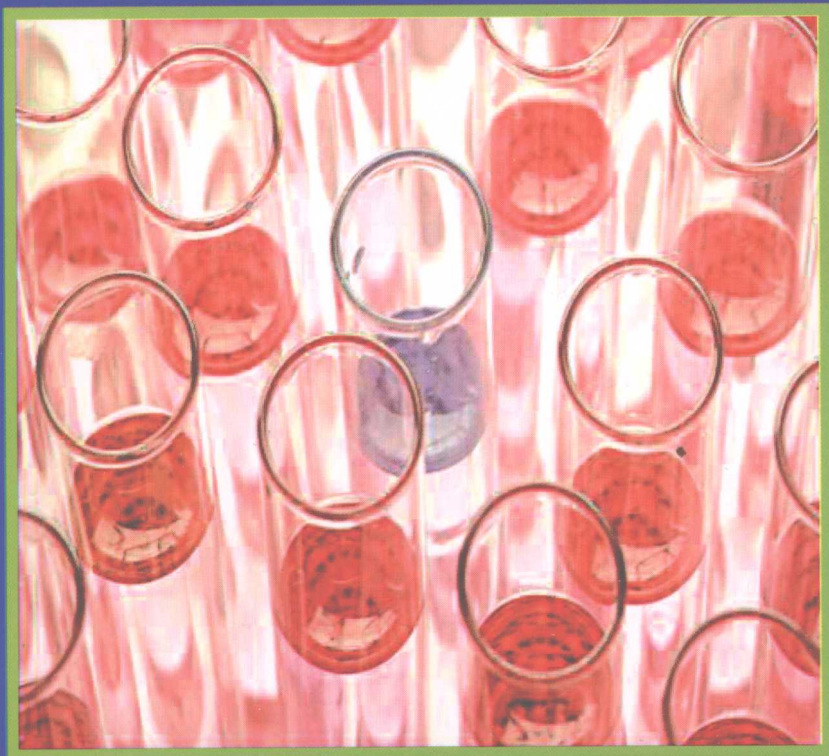


SHIYONGLIN CHUANGJIANYANCAOZUOJISHU

实用临床检验 操作技术

主编 曲灿华 刘亚波 辛 华



黑龙江科学技术出版社

实用临床检验操作技术

主 编 曲灿华 刘亚波 辛 华

黑龙江科学技术出版社
中国·哈尔滨

图书在版编目 (CIP) 数据

实用临床检验操作技术/曲灿华等主编. —哈尔滨:
黑龙江科学技术出版社, 2008. 1
ISBN 978-7-5388-5648-4

I. 实... II. 曲... III. 临床医学—医学检
验 IV. R446. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 204444 号

责任编辑 张洪冰

封面设计 刘 洋

实用临床检验操作技术

SHIYONG LINCHUANG JIANYAN CAOZUO JISHU

主 编 曲灿华 刘亚波 辛 华

出 版 黑龙江科学技术出版社

(150001 哈尔滨市南岗区建设街 41 号)

电话 (0451) 53642106 电传 53642143 (发行部)

印 刷 佳木斯大学印刷厂

发 行 黑龙江科学技术出版社

开 本 787×1092 1/16

印 张 34.25

字 数 700 000

版 次 2008 年 1 月第 1 版·2008 年 1 月第 1 次印刷

印 数 1—500

书 号 ISBN 978-7-5388-5648-4/R·1437

定 价 55.00 元

《实用临床检验操作技术》编委会

主 编	曲灿华 (佳木斯大学附属第一医院	副主任技师)
	刘亚波 (佳木斯大学附属第一医院	副主任技师)
	辛 华 (佳木斯大学附属第一医院	副主任技师)
副主编	王 琳 (佳木斯大学附属第一医院	主管技师)
	张国莲 (黑龙江省浩良河化肥厂医院	主管技师)
	李 丽 (萝北县宝泉岭中心医院	主管检验技师)
编 委	苏雪莹 (佳木斯大学附属第一医院	主管技师)
	王 英 (佳木斯大学附属第一医院	主管技师)
	王 芳 (佳木斯大学临床学院	讲师)
	王晓红 (佳木斯大学附属第一医院	主管技师)
	刘君星 (佳木斯大学基础医学院	副教授)
	李利军 (佳木斯大学附属第一医院	主管技师)
	李 寅 (佳木斯出入境检验检疫局	主管检验技师)
	张 晶 (佳木斯中心医院	主管检验技师)
	和 军 (佳木斯大学附属第一医院	主管技师)
	林 红 (佳木斯传染病院	主管检验技师)
	赵 刚 (佳木斯大学附属第二医院	主治医师)

