

比较两种方法对牛鲍氏计数板中细胞计数结果的影响*

张明昊¹,蔡晓钟¹,罗娟¹,薛白²,曾娣²,徐超²,仲煜杰³,徐增伟²,左国伟^{3Δ}

(1. 重庆医科大学:1. 实验教学管理中心;2. 公共卫生与管理学院;3. 检验医学院/临床检验诊断学教育部重点实验室,重庆 400016)

[摘要] **目的** 比较牛鲍氏计数板的传统计数方法和新计数方法对细胞计数结果的影响。**方法** 用传统计数方法和新计数方法计数 118 份抗凝血标本中的红细胞,然后将结果与标准值对照。**结果** 在 109 份有效样本中,有 57 份(52.29%)用新方法计数结果更准确,40 份(36.70%)用传统方法计数结果更准确,12 份(11.01%)用两种方法计数引出的误差相同。新方法计数误差的平均值为 $(0.071 \pm 0.005) \times 10^{12}/L$,明显低于传统方法计数误差的平均值 $(0.079 \pm 0.006) \times 10^{12}/L$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 采用新方法在减小牛鲍氏计数板对细胞计数的误差方面可能有一定的作用。

[关键词] 计数方法;标准值;牛鲍氏计数板;压线细胞;分布误差

[中图分类号] R331

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)05-0658-03

Comparison of influence of two methods on cell count results in Neubauer counting chamber*

Zhang Minghao¹, Cai Xiaozhong¹, Luo Juan¹, Xue Bai², Zeng Di², Xu Chao², Zhong Yujie³, Xu Zengwei², Zuo Guowei^{3Δ}

(1. Center for Lab Teaching & Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. College of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Key Laboratory of Medical Diagnostics, Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective** To compare the influence of the classical counting method and the bran-new counting method in Neubauer counting chamber on cell count results. **Methods** 118 anti-coagulated blood samples were selected. The two methods mentioned above were applied respectively to count the number of red blood cells, and results were compared with the standard references. **Results** Among 109 effective samples, the results of 57 samples (52.29%) had more accuracy through using the new counting method, whereas the results of only 40 samples (36.70%) had more accuracy through using the conventional counting method, and the results of 12 samples (11.01%) had the same errors through using two methods. The average deviation caused by the new method was $(0.071 \pm 0.005) \times 10^{12}/L$, which was significantly lower than $(0.079 \pm 0.006) \times 10^{12}/L$ ($P < 0.01$) by the conventional method, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Adopting the new counting method could have certain effect in the aspect of lessening the error of cell counts in Neubauer counting chamber.

[Key words] counting methods; standard value; Neubauer counting chamber; pressing-line cells; distribution error

牛鲍氏计数板被广泛地运用于计数体液细胞和微生物,且其测定结果通常被视为“金标准”。然而操作中,测试者会发现某些计数方格的 4 条外边线上各自分布的压线细胞数目有差异,但传统方法只要求对其按照“数上不数下,数左不数右”的原则来处理^[1],这样计数可能会由于较大分布误差的存在而引起结果偏移。本研究将对传统计数方法和新计数方法(对分布于 4 条外边上的压线细胞计数后,将计数值除以 2)对牛鲍氏计数板中细胞计数结果的差异,来揭示运用新计数方法的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选用 2015 年 6 月重庆医科大学附属大学城医院健康体检者的新鲜抗凝血标本 118 份,全部入选标本均征得体检者的许可并签署知情同意书。红细胞计数平均值为 $(4.61 \pm 0.50) \times 10^{12}/L$,最高 $6.05 \times 10^{12}/L$,最低 $3.35 \times 10^{12}/L$ 。

1.2 方法

1.2.1 仪器、耗材及试剂 每份全血样本的红细胞计数标准值由 Sysmex 公司生产的 KX-21 全自动三分类血细胞分析仪

和该公司原装配套的 Cellpack 稀释液和溶血剂进行测定。采用上海求精生化试剂仪器有限公司生产的改良牛鲍氏计数板(内置盖玻片)和山东奥赛特医疗器械有限公司生产的血红蛋白吸管进行红细胞计数的手工法操作,红细胞稀释液选用质量体积比为 3.13% 的枸橼酸钠蒸馏水溶液。

