

# 华南虎血常规两种测定方法的比较应用

王瑛莹

上海动物园 上海 200335

**摘要:** 通过全自动血细胞分析仪与人工镜检法分别对华南虎 (*Panthera tigris amoyensis*) 血常规进行分析, 并对获得结果做比较分析, 探究建立适合华南虎血细胞分析的方法。收集临床华南虎血液标本 40 份, 分别使用全自动血液分析仪和人工显微镜检法对红细胞、白细胞进行计数检测, 并对白细胞进行分类分析。如人工计数和仪器计数获得的数据均符合正态分布, 则应用配对样本 *T* 检验比较差异性, 否则应用非参数检验(两个相关样本: Wilcoxon 带符号秩检验)。相关性采用 Spearman 分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。结果表明, 通过两种方法获得的红细胞计数、白细胞计数、中性粒细胞比率、嗜酸性粒细胞比率结果差异均不显著 ( $P > 0.05$ ); 淋巴细胞比率、单核细胞比率和嗜碱性粒细胞比率, 两种方法检测结果具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。红细胞计数 ( $r = 0.915$ )、白细胞计数 ( $r = 0.832$ )、淋巴细胞比率 ( $r = 0.832$ )、中性粒细胞比率 ( $r = 0.481$ ) 应用两种方法获得的结果相关性均较好。单核细胞比率 ( $r = 0.283$ )、嗜酸性粒细胞比率 ( $r = 0.309$ )、嗜碱性粒细胞比率 ( $r = 0.146$ ) 两种检测方法相关系数都低于 0.4, 且  $P$  值接近或大于 0.05, 呈弱相关或极弱相关。全自动血细胞分析仪可准确测定华南虎红细胞、白细胞数量, 计数具有准确、快速、可靠的优点; 然而, 该法不适用于白细胞分类计数, 必要时人工与仪器结合方可保证检验结果的准确性。本研究为实现华南虎血细胞快速准确分析提供参考。

**关键词:** 华南虎; 血常规; 全自动血液分析仪; 人工显微镜法

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2020) 02-264-08

## Comparative Application of Two Methods for Determination of Blood Routine in South China Tiger

WANG Ying-Ying

Shanghai Zoological Park, Shanghai 200335, China

**Abstract:** The complete blood count (CBC) of the South China tiger was analyzed by automated hematology analyzer and manual microscope method respectively in this study. By comparing the results obtained from the two methods, a suitable method for CBC of South China tiger was explored. Forty blood samples from South China tiger were collected and examined. When data detected by the two methods were normally distributed, paired sample T-test was used to analyze the difference, otherwise, Wilcoxon signed rank test was used. Correlation analysis was performed by Spearman analysis and the statistical significance was judged

**基金项目** 上海市绿化和市容管理局资助项目;

**第一作者介绍** 王瑛莹, 女, 工程师; 研究方向: 珍稀濒危野生动物保护; E-mail: 329846444@qq.com。

收稿日期: 2019-09-25, 修回日期: 2020-01-08 DOI: 10.13859/j.cjz.202002016

when  $P$  value was less than 0.05. The results showed that there was no significant difference for the red blood cells counts ( $P > 0.05$ ), white blood cells counts ( $P > 0.05$ ), neutrophil ratio ( $P > 0.05$ ), eosinophil ratio ( $P > 0.05$ ) between the two methods. And there were significant differences in the lymphocyte ratio ( $P < 0.05$ ), monocyte ratio ( $P < 0.05$ ) and basophil ratio ( $P < 0.05$ ). The two sets of data were well correlated in red blood cells counts ( $r = 0.915$ ), white blood cells counts ( $r = 0.832$ ), lymphocyte ratio ( $r = 0.832$ ), and neutrophil ratio ( $r = 0.481$ ), while the correlation coefficients of monocyte ratio ( $r = 0.283$ ), eosinophil ratio ( $r = 0.309$ ) and basophil ratio ( $r = 0.146$ ) were lower than 0.4, and  $P$  value was greater than or equal to 0.05, showing weak or extremely weak correlation. Thus, the automatic hematology analyzer can be used to accurately detect the count of both red blood cells and white blood cells of South China tiger, which has the advantages of accuracy, rapidity and reliability. However, this method is not suitable for the classification of white blood cells. If necessary, the accuracy of the results can be guaranteed by combining microscope and machine method. This study provides a reference for the rapid and accurate analysis of blood cells in South China tiger.