目 录

第一编 临床血液学检验

第一章 血液一般检验	(1)
第一节 血红蛋白测定	(1)
第二节 红细胞计数	(4)
第三节 血涂片的制备与染色	(5)
第四节 红细胞形态学检查	(7)
第五节 红细胞比容测定	(9)
第六节 三种红细胞参数平均值计算	(11)
第七节 网织红细胞计数	(12)
第八节 白细胞计数	(13)
第九节 白细胞分类计数	(15)
第十节 白细胞形态学检查	(16)
第十一节 嗜酸粒细胞直接计数	(18)
第十二节 血小板计数	(20)
第十三节 红细胞沉降率测定	(21)
第十四节 红斑狼疮细胞检查	(23)
第十五节 血细胞自动分析仪	(23)
第二章 血栓与止血检验	(32)
第一节 血小板功能检查	(32)
第二节 凝血系统检查	(37)
第三节 纤溶及抗凝物质测定	(45)
第四节 血液流变学检查	(48)
第三章 溶血性贫血的检查	(54)
第一节 血浆游离血红蛋白测定	(54)
第二节 红细胞渗透脆性试验	(55)
第三节 红细胞孵育渗透脆性试验	(56)
第四节 红细胞自身溶血试验	(57)
第五节 高铁血红蛋白还原试验	(59)
第六节 血红蛋白 F 碱变性试验	(60)
第七节 血红蛋白电泳检查	(61)

第八节 蔗糖水溶血试验	(63)
第九节 血清酸化溶血试验	(63)
第四章 骨髓细胞学检查及血细胞化学染色	(65)
第一节 血常规和骨髓象检查	(65)
第二节 血细胞化学染色	(79)
第五章 血型血清学检查	(87)
第一节 ABO 血型鉴定	(87)
第二节 Rh 血型鉴定	(89)
第三节 交叉配血试验	(90)
第四节 抗球蛋白试验	(91)

第二编 临床体液检验

第一章 尿液检验	(94)
第一节 尿液标本的收集和处理	(94)
第二节 尿液的理学检查	(95)
第三节 尿液化学检查	(97)
第四节 尿沉渣检查	(115)
第五节 尿绒毛膜促性腺激素检测	(120)
第二章 粪便检验	(122)
第一节 粪便标本的采集方法及注意事项	(122)
第二节 粪便标本检验后处理	(122)
第三节 粪便的理学检验	(122)
第四节 粪便显微镜检查	(123)
第五节 粪便隐血试验	(125)
第三章 体液及排泄物检查	(127)
第一节 脑脊液检查	(127)
第二节 浆膜腔积液检查	(130)
第三节 精液检查	(133)
第四节 前列腺液检查	(136)
第五节 胃液检查	(137)
第六节 十二指肠引流液及胆汁检查	(139)

第三编 临床生化检验

第一章 蛋白质测定	(140)
第一节 血清总蛋白测定	(140)
第二节 血清白蛋白测定	(143)
第三节 脑脊液总蛋白测定	(145)
第四节 血清蛋白醋酸纤维素膜电泳	(146)

