

• 述 评 •

# 血细胞分析自动化与显微镜复检应关注什么

张时民<sup>1,2</sup>, 王 庚<sup>1,2</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院, 北京 100730; 2. 北京协和医院检验科, 北京 100730)

**关键词:**血细胞分析; 显微镜; 复检**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.001**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2016)04-0433-03

由于血细胞分析仪具有快速、准确和便捷等优势,60 多年来一直在改变实验室血常规检验方法与检验流程。近年来血细胞分析仪由于各种新技术的使用,其检测性能越来越强大,检测参数也越来越多,特别是具有白细胞五分类技术的仪器的普及应用及全自动流水线化的血细胞分析系统的使用,使得实验室越来越依赖这样的设备来完成大量的血常规检验工作<sup>[1]</sup>。在样本量加大和人员缺乏这种特定环境条件下,外周血涂片检查的重要性被逐渐淡化和忽视,以至造成一些漏诊与错误。这种现象已经引起国内外临床检验界的重视,因此 P. W. Barnes 等教授倡导并组成了国际血液学复检专家组(International Consensus Group for hematology Review),并在 2005 年制定了自动血细胞计数和白细胞分类计数的复检标准<sup>[2]</sup>,该标准被国际实验血液学学会(ISLH)作为一个推荐方法介绍给全球使用各种自动化血液分析系统的专业人士参考。中华医学会检验分会也于 2006 年组成全国血液学复检专家小组对该标准进行了标准的释义并将其发表<sup>[3]</sup>,这就是所熟悉的 41 条筛检规则。而采用不同的血细胞分析系统,建立与各自医疗单位和服务人群相适应的复检规则也成为血液分析仪的用户单位的重要工作,这也是卫生部实验室管理办法和 ISO 15189 评审中重要的检查条款。

血涂片的复检与复核方法有两种,血片浏览(review)和血片分类(differential)。许多情况下仅仅需要浏览复核血片,用于确认血细胞分析仪得出的结论,例如红细胞体积大小(对发现的红细胞异常形态、染色、内含物应同时进行描述和报告),大小不等、某类细胞增高或减低(不包括形态学报告内容)。对出现白细胞形态学提示的问题,分类不正确的问题、不能分类的问题,则应采用显微镜下血片分类,重新分类报告。那么复检规则要关注和解决那些问题呢? 以下几点建议供参考。

## 1 浏览血片

首先浏览血涂片,此时可采用低倍(或高倍)镜浏览观察,初步了解血涂片制片效果,细胞的分布情况,染色效果,有否具有病理意义的大型细胞的出现等。同时观察血小板的聚集情况,如果是外周血、未抗凝的条件下直接涂片,血小板应出现轻度聚集,可见 3~5 个的小型聚集或成簇状聚集,表明血小板具有聚集能力,血小板无力症患者血涂片中的血小板虽数量未见异常,但血小板散在分布,几乎见不到聚集的血小板,也是一种异常现象。如果是抗凝血,血小板应该分布均匀,不应出现聚集现象,如有聚集出现将是导致仪器计数异常的问题所在。同时还需要观察红细胞的分布与排列,发现缙钱状排列现象和红细胞凝集现象等,从而发现初步判断是否有多发性骨髓瘤、球蛋白血症、血粘度较高或者冷凝集综合征等,甚至考虑判断是否会影响红细胞计数的准确性等问题。

## 2 评估检测结果

通过血涂片的浏览观察,可以对血细胞分析仪测定的细胞计数结果进行复核,初步评估仪器计数结果的可靠性和一致性。例如白细胞可参考表 1 的关系进行复核<sup>[4]</sup>;或采用估算方法进行复核,选择血片中分布均匀的区域进行评估,白细胞计数( $\times 10^9/L$ ) = 每高倍镜视野中白细胞平均个数  $\times 2$  ( $\times 10^9/L$ )<sup>[5]</sup>。

