



全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

临床检验基础 实验指导

（第2版）

主编 姜忠信 王元松

中国医药科技出版社

· 全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材 ·

临床检验基础实验指导

(第2版)

主 编 姜忠信 王元松

副主编 龚道元 张式鸿

编 者 (以姓氏笔画为序)

王元松 (青岛大学)

田景惠 (泰山医学院)

闫海润 (牡丹江医学院)

向 阳 (第三军医大学)

刘 帅 (郑州大学)

张式鸿 (中山大学)

林梅双 (广州医科大学)

郑 沁 (四川大学)

姜忠信 (青岛大学)

龚道元 (佛山科学技术学院)

董 立 (山东医学高等专科学校)

傅琼瑶 (海南医学院)

谢婷婷 (贵州医科大学)

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材之一,全书共5章52个实验,主要介绍了血液检验、尿液检验、排泄物与分泌物检验、体腔液检验和脱落细胞学基本检验等内容。本书的实验均为可操作性强,能为诊断疾病、观察病情变化和判断预后提供灵敏度高、特异性高的实验室检查项目,以便培养医学检验(技术)专业学生的临床检验的基本技能。本书供高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业及相关专业本科、专科和成人教育(专升本)各层次学生用作教材,也可作为临床检验人员日常工作、继续教育和职称考试的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

临床检验基础实验指导/姜忠信,王元松主编.—2版.—北京:中国医药科技出版社,2015.8

全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材

ISBN 978-7-5067-7590-8

I. ①临… II. ①姜… ②王… III. ①临床医学-医学检验-医学院校-教学参考资料
IV. ①R446.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第174928号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 889×1194mm¹/₁₆

印张 7³/₄

字数 193千字

初版 2010年2月第1版

版次 2015年8月第2版

印次 2015年8月第1次印刷

印刷 三河市汇鑫印务有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-7590-8

定价 18.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材

建设委员会

主任委员 丛玉隆（中国人民解放军总医院）

副主任委员 （以汉语拼音为序）

樊绮诗（上海交通大学医学院）

胡丽华（华中科技大学同济医学院）

刘新光（广东医学院）

吕建新（温州医学院）

王 前（南方医科大学）

吴忠道（中山大学中山医学院）

姚 智（天津医科大学）

尹一兵（重庆医科大学）

委 员 （以汉语拼音为序）

陈育民（河北工程大学医学院）

洪秀华（上海交通大学医学院）

胡建达（福建医科大学）

胡翊群（上海交通大学医学院）

李咏梅（北华大学医学部）

刘 辉（大连医科大学）

刘成玉（青岛大学医学院）

吕世静（广东医学院）

王 辉（新乡医学院）

徐克前（中南大学湘雅医学院）

姚群峰（湖北中医药大学）

张进顺（河北北方学院）

吴俊英（蚌埠医学院）

郑铁生（江苏大学医学院）

秘 书 长 匡罗均（中国医药科技出版社）

办 公 室 罗万杰（中国医药科技出版社）

尚亭华（中国医药科技出版社）

全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业规划教材

出版说明

全国高等医药院校医学检验专业规划教材,于20世纪90年代开始启动建设。是在教育部、原国家食品药品监督管理局的领导和指导下,在广泛调研和充分论证基础上,由中国医药科技出版社组织牵头江苏大学、温州医科大学、中山大学、华中科技大学同济医学院、中南大学湘雅医学院、广东医学院、上海交通大学医学院、青岛大学医学院、广西医科大学、南方医科大学、301医院等全国20多所医药院校和部分医疗单位的领导和专家成立教材建设委员会共同规划下,编写出版的一套供全国医学检验专业教学使用的本科规划教材。

本套教材坚持“紧扣医学检验专业本科教育培养目标,以临床实际需求为指导,强调培养目标与用人需求相结合”的原则,10余年来历经二轮编写修订,逐渐形成了一套行业特色鲜明、课程门类齐全、学科系统优化、内容衔接合理的高质量精品教材,深受广大师生的欢迎,为医学检验专业本科教育做出了积极贡献。

本套教材的第三轮修订,是在我国高等教育教学改革的新形势和医学检验专业更名为医学检验技术、学制由5年缩短至4年、学位授予由医学学士变为理学学士的新背景下,为更好地适应新要求,服务于各院校教学改革和新时期培养医学检验专门人才需求,在2010年出版的第二轮规划教材的基础上,由中国医药科技出版社于2014年组织全国40余所本科院校300余名教学经验丰富的专家教师不辞辛劳、精心编撰而成。

本轮教材含理论课程教材10门、实验课教材8门,供全国高等医药院校医学检验技术(医学检验)专业教学使用。具有以下特点:

