

# 显微镜视场数对血涂片细胞计数影响的研究

杨丽妙<sup>1</sup>, 杨洪乐<sup>1\*</sup>, 郝丽颖<sup>2</sup>, 张曼娜<sup>1</sup>, 杜欢欢<sup>1</sup>, 胡蕊<sup>1</sup>

(1.河北医科大学第二医院检验科,河北石家庄 050000;2.河北省文安县妇幼保健院检验科,河北文安 065000)

**[摘要]** **目的** 通过研究显微镜的光学技术参数视场数对显微镜下手工计数血涂片内白细胞计数和血小板计数的影响,规范显微镜用于细胞计数的参数和方法。**方法** 分别使用全自动血细胞分析仪法、改良牛鲍计数板法和血涂片法3种方法对300例外周血标本进行白细胞和血小板计数,其中血涂片法分别使用视场数为20和26.5的显微镜进行计数,对结果进行比较分析和细胞估算。**结果** 对视场数为20的显微镜每油镜视野下血小板计数和白细胞计数均低于视场数为26.5的显微镜,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。视场数为20的显微镜估算的白细胞计数正常值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,视场数为26.5的显微镜估算的白细胞计数正常值、低值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。R=10时,视场数为20的显微镜估算的血小板计数正常值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,视场数为26.5的显微镜估算的血小板计数正常值、低值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。R=15时,视场数为20和视场数为26.5的显微镜估算的血小板计数正常值、低值和高值均高于全自动血液分析仪法及改良牛鲍计数板,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。视场数为20和26.5的显微镜使用血小板估算公式时,与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板比较,3种浓度标本差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 不同视场数的显微镜对计数白细胞和血小板有影响;视场数为20的显微镜在R=10、视场数为26.5的显微镜在R=7.33时对低值标本的血小板计数具有参考意义;视场数为20的显微镜在低值标本的白细胞计数时具有参考意义;对于两种视场数的显微镜来说,血小板估算公式适用于低值、正常值、高值标本的血小板计数。

**[关键词]** 白细胞计数;血小板计数;显微镜检查 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.04.019

**[中图分类号]** R446.113 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)04-0477-08

## Study on the effect of microscopic field of view number on cell counting in blood smear

YANG Li-miao<sup>1</sup>, YANG Hong-le<sup>1\*</sup>, HAO Li-ying<sup>2</sup>,

ZHANG Man-na<sup>1</sup>, DU Huan-huan<sup>1</sup>, HU Rui<sup>1</sup>

(1.Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Province, Shijiazhuang 050000, China; 2.Department of Clinical Laboratory, Maternity and Child-Care Hospital of Wen'an County, Hebei Province, Wen'an 065000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of number of microscope field of view on the manual counting of white blood cells (WBC) and platelets in the blood smear, and to standardize the parameters and methods used in microscopy for cell counting. **Methods** The WBC and platelets of 300 peripheral blood samples were calculated by three different methods: automatic hematology analyzer (AHA) method, neubauer hemocytometer and blood smear method. The WBC and platelets were calculated by microscope with field of view of 20 and 26.5 respectively, and the results were collected for comparison and cell estimation. **Results** The platelet count per

[收稿日期]2023-04-18

[基金项目]河北省医学科学研究课题计划(20230661)

[作者简介]杨丽妙(1980-),女,河北栾城人,河北医科大学第二医院主管检验师,医学硕士,从事临床检验基础、激素研究和教学研究。

\* 通信作者。E-mail:yinxiang95@126.com

every oil field of view of the microscope and WBC count with a field of view of 20 were lower than those of the microscope with a field of view of 26.5, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The normal and high values of the WBC count estimated by a microscope with a field of view of 20 were lower than those of AHA and neubauer hemocytometer. The normal, low and high values of the WBC count estimated by a microscope with a field of view of 26.5 were lower than those of AHA and neubauer hemocytometer, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). When  $R=10$ , the normal and high values of platelet count estimated by a microscope with a field of view of 20 were lower than those of AHA and neubauer hemocytometer. The normal and high and low values of platelet count estimated by a microscope with a field of view of 26.5 were lower than those of AHA and neubauer hemocytometer, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). When  $R=15$ , the normal value, low value and high value of platelet count estimated by the microscope with field number of 20 and field of view 26.5 were higher than those of AHA and neubauer hemocytometer, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). When using the platelet estimation formula for microscopes with fields of view of 20 and 26.5, compared with AHA and neubauer hemocytometer, there was no significant difference in the three concentrations of specimens ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Different field of view microscopy has an effect on the counting of WBC and platelets. The microscope with 20 field of view has reference significance for the platelet count of low value specimens when  $R=10$  and the microscope with 26.5 field of view when  $R=7.33$ . The microscope with 20 field of view has reference significance for WBC counting in low value specimens. The platelet estimation formula is applicable to the counting of low, normal and high value samples for microscopes with two different field of view.