表 1 血涂片白细胞分布与定量计数结果的关系对照表<sup>\*</sup>

血涂片上的 WBC 数量(/HPF)	WBC 计数结果( $\times 10^9/L$ )
2~4	4~7
4~6	7~10
6~10	10~13
10~12	13~18

<sup>\*</sup>: 该对应关系或评估方法,与所使用的显微镜镜头的数值孔径和视场直径有关,本表供参考。

还可根据血涂片上血小板分布情况初步评估仪器对血小板计数结果的一致性及其复核。如果每油镜视野中平均 1 个血小板,相当于 PLT 计数结果的  $10 \times 10^9/L$ ,依次类推。或者通过血片推断血小板数量,选择血片体尾交界处分布均匀、无异常聚集或纤维蛋白丝的区域,浏览血涂片可大致估算血小板数量,方法:血小板数( $\times 10^9/L$ ) = 每油镜视野中血小板平均个数  $\times 15$  ( $\times 10^9/L$ )<sup>[5]</sup>。

## 3 不漏检血液病

复检中很重要的问题是不要漏检血液系统疾病,或者称为造血与淋巴组织肿瘤。虽然许多品牌的血细胞分析仪可以给出成熟粒细胞(IG)、异型淋巴细胞(ATYP)、原始细胞(BLAST)、核左移(LEFT SHIFT)、大型未染色细胞(LUC)等提示性报警信息,甚至是数量结果信息,但是他们依然具有局限性。根据目前的技术水平,五分类原理的血细胞分析仪尚不能对多种异常细胞给出明确的定义,更谈不上对血液系统疾病给出正确的白细胞分类报告。因此需要有经验的检验医师或技师进行细致的显微镜分类复检。在进行显微镜涂片检查时,除了关注和发现各系原始或幼稚细胞外,此外还应关注中性粒细胞毒性改变(如中毒颗粒、空泡变性、Döhle 小体及白细胞体积大小不均),核左移与核右移、Pelger-Huet 畸形、May-Hegglin 畸形、Chediak-Higashi 畸形、是否吞噬病原微生物等现象,这些问题的出现对诊断传染性疾病、某些严重感染、中毒、恶性肿瘤、猩红热、白喉、MDS 等具有重要意义,还对疾病的治疗和预后判断具有一定的帮助。对嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和单核细胞异常增高的病例,也需进行镜下复核与确认,以防止出现假性增加的问题。此外还要观察是否有其他异常细胞出

现,如异型淋巴细胞、浆细胞、骨髓瘤细胞、毛细胞、塞色利(Sezary)细胞、淋巴瘤细胞等,以便初步筛查某些血液系统疾病。白细胞参数出现异常报警提示,一般要考虑进行白细胞分类,将幼稚或异常的白细胞给出适当的百分比报告,对仪器分类错误的结果要给予纠正或重新分类确定。如果某些报警信息过于敏感,经镜检确认未见异常报警信息所提示的细胞、或未见异常细胞,也要在报告中予以记录和说明。

#### 4 关注红细胞

应该关注红细胞形态信息,提供贫血诊断的初步鉴别信息。一般血细胞分析仪都会提供许多红细胞报警的信息,如大细胞(Macro)、小细胞(Micro)、红细胞大小不等(Aniso)、血红

蛋白含量不均(HC VAR)、低色素性(Hypo)、高色素性(Hyper)等形态学信息。笔者认为这些红细胞形态学信息是更加准确的告知一个样本的红细胞大小或大小不等的信息,他更加客观、更加敏感,更加准确的、定量化的了解红细胞大小及色素改变的情况,是比较可信的参数,而这些参数的准确性应该建立在仪器校准合格、仪器质控在控及 MCV/MCH/MCHC 三项浮动均值指标完全在控的基础之上。而人工观测和描述这些红细胞信息,则可能受到个人经验因素影响,笔者认为其敏感性和一致性不如仪器分析结果准确和稳定。红细胞大小及形态学改变的临床意义参见表 2。

