

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材

供医学检验技术专业用

临床基础检验学技术 实验指导

主 编 林东红

副主编 刘成玉
吴晓蔓



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材配套教材

国家卫生和计划生育委员会“十二五”规划教材配套教材
全国高等医药教材建设研究会“十二五”规划教材配套教材

全国高等学校配套教材
供医学检验技术专业用

临床基础检验学技术 实验指导

主 编 林东红

副主编 刘成玉 吴晓蔓

编 者 (以姓氏笔画为序)

刘成玉 (青岛大学医学院)

江新泉 (泰山医学院)

孙晓春 (江苏大学医学院)

吴晓蔓 (广州医科大学)

林东红 (福建医科大学)

林发全 (广西医科大学)

郑文芝 (海南医学院)

贾 莉 (大连医科大学)

夏 惠 (蚌埠医学院)

徐建萍 (福建医科大学)

郭素红 (吉林医药学院)

唐 敏 (重庆医科大学)

龚道元 (佛山科学技术学院医学院)

粟 军 (四川大学华西临床医学院)

湛孝东 (皖南医学院)

秘 书 徐建萍(兼)

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床基础检验学技术实验指导/林东红主编.—北京:人民卫生出版社,2015

全国高等学校医学检验专业第六轮暨医学检验技术专业第一轮规划教材配套教材

ISBN 978-7-117-20167-4

I. ①临… II. ①林… III. ①临床医学-医学检验-医学院校-教学参考资料 IV. ①R446.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 005312 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数据库服务, 医学教育资源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

临床基础检验学技术实验指导

主 编: 林东红

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 河北新华第一印刷有限责任公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 10

字 数: 250 千字

版 次: 2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20167-4/R·20168

定 价: 23.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

前 言

2012年教育部颁布新的专业目录,将医学检验专业改为医学检验技术专业(学制由五年改为四年)。为适应这一调整,人民卫生出版社启动了医学检验技术专业类本科教材的编写工作。为了适应和配合《临床基础检验学技术》教学需要,我们编写了《临床基础检验学技术实验指导》,供高等学校医学检验技术专业 and 医学实验技术专业使用,同时也可供临床医师、检验医师、检验技师、进修人员和实习生等在临床工作中参考使用。

《临床基础检验学技术实验指导》的编写坚持医学检验技术专业培养目标,强化学生的实践能力培养,坚持“以技为先”的原则,精心选择实验项目,合理安排教学进程,以实现医学检验技术专业的培养目标。

《临床基础检验学技术实验指导》共分为12章,包括血液标本采集和血涂片制备、血液一般检验、血型检验、尿液检验、粪便检验、生殖系统分泌物检验、脑脊液检验、浆膜腔积液检验、关节腔积液检验、寄生虫检验、脱落细胞检验和综合性设计性实验。每项实验基本按照目的、原理、材料、操作、参考区间、注意事项和讨论7个层次进行编写。在附录中增加光学显微镜的使用。

在编写过程中,为了使医学检验技术专业全套教材统一,我们进行了如下调整:①血液一般检验集中了血细胞手工法计数实验。将红细胞形态检查、白细胞形态检查和血小板检查整合为外周血细胞形态检查。②删除血栓与止血检验,归入临床血液学检验技术实验指导。③血型检验不以单个试验方法设置项目,而是统一整合成为ABO血型鉴定、RhD血型鉴定和交叉配血试验。④尿液检验整合了尿液干化学试带检查和尿液干化学分析仪检查的内容。⑤增加了寄生虫检验的部分内容。⑥为了增强学生的创新思维,我们编写了部分综合性设计性实验,要求学生根据提供的临床病例资料,设计并完成必要的实验室检验项目。⑦本教材的参考区间采用中华人民共和国新颁布的卫生行业标准。

《临床基础检验学技术实验指导》在编写过程中得到福建医科大学和各参编单位的大力支持,感谢许文荣教授及全体理论教材编者的悉心指导;感谢全体编者的辛勤付出!由于编者水平有限,内容和文字方面的不足和疏漏在所难免,敬请各位专家和读者提出宝贵意见,以备再版时修正,并致谢意!