第五节 糖化血清蛋白测定·····	(150)
第二章 血清非蛋白含氮类化合物测定·····	(152)
第一节 血清尿素测定·····	(152)
第二节 肌酐测定·····	(155)
第三节 血清尿酸测定·····	(156)
第四节 血清胱抑素 C 测定 ·····	(158)
第三章 糖类测定·····	(159)
第一节 血清葡萄糖测定·····	(159)
第二节 口服葡萄糖耐量试验·····	(161)
第三节 脑脊液葡萄糖测定·····	(162)
第四章 血脂及脂蛋白测定·····	(164)
第一节 血清总胆固醇测定·····	(164)
第二节 血清三酸甘油测定·····	(165)
第三节 高密度脂蛋白胆固醇测定·····	(167)
第四节 低密度脂蛋白胆固醇测定·····	(168)
第五节 血清载脂蛋白测定·····	(169)
第五章 血清无机离子测定·····	(174)
第一节 血清钾、钠测定·····	(174)
第二节 血清氯化物测定·····	(179)
第三节 血浆(清)碳酸氢根及总二氧化碳测定·····	(182)
第四节 血清总钙测定·····	(185)
第五节 血清无机磷测定·····	(187)
第六节 血清镁测定·····	(189)
第七节 血清铁和总铁结合力测定·····	(192)
第六章 血清酶活性测定·····	(195)
第一节 血清天门冬氨酸氨基转移酶(AST)活性测定·····	(195)
第二节 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性测定 ·····	(198)
第三节 血清碱性磷酸酶(ALP)活性测定·····	(203)
第四节 血清乳酸脱氢酶(LDH)活性测定 ·····	(205)
第五节 血清 L-γ-谷氨酰基转移酶(GGT)活性测定 ·····	(207)
第六节 血清肌酸激酶(CK)活性测定 ·····	(211)
第七节 血清肌酸激酶同工酶测定·····	(213)
第八节 血清淀粉酶(AMS)活性测定 ·····	(215)
第九节 胰淀粉酶(P-AMY)测定 ·····	(218)
第十节 血清胆碱酯酶(ChE)活性测定·····	(219)
第十一节 血清腺苷脱氨酶(ADA)活性测定 ·····	(220)
第十二节 血清单胺氧化酶(MAO)活性测定 ·····	(222)
第十三节 血清 α-羟丁酸脱氢酶(α-HBD)活性测定·····	(223)

第七章 肝功能检验	(225)
第一节 血清胆红素测定	(225)
第二节 胆汁酸测定	(227)
第八章 血气与酸碱分析	(230)
第一节 血液标本的采集和保存	(230)
第二节 电极的保养及注意事项	(232)
第三节 血气及酸碱分析常用参数	(234)
第四节 血气分析及酸碱失衡的判断	(243)
第九章 自动化分析仪	(252)
第一节 自动生化分析仪的校准	(252)
第二节 自动生化分析仪的检定	(254)
第三节 自动生化分析仪分析参数的设置	(256)
第四节 自动生化分析仪用的试剂盒	(258)
第五节 自动生化分析仪的管理	(260)

第四编 临床免疫学检验

第一章 免疫学检验的常用技术	(262)
第一节 免疫比浊技术	(262)
第二节 生物素与链霉亲合素的应用技术	(264)
第三节 金标记免疫分析技术	(266)
第四节 免疫电泳技术	(269)
第五节 免疫荧光测定技术	(271)
第六节 酶联免疫吸附试验	(274)
第七节 自动化学发光免疫分析技术	(276)
第八节 免疫印迹技术	(279)
第九节 流式细胞术	(281)
第十节 免疫学检验的质量控制	(283)
第二章 感染性疾病与感染免疫检测	(298)
第一节 细菌感染性疾病的免疫检测	(298)
第二节 病毒感染性疾病的免疫检测	(302)
第三节 先天性感染的免疫学检测	(320)
第四节 寄生虫感染的免疫检测	(324)
第五节 肺炎支原体感染的血清学检测	(327)
第六节 梅毒的血清学检测	(328)
第七节 急性期蛋白测定	(332)
第三章 免疫球蛋白、循环免疫复合物与补体测定	(335)
第一节 IgG, IgA, IgM 测定	(335)
第二节 IgD 测定	(338)

第三节	IgE 测定	(339)
第四节	M 蛋白测定	(340)
第五节	循环免疫复合物测定	(341)
第六节	补体测定	(343)
第四章	细胞免疫相关指标测定	(347)
第一节	淋巴细胞亚群测定	(347)
第二节	淋巴细胞增殖试验	(349)
第三节	白细胞介素-2 (IL-2) 测定	(350)
第四节	γ 干扰素 (IFN- γ) 测定	(352)
第五节	肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 测定	(353)
第五章	自身抗体测定	(355)
第一节	类风湿因子 (RF) 测定	(355)
第二节	抗核抗体测定	(356)
第三节	抗双链 DNA (dsDNA) 抗体测定	(359)
第四节	抗 ENA 抗体测定	(361)
第六章	肿瘤标志物测定	(363)
第一节	甲胎蛋白 (AFP) 测定	(363)
第二节	癌胚抗原 (CEA) 测定	(366)
第三节	前列腺特异抗原 (PSA) 测定	(368)
第四节	人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 测定	(375)