**[Key words]** white blood cell count; platelet count; microscopy

血常规一般为临床诊断和治疗疾病期间必查的项目之一,它可以反映多种疾病及病情进展情况,对于血液系统疾病及造血能力评价有重要意义<sup>[1]</sup>。血常规检测的过程中白细胞和血小板异常标本常需要进行复检,其复检方法一般包括改良牛鲍计数板计数、血涂片观察和计数、性状观察、更换仪器反复检测等。显微镜也被多种方法采用,全国临床检验操作规程规定血细胞分类计数采用显微镜计数法为“金标准”<sup>[2]</sup>。但在复检的过程中,对显微镜的选用也是极其重要的,显微镜的参数(目镜、物镜放大倍数、视场直径及视场数)选择不一样,其结果就不一样<sup>[3]</sup>。在此基础上,探讨了显微镜光学技术参数视场数在白细胞及血小板手工计数中的作用及对检验结果的影响。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2021 年 11 月—2022 年 5 月于河北医科大学第二医院检验科门诊临检组进行血常规检测后的 300 例患者的血液标本及涂片。纳入标准:按照行标 WS/T405 选取白细胞和血小板均低于参考区间(白细胞  $< 3.5 \times 10^9/L$ 、血小板  $<$

$125 \times 10^9/L$ )、白细胞和血小板均处在正常值(白细胞在  $3.5 \times 10^9/L \sim 9.5 \times 10^9/L$  之间、血小板在  $125 \times 10^9/L \sim 350 \times 10^9/L$  之间)、白细胞和血小板均高于正常值(白细胞  $> 9.5 \times 10^9/L$ 、血小板  $> 350 \times 10^9/L$ )的血液标本各 100 例。排除标准:发生血小板聚集、标本凝集、脂血、冷凝集、黄疸以及提示仪器异常报警的血液标本。研究中标本为患者检测出具报告后使用。

本研究经医院伦理委员会审批通过。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂与耗材** 白细胞稀释液<sup>[4]</sup>,血小板稀释液<sup>[5]</sup>,瑞氏—姬姆萨染色液,贝克曼库尔特原厂试剂、质控品、校准物;目镜(10 $\times$ ),高倍镜(40 $\times$ ),油镜(100 $\times$ )的 OLYMPUS BX43(视场数为 20)、BX70 显微镜(视场数为 26.5);贝克曼库尔特 UniCel DxH 800 Coulter 血液分析仪、改良牛鲍计数板。

**1.2.2 白细胞计数方法** ①使用贝克曼库尔特 UniCel DxH 800 Coulter 血液分析仪进行白细胞计数,记录相关数据(日期,编号,白细胞数量等)。②采用改良牛鲍计数板计数白细胞,取门诊检测血常

规完毕后的新鲜乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝全血 20  $\mu\text{L}$ , 用微量吸管加入到 380  $\mu\text{L}$  的白细胞稀释液中混匀, 待完全溶血后再次混匀 1 min, 室温静置 10 min, 取一滴白细胞悬液充入计数池中, 避免产生气泡, 室温静置 3 min, 在显微镜低倍镜下计数四角四个大方格内的白细胞数, 利用公式: 白细胞数/L = 四个大方格内白细胞数/4  $\times 10 \times 20 \times 10^6$ 。公式中: /4 表示平均一个大方格的白细胞数;  $\times 10$  表示换算成 1  $\mu\text{L}$  血液;  $\times 20$  表示稀释倍数;  $\times 10^6$  表示换算成 1 L 血液。记录所得的白细胞数量。③采用视场数为 20 以及 26.5 的显微镜分别计数血涂片内红细胞均匀分布的 30 个高倍镜视野下的白细胞范围(用 X~XX 表达)和每个视野下的白细胞均值, 记录结果, 再根据公式算出白细胞估算值(公式为 30 个高倍镜视野下白细胞均值  $\times 2$ )<sup>[6]</sup>。

1.2.3 血小板计数方法 分别用全自动血液分析仪法、改良牛鲍计数板法以及血涂片法对 300 例 EDTA 抗凝全血标本的血小板和白细胞进行计数。其中血涂片法采用 2 种不同视场数显微镜进行计数, 整个操作过程严格遵循《全国临床检验操作规程》第 4 版<sup>[7]</sup>。