表 2 MCV、MCH、MCHV 和 RDW 辅助进行贫血分类鉴别表

贫血分类	MCV	MCH	MCHC	RDW 正常	RDW 升高
正常细胞贫血	正常	正常	正常	再生障碍性贫血,急性失血性贫血,肾性贫血,遗传性球形红细胞增多症,白血病,某些慢性肝病、长期或大剂量化学治疗后等。	营养缺乏性贫血,部分早期铁缺乏(尚未贫血)、血红蛋白病性贫血、骨髓纤维化、铁粒幼细胞贫血等。
大细胞贫血	增高	增高	正常	骨髓增生异常综合征、部分再生障碍性贫血、部分肝病性贫血、某些肾性贫血。	巨幼细胞性贫血、某些肝病性贫血。
单纯小细胞贫血	减低	减低	正常	慢性感染、慢性失血性贫血;慢性肝肾疾病	缺铁性贫血及铁利用不良性贫血、β-珠蛋白
小细胞低色素贫血	减低	减低	减低	性贫血;轻型珠蛋白生成障碍性贫血、某些继发性贫血等。	生成障碍性贫血、HbH 病等。

红细胞分析还可对一些现象进行提示性报警,如红细胞聚集(RBC Agglutination)表示标本可能有冷凝集现象;血红蛋白测定浊度增加(Hb Interf)则可能是因乳糜血因素的影响;有核红细胞增加(NRBC)、红细胞双峰分布(Dimorphic Population)、红细胞碎片(RBC Fragment)干扰等,这些提示可以对一些红细胞和血红蛋白异常现象进行初步判断,但是 NRBC、红细胞聚集、红细胞碎片现象等还需要进行显微镜下的确认。如果这些现象出现,会影响到白细胞和红细胞计数的正确性,进而影响红细胞相关计算参数的准确性,因而需复检血片;红细胞碎片增多会干扰阻抗法的小血小板计数结果,也要通过仪器直方图和散点图初筛,通过复检血片而确认,并且需要对受到影响的计数结果进行纠正。复检血片所需要关注的是许多红细胞形态的异常改变、染色情况和内部结构出现异常时,血细胞分析仪的有关参数和报警信息不能完全覆盖或不能正确提示,如珠蛋白生成障碍性贫血和 HbC 时出现的靶形红细胞;遗传性椭圆形红细胞增多症;自身免疫性溶血性贫血时的球形红细胞(spherocyte)增多;肝脏疾病、溶血性贫血和小儿消化系统疾病导致的口形红细胞(stomatocyte)增加;舞蹈病和重度肝损伤时的棘形红细胞(acanthocyte)、骨髓纤维化时的泪滴样红细胞(tear drop)、巨幼细胞贫血和椭圆形红细胞增多症时的椭圆形红细胞(elliptocyte)增加;以及镰状细胞(sickle cell)贫血、嗜碱性点彩(basophilic stippling)红细胞、卡波环(Cabot rings)和豪焦小体(Howell-Jolly bodies)等情况出现和增加,均需要通过观察红细胞形态而进行识别和参与临床辅助诊断。

2015 年,国际血液学标准委员会(International Council for Standardization in Haematology, ICSH)根据十多位专家的研究和建议,推出了有关红细胞形态术语的标准化和外周血细胞形态学特征分级标准(ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features),见表 3。该项推荐标准对今后应用细

胞形态术语的标准化,特别是在判断细胞形态异常的标准方面,提供了有价值的借鉴性指导<sup>[6]</sup>。其中有关红细胞形态的术语和分类原则,与我国专业书籍或教科书中有关红细胞形态的命名及分类原则有一定差距,这方面应该引起我国同行们的注意。同时笔者也建议国内检验学会和血液学专家尽快讨论,制定或建立中英文标准化术语和译名,规范化各种细胞类别的定义,这对专业的发展是有积极意义的。

