

脑脊液白细胞显微镜计数法的改良

黄丽春, 岑雨贞[#], 郑磊, 熊铁, 陈雅妮, 孙德华[△]

(南方医科大学南方医院检验科, 广州 510515)

摘要:目的 对现用脑脊液白细胞显微镜计数法进行改良, 寻求最佳冰醋酸浓度及与脑脊液混合的最适比例, 提高脑脊液白细胞计数的准确度、精密度。方法 将不同浓度冰醋酸与脑脊液标本进行不同比例混合, 形成 28 种组合方法。标本稀释后 5 min 内对 28 种组合方法进行显微镜白细胞计数, 同时以现用方法进行计数, 每种方法均计数 2 次取均值。计数 20 例脑脊液标本后比较每种方法所得的白细胞计数均值与变异系数。结果 脑脊液与 5% 冰醋酸的混合比例为 60:40 时, 脑脊液白细胞计数结果最高(189 个/ μL), 明显高于现用方法(161 个/ μL); 变异系数也最小(7%), 明显低于现用方法(18%)。结论 使用 5% 的冰醋酸、且脑脊液与其混合比例为 60:40 时, 白细胞计数结果的准确性、精密度达到最佳。

关键词:脑脊液; 白细胞计数; 现用显微镜计数法; 改良显微镜计数方法; 稀释冰醋酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.21.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)21-2503-02

Improvement of the current routine method of WBC counting in cerebrospinal fluid

Huang Lichun, Cen Yuzhen[#], Zheng Lei, Xiong Te, Chen Yani, Sun Dehua[△]

(Department of Laboratory Medicine, Nanfang Hospital of Nanfang Medicine University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To improve the reliability and accuracy of WBC counting in cerebrospinal fluid (CSF), this article is studying the improved method of WBC counting in CSF by finding out the optimum percentage of CSF specimen with the most suitable concentration of acetic acid. **Methods** CSF specimen was mixed with different acetic acid at different ratio respectively. WBC counts were performed in 5 minutes on diluted samples of various concentrations. A series of 20 CSF specimens were analyzed via the proposed assay and conventional method. The average value and coefficient of variation (CV) of WBC count of each sample were compared and analyzed. **Results** The optimum percentage of CSF sample was obtained at 60:40 ratio. In this percentage, the maximal WBC count (189/ μL) was obtained compared that of conventional method (161/ μL). Moreover, the CV of the WBC counts in this percentage (7%) was also lower than that of the conventional method (18%). **Conclusion** The reliability and accuracy of WBC counting in CSF was the optimum percentage of CSF specimen and 5% acetic acid was 60:40. It may lead to a more reliable, accurate and standard way of WBC counts in CSF.

Key words: cerebrospinal fluid; WBC counts; microscopic count; glacial acetic acid

脑脊液常规是医院开展的常规项目, 脑脊液中的白细胞计数是脑脊液常规中最重要的组成部分, 对脑膜炎的诊断、治疗以及预后有重要的意义。现用显微镜计数法严格按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版) 中的体液细胞计数操作指南^[1], 该方法具有不精密度较大、受人为主观因素影响较多等多种不稳定因素^[2-3]。随着全自动分析仪对于血细胞及尿液分析技术的不断发展和完善, 其细胞计数功能亦延伸到了其他体液如浆膜腔积液、脑脊液的细胞计数等领域^[4-6]。全自动分析仪计数白细胞虽然精密度高, 在一定条件下其准确度也高, 与常规显微镜计数有较好的相关性, 但仪器法计数白细胞也存在一定的局限性, 受其检测细胞线性范围的限制, 脑脊液中的白细胞浓度过低时会影响分析仪对白细胞的计数及分类^[7-9]。故仪器法尚不能完全替代脑脊液白细胞的显微镜计数^[10]。本文通过对临床现用的脑脊液白细胞显微镜计数方法进行改良, 寻求最佳的冰醋酸浓度及与脑脊液混合的最适比例, 使脑脊液白细胞计数的方法更加规范化、标准化, 现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 连续收集本院门诊和住院患者送检脑脊液标本 21 例, 要求脑脊液为非肉眼血性的, 其体积必须大于 5 mL。1 例脑脊液标本用于稳定性试验, 20 例脑脊液标本用于稀释试验, 分 21 d 完成, 每天完成 1 例标本。