第五编 临床微生物学检验

第一章	临床微生物实验室管理概论	(379)
第一节	临床微生物实验室的基本条件	(379)
第二节	临床微生物实验室生物安全管理	(383)
第三节	临床微生物实验室信息管理	(385)
第四节	临床微生物检验的质量保证	(386)
第五节	临床微生物实验室菌株保存和管理	(392)
第六节	基本染色方法	(393)
第七节	临床细菌实验常用培养基	(397)
第八节	临床细菌实验基本的生化鉴定培养基及诊断血清	(402)
第九节	消毒与灭菌	(404)
第二章	临床细菌检验标本的采集、运送、保存和处理	(408)
第一节	临床细菌检验标本的采集、运送和保存	(408)
第二节	临床细菌检验标本的处理	(409)
第三节	血液和骨髓标本的处理	(411)
第四节	脑脊液标本的处理	(415)
第五节	尿标本的采集、运送和处理	(417)

第六节 下呼吸道标本的处理·····	(419)
第七节 粪便标本的处理·····	(422)
第八节 眼、耳、鼻、喉标本的收集和处理·····	(426)
第九节 脓液标本的处理(病灶分泌物)·····	(428)
第十节 无菌体液标本的处理·····	(430)
第十一节 生殖系统标本的处理·····	(432)
第三章 临床常见微生物的培养和鉴定·····	(434)
第一节 临床微生物的常规鉴定·····	(434)
第二节 球菌·····	(436)
第三节 肠杆菌科细菌·····	(445)
第四节 不发酵菌和其他革兰阴性杆菌·····	(454)
第五节 弧菌属、弯曲菌属和螺杆菌属·····	(459)
第六节 需氧革兰阳性杆菌·····	(463)
第七节 分枝杆菌属、放线菌属和诺卡菌属·····	(469)
第八节 厌氧菌·····	(472)
第九节 螺旋体·····	(477)
第十节 支原体和脲原体·····	(480)
第十一节 衣原体·····	(482)
第四章 临床常见真菌的培养和鉴定·····	(485)
第一节 真菌检验基本技术·····	(485)
第二节 临床常见浅部真菌培养和鉴定·····	(487)
第三节 临床常见深部真菌培养和鉴定·····	(489)
第五章 抗菌药物敏感性试验与细菌耐药性检测·····	(494)
第一节 纸片扩散法·····	(494)
第二节 稀释法·····	(497)
第三节 E 试验·····	(500)
第四节 联合药敏试验·····	(501)
第五节 特殊耐药菌及耐药酶的表型检测·····	(502)
第六章 病毒、细菌及其他病毒病原体核酸的 PCR 检测·····	(507)
第一节 聚合酶链反应(PCR)技术·····	(507)
第二节 实时荧光 PCR 技术的基本原理和方法·····	(513)
第三节 乙型病毒性肝炎病毒核酸(HBV DNA)的 PCR 测定·····	(516)
第四节 丙型病毒性肝炎病毒核酸(HCV RNA)的 PCR 测定·····	(521)
第五节 人乳头状瘤病毒核酸(HPV DNA)的 PCR 测定·····	(524)
第六节 结核杆菌的 PCR 检测·····	(528)
第七节 淋病奈瑟菌的 PCR 检测·····	(532)
第八节 沙眼衣原体的 PCR 检测·····	(534)
第九节 解脲支原体的 PCR 测定·····	(536)

第一编 临床血液学检验

第一章 血液一般检验

第一节 血红蛋白测定

一、氰化高铁血红蛋白 (HiCN) 测定法

原理

在血红蛋白转化液中，除硫化血红蛋白外，其余血红蛋白均可被高铁氰化钾氧化成高铁血红蛋白，再与氰离子 (CN^-) 结合，生成稳定的复合物氰化高铁血红蛋白 (HiCN)。棕红色的氰化高铁血红蛋白在波长 540 nm 处有吸收峰，可用校准的高精度分光光度计进行直接定量测定，或用 HiCN 参考液进行比色法测定，根据标本的吸光度即可求出血红蛋白浓度。

试剂

(1) HiCN 转化液 (文齐液)。氰化钾 (KCN) 50 mg; 高铁氰化钾 [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] 200 mg; 无水磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 140 mg; Triton X-100 1.0 mL; 蒸馏水加至 1 000 mL, 纠正 pH 值至 7.0~7.4。此液为淡黄色透明溶液，用蒸馏水调零，比色杯光径 1.000 cm, 波长 540 nm 处的吸光度应 < 0.001 。贮存在棕色有塞玻璃瓶中，放 4℃ 冰箱保存，一般可数月。如发现试剂变绿、浑浊则不能使用。

