

血细胞分析仪细胞体积分布直方图的特点及临床意义

解放军总医院临床检验科 乐家新 王成彬 丛玉隆 (北京 100853)

传统的血细胞检查完全采用手工方法,不仅操作繁琐费时,而且由于多种原因,计数结果的准确性和精密度难以保证。1958年,库尔特采用电阻率变化与电子技术相结合的方法,发明了性能比较稳定的电阻抗法血细胞计数仪,开创了血细胞分析的新纪元。20世纪90年代以来,随着各种高新技术在血细胞分析仪中的应用,使其检测原理不断完善,检测水平不断提高,测量参数不断增加,各种类型的血细胞分析仪已在国内外各医院广泛使用。但从根本上讲,其检测原理大致分为两部分,即电阻抗法与光散射法。电阻抗法血细胞计数原理是根据血细胞非导电性的性质,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,进行血细胞计数和体积测定。光散射法主要应用于白细胞分析,其检测原理就是利用多项技术(如射频、细胞化学染色和流式细胞术)联合同时检测一个白细胞,综合分析实验数据,得出较为准确的白细胞计数和五分类结果。

血细胞分析仪检测血标本时,除给出细胞数量外,还提供相应的细胞体积分布图。根据仪器检测的原理不同,可将血细胞分布图形分为直方图和散点图。直方图是血细胞分析仪用电阻抗原理对血细胞进行检测,以细胞体积为横坐标,细胞的相对数量为纵坐标,表示某一种细胞数量分布情况,可反映细胞体积大小异质性。包括白细胞、红细胞和血小板三种直方图。散点图是血细胞分析仪用多项技术(激光、射频及化学染色)联合使用对白细胞进行检测后得到的各类白细胞的散点状分布图。由于目前使用的血细胞分析仪绝大部分采用电阻抗原理,下面主要介绍血细胞体积分布直方图的特点及临床意义。

由于电阻抗法计数细胞的原理是基于细胞在测试系统中产生的脉冲大小与仪器内设定的阈值比较而得出的数据,每个细胞检

测时显示的脉冲大小除与细胞本身的大小有关外,还与溶血剂的种类、浓度、用量、溶血时间,稀释液的渗透压、离子强度、pH值、电导率,仪器出厂时仪器内固定的孔电流和脉冲增益等因素有关。换言之,上述任一参数的变化,均可导致脉冲的变化,致使细胞计数和分类计数的错误。而且不同厂家及型号的血细胞分析仪设置的技术参数和使用的试剂性能不同,致使不同型号仪器直方图的形状不完全相同。下面主要以Coulter JT-IR(白细胞直方图)和SF-3000(红细胞和血小板直方图)为例进行介绍。

一、白细胞直方图的特点与临床意义

1、正常白细胞直方图(图1-a):血细胞分析仪通常在35-450fl的范围内分析白细胞。根据正常白细胞在溶血剂作用后体积的大小,在直方图上从左至右可确认其相应的三个细胞群:小细胞群是位于左侧又高又陡的峰,分布在35-90fl范围,以成熟淋巴细胞(LYM)为主要特征细胞;大细胞群是位于右侧较低且分布宽的峰,跨越160-450fl,以中性粒细胞为主要特征细胞;位于大、小细胞群之间的较平坦的区域,分布在90-160fl范围,是单个核细胞(MONO),也被称为中间细胞(MID),以单核细胞为主要特征细胞。

2、异常白细胞直方图:由于正常外周血中的白细胞以淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞为主,白细胞直方图显示为有三个峰的光滑曲线,而且在这三群细胞分布区域的交界处均存在一个低谷(即报警监测点)。当白细胞分类的比例异常或出现异常细胞时,白细胞直方图曲线峰的高低、数量和低谷区的特征将会出现一些变化,并显示相应的报警。

