

全国高等医药教材建设研究会规划教材·全国高等医药院校配套教材

 供医学检验专业用

临床血液学和血液检验 实验指导

第2版

WBC	50.0		WBC	50.0	
LY%	13.5		LY%	13.5	
MO%	36.6	L	MO%	36.6	L
GR%			GR%		
LY#		H	LY#		H
MO#		H	MO#		H
GR#		H	GR#		H
RBC	4.45		WBC		
HGB	14.2		LY%	50.0	
HCT	42.6		MO%	13.5	
MCV	95.8		GR%	36.6	L
MCH	31.9		LY#		H
MCHC	33.3		MO#		H
RDW	12.0		GR#		H
MPV					
PDW					

主编 许文荣

 人民卫生出版社

全国高等医药院校配套教材

供医学检验专业用

临床血液学和血液 检验实验指导

第2版

主 编 许文荣

编 者 (以姓氏笔画为序)

冯文莉 (重庆医科大学)

许文荣 (江苏大学医学技术学院)

江 虹 (四川大学华西医院)

钟美佐 (中南大学湘雅医院)

胡嘉波 (江苏大学医学技术学院)

夏 薇 (北华大学医学院)

管洪在 (青岛大学医学院)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

临床血液学和血液检验实验指导/许文荣主编. 2版.
—北京:人民卫生出版社,2003
ISBN 7-117-05325-9

I. 临… II. 许… III. ①血液学-实验-医学院校-教材②血液检查-实验-医学院校-教材 IV. ①R331.1
②R446.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 109800 号

临床血液学和血液检验实验指导 第 2 版

主 编:许文荣
出版发行:人民卫生出版社(中继线 67616688)
地 址:(100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼
网 址:<http://www.pmph.com>
E - mail: pmph@pmph.com
印 刷:北京市增富印刷有限责任公司(天运)
经 销:新华书店
开 本:787×1092 1/16 印张:15.25
字 数:344 千字
版 次:2003 年 2 月第 1 版 2003 年 5 月第 2 版第 5 次印刷
标准书号:ISBN 7-117-05325-9/R·5326
定 价:20.00 元

著作权所有,请勿擅自用本书制作各类出版物,违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

为了医学检验专业教学的需要,在卫生部教材办公室和医学检验专业教材评审委员会的领导和支持下,组织全国部分从事教学和临床工作、有较高学术造诣和实践经验的专家教授编写了《临床血液学和血液检验实验指导》一书,供全国高等医药院校和高等医学专科学校教学使用,也可供临床医生和检验人员参考。

全书共分5章。第一章介绍了造血检验的基本方法及技术;第二章~第四章分别叙述红细胞检验、白细胞检验、血栓与止血检验的方法;第五章简要讨论血液学检验的影响因素和质量控制,在检验方法的介绍中,主要讨论了方法的原理、材料、操作、注意事项、结果判断、临床意义和评价。

编者主要参考了国内外血液学检验的有关参考文献,认真研究和讨论教学大纲和编写提纲。保持了第一版实验指导的基本特点,对有些内容进行了适当的修改,并增添了部分新的检验方法。反复修改编写内容,互相审稿和集体定稿。希望本书作为配套教材,适合教学和临床需要。

由于编者水平和经验有限,缺点和错误在所难免,敬请专家和读者批评指正,以期再版时修改。在编写过程中,上海第二医科大学王鸿利教授给予了全面的指导和帮助,特致以衷心的感谢。

编 者
2002. 11

目 录

第一章 检验的基本方法	1
第一节 血细胞化学染色检验	1
一、过氧化物酶(POX)染色	1
二、苏丹黑 B(SB)染色	3
三、过碘酸-雪夫反应(PAS法)	4
四、碱性磷酸酶(NAP)染色	6
五、脱氧核糖核酸(DNA)染色	9
六、核糖核酸(RNA)染色	10
七、酯酶染色	11
八、酸性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶染色	14
九、铁染色	16
第二节 常见血液病细胞形态学检查	17
一、骨髓穿刺术	17
二、常见血液病细胞形态学	19
第三节 血细胞超微结构检验	35
一、细胞分离技术	35
二、扫描电镜标本制作	37
三、透射电镜标本的制作	39
四、电镜酶细胞化学标本的制作	40
第四节 造血祖细胞培养	44
一、造血祖细胞的体外培养技术	44
二、造血祖细胞体内扩散盒培养技术	49
第五节 血细胞染色体检验	51
一、染色体标本的制作	51
二、染色体显带技术	55
三、姊妹染色单体差别染色技术	57
第六节 血细胞凋亡检验	58
一、形态学检验	59
二、琼脂糖凝胶电泳检测凋亡过程中 DNA 的降解	61
三、流式细胞术检测凋亡细胞	62
四、原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶标记技术	63
第二章 红细胞检验	66

