

面向 **21** 世纪高等医药院校精品课程教材

高等医学院校实验实训系列教材

LINCHUANG JIANYAN SHIYAN XILIE JIAOCHENG

临床检验实验系列教程

—— 临床检验基础分册

主 编 陈佳玉 梁 勇

副 主 编 周 军 王海宝

王海平 李明成

赵传昌

本册主编 张丽婷 王冬国

面向 21 世纪高等医药院校精品课程教材
高等医学院校实验实训系列教材

临床检验实验系列教程

——临床检验基础分册

主 编 陈佳玉 梁 勇
副 主 编 周 军 王海宝 王海平
李明成 赵传昌
本册主编 张丽婷 王冬国
编 者 孙丽媛 牟思华 黄盈瑞

图书在版编目(CIP)数据

临床检验实验系列教程. 临床检验基础分册/陈佳玉, 梁勇主编; 张丽婷, 王冬国分册主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2010. 7

ISBN 978-7-308-07480-3

I. ①临… II. ①陈… ②梁… ③张… ④王… III. ①临床医学—医学检验—教材 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 056899 号

编写说明

实验教学是高等学校实验室的基本任务,是训练学生掌握实验技能的一个重要实践性教学环节,是对学生进行最佳智能结构培养的必修课。为适应当今世界科技迅猛发展对传统实验教学提出的严峻挑战,适应 21 世纪高校医学实验教学改革,培养 21 世纪的实用型人才,提高学生的动手能力和实验教学质量,需要我们及时把新知识、新技术纳入到高等医学教育的教学内容之中。为此,我们坚持“加强基础、培养素质、发展个性、突出创新”的实验教学改革方针和“以学生为主体、以就业为导向、以职业实践为主线、以项目课程为引导”的实验教学改革理念,兼顾知识传授和能力培养、素质提高,使学生全面、协调发展,彻底改变传统的实验教学模式。按照学院人才培养模式,围绕学院实验教学学分制,结合实验课程体系、实验教学内容、教学方法、考核模式等诸方面改革的要求,注重素质教育和创新性与实践性的培养,为学生知识、能力、素质协调发展创造条件。为此,学院牵头组织相关医学院校共同编写了这套《高等医学院校实验实训系列教材》。

本系列教材在编写过程中,以着重培养学生动手能力和分析解决问题的能力为基础,把握实验教学改革思路,突出特色,确定了“四个三”的编写原则。首先要有思维新、知识新、结构新等“三个创新”。其次,把握好实验课程的系统性与创新性的关系,传统实验内容删减与实验知识完整性的关系,实验教学课程的独立开设与相关课程理论教学的协同关系等“三个关系”。再次,体现实践经验与经典技术的结合,技术创新与素质培养的结合,实验项目与科研工作的结合等“三个结合”。最后,实验内容要包括“三个层次”,即基础性实验、综合设计性实验、研究创新性实验,分别占 60%、30%、10%左右。对所选择的实验内容进行系统的优化组合,具有代表性、先进性、实用性和特色性。

本系列教材对每个实验的编写力求实用、简明、条理清晰,突出实验原理、实验方法的说明,并提供必要的图表,便于学生理解实验原理,方便教师指导实验操作。实验之后的思考题有助于学生理解、掌握实验原理和操作步骤,以期望提高分析问题、解决问题的能力。

本系列教材由陈佳玉(台州学院)、梁勇(台州学院)任主编,周军(台州学院)、王海宝(台州市立医院)、王海平(台州医药有限公司)、李明成(北华大学)、赵传昌(台州学院)任副主编。由于时间仓促,加之编写经验不足,本系列教材一定存在不尽如人意之处,敬请广大师生在使用过程中及时提出宝贵意见,以便再版时修订,使其更加完善。

周 军

2010 年 6 月

前 言

“临床检验基础”是全国高等医药院校医学检验专业的必修课和主干课程之一。为适应新版教材《临床检验基础》(第4版)实验教学的需要,在参考前四版《临床检验基础》教材及前三版实验指导的基础上,结合医学检验专业的人才培养计划,由浙江省台州学院医学院组织编写了这本实验配套教材。

