



中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 346—2011

网织红细胞计数的参考方法

Reference method for reticulocyte counting

2011-09-30 发布

2012-04-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由卫生部临床检验标准专业委员会提出。

本标准主要起草单位：卫生部临床检验中心。

本标准主要起草人：彭明婷、谷小林、施丽飞、李臣宾、申子瑜。

网织红细胞计数的参考方法

1 范围

本标准规定了网织红细胞计数参考方法的技术要求。

本标准适用于建立并运行网织红细胞计数参考方法的实验室。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

参考方法 reference method

一种可清楚和准确描述的用于特定检测的技术,该技术要有依据,可提供足够准确和精密的实验数据以评价其他实验方法检测结果的有效性。若有决定性方法,参考方法的准确性必须与决定性方法进行比较,并且须标示不准确度和不精密度。

3 总则

为了保证参考方法检测结果的准确性,建立参考方法的实验室必须与其他参考实验室进行结果比对。

4 原理

网织红细胞是未完全成熟的红细胞,其胞质中含有嗜碱性的 RNA 物质,经碱性染料活体染色后,形成蓝色点粒状或丝网状结构。参考方法中,采用显微镜(明场或相差)对新亚甲蓝活体染色后制备的血涂片进行网织红细胞计数,确定网织红细胞与红细胞的比值后,使用参考方法(ICSH,1994)计数红细胞,网织红细胞比值乘以红细胞计数结果,即为网织红细胞的绝对数。网织红细胞绝对数的表达方式为每升全血中含有网织红细胞的数量。

5 血液标本的要求

5.1 血液标本的采集应使用真空采血管或注射器采血后注入含抗凝剂的洁净试管中,要注意防止溶血。

5.2 使用 EDTA·K₂ 抗凝剂,加入血液后抗凝剂的终浓度为 3.7 μmol/mL~5.4 μmol/mL(1.5 mg/mL~2.2 mg/mL)。

5.3 标本采集后要求在 4 h 内进行染色。

5.4 检测前应先轻柔地颠倒试管以混匀标本,颠倒次数至少为 8 次(试管的最佳颠倒次数取决于试管的种类和容积大小)。血液加入抗凝管后,管内剩余空间应至少占试管体积的 20%。

5.5 不能使用旋涡混匀器和滚轴混匀器。

6 染料和染液配制

6.1 推荐的染料为新亚甲蓝。

6.2 染液的配制方法:将 1.0 g 新亚甲蓝(染料应干燥)溶解于 100 mL pH 为 7.4 的等渗磷酸盐缓冲液(150 mmol/L 的 NaH_2PO_4 18 mL, 150 mmol/L 的 Na_2HPO_4 82 mL)中。

6.3 待染料溶解后,必须充分混匀并过滤,然后将其装入干净的棕色瓶中,避光保存于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,染液可稳定 1 个月。

6.4 使用前取适量的染液用过滤器或滤纸(要求孔径为 $11\text{ }\mu\text{m}$)再次进行过滤,以去除沉淀的染料和其他颗粒物质。

7 实验器具

7.1 巴斯德移液管。

7.2 $75\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ 的玻璃试管。

7.3 载玻片(经酸处理)。

8 操作过程

8.1 将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 过滤后的染液加至 $75\text{ mm}\times 10\text{ mm}$ 的试管中,再将约 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的全血加至该试管中,加盖并充分混匀后,在室温条件下染色 $3\text{ min}\sim 5\text{ min}$ 。

8.2 将细胞悬液重新混匀,在载玻片上推成薄血膜。血膜长度至少有 2.5 cm ,血膜末端离玻片的末端至少有 1 cm 的距离,且整个血膜周边应留有光滑连续的空白区。可用热吹风等方式使血膜快速干燥(避免温度过高或时间过长)。

8.3 在低倍镜下(总的放大倍数为 100 倍)先浏览血膜的细胞分布情况,以确认细胞均匀地分布于适当的计数区域内,然后在油镜下计数血膜上的红细胞,如出现任何干扰因素(如疟原虫、Heinz 小体),则不适用于参考方法。

9 计数

9.1 要获得准确的计数结果,就必须把每个视野中的成熟红细胞和网织红细胞准确地区分开来。要求由两位经验丰富的检验技术人员通过视频监测器或者两人共用一台双头双筒的显微镜同时计数。

