

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验等专业使用

临床基础检验学 实验指导

主 编 夏曙华



科学出版社

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验等专业使用

临床基础检验学实验指导

主 编 夏曙华

副主编 莫 非 钟春琍 王正蓉

编 者 (以姓氏笔画为序)

王永伦(遵义医学院)

王世君(贵阳医学院)

王正蓉(贵阳医学院)

朱 江(贵州省人口计生科研所)

李林杰(贵阳市护理职业学院)

邹 阳(贵州省检验中心)

张 姝(贵阳医学院)

陈 瑜(贵阳医学院)

余 蕾(贵阳医学院)

钟春琍(贵州省人口计生科研所)

莫 非(贵阳医学院)

夏曙华(贵阳医学院)

黄 莉(贵阳医学院)

渠 巍(贵阳市妇幼保健院)

程树强(贵阳医学院)

谢婷婷(贵阳医学院)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书是全国高等院校医学检验专业实验教学系列规划教材之一,全书分八章共 52 个实验和 2 个附录。第一章为临床检验基本技术,介绍实验常规器材的使用和基本技术训练;第二章至第六章为临床检验学基本实验技术及验证性实验,按照标准化、规范化操作规程要求,介绍血液、尿液、粪便、生殖系统分泌物、其他体液的常规检验技术,更加注重检验技术与临床实际操作的紧密结合,特别有助于学生把临床检验与诊断相结合,对学生掌握本学科的基本知识、基本技能和今后的临床工作具有参考价值。第七章临床检验技能综合训练及第八章研究应用性实验从综合性、设计性、应用性等多角度出发,介绍了具有重要临床应用价值的基本技术和实验,尤其是对血细胞分析仪的校准、性能评价、检测结果比对、室内质控、室间质评等的阐述,着重强调了临床实验室质量管理,提高检测结果的科学性、准确性和可比性,旨在提高学生对本学科理论和实践的综合运用能力,还可培养学生科研设计能力、实验技能、综合实验能力,为今后的临床工作打下理论和实践的基础。附录介绍了临床检验项目 SOP 编写要求和医学实验室医疗废物处理及要求,强调了实验室整体管理,增加了本书实用性。

本书可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用,并可用作临床医学、医学影像学、麻醉学、法医学、预防医学以及药学专业实验教学的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

临床基础检验学实验指导 / 夏曙华主编. —北京:科学出版社,2012.6

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-034998-9

I. 临… II. 夏… III. 临床医学-医学检验-医学院校-教材 IV. R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 134182 号

责任编辑:王 颖 李国红

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京佳艺恒彩印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 6 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012 年 6 月第一次印刷 印张:11 1/2 插页:2

字数:263 000

定价:32.80 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》 编写指导委员会

顾 问 郑铁生
主 任 杨国珍
副主任 李永念
委 员 (按姓氏笔画排序)
王正蓉 王良宏 王豫萍 李 兴
肖 芸 谷俊莹 张亚莉 罗昭逊
费 樱 莫 非 夏曙华 黄 海
黄韵祝 蒋红梅 曾小菁 潘 卫
秘 书 潘 卫 谷俊莹

序

医学检验是临床医学与实验医学的有机结合,是运用物理学、化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、生物信息学、细胞学等技术,为疾病预防保健、疾病诊断、治疗及科研等提供客观依据的一门学科。医学检验专业的培养目标是培养既具有基础医学、临床医学和检验医学理论知识,又具有实验室基本技能和一定创新能力的高级医学检验人才。

按照《教育部关于“十二五”普通高等教育本科教材建设的若干意见》(教高〔2011〕5号)“充分发挥高等学校在教材建设中的主体作用。……高等学校要根据学校特色,促进教材建设与人才培养相结合,与专业建设、课程建设、科研工作、教学方式方法改革和教学辅助资源建设相结合,形成良性互动,建设高质量教材”的精神,这套《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》由贵阳医学院牵头,联合第三军医大学、湖北医药学院、北京大学医学部、湖南师范大学、宁夏医科大学、遵义医学院、昆明医学院、海南医学院、徐州医学院、贵阳中医学院、贵阳护理职业学院等高等医药院校和贵州省临床检验中心、贵州省人口计生科研所、贵州省人民医院、贵州省血液中心、贵阳市妇幼保健儿童医院、广州军区总医院以及贵州省肿瘤医院的专家教授共同编写。这套教材包括了医学检验专业课程的七本实验教材,分别是《临床基础检验学实验指导》、《临床生物化学检验实验指导》、《临床微生物学检验实验指导》、《临床免疫学检验实验指导》、《临床血液学检验实验指导》、《分子诊断学实验指导》及《临床输血学检验实验指导》。本教材可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。

本书的顺利出版,是各位编者辛勤劳动的结果,也得到各参编单位的大力支持,尤其得到教育部国家级教学团队、高等学校特色专业建设点、贵州省高等学校教学内容和课程体系改革重点项目、贵州省教育厅省级实验教学示范中心和贵州省卫生厅、贵阳医学院及贵阳医学院附属医院专项资金的资助,在此一并致谢。