第一节 显示溶血的检验	66
一、游离血红蛋白检测	66
二、血清结合珠蛋白检测	67
三、尿含铁血黄素试验	68
四、血浆高铁血红素白蛋白检测	69
第二节 红细胞膜缺陷检验	70
一、红细胞渗透脆性试验	70
二、红细胞渗透脆性孵育试验	71
三、自身溶血试验及其纠正试验	73
四、酸化甘油溶血试验	75
第三节 红细胞酶缺陷的检验	76
一、高铁血红蛋白还原试验	76
二、G6PD 缺陷变性珠蛋白小体试验	78
三、G6PD 荧光斑点试验	78
四、G6PD 活性检测	79
五、丙酮酸激酶荧光斑点试验	81
六、丙酮酸激酶活性检测	82
第四节 珠蛋白合成异常的检验	84
一、血红蛋白电泳检测	84
二、抗碱血红蛋白检测	86
三、HbF 酸洗脱法检测	87
四、异丙醇沉淀试验	88
五、热变性试验	89
六、红细胞包涵体试验	90
七、HbA ₂ 微柱层析试验	91
八、肽链分析	92
九、红细胞镰变试验	93
十、镰状细胞溶解度试验	94
十一、碳氧血红蛋白检测	95
第五节 免疫性溶血检验	96
一、抗人球蛋白试验	96
二、冷凝集素试验	98
三、冷热溶血试验	99
第六节 阵发性睡眠性血红蛋白尿试验	101
一、酸化血清溶血试验(Ham 试验)	101
二、蔗糖溶血试验	102
三、CD ₅₅ 、CD ₅₉ 检测	102
第七节 低色素小细胞性贫血检验	104
一、血清铁蛋白检测	104

二、红细胞内游离原卟啉检测	105
三、血清铁检测	106
四、血清总铁结合力及转铁蛋白饱和度检测	107
五、血清转铁蛋白检验	108
第八节 正常色素正常细胞性贫血的检验	109
一、再生障碍性贫血检验	109
二、骨髓病性贫血检验	110
第九节 巨幼细胞性贫血检验	111
一、血清维生素 B ₁₂ 检测	111
二、血清维生素 B ₁₂ 吸收试验	111
三、尿甲基丙二酸排泄试验	112
四、血清(红细胞)叶酸检测	114
五、组氨酸负荷试验	115
第三章 白细胞检验	117
第一节 白细胞功能检验	117
一、墨汁吞噬试验	117
二、白细胞吞噬功能试验	118
三、血清溶菌酶活性试验	119
四、硝基四氮唑蓝还原试验	121
五、白细胞趋化试验	122
六、吞噬细胞吞噬功能试验	123
第二节 白细胞代谢及其产物检验	125
一、末端脱氧核苷酰转移酶(TdT)检测	125
二、N-碱性磷酸酶检测	128
三、酸性 α -醋酸酯酶检测	130
第三节 白细胞动力学检验	131
一、流式细胞术检测	131
二、泼尼松刺激试验	132
三、肾上腺素激发试验	133
四、二异丙酯氟磷酸盐标记检测	134
五、粒细胞抗体检测	136
第四节 白细胞免疫标记检测	138
一、流式细胞仪计数检测	138
二、荧光显微镜计数检测	139
三、碱性磷酸酶-抗碱性磷酸酶桥联酶标记法检测	141
四、生物素-亲和素酶标法检测	143
第四章 血栓与止血检验	146