**Key words:** The South China tiger; CBC; Automated hematology analyzer; Manual microscope method

华南虎 (*Panthera tigris amoyensis*) 是我国特有的虎亚种, 是中国的十大濒危动物之一, 国家 I 级保护野生动物, 目前几乎在野外灭绝, 仅在各地动物园、繁殖基地里人工饲养着 100 余只 (Fàbregas et al. 2015, Zhang et al. 2019)。华南虎作为森林生态链的重要组成部分和重要成员, 对其进行健康监测和科学管理至关重要。血液学指标是评估动物健康状况和了解各种器官功能状态的重要依据, 血液指标能客观地反映动物机体的生理机能与代谢状况 (Li et al. 2019)。血常规检查是临床上最基础的化验检查之一, 在全身体检中是基本的体检项目, 包括项目主要有红细胞 ((red blood cell, RBC) 计数、白细胞 (white blood cell, WBC) 计数、血小板 (platelet, PLT) 计数、血红蛋白 (hemoglobin, HGB) 测定、红细胞比容 (hematocrit value, HCT) 测定及白细胞分类计数 (Mohamad et al. 2019)。血常规检查是野生动物疾病诊断的重要方式之一, 临床上通过测定血常规生理指标可为疾病的诊断、治疗和判断预后提供参考 (黄淑芳等 2016)。掌握华南虎血常规指标, 实现华南虎的血常规快速准确分析, 在某些特定情况下对华南虎的疾病诊断和治疗干预显得尤为重要。

血常规测定方法目前有自动血细胞分析仪计数法和人工镜检计数法两种。一直以来, 血细胞计数都是以显微镜目视计数法作为“金标准”, 这是任何血细胞分析仪都不能取代的 (王靖 2010)。但是血细胞分析仪计数快速、方便, 测定项目多, 也是显微镜法无法比拟的。随着血细胞分析仪在兽医领域的应用, 大大提高了检验的工作效率和质量, 而且为临床兽医提供了更广泛的参考数据 (叶应妩等 1997)。由于野生动物收集样本困难、样本数量少, 临床上覆盖多种野生动物血细胞参数的自动血细胞分析仪较少, 目前市场上出现的兽用血细胞分析仪的适用性均在探索中。

目前, 上海动物园有五分类全自动血细胞分析仪 (迈瑞 BC-5000Vet, 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司) 一台, 该仪器缺乏虎血常规检测参考指标, 其是否可应用于华南虎血细胞快速分析尚不明确。本研究拟以人工显微镜法测得数据为参照标准, 对全自动血液分析仪和人工显微镜法检测华南虎血细胞数据进行分析, 探讨两者之间的差异性及其成因, 判定全自动血细胞分析仪检测华南虎血常规的可行性, 为实现华南虎血细胞快速准确分析提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 血液样本

采自上海动物园、福建梅花山国家级自然保护区、苏州动物园、洛阳动物园圈养华南虎的血液样本共 40 份，其中，幼龄虎 4 只，成年虎 36 只；雌虎 22 只，雄虎 28 只。收集到血样置于 EDTA-K<sub>2</sub> 真空抗凝管中轻轻颠倒混匀，室温条件下保存备用。

#### 1.2 检验方法

##### 1.2.1 人工镜检计数及华南虎血细胞显微形态

取血液样品 20 μl，加入 2%冰醋酸 380 μl，稀释样品并破坏红细胞，混匀，持续振荡 5 min，取适量混匀液滴入血细胞计数板（图 1）中，显微镜下计数 4 个大方格内白细胞总数 *n*，则白细胞数量为  $(n/20) \times 10^9$  个/L；取血液样品 20 μl，加入 0.9% NaCl 溶液 3 980 μl，稀释血细胞，充分混匀后取适量滴入血细胞计数板中，显微镜下计数 5 个中方格内红细胞总数 *m*，则红细胞数量为  $(m/100) \times 10^{12}$  个/L。取 3 μl 血液制成 6 cm × 2.5 cm 血涂片，用瑞氏-姬姆萨染液染色后用低倍镜观察血涂片的细胞分布情

况，选择血涂片体尾交界染色良好处，用油镜计数 100 个白细胞进行白细胞分类（田露等 2010）。华南虎血细胞显微形态见图 2。检测环境温度温度为 25 °C 左右。