(2) HiCN 标准液 (200 g/L) 商品试剂。

操作

1. 直接定量测定

(1) 试管内加 5 mL HiCN 转化液。

(2) 取全血 20 μL ，加到盛有转化液的试管底部，用上清液反复冲洗吸管 3 次，充分混合，静置 5 min。

(3) 以符合 WHO 标准的分光光度计 (常规测定时带宽应 < 6 nm)，波长 540 nm 处，光径 (比色杯内经) 1.000 cm，HiCN 转化液或蒸馏水调零，测定吸光度 (A)。

(4) 根据标本的吸光度 (A) 直接计算出血红蛋白含量 (g/L)。

$$\text{血红蛋白 (g/L)} = A \times \frac{64\ 458}{44\ 000} \times 251 = A \times 367.7$$

A: 540 nm 处测定管吸光度。

64 458: 目前国际公认的血红蛋白平均相对分子质量。

44 000: 1965 年国际血液学标准化委员会 (ICSH) 公认的血红蛋白毫摩尔消光系数。

251: 稀释倍数。

2. HiCN 标准液比色法测定

(1) 标准曲线绘制和 K 值计算。用 HiCN 标准液倍比稀释后 (50 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L), 在所用的分光光度计上 (相当 540 nm 处) 分别测定各稀释度的吸光度, 以标准品血红蛋白含量为横坐标、吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。或求出换算常数 K。

(2) 标本的血红蛋白转化和比色同直接定量测定, 得到标本的吸光度 (A)。

(3) 通过标准曲线查出待测样本的血红蛋白浓度或用 K 值来计算血红蛋白浓度, 即

$$\text{Hb (g/L)} = K \times A。$$

例如, 倍比稀释后 HiCN 标准液 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 分别测得 540 nm 处吸光度为 0.13, 0.27, 0.41, 0.54, 标本的吸光度为 0.32。先求出 K 值, 再计算出标本的血红蛋白含量 (g/L)。

$$K = \frac{\sum Hb}{\sum A} = \frac{50 + 100 + 150 + 200}{0.13 + 0.27 + 0.41 + 0.54} = 370.37$$

$$\text{Hb} = 370.37 \times 0.32 = 118.52 (\text{g/L})$$

参考范围

成年男性: 120~160 g/L。

成年女性: 110~150 g/L。

70 岁以上老年男性: 94.2~122.2 g/L。

70 岁以上老年女性: 86.5~111.8 g/L。

新生儿: 170~200 g/L。

注意事项

(1) 血红蛋白测定方法很多。但无论采用何种方法, 都必须以 HiCN 法为标准, 绘制标准曲线。标准曲线或 K 值应定期检查, 并与分光光度计相配。

(2) 标准微量吸管必须经过水银称重法校正。加液量必须准确, 血液与转化液充分混匀。可用血红蛋白液代替抗凝血进行鉴定。

(3) HiCN 转化液不能贮存在塑料瓶中, 否则会使 CN^- 丢失, 测定结果偏低。HiCN 转化液应贮存在棕色有塞玻璃瓶中, 4℃ 冰箱保存一般可用数月。但不能在 0℃ 以下保存, 因为结冰可引起高铁氰化钾还原, 使转化液褪色失效。

(4) 氰化钾是剧毒品, 配制转化液时要按剧毒品管理程序操作。测定后的废液不能与酸性溶液混合, 因为氰化钾遇酸可产生剧毒的氰氢酸气体。为防止氰化钾污染环境, 比色测定后的废液集中于广口瓶中。按每升 HiCN 废液加次氯酸钠溶液 (替福民) 40 mL, 充

分振摇混匀，敞开容器，置室温 3 h 以上，使 CN^- 氧化成 CO_2 和 N_2 挥发，或水解成 CO_3^{2-} 和 NH_4^+ ，再排入下水道。

(5) HiCN 转化液是 1 种低离子强度而 pH 又近中性的溶液，遇到白细胞过多或异常球蛋白增高的血液标本， HiCN 比色液会出现浑浊。若因白细胞过多引起的浑浊，离心后取上清液比色；若因球蛋白异常增高（肝硬变者）引起的浑浊，可在比色液中加入少许固体氯化钠或碳酸钾，混匀后可使溶液澄清。