编写本实验教材的主导思想是围绕理论教科书的的教学内容,配合其教学进度的安排,选择相关的实验内容,通过实验课的学习,使学生巩固理论知识,培养动手能力,提高临床检验技能。

本教材在实验内容的选择方面注意深度和广度的结合,删除陈旧的实验内容,同时兼顾在我国目前社会经济条件下仍具实用价值、所得结果较为可靠的实验方法作为实验内容,重视近年来国际、国内有关学术组织推荐,且为临床广泛应用的标准化检验方法的介绍与学习。其主要内容包括血液检验的一般检验技术、血液一般检验、尿液检验、粪便检验、体液检验和脱落细胞检验等六章,每章又包含多个常用的实验项目,每个项目按实验目的、原理、器材、试剂、标本、操作、参考价值和注意事项等内容进行编写,方便学生全面掌握每个项目的技术要点。

参加本书编写的老师有张丽婷(台州学院)、王冬国(台州市立医院)、孙丽媛(北华大学)、牟思华(台州市立医院)、黄盈瑞(台州学院),对他们的辛勤劳动表示衷心的感谢。

本教材可供全国高等医药院校、医学高等专科学校医学检验专业师生使用,也可供临床检验实际工作者借鉴参考。

本教材在编写过程中得到了台州学院医学院领导、实验办、教务处的大力支持和关心,在此一并表示衷心的感谢。虽然编者已尽心努力地完成编写任务,但是由于编者水平有限,缺点、错误在所难免,敬请同行专家、广大师生和其他读者提出宝贵意见。

张丽婷

2010年6月

实验室规则

一、实验室是科学实践的重要基地,要养成严谨的学风和实事求是的科学作风。

二、遵守实验室秩序,听从老师安排,不迟到、不早退,不随意缺课,课堂上不得喧哗、嬉笑。

三、爱护国家财产,有条不紊地进行实习。显微镜、标本、玻片、玻璃器皿等实验用品用完后放回原处。不许将实验室物品随便移动位置,特别是示教标本。不得擅自带走实验室的一切设备,包括灯管启动器等小物件。

四、标本来源不易,在实验过程中要特别加以爱护,严防损坏。如不小心打碎玻片标本、大体标本或损坏显微镜部件要及时告知指导教师,视情节轻重进行适当赔偿。

五、保持卫生。进入实验室必须穿白大衣,注意衣冠整洁。禁止随地吐痰、乱放乱扔污物纸屑等。下课后,要留值日生清扫实验室。

六、做好安全工作,值日生离开实验室前必须关好水、电、门、窗等。

(张丽婷、王冬国)

目 录

第一章 血液检验的一般检验技术	1
实验一 微量吸管的使用 / 1	
实验二 血液标本的采集 / 2	
一、皮肤采血法 / 2	
二、静脉采血法 / 3	
实验三 改良牛鲍计数板的使用 / 5	
实验四 血涂片的制备与染色 / 7	
第二章 血液一般检验	11
实验一 红细胞计数 / 11	
实验二 血红蛋白测定 / 13	
一、氰化高铁血红蛋白测定法 / 13	
二、十二烷基硫酸钠血红蛋白测定法 / 16	
实验三 红细胞形态检查 / 17	
实验四 血细胞比容测定 / 18	
一、微量法 / 18	
二、温氏法 / 19	
实验五 红细胞平均直径测量 / 20	
实验六 网织红细胞计数 / 22	
一、试管法 / 22	
二、玻片法 / 24	
实验七 嗜碱性点彩红细胞计数 / 25	
实验八 红细胞沉降率测定 / 26	
一、魏氏法 / 26	
二、自动血沉仪法 / 27	
实验九 白细胞计数 / 28	
实验十 白细胞形态检查 / 29	
实验十一 白细胞分类计数 / 30	

