附件2：

安徽医科大学2025年大学生检验实验技能竞赛内容大纲

实验理论与操作内容：检验技术实验内容。

专业知识竞赛：形态学分析判断（包括外周血、骨髓、体液等有形物）占 50%；临床生化检验技术、临床免疫检验技术、临床微生物检验技术及临床基础检验技术基本知识（人卫出版社 2015 版）占 50%。

专业操作技能竞赛：本次技能比赛范围共 5 项：白细胞计数（手工法）、ABO 血型鉴定、平板分离划线及细菌革兰染色镜检、ELISA 测定 HBsAg、葡萄糖测定。

白细胞计数（手工法）

1原理

白细胞计数手工法主要使用血液稀释、显微镜计数和计算的方法来确定血液中白细胞的数量。常用的设备包括血细胞计数板（例如Newbauer计数板）和显微镜。基本原理是将已知体积的稀释血液样本放入计数板中，然后在显微镜下计数一定区域内的白细胞数量，根据计数结果和稀释倍数计算出每微升（µL）血液中的白细胞总数。

2操作步骤

准备工作，血液稀释，混合稀释液，装填计数板，显微镜观察，

计数，计算。

3.注意事项

操作过程中保持手部和仪器的清洁，避免污染。

稀释后立即进行计数，以防白细胞发生自溶或样本变质。

注意计数时的准确性，避免重复或漏计。

**ABO血型鉴定（正定型试管法）：**

1.原理：正定型（正向试验）：将受试者的红细胞与已知的抗A血清和抗B血清混合，观察是否发生凝集反应。通过凝集反应确定红细胞表面的抗原类型。

2操作：准备材料，用标签和记号笔标记两个试管或反应板的孔，，加入抗体，加入红细胞悬液，使用移液器或滴管，将受试者的红细胞悬液加入到标记为抗A和抗B的试管或反应板孔中，各加1滴红细胞悬液，混合，观察反应，读取结果。凝集反应表示存在相应的抗原，未发生凝集表示不存在相应的抗原。

3.注意事项

样本处理：确保受试者的红细胞悬液均匀分布，避免细胞沉淀。

采集的红细胞样本应新鲜，避免长时间放置导致细胞变质。

试剂选择：确保使用的是有效期内的抗A和抗B血清，避免试剂失效影响结果。

血清和红细胞悬液的比例要适当，通常为1:1。

环境条件：试验应在室温下进行，避免温度过高或过低影响反应速度和结果准确性。试管或反应板应洁净，避免污染物干扰实验结果。

反应观察：观察凝集反应时应在良好的光线条件下进行，以确保结果的准确性。

若使用离心机，应避免离心时间过长或转速过高，以免破坏红细胞。

**平板分区划线分离及细菌的革兰染色镜检**

1.原理：平板分区划线分离法（Streak Plate Method）是一种常用的微生物分离技术，通过将微生物样品在培养基表面划线，使微生物逐步稀释并分离出单个菌落。这有助于从混合菌群中获得纯培养物。

2.操作步骤：准备灭菌的接种环或接种针，灭菌，接种，将灭菌后的接种环蘸取少量微生物样品，稀释划线，培养。制备涂片，固定，初染，冲洗，媒染，冲洗，脱色，冲洗，复染，冲洗，干燥，在油镜（1000倍）下观察染色结果，革兰氏阳性菌呈紫色，革兰氏阴性菌呈红色。

3注意事项：灭菌后的接种环要充分冷却，避免高温杀死样品中的微生物。

每次划线之间都要重新灭菌接种环，以防止交叉污染。

划线时动作要轻，避免破坏培养基表面。

染色和冲洗步骤时间控制要准确。

保持玻片水平，避免染色液流失。

使用油镜时滴加香柏油，提高显微镜观察效果。

①使抗原或抗体结合到某种固相载体表面，并保持其免疫活性。②使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体，这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性，又保留酶的活性。在测定时，把受检标本（测定其中的抗体或抗原）和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色反应的深浅来进行定性或定量分析。由于酶的催化频率很高，故可极大地放大反应效果，从而使测定方法达到很高的敏感度。

**ELISA检测HBsAg**

1.原理

ELISA检测HBsAg的原理主要是基于抗原-抗体反应的特异性和酶的高效催化作用。具体来说，就是先将抗-HBs抗体（即捕获抗体）固定在固相载体（如酶标板）上，然后加入含有HBsAg的待测样本。样本中的HBsAg会与固相载体上的抗-HBs抗体结合，形成抗原-抗体复合物。接着，加入酶标记的HBsAg特异性抗体（即检测抗体），该抗体会与已经结合在固相载体上的HBsAg结合，形成“固相抗体-抗原-酶标抗体”的三明治结构。最后，加入底物，酶会催化底物产生颜色反应，颜色的深浅与待测样本中HBsAg的含量成正比。

2.操作步骤:包被：将抗-HBs抗体（捕获抗体）包被在酶标板的反应孔内，确保抗体均匀分布并吸附在固相载体上。

加入含有HBsAg的待测样本，使抗原与固相载体上的抗-HBs抗体结合,将酶标板置于37℃温育一定时间（如30分钟），使抗原-抗体反应充分进行,用洗涤液洗涤酶标板，去除未结合的抗原和杂质。

加酶：加入酶标记的HBsAg特异性抗体（检测抗体），使其与固相载体上的HBsAg结合，重复温育和洗涤步骤，确保形成稳定的抗原-抗体-酶标抗体复合物。加入底物溶液，酶催化底物产生颜色反应。用酶标仪测定各孔的光密度值（OD值），根据OD值判断待测样本中HBsAg的含量。

**3.注意事项**

试剂保存：试剂盒应置于2℃～8℃保存，避免反复冻融。使用前应确保试剂充分摇匀，并垂直滴加。

样本处理：待测样本应新鲜采集，避免使用NaN3防腐。如有必要，可对样本进行适当稀释。

操作规范：加样时应避免触及孔壁，温育时应确保酶标板密封良好。洗涤时应充分洗涤，避免孔内液体残留。

质量控制：每次实验应设置阳性对照、阴性对照和空白对照，确保实验结果的准确性和可靠性。

结果判断：根据OD值判断待测样本中HBsAg的含量时，应注意阴性对照OD值的影响。当样品OD值/阴性对照平均OD值≥2.1时，判断为阳性；否则为阴性。

**葡萄糖测定**

1.原理：葡萄糖氧化酶法利用葡萄糖氧化酶（GOD）催化葡萄糖与氧反应生成葡萄糖酸和过氧化氢。过氧化氢在过氧化物酶（POD）存在下，与显色剂（如邻联茴香胺）反应生成有色产物，通过比色法测定有色产物的吸光度，从而间接测定样品中的葡萄糖浓度。

2.操作步骤：试剂准备，样品处理，混合反应，孵育反应，将试管置于37℃水浴中孵育规定时间（如15分钟）。终止反应，孵育完成后，从水浴中取出试管，冷却至室温。测定吸光度，计算葡萄糖浓度，根据标准曲线或试剂盒提供的公式，计算样品中的葡萄糖浓度。

3.注意事项：

采集样品时应避免溶血和污染，使用抗凝管采集血样，保持尿液样品的清洁。

严格按照试剂盒说明书配制试剂，避免试剂失效或污染。

孵育温度和时间要准确控制，避免温度过高或过低、时间过长或过短，影响反应结果。

使用分光光度计前应校准仪器，确保测量准确。

比色皿应清洁无划痕，避免影响光路和测量结果。