

全国卫生专业技术资格考试专家委员会 | 编写

2011

全国卫生专业技术资格考试**考试指导**

临床医学检验技术（士）

适用专业

[附赠考试大纲]

临床医学检验技术（士）



人民卫生出版社

PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE

全国卫生专业技术资格考试专家委员会 编写

2011

全国卫生专业技术资格考试指导

临床医学检验技术(士)

适用专业

[附赠考试大纲]

临床医学检验技术

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床医学检验技术(士)/全国卫生专业技术资格考试
专家委员会编写. —北京:人民卫生出版社, 2010. 12

(2011 全国卫生专业技术资格考试指导)

ISBN 978-7-117-13657-0

I. ①临… II. ①全… III. ①医学检验-医药卫生人
员-资格考核-自学参考资料 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 202074 号

门户网: www.pmph.com	出版物查询、网上书店
卫人网: www.ipmph.com	护士、医师、药师、中 医 师、卫生资格考试培训

版权所有, 侵权必究!

本书本印次内封贴有防伪标。请注意识别。

临床医学检验技术(士)

编 写: 全国卫生专业技术资格考试专家委员会

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: 010-67605754 010-65264830

010-59787586 010-59787592

印 刷: 北京铭成印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 **印张:** 47

字 数: 1202 千字

版 次: 2010 年 12 月第 1 版 2010 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-13657-0/R · 13658

定 价: 112.00 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销售中心联系退换)

出版说明

为贯彻国家人事部、卫生部《关于加强卫生专业技术职务评聘工作的通知》等相关文件的精神,自 2001 年全国卫生专业初、中级技术资格以考代评工作正式实施。通过考试取得的资格代表了相应级别技术职务要求的水平与能力,作为单位聘任相应技术职务的必要依据。

依据《关于 2010 年度卫生专业技术资格考试有关问题的通知》(人社厅发[2009]138 号)文件精神,自 2010 年度起卫生专业技术资格考试新增输血技术(中级)和输血技术(初级师)两个专业,卫生专业初中级技术资格考试专业增加至 116 个。其中,全科医学、临床医学等 65 个专业的“基础知识”、“相关专业知识”、“专业知识”、“专业实践能力”4 个科目全部实行人机对话考试。其他 51 个专业的 4 个科目仍采用纸笔作答的方式进行考试。

为了帮助广大考生做好考前复习工作,特组织国内有关专家、教授编写了《2011 卫生专业技术资格考试指导》临床医学检验技术(士)部分。本书根据最新考试大纲中的具体要求,参考国内外权威著作,将考试大纲中的各知识点与学科的系统性结合起来,以便于考生理解、记忆。

临床医学检验技术(士)专业资格考试基础知识、相关专业知识、专业知识、专业实践能力四个科目的具体考核内容请参见考试大纲。

欢迎广大考生和专业人士来信交流学习:zgks2009@163.com。

目 录

• 第 一 篇

临床检验基础	1
第一章 血液样本采集和血涂片制备	1
第二章 红细胞检查	8
第三章 白细胞检查	24
第四章 血液分析仪及其临床应用	34
第五章 血型 and 输血	42
第六章 尿液生成和标本采集及处理	56
第七章 尿理学检验	60
第八章 尿有形成分检查	66
第九章 尿液化学检查	76
第十章 尿液分析仪及其临床应用	91
第十一章 粪便检验	99
第十二章 脑脊液检验	106
第十三章 浆膜腔积液检验	114
第十四章 精液检查	123
第十五章 前列腺液检查	128
第十六章 阴道分泌物检查	130
第十七章 羊水检查	133
第十八章 痰液与支气管灌洗液检验	136
第十九章 胃液和十二指肠引流液检验	139
第二十章 脱落细胞检查	143

• 第 二 篇

临床血液学检验	157
第一章 绪论	157
第二章 造血与血细胞分化发育	158
第三章 骨髓细胞学检查	162
第四章 血细胞化学染色	168
第五章 溶血性贫血及其实验诊断	174
第六章 其他贫血及其实验诊断	182
第七章 白血病概述	187
第八章 急性淋巴细胞白血病及其实验诊断	191
第九章 急性髓细胞白血病及其实验诊断	192
第十章 慢性白血病及其实验诊断	195
第十一章 特殊类型白血病及其实验诊断	197
第十二章 骨髓增生异常综合征及其实验诊断	199