- 实验十二 嗜酸性粒细胞直接计数 / 32
- 实验十三 血小板计数 / 33
- 实验十四 血小板形态检查 / 35
- 实验十五 血栓与止血常用筛检试验 / 36
 - 一、凝血酶原时间测定 / 36
 - 二、活化部分凝血活酶时间测定 / 39
 - 三、纤维蛋白原含量测定 / 40
 - 四、凝血酶时间测定 / 42
- 实验十六 ABO 血型鉴定 / 44
 - 一、正定型法 / 44
 - 二、反定型法 / 47
- 实验十七 Rh 血型酶介质法鉴定 / 48
- 实验十八 红细胞血型抗体抗球蛋白试验筛查 / 49
- 实验十九 交叉配血 / 51
 - 一、盐水介质配血法 / 51
 - 二、凝聚胺介质配血法 / 53
- 实验二十 微柱凝胶试验 / 54
- 实验二十一 红细胞抗体吸收试验 / 56
- 实验二十二 血液分析仪的使用 / 57
 - 一、三分群型血液分析仪的使用及结果分析 / 57
 - 二、五分类型血液分析仪的使用及结果分析 / 61

第三章 尿液检验 64

- 实验一 尿液理学检查 / 64
 - 一、尿液外观检查 / 64
 - 二、尿量测定 / 65
 - 三、尿液酸碱度 pH 试纸法测定 / 66
 - 四、尿液比密测定 / 66
- 实验二 尿液化学成分检查 / 69
 - 一、尿蛋白定性检查 / 69
 - 二、尿蛋白定量检查 / 71
 - 三、尿本周蛋白定性检查 / 73
 - 四、尿葡萄糖班氏(Benedict)法定性检查 / 75
 - 五、尿酮体改良 Rothera 法定性检查 / 77
 - 六、尿胆红素 Harrison 法定性检查 / 78

七、尿胆原改良 Ehrlich 法定性检查	/ 79
八、尿血红蛋白邻联甲苯胺法定性检查	/ 81
九、尿肌红蛋白定性检查	/ 82
十、尿绒毛膜促性腺激素金标抗体法检查	/ 83
实验三 尿液有形成分显微镜检查	/ 85
一、尿液未染色显微镜检查法	/ 85
二、尿液染色显微镜检查法	/ 87
实验四 1h 尿液有形成分排泄率测定	/ 89
实验五 尿液分析仪检查	/ 90
一、尿液干化学分析仪检查	/ 90
二、尿液全自动有形成分分析仪检查	/ 93
第四章 粪便检验	96
实验一 粪便理学检查	/ 96
实验二 粪便隐血试验	/ 96
一、邻联甲苯胺法	/ 96
二、单克隆抗体胶体金法	/ 97
实验三 粪便显微镜检查	/ 99
一、直接涂片法	/ 99
二、虫卵及包囊浓聚法	/ 100
实验四 粪便分析工作站检查法	/ 101
第五章 体液检验	103
实验一 脑脊液检查	/ 103
一、脑脊液理学检查	/ 103
二、脑脊液显微镜检查	/ 104
三、脑脊液蛋白质定性检查	/ 106
实验二 浆膜腔积液检查	/ 108
一、浆膜腔积液理学检查	/ 108
二、浆膜腔积液显微镜检查	/ 109
三、浆膜腔积液黏蛋白定性试验	/ 111
实验三 精液检查	/ 112
一、精液理学检查	/ 112
二、精子活动率、活力和存活率检查	/ 113
三、精子计数	/ 114

四、精子形态检查	/ 115
实验四 前列腺液检查	/ 117
一、前列腺液理学检查	/ 117
二、前列腺液显微镜检查	/ 117
实验五 阴道分泌物检查	/ 118
一、阴道分泌物理学检查	/ 118
二、阴道分泌物显微镜检查	/ 119
第六章 脱落细胞学检验	121
实验一 常规标本制备技术	/ 121
实验二 涂片湿固定技术	/ 124
实验三 基本染色方法	/ 127
一、巴氏染色法	/ 127
二、苏木素-伊红染色法	/ 129
实验四 涂片观察及结果报告	/ 132
实验五 脱落细胞涂片检查	/ 133
一、女性生殖道脱落细胞检查	/ 133
二、呼吸道脱落细胞检查	/ 134
三、浆膜腔积液脱落细胞检查	/ 135
四、消化道脱落细胞检查	/ 136
五、泌尿道脱落细胞检查	/ 136
参考文献	138

