

血液病实验手册

内蒙古医学院附院检验科

一九七六年八月一日

毛主席语录

人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

有比较才能鉴别。有鉴别，有斗争，才能发展。

应当积极地预防和医治人民的疾病，推广人民的医药卫生事业。

前 言

为适应工作需要，以及经验交流，我们把工作中所积累的零碎资料，参考兄弟医院所介绍的宝贵经验，编写了这本“血液病实验诊断手册”。

此手册着重介绍试验操作方法，适当的概述试验原理，临床意义，以及注意事项。本书主要适用于检验人员工作、学习之用，亦可供临床医生参考。

由于编写和业务水平有限，时间仓促，缺乏实践经验，一定存在不少缺点和错误，仅供同道者工作中参考，并希同志们提出批评指正。

内蒙古医学院附院检验科

1976、8、1、

目 录

第一章 溶血性贫血的实验室检查

第一节 试验方法..... (1)

一、红细胞盐水渗透脆性试验

方法(一)

方法(二)

二、红细胞机械脆性试验

三、尿含铁血黄素试验

四、红细胞自溶试验及纠正试验

五、血浆游离血红蛋白测定

六、糖水试验

七、酸溶血试验

八、热溶血试验

九、冷溶血试验

十、麦根齐试验

十一、抗人球蛋白试验

直接试验

方法(一)

方法(二)

间接试验

方法(一)

方法(二)

第二节 血细胞染色法及镜检..... (12)

一、血红蛋白——H包涵体检查

- 二、网织红细胞计数
- 三、变性珠蛋白小体检查
- 四、硝基兰四氮唑(N、B、T、)染色

第二章 出血及凝血实验室检查

第一节 正常止血过程及血液凝固机理.....(16)

一、正常止血过程

- (一) 毛细血管和血小管反射性收缩
- (二) 血小板粘性变形及白色血栓形成
- (三) 血液凝固

二、影响正常止血过程的因素

- (一) 血管因素
- (二) 血小板因素
- (三) 血浆凝固因子
- (四) 其它因子

三、正常凝血机理

- (一) 凝血活酶生成
- (二) 凝血酶生成
- (三) 纤维蛋白生成

四、抗凝系统

- (一) 抗凝血活酶
- (二) 抗凝血酶
- (三) 纤维蛋白溶解系统

第二节 实验方法.....(23)

一、试剂配制

- (一) 抗凝剂

- (二) 氯化钙溶液
- (三) 1% 甲苯胺兰溶液
- (四) 巴比妥缓冲液
- (五) 醋酸溶液
- (六) 硫酸钡处理法
- (七) 兔脑凝血活酶的制备法
- (八) 血小板代替液
- (九) 凝血酶的制备法
- (十) 红细胞素液制备
- (十一) 各种血浆制备
- (十二) 各种血清制备

二、实验方法

(一) 出血时间测定

(二) 血小板的检查

- 1、血小板计数
- 2、血小板凝集能力试验
- 3、血块回缩试验
- 4、血小板第3因子试验

(三) 血浆凝血因子的检查

- 1、凝血时间测定
- 2、血浆复钙时间测定
- 3、凝血酶元时间测定
- 4、凝血酶元活动度测定
- 5、凝血酶元消耗时间测定
- 6、凝血活酶生成试验
- 7、纠正试验
- 8、简易凝血活酶生成试验及纠正试验

(四) 主要凝血因子的检查

1、纤维蛋白元(比色法)

纤维蛋白元半定量法

2、V因子测定

3、Ⅲ因子测定

4、鉴别Ⅷ(A、H、G)Ⅸ(P、T、C、)Ⅺ(P、T、A)