林东红

2015年1月

目 录

第一章 血液标本采集和血涂片制备	1
实验一 血液标本采集	1
一、毛细血管采血法	1
二、静脉采血法	2
实验二 改良牛鲍血细胞计数板的使用	5
实验三 血涂片的制备和染色	8
第二章 血液一般检验	11
实验一 红细胞计数	11
实验二 白细胞计数	12
实验三 血小板计数	14
实验四 嗜酸性粒细胞直接计数	16
实验五 白细胞分类计数	17
实验六 外周血细胞形态检查	19
一、白细胞形态检查	19
二、红细胞形态检查	20
三、血小板形态检查	21
实验七 网织红细胞计数	22
一、试管法	22
二、玻片法	23
实验八 血红蛋白测定	24
一、氰化高铁血红蛋白测定法	24
二、十二烷基硫酸钠血红蛋白测定法	26
实验九 血细胞比容测定	27
一、微量法	27
二、温氏法	28
实验十 红细胞沉降率测定	29
一、魏氏法	29
二、自动血沉仪法	31
实验十一 血液分析仪的使用及结果分析	32
一、三分群型血液分析仪的使用及结果分析	32
二、五分类型血液分析仪的使用及结果分析	37

实验十二 血液分析仪校准、性能评价和比对	40
一、血液分析仪的校准	40
二、血液分析仪的性能评价	42
三、血液分析仪的比对	45
第三章 血型检验	47
实验一 ABO 血型鉴定	47
一、盐水介质试管法	47
二、盐水介质玻片法	49
三、微柱凝胶血型定型检测卡法	49
实验二 RhD 血型鉴定	51
一、盐水介质法	51
二、酶介质法	51
实验三 交叉配血试验	52
一、盐水介质法	52
二、抗球蛋白介质法	53
三、低离子聚凝胺介质法	55
四、微柱凝胶抗球蛋白介质法	56
第四章 尿液检验	57
实验一 尿液理学检查	57
一、尿量测定	57
二、尿颜色和透明度检查	57
三、尿比重测定	58
实验二 尿酸碱度测定	60
实验三 尿蛋白质定性检查	61
一、磺基水杨酸法	61
二、加热乙酸法	62
实验四 尿本周蛋白定性检查	63
一、凝溶法	63
二、对-甲苯磺酸法	65
实验五 尿葡萄糖班氏法定性检查	65
实验六 尿酮体改良 Rothera 法定性检查	68
实验七 尿胆红素 Harrison 法定性检查	69
实验八 尿胆素原改良 Ehrlich 法定性检查	70
实验九 尿液有形成分检查	71
一、非染色显微镜检查法	71
二、染色后显微镜检查法	76
三、尿液有形成分定量计数仪法	77
四、1 小时尿液有形成分排泄率测定	78

实验十 尿液干化学分析仪检查	79
实验十一 全自动尿液有形成分分析仪检查	84
第五章 粪便检验	87
实验一 粪便理学检查	87
实验二 粪便显微镜检查	88
一、直接涂片法	88
二、虫卵及包囊浓聚法	89
三、粪便沉渣工作站检查法	90
实验三 粪便隐血试验	91
一、邻联甲苯胺法	91
二、单克隆抗体胶体金法	92
第六章 生殖系统分泌物检验	93
实验一 阴道分泌物检查	93
一、阴道分泌物理学检查	93
二、阴道分泌物显微镜检查	93
实验二 细菌性阴道病检查	94
实验三 精液检查	96
一、精液理学检查	96
二、精液显微镜检查	97
实验四 前列腺液检查	100
一、前列腺液理学检查	100
二、前列腺液显微镜检查	100
第七章 脑脊液检验	103
实验一 脑脊液理学检查	103
实验二 脑脊液显微镜检查	104
实验三 脑脊液蛋白质定性检查	106
一、潘迪试验	106
二、硫酸铵试验	107
第八章 浆膜腔积液检验	109
实验一 浆膜腔积液理学检查	109
实验二 浆膜腔积液显微镜检查	110
实验三 浆膜腔积液黏蛋白定性试验	112
第九章 关节腔积液检验	113
实验一 关节腔积液理学检查	113
实验二 关节腔积液显微镜检查	113

第十章 寄生虫检验	117
实验一 消化道线虫检查	117
实验二 组织线虫(丝虫和旋毛虫)检查	119
实验三 吸虫检查(一)	121
实验四 吸虫检查(二)	122
实验五 绦虫检查	124
实验六 阿米巴原虫和纤毛虫检查	127
实验七 鞭毛虫检查	128
实验八 孢子虫检查	130
实验九 节肢动物检查	133
第十一章 脱落细胞检验	135
实验一 脱落细胞检查标本制备技术	135
实验二 涂片的湿固定技术	137
实验三 脱落细胞检验的基本染色方法	138
一、巴氏染色法	138
二、苏木素-伊红染色法	140
实验四 细胞涂片观察和结果报告	141
实验五 脱落细胞涂片检查	142
实验六 针吸细胞涂片检查	144
第十二章 综合性设计性实验	147
实验一 血细胞检验综合性设计性实验	147
实验二 尿液检验综合性设计性实验	147
实验三 浆膜腔积液检验综合性设计性实验	148
附录 普通光学显微镜的使用	151