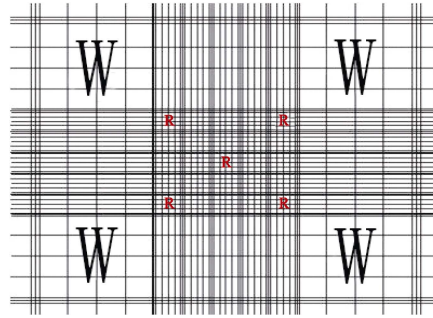


图 1 计数板白细胞 (W)、红细胞 (R) 计数区域  
Fig. 1 Counting area for white blood cells (W) and red blood cells (R)

1.2.2 仪器检验 采用迈瑞 BC-5000Vet 兽用全自动血液细胞分析仪（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司）进行华南虎血常规仪器检测，应用半导体激光流式细胞技术获得白细胞总数和五分类白细胞的分类统计，应用阻抗法进行

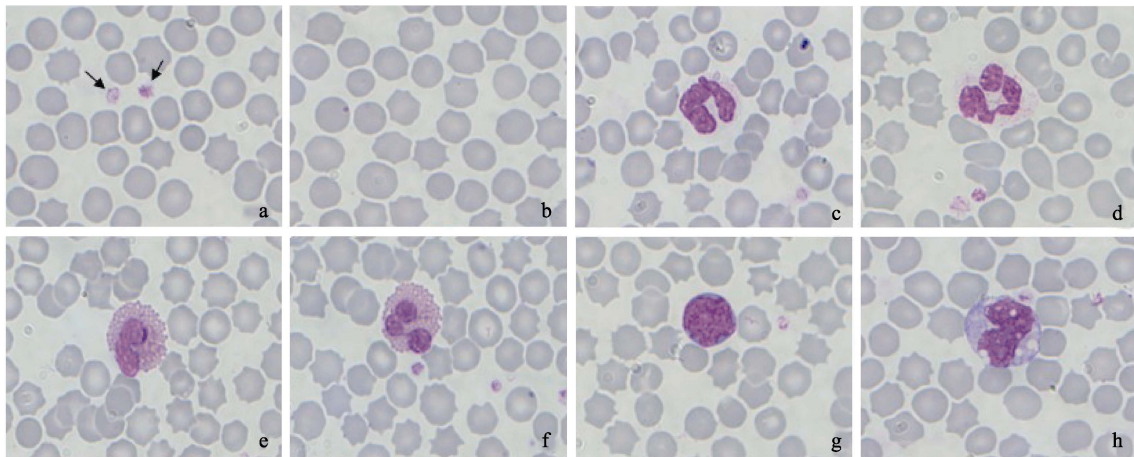


图 2 华南虎血细胞显微形态（截取显微镜视野下部分视野）

Fig. 2 Micrograph picture of South China tiger blood cells (Partial field of view under microscope)

a. 血小板；b. 红细胞；c. 中性杆状核粒细胞；d. 中性分叶核粒细胞；e. 嗜酸杆状核粒细胞；f. 嗜酸分叶核粒细胞；g. 淋巴细胞；h. 单核细胞。放大倍数 1 000 ×。

a. Platelet; b. Red blood cells; c. Neutrophilic stab cells; d. Neutrophilic segmented cells; e. Eosinophilic stab cells; f. Eosinophilic segmented cells; g. Lymphocytes; h. Monocytes. 1 000 ×.

红细胞、血小板计数, 血红蛋白浓度应用比色法测量, 体积计量由体积计量单元中的体积计量管和两个光电传感器测定。严格按照血细胞分析仪的要求定期对血液分析仪进行校准, 操作步骤严格按照仪器的标准操作规程进行, 并记录好分析结果是否异常。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析, 计量数值以平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示, 对测定的数据进行正态分布检验 (样本量不足 50, 采用 Shapiro-Wilk test) (薛薇 2016)。在数据比较过程中, 对应的人工计数和仪器计数两组数据均符合正态分布的数据应用配对样本 *T* 检验比较差异性, 两组中只要有一组不符合正态分布的数据应用非参数检验 (两个相关样本: Wilcoxon 带符号秩检验) 比较差异性。采用 Spearman 做相关性分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 仪器与人工计数稳定性比较

为验证仪器检测与人工计数的在血细胞计数中的稳定性, 使用方法较为成熟的川金丝猴 (*Rhinopithecus roxellanae*) 血液样本为对象, 选取低值、中值、高值 3 个不同细胞密度水平的血细胞样本。根据临床样本细胞密度的分布,