敬请各位读者在使用中多提宝贵意见,以利修改再版。

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》编写指导委员会
2012年元月

前 言

临床基础检验是医学检验学中的一个重要分支,是近年来发展较快的学科之一,其主要是通过感官的、理学的、化学的以及现代自动化仪器的方法,检查患者的血液、体液、分泌物和排泄物,以获得疾病的病原、病理变化和机体功能状态等,为临床疾病预防、诊断、疗效、预后等提供依据。同时,临床基础检验也是一门集微观形态学和宏观理化检验于一体的检验学,是临床和实验室技术紧密结合的综合性应用学科。

本教材主要围绕学生能力、素质的培养和提高,重视检验质量、医疗服务、生物安全意识和临床思维能力的全面培养进行编写。本书的实验教学内容分为三个层次:验证性实验、综合性实验、研究应用性实验。其中,验证性实验详细撰写了临床检验的基本技术和临床基础检验学的经典试验,按实验目的、原理、器材、步骤、注意事项、方法学评价、思考题进行编写,体现了基础理论、基本知识、基本技能;综合性实验是根据临床检验的实际运用情况,按实验设计思路与目的、实验原理、器材、步骤、结果、结果分析、讨论提纲进行编写,用以提高学生对实验的质量控制、结果分析、完整实验报告等方面的综合运用能力;研究应用性实验是从检验与临床相结合的角度出发设计,并按总的实验设计思路与目的、实验步骤、实验设计提示、实验报告要求及每个实验的研究目的、研究背景、临床资料、实验器材、实验检查项目、实验步骤、讨论提纲进行编写;用以培养学生科研设计能力、实验技能、综合实验能力、与临床结合运用和分析的能力,为今后的临床工作打下理论和实践的基础。

本教材的作者均是长期从事临床基础检验学的临床、教学及科研的中青年教师,在编写过程中,他们查阅大量的文献资料,力求内容新颖而实用,体现应用性、综合性和设计性。本书图文并茂,病例真实生动,是集教师们多年的临床经验,涵盖了临床基础检验常见的各种有形成分的形态学特点,特别有助于学生把临床基础检验与临床诊断相结合,另外,还提供了临床检验项目 SOP 编写要求和医学实验室医疗废物处理及要求,不仅是医学检验专业学生的实习指导,也可以作为医院从事临床检验人员的专业指导书。

由于时间有限、经验不足,加之检验医学日新月异,难免有疏漏之处,敬请各位同仁批评指正,以便再版时更正。在此诚表谢意!

夏曙华

2012年4月

目 录

序 前言

第一篇 临床基础检验学实验技术及验证性实验

第一章 临床检验基本技术	(1)
实验一 光学显微镜的使用	(1)
实验二 微量吸管的使用	(2)
实验三 改良 Neubauer 计数盘的使用	(4)
实验四 血涂片制备与染色	(7)
实验五 血液标本采集	(12)
第二章 血液一般检验	(17)
实验一 白细胞计数	(17)
实验二 白细胞分类计数	(18)
实验三 外周血白细胞形态学检查	(21)
实验四 嗜酸粒细胞计数	(23)
实验五 血小板计数	(24)
实验六 红细胞计数	(26)
实验七 血红蛋白测定(氰化高铁血红蛋白测定法)	(27)
实验八 红细胞形态学检查	(31)
实验九 红细胞比容测定	(32)
实验十 网织红细胞计数	(35)
实验十一 红细胞沉降率测定	(38)
实验十二 血细胞分析仪的使用	(40)
第三章 尿液检验	(49)
实验一 尿液一般检查	(49)
实验二 尿渗透量测定	(54)
实验三 尿液蛋白质定性实验	(55)
实验四 尿液葡萄糖班氏定性实验	(58)
实验五 尿液酮体定性测定	(59)
实验六 尿液胆红素定性测定(Harrison 法)	(61)
实验七 尿胆原定性测定(改良 Ehrlich 法)	(62)
实验八 尿液本周蛋白定性检查	(64)
实验九 乳糜尿定性检查	(66)
实验十 尿液人绒毛膜促性腺激素定性检查	(67)

实验十一 尿液的有形成分检查	(68)
实验十二 尿液有形成分的定量计数	(76)
实验十三 尿液自动化分析仪检验	(79)
第四章 粪便检验	(85)
实验一 粪便常规检查	(85)
实验二 粪便分析工作站	(87)
实验三 粪便隐血试验	(88)
第五章 生殖系统分泌物检查	(92)
实验一 精液检验	(92)
实验二 前列腺液检查	(100)
实验三 阴道分泌物检验	(102)
第六章 其他体液	(107)
实验一 脑脊液常规检验	(107)
实验二 浆膜腔积液常规检验	(112)
实验三 关节腔积液检验	(117)
实验四 痰液检查	(118)
实验五 胃液与十二指肠引流液检验	(120)
实验六 羊水检查	(123)