实验一 血液标本采集

一、毛细血管采血法

【目的】 掌握毛细血管采血法和微量吸管的使用方法。

【原理】 采血针刺破毛细血管待血液自然流出,用微量吸管吸取所需血量。

【材料】

1. 器材 一次性消毒采血针(图 1-1)、75% (V/V) 乙醇脱脂棉球、无菌干脱脂棉、一次性微量吸管、乳胶吸头、2ml 吸管、吸耳球、试管、试管架。

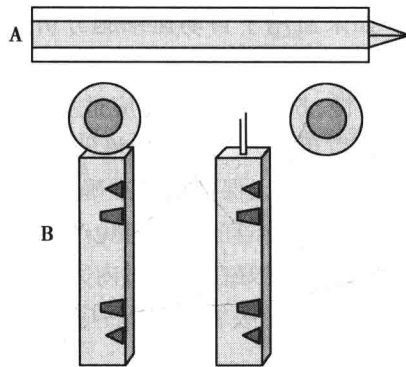


图 1-1 一次性采血针模式图

A. 传统采血针; B. 新型采血针

2. 试剂 生理盐水(或血细胞稀释液)、75% 乙醇。

【操作】

1. 准备器材 将乳胶吸头套在微量吸管上,检查两者连接处是否漏气。取试管 1 支,加入 2ml 生理盐水。

2. 选择采血部位 一般选择左手环指;1 岁以下婴幼儿常选择脚趾或足跟内外侧;特殊情况可选择其他手指或耳垂。

3. 按摩皮肤 轻轻按摩采血部位,使局部组织自然充血。

4. 消毒皮肤 用 75% 乙醇脱脂棉球擦拭采血部位,待干。

5. 针刺皮肤 用左手拇指和示指固定采血部位以绷紧皮肤和皮下组织,右手持一次性消毒采血针迅速刺入采血部位(图 1-2),深度 2~3mm,立即出针。



图 1-2 手指采血的进针部位

6. 拭去第1滴血 待血液自然流出或稍加压力流出后,用无菌干脱脂棉拭去第1滴血。

7. 持管吸血 待血液再次自然流出成滴后,右手拇指和中指夹住微量吸管和吸头连接处,示指盖住吸头小孔。三指轻微用力,排出适量气体使管内形成负压。将管尖轻插入血滴中,三指轻轻松开,吸取血液至所需刻度后,抬起示指。

8. 止血 采血完成后,用无菌干脱脂棉压住采血部位止血。

9. 拭净余血 用干脱脂棉沿微量吸管口方向拭净余血,并使血量达到规定刻度。

10. 释放血液 将微量吸管插入含生理盐水(或血细胞稀释液)的试管底部,慢慢排出吸管内血液,吸取试管内上清液冲洗吸管内余血3次后排尽液体,立即混匀试管内液体。

【注意事项】

1. 采血前准备 标本采集前,应使受检者尽量保持安静,减少运动。

2. 选择采血部位 所选部位的皮肤应完整,无烧伤、冻疮、发绀、水肿或炎症等。除特殊情况外,不选择耳垂采血。严重烧伤者可选皮肤完整处采血。

3. 消毒皮肤 本试验具有创伤性,必须严格无菌操作,以防采血部位感染;必须使用一次性消毒采血针,做到一人一针一管,避免交叉感染。皮肤消毒后,应待乙醇挥发后采血,否则血液不易成滴。

4. 针刺皮肤 进、出针要迅速,伤口深度需达2~3mm。

5. 拭去第1滴血 因第1滴血混有组织液应拭去。如血流不畅切勿用力挤压,以免混入组织液,影响结果的准确性。如采血用于自动血细胞分析仪,应使用优质无菌纸巾擦血,以免混入棉纤维,造成仪器堵孔。

6. 持管吸血 吸血时动作要慢,挤压吸头力度应适宜,防止血液吸入乳胶吸头内。吸血过程中管尖始终不要离开液面,以免吸入气泡。血液凹液面到达吸管刻度线即可。

7. 拭净余血 吸血后拭净管外余血以保证血量准确。

8. 释放血液 血液排入试管内速度不宜过快,避免产生气泡。

9. 检测 标本采集后应及时测定,最好在2小时内完成,不宜冷藏。

10. 洗涤吸管 若采用非一次性微量吸管,使用后应依次用蒸馏水洗净、95%(V/V)乙醇脱水、乙醚干燥。

【讨论】

1. 使用微量吸管进行毛细血管采血时,如何保证检验结果的准确性?

2. 若采用非一次性微量吸管,洗涤微量吸管所用的3种溶液各有何作用?

3. 如何校正微量吸管?