第一章 血液检验的一般检验技术

实验一 微量吸管的使用

【目的】

掌握微量吸管(micropipette)的使用方法。

【原理】

挤压胶吸头,使刻度微量吸管产生负压而吸取液体。

【器材】

微量吸管、胶吸头、干脱脂棉球、试管、试管架、2mL 吸管、吸耳球。

【试剂】

洗涤液(稀盐酸)、生理盐水。

【标本】

抗凝血。

【操作】

1. 准备吸管及试管 将胶吸头套在微量吸管上,注意两者连接处应严密不漏气。试管上缘做好标记(患者姓名或门诊号/住院号或条形码)。
2. 加稀释液 取试管 1 支,加生理盐水 1mL。
3. 持管吸血 右手拇指和中指夹住吸管与胶吸头交接处,食指盖住胶吸头上的小孔。三指轻微用力,排出适量的气体使管内形成负压。将吸管尖嘴插入抗凝血液面下,三指缓慢松开,吸取抗凝血到所需刻度($20\mu\text{L}$)后轻轻抬起食指,并控制三指力量不变。
4. 拭净余血 用干脱脂棉球沿吸管口方向拭净吸管外侧多余血液。
5. 释放血液 将吸管插入含生理盐水的试管底部,慢慢排出吸管内的血液,再用上清液冲洗管内余血 3 次。
6. 洗涤吸管 用清洗液清洗微量吸管至少 3 次。如为一次性微量吸管,可省略该步骤。

【注意事项】

1. 准备吸管 吸管和胶吸头连接处应严密不漏气,挤压吸头时力度应适宜。
2. 持管吸血 注意吸血时吸管尖嘴始终不要离开液面,以免吸入气泡;手指松开胶吸头时速度要缓慢,以免将血液吸入胶吸头内。
3. 拭净余血 棉球只能在管外拭血,不要在尖嘴口处停留,以免将吸管内血液吸出导致血量不足。
4. 洗涤吸管 每次使用结束后应及时清洗微量吸管,以免血液黏附在管壁内侧,造成血量不准确或堵管。

实验二 血液标本的采集

一、皮肤采血法

【目的】

掌握皮肤采血(collection of skin puncture blood)的方法,了解不同部位采血对检验结果的影响。

【原理】

采血针刺破皮肤后血液自然流出,用微量吸管吸取一定量的血液。

【器材】

一次性消毒采血针、 $20\mu\text{L}$ 微量吸管或一次性微量吸管、胶吸头、试管、试管架、记号笔、 2mL 吸管、吸耳球、 $75\%(V/V)$ 酒精棉签或碘酊棉签、无菌干脱脂棉球。

【试剂】

清洗液(稀盐酸)、生理盐水。

【标本】

末梢血。

【操作】

1. 准备 取 1 支标记好的试管,加入 1mL 生理盐水。取微量吸管并与胶吸头相连,检查连接处是否漏气,或取一次性微量吸管备用。
2. 选择采血部位 婴幼儿选择足跟采血,其他患者选择左手中指或无名指。
3. 按摩 轻轻按摩所选部位处的皮肤,使局部组织自然充血。
4. 消毒 用 75% 酒精棉签或碘酊棉签按顺时针方向由内向外擦拭采血部位的皮肤,待干。
5. 针刺 用左手拇指和食指固定采血部位使其皮肤和皮下组织绷紧,右手持一次性消毒采血针自指尖腹内侧或足跟外缘迅速刺入,深度 $2\sim 3\text{mm}$,立即拔出采血针。
6. 拭血 待血液自然流出或稍加压力流出后,用无菌干脱脂棉球拭去第 1 滴血。
7. 吸血与止血 血液重新流出时,用微量吸管吸血至 $20\mu\text{L}$ 刻度,如血流不畅,可以用左手自采血部位远端从手指根部向指尖方向施压,使血液流出。然后用无菌干脱脂棉球压住伤口止血,并嘱患者按压数分钟,不要揉搓伤口。
8. 稀释血液 用干脱脂棉球擦净微量吸管外部余血后,将吸管伸入装有生理盐水的试管底部,慢慢排出吸管内的血液,并用上清液冲洗管内余血 3 次,最后将试管内的液体混匀并及时清洗微量吸管,如为一次性微量吸管可不需清洗。