临床意义

- (1) 生理性增加：新生儿、高原地区居住者。
- (2) 生理性减少：婴幼儿、老年人、妊娠中晚期等。
- (3) 病理性增加：真性红细胞增多症、代偿性红细胞增多症，如先天性青紫性心脏病、慢性肺部疾病、脱水。
- (4) 病理性减少：各种贫血、白血病、产后、手术后、大量失血。
- (5) 各种贫血时，由于红细胞内的血红蛋白含量不同，红细胞和血红蛋白减少的程度可能会不一致。血红蛋白测定可以了解贫血的程度。如需了解贫血的类型，还需要做红细胞计数和红细胞形态学检查及红细胞其他相关指标测定。

二、十二烷基硫酸钠血红蛋白 (SDS-Hb) 测定法

原理

十二烷基硫酸钠 (SDS) 为 1 种阴离子表面活性剂，具有轻度氧化作用，血液中除 SHb 以外的所有血红蛋白均可与低浓度的 SDS 作用，亚铁血红素被氧化成稳定的棕红色高铁血红素样复合物 (SDS-Hb)，由于 SDS-Hb 的毫摩尔消光系数尚未确认，故不能根据标本吸光度直接计算结果，需用 HiCN 法及本法分别测定多份不同浓度抗凝血或溶血的血红蛋白浓度和吸光度，以此绘制标准曲线，间接计算血红蛋白浓度。

试剂

- (1) SDS 原液 (208 mmol/L)：SDS 60.0 g；Triton X-100 70 mL；33.3 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.2) 加至 1 000 mL。
- (2) SDS 应用液：用蒸馏水将原液稀释 100 倍。

操作

- (1) 取 4 份不同浓度的抗凝血，分别用 HiCN 法及本法测定每份血液的血红蛋白浓度和吸光度，然后以 HiCN 法测得的血红蛋白浓度为横坐标，SDS 法测得的吸光度为纵坐标，绘制标准曲线。
- (2) 取 SDS 应用液 5 mL，加入全血 20 μL 充分混匀后静置 3 min，以应用液调零，以 540 nm 测定其吸光度，查标准曲线，即可得出血红蛋白浓度。

(李寅)

第二节 红细胞计数

原理

用等渗稀释液将血液稀释一定倍数，充入计数池后，在显微镜下计数一定体积内的红细胞数量，经换算求出每升血液中的红细胞数量。

试剂

红细胞稀释液。氯化钠 1.0 g；结晶硫酸钠 5.0 g（或无水硫酸钠 2.5 g）；氯化高汞 0.5 g；蒸馏水加至 200 mL，溶解后加 20 g/L 伊红溶液 1 滴，过滤后使用。

操作

- (1) 取小试管 1 支，加红细胞稀释液 2 mL。
- (2) 用清洁、干燥的微量吸管采集末梢血或抗凝血（EDTA 抗凝）10 μ L，擦去管外余血，轻轻加至红细胞稀释液底部，再轻吸上清液清洗吸管 2~3 次，立即混匀。
- (3) 混匀后用微量吸管或玻璃棒将红细胞悬液充入计数池，室温下平放 3~5 min，待细胞下沉后于显微镜下计数。
- (4) 用高倍镜依次计数中央大方格内 4 角和正中 5 个中方格内的红细胞数。

计算

$$\text{红细胞/L} = N \times \frac{25}{5} \times 10 \times 10^6 \times 200 = N \times 10^{10} = \frac{N}{100} \times 10^{12}$$

N：表示 5 个中方格内数得的红细胞数。

$\times \frac{25}{5}$ ：将 5 个中方格红细胞数换算成 1 个大方格红细胞数。

$\times 10$ ：将 1 个大方格红细胞数换算成 1 μ L 血液内红细胞数。

$\times 10^6$ ：1 L = 10^6 μ L。

$\times 200$ ：为血液的稀释倍数。

参考范围

成年男性：(4.0~5.5) $\times 10^{12}$ /L。

成年女性：(3.5~5.0) $\times 10^{12}$ /L。

新生儿：(6.0~7.0) $\times 10^{12}$ /L。

注意事项

- (1) 采血时不能过分挤压采血部位，针刺深度必须适当。
- (2) 采血应顺利、准确，采血部位不得有水肿、紫绀、冻疮、炎症等。红细胞数量明显增高时可适当加大稀释倍数。
- (3) 大小方格内压线细胞的计数，遵循数上不数下、数左不数右的原则，避免多数或漏数。