第十三章	恶性淋巴瘤及其实验诊断	201
第十四章	浆细胞病及其实验诊断	203
第十五章	骨髓增生性疾病及其实验诊断	205
第十六章	恶性组织细胞病及其实验诊断	207
第十七章	其他白细胞疾病及其诊断	209
第十八章	出血与血栓的基础理论	211
第十九章	血栓与止血检验的基本方法	216
第二十章	常见出血性疾病的实验诊断	226
第二十一章	血栓性疾病及其实验诊断	233
第二十二章	抗凝与溶栓治疗的实验室监测	238
第二十三章	凝血仪的检测原理和方法	240
临床化学		241
第一章	绪论	241
第二章	糖代谢紊乱及糖尿病的检查	242
第三章	脂代谢及高脂蛋白血症	265
第四章	血浆蛋白质检查	277
第五章	诊断酶学	283
第六章	体液平衡紊乱及其检查	294
第七章	钙、磷、镁代谢与微量元素	310
第八章	治疗药物浓度监测	317
第九章	心肌损伤的生化标志物	320
第十章	肝胆疾病的实验室检查	334
第十一章	肾功能及早期肾损伤的检查	345
第十二章	胰腺疾病的检查	358
第十三章	内分泌疾病的检查	363
第十四章	临床化学常用分析技术	380
第十五章	血清酶催化活性浓度和代谢物浓度酶法检测技术	384
第十六章	临床化学自动分析仪	389
第十七章	标本、试剂、量器常识	390
临床免疫学和免疫检验		395
第一章	概论	395
第二章	抗原抗体反应	401
第三章	免疫原和抗血清的制备	404
第四章	单克隆抗体与基因工程抗体的制备技术	408
第五章	凝集反应	411
第六章	沉淀反应	413
第七章	免疫电泳技术	416
第八章	放射免疫技术	418
第九章	荧光免疫技术	420
第十章	酶免疫技术	424

• 第三篇

• 第四篇

第十一章	生物素-亲和素免疫放大技术	433
第十二章	免疫组织化学技术	435
第十三章	免疫细胞分离及检测技术	443
第十四章	吞噬细胞功能检测及应用	447
第十五章	细胞因子测定及应用	450
第十六章	细胞黏附分子测定及应用	454
第十七章	免疫球蛋白检测及应用	455
第十八章	循环免疫复合物检测及应用	459
第十九章	补体检测及应用	460
第二十章	自身抗体检测及应用概述	465
第二十一章	MHC 与 HLA 检测及应用	469
第二十二章	流式细胞仪分析技术及应用	472
第二十三章	免疫自动化仪器分析	475
第二十四章	免疫学检验的质量管理	480
第二十五章	超敏反应性疾病及其免疫检测	482
第二十六章	自身免疫性疾病及其免疫检测	492
第二十七章	免疫增殖性疾病及其免疫检测	495
第二十八章	免疫缺陷性疾病及其免疫检测	499
第二十九章	肿瘤免疫及其免疫检测	506
第三十章	移植免疫及其免疫检测	510
微生物学及检验		515
第一章	绪论	515
第二章	细菌的形态与结构	518
第三章	细菌的生理	523
第四章	细菌的分布	527
第五章	外界因素对细菌的影响	529
第六章	细菌的遗传与变异	532
第七章	微生物的致病性与感染	536
第八章	细菌的分类与命名	545
第九章	微生物检验概述	548
第十章	细菌形态学检查法	554
第十一章	培养基	557
第十二章	细菌的培养与分离技术	560
第十三章	细菌的生物化学试验	564
第十四章	血清学试验	568
第十五章	动物实验	569
第十六章	菌种保存与管理	571
第十七章	细菌检验的商品化、自动化设备	573
第十八章	病原性球菌及检验	575
第十九章	肠杆菌科及检验	583

• 第五篇

第二十章 弧菌科及检验	596
第二十一章 弯曲菌属和幽门螺杆菌及检验	600
第二十二章 厌氧性细菌及检验	603
第二十三章 需氧/兼性厌氧革兰阳性杆菌及检验	609
第二十四章 分枝杆菌属及检验	614
第二十五章 非发酵菌及检验	617
第二十六章 其他革兰阴性杆菌及检验	620
第二十七章 衣原体及检验	623
第二十八章 立克次体及检验	625
第二十九章 支原体及检验	627
第三十章 病原性放线菌及检验	629
第三十一章 螺旋体及检验	631
第三十二章 病毒感染的实验诊断	634
第三十三章 真菌检验	646
第三十四章 临床标本微生物检验概述	651
第三十五章 细菌对药物的敏感试验	657
第三十六章 医院感染	663
第三十七章 临床细菌检验的质量控制及实验室安全防护	666
寄生虫学及检验	669
第一章 总论	669
第二章 医学蠕虫	672
第三章 医学原虫	679
第四章 医学节肢动物	683
第五章 实验检验技术	685
临床医学检验技术初级(士)考试大纲	689

• 第六篇

第一章 血液样本采集和血涂片制备

一、血液生理概要

(一) 血液组成

血液由血细胞(红细胞、白细胞、血小板)和血浆组成。离体后的血液自然凝固,分离出来的淡黄色透明液体称为血清。血液加抗凝剂后分离出来的淡黄色液体称为血浆。血清与血浆区别是:血清缺少某些凝血因子,如凝血因子 I (纤维蛋白原)、II (凝血酶原)、V、Ⅷ等。

