

第五章 临床微生物学检验

一、病原微生物的培养鉴定和耐药性检测

检验申请单可为实验室提供有关标本的重要信息,准确完整的信息可以使实验室选择正确的标本后处理方法、实验技术路线和结果综合判定分析。微生物检验申请单除包括一般申请单上应注明患者的ID号、姓名、性别、年龄、临床诊断、检验目的(如细菌培养加药敏试验、嗜血杆菌培养加药敏试验、真菌培养、厌氧菌培养、结核分枝杆菌培养、弧菌培养加药敏试验等),还应该包括标本类别、取材部位、取材方式(如尿液标本要注明是导尿、膀胱穿刺尿和中段尿等)、取材时间、近3d内是否使用过抗菌药物,如使用过,是何种抗菌药物。如考虑为特殊病原菌感染,应在申请单上注明或事先与实验室电话联系。标本采集后,送实验室前均需将LIS系统的识别条形码(每联有大、小两种)分别贴在申请单上(大标识)和送检容器外(小标识),并在护士站进行标本信息、采集后送验。

237

(一) 各类标本的采集送检要点

根据临床诊断需要选取适当部位,用正确的方式采集和运送标本是至关重要的。如果标本的采集和管理未按要求进行,就不可能为医师提供任何有用的信息,甚至误导临床的诊断和治疗,因此实验室有理由拒收未按标准留置的送检标本。采集标本要遵循早期、无菌、适量和安全的原则。尽可能在使用抗菌药物之前采集标本。不同的标本有不同的采集方式。

1. 血液标本

血液标本应该在使用抗菌药物之前采集,按无菌操作技术对采

集部位进行消毒,皮肤消毒程序为:①70%酒精擦拭静脉穿刺部位30 s以上。②1%~2%碘酊作用30 s或10%碘伏作用60 s,从穿刺点向外画圈消毒,至消毒区域直径达3 cm以上。③70%酒精脱碘。采集血液(不可从正在进行输液,尤其是正在输入抗菌药物的静脉穿刺处留取血液)后立即将针头(勿换针头)插入事先消毒好的瓶口橡皮塞,将血液注入瓶内。采血时间应该选择在体温峰值即将出现前,至少也应该在体温峰值出现后立即采集。采血量与血培养瓶中的液体比积为1:5到1:10,一般成人8~10 ml,儿童1~5 ml。采样后将血培养瓶上的活动条形码揭下粘贴在检验申请单上,记录抽血时间并在护士工作站将LIS系统的识别条形码分别贴在申请单和血培养瓶上,并对条形码进行计算机采集,然后立即送检验科微生物室。如不能及时送达,放置室温,切勿置冰箱保存。生物梅里埃公司(BacT/ALERT)的血培养瓶,用前也要求室温保存。

每一次采集血培养标本,应该选择2个不同的部位抽血,分别注入2个血培养瓶。这样做的优点是有助于发现可能存在的操作污染,特别是对凝固酶阴性的葡萄球菌、草绿色链球菌、棒状杆菌属,当2个瓶同时培养出此类细菌,有较重要的临床意义。可疑细菌性心内膜炎,在1~2 h采集3份血标本,如24 h后阴性,再采集3份以上血标本。

如果怀疑为厌氧菌引起的血液感染,应同时申请厌氧培养和普通培养,抽血后特别注意排空针管和针尖处的空气,立即注入厌氧培养瓶,切不可将空气注入瓶中,再注入普通血培养瓶。

报告结果:机器报警显示阳性瓶时,取下阳性瓶做涂片,经革兰染色镜检后电话通知主管医师,并同时细菌的分离鉴定和抗菌药物敏感试验。当培养瓶在血培养仪上培养到6 d时,机器会显示阴性,此时报告阴性。如考虑为特殊细菌引起的感染,需要延长培养时间,可在申请单上注明。