1. 适应学制的转变 第三轮教材修订符合四年制医学检验技术专业教学的学制要求,为目前的教学提供更好的支撑。

2. 坚持“培养目标”与“用人需求”相结合 紧扣医学检验技术专业本科教育培养目标,以医学检验技术专业教育纲要为基础,以国家医学检验技术专业资格准入为指导,将先进的理论与行业实践结合起来,实现教育培养和临床实际需求相结合,做到教师好“教”、学生好“学”、学了好“用”,使学生能够成为临床工作需要的人才。

3. 充实完善内容,打造教材精品 专家们在上一轮教材基础上进一步优化、精炼和充实内容。坚持“三基、五性、三特定”,注重整套教材的系统科学性、学科的衔接性。进

一步精简教材字数，突出重点，强调理论与实际需求相结合，进一步提高教材质量。

编写出版本套高质量的全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材，得到了相关专家的精心指导，以及全国各有关院校领导和编者的大力支持，在此一并表示衷心感谢。希望本套教材的出版，能受到全国本科医学检验技术（医学检验）专业广大师生的欢迎，对促进我国医学检验技术（医学检验）专业教育教学改革和人才培养做出积极贡献。希望广大师生在教学中积极使用本套教材，并提出宝贵意见，以便修订完善，共同打造精品教材。

全国高等医药院校医学检验技术（医学检验）专业规划教材建设委员会

中国医药科技出版社

2015 年 7 月

前言

《临床检验基础》是全国医学院校医学检验（技术）专业的必修课和主干课程之一，为了适应《临床检验基础》（第3版）实验教学的需要，在全国高等医药院校教材建设指导委员会的组织和领导下，我们对上一版《临床检验基础实验指导》进行了修订和完善，既可供全国高等学校医学检验（技术）专业师生使用，也可供临床检验医师、进修人员和实习生在临床检验实际工作中参考。

《临床检验基础实验指导》（第2版）编写的目的是使学生通过实验课的实际操作，巩固所学的理论知识 and 提高临床检验基本技能。其主要内容包括血液检验、尿液检验、排泄物与分泌物检验、体腔液检验和脱落细胞学基本检验等5章，每章又包含几个常用的实验，按实验的目的、原理、材料、操作、参考区间、注意事项等进行编写，突出了检验项目的注意事项、方法学评价和质量控制，以提高学生的实际操作的准确性和选择合理实验方法的能力。

本书在编写过程中得到了各编写单位的大力支持，得到了刘成玉教授、林发全教授、吴晓蔓教授、栗军教授、郑峻松教授的悉心指导，在此一并致谢。同时还要感谢第1版实验指导的主编贺志安教授及各位编委，他们高深的学术造诣、严谨的治学态度和辛勤敬业的工作是第2版实验指导所依托的坚实基础，谨在此向他们表示深切的敬意和感谢。

由于编者的水平有限，纰误疏漏在所难免，欢迎同行专家、广大师生和读者提出宝贵意见。

编者
2015年5月



目录

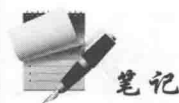
第一章 血液检验	1
实验一 血液标本采集	1
一、皮肤采血法	1
二、静脉采血法	2
实验二 改良 Neubauer 血细胞计数板的使用	3
实验三 血涂片的制备和染色	5
实验四 红细胞计数	9
实验五 白细胞计数	10
实验六 血小板计数	12
实验七 嗜酸性粒细胞直接计数	13
实验八 白细胞分类计数	15
实验九 血细胞形态检查	17
一、白细胞形态检查	17
二、红细胞形态检查	17
三、血小板形态检查	18
实验十 网织红细胞计数	19
一、试管法	19
二、玻片法	21
实验十一 血红蛋白测定	22
一、氰化高铁血红蛋白测定法	22
二、十二烷基硫酸钠血红蛋白测定法	24
实验十二 血细胞比容测定	25
一、微量法	25
二、温氏法	26
实验十三 红细胞沉降率测定	27
一、魏氏法	27
二、自动血沉仪法	28
实验十四 血细胞分析仪的使用及结果分析	29
一、三分群血细胞分析仪的使用及结果分析	29
二、五分类血细胞分析仪的使用及结果分析	30
实验十五 血细胞分析仪校准、性能评价和比对	31
一、血细胞分析仪的校准	31
二、血细胞分析仪的性能评价	34
三、血细胞分析仪的比对	36
实验十六 ABO 血型鉴定	37