第一节 筛检试验	146
一、束臂试验	146
二、出血时间	147
三、血小板计数	148
四、血浆凝血酶原时间测定	149
五、活化部分凝血活酶时间测定	151
六、血浆纤维蛋白原检测	152
七、优球蛋白溶解时间	153
八、血清纤维蛋白(原)降解产物检测	154
九、血浆 D-二聚体检测	155
第二节 血管壁检验	155
一、血浆血管性血友病因子抗原检测	155
二、血浆 vWF 瑞斯托霉素辅因子检测	157
三、血浆 6-酮-前列腺素 F _{1α} 检测	158
四、血浆内皮素-1 检测	159
第三节 血小板检验	161
一、血小板生存时间检测	161
二、血小板相关抗体检测	162
三、血小板相关补体 3 检测	163
四、血小板粘附试验	164
五、血小板聚集试验	166
六、血浆 β-血小板球蛋白和血小板第 4 因子检测	168
七、血小板第 3 因子有效性检测	170
八、血块收缩试验	171
九、血浆血栓烷 B ₂ 检测	172
十、血小板膜糖蛋白检测	173
第四节 凝血因子检验	175
一、简易凝血活酶生成试验及纠正试验	175
二、血浆蝮蛇毒时间	177
三、血浆因子Ⅲ、Ⅸ和Ⅺ促凝活性检测	177
四、血浆因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ促凝活性检测	179
五、血浆纤维蛋白原检测	180
六、血浆因子Ⅲ定性试验	181
第五节 生理性抗凝蛋白的检验	182
一、血浆抗凝血酶抗原检测	182
二、血浆抗凝血酶活性测定	183
三、血浆蛋白 C 抗原含量检测	184
四、血浆蛋白 C 活性检测	185
五、血浆蛋白 S 抗原含量检测	186

六、血浆活化蛋白 C 抵抗试验	187
七、组织因子途径抑制物抗原检测	188
八、组织因子途径抑制物活性检测	190
九、可溶性纤维蛋白单体复合物检测	191
第六节 病理性抗凝物质的检验	192
一、复钙交叉试验	192
二、凝血因子Ⅲ抑制物检测	193
三、狼疮抗凝物质的筛选试验和确诊试验	194
第七节 纤溶活性检测	194
一、血浆凝血酶时间	194
二、血浆硫酸鱼精蛋白副凝固试验	195
三、血浆纤溶酶原检测	196
四、血浆抗纤溶酶活性检测	199
五、血浆纤溶酶原活化剂检测	200
六、血浆纤溶酶原活化抑制剂检测	203
第八节 血栓前状态的检测	206
一、血栓调节蛋白检测	206
二、血浆纤维蛋白肽 A 检测	208
三、血浆纤溶酶- α_2 抗纤溶酶复合物检测	209
四、血小板表面 P 选择素检测	211
五、血浆凝血酶-抗凝血酶复合物检测	212
六、血浆凝血酶原片段 1+2 检测	213
第九节 血液流变学检验	214
一、全血粘度检测	214
二、血浆(血清)粘度检测	216
第五章 血液学检验的影响因素和质量控制	218
第一节 血液学检验的影响因素	218
一、标本因素	218
二、试剂和仪器因素	220
三、方法学和操作者因素	221
第二节 质量控制	221
一、质量控制的原则	221
二、质量控制的方法	222
三、试验的标准化	224
附录一 索引	225
附录二 参考书目	231

第一章 检验的基本方法

第一节 血细胞化学染色检验

一、过氧化物酶(POX)染色

(一) 3-氨基-9-乙基咪唑法

【原理】 细胞内的过氧化物酶(peroxidase, POX), 能将底物 H_2O_2 分解, 产生新生态氧, 使 3-氨基-9-乙基咪唑(3-amino-9-ethylcarbazole, AEC) 氧化, 产生棕红色颗粒并沉积于细胞内酶活性所在部位。

【材料】

1. 固定液(pH6.6)

磷酸氢二钠	20mg	磷酸氢二钾	100mg
甲醛	25ml	丙酮	45ml
蒸馏水	30ml		

2. 染色液

3-氨基-9-乙基咪唑	10mg	二甲亚砜	6ml
0.02mol/L 醋酸缓冲液(pH5.0~5.2)	50ml	0.3%过氧化氢	0.4ml

使用前过滤, 最终 pH 为 5.5。

3. Mayer 苏木素染液。

【操作】

1. 新鲜干燥的涂片上放入固定液中固定 15s, 水洗。
2. 浸入染色液 2.5min, 水洗。
3. Mayer 苏木素复染 8~15min。
4. 水洗, 待干, 镜检。