2. 导管尖端

导管尖端的培养可判定菌血症的来源,最常用的技术是半定量培养。用酒精消毒皮肤后,拔出导管,用无菌剪刀剪下抽入皮内的导

管前端 5 cm,置入一带盖的无菌试管(切勿将体外导管部分置入无菌试管)后立即送检(<15 min)。如接种培养后细菌数大于 15 CFU,考虑为导管相关感染。

3. 无菌体液

(1) 脑脊液(CSF)标本:腰穿法收集脑脊液 3~5 ml(细菌培养不少于 0.5 ml,结核分枝杆菌不少于 3 ml),盛于无菌试管中(也可以注入血培养瓶,按血培养程序申请),应立即送检,否则会影响检出率,同时注意保温,不可置冰箱保存,否则会使病原菌死亡,尤其是脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌及流感嗜血杆菌。所有的 CSF 标本应做革兰染色和细胞记数。怀疑为新生隐球菌感染的患者,应该申请真菌培养,并注明临床怀疑为新生隐球菌感染。引起脑膜炎的细菌中很少有厌氧菌,因此无需常规进行厌氧菌培养。厌氧菌常与脑脓肿、硬膜下积脓和硬膜外脓肿等疾病相关,CSF 的检查对这些疾病帮助不大。

(2) 其他体液标本:心包液、腹膜液、胸膜液和滑膜液应通过无菌技术采集 1~5 ml 液体标本送检,而不应该用棉拭子沾取液体送检。液体标本应直接注入血液培养瓶(按血培养程序申请)或无菌试管立即送检(采用无菌试管留取的标本<15 min 内送检)。

4. 耳部标本

耳标本包括诊断外耳炎的拭子和诊断中耳炎的中耳液体。外耳拭子应该先用湿润的拭子除去外耳道的耳叮和皮屑,然后插入一拭子在外耳道旋转采集。内耳标本,如鼓膜完整,先用皂液清洗,再通过注射器吸取技术采集液体。如鼓膜破裂,用可弯曲的拭子采集液体。

5. 眼部标本

用稍蘸无菌肉汤的消毒紧细拭子后,在眼结膜上病变明显处滚动采集标本,采集结膜或角膜的刮片标本以消毒刮刀或虹膜恢复器轻轻刮取结膜上皮细胞层或角膜溃疡边缘式进行缘,切勿刮取角膜溃疡之基底部。如怀疑真菌感染时可刮取基底部,但不宜深。最好能在床边接种培养基。如不能立即接种,应将拭子放入 Start's 运送

培养基中,以防干燥,2 h 内送检。

6. 粪便标本

粪便标本应该直接留入清洁的容器,挑取可疑部分置小的带盖的清洁容器内送检。排便困难者或婴幼儿,可用直肠拭子采集粪便标本。先用肥皂水将肛门周围洗净,用无菌生理盐水,保存液或增菌液润湿的棉拭子插入肛门,成人约 4 ~ 5 cm,儿童 2 ~ 3 cm,与直肠黏膜表面接触,转转旋转,并将拭子置于适当的运送培养基内送检。对于住院 3 d 以上的患者一般不做粪便的常规培养,有研究资料认为这时患者的腹泻很少为食物源性的,推荐进行难辨梭菌的毒素检测。

引起腹泻的常见病原菌包括沙门菌属、志贺菌属、气单胞菌属和邻单胞菌属。如果怀疑为弧菌属、致腹泻的大肠埃希菌或其他特殊细菌引起的腹泻,请注明申请目的。如临床怀疑为菌群失调请在申请单上注明。常见的菌群失调症由金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和酵母菌引起。

240

报告方式:检出致病菌,作细菌鉴定和药敏试验,试验周期一般 3 ~ 5 d;若培养 48 h 后仍无致病菌生长,第 3 天发出报告,报告无致病菌生长。培养出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌或者酵母菌过度生长,不需要做药敏试验。