第二篇 临床基础检验学综合性实验及研究应用性实验

第七章 临床检验技能综合训练	(129)
实验一 血常规检查与临床检验基本技术综合性实验	(129)
实验二 红细胞平均指数测定与临床检验基本技术综合性实验	(132)
实验三 尿液常规检验与临床检验基本技术综合性实验	(133)
实验四 血细胞分析仪的校准	(134)
实验五 血细胞分析仪的性能评价	(138)
实验六 血细胞分析仪检测结果的比对	(143)
实验七 临床血液常规检验室内质控	(146)
实验八 临床血液常规检验室间质量评价	(152)
第八章 综合性、设计性、应用性的“三性”跨学科实验设计	(156)
实验一 传染性单核细胞增多症的实验室诊断	(157)
实验二 系统性红斑狼疮肾损害的实验室诊断	(159)
参考文献	(161)

附 录

附录一 临床检验项目 SOP 编写要求	(162)
附录二 医学实验室医疗废物处理及要求	(172)
彩图	

第一篇 临床基础检验学实验技术 及验证性实验

第一章 临床检验基本技术

实验一 光学显微镜的使用

【实验目的】

1. 掌握光学显微镜的正确使用和维护方法。
2. 熟悉光学显微镜的结构和原理。

【实验原理】

光学显微镜是由物镜和目镜两组会聚透镜组成的光学折射成像系统。置于物镜前方的被观察物被作第一级放大成一倒立实像,该实像再被目镜作第二级放大成一虚像,位于人眼的明视野处。

【实验器材】

1. 器材 光学显微镜、擦镜纸。
2. 试剂 香柏油、清洁液(乙醚与无水乙醇 3:7)。
3. 标本 瑞氏染色血涂片。

【实验步骤】

1. 实验准备

(1) 右手握镜臂,左手托镜座,平贴胸前,将显微镜从镜箱内取出后置于平稳的实验台上,熟悉显微镜的结构。

(2) 打开电源开关,旋转粗准焦螺旋,将载物台降至最低,旋转光调节旋钮,调整聚光器高度和光栅大小,使光强度适中。

(3) 将瑞氏染色血涂片置于载物台上并正对通光孔的中心。

2. 低倍镜观察

(1) 转动转换器,使低倍镜(10目镜×10物镜)对准样本上方。从侧面观察,调节粗准焦螺旋将物镜降至距标本约0.5cm处。

(2) 通过目镜观察标本,慢慢旋转粗准焦螺旋使载物台向下至出现物像后调节细准焦螺旋至成像清晰。

3. 高倍镜观察 将物镜转换为高倍镜(10目镜×40物镜),调节细准焦螺旋即可看到

清晰物像,一般不需要调节粗准焦螺旋。

4. 油镜观察 将聚光器升至与载物台平齐,光栅开至最大,使射入的光线最强。在血涂片的体尾交界处滴上香柏油一滴,转换物镜为油镜(10目镜×100物镜),调节细准焦螺旋至可看到清晰物像。

5. 收镜

(1) 观察完毕后,取下血涂片,关闭显微镜电源,用滴上清洁液的擦镜纸将镜头擦拭干净并用绸布擦拭镜身。

(2) 将物镜转换成“八”字形,载物台、聚光器下降至最低处,轻轻放回显微镜箱内。

【注意事项】

1. 搬动显微镜时,勿用一只手提,前后摇摆,使目镜滑出跌落。
2. 一定要使用转换器切换镜头,以免使光轴发生弯曲。转动粗、细准焦螺旋时,不要用力过猛,以防止损坏机件。
3. 严禁随意取出目镜,以免灰尘掉入镜筒。严禁拆下显微镜的其他部件导致部件失落或损坏。
4. 注意不要短时频繁开关显微镜,使用间隙时要将光调节旋钮调至最小。
5. 使用油镜时,切记只能将镜头上移,不可下移,以免压碎物品,碰坏镜头。
6. 擦拭目镜、物镜的污物应用专用的擦镜纸和清洁液。切勿用手指、纱布和普通纸擦。
7. 观察时坐姿端正,腰背挺直,双眼睁开。双筒显微镜注意调节光瞳间距,使双目观察到一个单一像,并可旋转左目镜上的屈光度调节环,补偿双眼视力差。
8. 低倍镜主要用于全片观察、细胞计数、对尿液中管型以及粪便中寄生虫的观察等,因此要注意利用光栅调节视野光线强弱,以便观察到相应目标物体;油镜主要用于细胞的分类和形态观察,因此应把光栅充分开大,保证射入的光线最强。
9. 如视场中出现污点应检查并彻底擦净目镜、聚光镜、滤色镜。
10. 显微镜的工作温度范围一般为5~40℃,存放的环境应防震、防晒、防尘、防潮。

【方法学评价】

光学显微镜成本低廉,操作简便,无需特殊的实验条件,主要用于细胞、微生物、寄生虫虫卵等形态学方面的检测,对形态的识别直观准确,已成为临床检验中必不可少的检测工具。但光学显微镜对未染色的细胞立体形态不如相差显微镜清晰,对培养瓶中的细胞不如倒置显微镜易观察,没有荧光显微镜、暗视野显微镜的功能。

【思考题】

1. 使用显微镜观察物体时应注意什么?
2. 怎样使用低倍镜、高倍镜和油镜观察物体?