(1)中性粒细胞比例增高或淋巴细胞比例减低(图1-b):白细胞直方图表现为粒细胞峰明显变大,淋巴细胞峰明显变小。在严重

的细菌感染时,如果中性粒细胞发生中毒性改变,粒细胞峰可向左移动或向右延伸,有的可显示“R3”或“R4”报警提示。

(2)中性粒细胞比例减低或淋巴细胞比例增高(图1-c):白细胞直方图表现为粒细胞峰明显变小,淋巴细胞峰明显变大。

(3)单核细胞比例增高(图1-d):白细胞直方图表现为在单个核细胞区出现一个明显的峰,其大小与单核细胞比例增高的程度有关,常显示R3”报警提示。值得注意的是,仪器显示的“MO”或“MID”增高仅表示可能是单核细胞增高,也可能是嗜酸性粒细胞或幼稚细胞等,因此,必须涂片染色后经显微镜确认。

(4)嗜酸性粒细胞比例增高(图1-e):白细胞直方图上也在单个核细胞区出现一个明显的峰,其大小也与嗜酸性粒细胞增高的程度有关,可显示“R2”或“R3”报警提示。注意事项与单核细胞比例增高相同。

(5)急性淋巴细胞白血病(图1-f):白细胞直方图表现为淋巴细胞峰向单个核细胞区扩展变宽,其程度与原始及幼稚淋巴细胞的比例高低有关,常伴有“R2”报警。

(6)急性非淋巴细胞性白血病(图1-g):白细胞直方图常以单个核细胞峰增高为主,并向淋巴细胞区和粒细胞区扩展,常显示“R2”、“R3”及“Rm”报警提示。其异常峰的高低及扩展的程度与原始及幼稚细胞的比例高低有关。