1.2 器材与仪器 采用 Olympus KX-31 光学显微镜、Sysmex

UF-1000i 尿沉渣分析仪及配套试剂、冰醋酸、改良牛鲍氏计数板、洁净小试管、微量吸管、加样器、枪头、计时器

1.3 方法

1.3.1 现用显微镜计数法 按照《全国临床检验操作规程》(第 3 版) 中的体液细胞计数操作指南, 于洁净小试管内放入冰醋酸 1~2 滴, 转动试管, 使内壁沾有冰醋酸后倾去之, 然后滴加混匀的脑脊液 3~4 滴, 数分钟后, 混匀充入计数池, 按细胞总数操作中的红、白细胞计数法计数。

1.3.2 稳定性试验 将 100 μL 新鲜脑脊液标本与 100 μL 纯冰醋酸混匀, 分别放置 5、10、20、30 min 后充池计数, 所得结果乘以稀释倍数。同时, 将脑脊液按现用方法分别放置 5、10、20、30 min 后充池计数, 所有实验结果均为充池计数两次取平均值所得。比较两种方法的结果, 证明浓度过高的冰醋酸会破坏白细胞, 使计数结果偏低。

1.3.3 稀释试验(改良显微镜计数法) 按照全自动尿沉渣分析仪 UF-1000i 的操作指南进行脑脊液标本分析, 当然, 在标本检测前确定了仪器质控在控。将脑脊液标本在 UF-1000i 尿沉渣分析仪上进行白细胞计数, 当白细胞结果为 200 个/ μL 时, 为稀释试验入选标本。将不同浓度的冰醋酸与选取的脑脊液按不同比例混合, 每种方法均充池计数两次, 取其平均值, 乘以稀释倍数后将所得结果填入表内, 同时, 每个标本还需用现用方法及 Sysmex UF-1000i 尿沉渣分析仪分别计数白细胞。总

计数 20 例标本。

1.4 统计学处理 运用 EXCEL 计算每种方法的均值与变异系数,通过曲线图和柱形图进行比较。以稀释冰醋酸浓度为横坐标,每种方法的变异系数为纵坐标,每种比例作出一条曲线,作出 CV 值的趋势图。寻找白细胞计数的最高点与 CV 的最低点。

2 结果

2.1 稳定性实验结果 结果见表 1。

表 1 稳定性实验结果 ($\times 10^6 / \mu L$)

时间 (min)	5	10	20	30
原液	183	174	165	158
纯冰醋酸与脑脊液混合	135	97	91	71

2.2 20 例脑脊液标本不同方法计数结果的平均值 结果见表 2~4,图 1、2。

表 2 28 种显微镜改良方法的计数结果平均值 ($\times 10^6 / \mu L$)

脑脊液与稀释冰乙酸的比例	冰醋酸浓度							平均值
	1%	5%	10%	20%	40%	60%	80%	
80 : 20	红细胞溶解不全	177	159	154	138	145	133	151
60 : 40		171	189	163	143	145	128	125
40 : 60		162	157	136	128	132	103	84
20 : 80		143	140	122	101	103	83	61
平均值		159	166	145	132	129	115	101

表 3 显微镜计数方法与仪器计数结果平均值 ($\times 10^6 / \mu L$)