①使用贝克曼库尔特 UniCel DxH 800 Coulter 血液分析仪进行血小板计数, 记录相关数据(日期, 编号, 血小板数量等)。

②采用改良牛鲍计数板法计数血小板<sup>[8]</sup>, 取门诊已检测血常规完毕的 EDTA 抗凝混匀后的全血标本 20  $\mu\text{L}$  加入到 380  $\mu\text{L}$  的血小板稀释液中, 充分混匀 1 min, 室温静置 10 min 后, 再次充分混匀后取一滴悬液, 充入改良牛鲍计数板的计数池中, 充池过程中一定要避免产生气泡, 在室温下静置 10~15 min 后, 在高倍镜下依次计数中央大方格内的四角和中央共五个中方格内血小板的数量。然后利用公式: 血小板数/L = 5 个中方格内血小板数  $\times 5 \times 10 \times 20 \times 10^6$  来计算血小板的数量。式中:  $\times 5$  表示将五个中方格换算成一个大方格;  $\times 10$  表示换算成 1  $\mu\text{L}$  血液;  $\times 20$  表示稀释倍数;  $\times 10^6$  表示换算成 1 L 血液。

③采用视场数为 20 和 26.5 的两种显微镜分别计数血涂片内红细胞均匀分布的 30 个油镜视野下的血小板范围(用 X~XX 表达)和每个视野下的血小板均值, 得到血小板数量并记录, 再乘以 R 系数后得到血小板最终数值(单位:  $10^9/\text{L}$ ) (公式为 30 个油镜视野下血小板均值  $\times R$ , ①  $R = 10^{[9]}$ ; ②  $R = 15^{[10-11]}$ )。

④通过计数红细胞的方法估算血小板的数量<sup>[12-13]</sup>。找到血涂片中红细胞平均分布且细胞间无重叠的区域, 采用视场数为 20 和 26.5 的显微镜分别计数 30 个油镜视野下红细胞均值, 通过观察镜下血小板和红细胞的比例, 利用仪器检测的红细胞数估算血小板数。最后利用计算公式: 血小板估算数目( $\times 10^9/\text{L}$ ) = 30 个视野血小板平均数/30 个视野红细胞平均数  $\times$  全自动血液分析仪计数红细胞数目( $\times 10^{12}/\text{L}$ ) 估算血小板数量。

1.2.4 质控方法 检验前, 全自动血液分析仪按照日常保养、维修、室内质控的常规操作方法, 使用配套的质控品进行常规室内质量控制, 其本底计数正常, 低、中、高 3 个水平室内质控标本结果均在控后再进行标本检测。300 个 EDTA 抗凝全血标本按仪器说明书要求操作, 均在 2 h 内检测完毕。

改良牛鲍计数板法以及血涂片法计数前, 均选取五个标本, 在实验人员之间进行人人比对, 且整个过程严格按照《全国临床检验第四版操作规程》第 4 版操作。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 21.0 统计软件分析数据。非正态分布的计量资料比较采用秩和检验, 相关性分析采用 Pearson 分析方法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 2 种视场数显微镜白细胞计数比较 视场数为 20 的显微镜每高倍镜视野下白细胞计数的正常值、低值和高值均低于视场数为 26.5 的显微镜, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 视场数为 20 和 26.5 的显微镜每高倍镜视野下白细胞计数比较

Table 1 Comparison of white blood cell count per every high power field of view of the microscope with a field of view of 20 and 26.5

| [n = 100, M(QR), $\times 10^9/\text{L}$ ] |            |            |            |
|---|------------|------------|------------|
| 视场数                                       | 白细胞计数      |            |            |
|   | 正常值        | 低值         | 高值         |
| 20  | 2.10(0.30) | 1.40(0.20) | 4.40(0.94) |
| 26.5                                      | 4.56(0.57) | 2.00(0.40) | 6.70(1.24) |
| U 值                                       | 12.054     | 9.963      | 8.816      |
| P 值                                       | <0.001     | <0.001     | <0.001     |

2.2 2 种视场数显微镜血小板计数比较 视场数为 20 的显微镜每高倍镜视野下血小板计数的正常值、低值和高值均低于视场数为 26.5 的显微镜, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表2 视场数为20和26.5的显微镜每高倍镜视野下血小板计数比较

Table 2 Comparison of platelet number per every high power field of view of the microscope with a field of view of 20 and 26.5

| 视场数        | 血小板计数<br>[ $n=100, M(QR), \times 10^9/L$ ] |             |              |
|------------|--|-------------|--------------|
|            | 正常值  | 低值          | 高值           |
| 20         | 18.20(2.15)                                | 7.73(2.69)  | 34.13(6.50)  |
| 26.5       | 36.66(5.69)                                | 11.48(2.48) | 62.10(11.63) |
| <i>U</i> 值 | 12.129                                     | 4.966       | 11.830       |
| <i>P</i> 值 | <0.001                                     | <0.001      | <0.001       |

2.3 2种视场数显微镜估算的白细胞计数与全自动血液分析仪法及改良牛鲍计数板法比较 视场数为20的显微镜估算的白细胞计数正常值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,视场数为26.5的显微镜估算的白细胞计数正常值、低值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表3,4。相关性分析结果显示,视场数为20的显微镜与全自动血液分析仪的正常值、低值、高值的相关系数分别为0.734、0.774、0.732,与改良牛鲍计数板的正常值、低值、高值的相关系数分别为0.622、0.728、0.715。视场数为26.5的显微镜与全自动血液分析仪的正常值、低值、高值的相关系数分别为0.740、0.722、0.778,与改良牛鲍计数板的正常值、低值、高值的相关系数分别为0.684、0.689、0.771,相关性一般。见表5。