(7)慢性淋巴细胞白血病(图1-h):白细胞直方图与正常淋巴细胞比例增高时相似,但淋巴细胞峰底略宽,有时可显示“R2”报警。

(8)慢性粒细胞白血病(图1-i):白细胞直方图表现为多区异常,为形状单一而分布广泛的图形,淋巴细胞峰可有可无,随淋巴细胞所占的比例大小而异。

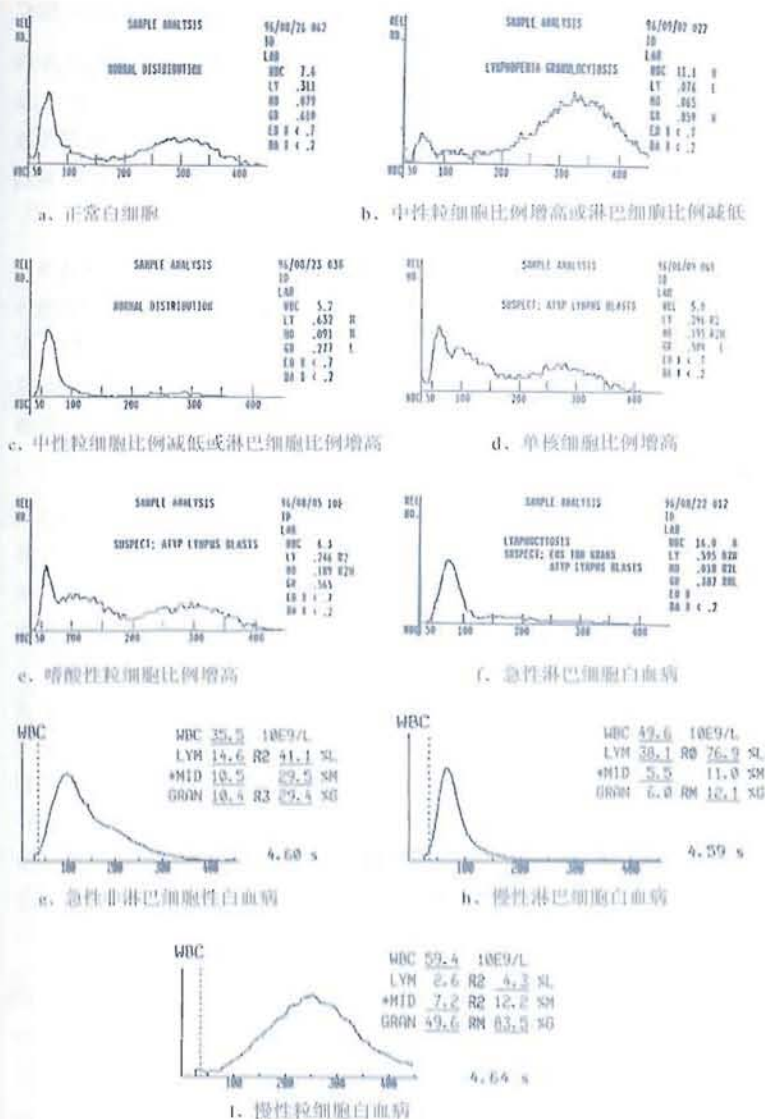


图1、各类白细胞直方图

(a-f) Coulter JT-IR 测试; (g-i) Cell-Dyn 1700 测试

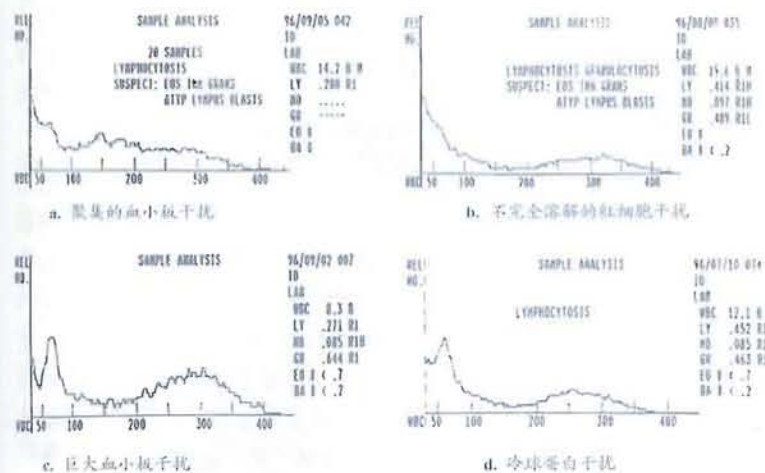


图2、各种干扰因素引起的白细胞直方图变化

3. 白细胞直方图变化的意义, 主要是指导实验室工作人员如何做好仪器计数的质量控制及判断是否“涂片复检”。

(1)、判断白细胞计数时是否受到其他因素的干扰

白细胞计数时先加入溶血剂, 使红细胞破坏, 保留的“膜包核”状的白细胞进行计数, 但下列因素: ①某些贫血的病理红细胞及新生儿红细胞对溶血剂有较强的抵抗力, 使之不溶解或不完全溶解; ②有核红细胞; ③血小板聚集成团, 这些均可误计数为白细胞等, 此时白细胞直方图也可发生相应的改变。因此, 当实验结果出现这些图形时, 提示白细胞计数和分群结果均不准确, 需要复查。各种干扰因素引起的白细胞直方图变化见图2。

(2)、判断白细胞直方图是否符合白细胞分类筛选标准, 以决定涂片镜检

经过溶血剂处理后的“膜包核”白细胞体积与其自然体积无关。含有较多颗粒的粒细胞经溶血剂处理后的体积比颗粒细、少的单核细胞和淋巴细胞体积要大些, 尽管其真实体积与单核细胞相等或更小。白血病细胞、异形淋巴细胞、浆细胞、嗜酸性粒细胞和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。在一个细胞群中, 可能以某种细胞为主, 但由于细胞体积间的交叉, 可能还存在其他细胞; 也可能存在与白细胞体积大小相近, 而实际上并非细胞的颗粒(如聚集的血小板)。由此可见, 电阻抗法仪器只是根据“膜包核”颗粒体积的大小, 将白细胞分成几个群体, 这是比较粗糙的分类, 很难准确地反映出病人血样中各类白细胞比例的真实情况。因此, 只能用于健康体检或无明显血液学异常且白细胞体积分布直方图正常的病人。准确的白细胞分类不能完全脱离显微镜检查。