全血适用于临床血液学检查,如血细胞计数、分类和形态学检查等。血浆适用于血浆生理性和病理性化学成分的测定,特别是内分泌激素测定;血浆除钙离子外,含有其他全部凝血因子,也适用于血栓与止血的检查。血清适用于临床化学和临床免疫学检查。

(二) 血液理化性质

1. 血量 正常人血量约为 (70 ± 10) ml/kg 体重,成人约 4~5L,约占体重的 6%~8%,其中血浆占 55%,血细胞占 45%。小儿血量与体重之比略高于成人,男性比女性血量稍多,但女性妊娠期间血量可增加 23%~25%。

2. 颜色 血液的红色来自红细胞内血红蛋白。动脉血氧合血红蛋白含量较高,呈鲜红色;静脉血还原血红蛋白含量高,呈暗红色。严重贫血者血液红色变浅。严重一氧化碳中毒或氰化物中毒者血液呈樱红色。

3. 酸碱度 正常人血液 pH 7.35~7.45,动脉血 pH 7.40,静脉血 pH 7.35。

4. 比重和渗透量

(1)血液比重:正常男性约为 1.055~1.063,女性约为 1.051~1.060,相对黏度为 4~5;血浆比重约为 1.025~1.030;血细胞比重约为 1.090。血液比重与红细胞含量、红细胞内血红蛋白含量有关。血浆比重和血浆内蛋白浓度有关。

(2)血浆渗透量:正常人约为 290~310mOsm/(kg·H₂O)。

(三) 血液特性

1. 红细胞的悬浮稳定性 正常人血液中红细胞呈均匀混悬状态,与红细胞膜表面的唾液酸根、正常血浆成分、血浆黏度及血流动力学等因素有关。

2. 黏滞性 正常人全血黏度约为生理盐水黏度的 4~5 倍,血浆黏度约为生理盐水黏度的 1.6 倍。血液黏度与血细胞比容和血浆黏度有关,其中,血浆黏度受血浆中纤维蛋白原、球蛋白等大分子蛋白质的影响,它们的浓度越高,血浆黏度越高。

3. 凝固性 正常血液离开血管后,在数分钟内便自行凝固,是凝血因子激活的结果。

(四) 血液生理功能

血液具有运输功能、协调功能、维护机体内环境稳定和防御功能。

二、采血方法

正确采集血样本是获得准确、可靠实验结果的关键。在样本采集前,应根据实验要求,决定采血方法、所需血量及适用抗凝剂。

(一) 静脉采血法

1. 概述 静脉采血多采用位于体表的浅静脉,通常采用肘部静脉、手背静脉、内踝静脉或股静脉。小儿可采颈外静脉血液。根据采血量可选用不同型号注射器,配备相应的针头。某些特殊检查,为避免血小板激活,要使用塑料注射器和硅化处理后的试管或塑料试管。

2. 操作方法

(1)准备试管:取合适数量和规格的试管备用。

(2)检查注射器: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。

(3)选择静脉:患者取坐位,前臂水平伸直置于桌面枕垫上。暴露穿刺部位,选择容易固定、明显可见的肘部静脉。

(4)消毒:先用 30g/L 碘酊棉签自所选静脉穿刺处从内向外、顺时针方向消毒皮肤,待碘酊挥发后,再用 75%乙醇棉签以同样方法拭去碘迹,待干。

(5)扎压脉带:在采血部位上端扎压脉带或止血带,并嘱患者反复握拳几次后握紧拳头,使静脉充盈暴露,便于穿刺。

(6)穿刺:取下针头无菌帽,以左手拇指固定静脉穿刺部位下端,右手拇指和中指持注射器针筒,示指固定针头下座,使针头斜面 and 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,然后以 5° 角向前穿破静脉壁进入静脉腔。见回血后,将针头顺势探入少许,以免采血时针头滑出;但不可用力深刺,以免造成血肿,同时立即去掉压脉带。

(7)抽血:以右手固定注射器,左手缓缓抽动注射器内芯至所需血量后,用消毒干棉球压住针孔,请患者松拳,迅速拔出注射器。嘱患者继续按压针孔数分钟,以防出血。

(8)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,防止溶血和泡沫产生。轻轻混匀抗凝血,切忌振荡试管,盖紧试管塞备用。

3. 注意事项

(1)采血前应向患者耐心解释,以消除疑虑和恐惧心理。如个别患者进针时或采血后发生眩晕,应让其平卧休息。必要时可嗅吸芳香氨酊、针刺(或指压)人中和合谷等穴位。若因低血糖诱发眩晕,可立即静脉注射葡萄糖或让患者口服糖水。如有其他情况,应找医生共同处理。

(2)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。

(3)如果肥胖患者静脉暴露不明显,可用左手示指经碘酊、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)抽血时针栓只能向外抽,不能内推,以免静脉内注入空气形成气栓,造成严重后果。