二、静脉采血法

【目的】 掌握静脉采血法。

【原理】 使用注射器或负压采血器刺入浅静脉后,利用负压吸取所需血量。

【材料】

1. 器材

(1)一次性消毒注射器:①针头:长30~40mm,18号、19号、20号带斜面。若采集5岁以下儿童的血液标本,使用23号或25号针头。②注射器:可选用2ml、5ml、10ml或20ml注射器(图1-3)。

(2)含或不含抗凝剂的试管。

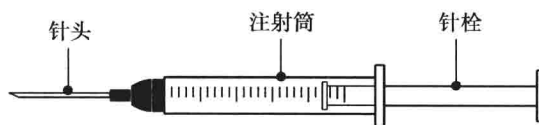


图 1-3 一次性注射器模式图

(3) 一次性负压采血器(图 1-4)、负压采血管。

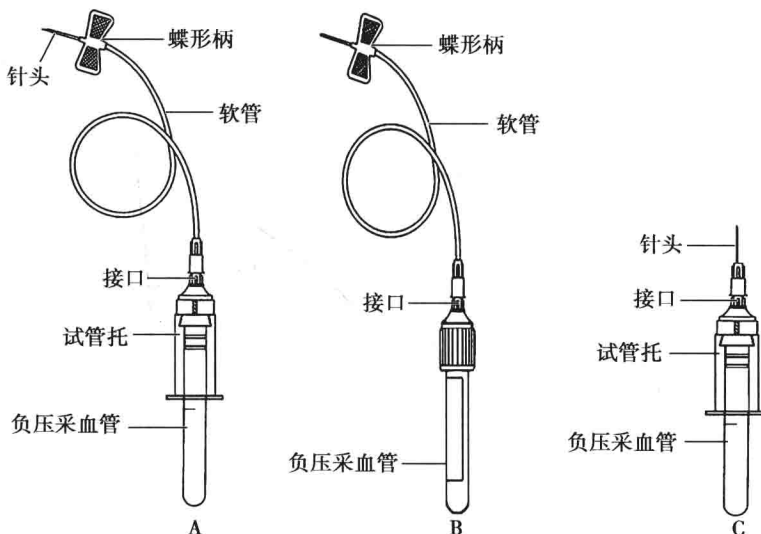


图 1-4 一次性负压采血器模式图

A、B 为软接式；C 为硬接式

(4) 压脉带(2~3mm 口径的橡皮软管)、消毒棉签、枕垫。

2. 试剂 30g/L 碘酊、75% (V/V) 乙醇或碘伏、抗凝剂(根据实验项目选择相应的抗凝剂)。

【操作】

1. 准备试管 仔细阅读受检者申请单,决定采血量,准备所需的试管,并按顺序排列。如其仅做凝血试验一项,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,加入抗凝剂(0.109mol/L 的枸橼酸钠)0.4ml。

2. 标记试管 试管上须贴有标签,注明受检者姓名、项目名称、采集日期。

3. 消毒双手 采血前,操作人员应用消毒液或洗涤剂洗手。

4. 选择静脉 请受检者取坐位,前臂水平伸直,掌心向上,将肘部置于操作台枕垫上。常选择粗大、易于辨认的肘前静脉(CLSI 的 H03-A6 文件建议)进行穿刺。

5. 检查注射器 打开一次性注射器包装,取下针帽,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,套回针帽,备用。

6. 消毒皮肤 用 30g/L 碘酊棉签自所选静脉穿刺处由内向外、顺时针方向消毒皮肤,待碘酊挥发后,再用 75% 乙醇棉签以相同方向拭去碘迹,或直接用碘伏消毒,待干。

7. 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,压脉带游离端向上。嘱受检者握紧和放松拳头几次,使静脉隆起(图 1-5)。