5 两种视场数的显微镜估算的白细胞计数与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板的分析结果(相关性分析)

Table 5 Results of estimated white blood cell count using a microscope with two different field of view and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer (correlation analysis)

| 显微镜估算    | 全自动血液分析仪   |            |            |            |            |            |
|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|          | 正常值        |            | 低值         |            | 高值         |            |
|          | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 视场数为20   | 0.734      | <0.001     | 0.774      | <0.001     | 0.732      | <0.001     |
| 视场数为26.5 | 0.740      | <0.001     | 0.722      | <0.001     | 0.778      | <0.001     |
| 显微镜估算    | 改良牛鲍计数板    |            |            |            |            |            |
|          | 正常值        |            | 低值         |            | 高值         |            |
|          | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 | <i>r</i> 值 | <i>P</i> 值 |
| 视场数为20   | 0.622      | <0.001     | 0.728      | <0.001     | 0.715      | <0.001     |
| 视场数为26.5 | 0.684      | <0.001     | 0.689      | <0.001     | 0.771      | <0.001     |

2.4 2种视场数显微镜估算的血小板计数与全自动血液分析仪法及改良牛鲍计数板法比较  $R=10$ 时,视场数为20的显微镜估算的血小板计数正常值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,视场数为26.5的显微镜估算的血小板计数正常值、低值和高值均低于全自动血液分析仪和改良牛鲍计数板,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表6,7。 $R=15$ 时,视场数为20和视场数为26.5的显微镜

表3 视场数为20的显微镜估算的白细胞计数与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板结果比较

Table 3 Comparison of estimated white blood cell count using a microscope with a field of view of 20 and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

| 视场数20      | 白细胞数<br>[ $n=100, M(QR), \times 10^9/L$ ] |            |               |
|------------|---|------------|---------------|
|            | 正常值                                       | 低值         | 高值            |
| 显微镜估值      | 4.20(0.80)                                | 2.80(0.80) | 8.80(3.07)    |
| 全自动血液分析仪   | 5.90(1.88) *                              | 2.90(0.90) | 11.55(3.20) * |
| 改良牛鲍计数板    | 6.20(1.98) *                              | 2.90(0.69) | 11.65(2.91) * |
| <i>H</i> 值 | 119.506                                   | 0.383      | 83.299        |
| <i>P</i> 值 | <0.001                                    | 0.826      | <0.001        |

\* *P* 值<0.05 与显微镜估值比较(秩和检验)

表4 视场数为26.5的显微镜估算的白细胞计数与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板结果比较

Table 4 Comparison of estimated white blood cell count estimated by a microscope with a field of view of 26.5 and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

| 视场数26.5    | 白细胞数<br>[ $n=100, M(QR), \times 10^9/L$ ] |              |               |
|------------|---|--------------|---------------|
|            | 正常值                                       | 低值           | 高值            |
| 显微镜估值      | 9.12(2.26)                                | 4.00(1.29)   | 13.40(4.55)   |
| 全自动血液分析仪   | 5.90(1.88) *                              | 2.90(0.90) * | 11.55(3.20) * |
| 改良牛鲍计数板    | 6.20(1.98) *                              | 2.90(0.69) * | 11.65(2.91) * |
| <i>H</i> 值 | 140.962                                   | 143.081      | 16.233        |
| <i>P</i> 值 | <0.001                                    | <0.001       | <0.001        |

\* *P* 值<0.05 与显微镜估值比较(秩和检验)

估算的血小板计数正常值、低值和高值均高于全自动血液分析仪法及改良牛鲍计数板,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表8,9。相关性分析结果显示,20视场数的显微镜与全自动血液分析仪的正常值、低值、高值的相关系数分别为0.840、0.831、0.787,与改良牛鲍计数板的正常值、低值、高值的相关系数分别为0.853、0.821、0.803。26.5视场数的显微镜与全自动血液分析仪的正常值、低值、高值的相关系

数分别为 0.831、0.860、0.810，与改良牛鲍计数板的正常值、低值、高值的相关系数分别为 0.833、0.850、0.822，相关性良好。见表 10。

表 6 视场数为 20 的显微镜估算的血小板计数 (R=10) 与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板结果比较

Table 6 Comparison of estimated platelet count using a microscope with a field of view of 20 (R=10) and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