【注意事项】

1. 采血前准备 在采集标本前,应使被检者尽量保持平静,减少运动。住院患者应尽量在早晨卧床时采血。尽量避免药物及饮食对检验结果的影响。在进行多项检查时,采集血液标本的顺序是血小板计数、红细胞计数、血红蛋白测定和白细胞计数与分类。
2. 选择采血部位 所选择采血部位的皮肤应完整,无烧伤、冻疮、发绀、水肿或炎症等。

半岁以下婴幼儿由于手指小,可自拇指、足趾或足跟内、外侧缘采血;严重烧伤者可选皮肤完整处采血。

3. 消毒皮肤 因本试验具有创伤性,必须严格按无菌技术操作,防止采血部位感染,做到一人一针一管,避免交叉感染,最好用一次性微量吸管。皮肤消毒后,应待乙醇或碘酊挥发后采血,否则流出的血液不易成滴。

4. 针刺 进、出针速度要快,伤口要有足够深度,否则影响采血量。

5. 拭血 因第1滴血混有组织液,应擦去。如血流不畅切勿用力挤压,以免造成组织液混入,影响结果的准确性。如采血用于自动血液分析仪,最好以优质无菌纸巾擦血,以免棉纤维混入,造成仪器堵孔。

6. 吸血与检测 血液充入管内的速度不宜过快,避免出现气泡,血液弯月面达到刻度线处即可。标本采集后应及时测定,最好在2h内完成,不宜在冰箱内存放。

二、静脉采血法

【目的】

掌握静脉采血(collection of venous blood)的方法和无菌操作技术。

【原理】

使用注射器或真空采血器刺入浅静脉后,用负压吸取所需的血量。

【器材】

一次性消毒注射器或一次性真空采血装置、压脉带或止血带(2~3mm口径的橡皮软管)、垫枕、消毒棉签、试管、试管架、记号笔。

【试剂】

30g/L碘酊、75%(V/V)乙醇、抗凝剂(109mmol/L枸橼酸钠溶液)。

【标本】

静脉血。

【操作】

1. 准备试管 仔细阅读受检者申请单,决定采血量,准备每个试验所需的试管,并按一定顺序排列,如患者仅做凝血试验一项,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,加入适量抗凝剂(109mmol/L枸橼酸钠溶液0.4mL)。

2. 标记试管 在试管上做好标记,如贴上标签,注明患者姓名、项目名称、采集日期、门诊或住院号等内容,贴上条形码。

3. 选择静脉 患者取坐位,将前臂放在实验台上,掌心向上,并在肘下放一垫枕。卧床受检者要求前臂伸展,暴露穿刺部位。常用采血位置是肘前静脉,因其粗大、容易辨认。

4. 检查注射器 检查包装完整后,打开一次性注射器包装,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,备用。使用前,保持针头无菌状态。

5. 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,压脉带末端向上。要求患者反复握拳几次后握紧拳头,使静脉隆起。压脉带应能减缓远端静脉血液回流,但又不能紧到压迫动脉血流。

6. 选择进针部位 用左手食指触摸进针部位的静脉。

7. 消毒皮肤 用30g/L碘酊棉签自所选静脉穿刺处从内向外按顺时针方向消毒皮肤,待碘酊挥发后,再用75%乙醇棉签以同样方式拭去碘迹,待干。

8. 穿刺 取下针头无菌帽,以左手拇指固定静脉穿刺部位下端,右手持注射器,食指固定针头下座。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,然后呈 5° 角向前刺破静脉壁进入静脉腔。确认刺入静脉中心位置,并沿着静脉走向将针头推入10~15mm。

9. 抽血 以右手固定注射器,用左手缓缓抽拉注射器针栓,见少量回血后,立即松开压脉带,采血至所需刻度(如做红细胞沉降率测定应采血1.6mL)。若使用一次性真空采血装置,当采血器刺入血管后会见少量回血,再将真空采血管插入采血器中,因真空管内负压作用,血液自动流入管中,到达采血量刻度后拔出真空管即可。