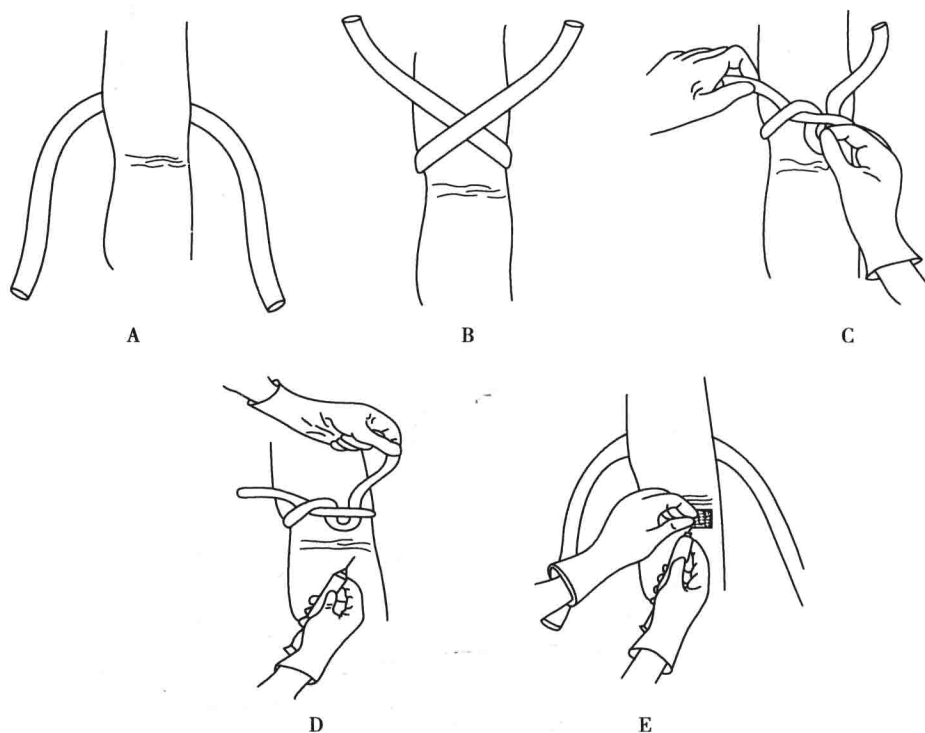


图 1-5 扎压脉带、抽血及止血操作示意图

8. 穿刺皮肤 取下针帽,左手拇指固定静脉穿刺部位下端,右手持注射器,示指固定针头下座。保持针头斜面和针筒刻度向上,沿静脉走向使针头与皮肤呈 30° 斜行快速刺入皮肤,然后以 5° 向前穿破静脉壁进入静脉腔。

9. 抽血 左手缓缓向后拉注射器针栓,见回血后,沿静脉走向将针头推入少许。同时松开压脉带,向后拉针栓至所需血量刻度。若使用一次性负压采血器,当采血针头进入血管后会见少量回血,将另一端的胶塞穿刺针插入负压采血管中,因试管内负压作用,血液自动流入试管,至所需血量刻度后拔出试管即可(图 1-5)。

10. 止血 嘱受检者松拳,用消毒棉签压住穿刺点,迅速向后拔出针头。继续紧按消毒棉签 3 分钟。

11. 放血 从注射器上取下针头。将血液沿试管壁缓缓注入试管。若含抗凝剂,需迅速将试管轻轻颠倒混匀 6~8 次。

【注意事项】

1. 采血前准备 采血前应向受检者耐心解释,以消除不必要的疑虑和恐惧心理。卧床受检者要求前臂伸展,暴露穿刺部位。

2. 准备试管 不同检查项目可根据试验需要选择不同的抗凝剂及其与血液的比例。

3. 选择静脉 如肥胖者静脉暴露不明显时,可以经碘酊、乙醇或碘伏消毒的左手示指,触摸采血部位,寻找静脉走向后凭触摸的方向与深度,试探性穿刺。如肘部静脉不明显或不宜穿刺,也可采用手背静脉等浅静脉穿刺。

4. 检查注射器 采血前要仔细检查针头是否安装牢固,针筒内是否干燥,是否有空气。所用针头应锐利、光滑、通气,针筒不漏气。一次性消毒注射器只能使用一次,不能反复

使用。

5. 消毒 本试验具有创伤性,必须严格无菌操作,以防采血部位感染;必须使用一次性消毒注射器,避免交叉感染。皮肤消毒后,不可再碰触消毒区。

6. 扎压脉带 压脉带绑扎不能过紧,以能减缓远端静脉血液回流,但又不能紧到压迫动脉血流为宜;压迫时间不超过1分钟,以避免淤血、血液浓缩和血液pH改变等,影响某些实验结果。

7. 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。

8. 抽血 见回血后,沿静脉走向将针头推入少许,以免针头滑出;但不可用力深刺,以免造成血肿。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。

9. 止血 用消毒棉签压迫穿刺点时,不要弯曲手臂,以免形成血肿。老年人、服用抗凝药者、肝功能异常者,须延长按压时间。

10. 放血 应先取下注射器针头,将血液沿试管壁缓缓注入试管,以免产生气泡或溅出。若含抗凝剂,需迅速将试管轻轻颠倒混匀6~8次,并防止泡沫产生和溶血。

11. 标本保存与检测 标本采集后应立即送检,实验室接到标本后应尽快检测。抗凝静脉血可稳定8~12小时,如不能及时测定,应置于4℃保存。测定前,须恢复至室温并混匀。用于生物化学检查的标本若不能及时检测,应及时分离血清(浆)并进行适当的处理。

【讨论】

1. 进行静脉采血操作时如何保证检验结果的准确性?
2. 常用的静脉负压采血法有几种? 各有何操作注意事项?