(二) 皮肤采血法

1. 概述皮肤采血法 又称为毛细血管采血法,是采集微动脉、微静脉和毛细血管的混合血,同时含细胞间质和细胞内液。通常选择耳垂或手指部位。耳垂采血痛感较轻、操作方便,但血液循环较差、受气温影响较大、检查结果不够恒定(如红细胞、白细胞、血红蛋白和血细胞

比容等测定结果比手指血或静脉血高),一般情况下不宜使用。手指采血操作方便,检查结果比较恒定,世界卫生组织(WHO)推荐采集左手无名指指端内侧血液,婴幼儿可采集大脚趾或足跟内外侧缘血液,严重烧伤患者,可选择皮肤完整处采血。

目前可用激光无痛采指血仪采血,原理是仪器中激光发生器发出一串单脉冲激光束,在一次性耗材(镜头片)的配合下,细微的光束打在手指上,在很短时间内使皮肤组织溶解、挥发,出现一个小孔,而打孔后的残留物成等离子状态,吸附在镜头片表面。仪器采血有效地避免了皮肤浅层组织液、细胞外液等渗入血液,确保检测结果准确,同时也可消除交叉感染,达到无痛采血的效果。

2. 操作方法

(1)准备:取合适试管,加适量稀释液。取微量吸管和乳胶吸头相连,检查连接处是否漏气,或取一次性微量吸管备用。

(2)按摩:轻轻按摩左手中指或无名指指端内侧,使局部组织自然充血。

(3)消毒:用75%乙醇棉签擦拭采血部位,待干。

(4)针刺:用左手拇指和示指固定采血部位使皮肤和皮下组织绷紧,右手持一次性消毒采血针自指端腹内侧刺入,深度2~3mm,立即出针。

(5)拭血:待血液自然流出后,用无菌干棉球擦去第1滴血,血小板计数除外。

(6)吸血:用一次性微量吸管吸血,然后用无菌干棉球压住伤口止血。如血流不畅,可用左手自采血部位远端向指端稍施压使血液流出。

(7)稀释:用无菌干棉球擦净微量吸管外部,将吸管伸入装有稀释液的试管底部,慢慢排出吸管内的血液,并用上清液冲洗管内余血2~3次,最后将试管内的液体混匀。

3. 注意事项

(1)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。除特殊情况外,不要耳垂采血。

(2)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,最好用一次性器材。

(3)皮肤消毒后,应待乙醇挥发后采血,否则流出的血液扩散而不成滴。

(4)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。

(5)进行多项检查时,采血的顺序依次为血小板计数、红细胞计数、血红蛋白测定、白细胞计数等。

(三) 真空采血法

是一种新的静脉采血法。真空采血装置有套筒式、头皮静脉式两种。封闭式采血无须容器之间的转移,减少了溶血现象,能有效保护血液有形成分,保证待验样本原始性状的完整性,使检验结果更可靠,同时,样本转运方便,能有效避免医护人员和患者间交叉感染。各种真空定量采血容器,根据需要标有不同的色码,适于不同检验项目(表1-1-1)。

(四) 方法学评价

1. 皮肤采血 缺点是易于溶血、凝血、混入组织液,而且局部皮肤揉擦、针刺深度不一、个体皮肤厚度差异等都影响检查结果,所以,皮肤采血检查结果重复性差、准确性不好。

2. 静脉采血 开放式采血法的操作环节多、难于规范统一,在移液和丢弃注射器时可能造成血液污染。封闭式采血法的操作规范,有利于样本收集运送和保存,防止院内血源性传染病。

表 1-1-1 常用彩色真空采血容器的用途

盖子颜色	添加剂	注意事项	用 途
红色	无	凝块形成约需 30~60min	化学、血清学、血库
紫色	EDTA	须颠倒混匀 8 次	全血细胞计数(CBC)
淡蓝色	枸橼酸钠	须颠倒混匀 3~4 次;血液与抗凝剂比例为 9:1	凝血检查(PT、APTT、因子测定)
绿色	肝素钠、肝素锂、肝素铵	根据实验需要,选择不同类型肝素;须颠倒混匀 8 次	化学
灰色	氟化钠	须颠倒混匀 8 次	葡萄糖、糖耐量
黄色	多聚茴香脑磺酸钠	须颠倒混匀 8 次	血培养
金黄色	分离胶/凝块激活剂	须颠倒混匀 5 次	化学
淡绿色	分离胶/肝素锂	须颠倒混匀 8 次	化学
黑色	枸橼酸钠	血液与抗凝剂比例为 4:1;须颠倒混匀 8 次	血沉

(五) 质量控制

1. 患者 患者活动情况、精神状态、药物、年龄、性别、种族、样本采集时间、吸烟、季节等都会影响检测结果。

2. 采血 止血带结扎时间应小于 1min,如超过 2min,大静脉血流受阻而使毛细血管内压增高,使分子质量 <5000 的物质逸入组织液,或缺氧引起血液成分的变化,使检查结果不可靠。