7. 泌尿生殖道标本

(1) 尿液标本:尿液标本包括清洁中段尿、导尿和耻骨上膀胱穿刺尿等。由于这些标本的后处理接种方式不同,检验申请单上必需注明是用何种方式留取的尿液标本。留取中段尿(最好留取清晨第一次尿或距上一次排尿 2 h 以上)前,先用肥皂液和清水清洁外阴,用无菌干纱布擦干,女性分开阴唇,男性向上拉起包皮,排去前段的数毫升尿液后,用无菌尿杯接取中段尿液 ≥ 1 ml;导尿和耻骨上膀胱穿刺尿按无菌操作技术采集。(留置尿袋的,不可用尿袋中放出的尿液送检,而应该先消毒留置管与尿袋的接口处,分开接口放弃部分尿液后,留取尿液。)厌氧菌培养必须用膀胱穿刺尿进行培养。

尿标本中菌落计数 $\geq 10^5$ CFU/ml 考虑为感染,报告鉴定结果及药敏试验结果。但这一标准不是惟一的,如伴有急性尿道症状的性活动期的年青妇女,尿中白细胞数升高,菌落计数为 10^2 CFU/ml 也有临床意义。菌落计数 $< 10^5$ CFU/ml 的尿路感染可以发生在婴幼儿、男性以及近期使用过抗生素、大量饮水后、有临床症状并伴有脓尿、有尿道梗阻、由血源传播的肾盂肾炎和留置导尿管的这部分人。

(2) 生殖道标本:子宫颈分泌物应该用窥器张开阴道后将无菌棉拭插入宫颈管2~3 cm,转动拭子5~10 s 吸取分泌物。男性尿道分泌物直接用无菌棉拭取分泌物检查。如无明显的分泌物,可用细的无菌棉拭插入尿道2~3 cm 处连续转动5 s。

8. 下呼吸道标本

标本来源有多种:痰(咳出或诱导出)、支气管肺灌洗吸出液、气管抽出液或气管刷子、肺穿刺或活检组织等。痰标本的留取量要求大于1 ml,留取痰标本之前,要嘱咐患者用清水、冷开水漱口或牙刷清洁口腔和牙齿,有假牙者应取下假牙,指导患者用力从深部咳出痰至带盖的无菌容器内。采用诱导法留取痰标本的患者,先用清水清洗牙龈和舌头,用3%~10% 盐水25 ml 给患者喷雾吸入后,采集诱导出的痰至带盖的无菌容器。通气机相关肺炎推荐使用肺泡灌洗液和支气管刷留取标本,将气管刷上0.001~0.01 ml 的分泌物置入1 ml 无菌生理盐水,立即送检。肺泡灌洗液留取10 ml 以上立即送检。对于不能自主咳痰的患者,严禁从吸痰器的管道和收集痰液的瓶子中留取痰标本,吸痰前,应连接一无菌吸管头和皮条在吸痰器上,将痰吸入无菌吸管头内,再放入带盖的无菌容器内送检。如怀疑为肺结核的患者,采集清晨的深咳痰5~10 ml,放入带盖的无菌容器内,需连续留取3 d 送检。

报告方式:检出致病菌,作细菌鉴定和药敏试验,试验周期一般3~5 d;若培养48 h 后仍无致病菌生长,第3 天发出报告,报告无致病菌生长。气管刷半定量记数培养细菌数大于1 000 CFU/ml(相当于原始标本细菌数 10^6 CFU/ml),考虑为感染。肺泡灌洗液离心后,革兰染色应报告细胞内是否存在细菌,半定量记数培养某种有意义

的细菌数大于 10^4 CFU/ml,与肺炎相关。培养结核分枝杆菌的标本,有阳性结果及时报告,未生长结核分枝杆菌的6~8周发出报告。

9. 上呼吸道标本

采集鼻咽拭子,应从鼻腔轻轻的将无菌拭子插入后鼻咽部,缓慢旋转5s,取出后插入无菌试管(手持部分不要插入试管内)或专用运送培养基。采集喉拭子,应用压舌板压住舌根,用无菌拭子采集炎症部位的样本,取出后插入无菌试管(手持部分不要插入试管内)或专用运送培养基。