实验二 改良牛鲍血细胞计数板的使用

【目的】 掌握改良牛鲍血细胞计数板的结构和使用方法。

【原理】 混匀稀释的血液或体液,滴入具有固定体积和精密划分刻度的改良牛鲍血细胞计数板中,显微镜观察并计数所选择区域中的细胞数,再乘以稀释倍数,即可换算成单位体积内的细胞数。

【材料】

1. 器材

(1)改良牛鲍血细胞计数板、盖玻片:改良牛鲍血细胞计数板由优质厚玻璃制成。每块计数板由“H”形凹槽分成2个相同的计数室(图1-6)。计数室两侧各有一条支持柱,较计数室平面高0.10mm。将特制的专用盖玻片覆盖其上,形成高0.10mm的计数室。计数室平均分为9个大方格,每格长、宽各1.0mm,面积为1.0mm²,容积为0.1mm³(μl)。其中,中央大方格用双线划分为25个中方格。位于四角的4个大方格用单线划分为16个中方格(图1-7)。改良牛鲍血细胞计数板的应用见表1-1。

(2)其他:试管、试管架、刻度吸管、吸耳球、微量吸管、乳胶吸头、干脱脂棉、玻璃棒、显微镜、绸布。

2. 试剂 白细胞稀释液、红细胞稀释液。

3. 标本 毛细血管血或EDTA抗凝新鲜全血。

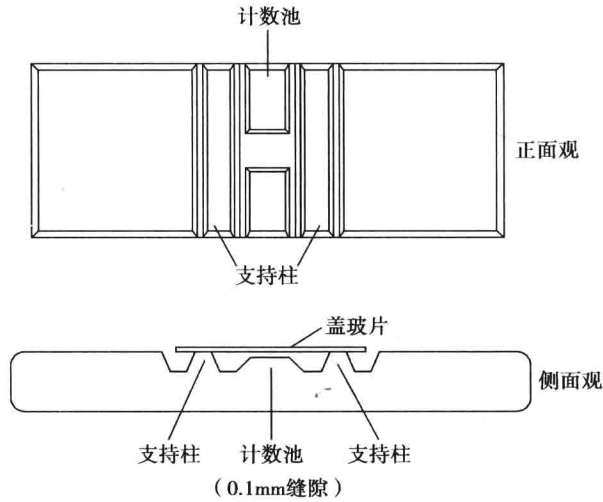


图 1-6 改良牛鲍血细胞计数板结构图

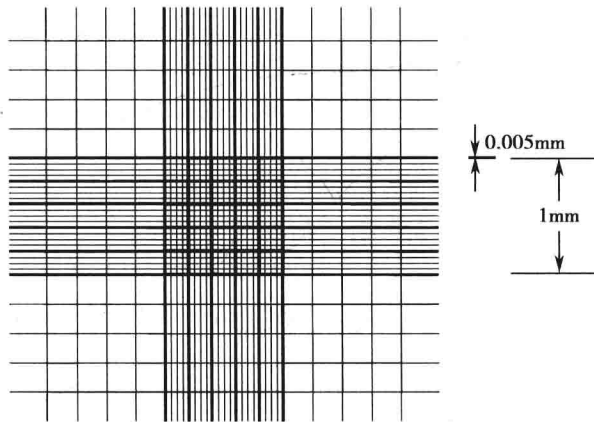


图 1-7 计数室模式图

表 1-1 改良牛鲍血细胞计数板的应用

计数细胞种类	计数域	计算(细胞数/L)
红细胞、血小板	中央大方格中的四角及中央 5 个中方格	$N \times 5 \times 10 \times \text{稀释倍数} \times 10^6$
白细胞	四角 4 个大方格	$N/4 \times 10 \times \text{稀释倍数} \times 10^6$
嗜酸性粒细胞、体腔液细胞、精子	两侧计数室四角及中央 5 个大方格共 10 个大方格	$N \times \text{稀释倍数} \times 10^6$

【操作】

1. 准备计数板 取洁净的改良牛鲍血细胞计数板平置于操作台上,采用“推式法”即从计数板下缘向前平推盖玻片,将其盖在计数室上。

2. 稀释血液 取试管 2 支,标明 A、B,分别加白细胞稀释液 0.38ml、红细胞稀释液 2ml,再分别加血液 20 μ l、10 μ l,混匀成细胞悬液。

3. 充液 用微量吸管吸取或用玻棒蘸取已充分混匀的细胞悬液 A 液 1 滴,滴于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计数室;以相同方法取 B 液充另一侧计

数室,静置2~3分钟,待细胞下沉。

4. 计数 先用低倍镜观察,降低聚光器、缩小光阑使光线减弱,以便观察整个计数板结构及特征,同时观察血细胞分布是否均匀。在低倍镜下分别计数四角4个大方格的白细胞数并记录;在高倍镜下分别计数中央大方格中四角及中央5个中方格的红细胞数并记录(图1-8)。