(3)、不能仅根据白细胞直方图的变化, 进行某种疾病的诊断

图3显示了一组图形相似、报警提示相同, 但白细胞种类不同的白细胞直方图变化, 由此可见, 尽管引起血液学变化的病因不同, 白细胞种类的变化不同, 但白直方图变化很相似。而图4显示了一组白细胞种类相同, 但图形和报警提示不同的白细胞直方图变化, 说明白细胞直方图图形变化无特异性。图5则显示了同一个白血病人治疗过程中外周血中白血病细胞比例不同, 而呈现的白细胞直方图变化。因此, 异常的白细胞直方图只是提示检查者粗略判断各类白细胞细胞比例变化或有无明显异常细胞出现, 进而在显微镜复检时注意这些变化的真正病理意义, 或在正常人体检中筛选是否需要进一步血涂片检查, 而不能仅根据白细胞直方图的变化来进行临床诊断。那种认为白细胞直方图的某种变化, 即可代表某种疾病的说法是错误的。

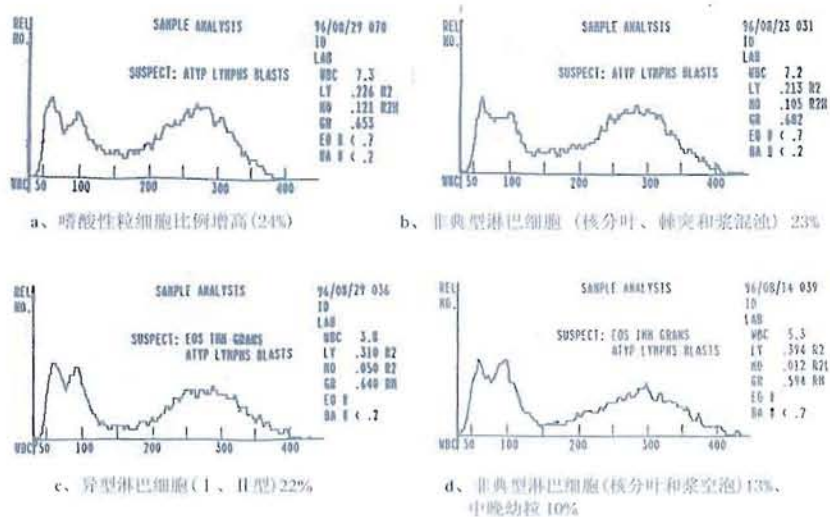


图3、图形和报警提示相同、细胞不同的白细胞直方图变化
(a与b比较; c与d比较)