#### 5 关注血小板

特别关注血小板,血小板体积小,易发生聚集和计数不准,因此是非常容易出现问题的复检内容之一。在进行血涂片检查或复检时,首要注意的是否出现血小板聚集(PLT Clump)报警信息,或者血小板分布异常(PLT Abn Distribution)的提示,特别是应用 EDTA 抗凝血标本时,注意防范血小板假性减低现象发生。而 EDTA 抗凝剂导致的假性血小板减低会给临床带来误诊或延误治疗。此外还需要关注大血小板是否明显增加的报警(Large PLT),它会使阻抗法计数的小血小板出现假性减低现象,此时需要考虑是否改用其他检测原理的设备,或者改用显微镜计数法进行纠正,巨大血小板出现过甚至会导致仪器“漏数”,这些超出红细胞体积大小的巨大血小板只有通过镜检才能发现。如果外周血出现较多颗粒缺失或减少的血小板、巨大血小板、形态异常的血小板、血小板体积明显大小不等,对骨髓病态造血相关的疾病和凝血机能障碍的疾病具有提示意义,如骨髓增生异常综合征、慢性骨髓增生性白血病等。此外笔者在最近的两年中还发现了冷球蛋白血症患者,导致血小板计数假性升高的病例,如果是假性升高到极高的水平(如  $>1\ 000 \times 10^9/L$ )通过复检规则还可以发现,如果是血小板偏低,而假性升高到正常水平,甚至仪器不出现任何报警信息,那则是非常难以发现和复检查出的,在 2013 和 2015 年就发现两例此类患者。因此发现冷球蛋白血症,其血小板计数结果一定要经过人工复检来确认,这是以前的复检规则中未曾提到的

问题<sup>[7]</sup>。

表 3 细胞中英文名称及形态学分级标准

Cell Name	细胞名称	Grading System		
		Few/ 1+	Mod/ 2+, %	Many/ 3+, %
RBC	红细胞			
Anisocytosis	红细胞大小不均	N/A	11~20	>20
Macrocytes	大红细胞	N/A	11~20	>20
Oval macrocytes	椭圆形大红细胞	N/A	2~5	>5
Microcytes	小红细胞	N/A	11~20	>20
Hypochromic cells	低色素性红细胞	N/A	11~20	>20
Polychromasia	嗜多色性	N/A	5~20	>20
Acanthocytes	棘形红细胞	N/A	5~20	>20
Bite cells	咬痕细胞	N/A	1~2	>2
Blister cells	泡形细胞	N/A	1~2	>2
Echinocytes	刺形红细胞	N/A	5~20	>20
Elliptocytes	椭圆形红细胞	N/A	5~20	>20
Irregularly contracted cells	不规则收缩形红细胞	N/A	1~2	>2
Ovalocytes	椭圆形红细胞	N/A	5~20	>20
Schistocytes	裂红细胞	<1%	1~2	>2
Sickle cells	镰形红细胞	N/A	1~2	>2
Spherocytes	球形红细胞	N/A	5~20	>20
Stomatocytes	口形红细胞	N/A	5~20	>20
Target cells	靶形红细胞	N/A	5~20	>20
Teardrop cells	泪滴形红细胞	N/A	5~20	>20
Basophilic stippling	嗜碱性点彩红细胞	N/A	5~20	>20
Howell-Jolly bodies	豪焦小体	N/A	2~3	>3
Pappenheimer bodies	帕彭海默小体(含铁小体)	N/A	2~3	>3
WBC	白细胞			
Dohle bodies	杜勒小体	N/A	2~4	>4
Vacuolation(neutrophil)	空泡变性(中性粒细胞)	N/A	4~8	>8
Hypogranulation (neutrophil)	乏颗粒(中性粒细胞)	N/A	4~8	>8
Hypergranulation (neutrophil)	多颗粒(中性粒细胞)	N/A	4~8	>8
Platelets	血小板			
Giant Platelets	巨血小板	N/A	11~20	>20