[n=100, M(QR), ×10<sup>9</sup>/L]

| 视场数为 20<br>(R=10) | 血小板计数          |              |                |
|-------------------|----------------|--------------|----------------|
|                   | 正常值            | 低值           | 高值             |
| 显微镜估值             | 182.00(43.50)  | 77.25(58.13) | 339.00(112.00) |
| 全自动血液分析仪          | 216.50(69.25)* | 85.00(52.00) | 402.00(89.50)* |
| 改良牛鲍计数板           | 209.50(65.00)* | 83.50(51.50) | 407.50(83.25)* |
| H 值               | 40.259         | 0.462        | 40.169         |
| P 值               | <0.001         | 0.794        | <0.001         |

\* P 值<0.05 与显微镜估值比较(秩和检验)

表 7 视场数为 26.5 的显微镜估算的血小板计数 (R=10) 与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板结果比较

Table 7 Comparison of estimated platelet count using a microscope with a field of view of 26.5 (R=10) and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

[n=100, M(QR), ×10<sup>9</sup>/L]

| 视场数为 26.5<br>(R=10) | 血小板计数          |               |                |
|---------------------|----------------|---------------|----------------|
|                     | 正常值            | 低值            | 高值             |
| 显微镜估值               | 366.59(106.68) | 114.75(69.00) | 613.50(204.00) |
| 全自动血液分析仪            | 216.50(69.25)* | 85.00(52.00)* | 402.00(89.50)* |
| 改良牛鲍计数板             | 209.50(65.00)* | 83.50(51.50)* | 407.50(83.25)* |
| H 值                 | 167.749        | 29.799        | 106.951        |
| P 值                 | <0.001         | <0.001        | <0.001         |

\* P 值<0.05 与显微镜估值比较(秩和检验)

表 8 视场数为 20 的显微镜估算的血小板计数 (R=15) 与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板结果比较

Table 8 Comparison of estimated platelet count using a microscope with a field of view of 20 (R=15) and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

[n=100, M(QR), ×10<sup>9</sup>/L]

| 视场数为 20<br>(R=15) | 血小板计数          |               |                |
|-------------------|----------------|---------------|----------------|
|                   | 正常值            | 低值            | 高值             |
| 显微镜估值             | 273.00(65.30)  | 115.88(87.19) | 508.50(168.00) |
| 全自动血液分析仪          | 216.50(69.25)* | 85.00(52.00)* | 402.00(89.50)* |
| 改良牛鲍计数板           | 209.50(65.00)* | 83.50(51.50)* | 407.50(83.25)* |
| H 值               | 62.694         | 36.312        | 53.064         |
| P 值               | <0.001         | <0.001        | <0.001         |

\* P 值<0.05 与显微镜估值比较(秩和检验)

表 9 视场数为 26.5 的显微镜估算的血小板计数 (R=15) 与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板结果比较

Table 9 Comparison of estimated platelet count using a microscope with a field of view of 26.5 (R=15) and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

[n=100, M(QR), ×10<sup>9</sup>/L]

| 视场数 26.5<br>(R=15) | 血小板计数          |                |                |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|
|                    | 正常值            | 低值             | 高值             |
| 显微镜估值              | 549.89(160.03) | 172.13(103.50) | 920.25(306.00) |
| 全自动血液分析仪           | 216.50(69.25)* | 85.00(52.00)*  | 402.00(89.50)* |
| 改良牛鲍计数板            | 209.50(65.00)* | 83.50(51.50)*  | 407.50(83.25)* |
| H 值                | 199.388        | 100.951        | 128.919        |
| P 值                | <0.001         | <0.001         | <0.001         |

\* P 值<0.05 与显微镜估值比较(秩和检验)

2.5 血小板估算公式得到的血小板计数与全自动血液分析仪法与改良牛鲍计数板法结果比较 视场数为 20 和视场数为 26.5 的显微镜通过血小板估算公式得到的血小板计数与全自动血液分析仪法和改良牛鲍计数板法比较差异无统计学意义 (P>0.05)。见表 11,12。

表 10 两种视场数的显微镜估算血小板数与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板相关性分析

Table 10 Comparison of estimated platelet count using a microscope with two different field of view and analysis results of automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer (correlation analysis)

| 显微镜估算     | 全自动血液分析仪 |        |       |        |       |        |
|-----------|----------|--------|-------|--------|-------|--------|
|           | 正常值      |        | 低值    |        | 高值    |        |
|           | r 值      | P 值    | r 值   | P 值    | r 值   | P 值    |
| 视场数为 20   | 0.840    | <0.001 | 0.831 | <0.001 | 0.787 | <0.001 |
| 视场数为 26.5 | 0.831    | <0.001 | 0.860 | <0.001 | 0.810 | <0.001 |
| 显微镜估算     | 改良牛鲍计数板  |        |       |        |       |        |
|           | 正常值      |        | 低值    |        | 高值    |        |
|           | r 值      | P 值    | r 值   | P 值    | r 值   | P 值    |
| 视场数为 20   | 0.853    | <0.001 | 0.821 | <0.001 | 0.803 | <0.001 |
| 视场数为 26.5 | 0.833    | <0.001 | 0.850 | <0.001 | 0.822 | <0.001 |