- (4) 稀释液要过滤,小试管、计数板均须清洁、干燥,以免杂质、微粒等被误认为细胞。
- (5) 如无上述稀释液时,也可用新鲜配制的等渗盐水代替。
- (6) 将细胞悬液充入计数池时要一次完成,不能产生满溢、气泡或充池不足的现象。
- (7) 红细胞在计数池中若分布不均,每个中方格之间相差超过20个以上时,要重新充池。正常数值范围内,2次红细胞计数相差不得超过5%。

临床意义

红细胞增加或减少的临床意义与血红蛋白相似。一般情况下,红细胞数与血红蛋白浓度之间有一定的比例关系。但在病理情况下,此比例关系会打破。因此,同时测定两者,对贫血的诊断和鉴别有帮助。

(李寅)

第三节 血涂片的制备与染色

原理

把血液制成细胞分布均匀的薄膜涂片,用复合染料染色。细胞染色包括物理吸附及化学亲合作用。不同的细胞种类及细胞的不同成分,对酸性及碱性染料的结合能力不同,而使各种细胞呈现出各自的染色特点。

试剂

1. 瑞氏(Wright)染液

(1) I液。瑞氏染料1.0 g;纯甲醇(AR)600 mL;甘油15 mL。将全部染料放入清洁干燥的乳钵中,先加少量甲醇慢慢地研磨(至少半小时),以使染料充分溶解,再加一些甲醇混匀,然后将溶解的部分倒入洁净的棕色瓶内,乳钵内剩余的未溶解的染料,再加入少许甲醇细研,如此多次研磨,直至染料全部溶解。甲醇用完为止。再加15 mL甘油,密闭保存。新鲜配制的染液偏碱,染色效果较差,经在室温下贮存一定时间,美蓝逐渐转变为天青B后方可使用,这一过程称染料成熟。放置时间愈久,天青愈多,染色效果愈好,但必须盖严瓶口,以免甲醇挥发或氧化成甲酸。甲醇必须用AR(无丙酮)。染液中也可加中性甘油3 mL,防止甲醇挥发,使细胞染色较清晰。

(2) II液。pH值为6.4~6.8磷酸盐缓冲液。磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.3 g;磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)0.2 g;蒸馏水加至1 000 mL。如无缓冲液,可用新鲜蒸馏水代替。

2. 姬姆萨染液

姬姆萨染料1.0 g;甘油66 mL;甲醇66 mL。将1.0 g姬姆萨染料粉末全部倒入盛有66 mL甘油的三角烧瓶内,在56℃的水浴锅上加热90~120 min,使染料与甘油充分混匀溶解。然后加入60℃预热的甲醇,充分摇匀后置棕色瓶中,于室温下静置7 d,过滤后才能使用。此种染液放置时间越久,细胞着色越佳。

3. 瑞-姬复合染液

(1) I液。瑞氏染料1.0 g;姬姆萨染料0.3 g;甲醇(AR)500 mL;中性甘油10 mL。将瑞氏染料和姬姆萨染料置洁净研钵中,加少量甲醇(分析纯),研磨片刻,再

吸出上液。如此连续几次，共用甲醇 500 mL，收集于棕色玻璃瓶中，每天早、晚各摇 3 min，共 5 d，存放 1 周即可使用。

(2) II 液，pH 值 6.4~6.8 磷酸盐缓冲液。磷酸二氢钾（无水）6.64 g；磷酸氢二钠（无水）2.56 g；用少量蒸馏水溶解，用磷酸盐调整 pH 值，加水至 1 000 mL。

操作

1. 瑞氏染色法

(1) 在玻片近一端 1/3 处，加 1 滴（约 50 μ L）充分混合的血液，握住另一边光滑的推片，以 30°~50° 角度使血液沿推片迅速散开，快速、平稳地推动推片至载玻片的另一端，将血液推成厚薄适宜的血涂片。血涂片应呈头、体、尾 3 部分。