3. 溶血 因容器不洁、接触水、强力振荡、操作不慎等可引起溶血,使红细胞计数、血细胞比容、血浆或血清化学成分(如钾、镁、转氨酶、胆红素)等多项指标检验结果发生变化。

4. 样本处理 血液样本采集后应立即送检,并尽快进行检查,样本保存不当直接影响实验结果。

5. 实验结果分析 分析结果时,应考虑药物、饮食等因素对结果的影响。同时,应密切结合临床。

三、抗凝剂选择

抗凝是用物理或化学方法除去或抑制血液中的某些凝血因子的活性,以阻止血液凝固。能够阻止血液凝固的物质,称为抗凝剂或抗凝物质。常用抗凝剂和使用方法如下。

1. 乙二胺四乙酸(EDTA)盐 常用有钠盐($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$)或钾盐($\text{EDTA} \cdot \text{K}_2\text{H}_2\text{O}$),能与血液中钙离子结合成螯合物,使 Ca^{2+} 失去凝血作用,阻止血液凝固。

EDTA 盐对血细胞形态、血小板计数影响很小,适用于血液学检查,尤其是血小板计数。但钠盐溶解度低于钾盐,有时影响抗凝效果。根据国际血液学标准化委员会(ICSH)建议,CBC 抗凝剂用 $\text{EDTA} \cdot \text{K}_2\text{H}_2\text{O}$,量为 1.5~2.2mg/ml 血液。不适于凝血检查、血小板功能试验。

2. 草酸盐 常用有草酸钠、草酸钾、草酸铵,溶解后解离的草酸根离子能与样本中钙离子形成草酸钙沉淀,使 Ca^{2+} 失去凝血作用,阻止血液凝固。

草酸盐优点是溶解度好、价廉。草酸盐对凝血因子V的保护作用差,影响凝血酶原时间测定,而且草酸盐与钙结合后形成的沉淀物,影响自动凝血仪检测结果,因此草酸盐不适于凝血检查。

双草酸盐抗凝剂:草酸钾可使红细胞体积缩小,草酸铵则可使红细胞胀大,二者按适当比例混合,恰好不影响红细胞形态和体积,可用于血细胞比容、CBC、网织红细胞计数等项目检查,若单用草酸钾或草酸钠作为抗凝剂,与肝素为抗凝剂测定的血细胞比容比较,测定结果可减低8%~13%。双草酸盐抗凝剂可使血小板聚集、影响白细胞形态,不适于血小板计数、白细胞分类计数。

3. 肝素 是加强抗凝血酶(AT)灭活丝氨酸蛋白酶作用,阻止凝血酶的形成,并阻止血小板聚集等作用,从而阻止血液凝固。

肝素广泛存在于肺、肝、脾等几乎所有组织和血管周围肥大细胞和嗜碱性粒细胞颗粒中,带有较多负电荷。肝素具有抗凝力强、不影响血细胞体积、不易溶血等优点,绝大多数检查都可用肝素作为抗凝剂,是红细胞渗透脆性试验的理想抗凝剂。但肝素可引起白细胞聚集,瑞氏染色后产生蓝色背景,不适于CBC、细胞形态学检查。每毫升血液肝素用量为 $(15 \pm 2.5)\text{U}$,多为肝素钠盐或钾盐。

4. 枸橼酸盐 常用有枸橼酸钠,能与血液中钙离子结合形成螯合物,阻止血液凝固。枸橼酸盐的溶解度低,抗凝力不如上述抗凝剂。枸橼酸钠与血液的抗凝比例为1:9或1:4。适用于红细胞沉降率、凝血检查,是输血保养液的成分。

四、血液涂片制备

(一) 载玻片的清洁

新载玻片常带有游离碱质,必须以1mol/L HCl浸泡24h,清水冲洗,干燥后备用。用过的载玻片可用适量肥皂或在其他洗涤剂中煮沸20min,趁热刷去血膜,清水彻底冲洗干净,必要时用蒸馏水浸泡,干燥后备用。要保持载玻片的清洁、干燥、中性、无油腻。

(二) 血涂片的制备

有手工推片法、载玻片压拉法、棕黄层涂片法等。血涂片可用非抗凝静脉血或毛细血管血,也可用EDTA抗凝血液制备。因EDTA抗凝血有时能引起红细胞皱缩和白细胞聚集,因此最好使用非抗凝血制备血涂片。

1. 手工推片法 取血1滴置载玻片一端,以边缘平滑的推片,从血滴前方接触血液,使血液沿推片散开,通常推片与载玻片保持 $25^\circ \sim 30^\circ$ 夹角,平稳地向前推动,血液即在载玻片上形成薄层血膜。涂片厚薄与血滴大小、推片与载玻片间夹角、推片速度、血细胞比容有关。