表 11 血小板估算公式(视场数为 20 的显微镜)得到的血小板计数与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板比较

Table 11 Comparison of platelet count results based on platelet estimation formula(a microscope with a field of view of 20) and analysis results using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer (rank sum test)

[n = 100, M(QR), × 10<sup>9</sup>/L]

| 视场数 20   | 血小板计数         |              |               |
|----------|---------------|--------------|---------------|
|          | 正常值           | 低值           | 高值            |
| 血小板估算值   | 208.23(57.35) | 81.68(57.31) | 402.27(81.14) |
| 全自动血液分析仪 | 216.50(69.25) | 85.00(52.00) | 402.00(89.50) |
| 改良牛鲍计数板  | 209.50(65.00) | 83.50(51.50) | 407.50(83.25) |
| H 值      | 0.879         | 0.034        | 0.047         |
| P 值      | 0.644         | 0.983        | 0.977         |

### 3 讨 论

血常规检验是临床常见的检查项目之一,主要是对血液细胞数量和血液细胞形态等进行检验<sup>[14]</sup>,其检验结果是血液系统疾病主要的诊断依据,同时也是鉴别诊断其他系统疾病的重要依据。随着科学技术的不断发展进步,全自动血液分析仪因其快速便捷的特点已经在临床上被广泛应用<sup>[15]</sup>。但在一些指标异常增高、降低或仪器有异常信息提示,特别是白细胞与血小板数量异常时,仍需要人工复检。复检的方式有多种,如一次性或改良牛鲍计数板计数、制作血涂片观察形态和计数、稀释计数、更换仪器重新检测等,张蕾等<sup>[16]</sup>认为可以采取多种方式相结合的方法进行复检,但目前,临床常用的复检方法为血涂片法,即结合显微镜对异常的细胞进行准确判断,以提高结果的准确性<sup>[16-18]</sup>。结合荧光染色法也可使得血小板复检得到较准确的结果<sup>[19]</sup>,但是此技术只在部分仪器上具备,不适合在检验机构常规开展。在血常规的复检过程中,显微镜是重要的工具,属于每一个实验室必备设备。但显微镜也不尽相同,不同品牌、不同参数对结果都会有影响。本文研究对象即为显微镜的参数之一:视场数。

表 12 血小板估算公式(视场数为 26.5 的显微镜)得到的血小板计数与全自动血液分析仪及改良牛鲍计数板比较

Table 12 Comparison of platelet count results based on platelet estimation formula(a microscope with a field of view of) and result analysis using automated hematology analyzer and neubauer hemocytometer

[n = 100, M(QR), × 10<sup>9</sup>/L]

| 视场数为 26.5 | 血小板计数         |              |                |
|-----------|---------------|--------------|----------------|
|           | 正常值           | 低值           | 高值             |
| 血小板估算值    | 224.00(66.56) | 86.00(48.75) | 405.66(107.13) |
| 全自动血液分析仪  | 216.50(69.25) | 85.00(52.00) | 402.00(89.50)  |
| 改良牛鲍计数板   | 209.50(65.00) | 83.50(51.50) | 407.50(83.25)  |
| H 值       | 2.610         | 0.232        | 0.491          |
| P 值       | 0.271         | 0.890        | 0.782          |

视场数即在中间像平面上测量出来的以毫米为单位的视场直径<sup>[20]</sup>。视场数是各个显微镜制造厂给出的参数,一般会标刻在显微镜目镜筒外表面。不同类型的目镜,其视场数不同,倍率高的目镜,视场数小。目镜和物镜共同形成的视野大小最后由目镜决定,也就是视场数大小。对于同一个物镜而言,目镜视场数越大,其视野越大,视场数越小,其视野就越小<sup>[21]</sup>。

2.6 2种视场数显微镜计数白细胞与血小板的范围 视场数为 20 的显微镜每油镜视野下计数血小板的范围(表达方式最低值~最高值)低值、正常值、高值分别为 1~16、9~27、24~64,每高倍镜视野下计数白细胞的范围低值、正常值、高值分别为 0~4、0~6、0~9;视场数为 26.5 的显微镜每油镜视野下计数血小板的范围低值、正常值、高值分别为 3~27、27~51、38~110,每高倍镜视野下计数白细胞的范围低值、正常值、高值分别为 0~5、0~6、0~19。

2.7 视场数为 20 和 26.5 显微镜计数血小板计数的换算系数 当使用视场数为 20 的显微镜时,血小板计数为正常范围时,建议的 R 值为 12.187;血小板计数为低值范围时,建议的 R 值为 10;血小板计数为高值范围时,建议的 R 值为 12。当使用视场数为 26.5 的显微镜时,血小板计数为正常范围时,建议的 R 值为 6.020;血小板计数为低值范围时,建议的 R 值为 7.330;当血小板计数为高值范围时,建议的 R 值为 6.550。

