

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 244—2005

血小板计数的参考方法

Reference method for platelet counting

2005-5-16 发布

2005-12-1 实施

中华人民共和国卫生部 发布

WS/T 244-2005

前 言

为了保证血小板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、陆红、谷小林、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

血小板计数的参考方法

WS/T 244—2005

Reference method for platelet counting

1 范围

本标准规定了血小板计数参考方法的技术要求。

本标准适用于建立血小板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）-2001 血小板计数的参考方法

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，可提供足够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 本标准采用间接法计数血小板（Platelet, PLT）。即用荧光标记 PLT 后，用流式细胞仪检测红细胞（Red blood cell, RBC）和 PLT 的比值，同时用单通道阻抗原理的半自动细胞计数仪准确计数 RBC，用 RBC 除以 RBC 和 PLT 的比值得出 PLT 的计数值。

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必须进行比对。

5 血小板计数参考方法的原理

首先将 EDTA 抗凝血标本用无菌缓冲液进行预稀释，再用特定的荧光抗体对 PLT 进行染色。溶液中已染色的血小板被稀释成计数浓度，用流式细胞仪检测血小板和红细胞，根据荧光强度和散射光强度将阈值设在可从 RBC 中区分 PLT 的

位置，以检测出 RBC 和 PLT 的比值。用 RBC 的计数值除以 RBC/PLT 的比值计算出 PLT 计数值。

6 血标本

6.1 用合乎要求的塑料注射器或真空采血系统采集健康人的静脉血标本。

6.2 标本的收集要求使用 EDTA 二钾为抗凝剂，抗凝剂的浓度为 3.7 至 5.4 $\mu\text{mol/ml}$ 血（1.5~2.2 mg/ml 血）。

6.3 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。

6.4 标本中不能有肉眼可见的溶血或小凝块。

6.5 标本置于 18°C~22°C 室温条件下，取血后 4 小时之内完成检测。

6.6 为了保证 RBC 和 PLT 分布的均一性，在预稀释和加标记抗体前动作轻柔地将采血管反复颠倒，充分混匀标本。勿使用混匀器对标本进行混匀。

7 容器和器皿

为避免血小板黏附于储存容器或稀释器皿上，在标本检测的整个过程中必须使用聚丙烯或聚苯乙烯容器，不得使用玻璃容器和器皿。

8 仪器的性能

8.1 使用流式细胞仪，通过前向角散射光和荧光强度来检测 PLT 和 RBC。仪器在检测异硫氰酸荧光素标记的直径为 2 μm 的球形颗粒时必须有足够的敏感度。

8.2 用半自动、单通道、阻抗原理的细胞计数仪检测 RBC，仪器小孔管的直径为 80~100 μm ，小孔的长度为直径的 70% 至 100%，计数过程中吸入稀释标本体积的准确度在 1% 以内（溯源至国家或国际计量标准）。

9 试剂

9.1 稀释液：用磷酸盐缓冲液（PBS）作为稀释液，浓度为 0.01 mol/L ，pH 值 7.2~7.4，含 0.1% 的牛血清白蛋白（BSA），配制方法如下：

9.1.1 将 1.15g 无水磷酸氢二钠（ Na_2HPO_4 ；化学分析纯，；分子量为 142.0）加到约 750ml 去离子水或蒸馏水中并使之溶解。

9.1.2 向 210mg 磷酸二氢钾（ KH_2PO_4 ；化学分析纯，分子量为 136.1），8.0g 氯化钠（ NaCl ；化学分析纯，分子量为 58.44），200mg 氯化钾（ KCl ；化学分析纯，分子量为 74.55）和 1.0 g BSA 的混合物中加入去离子水或蒸馏水至 1000ml。保存于 4°C~8°C 条件下。

9.1.3 用低附着性的平均孔径在 0.20~0.25 μm 之间的滤膜过滤。

9. 2 染液：使用异硫氰酸荧光素标记的 CD41 和 CD61 抗体，这两种抗体可以与血小板膜糖蛋白 II_b/III_a 复合物结合，用于检测血小板。

实验室应确认该批号抗体是否能得到足够的染上荧光的小血小板。抗体应能得到足够高的血小板的荧光信号以便通过 log FL1(528nm 处的荧光强度)对 log FS(前向角散射光)的图形分析，将血小板从噪声、碎片和 RBC 中分辨出来。

10 检测过程

10.1 用加样器加 5 μl 充分混匀（至少轻柔颠倒标本管 8 次）的血标本于 100 μl 已过滤的 PBS-BSA 稀释液中。

10.2 加 5 μl CD41 抗体和 5 μl CD61 抗体染液，在室温 18 $^{\circ}\text{C}$ ~22 $^{\circ}\text{C}$ 、避光条件下放置 15 分钟。

10.3 15 分钟后，加 4.85ml PBS-BSA 稀释液制备成 1:1000 的稀释标本，轻轻颠倒混匀以保证 PLT 和 RBC 充分混匀。

10.4 用流式细胞仪检测时，应至少检测 5000 个信号，其中 PLT 应多于 1000。流式细胞仪的设定必须保证每秒计数少于 3000 个信号。如果同时收集到 RBC 散射光的信号和血小板的荧光信号应被视为 RBC-PLT 重叠，计数结果将被分别计入 RBC 和 PLT。

直方图或点图均可被采用，但推荐使用点图。检测过程中推荐使用正向置换移液器。

11 RBC 浓度的计数法

据中华人民共和国卫生行业标准 WS/T XXX-2003：红细胞和白细胞计数的参考方法。

12 血小板计数值的确定

使用流式细胞仪确定 RBC/PLT 的比值

$$R = \text{RBC} / \text{PLT}$$

用 RBC 数除以 R 值得到 PLT 计数值

13 重叠

一旦设定了理想的检测条件，则不须再次进行重叠计数的校准。

14 不精密度

血小板检测结果的不精密度（CV）要求 $\leq 3\%$ 。

Radtek Radtek Radtek
Radtek Radtek Radtek
Radtek Radtek Radtek

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《血小板计数的参考方法》。

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血小板计数的国际标准，保证血小板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.	9. 12	1.0mg → 1.0g	杨振华、朱忠勇	采纳
2.	10.4	阳式 → 正向置换	杨振华	采纳
3.	12	删除举例的内容	金大鸣、杨振华	采纳
4.	11	据 ICSH 参考方法的要求 → 见行业标准《红细胞和白细 胞计数的参考方法》	朱忠勇、杨振华	采纳
5.	10.4	最低含 1000 个 PLT 的标本中 至少计数 50,000 个信号 → 应至少检测 5000 个信号，其 中 PLT 应多于 1000	孙芾、朱忠勇	采纳