2. 厚血膜涂片法 载玻片中央置血1滴,用推片角将血由内向外旋转涂成厚薄均匀、直径约1.5cm的圆形血膜,待干后,加蒸馏水使红细胞溶解,再干后染色镜检。

一张良好的血片,应厚薄适宜、头体尾明显、细胞分布均匀、血膜边缘整齐、并留有一定空隙。

五、血液细胞染色

血涂片在用光学显微镜观察前需要固定和染色。固定是将细胞蛋白质和多糖等成分迅速

交联凝固,以保持细胞原有形态结构不发生变化。染色是使细胞的主要结构,如细胞膜、细胞质、细胞核等染上不同的颜色,以便于镜下观察识别。血涂片染色方法大多源自罗氏染色法,常用瑞氏染色法、吉姆萨染色法。

(一) 瑞氏染色法

1. 瑞氏染料 由酸性染料伊红(E^-)和碱性染料亚甲蓝(M^+)组成。伊红通常为钠盐,有色部分为阴离子。亚甲蓝(又名美蓝)为四甲基硫堇染料,有对醌型和邻醌型两种结构。通常为氯盐,即氯化美蓝,有色部分为阳离子。亚甲蓝容易氧化为一、二、三甲基硫堇等次级染料(即天青)。将适量伊红、亚甲蓝溶解在甲醇中,即为瑞氏染料。甲醇的作用:一是溶解亚甲蓝和伊红;二是固定细胞形态。

2. 染色原理 既有物理的吸附作用,又有化学的亲和作用。各种细胞成分化学性质不同,对各种染料的亲和力也不一样。如血红蛋白、嗜酸性颗粒为碱性蛋白质,与酸性染料伊红结合,染粉红色,称为嗜酸性物质;细胞核蛋白、淋巴细胞、嗜碱性粒细胞胞质为酸性,与碱性染料亚甲蓝或天青结合,染紫蓝色或蓝色,称为嗜碱性物质;中性颗粒呈等电状态与伊红和亚甲蓝均可结合,染淡紫红色,称为嗜中性物质;原始红细胞、早幼红细胞胞质、核仁含较多酸性物质,染成较浓厚的蓝色;中幼红细胞既含酸性物质,又含碱性物质,染成红蓝色或灰红色;完全成熟红细胞,酸性物质彻底消失后,染成粉红色。

3. pH 的影响 细胞各种成分均属蛋白质,由于蛋白质系两性电解质,所带电荷随溶液 pH 而定,在偏酸性环境中正电荷增多,易与伊红结合,红细胞和嗜酸性粒细胞染色偏红,细胞核呈淡蓝色或不染色;在偏碱性环境中负电荷增多,易与亚甲蓝结合,所有细胞呈灰蓝色,颗粒呈深暗,嗜酸性颗粒呈暗褐,甚至棕黑色,中性颗粒偏粗,呈紫黑色。稀释染液必须用缓冲液,冲洗用水应近中性,否则可导致细胞染色反应呈色异常,形态难以识别,甚至错误。

4. 试剂配制

(1) I 液:瑞氏染料 1.0g、纯甲醇(AR 级以上)600ml、甘油 15ml。将染料放入清洁干燥乳钵中,先加少量甲醇慢慢研磨(至少 30min),以使染料充分溶解,然后将溶解的染料倒入洁净的棕色瓶内,乳钵内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,最后加 15ml 甘油,密闭保存。

(2) II 液:磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8),由磷酸二氢钾(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。

5. 染色方法

(1)采血:静脉或毛细血管 1 滴,加在距离载玻片一端 1cm 处。

(2)推片:左手执载玻片,右手持推片,制成舌状、头、体、尾分明的血涂片。

(3)干燥:将血涂片在空气中晃动,使其迅速干燥。天气寒冷或潮湿时,可置 37℃ 温箱中保温促干。

(4)标记:在载玻片一端做好标记。

(5)染色:将血涂片平置于染色架上,滴加 I 液 3~5 滴,使其迅速盖满血涂片,约 0.5~1min 后,滴加等量或稍多的 II 液,轻轻摇动玻片或用吸球吹气,使染液充分混合。

(6)冲洗:5~10min 后用流水冲去染液,待干镜检。

6. 注意事项

(1)血涂片面积太小会影响结果观察,故应在距载玻片另一端 2cm 处结束涂抹为宜。

(2)血涂片干透后固定,否则细胞在染色过程中容易脱落。

(3)加染液应适量,过少易蒸发形成沉淀,使细胞不易检查。

(4)冲洗时应以流水冲洗,不能先倒掉染液,以防染料沉着在血涂片上。冲洗时间不能过久,以防脱色。如血涂片上有染料颗粒沉积,可滴加甲醇,然后立即用流水冲洗。

(5)染色过淡可以复染,复染时应先加缓冲液,然后加染液。染色过深可用流水冲洗或浸泡,也可用甲醇脱色。

(二) 吉姆萨染色法

1. 染色原理 吉姆萨染液由天青、伊红组成。染色原理和结果与瑞氏染色基本相同。

2. 试剂配制 吉姆萨染料 1.0g、甘油 66ml、甲醇 66ml。将染料粉末全部倒入盛有 66ml 甘油的圆锥烧瓶内,在 56℃ 水浴锅上加热 90~120min,使染料与甘油充分溶解,然后加入 60℃ 预热甲醇,充分摇匀后置棕色瓶中,在室温下静置 7d,过滤后使用。