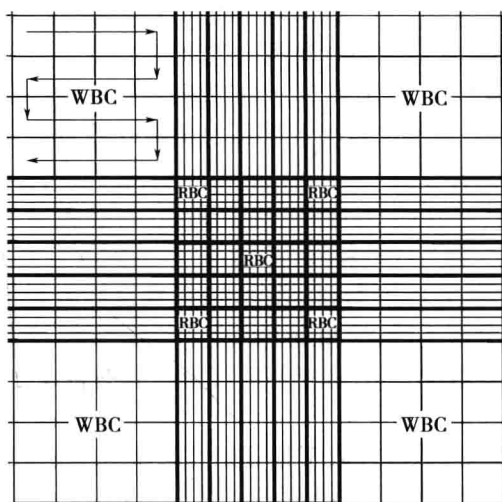


图1-8 红细胞、白细胞计数区域和计数顺序

5. 计数原则 ①按照一定顺序计数。②逐格计数(图1-8)。③对压线细胞遵循数上不数下、数左不数右的原则(图1-9),以免重复或遗漏。

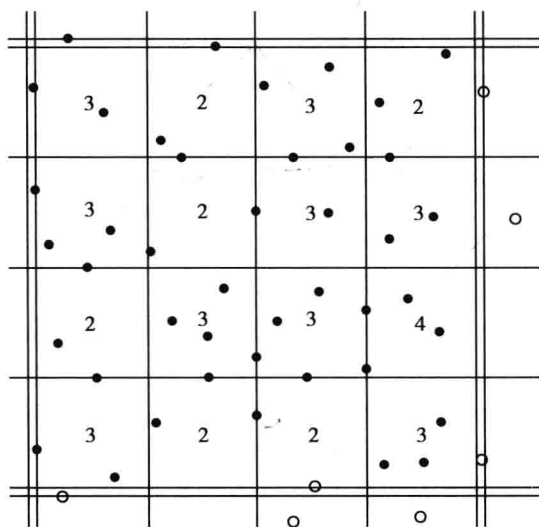


图1-9 细胞计数原则

计数黑色点,不计数白色点,方格内数字为应计细胞数目

【注意事项】

1. 改良牛鲍血细胞计数板

(1)计数板启用前及使用后每隔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: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符合要求。②计数室深度: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,多点测量计数室的高度误差应在 $\pm 2\%$ ($\pm 2\mu\text{m}$)以内。

(2) 保证计数板和盖玻片清洁:操作中手指勿接触计数板表面,以防污染。如使用血液充液,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,最后用清洁绸布拭净。切勿用粗糙织物擦拭,以免磨损计数板上的刻度。

2. 充液 计数板应平放。充液前要充分混匀细胞悬液。充液必须一次性完成,不能断续充液、满溢、不足或有气泡,否则应拭净计数板及盖玻片后重新操作。充液后不能移动或触碰盖玻片。

3. 静置计数板 红细胞和白细胞计数一般需静置2~3分钟,血小板需静置10~15分钟,注意保湿,放置时间过长会造成稀释液挥发。

4. 计数 血液稀释后应在1小时内计数完毕,以免血细胞凝集、稀释溶血、液体挥发后浓缩或分布不均。若细胞分布不均,应重新充液计数。计数红细胞、血小板用高倍镜,计数白细胞用低倍镜。应遵循计数原则,计数细胞时注意与非细胞成分相区别。

【讨论】

1. 使用改良牛鲍血细胞计数板计数细胞应如何保证结果的准确性?
2. 如何校正改良牛鲍血细胞计数板和盖玻片?

实验三 血涂片的制备和染色

【目的】 掌握血涂片的制备和染色方法。

【原理】 取一滴血于载玻片上推成均匀的血膜,并进行染色。染料含伊红和亚甲蓝,细胞中的碱性物质与酸性染料伊红结合染成红色;而酸性物质与碱性染料亚甲蓝结合染成蓝色。中性物质则同时与伊红和亚甲蓝结合,染成淡紫红色,从而使不同细胞呈现不同的染色特点。

【材料】

1. 器材

(1) 载玻片。

(2) 推片:选择边缘光滑的玻片,在两角分别作斜线标记,然后用玻璃切割刀裁去两角,制成约15mm宽度的推片。

(3) 吸耳球、显微镜、一次性采血针或注射器、记号笔、蜡笔和染色架。

2. 试剂

(1) Wright 染液:①Wright 染料1.0g、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,先加少量甲醇慢慢研磨(至少30分钟),使染料充分溶解,再加少许甲醇混匀,然后将溶解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,直至染料全部溶解,甲醇用完为止。最后再加15ml甘油密闭保存。②磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8):磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.3g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)0.2g、蒸馏水加至1000ml。配好后用磷酸盐溶液校正pH,塞紧瓶口贮存。也可配成10倍浓缩液,使用时再稀释。