10. 止血 嘱患者松拳,左手用消毒棉签轻压进针部位,右手迅速向后拔出注射器,并要求患者继续按压消毒棉签3min,以防出血。

11. 放血与混匀 取下注射器针头,将血液沿试管壁缓缓注入抗凝管中,盖好试管盖;若使用一次性真空采血装置无需此步骤。最后将试管轻轻颠倒混匀,不可振荡试管,以免溶血或产生泡沫。

【注意事项】

1. 采血前准备 采血前应向患者耐心解释,以消除不必要的疑虑和恐惧心理。如遇个别患者进针时或采血后发生眩晕,应立即拔出针头让其平卧休息片刻再进行。必要时可给患者嗅吸芳香酊,针刺(或拇指压掐)人中和合谷等穴位。若因低血糖诱发眩晕,可立即静注葡萄糖或嘱患者服糖水缓解。如有其他情况,应立即找医师共同处理。

2. 准备试管 检查项目不同要求抗凝剂种类及抗凝比例不同,如做一般血常规测定时应选择EDTA抗凝剂,而做血液流变学检查时应用肝素抗凝剂。

3. 选择静脉 如果肥胖患者的静脉暴露不明显,可以左手食指经碘酊、乙醇消毒后,在采血部位触摸,发现静脉走向后凭手感的方向与深度试探性穿刺。

4. 检查注射器 静脉采血前要仔细检查针头是否安装牢固,针筒内是否有空气和水分。所用针头应锐利、光滑、通气,针筒不漏气。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。

5. 扎压脉带 止血带绑扎不能过紧、压迫时间不能过长,以避免淤血和血液浓缩,最好不要超过1min,否则会影响某些实验结果,如造成血红蛋白和血细胞比容增高。

6. 穿刺皮肤 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. 抽血 速度不宜过快以防止血液溶血,因为溶血后标本不仅红细胞和血细胞比容减低,还会使血清(浆)化学成分发生变化。造成溶血的原因有:注射器和容器不干燥、不清洁;压脉带捆扎时间太久,淤血时间长;穿刺过程中损伤组织过多;抽血速度太快;血液注入容器时未取下针头或用力推出时产生大量气泡;抗凝血用力振荡;离心时速度过快等。

8. 止血 不能弯曲手臂,以免形成血肿。

9. 放血 为防止溶血和泡沫产生,将血液注入试管中时应去掉针头,颠倒混匀时切忌用力振荡试管。

10. 标本检测与保存 血液标本采集后应立即送检,实验室接到标本后应尽快地检查。抗凝静脉血可稳定 8~12h,如不能及时测定,应将其置于较稳定的环境中,如 4℃ 冰箱,减少条件的变化。测定前,将其从冰箱内取出,恢复至室温状态,混匀后再测定。用于生物化学检查的标本若不能及时检查,应将血清或血浆与细胞分离,进行适当的处理。

11. 一次性器材 只能使用一次,不能反复使用。

实验三 改良牛鲍计数板的使用

【目的】

掌握改良牛鲍计数板(improved Neubauer hemocytometer)的使用方法。

【原理】

一定倍数稀释的血液或体液,混匀后滴入具有固定体积和精密刻度划分的改良 Neubauer 计数板中,在显微镜下对所选择区域中的细胞进行计数,再乘以稀释倍数,即可换算成单位体积内的细胞数。

【器材】

改良 Neubauer 计数板(为优质厚玻璃制成。每块计数板由“H”型凹槽分为上、下 2 个相同的计数池。计数池两侧各有一条支持柱,较计数池平面高出 0.10mm,如图 1-1 所示。将特制的专用盖玻片覆盖其上,形成高 0.10mm 的计数池)及盖玻片、显微镜、绸布、胶吸头、试管、试管架、微量吸管或小玻棒或微量加样器、吸耳球。

【试剂】

白细胞稀释液、红细胞稀释液。

【标本】

抗凝血。

【操作】

1. 准备计数板 先用流水冲洗计数板和盖玻片,除去所有残留物,然后用乙醇洗涤,最后用绸布拭净,采用推压法从计数板下缘向前平推盖玻片,将其盖在计数池上。

2. 计数板结构观察 计数池内划有长、宽各 3.0mm 的方格,平均分为 9 个大格,每个大格面积为 1.0mm²,容积为 0.1mm³(μL)。在这 9 个大格中,中央大方格用双线分成 25 个中方格,其中位于正中及四角的共 5 个中方格是红细胞、血小板计数区。每个中方格又用单线分为 16 个

