

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 245—2005

红细胞和白细胞计数的参考方法

Reference method for the enumeration of
erythrocytes and leucocytes

2005-5-16 发布

2005-12-1 实施

中华人民共和国卫生部

发布

WS/T 245-2005

前 言

为了保证红细胞和白细胞的计数结果具有溯源性和准确性，特制定本标准。

本标准从 2005 年 5 月 16 日起实施。

本标准由卫生部医政司提出。

本标准起草单位：卫生部临床检验中心

本标准主要起草人：彭明婷、申子瑜、谷小林、陆红、杨振华。

本标准由卫生部委托卫生部临床检验中心负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

红细胞和白细胞计数的参考方法

WS/T 245—2005

Reference method for the enumeration of
erythrocytes and leucocytes

1 范围

本标准规定了建立红细胞和白细胞计数参考方法的技术要求。

本标准适用于建立红细胞和白细胞计数参考方法的实验室。

2 规范性引用文件

国际血液学标准化委员会（ICSH）-1994 红细胞和白细胞计数的参考方法

3 定义

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，可提供高度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。参考方法应溯源至一级计量标准并且须标示不准确度和不精密度。

4 总则

4.1 要求使用单通道、阻抗原理的半自动电子计数仪来建立红细胞和白细胞计数的参考方法。

4.2 为了保证参考方法检测结果的精密度和准确性，建立参考方法的实验室之间必须进行比对。

5 红细胞和白细胞计数参考方法的一般技术要求

5.1 血标本

5.1.1 用符合要求的塑料注射器或真空采血系统采集新鲜静脉血标本。标本中不得有肉眼可见的溶血或小凝块。

5.1.2 标本的收集要求使用 EDTA 二钾作为抗凝剂，抗凝剂的浓度为 3.7-5.4

$\mu\text{mol/ml}$ 血 (1.5-2.2 mg/ml 血)。盛有标本的试管应有足够的剩余空间以便于血标本的混匀操作。

5.1.3 标本应置于 $18^{\circ}\text{C}\sim 22^{\circ}\text{C}$ 的温度条件下直至检测。

5.1.4 标本采集到标本检测的时间间隔应不超过 4 小时。

5.1.5 检测前应轻轻地颠倒盛有标本的试管，以便将标本充分混匀。不得使用混匀器进行混匀操作。

5.2 加样器

要求使用经过校准的移液器，不准确度 $\leq\pm 0.5\%$ 。其不准确度应溯源至一级计量标准。

5.3 容量瓶

要求使用硅硼玻璃制成的一级容量瓶。每个容量瓶应有经国家标准计量机构检定的标示体积，其不准确度为 $\pm 1\%$ 。

5.4 计数杯

5.4.1 计数杯的体积应有 10ml。

5.4.2 计数杯应有足够的高度以保证在计数前电子细胞计数仪小孔管的小孔约在液体高度一半的位置，完成计数后在小孔上方至少有 1cm 的液体高度。

5.4.3 使用前要保持计数杯的清洁，无化学污染物和颗粒物。

5.4.4 须确认是否因细胞粘附于计数杯上而导致计数值的持续下降。从每批计数杯中抽查检测。在计数杯内加入稀释样本，放置不同的时间进行检测，以确认计数杯是否合格。临计数前，样品杯内的稀释液必须充分混匀。

5.5 仪器性能

5.5.1 电子细胞计数仪的设计要达到每个细胞只能计数一次的要求。细胞通过计数敏感区时颗粒回流的可能性要很小，由此产生的脉冲应低于相应的低阈值。

5.5.2 电子计数装置应有能力通过脉冲高度来区分检测的细胞、其它细胞和电噪声，且能保证检测误差足够小。

5.5.3 仪器小孔的直径为 $80\sim 100\mu\text{m}$ ，小孔长度为直径的 70~100%。

5.5.4 计数过程中吸入的标本体积的准确度要求在 1% 以内，准确度应溯源至国家或国际计量标准。

5.5.5 通过水银柱或其他适当物质的移动吸入标本。吸入标本的体积受温度影响

的程度应小于每摄氏度 0.1%。

5.5.6 为了避免人为因素的影响，设定阈值时要求保证信噪比在 100: 1 以上。

5.6 试剂

5.6.1 稀释液

5.6.1.1 稀释液应为无菌、无毒、适用于检测系统的缓冲盐溶液。

5.6.1.2 要求标示稀释液的渗透压，渗透压的大小在 $280 \pm 15 \text{mOsm}$ 范围内。

5.6.1.3 在设定的阈值条件下，稀释液的空白计数应少于 1×10^5 个/L。

5.6.2 溶血剂

在全血标本中计数白细胞时，红细胞须首先被溶解。溶血剂的作用不能影响白细胞计数，同时红细胞的碎片应被减至不被当作白细胞计入。

5.6.3 冲洗液

冲洗液由稀释液经真空脱气或加热至 90°C 以去除气体。

6 红细胞计数方法的要求

6.1 冲洗

计数前用冲洗液冲洗仪器。

6.2 重叠计数校正的稀释要求

计数的每一份标本都要进行重叠校正。

进行重叠校正的标本稀释方法和检测次数：制备 2 份稀释原液（每份 0.1ml 血加 20ml 稀释液）。取 0.02、0.04、0.06 和 0.08ml 稀释原液分别加入 20ml 稀释液中以制备两套 4 个浓度的次级稀释标本，浓度最高的次级稀释标本为 0.08+20ml，稀释倍数为 1/50451。每份次级稀释标本的计数次数如下所示：