【注意事项】

1. 标本需新鲜制作, 涂片厚薄适宜。
2. 染色液临用前应新鲜配制。
3. 染色液 pH 应为 5.5。
4. 用健康人末梢血片作阳性对照。

【结果】 阳性反应为棕红色颗粒。

阴性: 无颗粒。

弱阳性: 颗粒小, 分布稀疏。

阳性: 颗粒中等大小, 有少量堆积分布。

强阳性: 颗粒粗大, 堆积分布。

【临床意义】 POX 染色是鉴别急性粒细胞白血病(急粒)、急性单核细胞白血病(急单)、急性淋巴细胞白血病(急淋)类型的重要细胞化学染色方法。急粒时白血病细胞可呈阳性反应;急淋时白血病细胞呈阴性反应;急单时白血病细胞呈阴性反应或弱阳性反应。

【评价】 3-氨基-9-乙基咪唑法试剂无致癌物质,显色稳定性较好。但染色效果受试剂的 pH 的影响较大。3-氨基-9-乙基咪唑法是目前临床上过氧化物酶染色推荐使用的方法。

(二) 四甲基联苯胺法

【原理】 细胞质内的过氧化物酶能将底物 H_2O_2 分解,产生新生态氧,使四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)氧化为四甲基联苯胺蓝。四甲基联苯胺蓝自我脱氢氧化成棕色的四甲基苯醌二胺。若加入亚硝基铁氰化钠与四甲基联苯胺蓝结合,可形成稳定的蓝色颗粒,定位于细胞质酶所在部位。

【材料】

1. 1% TMB (3,5,3',5'-四甲基联苯胺)乙醇溶液 0.1g TMB 溶于 100ml 88% 乙醇溶液中,置棕色瓶内,冰箱保存。

2. 亚硝基铁氰化钠饱和溶液 在少量蒸馏水中加入亚硝基铁氰化钠晶体,至不再溶解为止,置棕色瓶内,冰箱保存。

3. 1% 过氧化氢溶液 取 30% H_2O_2 1ml 加入蒸馏水 29ml。

4. 稀过氧化氢溶液 1% H_2O_2 1 滴,加 10ml 蒸馏水稀释(新鲜配制)。

5. 瑞氏染色液。

【操作】

1. 取 0.1% TMB 乙醇溶液 1ml,加亚硝基铁氰化钠饱和溶液 $10\mu l$,溶液呈淡棕黄色。染色液应在临用前配制。

2. 在新鲜干燥的涂片上,加 0.1% TMB-亚硝基铁氰化钠饱和溶液的混合试剂 0.5ml,放置 1min 后,再加稀 H_2O_2 溶液 0.7ml,吹匀,染色 6min。

3. 直接用流水冲洗,待干,再用瑞氏染液复染 15~20min。

4. 流水冲洗后,待干,用油镜镜检。

【注意事项】

1. 血涂片或骨髓涂片应新鲜制作,涂片厚薄适宜。

2. TMB 配制在 85%~88% 的乙醇溶液中染色效果较好,勿用 90%~95% 乙醇,否则细胞表面蛋白质很快凝固,妨碍试剂向胞内渗入而使作用减弱。

3. H_2O_2 需新鲜配制,其浓度与加入量不能随意更改。涂片中粒细胞看不见阳性颗粒,红细胞呈棕色或绿色,即表示 H_2O_2 过浓。若 H_2O_2 加于血片上不产生气泡,则示无效。

4. 染色液 pH 应为 5.5。

5. 试剂应置于低温暗处,防止光线照射失效。

【结果】 在细胞胞质中出现蓝色或蓝黑色颗粒为阳性反应。

1. 阳性反应强度的判断

阴性:无颗粒。

弱阳性:颗粒小,分布稀疏。

阳性:颗粒略粗,分布较密集。

强阳性:颗粒粗大,密布于整个胞质中。

2. 粒细胞系统 早期原始粒细胞阴性;晚期原始粒细胞及以下各阶段均含不同程度的蓝黑色颗粒,随粒细胞成熟阳性反应逐渐增强;衰老的中性粒细胞酶活性降低,反应程度减弱,甚至呈阴性反应;嗜酸性粒细胞阳性反应最强,颗粒更粗大,呈蓝黑色;嗜碱性粒细胞阴性。