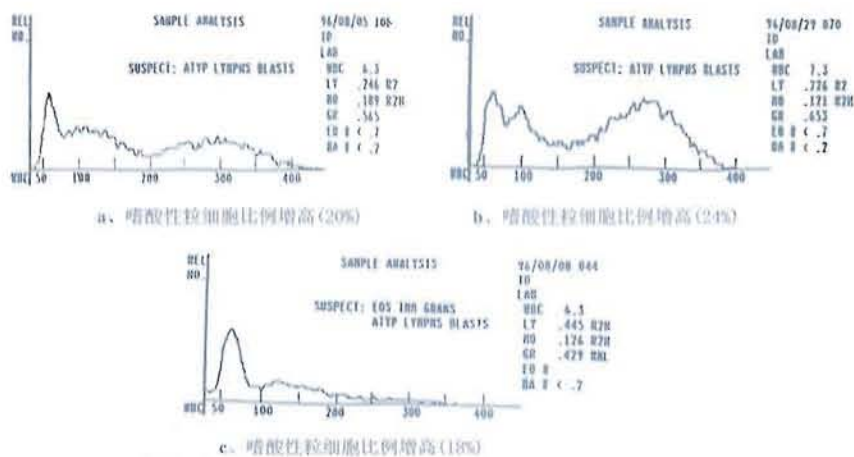


图4、细胞相同、图形和报警提示不同的白细胞直方图变化

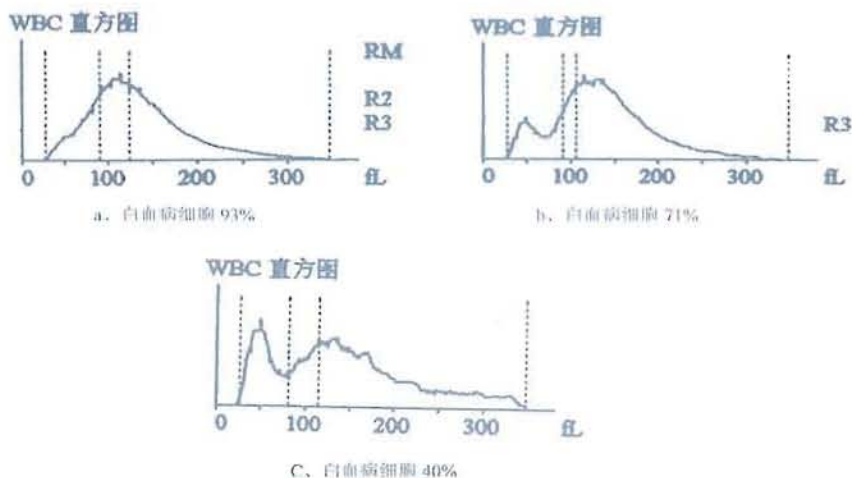


图5、同一个病人不同比例白血病细胞的白细胞直方图变化
(急性多颗粒早幼粒细胞白血病, Botest-3100 测试)

二、红细胞直方图的特点与临床意义

红细胞和血小板在一个系统中进行检测,即当它们通过小孔时,形成相应大小的脉冲,脉冲的多少代表颗粒的数量,脉冲的高度代表单个细胞的体积。根据不同的阈值,计算机分别给出红细胞和血小板数目。

1. 正常红细胞直方图(图6-a): 仪器通常在35~250fl的范围内分析红细胞。红细胞体积分布直方图的显示范围为25~250fl。正常红细胞主要分布在50~150fl范围内,从红细胞直方图上看好似两侧对称正态分布曲线。

2. 异常红细胞直方图: 如果红细胞的体积大小发生改变,均可见红细胞直方图左移(MCV变小)或右移测(MCV变大),或出现双峰(存在两个细胞群),红细胞体积分布宽度(RDW)也呈相应的变化。与白细胞直方图不同,某些贫血患者的红细胞体积分布直方图有其特点,此种图形变化再与其他参数结合分析,对贫血鉴别诊断颇有价值。分析时,应注意观察直方图峰的位置、峰底的宽度、峰顶的形状及有无双峰现象。下面介绍几种贫血的红细胞直方图变化。

(1) 缺铁性贫血的直方图(图6-b): 其特点为曲线峰左移,峰底变宽,显示小细胞不均一性。

(2) 轻型地中海贫血的直方图(图6-c): 图形表现为曲线峰左移,峰底变窄,显示小细胞均一性。

(3) 铁粒幼细胞性贫血的直方图(图6-d): 图形表现为曲线峰左移,可呈“双峰”形,峰底明显变宽。缺铁性贫血经铁剂治疗有效,在三周左右时也可出现类似的“双峰”状图形,但峰底更宽。

(4) 巨幼红细胞性贫血的直方图(图6-e): 治疗前的直方图曲线峰变低、右移,峰底明显变宽,显示明显的大细胞不均一性,是叶酸或维生素B₁₂缺乏引起巨幼细胞性贫血的重要直方图特征。经叶酸或B₁₂治疗后,正常红细胞群逐步释放进入外周血,而病理性红细胞并未完全消亡,检测的红细胞直方图可呈“双峰”形,说明治疗有效。

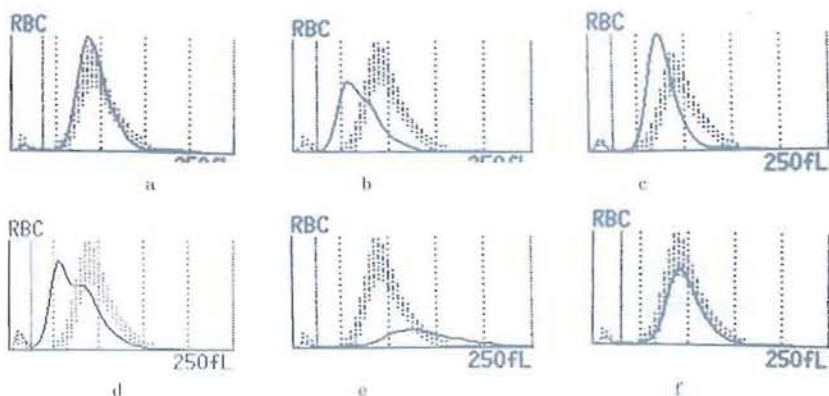


图6、各类红细胞直方图(SF-3000测试)