一、盐水介质试管法	37
二、盐水介质玻片法	39
三、微柱凝胶介质血型卡法	40
实验十七 Rh D 血型鉴定	41
一、盐水介质法	41
二、酶介质法	41
实验十八 交叉配血试验	42
一、盐水介质法	42
二、抗球蛋白介质法	43
三、低离子聚凝胺介质法	44
四、微柱凝胶抗球蛋白介质法	45
 第二章 尿液检验	47
实验一 尿液理学检查	47
一、尿量测定	47
二、尿液性状检查	47
三、尿液比重测定	48
实验二 尿液酸碱度 pH 试纸法测定	50
实验三 尿蛋白定性检查	51
一、磺基水杨酸法	51
二、加热乙酸法	52
实验四 尿液本周蛋白定性检查	53
一、凝溶法	53
二、对 - 甲苯磺酸法	54
实验五 尿液葡萄糖 Benedict 法定性检查	55
实验六 尿液酮体改良 Rothera 法定性检查	56
实验七 尿液胆红素 Harrison 法定性检查	57
实验八 尿液尿胆原改良 Ehrlich 法定性检查	58
实验九 尿液血红蛋白定性检查	59
实验十 尿液肌红蛋白定性检查	60
实验十一 尿液含铁血黄素定性检查	61
实验十二 尿液卟啉及卟胆原定性检查	62
一、尿液卟啉定性检查	62
二、尿液卟胆原定性检查	63
实验十三 乳糜尿定性检查	64
实验十四 尿液人绒毛膜促性腺激素定性检查	65
实验十五 尿液有形成分检查	66
一、非染色显微镜检查法	66
二、染色显微镜检查法	68
三、尿液有形成分定量计数仪法	69
四、1 小时尿液有形成分排泄率测定	70
实验十六 干化学尿液分析仪检查	71



实验十七 自动尿液有形成分分析仪检查	74
第三章 排泄物与分泌物检验	76
实验一 粪便理学检查	76
实验二 粪便显微镜检查	77
实验三 粪便隐血试验	78
一、单克隆抗体胶体金法	78
二、邻联甲苯胺法	79
实验四 阴道分泌物检查	80
一、阴道分泌物理学检查	80
二、阴道分泌物显微镜检查	80
实验五 精液检查	83
一、精液理学检查	83
二、精液显微镜检查	84
实验六 前列腺液检查	87
一、前列腺液理学检查	87
二、前列腺液显微镜检查	88
第四章 体腔液检验	90
实验一 脑脊液理学检查	90
实验二 脑脊液显微镜检查	91
实验三 脑脊液蛋白质定性检查	93
一、潘迪试验	93
二、硫酸铵试验	94
实验四 浆膜腔积液理学检查	95
实验五 浆膜腔积液显微镜检查	96
实验六 浆膜腔积液黏蛋白定性检查	98
第五章 脱落细胞学基本检验	100
实验一 常规标本制备技术	100
实验二 涂片湿固定技术	101
实验三 脱落细胞检验的基本染色方法	102
一、Papanicolaou 染色法	102
二、苏木精 - 伊红染色法	104
实验四 液基薄层脱落细胞检查技术	105
实验五 细胞涂片观察和结果报告	107



第一章 血液检验

实验一 血液标本采集

一、皮肤采血法

【目的】掌握皮肤采血法和微量吸管的使用方法。

【原理】采血针刺破皮肤毛细血管后，待血液自然流出，用微量吸管采集所需血量。

【材料】

1. 器材 一次性无菌采血针、75% (V/V) 乙醇脱脂棉球、无菌干脱脂棉、一次性微量吸管、乳胶吸头、2ml 吸管、洗耳球、试管和试管架。

2. 试剂 生理盐水（或血细胞稀释液）、75% 乙醇溶液。

【操作】

1. 准备器材 将乳胶吸头套在微量吸管上，检查两者连接处是否漏气。取试管 1 支，加入 2ml 生理盐水。

2. 选择采血部位 一般选择左手无名指；1 岁以下婴幼儿常选择拇趾或足跟内外侧；特殊情况可选择其他手指或耳垂。

3. 按摩皮肤 轻轻按摩采血部位，使局部组织自然充血。

4. 消毒皮肤 用 75% 乙醇脱脂棉球擦拭采血部位，待干。

5. 针刺皮肤 用左手拇指和示指固定采血部位以绷紧皮肤和皮下组织，右手持一次性无菌采血针迅速刺入采血部位，深度 2~3mm，立即出针。

6. 拭去第 1 滴血 待血液自然流出或稍加压力流出后，用无菌干脱脂棉拭去第 1 滴血。

7. 采血 待血液再次自然流出成滴后，以右手拇指和中指夹住微量吸管和吸头连接处，示指盖住吸头小孔，三指轻轻用力，排出适量气体使管内形成负压。将吸管尖轻轻插入血滴中，轻轻放松示指，吸取血液至所需血量。