3. 单核细胞系统 除早期原始细胞外皆可呈弱阳性反应,其颗粒细小弥散分布,可覆盖核上,但有的呈阴性反应。

4. 成熟型网状细胞及巨噬细胞 可呈不同程度的阳性反应。

5. 红细胞、淋巴细胞、巨核细胞、浆细胞系等 均为阴性反应。

6. Auer小体 呈阳性反应。

【临床意义】 同3-氨基-9-乙基吖唑法。

【评价】 POX染色是鉴别急性白血病类型最常用的细胞化学染色方法,但因原始细胞多表现为阴性反应,故本法对白血病的分型有一定的局限性,特别是对某些分化极差的白血病,可能失去鉴别意义。四甲基联苯胺法操作简单,染色较好,试剂无致癌作用,但对染液的pH要求较高,如过低($\text{pH} < 5.0$)会出现假阳性结果。

二、苏丹黑 B(SB)染色

【原理】 苏丹黑 B(sudan black B, SB)是强脂溶性染料,可溶解于细胞质内含脂的结构中,使胞质中的脂类物质显示出来。

【材料】

1. 400g/L 甲醛溶液。

2. 缓冲液

(1)A液:取酚 16g 溶于无水乙醇 30ml 中。

(2)B液:0.3g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)溶于 100ml 蒸馏水。

将 A 液与 B 液分别溶解后混匀。

3. 苏丹黑 B 贮备液

苏丹黑 B 0.3g

无水乙醇 100ml

在室温中经常摇荡,数天后使其完全溶解。

4. 苏丹黑 B 染色液 苏丹黑 B 贮存液与缓冲液 3:2 混合,负压抽滤,可用一周。

5. 70%乙醇。

6. 瑞氏染液。

【操作】

1. 干燥涂片用 400g/L 甲醛蒸气固定 10min,水洗 3~5min。

2. 置苏丹黑 B 染色液中 37℃染色 30~60min。

3. 用 70%乙醇冲洗 1~2min,然后水洗 1min。

4. 待干后,用瑞氏染色液复染 20~30min。

5. 水洗,待干,镜检。

【注意事项】

1. 苏丹黑 B 贮存液可用 1~2 月,如发生沉淀或蓝色变为褐色,则不宜使用。
2. 室温中染色时间需 20h,提高染色温度可缩短时间。
3. 已固定的旧标本作苏丹黑 B 染色,其阳性程度比过氧化物酶染色明显。

【结果】 阳性反应呈棕黑或深黑色颗粒,定位于胞质中。

1. 粒细胞系 原始粒细胞一般为阴性反应,有的可出现少量阳性颗粒,早幼粒细胞以后,随着细胞的发育成熟阳性反应逐渐增强,颗粒增多,变粗;嗜酸性粒细胞阳性颗粒粗大,着色深;嗜碱性粒细胞呈阴性或阳性反应,阳性颗粒大小不一。

2. 单核细胞系 原始单核细胞一般为阴性反应,幼单核细胞和单核细胞呈弱阳性反应,颗粒细小呈弥散分布。

3. 其它细胞 淋巴细胞、幼红细胞、巨核细胞和血小板均呈阴性反应,网状细胞、巨噬细胞可呈阳性反应。

【临床意义】 SB 染色一般与 POX 染色结果相同,二者临床意义相似。它有助于鉴别急性白血病类型。急粒时白血病细胞可呈阳性反应,以 M_3 反应最强;急淋时白血病细胞呈阴性反应;急单时白血病细胞呈阴性反应或弱阳性反应。

【评价】 过氧化物酶染色要求涂片新鲜,保持酶活性,才能得出正确结果;而苏丹黑 B 染色则无此要求。也有人认为在急性粒细胞白血病 M_1 型,苏丹黑 B 染色较过氧化物酶染色敏感,但特异性不如过氧化物酶染色(极少数急淋白血病细胞可为阳性)。