方法	平均值
现用显微镜计数法	161
UF-1000i 尿沉渣分析仪法	200

表 4 28 种改良显微镜计数方法充池前的最终冰醋酸的浓度

脑脊液与稀释冰乙酸的比例	冰醋酸浓度						
	1%	5%	10%	20%	40%	60%	80%
80 : 20	0.2%	1%	2%	4%	8%	12%	16%
60 : 40	0.4%	2%	4%	8%	16%	24%	32%
40 : 60	0.6%	3%	6%	12%	24%	36%	48%
20 : 80	0.8%	4%	8%	16%	32%	48%	64%

冰醋酸浓度平均值直方图

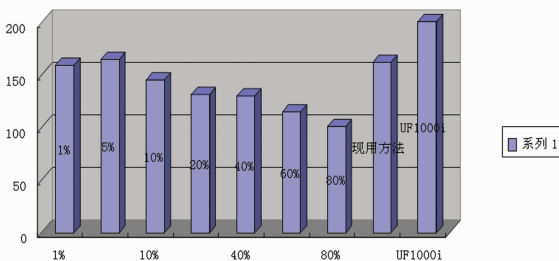


图 1 冰醋酸各种浓度组的均值与现用常规显微镜法及 UF-1000i 尿沉渣仪器法均值直方图

2.3 20 例脑脊液标本不同方法计数结果的 CV 值 结果见

表 5。

脑脊液各种比例组均值直方图

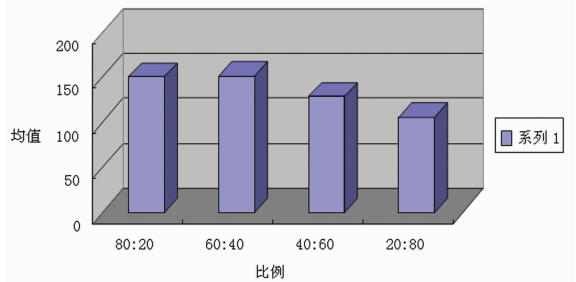


图 2 脑脊液与稀释冰醋酸各种比例组的平均值直方图

表 5 28 种改良显微镜方法计数结果的 CV 值

脑脊液与稀释冰醋酸的比例	冰醋酸浓度						
	1%	5%	10%	20%	40%	60%	80%
80 : 20	红细胞溶解不全	16%	21%	35%	27%	29%	31%
60 : 40		16%	7%	33%	35%	30%	36%
40 : 60		23%	21%	25%	19%	20%	24%
20 : 80		22%	18%	24%	28%	34%	53%

3 讨论

从表 1 可以看出对于同一例脑脊液标本,脑脊液原液分别放置 5、10、20、30 min 后再按现用显微镜计数方法计数,所得到的结果未出现明显减低;而用纯冰醋酸与脑脊液以 1 : 1 的比例混合后放置,其所计数得到的结果与放置脑脊液原液按现用显微镜法计数的结果比较明显减低。而且随着放置时间的延长,其所计数得到的白细胞结果呈逐渐减低的趋势。计数时发现用纯冰醋酸与脑脊液以 1 : 1 的比例混合后的脑脊液中出现大量白细胞裸核,说明浓度过高的冰醋酸对脑脊液中部分白细胞有破坏作用。而如果将脑脊液原液放置时间过久也会导致一些不稳定的白细胞溶解,使得结果偏低。在稳定性试验中放置原液结果基本不减低的原因可能是因为放置的时间还不够长,脑脊液标本还比较新鲜,没有出现计数逐渐降低的情况。

从图 1 中作者观察到随着冰醋酸浓度的升高,白细胞的计数结果呈下降趋势,且显微镜计数法的计数结果与仪器法计数结果高度相关。当冰醋酸浓度为 5%,脑脊液与稀释冰醋酸浓度是 60 : 40 时显微镜计数结果与仪器计数结果最接近,说明在此情况下脑脊液中的白细胞破坏最小,偶然误差最低。图中现用显微镜法计数的结果比某些浓度组的结果高,可能是由于现用显微镜计数方法中冰醋酸的最终浓度小于其浓度组的最终浓度,对脑脊液中的白细胞破坏没有那么严重,所以出现现用显微镜计数方法的计数结果不是 28 种方法最低的情况。建议使用浓度为 5% 的冰醋酸、且脑脊液与 5% 冰醋酸的混合比例为 60 : 40。