(程树强)

实验二 微量吸管的使用

【实验目的】

1. 掌握微量吸管的正确使用使用方法。

2. 掌握影响微量吸管吸血量准确性的各种因素。

【实验原理】

挤压带孔的乳胶吸头使微量吸管产生负压而吸取液体。

【实验器材】

1. 器材 一次性微量吸管、带孔乳胶吸头、试管、试管架、干棉球、2ml 刻度吸管、一次性医用乳胶手套。

2. 试剂 生理盐水。

3. 标本 健康人抗凝血。

【实验步骤】

1. 准备

(1) 将微量吸管的红色线插管端插入带孔乳胶吸头的连接处上,注意两者间应连接严密不漏气。

(2) 加稀释液:取试管 1 支,加生理盐水 2ml。

2. 使用微量吸管采血

(1) 持管吸血:有两种方法,可根据掌握熟悉情况自主选择(表 1-2-1)。

(2) 拭余血:用干棉球顺微量吸管口方向拭净管外余血,并轻轻蘸拭管尖口,以蘸出超过刻度线 2mm 以内的少量余血,使其退回到刻度线,确保吸水量的准确。

表 1-2-1 持微量吸管取血方法

操作步骤	方法一	方法二
1	右手拇指和中指夹住吸管与吸头交接处,食指盖住吸头顶端的小孔微用力,排出适量的气体使管内形成负压	右手中指和无名指夹住吸管与吸头交接处,拇指盖住吸头侧面的小孔,食指持于吸头小孔背侧,两指同时对吸头微用力,排出适量的气体使管内形成负压
2	左手持混匀的抗凝血,将管尖插入抗凝血中	同方法一
3	食指慢慢松解压力,使抗凝血随着吸头被缓慢解压而被吸入微量吸管中	慢慢松解拇指与食指间的压力,使抗凝血随着吸头被缓慢解压而被吸入微量吸管中
4	当吸至吸管所需容量的刻度线后,将吸管从抗凝血中取出,让吸管尖端口抵于带有一次性医用乳胶手套的左手食指尖(采患者血时,直接将管尖口抵于患者的采血手指部位即可),防止因抬起食指时的负压使血样被吸入乳胶吸头内	同方法一。防止因抬起拇指时的负压使血样被吸入乳胶吸头内
5	迅速抬起食指排除管内的负压(图 1-2-1)	拇指迅速抬起排除管内的负压(图 1-2-2)

(3) 释放血液:将微量吸管插入含生理盐水的试管底部,食指或拇指盖住吸头顶端或侧面的小孔加压乳胶吸头,将微量吸管内的血液缓慢轻轻的吹出,再用上清液反复冲洗管内余血 2~3 次,并立即混匀。

【注意事项】

1. 吸取抗凝血标本时,注意管尖不能离开液面,如是末梢采血时,管尖口也不能离开血滴,以免吸入空气产生气泡;吸血时也不要用力过猛,将血液吸入乳胶吸头。

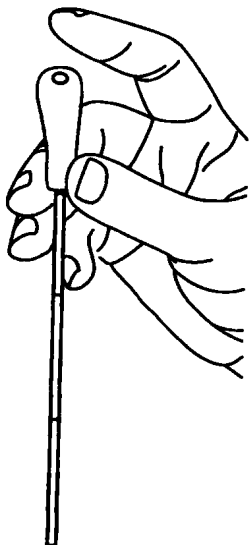


图 1-2-1 持管取血方法一示意图

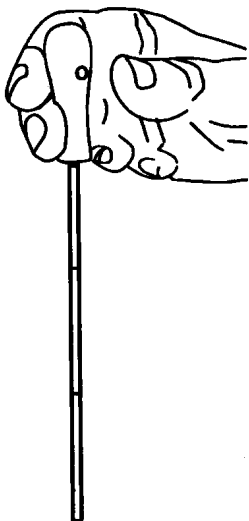


图 1-2-2 持管取血方法二示意图

2. 吸血量不能超过所需容量刻度线 2mm, 以免黏附管壁多余的血液影响血细胞计数结果。

3. 若吸血量不到所需容量刻度线时, 抗凝血可以吹出管内血液后, 重新吸血, 但若是末梢采血则不能(详见实验五末梢采血)。

4. 为了避免患者之间的交叉感染, 微量吸管必须一人一管, 一次性使用。

5. 临床血常规检查较多, 故一次性微量吸管的使用量大, 不可能鉴定每一根微量吸管的质量, 可采取抽样方式进行, 即从每一批购进的一次性微量吸管中, 按随机抽样原则至少抽取 50 支, 用认可方法如水银称重法、

纯水称重法、比色法等对其进行鉴定, 凡微量吸管误差 \leq 允许误差 $\pm 1\%$ 者为合格, 否则为不合格。所抽样品中至少 90% 以上是合格品, 其余不合格者的误差均在 $\pm 1\% \sim \pm 2\%$, 且所抽样品 $CV \leq 1\%$, 可认为这批微量吸管合格, 能用于临床。如不能满足要求, 建议可更换吸管批号再鉴定, 若还不行, 最好更换厂家, 并做好鉴定记录, 以确保微量吸管的质量。