三、过碘酸-雪夫反应(PAS 法)

【原理】 细胞内含有 1,2-乙二醇基的糖类在高碘酸(periodic acid)的氧化作用下产生双醛基,后者与雪夫(Schiff)染料作用,使无色品红变为紫红色的化合物,定位于胞质中。根据胞质中糖原种类及含量多少,可呈现粗细不等的红色颗粒、块状物或均匀红色。在高碘酸氧化前,用麦芽糖淀粉酶或唾液淀粉酶处理标本,再作糖原染色,可鉴别是糖原还是其它多糖类物质,如被消化则是糖原,如不被消化则为其它多糖类物质。

【材料】

1. 10g/L 高碘酸溶液 $HIO_4 \cdot 2H_2O$ 1g 溶于 100ml 蒸馏水中。

2. 雪夫(Schiff)染液 取蒸馏水 200ml 加入 500ml 三角烧瓶内,加热至沸。移开火焰缓缓少量加入碱性品红 1g 继续加热 2min,使之充分溶解,停止加热。待冷却至 60℃ 左右时,过滤,加入 1mol/L 盐酸 20ml,混匀。待冷却至 25℃ 加入偏重亚硫酸钠($Na_2S_2O_5$) 2g 混匀,置带塞的棕色玻璃瓶中,放暗处 24h 后取出,加活性炭 1g,振荡混匀吸附色素,用滤纸过滤后密封在棕色瓶内,放冰箱保存。

3. 亚硫酸液

100g/L 偏重亚硫酸钠	6ml
1mol/L 盐酸	5ml
蒸馏水	100ml

每次用前新鲜配制。

4. 20g/L 甲绿

甲绿	2g
----	----

蒸馏水 加至 100ml

5. 淀粉酶 嚼石蜡刺激分泌唾液,收集唾液后离心取上清液,内含淀粉酶,或将麦芽糖淀粉酶 0.1~1.0g 溶于 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.0)100ml 中。

【操作】

1. 新鲜干燥的涂片用 95%乙醇固定 10min,蒸馏水冲洗,待干。
2. 如涂片需要消化,可加唾液或麦芽糖淀粉酶,置室温消化 60min,然后用蒸馏水冲洗。
3. 10g/L 高碘酸氧化 15~20min,蒸馏水冲洗,待干。
4. 置雪夫染液中室温染色 30~60min。
5. 用亚硫酸溶液冲洗 3 次后,再用自来水冲洗 2~3min,待干。
6. 20g/L 甲绿复染 10~20min。
7. 水洗,待干,镜检。

【注意事项】

1. 所用染色缸及器具应十分清洁、干燥。
2. 雪夫(Schiff)染液应避免光保存,无色,变红则失效。
3. 10g/L 高碘酸溶液质量要保证,变黄则不能用。氧化时间要准确,否则将导致假阳性或假阴性。
4. 染色好的涂片应及时检查,以免褪色。

【结果】

1. 阳性反应 细胞质内染红色或紫红色,呈弥散状、颗粒或块状。阴性反应,胞质无色。胞核染成绿色。

2. 反应强度判断标准

(1)中性粒细胞的分级标准:

- (一)胞质无色。
- (+)胞质内呈淡红色有极少颗粒。
- (++)胞质呈红色,厚而不透明,或有少量颗粒。
- (+++)胞质呈深红色,颗粒较紧密,但尚有空隙。
- (++++)胞质呈深紫红色,颗粒紧密,无空隙。

(2)淋巴细胞分级标准:

- (一)胞质内无色。
- (+)胞质内呈弥散淡红或有少数细颗粒(<10 个)。
- (++)胞质内呈弥散较深的红色或有多数细颗粒(≥ 10 个)。
- (+++)胞质内有较粗颗粒或少数小块状红色物质。
- (++++)胞质内呈多数粗颗粒并有大块红色物质。

(3)幼红细胞的分级标准:

- (一)胞质内无色。
- (+)胞质内有少数分散细小颗粒或浅红色弥漫物质。
- (++)胞质中有 1~2 个浓的颗粒环或胞质呈弥散红色。
- (+++)胞质中有较粗红色颗粒直至小块红色物质。