3. 染色方法

(1)同瑞氏染色(1)~(4)步骤。

(2)固定:将干燥血涂片用甲醇固定 3~5min。

(3)染色:将血涂片置于用磷酸盐缓冲液(pH 6.4~6.8)稀释 10~20 倍的吉姆萨染液中,浸泡 10~30min。

(4)冲洗:取出用流水冲洗,待干镜检。

六、方法学评价

(一) 血涂片制备

手工推片法用血量少、操作简单,是应用最广泛的方法。棕黄层涂片法可提高异常情况的阳性检出率。此外,疟原虫、微丝蚴等检查可采用厚血涂片法。

(二) 血液细胞染色

瑞氏染色法是最经典、最常用染色法,尤其对于细胞质成分、中性颗粒等可获得很好的染色效果,但对细胞核的着色能力略差。吉姆萨染液对细胞核、寄生虫(如疟原虫等)着色较好,结构更清晰,但对细胞质成分的着色能力略差。采用瑞-吉复合染液可使细胞胞质、颗粒、胞核等均获得满意的染色效果。

瑞氏染料的质量规格用吸光度比值(rA)来评价,新配制染料 rA 接近 2,降到 1.3 ± 0.1 时,染料即可使用。新鲜配制的染料偏碱,须在室温或是 37℃ 下贮存一定时间,待亚甲蓝逐渐变为天青 B,贮存时间愈久,染色效果愈好。在贮存过程中,必须加塞,以防甲醇挥发和氧化成甲酸,所用甲醇须为 AR 级,若其中含过多丙酮,会使染色偏酸,白细胞着色不良。

七、质量控制

(一) 血涂片制备

制备涂片时,血滴愈大、角度愈大、推片速度愈快,血膜愈厚,反之则愈薄。血细胞比容增高、血液黏度较高时,应采用小血滴、小角度、慢推,可得满意结果;血细胞比容减低、血液较稀时,应采用大血滴、大角度、快推。

(二) 血液细胞染色

染色深浅与血涂片中细胞数量、血膜厚度、染色时间、染液浓度、pH 密切相关。

第二章 红细胞检查

一、概 要

(一) 红细胞生理

红细胞是血液中数量最多的有形成分,起源于骨髓造血干细胞,在红细胞生成素作用下,经红系祖细胞阶段,分化为原红细胞,经数次有丝分裂发育为早幼、中幼和晚幼红细胞。晚幼红细胞通过脱核成为网织红细胞,这一过程在骨髓中进行,约需 72h。网织红细胞经约 48h 成完全成熟的红细胞,释放入血液,平均寿命约 120d,衰老红细胞主要在脾破坏,分解为铁、珠蛋白和胆红素。

红细胞生理功能是通过胞内的血红蛋白来实现的。红细胞有交换和携带气体的功能。红细胞经过肺部时,肺泡中氧气经肺泡壁、毛细血管壁进入红细胞内,与红细胞内血红蛋白结合,随血液被带到各组织;同时将组织代谢产生的二氧化碳与血红蛋白结合,经血流带回肺部,经肺泡排出体外。如此往复,使全身组织能及时、充分地得到代谢所需的氧气,并排出体内多余的二氧化碳。

(二) 血红蛋白

血红蛋白分子是有核红细胞、网织红细胞内形成的一种含色素蛋白质。色素部分为亚铁血红素,蛋白质部分为珠蛋白。亚铁血红素由原卟啉、铁组成,受 δ -氨基- γ 酮戊酸合成酶、血红素和 Fe^{2+} 的调节。珠蛋白肽链分为 α 、 β 两类:① α 类链: α 、 ζ 和 θ 链;② β 类链: β 、 δ 、 γ 、 ϵ 链。 α 链由 141 个氨基酸组成, β 链由 146 个氨基酸组成。每个 Hb 分子由 2 条 α 类肽链和 2 条 β 类肽链组成。在正常情况下,99% Hb 的铁原子呈 Fe^{2+} 状态,称为还原 Hb,1% 呈 Fe^{3+} 状态,称为高铁血红蛋白,只有 Fe^{2+} 状态的 Hb 才能与氧结合,称为氧合血红蛋白。