8. 止血 采血完成后，用无菌干脱脂棉压住采血部位止血。

9. 释放血液 用干脱脂棉沿微量吸管口方向拭净余血，将微量吸管插入含生理盐水（或血细胞稀释液）的试管底部，慢慢排出吸管内血液，吸取试管内上清液冲洗吸管内余血 3 次后排尽液体，立即混匀试管内液体。

【注意事项】

1. 操作前准备 ①受检者准备：标本采集前，使受检者尽量保持安静，减少运动。②器材准备：吸管与胶头连接处应严密不漏气。非一次性微量吸管应定期校准，容量误差 $\leq 1\%$ 。

2. 选择采血部位 所选部位的皮肤应完整，无烧伤、冻疮、发绀、水肿或炎症等。除特殊情况外，不选择耳垂采血。严重烧伤者可选皮肤完整处采血。

3. 消毒皮肤 本试验具有创伤性，必须严格无菌操作，以防采血部位感染；必须使用一次性无菌采血针，做到一人一针一管，避免交叉感染。皮肤消毒后，应待乙醇挥发后采血，否则



血液不易成滴。

4. **针刺皮肤** 进、出针要迅速，伤口深度需达2~3mm。

5. **拭去第1滴血** 因第1滴血混有组织液应拭去。如血流不畅切勿用力挤压，以免混入组织液，影响结果的准确性。如采血用于血细胞分析仪检验，应使用优质无菌纸巾擦血，以免混入棉纤维，影响血细胞分析仪正常工作。

6. **采血** 采血时动作要慢，挤压吸头力度应适宜，防止血液吸入乳胶吸头内。吸血过程中管尖始终不要离开液面，以免吸入气泡。血液凹液面到达吸管刻度线即可。

7. **拭净余血** 吸血后拭净管外余血以保证血量准确。

8. **释放血液** 血液排入试管内速度不宜过快，避免产生气泡。

9. **检测** 采集标本后应及时检测，最好在2小时内完成，标本不宜冷藏。

10. **洗涤吸管** 若采用非一次性微量吸管，使用后应依次用蒸馏水洗净、95% (V/V) 乙醇溶液脱水、乙醚干燥。

二、静脉采血法

【目的】掌握静脉采血法。

【原理】使用注射器或负压采血器刺入浅静脉后，利用负压吸取所需血量。

【材料】

1. **器材** 一次性无菌注射器、试管（含或不含抗凝剂）。一次性负压采血针、负压采血管。压脉带（2~3mm口径的橡皮软管）、无菌棉签、枕垫。

2. **试剂** 30g/L 碘酊、75% (V/V) 乙醇溶液或碘伏、抗凝剂（根据实验项目选择相应的抗凝剂）。

【操作】

1. **准备试管** 仔细阅读受检者申请单，决定采血量，准备所需的试管，并按顺序排列。如其仅做凝血试验一项，最初1ml血液必须丢弃。如做红细胞沉降率测定，需取试管1支，加入抗凝剂（0.109mol/L 枸橼酸钠）0.4ml。

2. **标记试管** 试管上须贴有标签，注明受检者姓名、项目名称、采集日期。

3. **消毒双手** 采血前，操作人员应用消毒液或洗涤剂洗手。

4. **选择静脉** 请受检者取坐位，前臂水平伸直，掌心向上，将肘部置于操作台枕垫上，选择粗大、易于辨认的肘正中静脉进行穿刺。

5. **检查注射器** 打开一次性注射器包装，取下针帽，左手持针头下座，右手持针筒，将针头和针筒紧密连接，并使针头斜面对准针筒刻度，抽拉针栓检查有无阻塞和漏气。最后排尽注射器中的空气，套回针帽，备用。

6. **消毒皮肤** 用30g/L 碘酊棉签自所选静脉穿刺处由内向外、顺时针方向消毒皮肤，待碘酊挥发后，再用75%乙醇棉签以相同方向拭去碘迹，或直接用碘伏消毒，待干。

7. **扎压脉带** 在采血部位上端约6cm处，将压脉带绕手臂一圈打一活结，压脉带游离端向上。嘱受检者握紧和放松拳头几次，使静脉隆起。

8. **穿刺皮肤** 取下针帽，左手拇指固定静脉穿刺部位下端，右手持注射器，示指固定针头下座。保持针头斜面和针筒刻度向上，沿静脉走向使针头与皮肤成30°角斜行快速刺入皮肤，然后以5°角向前穿破静脉壁进入静脉腔。

9. **采血** 左手缓缓向后拉注射器针栓，见回血后，沿静脉走向将针头推入少许。同时松开压脉带，向后拉针栓至所需血量刻度。若使用一次性负压采血器，当采血针头进入血管后会见少量回血，将另一端的胶塞穿刺针插入负压采血管中，因试管内负压作用，血液自动流入试