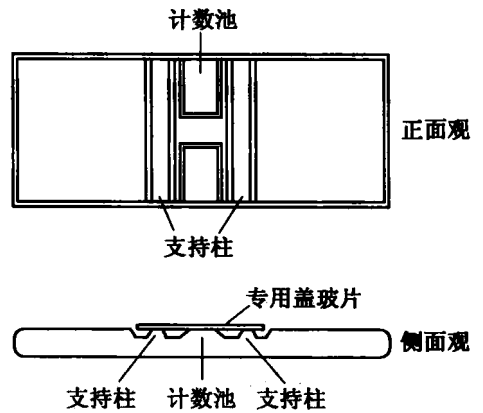


图 1-1 改良 Neubauer 计数板

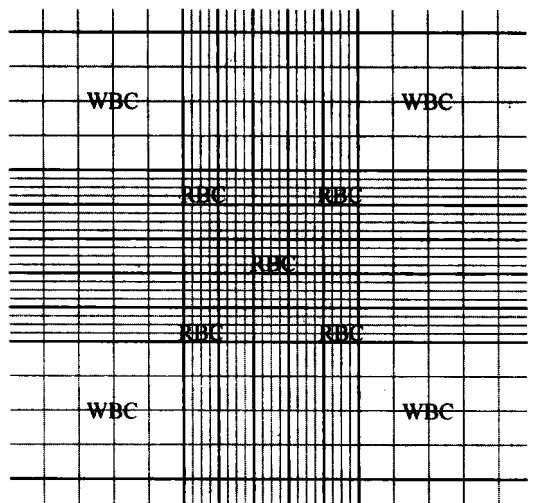


图 1-2 改良 Neubauer 计数板的镜下结构

小方格。位于四角的4个大方格是白细胞计数区,它们分别用单线划分为16个中方格,如图1-2所示。

3. 稀释血液 取试管2支,标记A、B,分别加白细胞稀释液0.38mL、红细胞稀释液2mL,再各加抗凝血 $20\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$,充分混匀2~3min,备用。

4. 充池 充分混匀A液,用微量吸管或小玻棒或微量加样器将稀释血液(约 $10\mu\text{L}$)滴入计数板和盖玻片交界处,利用虹吸作用让液体顺其间隙充满一侧计数池;再充分混匀B液,以同样方法在计数板另一侧充池。

5. 静置计数板 充池后应平放于桌面上静置2~3min,待细胞下沉。

6. 计数 先用低倍镜($10\times$ 接物镜)观察,通过调节显微镜光栅大小和聚光器高低,减少光线进入量以便观察整个计数板的结构(大、中、小方格)及特征,同时观察血细胞分布是否均匀。充A液的计数池用低倍镜观察四角大方格内白细胞计数范围,充B液的计数池用高倍镜($40\times$ 接物镜)观察中央大方格内红细胞计数范围,如图1-2所示。

7. 计数原则 需遵循一定的方向逐格进行,以免重复或遗漏。对压线的细胞遵循数左不数右、数上不数下的原则,如图1-3所示。记录所数5个中方格的红细胞数和4个大方格的白细胞数。

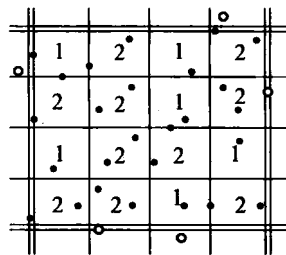


图1-3 计数原则

【注意事项】

1. 计数板

(1) 保证计数板和盖玻片清洁:操作中勿让手指接触计数板表面,以防污染致使充池时产生气泡。如使用血液充池,计数板和盖玻片使用后应依次用95%(V/V)乙醇、蒸馏水棉球擦拭,最后用清洁纱布揩净。千万勿用粗糙织物擦拭,以免磨损计数板上的刻度。