白细胞密度低于  $5 \times 10^9$  个/L 为低值, 高于  $10 \times 10^9$  个/L 为高值, 介于两者之间的为中值; 红细胞密度低于  $3 \times 10^{12}$  个/L 为低值, 高于  $6 \times 10^{12}$  个/L 为高值, 介于两者之间的为中值。每个密度的样本分别使用两种方法重复测定 10 次, 通过平均值、标准差和变异系数 3 种分析指标, 判断两种方法在血细胞计数中的稳定性。两种方法测定白细胞和红细胞数量平均值差别不大 (表 1), 表明 10 次检测中仪器法和手工计数准确性相当。白细胞计数变异系数、红细胞变异系数分析发现, 仪器法小于手工计数法。两种细胞计数标准差差异与变异系数差异情况类似 (表 1)。简言之, 尽管仪器法和人工法计数白细胞和红细胞检测平均值差异不大, 但是仪器法标准差和变异系数均明显低于人工镜检法, 表明仪器法具备更高的稳定性和可重复性。

### 2.2 仪器法与人工镜检法检测华南虎血细胞计数比较

为了比较两种方法在华南虎血细胞计数中的可行性, 使用仪器法与人工镜检法检测对临床收集的虎血液样本进行分析。两种方法检测白细胞密度差异不显著 (配对 *T* 检验,  $P > 0.05$ ), 红细胞密度差异也不显著 (Wilcoxon 符号秩检验,  $P > 0.05$ ) (表 2)。表明仪器法与人工镜检法应用于华南虎白细胞计数和红细胞

表 1 基于金丝猴血液样本两种方法测定低中高密度样本结果

Table 1 Results of low, medium and high density samples measurement with two methods according to Golden Monkey

		人工镜检 Artificial detection			仪器检测 Instrument detection		
		低值 Low value	中值 Median value	高值 High value	低值 Low value	中值 Median value	高值 High value
白细胞 White blood cell ( $10^9$ 个/L)	平均值 Mean	1.49	8.03	14.35	1.93	8.12	12.30
	标准差 Standard deviation SD	0.18	0.95	1.12	0.05	0.12	0.12
	变异系数 Coefficient of variation CV (%)	12.3	11.8	7.8	2.8	1.5	0.9
红细胞 Red blood cell ( $10^{12}$ 个/L)	平均值 Mean	2.47	4.96	6.15	2.85	4.69	6.92
	标准差 Standard deviation SD	0.15	0.78	0.63	0.06	0.05	0.12
	变异系数 Coefficient of variation CV (%)	6.0	15.6	10.2	1.9	0.9	1.7

表 2 人工镜检和仪器检测血细胞统计结果

Table 2 Statistical results of blood cells detected by artificial and instrument

生理指标 Physiological index	样本量 <i>n</i> Sample size	检测方法 Detection method	中位数 Median	平均值 Mean	标准差 SD Standard deviation	<i>P</i>
白细胞 White blood cell (10 <sup>9</sup> 个/L)	39	人工镜检法 Manual method	9.60	10.41	4.27	0.113
		仪器法 Instrument method	11.30	11.05	4.24	
红细胞 Red blood cell (10 <sup>12</sup> 个/L)	25	人工镜检法 Manual method	6.99	6.66	0.37	0.619
		仪器法 Instrument method	7.32	6.74	0.34	

计数分析结果基本一致。

### 2.3 仪器法与人工镜检法用于华南虎白细胞分类计数

白细胞分类计数结果中, 两种方法测得中性粒细胞 (neutrophil, Neu) 比率数据符合正态分布, 组间差异分析采用配对 *T* 检验。淋巴细胞 (lymphocyte, Lym)、单核细胞 (monocyte, Mon)、嗜酸性粒细胞 (eosinophils, Eso) 和嗜碱性粒细胞 (basophil, Bas) 比率两种检测方法差异分析采用 Wilcoxon 符号秩检验。中性粒细胞、嗜酸性粒细胞比率两种方法测定结果无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞比率两种方法统计结果具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。表明应用仪器快速检华南虎外周血白细胞分类计数结果不理想。