10. 其他标本

(1) 组织标本:用外科手术方法采集组织标本,慢性的组织损伤由于细菌含量少,需取适量的样本。采集的组织标本应放入无菌试管及时送实验室(<15 min),以防标本干掉。极少量的组织标本,应放入含有少量生理盐水的无菌试管。

(2) 骨髓标本:骨髓标本采集后,注入血培养瓶送检。

(3) 皮肤(肤癣病)标本:用70%的乙醇局部消毒后,在损伤的边缘轻刮表面的皮肤(勿使出血),放入无菌试管送检。

(4) 伤口或脓液标本:用无菌生理盐水或70%的乙醇除去表面分泌物。开放性伤口尽可能抽吸脓液,或将拭子伸入损伤部位擦取感染扩展边缘的脓液;闭合性伤口抽取脓腔壁的物质送检。如果考虑厌氧菌感染,抽取脓液后排出空气,将针尖的剖面全部插入一无菌橡皮塞,立即送检(<15 min)。如感染伤口呈窦道状,最好加送分枝杆菌培养(排除快速生长的分枝杆菌或结核分枝杆菌感染)。

(二) 报告时间、报告方式和判读原则

阳性报告的病原体一般鉴定至种,阴性报告有下列几种情况:应该是无菌的部位报告无菌生长,有正常菌群的部位报告无致病菌生长,特殊目的的培养报告未生长××菌。一般的细菌培养标本3~5d发阳性报告,第3天发出阴性报告。无菌体液标本3d~1周发阳性报告,第5天发出阴性报告。血液培养3d~1周发正式阳性报告(初步报告随时电话通知),第6~7天发出阴性报告。真菌培

养3 d~2周发出阳性报告,1~2周发出阴性报告。结核分枝杆菌培养出现阳性生长鉴定确认后即报告,6~8周发出阴性报告。需要知道是否有可疑阳性感染菌生长现象的,可在送检的第2天与实验室联系获取信息。

通常在检验报告单上会给出感染菌的名称和药物敏感试验的结果。从有正常菌群分布的部位分离的细菌会给出可能的感染菌和正常菌群相对量的比值,如痰的细菌培养会出现某感染菌(+++),生长正常菌群(++)或未生长正常菌群。细菌数量对临床诊断治疗有重要参考意义的,会给出半定量或定量数值。药物敏感试验报告敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。“敏感”指用推荐用于此型感染病原菌的药物剂量,可以对该菌株所致感染进行恰当的治疗,除非存在禁忌证。“中介”包括以下含义:此药对该菌株的最低抑菌浓度(MIC)接近血液和组织中通常可达到的水平,但治疗的反应率可能低于敏感株。“中介”类意味着药物在生理浓集部位具有临床效力(如尿液中的喹诺酮类和 β 内酰胺类),或者可用高于正常剂量的药物进行治疗(如 β 内酰胺类)。“中介”类的解释还包括一个缓冲区,它可以防止微小的、未能控制的技术因素造成重大的结果解释错误,特别是对那些安全范围较窄的药物。“耐药”指常规剂量的抗微生物药物通常达到的全身浓度,不能抑制该菌株生长或(和)MIC值落于某范围内的菌株,在此范围内,可存在某些特定的耐药机制,并且治疗研究显示其临床疗效不可靠。