6 血液寄生虫

血片检查中另一特别需要重视的问题是血液寄生虫,某些患者可能因临床症状不典型,未引起临床医生关注寄生虫感染问题。在血液中可以发现疟原虫<sup>[8]</sup>、微丝蚴、巴贝斯虫、锥虫、弓形虫等感染,要知道这些病原体的发现,实际上是给临床出具了诊断性报告,是血液检验中可以发出确诊报告的项目,这是非常重要的。如果临床患者有相关症状,或临床医生提示检查血液寄生虫,应将血片仔细浏览,或者多涂几张血片,包括厚血片进行细致检查。而目前在南方,特别是从疫区国家归来的人员,其疟原虫感染率非常高,值得警惕和仔细检查。

7 显微镜计数技术

复检有时候还需要传统的显微镜法予以配合,虽然血细胞分析仪在计数的准确性、精密度上、检测速度上已经大大高于

传统的人工测定方法,是毋庸置疑的。但是在某些特定的病例上,可能还需要人工法予以验证和辅助分析。假如遇到 EDTA 及枸橼酸钠抗凝剂均可引发血小板聚集的病例,就需要回归显微镜计数法。遇到严重的冷凝集现象或者冷球蛋白血症、红细胞碎片增加的病例,都有可能导导致红细胞计数及血小板计数出现错误,都可能要回归显微镜计数法予以解决。溶血性贫血患者过高的网织红细胞,也可因仪器试剂或线性问题导致计数结果偏低或不正确,且在 41 条规则中并未涉及到此类问题的复检规则,因此也需要用传统的煌焦油蓝染色和显微镜计数法予以纠正<sup>[9]</sup>。

8 数字图像技术

目前已经有一些数字图像的血细胞检查系统,将血片置于显微镜下进行数字图像拍摄,然后数字识别软件对白细胞进行分类处理。其完全模拟显微镜分类技术进行形态学血细胞检查,这是一个有益的进步。但是可能还有一些瓶颈问题尚未得到解决,或许因血细胞形态千变万化,在原始和幼稚细胞、异常细胞形态等方面,在某些成分的干扰情况下,其正确识别率仍有待进一步的提升。目前对应用此类仪器应用,笔者的建议是,首先进行屏幕审核,纠正其错误识别的细胞,消除干扰成分,对难以鉴别的样本,重新进行显微镜下的观察和判别。

9 小结

目前在广泛应用各种品牌的自动化血细胞分析仪进行大量血常规标本检测的背景下、在工作量增加、检验人员配备不足、检验报告时间被限定的现实条件下,制定适合自己实验室使用的、能够保证实验质量、尽量减少漏检和实验误差的复检规则,非常重要。更为重要的是有了复检规则,应该具体落实和执行这些规则,不要流于形式,以保证实验室所出具的报告具有可信性和高质量,最大限度地满足临床医师诊治工作对临床检验的需求。

参考文献

[1] 张时民. 五分类法血细胞分析仪测定原理和散点图特征[J]. 中国医疗器械信息, 2008, 14(12): 1-9, 44.

[2] Barnes PW, Mcfadden SL, Machin SJ, et al. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis[J]. Lab Hematol, 2005, 11(2): 83-90.

[3] 中华医学会检验分会全国血液学复检专家组. 全国血液学复检专家组工作会议纪要暨血细胞自动计数复检标准释义[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(4): 380-382.

[4] 熊立凡. 临床检验基础[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

[5] 王霄霞. 外周血细胞形态学检查技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[6] Palmer L, Briggs C, Mcfadden S, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features[J]. Int J Lab Hematol, 2015, 37(3): 287-303.

[7] 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.

[8] 王庚, 陈倩, 王欣, 等. 因血小板减少血涂片复检出疟原虫[J]. 协和医学杂志, 2014, 5(3): 327-330.

[9] 张时民, 李建英, 王庚. 3 例溶血性贫血患者用血液分析仪检测网织红细胞结果偏低[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(1): 72.