因子缺乏的纠正试验

(五)纤维蛋白溶解系统的检查

1、纤维蛋白溶酶活性的检查

(1)全血块溶解试验

(2)血浆凝块溶解试验

(3)优球蛋白溶解试验

2、纤维蛋白裂解产物(FDP)的检查

(1)乙醇试验

(2)血浆鱼精蛋白付凝集试验

(3)凝血酶时间测定

(4)连续稀释硫酸鱼精蛋白试验

(六)抗凝物质的检查

1、肝素中和试验

2、肝素负荷试验

3、鱼精蛋白负荷试验

4、凝血酶活力测定

5、正式试验

第三章 出血性疾病实验诊断要点

第一节 血管壁异常的出血性疾病……………(43)

一、遗传性出血性毛细血管扩张症

二、血管性假性血友病

三、血管性血友病

四、单纯性紫癜

五、过敏性紫癜

第二节 血小板异常的疾病…………… (45)

一、血小板减少性紫癜

(一) 原发性血小板减少性紫癜

(二) 继发性血小板减少性紫癜

二、血小板功能异常

(一) 血小板无力症

(二) 血小板释放反应异常

(三) 后天性血小板机能异常

三、原发性血小板增多症

第三节 先天性血液凝固障碍性疾病…………… (47)

一、血友病

二、血友病乙

三、血友病丙

四、第ⅡⅤⅦⅩ因子缺乏症

五、第Ⅲ因子缺乏症

六、第Ⅷ因子缺乏症

七、无纤维蛋白元血症

第四节 获得性血凝障碍性疾病…………… (49)

一、弥散性血管内凝血(DIC)

(一) 存在引起DIC的原发性疾病

(二) 临床表现

(三) 实验室检查

- 二、原发性纤维蛋白溶解症
- 三、严重肝脏疾病
- 四、维生素K缺乏症
- 五、纤维蛋白无减少症
- 六、后天性纤维蛋白元减少症原因
 - 1、纤维蛋白生成障碍
 - 2、血管内凝血而致纤维蛋白元消耗增加。
 - 3、纤维蛋白元溶解及破坏
 - 4、纤维蛋白元的反应性变化

第四章 肿瘤细胞学检查

第一节 肿瘤细胞学检验的基本技术…………… (52)

- 一、标本的要求及涂片方法
- 二、染色

第二节 细胞学检验报告方式及存在问题…………… (54)

- 一、细胞学检验报告的分级方法
- 二、细胞学检验中存在的问题

第三节 恶性肿瘤细胞的一般形态特征…………… (55)

- 一、癌细胞的一般特征
 - (一) 细胞形态的改变
 - (二) 胞浆的改变
 - (三) 整个细胞的改变
 - (四) 细胞之间关系的改变
- 二、癌细胞的类型
 - (一) 鳞状上皮癌细胞

(二) 腺癌细胞

(三) 未分化的癌细胞

三、肿瘤细胞学鉴别要点

第四节 浆膜腔液内肿瘤脱落细胞检验……………(59)

一、标本处理方法

二、显微镜下观察

(一) 非肿瘤细胞

(二) 胸、腹水内癌细胞的形态特点

三、痰液内肿瘤脱落细胞检验

(一) 标本之收集

(二) 显微镜下观察

四、食管、胃癌细胞检验

(一) 标本的采取

(二) 镜下检查

五、尿液内脱落细胞检验

(一) 标本之采集及处理方法

(二) 显微镜下观察

第五节 淋巴结,肝脏,局部包块穿刺细胞学检验…(64)

一、淋巴结穿刺涂片细胞学检验

(一) 基本正常之淋巴结细胞

(二) 炎症所致淋巴结细胞之改变

(三) 良性肿瘤细胞

(四) 恶性肿瘤细胞

二、肝脏及局部包块穿刺细胞学检验

(一) 肝脏穿刺检验

(二) 局部包块穿刺涂片检验

第六节 阴道恶性肿瘤细胞检验..... (67)

- 一、涂片内非肿瘤细胞形态
- 二、炎症时阴道细胞的改变
- 三、涂片中恶性肿瘤细胞形态

第五章 血红蛋白的分离与鉴定技术

第一节 血红蛋白..... (71)

- 一、正常血红蛋白
- 二、异常的血红蛋白

第二节 血红蛋白的分离及鉴定技术..... (72)