1.2.2 检测方法 实验全过程由 3 名经验丰富的专职实验老师负责,并严格参照《全国临床检验操作规程》(第 3 版)^[1]中手工法红细胞计数的操作流程来测定每一份样本:先取规格为 12×100 的塑料试管 1 支,加入红细胞稀释液 2 mL;拿 1 支血红蛋白吸管吸取抗凝血标本 10 μ L,用医用脱脂棉球擦去管外余血后加至装有红细胞稀释液的试管底部,再轻轻地吸上清液反复吹洗吸管 3 次,立即混匀;随后用血红蛋白吸管将红细胞悬液充入计数池,并静置 3 min;高倍镜下依次计数中央大方格内 4 角和正中 5 个中方格内的红细胞,对每个中方格 4 条外边线上分布的压线细胞分别计数,然后再按照传统方法和新方法把结果换算成:红细胞数/L = 5 个中方格内红细胞数 $\times 5 \times 10 \times 201 \times 10^6/L$ 。当两种方法计数出的结果与标准值的误差均小于 5% 时,该例样本视作有效。再将两种方法计算结果与

标准值的误差均小于 2% 的样本划归为“低误差样本组”，其余的有效样本划归为“高误差样本组”。

1.2.3 质控 为了减小 KX-21 血细胞分析仪的定标误差，测试中每间隔 10 份样本就用 Sysmex 公司生产的原装血液学质控物对测量结果进行监控。参考的定标点选用红细胞值分别为 $5.49 \times 10^{12}/L$ 和 $4.12 \times 10^{12}/L$ 的两个质控品轮流监测，结果 12 个监控点的测试值依次为 (5.50, 4.12, 5.51, 4.11, 5.48, 4.12, 5.50, 4.10, 5.49, 4.13, 5.51, 4.11)，其中的最大误差小于 0.50%，符合测试要求。盖玻片的厚度用精密度为 10 μL 的游标卡尺丈量，各测量点读数无差异；血红蛋白吸管容积的精密度用重铬酸钾比色法校准，组间的吸光度值无明显差异，符合实验要求。为了避免红细胞随放置时间延长被逐步破坏，每一份样本的仪器法定标和手工法计数过程均控制在 40 min 内完成。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行统计学处理。两种计数方法对误差大小的影响是否具有独立性用 χ^2 检验分析，红细胞计数误差的组间差异采用配对样本 t 检验比较，其相关性用 Pearson 检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基本情况 在 118 份样本中，有 9 份因为误差偏大（当任一种方法的计数结果与标准值的误差大于 5%）而淘汰，109 份标本计数结果有效。其中两种方法计数值均偏大 46 份，均偏小 43 份，一大一小 20 份。分布于左上边和右下边的压线红细胞平均值分别为 $(88.06 \pm 10.98)/份$ 和 $(88.18 \pm 10.47)/份$ ， $P = 0.873$ 。用传统方法和新方法计算出的全血红细胞水平分别为 $(4.620 \pm 0.505) \times 10^{12}/L$ 和 $(4.621 \pm 0.495) \times 10^{12}/L$ ，然后再对比标准参考值的红细胞水平 $(4.620 \pm 0.492) \times 10^{12}/L$ ，两种方法比较差异无统计学意义 ($P = 0.969, 0.915$)，表明两种方法测得的数据具有可比性。

2.2 压线红细胞分布的特殊性 虽然压线红细胞在左上边和右下边分布数目的平均值相当，但在个例中，分布的均匀性仍不一致。典型标本中央中方格压线红细胞分布，压线细胞在左上线和右下线各分布 12 个、13 个，见图 1；典型标本右下角中方格压线红细胞分布，压线细胞在左上线和右下线各分布 13 个、22 个，见图 2。

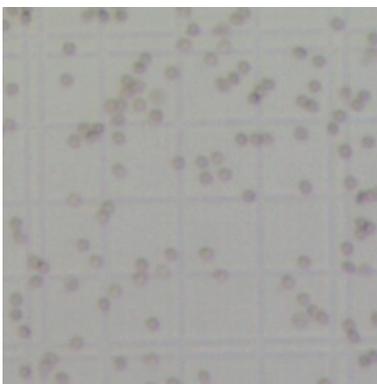


图 1 典型标本中央中方格压线红细胞分布

2.3 两种方法下对红细胞计数结果误差频数比较 与传统方法相比，新计数方法在控制误差方面，不具备明显优势。两种方法下对红细胞计数结果进行误差分析的频数比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 1。

2.4 两种方法下红细胞计数结果与标准值差异的平均值和配对样本 t 检验比较 在总有效样本组和低误差样本组中，新方

法计数值与标准值的误差明显小于传统方法计数值与标准值的误差，二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 2。