表 2 的直方图中,脑脊液与不同浓度冰醋酸 (1%、5%、10%、20%、40%、60%、80%) 按不同比例混合计数所得均值分别为: 159、166、145、132、129、115、101 $\times 10^6 / L$,基本呈现出随着冰醋酸浓度升高,计数结果逐渐下降的情况,符合冰醋酸最终的浓度越高,脑脊液中的白细胞计数越低的理论。

29 种方法中,不精密度最小的是冰醋酸浓度为 5%,脑脊液与 5% 冰醋酸的混合比例为 60 : 40 的这种方法。但是考虑到显微镜计数的偶然误差与设计冰醋酸浓度的组数不足,估计 CV 值最小,平均值最高是稀释冰醋酸浓度为 5%,脑脊液与稀释冰醋酸的浓度比例为 60 : 40 时最佳。(下转第 2507 页)

膜容受性方面起重要作用^[9]。

有研究认为,子宫内膜的厚度与妊娠结局相关^[10]。88.2%成功妊娠者的子宫内膜厚度在 9~12 mm,超声类型呈 A 型^[2],但随后较多研究证实子宫内膜厚度与妊娠结局无关,本研究中治疗后两组子宫内膜厚度比治疗前均明显增厚,但对照组差异无统计学意义($P>0.05$),而观察组差异有统计学意义($P<0.05$),与后者的观点一致。本研究认为,采用经阴道超声监测子宫内膜厚度,虽不能对妊娠结局做出可靠的预测,但对薄型子宫内膜不孕症患者进行干预性治疗。

另有研究认为,子宫内膜的血流分布与妊娠相关。有研究结果显示,在 HCG 注射日监测子宫内膜血流的敏感性和特异性最好。活胎妊娠者的子宫内膜内及内膜下的血流较流产者的丰富。有研究提示,子宫内膜血流与胚胎种植及继续发育有密切关系。本研究中观察组较对照组治疗后 II 型、III 型子宫内膜血流分布明显高于治疗前,但 I 型治疗前后子宫内膜血流分布没有明显变化;观察组生化妊娠率及临床妊娠率均高于对照组。意味着可能薄型子宫内膜的血流分布较内膜厚度对子宫内膜容受性的影响更大;当子宫内膜内及内膜下血流均可检测到者,子宫内膜厚度和形态变得不再重要,其临床妊娠率可能提高,流产率可能降低;对于宫腔粘连分离术后内膜厚度小于 6 mm 的患者,子宫内膜下或内膜内血流分布检出率均明显减低,即使药物或者仿生物电刺激治疗使子宫内膜厚度有所增加,临床妊娠率也没有明显改善。

本研究通过 U8 仿生物电刺激子宫血管平滑肌收缩和松弛,降低血管阻力;增加盆腔、子宫内膜和子宫肌肉的血液循环,增加组织营养;刺激子宫内膜,加速组织修复和生理功能恢复,促进子宫内膜生长,增加子宫内膜厚度,刺激改善盆腔微环境,增加子宫内膜血供,从而改善子宫环境,改善子宫内膜容受性,有提高临床妊娠率的趋势,值得进一步研究推广。

参考文献:

- [1] Raga F, Bonilla-Musoles F, Casa EM, et al. Assessment of endometrial volume by three-dimensional ultrasound

prior to embryo transfer: clues to endometrial receptivity [J]. Hum Reprod(Oxford England), 1999, 14(11): 2851-2854.