(+++++)有粗大红色块或有粗大致密的紫红色颗粒。

(4)巨核细胞的分级标准:

(-)胞质内无红色颗粒,如弥散性着色,此系其它多糖类物质。

(+)少量糖原包涵体,常定位于核膜附近。

(++)中等量糖原包涵体,定位于核膜处或分散在胞质中,约占胞质的1/3。

(+++大量糖原包涵体分散于胞质中,占胞质1/2。

(++++糖原包涵体充满整个胞质。

3. 粒细胞系统 原始粒细胞为阴性反应;自早幼粒细胞以下阶段均呈阳性反应,并随细胞的成熟阳性反应程度逐渐增强;嗜酸性粒细胞的颗粒本身不着色,而颗粒之间的胞质呈红色;嗜碱性粒细胞为阳性反应,阳性反应物质为大小不一的紫红色颗粒。

4. 红细胞系统 幼红细胞和红细胞均呈阴性反应。

5. 单核细胞系统 原始单核细胞为阴性反应;幼单核细胞为(+)阳性反应,单核细胞为(+)-(++)阳性反应,有时在胞质的边缘处颗粒较粗大。

6. 淋巴细胞 大多数淋巴细胞为阴性反应,少数淋巴细胞呈(+)阳性反应。

7. 巨核细胞和血小板 巨核细胞为阳性反应,呈红色颗粒状或块状;血小板为阳性反应,阳性反应物质为细颗粒状,有时为红色小块状。

8. 其他细胞 浆细胞一般为阴性反应,少数可呈红色细颗粒状阳性反应;巨噬细胞可呈红色细颗粒状阳性反应。

【临床意义】

1. 红血病、红白血病及贫血类型的鉴别 红血病、红白血病、重型地中海贫血、缺铁性贫血及MDS时幼红细胞呈强阳性反应;溶血性贫血时幼红细胞呈阴性反应或弱阳性反应;再生障碍性贫血、巨幼细胞性贫血时幼红细胞呈阴性反应。

2. 白血病类型的鉴别 急性粒细胞白血病原始粒细胞呈阴性或弱阳性反应,以弥漫性为主;急性淋巴细胞白血病原、幼淋巴细胞多呈块状阳性反应,也有少数呈阴性反应;急性单核细胞白血病原、幼单核细胞呈阳性反应,其颗粒细小,弥散分布。

【评价】

1. 固定试剂的影响 固定试剂不同,染色结果不同。目前较常用的有95%乙醇、纯甲醇及甲醛蒸气,其中乙醇固定后糖原颗粒明显,成熟粒细胞的反应彼此之间有较明显的颜色差异,易于判断阳性反应的程度,且唾液消化后的对照标本没有假阳性,故通常选用乙醇为固定剂。

2. 碱性品红对染色的影响 不同品牌的碱性品红染色效果不一,碱性品红的质量是试验成败的关键因素之一。

3. 染色后标本应及早观察和记录,染色后标本保存8d后,将逐渐褪色,保存时间延长,褪色更为明显。

四、碱性磷酸酶(NAP)染色

(一) 钙-钴法

【原理】 中性粒细胞内碱性磷酸酶(neutrophile alkaline phosphatase, NAP)在pH9.2~9.8时,将底物 β -甘油磷酸钠水解,产生磷酸钠。磷酸钠与钙离子发生反应,形