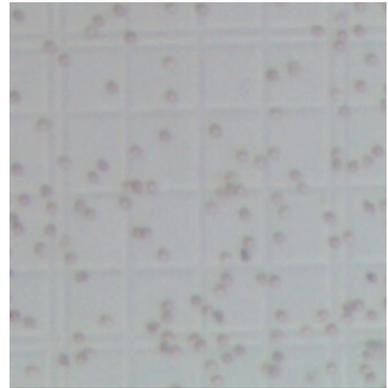


图 2 典型标本右下角中方格压线红细胞分布

表 1 各组样本在两种方法下对红细胞计数结果误差较小的频数比较 [$n(\%)$]

组别	<i>n</i>	传统方法	新方法	误差相等	χ^2	<i>P</i>
总有效样本组	109	40(36.70)	57(52.29)	12(11.01)	1.340	0.247
低误差样本组	56	20(35.71)	29(51.78)	7(12.50)	0.709	0.400
高误差样本组	53	20(37.74)	28(52.83)	5(9.43)	0.596	0.440

表 2 两种方法下对红细胞计数结果与标准值差异的平均值比较 ($\bar{x} \pm s, \times 10^{12}/L$)

组别	<i>n</i>	传统方法	新方法	<i>t</i>	<i>P</i>
总有效样本组	109	0.079 \pm 0.006	0.071 \pm 0.005	2.768	0.007
低误差样本组	56	0.035 \pm 0.003	0.029 \pm 0.003	2.242	0.029
高误差样本组	53	0.125 \pm 0.006	0.115 \pm 0.006	1.881	0.066

2.5 两种方法下红细胞计数结果与标准值的 Pearson 相关性检验 在 3 组样本中，两种方法的计数结果与标准值都具有极高的正相关性 ($r > 0.95, P < 0.01$)。3 组新方法计数结果与标准值的相关性均高于传统方法计数结果与标准值的相关性 (表 3)，表明新方法计数的结果更具可靠性。

表 3 各组样本在两种方法下红细胞计数结果与标准值的相关性分析

组别	<i>n</i>	传统方法 <i>r</i>	新方法 <i>r</i>	<i>P</i>
总有效样本组	109	0.981	0.984	0.000
低误差样本组	56	0.996	0.997	0.000
高误差样本组	53	0.963	0.967	0.000

3 讨 论

随着医学科技水平的不断提高，各类全自动细胞计数仪相继投入到临床检验的应用中。以尿沉渣检查为例，传统的显微镜检查已经逐步被高效、快捷的尿沉渣分析仪取代^[2]。然而，近年来已有较多来自临床的报道证实尿沉渣分析仪对某些成分不能做出正确的判断，以致医师做出错误的结论^[3]。运用仪器对脑脊液成分分析也是如此。2009 年张庆芳^[4]报道，直接用 Sysmex XS-500i 对脑脊液细胞进行计数，结果把很多有形成分直接视为白细胞，最终使有核细胞计数出现较大误差。其原因是该仪器对非血液样本中的特殊成分识别能力不足^[5]。

临床上,精准的定量报告有助于动态观察疾病的发展和治^[6]。目前,利用手工法在显微镜下对细胞和特殊成分来计数依然是最可靠的检查手段,也是最重要的参考方法^[7]。

牛鲍氏计数板是一种用玻璃制成的特殊测定工具,主要用于对体液细胞和微生物进行计数,需与显微镜配合使用,操作技术要求较高^[8]。与各种全自动细胞计数仪相比,牛鲍氏计数板的测量原理更为科学,所以临床上用其计数结果来为仪器的校准提供参考依据。牛鲍氏计数板的计数误差主要来自于操作误差和固有误差:当中由于取样不合理、器材使用不当、稀释倍数不准确、细胞识别错误等因素所形成的误差属于操作误差;而由于计数板、盖玻片、血红蛋白吸管不够精准引起的误差称仪器误差,由于细胞在计数板内分布不均而带来的误差称分布误差,仪器误差和分布误差统称为固有误差^[9]。操作误差和仪器误差一般可以由提高实验者的技术熟练程度和规范操作流程来避免,但细胞分布误差却难以消除^[9]。2004 年 Douglas 等^[10-11]报道:由于受流体动力学的作用,较大分布误差明显存在于低深度的计数池中,而这种现象不存在于计数池深度为 100 μL 的计数池中;由于受毛细现象的牵制,低深度的计数池还可能会给出偏低的细胞计数结果^[12]。目前国际上通用计数池深度为 100 μL 的牛鲍氏计数板,压线细胞的处理是计数过程中的重要环节,传统方法要求对其按照“数上不数下,数左不数右”的原则来计算,但实践操作中,测试者会发现在许多计数方格的 4 条边线上各自分布的压线细胞数目有显著差异,因此这样计数可能会引入较大分布误差。