- 一、血红蛋白溶液的制备
 - (一) 巴比妥缓冲液法
 - (二) 氯仿法
 - (三) 四氯化碳法
- 二、镰变试验
- 三、抗碱变性试验
- 四、不稳定血红蛋白的筛选试验
- 五、胎儿血红蛋白 F 酸洗脱法
- 六、血红蛋白溶解度

第三节 血红蛋白电泳分离..... (76)

- 一、淀粉凝胶电泳
 - (一) 试剂的配制
 - (二) 凝胶的制备
 - (三) 胶板模
 - (四) 方法

二、醋酸纤维薄膜电泳

三、琼脂电泳

第六章 荧光抗体技术

第一节 荧光抗体标记步骤..... (81)

一、抗体提纯、从抗血清中提取丙种球蛋白

二、免疫球蛋白的纯化(I γ G)的提出

三、提取兔抗人I γ G—I γ G抗体

四、取血步骤(耳血)

五、荧光抗体标记

六、去除游离荧光素

七、DEAE纤维素层析、分段除去非特异性荧光素

第二节 抗核抗体的操作方法..... (86)

一、荧光显微镜的使用方法

二、抗核抗体的操作

三、抗核抗体观察

四、抗核抗体的临床意义

第三节 红斑狼疮细胞检查..... (87)

一、红斑狼疮的形成

二、红斑狼疮细胞的检查法

附:

临床检验正常值表..... (88)

第一章 溶血性贫血的实验室检查

第一节 试验方法

一、红细胞盐水渗透脆性试验

原理：

红细胞在等渗压盐水中形态不变，故不发生溶血，在低渗压的盐水中，红细胞因吸入水分，发生膨胀而破裂，形成溶血。

红细胞脆性试验，是用一系列不同浓度的低渗盐水，测验红细胞开始溶血至完全溶血的界限，决定溶血的原因是由于红细胞本身的脆性增加，或由于其它毒性因素，使红细胞溶解增多。

方法（一）：

试剂：1%氯化钠溶液—予先将氯化钠置平皿内，于100—110℃烤箱烤4小时。

操作：

1、取26支小试管（1×8Cm）分成两排立于试管架上，前排用来检查患者血，后排作正常对照。

2、将配好的13种不同浓度的盐水，由低浓度向高浓度分别加入各试管1毫升，并在管架上注明浓度

不同浓度之低张盐水的配制

试 管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
蒸馏水（毫升）	76	72	6	64	60	56	52	48	44	40	36	32	28
1%氯化钠（毫升）	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72
管内氯化钠浓度	0.24	0.28	0.32	0.36	0.40	0.44	0.48	0.52	0.56	0.60	0.64	0.68	0.72

混合后，分别置于100毫升洁净干燥之细口瓶内置4℃冰箱保存。

3、以7号针头，取患者静脉血液1毫升，就原针头在每管内加血一滴，滴入后，在手指将管口堵住，由低浓度向高浓度将每管轻轻倒转一次，使盐水混匀。每倒转一管后，要用沙布擦干手指。

4、将试管架放入4℃水箱内，静置2小时后，取出观察结果，从最高浓度观察有无溶血现象：上清液稍变红，即为开始溶血，管底完全没有红细胞，全变红色，即为完全溶血。

结果：

正常者

开始溶血，0.40—0.46%氯化钠。

完全溶血，0.30—0.36%氯化钠。

溶血性黄疸：

开始溶血，0.47—0.48%氯化钠。

完全溶血，0.34%氯化钠。

慢性阻塞性黄疸：

开始溶血，0.39—0.40%氯化钠。

完全溶血，0.30,%氯化钠。

急性肝炎：

开始溶血，0.40—0.46%氯化钠。

完全溶血，0.28%氯化钠。

临床意义：

红细胞脆性增加见于：遗传性球形红细胞增多症及自身免疫性溶血性贫血等。

红细胞脆性减低见于：脾切除术后；镰状红细胞性贫血；地中海贫血及缺铁性贫血等。

方法（二）：

试剂：

1、1%氯化钠。

2、0.04%氨水（取浓氨水0.16毫升加蒸馏水至100毫升）。

操作：

1、无菌取血5毫升，用肝素抗凝或脱纤维蛋白。2.5毫升注入无菌小瓶于37℃中放置24小时（为测定孵育后脆性试验之用）。另2.5毫升置表面皿，在空气中轻轻振荡4分钟以上，使充分氧合呈鲜红色（因二氧化碳能使红细胞脆性增加）然后放入试管中。同时作正常对照。