血红蛋白的合成受激素的调节:一类是红细胞生成素,可促进 δ -氨基- γ 酮戊酸生成和铁の利用,从而促进血红素、Hb 的合成;另一类是雄激素,能促进 δ -氨基- γ 酮戊酸合成酶、红细胞生成素的生成。

在人体生长各期,Hb 种类与比例不同。在胚胎发育早期,约妊娠第 5 周, ζ 与 ϵ 基因表达,形成个体发育中第一个有功能的胚胎期血红蛋白: $\zeta_2\epsilon_2$ (Hb Gower I);妊娠第 6 周, α 和 γ 基因开始表达,形成 Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$)、Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$)、Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) 和 HbF ($\alpha_2\gamma_2$) 等胚胎期血红蛋白;妊娠第 8 周, γ 链合成达到最高峰, β 链开始合成,形成 HbA ($\alpha_2\beta_2$);妊娠第 36 周, β 链合成迅速增加, γ 链合成速率减低;刚出生时, β 链与 γ 链合成量大致相等;出生后 3 个月,使 HbA 逐步占 Hb 总量 95% 以上,而 HbF 逐步降至 1% 以下。 δ 链开始合成时间不很清楚,出生后 HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) 占 Hb 总量的 2%~3%。

血红蛋白(Hb 或 HGB)分子是一种微红色的胶体物质,相对分子质量为 64458,是一种呼吸载体,每克血红蛋白可携带 1.34ml 氧,成人约含 600g 血红蛋白,可携约 800ml 氧。血红蛋白降解产物为珠蛋白和血红素。珠蛋白由蛋白酶、肽酶分解为氨基酸,进入氨基酸代谢,可再参与蛋白质、多肽合成或转变成其他含氮物质;血红素中铁由单核-吞噬细胞系统处理,与运铁蛋白结合进入铁代谢库。

二、红细胞计数

(一) 检测原理

1. **手工显微镜法** 用等渗稀释液将血液稀释一定倍数,充入血细胞计数池,在显微镜下计数一定体积内的红细胞数,经换算求出每升血液中红细胞数量。

2. **血液分析仪法** 用电阻抗和(或)光散射原理。

(二) 方法学评价

1. **手工显微镜法** 是传统方法,不需要特殊设备,但操作复杂、费时。

2. **血液分析仪法** 是常用方法,比手工法精确(如电阻抗计数法的变异系数为2%,手工法则大于11%),且操作简便、快速。当白细胞数量明显增高时,会干扰红细胞计数和体积测定而产生误差。

(三) 质量控制

1. **手工法** 误差原因为:

- (1)样本:血液发生凝固。
- (2)操作:稀释、充池、计数不规范。
- (3)器材:微量吸管、计数板不标准。
- (4)固有误差(计数域误差)。

2. **仪器法** 仪器应严格按规程操作,并定期进行室内质控和室间质评。

(四) 参考值

1. **参考值** 成年男性 $(4.0 \sim 5.5) \times 10^{12}/L$;成年女性 $(3.5 \sim 5.0) \times 10^{12}/L$;新生儿 $(6.0 \sim 7.0) \times 10^{12}/L$ 。

2. **医学决定水平** 高于 $6.8 \times 10^{12}/L$,应采取措施;低于参考值低限,为诊断贫血界限,应寻找病因;低于 $1.5 \times 10^{12}/L$ 应考虑输血。

(五) 临床意义

1. 生理性变化

(1)年龄与性别的差异:新生儿,由于出生前处于生理性缺氧状态,故红细胞明显增高,较成人约增加35%,出生2周后逐渐下降,2个月婴儿约减少30%。男性在6~7岁时最低,随年龄增大而逐渐上升,25~30岁达到高峰,30岁后随年龄增大而逐渐下降,直到60岁尚未停止。女性也随年龄增大而逐渐上升,13~15岁达到高峰,随后受月经、内分泌等因素影响而逐渐下降,21~35岁维持最低水平,以后随年龄增大而逐渐上升,与男性水平相当。

(2)精神因素:感情冲动、兴奋、恐惧、冷水浴等可使肾上腺素增多,导致红细胞暂时增多。

(3)剧烈体力运动和劳动:由于需氧量增加,使红细胞生成素生成增加、骨髓加速释放红细胞,导致红细胞增多。

(4)气压减低:高山地区居民和登山运动员因缺氧,红细胞代偿性增生,数量增高。

(5)妊娠中后期:为适应胎盘循环需要,通过神经、体液调节,孕妇血浆容量明显增加使血液稀释,导致红细胞减少。

2. **红细胞和血红蛋白量减少** 见于临床上各种原因的贫血。通过红细胞计数、血红蛋白测定或血细胞比容测定可诊断贫血,明确贫血程度。贫血原因分析应结合体检和进一步检查。按病因将贫血分成:

(1)急、慢性红细胞丢失过多:各种原因出血,如消化性溃疡、痔疮、十二指肠钩虫病等。