6. 使用废弃的微量吸管属于锐利物类医用废物, 必须放于专用的一次性利器废物盒内, 24 小时内由指定的医疗废物处理单位回收, 48 小时内彻底安全焚烧。

【方法学评价】

一次性微量吸管由于采用一人一管, 一次性使用, 可有效地避免原血红蛋白微量吸管重复使用采血而可能引起患者之间的交叉感染。

【思考题】

1. 哪些因素可影响一次性微量吸管取血量准确性和精密度?
2. 怎样控制微量吸管采血的质量?

(夏曙华)

实验三 改良 Neubauer 计数盘的使用

【实验目的】

1. 掌握改良 Neubauer 计数盘的结构、注意事项和正确使用的方法。
2. 了解改良 Neubauer 计数盘的校正。

【实验原理】

将一定倍数稀释的血液或体液混匀后, 滴入具有精密划分刻度和相应固定体积的血细

胞计数盘中,根据标本和计数的细胞不同,在显微镜下选择相应的方格计数一定容积内的细胞数,乘以稀释倍数,即可换算成单位体积内的某种细胞数。

【实验器材】

1. 器材 改良牛鲍(Neubauer)计数盘及盖玻片、普通光学显微镜、绸布、微量吸管、1ml 和 2ml 刻度吸管、大试管(15mm×100mm)、小试管(10mm×100mm)及试管架、记号笔。

改良牛鲍计数盘为优质厚玻璃制成,每块计数盘由“H”型凹槽分为两个相同的计数池,计数池两侧各有一条支持柱,比计数池平面高 0.10mm。将特制的专用盖玻片覆盖其上,盖玻片与计数池间形成 0.1mm 的缝隙(图 1-3-1)。计数池为长、宽各 3.00mm 的方格,被平分为 9 个大方格,每个大方格的边长为 1.0mm,面积为 $1.0\text{mm} \times 1.0\text{mm} = 1.0\text{mm}^2$,容积为 $1.0\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3$ (相当于 $0.1\mu\text{l}$)。中央大方格用双线分成 25 个中方格,每个中方格又用单线分为 16 个小方格,共 400 个小方格,其中位于正中及四角的 5 个中方格为红细胞和血小板计数区。四角的 4 个大方格用单线划分为 16 个中方格,作白细胞计数用(图 1-3-2)。

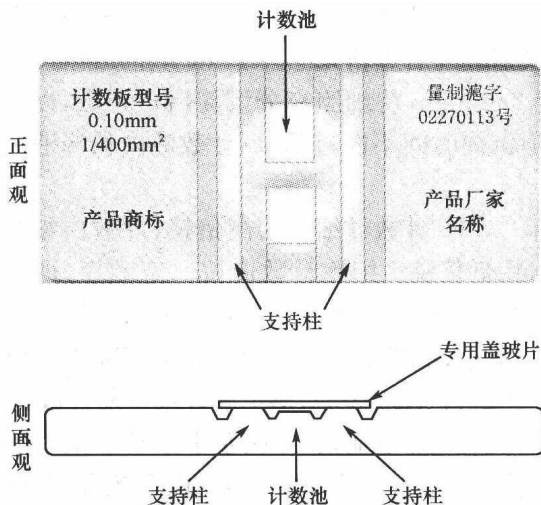


图 1-3-1 改良 Neubauer 计数盘结构图

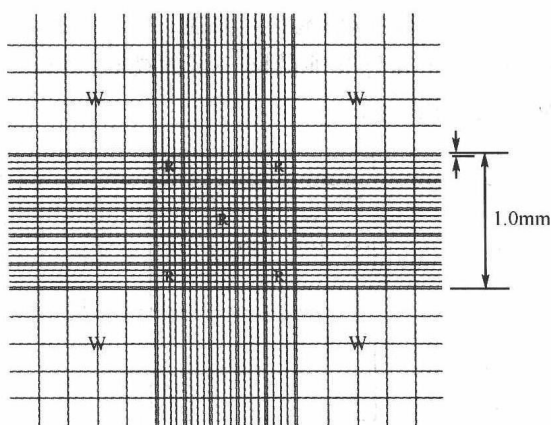


图 1-3-2 改良 Neubauer 计数盘计数池模式图 (RBC、WBC 计数区域)

2. 试剂 红细胞稀释液、白细胞稀释液。

3. 标本 EDTA 盐抗凝血。

【实验步骤】

1. 计数盘的准备 用绸布拭净血细胞计数盘和盖玻片,采用“推式盖片法”即从计数盘一侧的计数池下缘向另一侧计数池方向平推血盖片,将其盖于计数池上备用。

2. 稀释血液 取大小试管各 1 支,大试管标注 RBC,加红细胞稀释液 2ml、抗凝血 $10\mu\text{l}$,小试管标注 WBC,加白细胞稀释液 0.38ml、抗凝血 $20\mu\text{l}$,均立即混匀备用。取抗凝血稀释的操作按照本章实验二步骤进行。