2、取小试管28支，排成两排，注明测定与正常对照。

分别按下表加入试液：

试 管 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1%氯化钠(毫升)	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6	6.0	6.8	—
蒸馏水(毫升)	6.4	6.0	5.6	5.2	4.8	4.4	4.0	3.6	3.2	2.8	2.4	2.0	1.2	—
0.04%氨水(毫升)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8
最后氯化钠浓度	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	0.75	0.85	0

3、每管加入上述经振荡之血液0.08毫升，反复颠倒，置室温（20℃）1小时。

4、离心取上清液以绿色滤光板比色，第13管因是生理盐水管，不溶血，可作空白管。

第14管为100%溶血，其它各管的溶血程度，与第14管比较。

计算：

$$\frac{\text{试验管读数} - \text{空白管}}{100\% \text{溶血管读数} - \text{空白管}} \times 100 = \text{溶血度}\%$$

5、24小时，将37℃保温之血液同样操作计算出红细胞孵育后之脆性。

6、以溶血度100%为纵座标，以最后氯化钠浓度为横座标绘制曲线，再找出50%溶血度报告之。

解释：50%溶血度，即溶解50%红细胞的低渗盐水浓度或称红细胞中间脆性。

正常值：

孵育前红细胞中间脆性为0.40—0.445%。

孵育后红细胞中间脆性为0.465—0.59%。

二、红细胞机械脆性试验

操作：

1、静脉取血，3.8%枸橼酸钠抗凝（1：9）置125毫升三角烧瓶中（瓶底直径6厘米）。

2、将三角烧瓶斜位固定于康氏振荡器上275—285次/分，振荡60分钟。

3、取出0.1毫升放入10毫升蒸馏水内，再取0.1毫升放入10毫升1.25%氯化钠中，离心取上清液，以水为空白，蓝色滤光板比色。

计算：

$$\frac{1.25\% \text{氯化钠管读数}}{\text{蒸馏水管读}} \times 100 = \text{溶血}\%$$

正常值

16.9%（±）6.3%（范围7.5—23.9%）。

临床意义：

遗传性红细胞增多症时，抵抗力显著降低，地中海贫血渗透脆性抵抗力常增加，但机械脆性抵抗力常显著减弱。

三、尿含铁血黄素试验

原理

溶血性贫血患者，尿中常含有游离之铁质，其可与亚铁氰化钾在酸性环境中发生普鲁氏兰反应，形成亚铁氰化铁之蓝色颗粒。

试剂：2%亚铁氰化钾溶液及1%盐酸。

操作：

1、2%亚铁钾及与1%盐酸等量混合，成为酸性亚铁氰化钾溶液。

2、取病人新鲜尿液、离心沉淀后，弃去上清液。

3、将新鲜配制的酸性亚铁氰化钾溶液2.5毫升加入尿沉渣中，混匀后，在室温静置20分钟。

4、再离心沉淀，弃去上清液，将沉渣置玻片上，加盖玻片，以高倍镜或油镜镜检。

5、如有分散或成堆蓝绿色闪光的约1—3微米的颗粒，存在于细胞内外，即为阳性。

6、如欲保存标本，可将沉渣制成涂片，在空气中待干后，浸在甲醇中10—20分钟，然后在56℃水浴中用新鲜配制的酸性亚铁氰化钾溶液染色10分钟，用自来水洗20分钟，继之用蒸馏水洗，最后用1%伊红或沙黄液复染。