本研究发现在总有效样本中,新方法计数误差的平均值明显低于传统方法计数误差的平均值,且相似的情况也存在于低误差样本组中。另外,在 3 组样本中,两种方法的计数结果与标准值都具有显著且极高的正相关性;而且所有用新方法计数的结果与标准值的相关性均高于同组;中用传统方法计数的结果与标准值的相关性。以上数据均说明新方法计算出的结果更具可靠性。本研究还发现,52.29% 的样本用新方法计数结果更准确,36.70% 的样本用传统方法计数结果更准确,11.01% 的样本用两种方法计数引出的误差相同,但经过 χ^2 检验后确认该百分比的差异无统计学意义($P>0.5$)。

本研究选用自动化分析仪对全血样本中红细胞水平进行定标的操作在理论上存在一定争议,毕竟仪器的计数结果不是“金标准”。采用这种定标方法也源于本实验目的的特殊性是比较牛鲍氏计数板的两种计数方法,故参考值需要通过非手工计数方法来获取。本研究选用红细胞作为计数对象是基于两点考虑:(1)在血液成分中,红细胞寿命较长;(2)自动化分析仪对红细胞计数的准确性相对较高。尽管如此,红细胞特殊的延展性决定了它的平均体积会随着存放时间的延长而逐渐增大,细胞稳定性随之降低^[13]。所以本实验中的测试者在较短时间内完成了每份样本的仪器法定标和手工法计数,还多次用原装血液学质控品来监测仪器的计数过程,以确保其结果的可信度。

综上所述,新方法的引入在减小牛鲍氏计数板对细胞计数的误差方面可能有一定的作用。从计数池的显微结构上看,计数方格的 4 条外边是划分方格内、外区域的界线,故分布于 4 边上的压线细胞约 1/2 的概率是属于计数方格内的细胞,所以

采用新方法来计数在理论上也更具合理性。但从另一方面来看,对 4 条边都进行计数势必会增加测试者的工作量,并相继延长计数时间,且参照本研究的统计数据,虽然用两种方法计数出的结果对比标准值的偏差有显著的不同,但是两种方法计数出的结果值并无明显差异。因而作为测试者,需要根据实验的要求来灵活选择计数方法,或者在时间相对充裕的条件下联合运用两种方法来判断细胞分布的均匀性。目前,国内外鲜有针对压线细胞的分布不均引起计数误差的报道和研究,而本实验又受时间、条件等因素的限制难以对两种计数方法的优劣性作出全面的评价,故阐明其中的奥秘仍有待时机。将来,还需要开展更多关于控制牛鲍氏计数板中细胞分布误差的方法研究,并从实验对象和参考标准的选择开始就周密布控、逐步斟酌,相信最终能探索出更有效、更快捷的控制分布误差的计数方法。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:126-127.
- [2] 曹晓君.两种尿沉渣分析仪在临床上的应用评价[J].中国医药科学,2014,4(6):139-141.
- [3] 刘沛.尿液分析中尿沉渣镜检的作用[J].中外医疗,2012,31(12):44-44.
- [4] 张庆芳.UF-1000i全自动尿沉渣分析仪在胸腹水检查中的应用[J].中国实用医药,2009,4(33):34-35.
- [5] 白雪丽.XT-4000i多功能全自动血细胞分析仪在体液细胞检测中与手工法的应用比较[J].中国医疗设备,2012,27(1):75-76.
- [6] 丛玉隆.自动化仪器检查尿有形成分的问题与思考[J].实用医院临床杂志,2012,9(3):1-3.
- [7] 全国卫生专业技术资格考试专家委员会.临床医学检验与技术[M].北京:人民卫生出版社,2010:71.
- [8] 刘家文.提高血球计数板使用实训教学效果的途径探析[J].魅力中国,2009,89(25):146-145.
- [9] 周东明.血球计数板的使用及相关计算[J].新高考:高三理化生,2013(4):61-64.
- [10] Douglas-Hamilton DH,Smith NG,Kuster CE,et al. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration[J]. J Androl,2004,26(1):115-122.
- [11] Douglas-Hamilton DH,Smith NG,Kuster CE,et al. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers [J]. J Androl,2004,26(1):107-114.
- [12] Kirkman-Brown J,Björndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis [J]. Fertil Steril,2009,91(2):627-631.
- [13] 秦光蓉.血细胞分析仪在全血细胞计数中一次严重失误的报道[J].重庆医学,2002,31(6):472-472.

(收稿日期:2015-07-31 修回日期:2015-10-13)