检验报告单上还会报告目前可以检测的耐药酶和从耐药表型推测耐药机制的提示。如葡萄球菌、淋病奈瑟菌、嗜血杆菌的细菌如 β 内酰胺酶阳性表示对氨苄西林等对 β 内酰胺酶不稳定的青霉素类药物耐药。大肠埃希菌和克雷伯菌属超广谱 β 内酰胺酶阳性,提示用青霉素类、头孢类和单环 β 内酰胺类药物治疗效果不佳。葡萄球菌对苯唑西林耐药表示携带mecA基因,对所有的 β 内酰胺类药物以及 β 内酰胺类联合 β 内酰胺酶抑制剂类的药物耐药,并常常存在对其他类抗菌药物的交叉耐药。耐环丙沙星的葡萄球菌往往对喹诺酮类药物均耐药,耐萘啶酸的沙门菌属和志贺菌属通常已出现DNA

旋转酶的点突变,慎用喹诺酮类药物。耐庆大霉素的葡萄球菌往往对氨基糖苷类药物(不指示链霉素)耐药。肠球菌检测高浓度的庆大霉素和高浓度的链霉素,如敏感,表示可以和敏感的青霉素类和糖肽类药物联合用药。所有的结果和提示均需要临床医师结合临床实际加以考虑并加强与实验室的沟通。

二、感染性疾病的血清学检查

感染性疾病的血清学检查包括检测血清中病原微生物所表达的各类蛋白抗原以及由抗原刺激机体所产生的抗体。

(一) 肥达试验

【试验原理】

用已知的伤寒、副伤寒沙门菌抗原检测患者血清中是否有相应抗体的凝集试验称作肥达试验。包括患者血清抗体与伤寒沙门菌菌体(TYO)、鞭毛(TYH)和甲、乙、丙型副伤寒沙门菌鞭毛(PA, PB, PC)5种抗原的凝集效价,通称O、H、甲、乙和丙的凝集效价。

【参考值范围】

正常人凝集效价随各地区的预防接种率和流行情况而有不同。一般认为:TYO < 1:80, TYH < 1:160, PA < 1:80, PB < 1:80, PC < 1:80。

【临床意义】

H及O效价均增高时可诊断为伤寒。O效价达1:80以上以及A、B、C中之一项效价达1:80以上时,可诊断为副伤寒甲或乙或丙,如效价随病情逐渐上升,诊断价值更大。一般应取双份血清(急性期和恢复期)作对比,如呈4倍以上增长则价值更大,凝集素如明显上升,是新近感染伤寒的指征。伤寒患者发病第1周后才出现肥达反应,第1周内阳性率为50%,第4周可达90%。人体感染伤寒或预防接种后,H与O抗体在体内的消长情况不同。IgM型的O抗体出现较早,持续时间约半年,消失后不易再出现。IgG型抗体出现较晚,持续时间

长达数年,消失后易受非特异抗原刺激而短暂地重新出现。

单 H 凝集价升高而 O 不高者,可能因素:①曾接受过伤寒菌苗接种;②患过伤寒;③另外少数伤寒患者因 O 凝集价被 Vi 抗原影响不增高,仅 H 凝集价高;④其他沙门菌感染。曾预防接种过伤寒混合疫苗,再感染伤寒时,H 与 O 凝集价上升较快,但在疾病恢复时,凝集价并不太高,因为预防接种后体内产生抗体,再感染时病情缓和。过去曾接种过伤寒菌苗或患过伤寒近期又感染流感、布氏杆菌等其他病原体时,可产生高滴度的 H 凝集素及较低滴度的 O 凝集素,此系“回忆”反应。

【样本要求】

静脉血(抗凝)。

(二) 冷凝集试验

【试验原理】

受肺炎支原体感染的患者,血清中常含有非特异性冷凝集素(IgM 类抗体),能在 0~4℃ 时凝集人的红细胞。

【参考值范围】

≤1:32。

【临床意义】

凝集价 >1:64 具有诊断意义。在病程中,冷凝集素效价逐渐上升对诊断价值更大。患支原体肺炎、肝硬化、多发性骨髓瘤、疟疾、恶性淋巴瘤等疾病时冷凝集素有不同程度的升高。冷凝集素效价升高可在传染过程中出现,特别是肺炎支原体所致非典型性肺炎;慢性的冷凝集素升高常继发于淋巴细胞增殖性疾病。双份血清效价有 4 倍增高者亦有诊断意义。由肺炎支原体所引起的非典型肺炎目前用肺炎支原体血清抗体试验检测。