- a. 正常红细胞 (MCV: 89.4fL, RDW: 13.8%);
 b. 缺铁性贫血 (MCV: 66.2fL, RDW: 25.9%);
 c. 轻型β-地中海贫血 (MCV: 71.9fL, RDW: 13.3%);
 d. 铁粒幼细胞性贫血 (MCV: 73.6fL, RDW: 22.8%);
 e. 巨幼细胞性贫血 (MCV: 131.2fL, RDW: 24.2%);
 f. 急性失血性贫血 (MCV: 91.3fL, RDW: 13.0%)

(5)急性失血性贫血的直方图(图6-f):直方图的曲线峰变低,其它特点与正常红细胞直方图一致。

应该指出,不同型号仪器的特点及使用稀释液不同,红细胞分布曲线的形状亦有差异,但反映病理变化的基本特征是相同的,上述内容只是描述的某一型号仪器的图形变化。在实际工作中,不同实验室应根据自身仪器的特点进行对比分析。

3.RDW的临床应用

RDW由血细胞分析仪在计数红细胞数量的过程中,同时测量红细胞体积大小的差异获得,是反映外周血红细胞体积异质性的参数。RDW能直接、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。

(1)用于缺铁性贫血和轻型地中海贫血的鉴别诊断:由于Hb合成障碍,两者均可表现为小细胞低色素性贫血,但前者RDW增高,后者大多数(88%)病例RDW正常。

(2)用于缺铁性贫血的早期诊断和疗效观察:绝大多数(96%)IDA时RDW均增高,特别是MCV尚处于正常参考值范围时, RDW增高是缺铁性贫血的早期诊断的重要指标,当MCV减低时, RDW增高更明显。给予铁剂治疗有效时, RDW先增高,随着正常红细胞的增多和小红细胞的减少, RDW逐渐降至参考范围。

(3)用于贫血的形态学分类: Bassmen提出了MCV/RDW分类法(1983年),根据MCV和RDW二个参数,将贫血分为小细胞均一性(MCV减低, RDW正常),小细胞不均一性(MCV减低, RDW增高),正细胞均一性(MCV正常, RDW正常),正细胞不均一性(MCV正常, RDW增高),大细胞均一性(MCV增高, RDW正常),大细胞不均一性(MCV增高, RDW增高)六类。

三、血小板细胞直方图的特点与临床意义

1. 正常血小板直方图(图7a):血细胞分析仪通常在2-30fl范围分析血小板,正常血

小板主要集中在于2-20fl范围内,一般在25-30fl之间的某一点与横坐标重合,直方图是一条呈对数正态分布的光滑曲线。平均血小板体积(MPV)是血小板直方图曲线所含的群体算术平均体积,正常人的MPV值与血小板数量呈非线性负相关。

2. 异常血小板直方图:血小板与红细胞在同一个通道内测量,二者在体积上有明显的差异,仪器设定了特定的阈值,将高于阈值者定于红细胞,反之为血小板。但红细胞群体中的小红细胞或细胞碎片可落在血小板的阈值内,巨大血小板或聚集的血小板可误认为红细胞,这些均可从血小板直方图上反映出来。另外,乳糜微粒、冷球蛋白颗粒和红细胞冷凝集等也可干扰血小板计数结果,但血小板直方图无明显的变化。

(1)大血小板直方图(图7b):曲线峰右侧右移,在大于30fl的某一点与横坐标重合, MPV值明显增高。如果血小板数减低,可见于ITP及体外循环时;如果血小板数升高,见于脾切除术后。如果血小板数正常,可见于慢性髓性白血病、骨髓纤维化等。

(2)小血小板直方图(图7c):曲线峰右侧左移,在小于20fl的某一点与横坐标重合, MPV值明显减低。如果血小板数减低,可见于AIDS病毒感染和脾亢等;如果血小板数正常,可见于慢性再障;如果血小板数