成不溶性磷酸钙。磷酸钙再与硝酸钴发生反应,形成磷酸钴。最后与硫化铵发生反应,形成不溶性棕黑色硫化钴沉淀,定位于酶活性之处。

【材料】

1. 10%甲醛甲醇固定液

甲醛 10ml

甲醇 90ml

混合后冰箱备用,每周配一次。

2. β -甘油磷酸钠基质液

30g/L β -甘油磷酸钠 5ml

20g/L 氯化钙 10ml

20g/L 巴比妥钠液 5ml

20g/L 硫酸镁液 1ml

蒸馏水 10ml

用玻璃棒搅拌使之完全溶解后用 1mol/L 盐酸或 1mol/L 氢氧化钠调节 pH 至

9.4。

3. 20g/L 硝酸钴。

4. 20g/L 硫化铵(临用前配制,用完弃去)。

5. 10g/L 伊红。

【操作】

1. 新鲜干燥的涂片放入冷 10%甲醛甲醇液中固定 10min,用流水冲洗,待干。

2. 将涂片放入预温至 37℃的基质液中,温育 4~6h。

3. 滴加 20g/L 硝酸钴,5min,蒸馏水冲洗。

4. 滴加 20g/L 硫化铵,5min,蒸馏水冲洗。

5. 用 10g/L 伊红复染 3~5min,水洗,待干,镜检。

【注意事项】

1. 标本应新鲜,存放过久,酶活性降低,一般在 1 周内进行染色观察。

2. 低温固定,细胞不易破碎,从而使酶不易扩散,定位准确。

3. β -甘油磷酸钠的基质液必须新鲜配制。

4. 基质液的 pH 以 9.4~9.6 为宜,pH<9.0 时酶活性明显下降,且沉淀易分解。pH>10.0 时细胞易破碎,使酶扩散,黑色颗粒散于细胞外,造成假阴性。

5. 每次染色时,最好做一份感染患者的血片,作为阳性对照,便于确定方法是否可靠。

【结果】

1. 健康人的血细胞碱性磷酸酶除中性成熟粒细胞(杆状核及分叶核)可见阳性外,其它细胞均呈阴性。

2. 判断标准及分级

(-)0 分:胞质呈淡红色。

(+)1 分:胞质呈均匀浅灰色,无颗粒或有少量棕黑色颗粒,但不超过胞质的 1/4。

(++)2 分:全部胞质呈均匀棕黑色或出现较粗的黑色颗粒,不超过胞质 1/2。

(+++)**3分**:胞质中已基本充满棕黑色颗粒,但颗粒之间有空隙。

(++++)**4分**:全部胞质充满粗大棕黑色颗粒而呈深黑色,黑色沉淀甚至掩盖于胞核上。

3. **NAP积分** 油镜下计数100个中性杆状核、分叶核粒细胞,分别记录其分级情况,全部阳性细胞之和即为阳性率。将得出各种积分的百分率乘以该积分,再相加即为积分值。

例:4分 占20% $4 \times 20 = 80$ 分
3分 占40% $3 \times 40 = 120$ 分
2分 占18% $2 \times 18 = 36$ 分
1分 占10% $1 \times 10 = 10$ 分
0分 占12% $0 \times 12 = 0$ 分
阳性率88% 积分=246分

【参考值】健康成人NAP积分值为7~51分。但因实验条件(实验方法、试剂质量、结果判断)不同,差别很大,故应建立自己实验室的参考值。

【临床意义】临床上主要用于鉴别:

1. 慢粒与类白血病反应 慢粒(无继发性感染者)时,NAP一般明显下降;类白血病反应时则显著增高。

2. 阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)与再生障碍性贫血(再障) PNH常降低,再障常增高。

3. 急性白血病的细胞类型 急淋增高,急粒下降。

【评价】本法试剂易得、低廉,但试剂配制复杂,操作繁琐,费时,影响因素多。

(二) 卡氏(kaplow)偶氮偶联法

【原理】中性粒细胞胞质中的碱性磷酸酶在pH9.6的碱性条件下能水解磷酸萘酚,生成萘酚,后者与重氮盐偶联形成不溶性的有色沉淀定位于胞质中的酶活性处。

【材料】

1. 10%甲醛甲醇固定液。

2. 丙二醇缓冲液

(1)贮备液(0.2mol/L):

2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇	10.5g
蒸馏水	加至500ml

溶解后保存冰箱内。

(2)应用液(0.05mol/L,pH9.75):

0.2mol/L 贮存液	25ml
0.1mol/L 盐酸	5ml
蒸馏水	加至100ml

3. 基质孵育液(pH9.5~9.6) α -磷酸萘酚钠 20mg 溶于0.05mol/L 丙二醇缓冲液20ml,再加坚牢紫酱 GBC 盐(或重氮坚牢蓝)20mg 混合后用滤纸过滤,用前临时配制。

4. 1g/L 苏木素复染液 取1g 苏木素加到蒸馏水500ml中,加热煮沸,使苏木素溶解,再加入蒸馏水500ml、碘酸钠200mg、硫酸铝钾50g,充分混匀,置棕色玻璃瓶中室温