- [2] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 731-746.
- [3] 门殿霞, 刘望彭. 经阴道超声评价不孕症患者子宫内膜容受性的研究进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2006, 8(9): 548.
- [4] 乐杰. 妇产科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 351.
- [5] 黄荷凤. 现代辅助生育技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 343-351.
- [6] Chien LW, Au HK, Chen PL, et al. Assessment of uterine receptivity by the endometrial/subendometrial blood flow distribution pattern in women undergoing in vitro fertilization/embryo transfer [J]. Fertil Steril, 2002, 78(2): 245-251.
- [7] 王莹. IVF-ET 中阴道超声对子宫内膜容受性的评价 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(8): 321-333.
- [8] Ng EH, Chan CC, Tang OS, et al. Changes in endometrial and subendometrial blood flow in IVF [J]. Reprod Biomed Online, 2009, 18(2): 269.
- [9] Lesny P, Killick SR, Tetlow RL, et al. Ultrasound evaluation of the uterine zonal anatomy during in vitro fertilization and embryo Transfer [J]. Hum Reprod, 1999, 14(6): 1593-1598.
- [10] Chen SL, Wu FR, Luo C, et al. Combined analysis of endometrial thickness and pattern in predicting outcome of in vitro fertilization and embryo transfer: a retrospective cohort study [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2010, 8: 30.

(收稿日期: 2013-01-08 修回日期: 2013-03-18)

(上接第 2504 页)

理论上应该采用 1% 浓度的稀释冰醋酸,降低酸的浓度,减少白细胞的破坏,但是当冰醋酸浓度为 1%,脑脊液与冰醋酸比例为 80:20 时,其冰醋酸的最终浓度仅有 0.2%,过低的冰醋酸浓度不能使红细胞充分溶解,达不到破坏红细胞以计数白细胞的目的,所以在计数时无法完全排除红细胞的干扰,故不推荐使用浓度为 1% 的冰醋酸。

本实验使用 5% 的冰醋酸与脑脊液按 60:40 的比例充分混匀后充池计数,得出 CV 值最小,平均值最高,找出了最佳的冰醋酸浓度及与脑脊液混合的最适比例,达到了改良现用显微镜法计数脑脊液白细胞的目的。

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,2006:312-314.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods [S]. H20-A, NCCLS, 1992.
- [3] Van AJT, Delanghe JR, Langlois MR, et al. Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid [J]. Clin Chem, 2001, 47(3): 556-560.

[4] Ziebig R, Lun A, Sinha P. Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with the automated hematology analyzer CellDyn 3500 and the urine flow cytometer UF-100 [J]. Clin Chem, 2000, 46(2): 242-247.

- [5] 洪俊,陈进,苏汉桥,等. 全自动血液分析仪对脑脊液细胞检查的应用分析 [J]. 检验医学, 2008, 23(1): 18-20.
- [6] 陈卫民,倪士刚,王伟. Sysmex UF-1000i 尿沉渣分析仪在浆膜腔积液细胞计数中的应用 [J]. 海南医学, 2011, 22(1): 101-102.
- [7] 生媛,王贤. XE-2100 血细胞分析仪在脑脊液白细胞计数中的应用 [J]. 中国医疗设备, 2009, 5: 65, 95.
- [8] 李辉军,田磊,舒学军. BC-5500 全自动血细胞分析仪与 UF-50 尿沉渣分析仪在脑脊液白细胞计数上的应用价值探讨 [J]. 华中华医学杂志, 2008, 32(1): 29-30.
- [9] 王志富,臧玉龙,付艳荣等. 利用三分类血细胞分析仪快速做脑脊液和胸腹水细胞计数及分类的方法 [J]. 检验医学与临床, 2006, 17(5): 79-80.
- [10] 华建江,许珊娜,刘和录等. UF-1000i 尿沉渣仪与 XT-1800i 血球仪联合检测在脑脊液细胞计数中的应用 [J]. 医疗卫生装备, 2010, 31(6): 66-67, 69.

(收稿日期: 2013-01-11 修回日期: 2013-03-15)