### 2.4 仪器法与人工镜检法检测华南虎血细胞结果相关性分析

为了验证仪器法是否可以代替人工计数法

用于华南虎血细胞快速准确分析, 对两种计数方法进行相关性分析。白细胞、红细胞以及白细胞分类计数两种检测方法的主要线性回归参数见图 3。白细胞、红细胞、淋巴细胞比率人工镜检和仪器检测两种方法存在非常好的相关性。中性粒细胞比率两种检测方法结果呈中等程度相关。单核细胞比率、嗜酸性粒细胞比率、嗜碱性粒细胞比率两种检测方法相关系数都低于 0.4, 且 *P* 值接近或大于 0.05, 呈弱相关或极弱相关。

## 3 讨论与分析

本研究首先使用园内血常规检测十分成熟的金丝猴血液样品作为参照, 通过对不同血细胞密度水平的样品多次重复检测, 发现全自动血液细胞分析仪检测方法较人工镜检具有更好的重复性, 说明使用仪器法代替人工检测的必要性。

表 3 仪器法与人工镜检法检测白细胞分类计数的比较

Table 3 Comparison between instrument and artificial detections of leukocyte classification

生理指标 Physiological index	样本量 <i>n</i> Sample size	检测方法 Detection method	平均值 Mean	标准差 SD Standard deviation	中位数 Median	<i>P</i>
淋巴细胞比率 Lymphocyte (%)	40	人工镜检法 Manual method	20.28	13.17	18.50	0.034
		仪器法 Instrument method	16.68	10.24	14.85	
单核细胞比率 Monocyte (%)	40	人工镜检法 Manual method	2.00	2.06	1.00	< 0.001
		仪器法 Instrument method	5.15	4.44	3.75	
中性粒细胞比率 Neutrophil (%)	40	人工镜检法 Manual method	75.08	14.70	77.00	0.728
		仪器法 Instrument method	75.84	12.22	78.15	
嗜酸性粒细胞比率 Eosinophils (%)	40	人工镜检法 Manual method	2.48	3.24	1.50	0.939
		仪器法 Instrument method	2.22	1.82	1.75	
嗜碱性粒细胞比率 Basophil (%)	40	人工镜检法 Manual method	0.13	0.52	0.00	0.004
		仪器法 Instrument method	0.11	0.19	0.10	