视场数会影响血涂片细胞计算结果,主要是由于视野的大小对细胞测算数量产生影响。根据本文试验数据的分析可以看到,不同视场数的显微镜计数白细胞以及血小板的结果差异有统计学意义。对于同一个物镜而言,目镜视场数越大,平均每视野所计数的细胞越多,范围越大。本研究采用全自动血液分析仪法、改良牛鲍计数板法以及血涂片法对白细胞和血小板的低值、正常值和高值各 100 例 EDTA 抗凝全血标本进行计数,其中 2 种视场数显微镜的血涂片细胞估算结果与改良牛鲍计数板法和全自动血液分析仪法相关性中白细胞相关性一般,在 0.7 左右。血小板相关性一致性良好,相关系数均在 0.8 以上。但血涂片法中 2 个视场数的显微镜在计数血小板与白细胞时结果差异均有统计学意义(P < 0.01),使得显微镜的视场数对血涂片法中白

细胞和血小板的计数结果差异有统计学意义。

在白细胞血涂片计数中,采用白细胞估算方法(30个高倍镜视野下白细胞均值 $\times 2$ ),实验结果显示,2台显微镜估算出的白细胞值与仪器和改良牛鲍计数板计数的白细胞数之间的分析结果除了视场数为20显微镜在计数白细胞低值标本外,其余标本差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明进行外周血的白细胞估算时只适用于视场数为20显微镜和低值白细胞标本计数,白细胞估算方法对白细胞计数的准确性有待进一步研究。

在血小板血涂片计数中,本试验采用了2种估算方法:①30个油镜视野下血小板均值 $\times R$ ( $R = 10$ ;  $R = 15$ )。系数R的数值不同文献中数值有些差别,关丽君<sup>[9]</sup>建议 $R = 10$ ,而朱建峰等<sup>[10]</sup>、王霄霞<sup>[6]</sup>建议 $R = 15$ ,关于该系数说法不一,本研究证实了部分研究结果。结果显示,当 $R = 10$ 时,20视场数的显微镜低值标本与全自动血液分析仪法及改良牛鲍计数板法的结果差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明当 $R = 10$ 时,对20视场数的显微镜估算低值标本血小板具有参考意义,而对正常值和高值标本参考意义不大,对26.5视场数的显微镜估算血小板数的参考意义不大。当 $R = 15$ 时,2台显微镜的分析结果差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明2种视场数的显微镜估算出的血小板数与仪器法或者改良牛鲍计数板法差异显著,用显微镜估算血小板不可替代仪器法或者改良牛鲍计数板法。且随着视场数的增大,估算出的血小板数值越大,由此可以推测R值可能与视场数相关,显微镜的视场数越大,R值越小。推测可能是因为视场数越大,平均每油镜视野下计数的血小板越多,如果以全自动血液分析仪法或者改良牛鲍计数板法得到的血小板数为标准值,视场数越大,相应的每油镜视野下的血小板均值越大,因此转换系数R就越小,相反,视场数越小,那么R值就越大。②利用血小板估算公式<sup>[12-13]</sup>:血小板估算数目( $10^9/L$ ) = 30个视野血小板平均数/30个视野红细胞平均数 $\times$ 全自动血细胞分析仪计数红细胞数目( $10^{12}/L$ ),用2种视场数的显微镜估算出的血小板正常值、低值、高值标本与全自动血液分析仪法及改良牛鲍计数板法的结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明血小板估算公式对血涂片法3种浓度标本的血小板计数具有一定的参考意义,和朱建峰等<sup>[10]</sup>的低值标本结论吻合。

通过以上对研究结果的分析与讨论,可以得到2种视场数的显微镜在计数血涂片法中的白细胞与血小板的范围。在日常的复检工作中,此范围可供

采用此2种视场数显微镜进行血涂片法中的白细胞和血小板计数时参考使用,对于粗略判断细胞数量有很大的意义。对于血涂片法中的白细胞计数,仅建议采用视场数为20显微镜使用白细胞估算法(30个高倍镜视野下白细胞均值 $\times 2$ )进行低值白细胞计数。对于血涂片法复检血小板减低标本时,建议采用视场数为20的显微镜计数每油镜视野下的血小板计数,乘以 $R$ ( $R = 10$ )或使用血小板估算公式,血小板计数高值和正常值标本建议使用血小板估算公式。用视场数为26.5的显微镜复检三种浓度血小板标本时均建议采用血小板计数估算公式,计数正常值和高值标本时采用推荐的R值12.187、12.000。不建议使用视场数为26.5的显微镜复检血小板,因为该显微镜配置偏高偏贵,一般只应用于研究型的实验室,而不是常规实验室。如果非用不可,也可以按照推荐的R系数进行换算。计数正常值血小板标本,建议的R值为6.020。计数低值血小板数标本,建议的R值为7.330。计数高值血小板标本时,建议的R值为6.550。本研究由于时间限制,样本量较少,并且可能存在随机误差,后续会增大样本数量,以增加实验的准确性。目前血涂片计数法在临床上得到广泛应用,但和全自动血细胞分析仪检测法一样,各自都存在优点和局限性<sup>[22]</sup>。与全自动血细胞分析仪的快速便捷相比,血涂片法耗时长,操作复杂。