管，至所需血量刻度后拔出试管即可。

10. 止血 嘱受检者松拳，用无菌棉签压住穿刺点，迅速向后拔出针头。继续紧按无菌棉签 3min。

11. 放血 从注射器上取下针头。将血液沿试管壁缓缓注入试管。若含抗凝剂，需迅速将试管轻轻颠倒混匀 5~8 次。

【注意事项】

1. 操作前准备 ①受检者准备：采血前应向受检者耐心解释，以消除不必要的疑虑和恐惧心理。卧床受检者要求前臂伸展，暴露穿刺部位。②试管（采血管）准备：根据需要选择不同的抗凝剂及其与血液的比例，或不同的负压采血管。③检查注射器：采血前要仔细检查针头是否安装牢固，针筒内是否干燥，是否有空气。所用针头应锐利、光滑、通气，针筒不漏气。一次性无菌注射器只能使用一次，不能反复使用。

3. 选择静脉 如肥胖者静脉暴露不明显时，可以经碘酊、乙醇或碘伏消毒的左手示指，触摸采血部位，寻找静脉走向后凭触摸的方向与深度，试探性穿刺。如肘部静脉不明显或不宜穿刺，也可采用手背静脉等浅静脉穿刺。

4. 消毒 本试验具有创伤性，必须严格无菌操作，以防采血部位感染；必须使用一次性无菌注射器，避免交叉感染。皮肤消毒后，不可再碰触消毒区。

5. 扎压脉带 压脉带绑扎不能过紧，以能减缓远端静脉血液回流，但又不能紧到压迫动脉血流为宜；压迫时间不超过 1min，以避免瘀血、血液浓缩和血液 pH 改变等，影响某些实验结果。

6. 穿刺 不能从静脉侧面进针。针头进入静脉的感觉是：皮肤有一定阻力，而静脉壁阻力较小，更富弹性。

7. 采血 进针后见到回血，再沿静脉走向将针头推入少许，以免针头滑出；但不可用力深刺，以免造成血肿。抽血时针栓只能向外抽，不能向静脉内推，以免形成空气栓塞，造成严重后果。

9. 止血 用无菌棉签压迫穿刺点时，不要弯曲手臂，以免形成血肿。老年人、服用抗凝药者、肝功能异常者，需延长按压时间。

10. 放血 普通静脉采血法应先取下注射器针头，将血液沿试管壁缓缓注入试管，以免产生气泡或溅出。若含抗凝剂，需迅速将试管轻轻颠倒混匀 5~8 次，并防止泡沫产生和溶血。

11. 标本保存与检测 标本采集后应立即送检，实验室接到标本后应尽快检测。抗凝静脉血可稳定 8~12h，如不能及时测定，应置于 4℃ 保存。测定前，须恢复至室温并混匀。用于生物化学检查的标本若不能及时检测，应及时分离血清（浆）并进行适当的处理。

【实验讨论】

- (1) 如何使病人克服恐惧心理，积极配合采血？
- (2) 两种采血方法的异同点与关键的环节有哪些？
- (3) 血液标本保存与处理应注意哪些问题？

实验二 改良 Neubauer 血细胞计数板的使用

【目的】 掌握改良 Neubauer 血细胞计数板的结构和使用方法。

【原理】 混匀稀释的血液或体液，滴入具有固定体积和精密划分刻度的改良 Neubauer 血细胞计数板中，显微镜下观察并计数一定区域内的细胞数，再乘以稀释倍数，即可换算成单位体



积内的细胞数。

【材料】

1. 器材 ①普通显微镜、改良 Neubauer 血细胞计数板、血盖片。改良 Neubauer 血细胞计数板由 2 个计数室（图 1-1）组成。计数室中的中央大方格用双线划分为 25 个中方格。位于四角的 4 个大方格用单线划分为 16 个中方格（图 1-2）。改良 Neubauer 血细胞计数板的应用见表 1-1。②试管、试管架、刻度吸管、洗耳球、微量吸管、乳胶吸头、干脱脂棉、玻璃棒、显微镜、绸布。

