使白细胞浆内酶被固定。此后发生第二步反应, 即加入过氧化氢(H_2O_2)和 4 氯-萘酚并加热 13 秒, 此时如果待测细胞浆中含有过氧化物酶即可分解 H_2O_2 产生 $[\text{O}]$, 后者可使 4 氯-萘酚显色并沉积定位于酶反应部位。细胞通过测试区时, 由于酶反应强度不同(阴性、弱阳性、强阳性)和细胞体积大小的差异, 激光束射到细胞上的前向角和散射角不同, 以 X 轴为吸光率标记(酶反应强度), Y 轴为光散射(细胞大小), 每个细胞产生的两个信号结合定位在细胞图上(见图 1-6), 每秒钟仪器可测上千个细胞, 计算机系统对存储的资料进行分析处理, 并可根据嗜碱性粒细胞/分叶核通道结果计算出白细胞