(2) Giemsa 染液:包含Giemsa染料1.0g、甲醇(AR级以上)66ml、甘油66ml。将染料全部倒入盛有66ml甘油的圆锥烧瓶内,在56℃水浴锅中加热90~120分钟,使染料与甘油充分混匀溶解,然后加入60℃预热的甲醇,充分摇匀后放棕色瓶内,室温下静置7天,过滤后使用。此染液放置越久,染色效果越好。

(3) Wright-Giemsa 复合染液:①中性甘油:取甘油与水按体积比1:1混合,加酚酞指示

液 2~3 滴,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定至溶液显粉红色即可。②Wright-Giemsa 复合染料:Wright 染料 1.0g、Giemsa 染料 0.3g、甲醇(AR 级以上)500ml、中性甘油 10ml。将 Wright 染料和 Giemsa 染料置洁净研钵中,加少量甲醇研磨片刻,吸出上层混合液。反复数次,至 500ml 甲醇用完为止。将上层液体收集于棕色玻璃瓶中,每天早、晚各摇 3 分钟,共 5 天,存放 1 周后即可使用。③磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8):磷酸二氢钾(KH_2PO_4)6.64g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)2.56g、加少量蒸馏水溶解,用磷酸盐溶液调整 pH,加水至 1000ml。

3. 标本 毛细血管血或 EDTA 抗凝新鲜全血。

【操作】

1. 采血 采集毛细血管血 1 滴置于距载玻片一端 1cm 处,也可以使用玻璃棒、微量吸管或注射器针头等取 EDTA 抗凝新鲜全血 1 滴滴加在载玻片上,直径约 4mm。

2. 推片 左手平执载玻片两端,右手持推片从血滴前方向后移动并接触血滴,使血液沿推片边缘展开,将推片与载玻片呈 $30^\circ \sim 45^\circ$,匀速向前将血液制成厚薄适宜的血涂片(图 1-10),呈舌形,有头、体、尾三部分,且清晰可见。

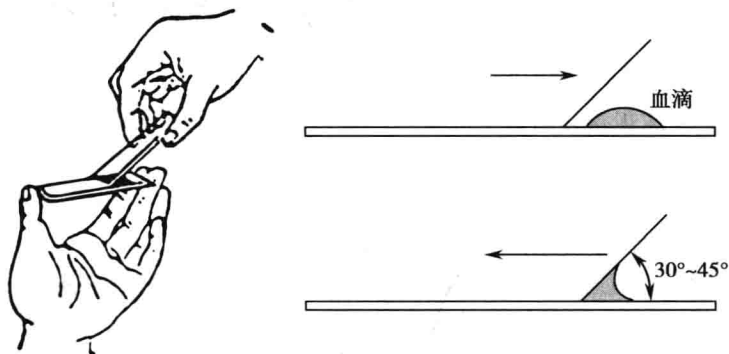


图 1-10 血涂片制备示意图

3. 干燥 将推好的血涂片在空气中晃动,使其迅速干燥。

4. 标记 在载玻片的一端用记号笔编号,注明受检者姓名。

5. 染色

(1)Wright 染色法:待血涂片干透后,用蜡笔在其两端画线,以防染色时染液外溢。将血涂片平放在染色架上,加染液数滴,以覆盖整个血膜为宜,0.5~1 分钟后,滴加等量或稍多的缓冲液,用吸耳球对准血涂片吹气,使染液与缓冲液充分混匀。室温下放置 5~10 分钟后用流水冲去染液,待干。

(2)Giemsa 染色法:将固定的血涂片置于被 pH 6.4~6.8 磷酸盐缓冲液稀释 10~20 倍的 Giemsa 染液中,浸染 10~30 分钟(标本较少可用滴染)。取出用流水冲洗,待干。

(3)Wright-Giemsa 复合染色法:操作步骤同 Wright 染色法,但用 Wright-Giemsa 复合染液和缓冲液分别替代 Wright 染液和相应的缓冲液。

6. 观察结果

(1)肉眼观察:染色前血膜呈肉红色、舌形,厚薄适宜,头、体、尾分明,血膜两侧应留有空隙;染色后呈淡紫色。

(2)显微镜观察:将干燥后的血涂片置于显微镜下观察。用低倍镜观察血涂片体、尾交界处的血细胞分布及染色情况。油镜下,成熟红细胞呈粉红色;白细胞核呈紫色,粒细胞胞质颗粒呈现特有的颜色;单核细胞胞质呈灰蓝色;淋巴细胞胞质呈淡蓝色;血小板呈紫色。