9.2 每份检测标本都应选用 3 张血涂片进行计数。

9.3 计数过程中视野的移动顺序如图 1 所示。

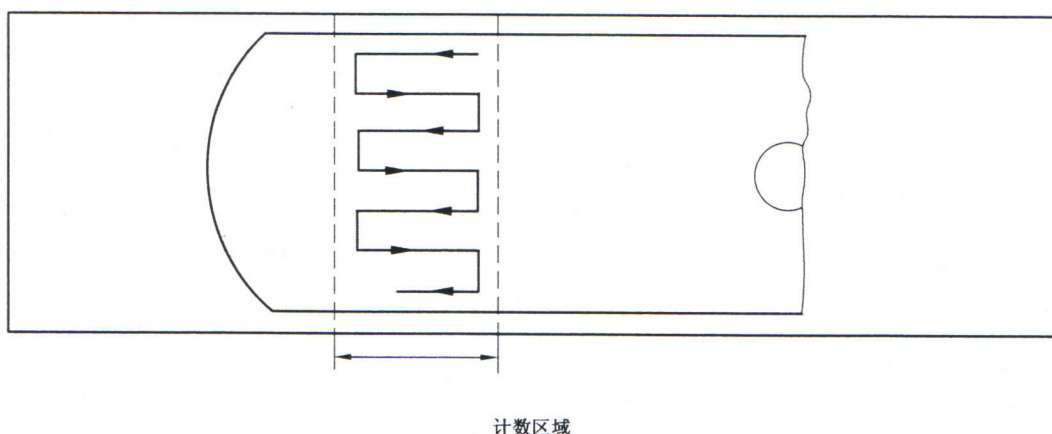


图 1 网织红细胞计数视野移动顺序示意图

9.4 计数红细胞的数量应以能够获得满意的精密度为标准(见表 1)。

9.5 成熟红细胞和网织红细胞要分别记录,网织红细胞的比值(rp)可用公式(1)计算:

$$rp = \frac{\text{网织红细胞数}}{\text{成熟红细胞数} + \text{网织红细胞数}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

9.6 网织红细胞绝对数为每升全血中所含的网织红细胞数。该值等于用参考方法计数出的红细胞总数乘以网织红细胞比值。

9.7 网织红细胞绝对数检测结果变异系数的计算方法见公式(2):

$$\sqrt{CV_{RBC}^2 + CV_{rp}^2} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

CV_{RBC} ——计数所得的红细胞数的变异系数;

CV_{rp} ——网织红细胞比值的变异系数。

10 精密度要求

10.1 检测结果精密度的理论计算公式见公式(3):

$$SE = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

SE ——标准差;

P ——网织红细胞占成熟红细胞和计数所得网织红细胞的比值;

n ——成熟红细胞数加上网织红细胞数。

10.2 已知 $CV = (SE/P) \times 100$, 可得到 SE 的值为 $[SE = P \times CV/100]$, 因此在公式(3)中可替换 SE , 最后得到“ n ”的值, 该值代表要获得满意的网织红细胞计数精密度需要计数的红细胞总数, 见公式(4)如下:

$$n = \frac{1-P}{P} \times \frac{100^2}{CV^2} \quad \dots\dots\dots (4)$$

所得结果就是理论上需要计数的红细胞总数。

10.3 当 CV 值分别为 2%、5% 和 10% 时, 对于不同的网织红细胞比值, 要求计数的红细胞数如表 1 所示。

表 1 当 CV 分别为 2%、5% 和 10% 时要求计数的红细胞数

网织红细胞比值	要求计数的红细胞数		
	2%	5%	10%
0.01	247 500	39 600	9 900
0.02	122 500	19 600	4 900
0.05	47 500	7 600	1 900
0.10	22 500	3 600	900
0.20	10 000	1 600	400
0.50	2 500	400	100

参 考 文 献

- [1] ICSH: Proposed Reference Method for Reticulocyte Counting Based on the Determination of the Reticulocyte to Red Cell Ratio. 1998
 - [2] ICSH: Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes. Clin Lab Haemat, 1994, 16: 131-138
-