但在异常标本的检测中,血涂片法的准确性要高于全自动血液分析仪检测<sup>[23]</sup>,因此,血涂片法常用于对血细胞分析仪异常检测结果的复检<sup>[24]</sup>。而在进行复检时,利用血涂片既可以进行异常细胞和异常形态的识别,也可以估算细胞数量,一举两得,节约了大量时间。不同显微镜的参数不同,其估算时的公式也不同,所以可以根据所选择的显微镜的视场数来选择相应的换算系数R,以减少显微镜的光学参数带来的结果的差异,提高检验的准确率。同时,本研究也为临床血常规复检提供了新的方式,也为提高复检的准确率作出了贡献。

#### [参考文献]

- [1] 王瑛莹.华南虎血常规两种测定方法的比较应用[J].动物学杂志,2020,55(2):264-271.
- [2] 杨静梅,林一民.全自动血细胞分析血细胞计数与手工计数应用比较[J].检验医学与临床,2012,9(8):961-963.
- [3] Vinogradova OA, Frolov DN, Zverev VA. Analysis of the problems of optimizing the parameters of a microscope's optical system[J]. J Opt Technol,2011,78(1):45-49.
- [4] 胡燕,刘文,彭涛.两种白细胞稀释液在白细胞计数中的应用

- [J].西南军医,2018,20(5):566—567.
- [5] 刘甲辰,高艳丽.三种血小板稀释液临床应用比较与检验学研究[J].中国医学创新,2013,10(33):88—89.
- [6] 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,2014:98.
- [7] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M].4版.北京:人民卫生出版社,2015:23.
- [8] 张明昊,蔡晓钟,罗娟,等.比较两种方法对牛鲍氏计数板中细胞计数结果的影响[J].重庆医学,2016,45(5):658—660.
- [9] 美丽君.改良涂片法复核血小板计数减少[J].检验医学与临床,2021,18(13):1954—1956.
- [10] 朱建锋,张莉,王蓓丽,等.2种外周血涂片血小板估测方法的评价[J].检验医学,2015,30(10):1027—1029.
- [11] 张稳燕,周开矿,陈颖,等.外周血涂片估测血小板的方法研究[J].检验医学临床,2016,13(22):3242—3244.
- [12] Kunicka JE, Fischer G, Murphy J, et al. Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter[J]. Am J Clin pathol,2000,114(2):283—289.
- [13] 何晶晶,张富贵.外周血涂片估算血小板公式的建立[J].饮食保健,2018,5(12):242.
- [14] 朱丹.全自动血细胞分析仪联合血涂片细胞形态学在血常规检验中的应用分析[J].中国医药指南,2022,20(8):108—110,114.
- [15] 潘旭枫,陈小华,梁秀珍,等.XS1000i全自动血细胞分析仪与镜检法对ITP患者低值血小板计数的比较[J].现代医药卫生,2013,29(2):176—177.
- [16] 张蕾,李智,李泳,等.ABBOTT CD-3700全自动血液分析仪对低值血小板检测准确度探讨[J].检验医学,2008,23(6):563—566.
- [17] 戴月虹,许健波,徐怡娜.急诊血常规复检规则的建立与评估[J].中国乡村医药,2020,27(20):54—55.
- [18] 林华.全自动血细胞分析仪与血涂片细胞形态学在血常规检验中的联合应用效果分析[J].中国实用医药,2021,16(1):48—50.
- [19] 崔晓阳,冯春颜,朱彩云,等.血液分析仪新型荧光血小板计数法的基本性能评价[J].中国医学装备,2016,13(1):70—74.
- [20] Vora P, Trivedi V, Mahajan S, et al. Wide field of view common-path lateral-shearing digital holographic interference microscope[J]. Bio Opt,2017,22(12):1—11.
- [21] 张森丽.如何计算显微镜下视野面积[J].诊断病理学杂志,2009,16(1):79.
- [22] 徐娅舒,吴德祥.手工计数法与血细胞分析仪测定血小板的比较[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(1):77—78.
- [23] 刘惠涛.血涂片分析在血常规检验中的应用效果及价值[J].航空航天医学杂志,2022,33(4):447—449.
- [24] Simon MW. The atypical lymphocyte[J]. Int Ped, 2003, 18(1):10—22.

(本文编辑:赵丽洁)