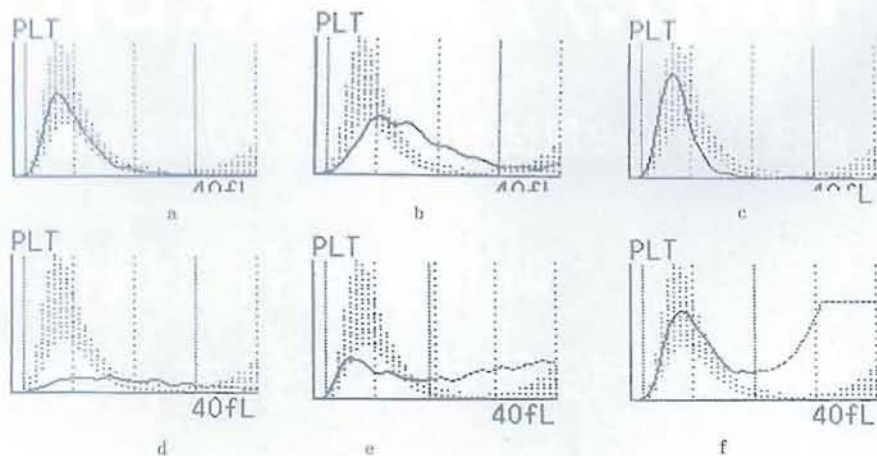


图7、各类血小板直方图

- a. 正常血小板直方图; b. 大血小板直方图; c. 小血小板直方图
 d. e. 聚集的血小板直方图; f. 小红细胞干扰的血小板直方图

升高,可见于反应性血小板增多症。

(3)聚集的血小板直方图(图7d):曲线峰变低,如果以<20个的血小板聚集为主,曲线峰右侧抬高呈拖尾状,不与横坐标重合;如果以>20个的血小板聚集为主,则曲线峰变低、变平,右侧抬高不明显。此时,在白细胞直方图的35fl处有一个小峰。见于标本采集不当或EDTA依赖性血小板聚集等。

(4)小红细胞干扰的血小板直方图(图7e):在曲线峰的右侧抬起并上扬,不与横坐标重合。可见于IDA或发生溶血的标本。

由于多种因素均可导致血小板直方图异常(图7),影响血小板计数和MPV的结果,因此,分析血小板直方图是血小板检测分析后质控的重要步骤。但血小板直方图对于医生作为诊断与治疗依据价值不大。

四、血细胞分析仪检测的质量保证

血细胞分析仪虽然提高了检验结果的准确性和精密度,但欲获得准确的检测结果,必须做好分析前、分析中和分析后的质量控制。

1.分析前质量控制:包括①做好操作人员上岗前的培训,选择高素质的专业技术人员,这是获得准确结果的关键。②按仪器说明书的要求,做好仪器的安装和校准。③按照ICSH公布的评价方案,对仪器测试标本的总变异性、精密度、携带污染率、线性范围、可比性和准确性进行测试、评价。④注意标本的采集和储存要求:选用ICSH推荐用EDTA二钾(1.5~2 mg/ml血)作为静脉血的抗凝剂,抗凝血在室温下,WBC、RBC、PLT可稳定24h,白细胞分类可稳定6~8h,Hb可稳定数日,但2h后粒细胞形态即有变化,故需作镜检下分类者,应及早

制备血涂片。

2.分析中质量控制:包括①了解试剂与仪器白细胞分类的关系,要求选用原装试剂和经国家鉴定的合格试剂;②注意测试时试剂的温度和溶血剂的用量及溶血时间对结果的影响;③了解仪器不完全堵孔对检测结果的影响;④做好室内质控,注意冷球蛋白、高胆红素血症、高脂血症和红细胞冷凝集等病理因素对仪器检测结果的影响。

3.分析后质量控制:包括①根据白细胞直方图及参数变化确定白细胞分类是否需要显微镜检查;②注意分析实验结果各参数之间的关系;③注意与临床资料进行相关分析;④经常听取临床医生的意见,及时纠正潜在引起实验偏差的趋势,不断改进实验室的工作,提高检验质量。