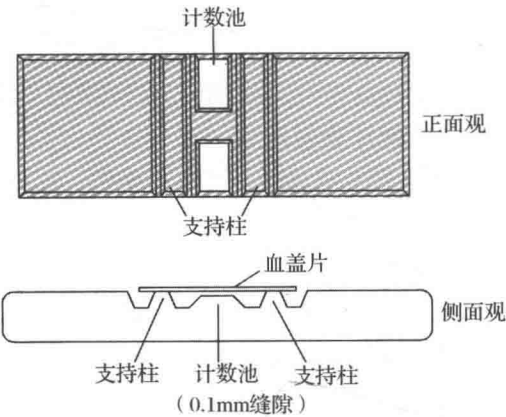


图 1-1 改良 Neubauer 血细胞计数板结构图

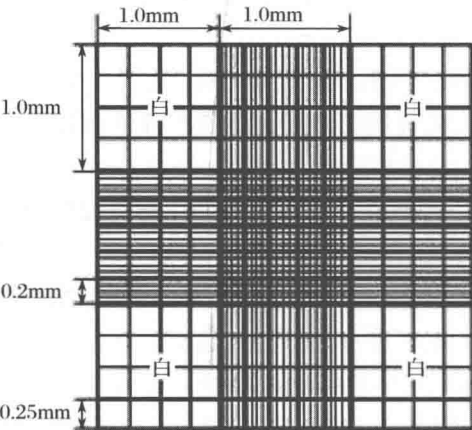


图 1-2 血细胞计数区域

表 1-1 改良 Neubauer 血细胞计数板的应用

计数细胞种类	计数域	计算（细胞数/L）
红细胞、血小板	中央大方格中的四角及中央 5 个中方格	$N \times 5 \times 10 \times \text{稀释倍数} \times 10^6$
白细胞	四角 4 个大方格	$N/4 \times 10 \times \text{稀释倍数} \times 10^6$
嗜酸粒细胞、体腔液细胞、精子	两侧计数室四角及中央 5 个大方格共 10 个大方格	$N \times \text{稀释倍数} \times 10^6$

2. 试剂 白细胞稀释液、红细胞稀释液。
3. 标本 毛细血管血或 EDTA 抗凝新鲜全血。

【操作】

1. 准备计数板 取洁净的改良 Neubauer 血细胞计数板平置于操作台上，采用推式法即从



计数板下缘向前平推血盖片，将其盖在计数室上。

2. 稀释血液 取试管2支，标明A、B，分别加白细胞稀释液0.38ml、红细胞稀释液2ml，再分别加血液20 μ l、10 μ l，混匀制成血细胞悬液。

3. 充液 用微量吸管吸取或用玻棒蘸取已充分混匀的血细胞悬液A液1滴，滴于计数板和血盖片交界处（不能碰到血盖片），利用虹吸作用让液体顺其间隙充满计数室；以相同方法取血细胞悬液B液充另一侧计数室，静置2~3min，待细胞下沉。

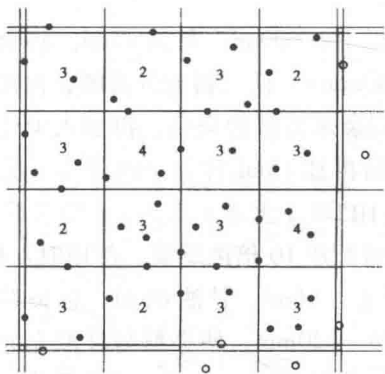


图1-3 血细胞计数原则

4. 计数 先用低倍镜观察，降低聚光器、缩小光阑使光线减弱，以便观察整个计数板结构及特征，同时观察血细胞分布是否均匀。在低倍镜下分别计数四角4个大方格的白细胞数并记录；在高倍镜下分别计数中央大方格中四角及中央5个中方格的红细胞数并记录（图1-2）。

5. 计数原则 ①按照一定顺序计数。②逐格计数。③对压线细胞遵循数上不数下、数左不数右的原则（图1-3），以免重复或遗漏。

【注意事项】

1. 改良 Neubauer 血细胞计数板

(1) 定期检查计数板：每隔1年鉴定1次，以防不合格或磨损而影响计数结果的准确性。①血盖片：血盖片为长方形，规格为24.0mm×20.0mm×0.6mm，肉眼观察正面应平滑，侧面呈直线状，检查包括厚度和平整度。厚度检查使用千分尺对血盖片的厚度进行多点测定，最少测9个区，每区测2点，要求区域间厚度差<2 μ m；平整度检查使用平面平晶仪检测血盖片两表面的干涉条纹，其条纹细密均匀或微量弯曲即符合要求。②计数室深度：将微米级千分尺尾部垂直架在计数板两堤上，移动尾部微米级千分尺，多点测量计数室的高度误差应在 $\pm 2\%$ （ $\pm 2\mu$ m）以内。

(2) 保证计数板和血盖片清洁：操作中手指勿接触计数板表面，以防污染。如使用血液充液，计数板和血盖片使用后应依次用95%（V/V）乙醇、蒸馏水棉球擦拭，最后用清洁绸布拭净。切勿用粗糙织物擦拭，以免磨损计数板上的刻度。