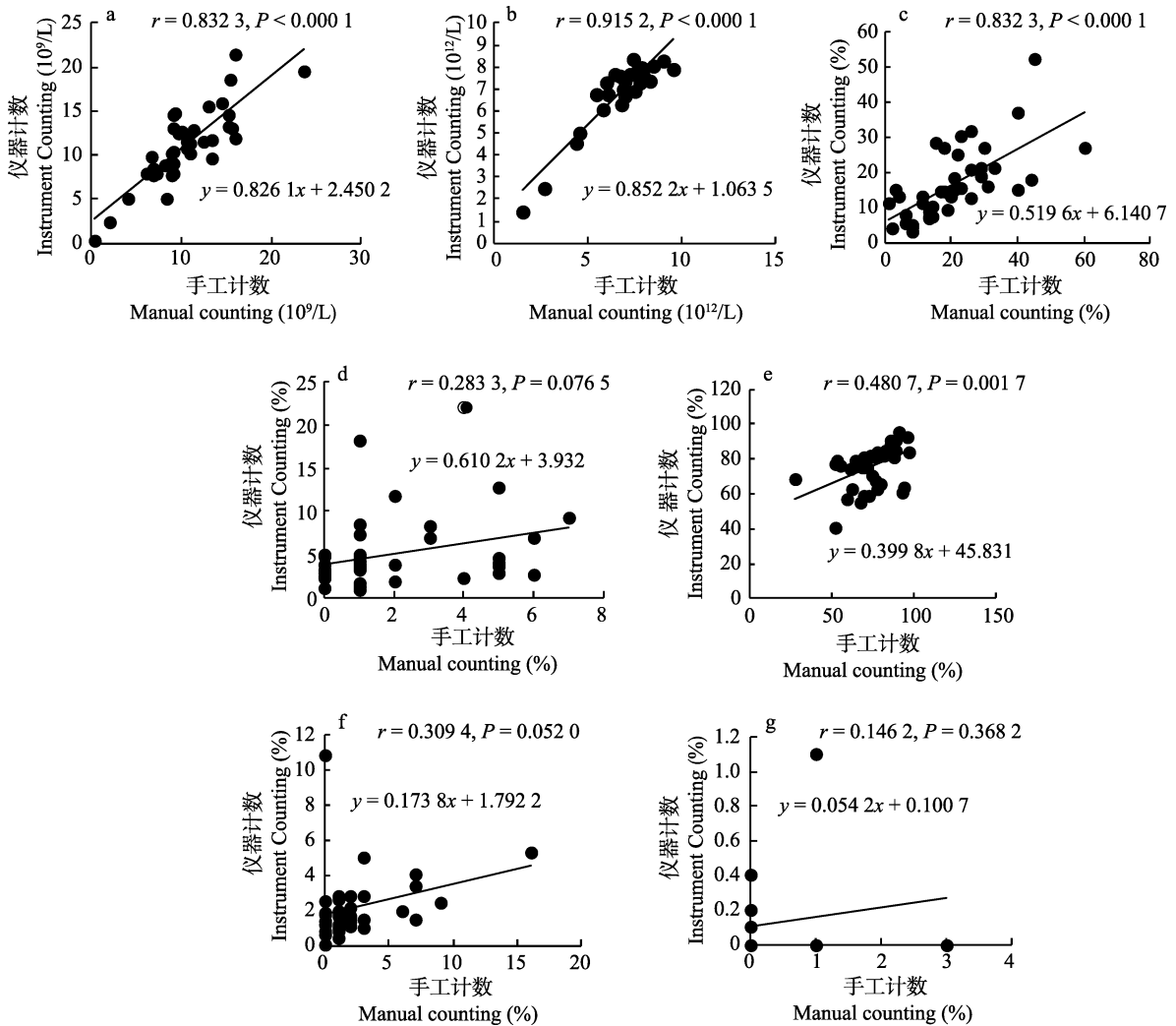


图 3 仪器法与人工镜检法检测结果线性相关分析

Fig. 3 Linear correlation analysis between the results of instrument and artificial detections

a. 白细胞计数; b. 红细胞计数; c. 淋巴细胞比率; d. 单核细胞比率; e. 中性粒细胞比率; f. 嗜酸性粒细胞比率; g. 嗜碱性粒细胞比率。  
 a. Leukocyte count; b. Red blood cell count; c. Lymphocyte ratio; d. Monocyte ratio; e. Neutrophil ratio; f. Eosinophil ratio; g. Basophil ratio.

结合华南虎细胞大小和种属，本实验华南虎血液检测通道选择猫 (*Felis catus*)。把人工计数作为检验标准，分析两种方法计数结果的差异和相关性，来判定全自动血液细胞分析仪检测华南虎血常规的可行性。两种检测方法测定的白细胞和红细胞计数结果无差异，表明仪器法与人工镜检法应用于华南虎白细胞计数和红细胞计数分析结果基本一致。进一步对华南虎白细胞进行分类分析发现，两种方法在检测

中性粒细胞和嗜酸性粒细胞比率时表现出高度一致性 ( $P > 0.05$ )，表明两种方法均适用于中性粒细胞和嗜酸性粒细胞百分比分析；然而，两种方法应用于淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞比率测定时，表现出显著差异 ( $P < 0.05$ )，表明以当前实验条件和参数设置条件下，全自动血液细胞分析仪不能很好反应白细胞中淋巴细胞、单核细胞和嗜碱性粒细胞的占比。为了进一步确定仪器分析法是否可以代替

人工计数法应用于华南虎血细胞快速准确分析,对两种计数方法进行相关性分析。仪器法与人工法检测白细胞和红细胞计数具有较高相关性,进一步说明使用全自动血液细胞分析仪检测华南虎红细胞和白细胞是可行的;然而,两种检测方法检测单核细胞比率、嗜酸性粒细胞比率和嗜碱性粒细胞比率相关系数都低于0.4,且 $P$ 值接近或大于0.05,呈弱相关或极弱相关,进一步说明全自动血液细胞分析仪不适用于白细胞分类分析。