结果：

阵发性睡眠性血红蛋白尿症时常为阳性。其它溶血性贫血所引起的血红蛋白尿症亦可为阳性。

四、红细胞自溶试验及纠正试验

原理：

血液在无菌状态下经过24小时及48小时孵育，正常人只见轻度溶血，而先天性球形红细胞增多症，可见早而进行性的溶血现象，加入葡萄糖后溶血现象可得到纠正，但在后天性红细胞增多症及非球形红细胞溶血性贫血患者结果与正常人相同。

试剂

1、无菌10%葡萄糖溶液。

2、0.04%氨水（取浓氨水0.16毫升加蒸馏水至100毫升）。

3、肝素抗凝剂：肝素10毫克加生理盐水1毫升。此溶液的1/10毫升（含100微克）可阻止10毫升全血数日之内不凝。肝素10微克可使全血1毫升经久不凝。

操作：

（一）、取4支加入肝素抗凝剂的无菌管、分别标记1、2、3、4管。

第1管，作为测定不加葡萄糖自溶用。

第2管，作为测定加葡萄糖自溶用。

第3管，作为测定红细胞容积和作为100%溶血标准管。

第4管，作为分离血浆用。

（二）、无菌取静脉血5毫升。按无菌操作加入上述4管。

第1管，1.5毫升血。

第2管，1毫升血加10%无菌葡萄糖0.01毫升、轻轻摇匀。

第3管，1.5毫升血。

第4管，1毫升血。

（三）、将第1、2、3管置37℃水浴中，静置48小时，放置过程中勿振动。

（四）、将第4管血离心，分离血浆，保存冰箱中。

（五）、将孵育后的第1、2管血离心5—10分钟，3000转/分，各吸出血浆0.2

毫升，置另2支试管中，然后加0.04%氨水4.8毫升。即血液被稀释25倍。

(六)、将第3管血充分混合，作血球容积。

另取1支试管，加4.95毫升0.04%氨水及0.05毫升全血，充分混合后，作为100%溶血标准管。

(七)、取1支试管，加用4.8毫升0.04%氨水及冰箱中保存的未孵育的血浆0.2毫升作为空白对照。

(八)、用72型分光计，光电比色，570毫微米滤光板，用空白对照管调节零点。

(九)、按下列公式算溶血百分比。

自溶百分比：

$$\frac{\text{不加或加葡萄糖血浆管读数} \times (100 - \text{血球容积})}{100\% \text{溶血管读数} \times 4}$$

(十)、报告方式：

不加葡萄糖自溶%。

加葡萄糖自溶%。

正常值：

不加葡萄糖自溶，0.4—3.5%。

加葡萄糖自溶，0—0.7%。

五、血浆游离血红蛋白测定

原理：

血红蛋白中之铁质在酸性溶液中，有过氧化酶作用，可分解过氧化氢放出氧，将联苯胺氧化成绿色→蓝色→稳定的红棕色。其颜色的深度与血红蛋白的含量成正比。

试剂：

1、1%联苯胺溶液：联苯胺1克溶于30毫升蒸馏水中，加95%乙醇溶液50毫升，冰醋酸20毫升。贮存深色瓶中，放冰箱保存，可用数周。

2、0.6%过氧化氢溶液（取28%过氧化氢0.5毫升加蒸馏水22.5毫升）。

3、3.8%枸橼酸钠或肝素防凝均可。

4、标准血红蛋白贮存液（血红蛋白10克/100毫升）。取洗涤浓缩的红细胞2毫升，反复冰冻溶解，使红细胞完全溶解，用沙利氏血红蛋白计，测定血红蛋白含量，最后用生理盐水稀释成10克/100毫升。（此量必须准确，所用沙利氏比色计须经血氧分析法校正）。制成后，可贮存在冰盒中，长期保存。

5、标准血红蛋白应用液（5毫克%）取血红蛋白10克%血红蛋白贮存液0.05毫升以生理盐水稀释至100毫升，即为5毫克%。

6、20%醋酸溶液：

冰醋酸20毫升加蒸馏水至100毫升。

操作：