2. 充液 计数板应平放。充液前要充分混匀细胞悬液，充液必须一次性完成，不能断续充液、满溢、不足或有气泡，否则应拭净计数板及血盖片后重新操作。充液后不能移动或触碰血盖片。

3. 静置计数板 红细胞和白细胞计数时一般需将已充液的计数板静置2~3min，血小板计数需静置10~15min。注意保湿，放置时间过长会造成稀释液挥发。

4. 计数 血液稀释后应在1小时内计数完毕，以免血细胞凝集、稀释溶血、液体挥发后浓缩或分布不均。若细胞分布不均，应重新充液计数。计数红细胞、血小板用高倍镜，计数白细胞用低倍镜。应遵循计数原则，计数细胞时注意与非细胞成分相区别。

【实验讨论】

- (1) 影响细胞计数的关键环节是什么？
- (2) 如何评价细胞计数的准确性和精密度？

实验三 血涂片的制备和染色

【目的】掌握血涂片的制备和染色方法。



【原理】取1滴血于载玻片上推成均匀的血膜，并进行染色。染料含伊红和亚甲蓝，细胞中的碱性物质与酸性染料伊红结合染成红色；而酸性物质与碱性染料亚甲蓝结合染成蓝色。中性物质则同时与伊红和亚甲蓝结合，染成淡紫红色，从而使不同细胞呈现不同的染色特点。

【材料】

1. 器材 显微镜、载玻片、推片、洗耳球、一次性无菌采血针或注射器、记号笔、蜡笔和染色架等。

2. 试剂

(1) Wright 染液：① Wright 染料 1.0g、甲醇（AR 级以上）600ml、甘油 15ml。将全部染料放入清洁干燥的乳钵中，先加少量甲醇慢慢研磨（至少 30min），使染料充分溶解，再加少许甲醇混匀，然后将溶解部分倒入洁净的棕色瓶内，乳钵内剩余未溶解的染料，再加入少许甲醇细研，如此反复，直至染料全部溶解，甲醇用完为止。最后再加 15ml 甘油密闭保存。②磷酸盐缓冲液（pH 6.4 ~ 6.8）： KH_2PO_4 （无水）6.63g， Na_2HPO_4 （无水）2.56g，加蒸馏水至 1000ml。配好后用磷酸盐溶液校正 pH，塞紧瓶口贮存。也可配成 10 倍浓缩液，使用时再稀释。

(2) Giemsa 染液：Giemsa 染料 1.0g、甲醇（AR 级以上）66ml、甘油 66ml。将染料全部倒入盛有 66ml 甘油的圆锥烧瓶内，在 56℃ 水浴锅中加热 90 ~ 120min，使染料与甘油充分混匀溶解，然后加入 60℃ 预热的甲醇，充分摇匀后放棕色瓶内，室温下静置 7 天，过滤后使用。此染液放置越久，染色效果越好。

(3) Wright - Giemsa 复合染液：①中性甘油：取甘油与水按体积比 1:1 混合，加酚酞指示液 2 ~ 3 滴，用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液滴定至溶液显粉红色即可。②Wright - Giemsa 复合染液：Wright 染料 1.0g、Giemsa 染料 0.3g、甲醇（AR 级以上）500ml、中性甘油 10ml。将 Wright 染料和 Giemsa 染料置洁净研钵中，加少量甲醇研磨片刻，吸出上层混合液。反复数次，至 500ml 甲醇用完为止。将上层液体收集于棕色玻璃瓶中，每天早、晚各摇 3min，共 5 天，再存放 1 周后即可使用。③磷酸盐缓冲液（pH 6.4 ~ 6.8）： KH_2PO_4 （无水）6.63g、 Na_2HPO_4 （无水）2.56g、加少量蒸馏水溶解，用磷酸盐溶液调整 pH，加蒸馏水至 1000ml。

3. 标本 毛细血管血或 EDTA 抗凝新鲜全血。

【操作】

1. 采血 采集毛细血管血 1 滴置于距载玻片一端 1cm 处，也可以使用玻璃棒、微量吸管或注射器针头等取 EDTA 抗凝新鲜全血 1 滴加在载玻片上，直径约 4mm。

2. 制备血涂片 左手平执载玻片两端，右手持推片从血滴前方向后移动并接触血滴，使血液沿推片边缘展开，将推片与载玻片呈 30° ~ 45° 角，匀速向前将血液制成厚薄适宜的血涂片（图 1-4）。血膜呈清晰的舌形，有头、体、尾三部分，且边缘整齐、两侧留有一定的空隙。