(2) 当盖玻片盖在计数板上时,若两层玻璃之间见到彩色条带(Newton环),说明计数板和盖玻片清洁良好,否则应重新清洁计数板和盖玻片。

(3) 改良 Neubauer 计数板在启用前后每隔1年都要鉴定1次,以防不合格或磨损而影响计数结果的准确性,鉴定内容是:① 盖玻片检查:包括厚度和平整度。厚度检查使用千分尺对盖玻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 $<2\mu\text{m}$;平整度检查使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符合要求。② 计数池深度: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,多点测量计数池的高度误差应在 $\pm 2\%$ ($\pm 2\mu\text{m}$)以内。

2. 充池 一次完成充池,如充池过少、过多、断续充池、有气泡或充液后移动盖玻片等均会使细胞分布不均匀,造成计数结果不准确,应拭净计数板及盖玻片后重新操作。

3. 静置计数板 平放计数板,不能在充池后移动盖玻片。白细胞和红细胞计数一般需沉淀2~3min,血小板应沉淀10~15min,且需注意保湿,若沉淀时间过长会因稀释液挥发而造成计数结果不准确。

4. 计数 计数板中细胞如果严重分布不均,应重新充池计数。计数红细胞和血小板用高倍镜,计数白细胞用低倍镜。

5. 计数原则 凡压线的细胞应按照数左不数右、数上不数下的原则,避免漏数或重复计数。注意识别非细胞成分。

实验四 血涂片的制备与染色

【目的】

掌握血涂片的制备和染色方法(preparation and staining of thin blood films)。

【原理】

将一小滴血液均匀涂在玻片上制成薄膜血片,使血细胞呈单层紧密分布。用含有天青 B 和伊红的复合染料进行染色。细胞中的碱性物质,与酸性染料伊红结合染成红色;细胞中的酸性物质,与碱性染料天青 B 结合染成蓝色;中性粒细胞的中性颗粒呈等电状态与伊红和天青 B 均可结合,染成淡紫红色。

【器材】

载玻片、推片、显微镜、吸耳球、一次性吸管、滤纸。

【试剂】

1. 瑞氏(Wright)染液

(1) 甲液: 包含瑞氏染料 1.0g、纯甲醇(AR 级以上)600mL、甘油 15mL。将全部染料放入清洁干燥的乳钵中,先加少量甲醇慢慢地研磨(至少 30min),以使染料充分溶解,再加一些甲醇,混匀后将溶解的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;如此反复多次研磨,直至染料全部溶解,甲醇用完为止。再加 15mL 甘油密闭保存。

(2) 乙液: 即磷酸盐缓冲液(pH6.4~6.8),包含磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.3g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)0.2g,加蒸馏水至 1000mL。配好后用磷酸盐溶液校正 pH,塞紧瓶口贮存。如无缓冲液,可用新鲜蒸馏水代替。

2. 吉姆萨染液 包含吉姆萨染料 0.75g、甘油 35mL、甲醇 65mL。将吉姆萨染料、甘油和甲醇放入含玻璃珠的容器内,每天混匀 3 次,连续 4d,最后过滤备用。

3. 瑞-吉复合染液

(1) I 液: 包含瑞氏染料 1g、吉姆萨染料 0.3g、甲醇(AR 级)500mL、中性甘油 10mL。将瑞氏染料和吉姆萨染料置洁净研钵中,加少量甲醇,研磨片刻,再吸出混合液。如此连续几次,共用甲醇 500mL。收集于棕色玻璃瓶中,每天早、晚各混匀 3min,共 5d,以后存放 1 周即能使用。

(2) II 液: 即磷酸盐缓冲液(pH6.4~6.8),包含无水磷酸二氢钾 6.64g、无水磷酸氢二钠 2.56g,加少量蒸馏水溶解,用磷酸盐调整 pH,加水至 1000mL。

【标本】

EDTA 抗凝静脉血或末梢血。

【操作】

1. 取血 用一次性吸管吸取 1~2h 内的 EDTA 抗凝静脉血 1 滴,若使用手指采血,则直接用洁净玻片蘸取末梢血 1 滴,滴加在距载玻片一端 11cm 处,直径约 4mm。

2. 制备涂片 用左手拇指、食指和中指平执载玻片,血滴靠近食指一侧,或放在类似桌子等平坦的地方,右手持推片从前向后接近血滴,使血液沿推片边缘展开,将推片与载玻片呈