3. 充池 充分混匀 RBC 悬液,用微量吸管吸取其细胞悬液,沿计数盘和盖玻片交界的狭缝处缓慢滴入,由于虹吸作用使液体顺其间隙充满计数池;以同样方法再取 WBC 悬液在另一侧计数盘充池,将计数盘平置于桌面上静置 2~3min,待细胞下沉。

4. 显微镜细胞计数

(1) 将计数盘置于显微镜镜台上,调低聚光器,调节显微镜光栅大小,用低倍镜观察计数盘的整个结构(大、中、小方格)及特征,同时观察血细胞是否均匀分布,严重分布不均时应重新充池。

(2) 在低倍镜下选择计数池四角的4个大方格计数白细胞,在高倍镜下选择计数池中央大方格位于正中及四角的5个中方格计数红细胞。

【注意事项】

1. 擦拭计数盘和盖玻片应选用清洁、干燥、柔软的绸布为宜,切勿用粗糙织物擦拭,以免磨损计数盘上的刻度。擦拭后手指不能接触其玻璃表面,以防污染油腻导致充液时产生气泡。

2. 加盖玻片的方式不同可影响充液高度,WHO推荐采用“推式”加盖玻片法。

3. 充液前应适当用力旋转试管使稀释血液中血细胞充分混匀,且需避免摇出过多气泡,使血细胞黏在管壁上,影响计数结果。

4. 计数盘需平放,充池须一次完成,充液量以液体恰好充满计数池为宜,如充液量过少计数池的单位体积内细胞悬液量不足,过多使悬液外溢,断续充液易产生气泡或充液后盖片移动等,均可使细胞分布不匀,应拭净计数盘及盖玻片后重新充池。

5. 充池后白细胞和红细胞计数一般需沉淀2~3min,待细胞充分沉淀后再计数,以避免因细胞不在计数池的同一平面视野而漏计。但沉淀时间不能过长,因计数池内稀释液挥发影响计数结果。

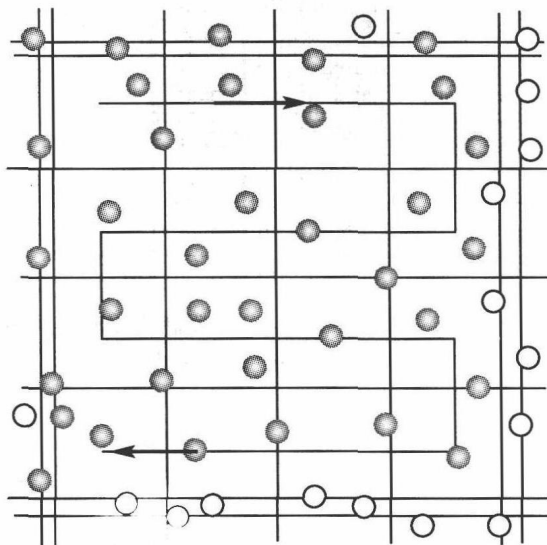


图 1-3-3 细胞计数规则示意图

6. 计数红细胞用高倍镜,计数白细胞用低倍镜。细胞计数应按一定顺序,即呈“弓”字形的移动视野,逐格进行计数,对于压线细胞按数上不数下,数左不数右的原则进行(图1-3-3),避免漏计或重复计数。

7. 计数细胞时,应左手推动显微镜的推动器,右手调节显微镜的微调螺旋,以便识别或鉴别细胞、非细胞成分。

8. 血盖片应为血细胞计数盘的专用盖片,其规格为24.0mm×20.0mm×0.6mm,要求盖片两面平整光滑,平面误差应 $< \pm 0.002\text{mm}$,高倍镜无裂隙,有一定的重量,不被细胞悬液所抬浮。血盖片的均匀厚度鉴定:用微米级千分尺对其厚度进行多点检测(至少9个区,每区测2个点),

各点的最大厚度差应 $\leq \pm 2\mu\text{m}$ 为合格。血盖片的平整度鉴定:①用平面平晶仪检测盖玻片两表面的干涉条纹,其条纹细密均匀或微量弯曲即为合格。②拭净待测血盖片后,将其覆于标准血盖片上,在适当光线下有均匀完整彩虹出现者为合格。③将拭净的盖玻片反贴在光滑清洁的平面反光镜上,立即将反光镜水平抬起,若血盖片能被反光镜吸附,且吸附时间较长(越长越好),最后呈圆弧形旋转落下为合格(两面都应检查)。

9. 新的改良牛鲍计数盘使用后每隔1年均应进行鉴定,其计数池大方格每边长度应用目镜测微计测量,允许误差应在 $\pm 1\%$ ($1 \pm 0.01\text{mm}$)以内;计数池深度应用微米级千分尺多点测量,误差应在 $\pm 2\%$ ($0.1 \pm 0.002\text{mm}$)以内为合格。