全自动血液细胞分析仪采用半导体激光流式细胞技术获得白细胞总数和五分类白细胞的分类统计,利用低角前向散射光反映细胞体积大小,高角前向散射光反映细胞内部精细结构和颗粒物质,根据采集到的这些信息用散点图来体现(刘晓婷等 2016)。因此在某些血液系统发生疾病时,有些幼稚细胞胞质颗粒物质增多,核型扭曲折叠被仪器误认为单核细胞(詹琦等 2012)。本次实验结果单核细胞有极显著性差异,仪器检测数据明显高于人工镜检结果。仪器是根据细胞核及其体积的大小所产生的脉冲不同而分类的,它对于一些大的单个核的细胞分辨不清,误认为是单核细胞,从而造成单核细胞增多。此次采集的样品中有部分是动物生病期间采集的,有的样本血液中出现过异常淋巴细胞,也有粒细胞核左移的现象,仪器对于这些异常的细胞分辨不清,误认为是单核细胞,这可能是造成仪器计数高于手工计数的原因。由于虎参考指标缺乏,本研究使用亲缘关系较近的猫通道作为参考指标,虎和猫尽管属于同一科,两者白细胞形态可能存在一定差异。这也可能是造成两种检测方法白细胞分类计数结果有显著性差异的原因。使用全自动血液分析仪和人工显微镜法两种方法对华南虎血细胞进行多方面分析,确定仪器分析法可准确测定华南虎红细胞、白细胞数量,计数具有准确、快速、可靠的优点;然而,仪器分析法不适用于白细胞分类计数,必要时通过人工与仪器分析相结合的方式保证检验结果的准确性。此外,

在可能条件下,通过实验条件优化、检测参数重新设定等方式进一步探索适合华南虎血细胞分析方法十分必要。

野生动物由于细胞形态相对复杂,形态各异,某些病理情况下部分细胞形态会发生变化,也会造成仪器对细胞类型的误判,尤其是异型淋巴细胞、有核红细胞、幼稚细胞、中毒细胞等,影响疾病的诊断和治疗(胡翊群 2004)。白细胞分类计数是根据白细胞的形态进行统计的,利用显微镜能够清楚地看到细胞的形态,细胞浆的染色特点,核染色质及核仁。因此,人工镜检不仅能弥补仪器对形态鉴别的不足,还能直观评估和验证血细胞分析仪检测结果的准确性(Altekin et al. 2010)。本实验提示,对野生动物血液临床检验时全自动血细胞分析仪具有快速、稳定的优点,人工镜检能更好地观察血细胞形态,筛查血液系统疾病。两种检测方法在野生动物血常规检验中联合应用,可有效弥补彼此的不足,提升工作效率,提高检验质量,建议在临床上配合应用。

## 参 考 文 献

- Altekin E, Kadicesme O, Akan P, et al. 2010. New generation IQ-200 automated urine microscopy analyzer compared with KOVA Cell Chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 24(2): 67–71.
- Fàbregas M C, Fosgate G T, Koehler G M. 2015. Hunting performance of captive-born South China Tigers (*Panthera tigris amoyensis*) on free-ranging prey and implications for their reintroduction. *Biological Conservation*, 192: 57–64.
- Li K, Liu S X, Yang C Y, et al. 2019. A routine blood test-associated predictive model and application for tuberculosis diagnosis: a retrospective cohort study from northwest China. *Clinical Research Report*, 47(7): 2993–3007.
- Mohammad M A, Mohammad T I. 2019. Machine learning approach of automatic identification and counting of blood cells. *Healthcare Technology Letters*, 6(4): 103–108.
- Zhang W P, Xu X, Yue B S, et al. 2019. Sorting out the genetic

- background of the last surviving South China Tigers. *Journal of Heredity*, 110(6): 641–650.
- 胡翊群. 2004. 临床血液学检验. 北京: 中国医药科技出版社.
- 黄淑芳, 王才益, 卞庆松, 等. 2016. BC-2800Vet 兽用全自动血液细胞分析仪应用于部分野生动物红白细胞计数的探讨. *浙江畜牧兽医*, (6): 5–7.
- 刘晓婷, 向代军, 徐菡, 等. 2016. 迈瑞 BC-5000 全自动血细胞分析仪性能的可靠性研究. *中国医学装备*, 13(4): 36–40.
- 田露, 汤萌, 程爱香. 2010. 血细胞形态学检查在临床工作中的应用体会. *实验与检验医学*, 28(5): 527.
- 王靖. 2010. 白细胞分类显微镜法与 CD-1600 血细胞分析仪法的对比分析. *中国中医药咨询*, 7(2): 119.
- 薛薇. 2016. *SPSS 统计分析方法及应用*. 3 版. 北京: 电子工业出版社, 141–209.
- 叶应妩, 王毓. 1997. *全国临床检验操作规程*. 2 版. 南京: 东南大学出版社, 11.
- 詹琦, 俞萍丽. 2012. 全自动血细胞分析仪计数 LUC 与手工镜检计数幼稚细胞的对照分析. *福建医药杂志*, 34(6): 52–54.