次级稀释标本	0.02+20	0.04+20	0.06+20	0.08+20
计数次数	12	6	4	3

6.3 将稀释标本移入计数杯

稀释标本应移至计数杯内，轻轻混匀约 30 秒，混匀过程中不能有气泡。计数应在稀释后 5 分钟内完成。

6.4 计数过程

6.4.1 样本通过小孔的时间可依照制造商的推荐而定。

6.4.2 按 6.2 规定的检测次数，对每份次级稀释标本进行重复检测。

6.5 阈值的验证

将低计数阈值设在血小板和红细胞脉冲信号之间波谷的位置。

6.6 重叠计数的校准方法

重叠计数的校正是使用回归分析方法检查回归的线性；分析的数据点由检测两套 4 个浓度的次级稀释标本得出。Y 轴代表每个水平的次级稀释标本的累积计数值，X 轴上的刻度将最高浓度次级稀释标本（0.08+20ml）的浓度定为 1.0。

次级稀释标本(ml) 0.02+20 0.04+20 0.06+20 0.08+20

X 轴的刻度值 0.2507 0.5010 0.7507 1.0000

如果变异的分析未显示非线性，那么回归直线的交叉点代表重叠校准的计数值。

计数值为吸入小孔管的二级稀释最大浓度标本（0.08+20ml）的红细胞计数值。由于重复测定了 3 次，故用该计数值除以 3。结果代表每毫升通过小孔的二级稀释标本内含的细胞数。最后，用计数值乘以 50451 得出 RBC 的计数值。

7 白细胞计数方法的要求

前述的原理同样适用于白细胞计数。制备双份稀释标本，每 0.08ml 血加入 20ml 稀释液中。计数前加入溶血剂。在确保红细胞完全溶解、红细胞残骸不至计入白细胞、溶血剂对白细胞计数发生影响之前，对白细胞进行计数。计数红细胞的小孔管可用于白细胞计数。

7.1 阈值的验证

原理同红细胞计数，低阈值设在红细胞碎片引起的噪声和白细胞信号之间。

7.2 重叠校准

与红细胞计数的操作相同，按如下要求制备 4 份原级白细胞稀释标本：

0.02+20ml 0.04+20ml 0.06+20ml 0.08+20ml

回归线的交点代表最大浓度原级稀释标本（0.08+20ml）的重叠校准值。重复检测的次数与 6.2 相同。用计数值乘以 251 得出白细胞的计数值。

7.3 误差分析

红细胞计数的最大允许偏倚为 2.0%，白细胞计数的最大允许偏倚为 4%。

7.4 样本误差

如果检测样本不能代表全血标本则说明存在误差。考虑的影响因素应包括混匀效果欠佳，取标本时溶血和稀释不准确等。

7.5 输送过程的误差

如果已知体积稀释血的某个细胞未被计数则会引起此项误差,该误差可由于细胞沉降、丢失和/或回流和吸入体积的不准确而产生。

7.6 计数误差

7.6.1 由于不当的识别、假性计数或不当的重叠校准都可导致最后的计数值不正确。细胞计数参考方法的不精密度应小于 1%。

7.6.2 潜在的误差来源包括标本的采集、稀释、吸入体积的不精密度和细胞计数值的范围等。

编制说明

制定本标准的依据是国际血液学标准化委员会（ICSH）颁布的文件《红细胞和白细胞计数的参考方法》。

在制订本标准的过程中，以书面形式征求了专家意见并召开了专家研讨会，根据专家意见对本标准进行了修改。本标准的制订对于在我国直接建立红细胞和白细胞计数的国际标准，保证红细胞和白细胞计数检测结果的溯源性具有重要意义。

意见汇总处理表

序号	标准章 条号	意见内容	提出意见专家	处理 结果
1.	6.6	0.7507 → 0.5010	邓小林	采纳
2.	7	二套 → 双份	朱忠勇、杨振华	采纳
3.	7.5	每个细胞 → 某个细胞	金大鸣、杨振华	采纳
4.	7.6.1	精密度 → 不精密度	朱忠勇、杨振华	采纳
5.	5.6.12	张力 → 渗透压	孙芾、朱忠勇	采纳
6.	6.2	校准 → 校正	朱忠勇、孙芾	采纳
7	5.5.5	运动 → 移动	朱忠勇	采纳
8	5.4.4	删除间隔	朱忠勇	采纳