(2) 将推好的血涂片在空气中晃动，使其迅速干燥。天气寒冷或潮湿时，应于 37 ℃ 温箱中保温促干，以免细胞变形缩小。

(3) 在载玻片的一端用记号笔编号。

(4) 用蜡笔在血膜两头画线，以防染液外溢，然后将血涂片平放在染色架上。

(5) 加 I 液数滴，以覆盖整个血膜为宜，固定血膜约 1 min。

(6) 滴加等量或稍多量的 II 液（缓冲液），室温下染色 5~10 min。

(7) 用流水冲去染液，待干后镜检。

2. 姬姆萨染色法

(1) 将干燥的血涂片用甲醇固定 3~5 min。

(2) 将固定的血涂片置于被 pH 值为 6.4~6.8 磷酸盐缓冲液稀释 10~20 倍的姬姆萨染液中，浸染 10~30 min（标本较少可用滴染）。

(3) 取出用流水冲洗，待干燥后用显微镜检查。

3. 瑞-姬复合染色法

操作步骤同瑞氏染色。只是染色时将瑞-姬复合染液 I 液和 II 液替代瑞氏染液的 I 液和 II 液。

注意事项

(1) 血滴大、血黏度高、推片角度大、推片速度快则血涂片厚；反之，则血涂片薄。针对不同患者应有的放矢。对血细胞密度高、血黏度高的患者应采用小血滴、小角度、慢推；而贫血患者则应采用大血滴、大角度、快推。

(2) 如血涂片面积太小，可观察的部分会受到局限，故应以在离开载玻片另一端 2 cm 的地方结束涂抹为宜。

(3) 血涂片干透后方可固定染色，否则细胞尚未牢固地吸附在玻片上，在染色过程中容易脱落。

(4) 加染液应适量，过少则易蒸发沉淀，一旦染料沉积在血涂片上，则不易冲洗，使细胞深染不易检查。

(5) 染色时间与染液浓度、染色时温度成反比，与细胞数量成正比。

(6) 冲洗时不能先倒掉染液，应以流水冲洗，以防染料沉着在血涂片上。冲洗时间不能过久，以防脱色。冲洗完的血涂片应立放于支架上，防止剩余水分浸泡脱色。如果血涂

片上有染料颗粒沉积,可用甲醇溶解。但需立即用水冲掉甲醇,以免脱色。

(7) 染色过淡,可以复染。复染时应先加缓冲液,创造良好染色环境,而后加染液,或加染液与缓冲液的混合液,不可先加染液。染色过深可用水冲洗或浸泡一定时间,也可用甲醇脱色。

(8) 血细胞中的各种有机物质,特别是蛋白质,对染色环境中氢离子浓度十分敏感。染色环境偏酸,增强伊红着色,红细胞和嗜酸性粒细胞染色偏红,细胞核呈淡蓝色或不着色;染色环境偏碱,增强天青着色,所有细胞呈灰蓝色,颗粒呈深暗色。嗜酸性颗粒呈暗褐,甚至棕黑色;中性颗粒偏粗,呈紫黑色。遇到此种情况应更换缓冲液。

(9) 瑞氏染料放置时间越长,美蓝逐渐氧化成天青,其染色效果越好。

(李 寅)

第四节 红细胞形态学检查

一、大小异常

正常红细胞直径为 $6\sim 9\mu\text{m}$,大小较一致。患各种贫血时,红细胞可出现大小不一。直径 $>10\mu\text{m}$ 者称大红细胞, $>15\mu\text{m}$ 者称巨红细胞,常见于巨幼细胞性贫血、肝脏疾病等;直径 $<6\mu\text{m}$ 者称为小红细胞,多见于缺铁性贫血等疾病。

二、形态异常

1. 球形红细胞

红细胞直径 $<6\mu\text{m}$,厚度增加 $>2.6\mu\text{m}$,因而红细胞呈小圆球形,细胞中心区血红蛋白含量较正常红细胞多,见于下列疾病。

- (1) 遗传性球形红细胞增多症。
- (2) 自身免疫性溶血性贫血。
- (3) 异常血红蛋白病。

2. 椭圆形红细胞

红细胞呈椭圆形,横径缩短,长径增大,有时可呈畸形。正常人血液中也可见到,但不超过15%。增多见于下列疾病。

- (1) 遗传性椭圆形红细胞增多症,一般高于25%~50%才有诊断意义。
- (2) 大细胞性贫血时可达25%。
- (3) 其他各类贫血都可有不同程度的增多。

3. 靶形红细胞

靶形红细胞比正常红细胞扁薄,中心有少许血红蛋白,部分可与周围的血红蛋白连接,边缘部染色较中央深,故呈靶状。主要见于下列疾病。

- (1) 珠蛋白生成障碍性贫血。
- (2) 严重缺铁性贫血。
- (3) 一些血红蛋白病。