10. 细胞分布误差(又称为固有误差或计数域误差),即使技术熟练的检验者也不可能充液后四个大方格内的细胞分布数一致,这是由于实验的计数域误差或分布误差所致。那么如何判断四个大方格细胞分布数之差在多少范围之内可保证数据可靠呢?可根据充液细胞分布标准,即常规考核标准(routine checking standard, RCS)判断,如符合下列 RCS 标准为合格(表 1-3-1),超过上述标准者为不合格,应该重新混匀冲池。RCS 计算公式如下:

表 1-3-1 不同白细胞总数充液细胞分布 RCS 标准

白细胞总数($\times 10^9/\text{L}$)	RCS
<4.0	0.30~0.20
4.1~14.9	0.20~0.15
>15.0	0.15

$$\text{RCS} = \frac{\text{四大格所数白细胞最大值} - \text{最小值}}{\text{四大格所见白细胞平均值}} \times 100\%$$

【方法学评价】

使用血细胞计数盘进行细胞计数是医学检验最常用的基本技术之一。该计数盘不仅用于人工法细胞计数,还用于血细胞分析仪检测结果的复查和仪器校正等,该法经典、方便、经济、实用,现仍较广泛的应用于临床检验和科研实践中。

改良牛鲍计数盘用于人工法细胞计数存在随机误差(采血、稀释、混合、充池等操作不正规造成的误差)、系统误差(微量吸管、计数盘和血盖片不精确造成的误差)及固有误差(每次冲池后血细胞分布不可能完全相同所造成的误差,即细胞分布误差),固有误差可随细胞计数数量的增加而减少。另外,还与个人技术(如细胞的识别、杂质的鉴别、对压线细胞计数原则的掌握等)的熟练程度有关。

【思考题】

1. 改良牛鲍计数盘用于人工法细胞计数存在哪些不足?如何预防?
2. 如何判断计数盘四个大方格细胞分布数之差在多少范围之内可保证数据可靠?

(夏曙华)

实验四 血涂片制备与染色

【实验目的】

1. 掌握血涂片制备和染色方法。
2. 熟悉血涂片制备和染色方法的影响因素。
3. 了解瑞氏染液的配置和质量评价。

【实验原理】

将全血滴于载玻片上,使用推片制成细胞分布均匀的血膜涂片,滴加复合染料,使细胞通过物理吸附及化学亲和作用而被染色,由于各种细胞所含化学成分不同,对酸性、碱性染料的亲和力不同,经染色后呈现出各自的染色特征。

【实验器材】

1. 器材 显微镜、载玻片、推玻片、染色架、洗耳球、铅笔、红色/白色特种蜡笔。

2. 试剂

(1) 瑞氏(Wright)染液

I液:瑞氏染料 1.0g、甲醇(AR级)600ml、甘油 20ml。将全部染料放入清洁干燥的研钵中,先加少量甲醇充分研磨半小时以上,使染料溶解,将溶解的染料倒入洁净干燥的棕色瓶内,在未溶解的染料中再加入少许甲醇磨研,再吸出上液,如此重复磨研至甲醇用完,染料全部被溶解为止。再加 20ml 甘油密闭保存。

II液:磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8)。磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 0.2g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.3g,加少量蒸馏水溶解后,加蒸馏水至 1000ml,再用磷酸盐溶液校正 pH。

(2) 瑞氏-吉姆萨复合染色液

I液:瑞氏染料 1.0g、吉姆萨染料 0.3g 于洁净研钵中,甲醇(AR级)500ml、中性甘油 10ml。配制方法与瑞氏染液的 I 液相同,染液配好后,每天早晚各振摇 3min,共 5 天,再存放 1 周即可使用。

II液:磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8)。磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 2.56g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 6.64g。加少量蒸馏水溶解,再加蒸馏水至 1000ml,用磷酸盐溶液调整 pH。

3. 标本 EDTA 盐抗凝血或末梢血。

【实验步骤】

1. 制备血涂片

(1) 取血:用微量吸管吸取混匀的 EDTA 盐抗凝血少许,滴 1 滴于载玻片右端 1cm 处,如为末梢采血则直接用洁净载玻片右端 1cm 处蘸 1 滴血。

(2) 推片:有两种方法,可根据掌握熟悉情况自主选择(表 1-4-1)。

2. 风干血涂片 手持制备好的血涂片在空气中晃动,使其迅速干燥。如寒冷或潮湿时,应于 37℃温箱中促干,以免细胞变形缩小。

3. 标记血涂片 在载玻片血膜的头部端,用铅笔在血膜上编号,并注明患者姓名。

4. 血涂片染色

(1) 划线:血膜干透后,用红色/白色特种蜡笔在两端划线,以防染色时染液外溢。

(2) 染色:将血涂片放于染色架上,滴加 I 液(染液)数滴,以染液覆盖整个血膜为度。静置 0.5~1min。滴加等量或稍多的 II 液(缓冲液),轻轻摇动玻片或用洗耳球轻轻吹气,使染液与缓冲液充分混合。