3. 干燥 将推好的血涂片在空气中晃动，使其迅速干燥。

4. 标记 在载玻片的一端用记号笔编号，注明受检者姓名。

5. 染色

(1) Wright 染色法：待血涂片干透后，用蜡笔在其两端画线，以防染色时染液外溢。将血涂片平放在染色架上，加染液数滴，以覆盖整个血膜为宜，0.5 ~ 1min 后，滴加等量或稍多的

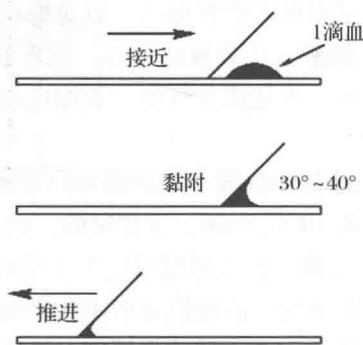


图 1-4 血涂片制备示意图



缓冲液，用洗耳球对准血涂片吹气，使染液与缓冲液充分混匀。室温下放置 5 ~ 10min 后用流水冲去染液，待干。

(2) Giemsa 染色法：将固定的血涂片置于被 pH 6.4 ~ 6.8 磷酸盐缓冲液稀释 10 ~ 20 倍的 Giemsa 染液中，浸染 10 ~ 30min（标本较少可用滴染）。取出后用流水冲洗，待干。

(3) Wright - Giemsa 复合染色法：操作步骤与 Wright 染色法相同，但用 Wright - Giemsa 复合染液和缓冲液分别替代 Wright 染液和相应的缓冲液。

6. 观察结果

(1) 肉眼观察：染色前血膜呈肉红色。厚薄适宜，头、体、尾分明，分布均匀，两侧留有一定的空隙，边缘整齐；染色后呈淡紫色。

(2) 显微镜观察：将干燥后的血涂片置于显微镜下观察。用低倍镜观察血涂片体、尾交界处的血细胞分布及染色情况。油镜下，成熟红细胞呈粉红色；白细胞核呈紫色，粒细胞胞质颗粒呈现特有的颜色；单核细胞胞质呈灰蓝色；淋巴细胞胞质呈淡蓝色；血小板呈紫色。

【注意事项】

1. 载玻片 ①必须清洁、干燥、中性、无油脂，表面无划痕、边缘完整。新载玻片常有游离的碱性杂质，应用 10% 盐酸浸泡 24 小时、清水彻底冲洗、擦干备用。使用过的载玻片在含适量肥皂水或洗涤剂的水中煮沸 20min，用热水洗净、再用清水反复冲洗、蒸馏水浸洗、擦干或烤干后备用。②使用时，只能手持载玻片边缘，切勿触及表面。

2. 标本 ①首选皮肤采血的标本（非抗凝血），也可用 EDTA 抗凝新鲜全血。EDTA - K₂ 能阻止血小板聚集，利于观察血小板形态。抗凝血液标本应在 4 小时内制作涂片，用于血象分析的抗凝血不宜冷藏。②不能使用肝素抗凝标本。

3. 推片 对血细胞比容高、血黏度高者推片速度要慢、角度要小；反之，血细胞比容低于正常、血黏度较低者推片速度要快、角度要大，方可获得满意的血涂片。

4. 涂片制备 ①血量多少、血液黏度、推片角度和速度可影响血膜大小。血滴大、血黏度高、推片角度大、速度快则血膜厚，反之则血膜薄。针对不同病人应有的放矢，对血细胞比容高、血黏度高的病人应采用小血滴、小角度、慢推；而贫血病人则应采用大血滴、大角度、快推。②血膜面积不宜太小，否则，血膜可观察的部分太小。③若全血中白细胞减少影响分类，或进行疟原虫、微丝蚴检查等需采用厚血涂片法时，可将抗凝血液标本离心后取其灰白层涂片，以提高阳性检出率。④血涂片制备质量问题与可能的原因见图 1 - 5 和表 1 - 2。

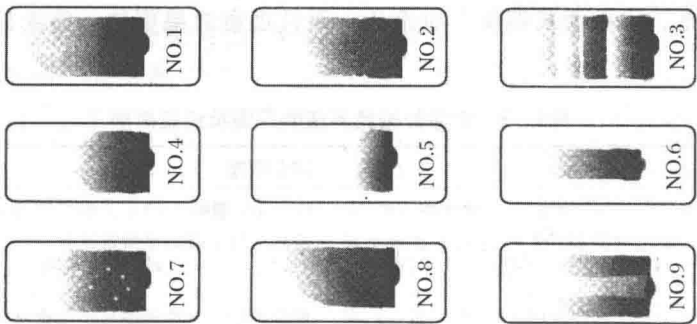


图 1 - 5 血涂片制备质量比较

NO. 1 为血涂片质量好，NO. 2 ~ NO. 9 为血涂片质量差。