(3) 染色效果观察:染 5~10min,将存有染液的血涂片小心移至显微镜载物台的推动器上,用低倍镜观察血膜体、尾交界处的白细胞的核、质着色清晰可辨,示染色恰到好处。

(4) 冲洗:立即平持染好的血涂片,用流水沿载玻片的一端缓缓冲去染液,竖立血涂片,待风干。

5. 染色涂片观察

(1) 肉眼观察:正常情况下,血膜染色风干后外观为淡紫红色。

(2) 镜下观察:用低倍和高倍镜观察血膜体、尾交界处的细胞,红细胞均匀分布不重叠,染呈肉红色;各种白细胞胞质及颗粒均分别显示其各自的特有色彩,胞核染紫红色,染色质结构清晰可辨,血小板胞质染淡红色,其颗粒染紫红色,示染色佳。油镜下观察染色血涂片头、体、尾细胞分布情况及白细胞分类观察的部位选择(彩图 1-4-1)。

表 1-4-1 制备血涂片的推片方法

操作步骤	方法一	方法二
1	左手拇指与食指和中指平执载玻片的两端,血滴位于食指和中指侧	同方法一
2	右手的拇指与食指和中指持推片两侧的下 1/3 处	右手的拇指与食指、中指和无名指持推片两面的上 1/3 处
3	将推片轻轻接触载玻片的拇指侧,缓慢向血滴靠近,当接触血滴时推玻片停止移动,右手将固定的推玻片轻微上下摇动,使血液沿推片边缘展开	将推片侧面轻轻接触载玻片的拇指侧,缓慢向血滴靠近,当接触血滴时推玻片停止移动,右手将固定的推玻片轻微前后摇动,使血液沿推片边缘展开
4	立即将推片与载玻片呈 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 角,轻轻平稳匀速的将推玻片向拇指侧推进,使血滴随之推进而被制成厚薄适宜的舌形血涂片(图 1-4-1)	立即将推片与载玻片呈 $30^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 角,轻轻平稳匀速的将推玻片向拇指侧拉进,使血滴随之而被制成厚薄适宜的舌形血涂片(图 1-4-2)

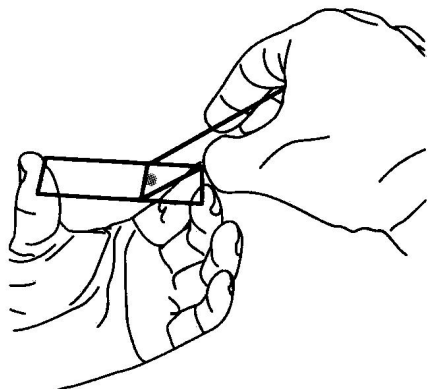


图 1-4-1 制备血涂片推片方法一示意图

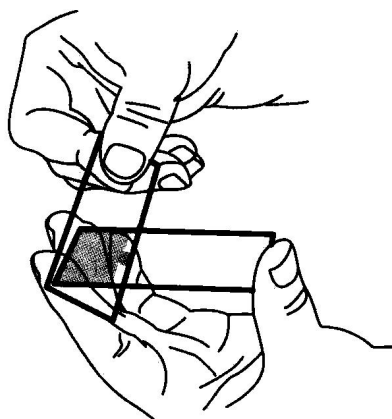


图 1-4-2 制备血涂片推片方法二示意图

【注意事项】

1. 载玻片和推玻片均必须干净、干燥、无尘、无油腻。

2. 推片边缘必须呈光滑整齐的直线,不能有弧形,否则影响推片的质量。

3. 血涂片制备 ①可用 EDTA 盐抗凝血制备血涂片,由于 EDTA 能阻止血小板聚集,涂片中的血小板呈散在分布,有利于血小板形态的观察,还有利于是否发生微凝集的监测,如出现了血小板聚集,提示该标本有微凝集,可造成血细胞分析仪堵孔或半堵孔,影响细胞计数结果。也可用末梢血制片,可观察血小板聚集情况。②不宜采用肝素盐抗凝血制血涂片,因其可使血膜背景染淡蓝色,影响白细胞形态观察。③使用抗凝血,应充分混匀后再涂片,避免因取样不均而影响结果。④应在采集抗凝血后 4h 内制备血涂片,血膜制好立即固定染色,以免因时间过长细胞发生退行性改变,甚至细胞溶解,影响其形态观察。⑤注意制片前,样本不宜冷藏。⑥推片时,血滴愈大、血黏度愈高、推片角度愈大、推片速度愈快,血膜就愈厚,反之则愈薄(图 1-4-3)。故应针对不同的血样采用不同的制片方法,对贫血标本应采用大血滴、大角度、快推。对血细胞比容高的标本应采用小血滴、小角度、慢推。⑦血膜应以覆盖载玻片中间 3/5 的面积为宜,如太小可影响细胞观察。⑧一张良好血片的要求:血膜厚薄适宜,头体尾分明,细胞分布均匀,血膜边缘整齐,两端留有空隙(图 1-4-4)。⑨注意造成血膜分布不均的原因:推片边缘不齐,有缺损时,血膜出现线条样缺损;推片边缘呈