【样本要求】

静脉血(抗凝)。

(三) 肝炎病毒血清学试验

【试验原理】

目前在人类发现肝炎病毒主要有甲、乙、丙、丁、戊、庚型和输血传播病毒共7种。感染肝炎病毒的患者,血清中含有病毒的蛋白抗原和(或)抗体,用免疫学的方法可以检测这些抗原、抗体的存在。

【参考值范围】

阴性。

【样本要求】

静脉血(抗凝)。

1. 乙型肝炎病毒(HBV)

乙型肝炎病毒是乙型肝炎的病原体,传播途径大致有血液、血制品、性接触及母婴传播途径。HBV的血清标志物包括表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎表面抗体(抗HBs),乙型肝炎e抗原(HBeAg)、乙型肝炎e抗体(抗HBe)和乙型肝炎核心抗原(HBcAg)、乙型肝炎核心抗体(抗HBc)共3对。由于HBcAg不能用常规的血清学方法检测,所以通常检测乙型肝炎的血清学试验俗称乙型肝炎二对半试验。

246

【临床意义】

(1) HBsAg是HBV感染后最早出现的血清学标志物,在感染后4~7周,血清谷丙转氨酶上升前数周,HBsAg就开始出现在血清中。HBsAg阳性表示存在HBV感染。在急性自限性感染者,HBsAg在血清中存在时间不超过6个月,如果HBsAg持续存在6个月以上,一般认为处于携带状态,因为以后机体清除病毒的可能性很低。也有S基因突变导致用目前的方法无法检测出HBsAg,即为所谓的HBsAg阴性的HBV感染。HBsAg阳性的献血员,应禁止献血,HBsAg阳性的孕妇,所生的新生儿应立即接种乙肝疫苗,防止发生母婴传播。

(2) 抗HBs是HBV感染后机体产生的保护性抗体,抗HBs的出现提示过去曾感染过HBV,现已恢复,体内HBV已被清除,无传染性。接种乙型肝炎疫苗后血清中亦出现抗HBs表示疫苗接种成功,机体对HBV有免疫力。

(3) HBeAg阳性结果表明有HBV复制,并有传染性。HBeAg在HBV感染的早期出现,血清中HBsAg和HBeAg常同时存在,而在

恢复期先于 HBsAg 消失,如 HBsAg 和 HBeAg 持续阳性,则成为 HBV 慢性感染。如孕妇 HBsAg 和 HBeAg 均为阳性,所生婴儿 90% 以上可成为 HBV 携带者。此外,HBeAg 的检测对抗病毒药物的考核和判断病情均有一定意义。

(4) 抗 HBe:急性肝炎患者的 HBeAg 消失后,抗 HBe 就出现,表示 HBV 复制减弱,传染性减小,病情趋向好转。但 HBV 前 C 区基因突变株,可不产生 HBeAg,故 HBeAg 为阴性,而抗 HBe 为阳性。此类变异株感染可表现病情重,易发展成为重型肝炎且病死率高,并可引起流行。

(5) 抗 HBc:目前认为它不是 HBV 感染的保护性抗体。抗 HBc 出现较早,常紧随 HBsAg 和 HBeAg 之后就可在血清中检出,早期以 IgM 型抗体为主,一般持续 6 ~ 18 周。常以抗 HBc - IgM 作为急性 HBV 感染的指示,但慢性乙型肝炎患者,尤其是在活动期可以持续低效价阳性。急性感染恢复期和慢性持续性感染以抗 HBc-IgG 为主,可持续存在数年。单项抗 HBc 阳性可见于:①既往感染,抗 HBs 滴度低测不出。②低水平病毒携带者,因 HBsAg 效价低而测不出。③核心窗口期,血清中 HBsAg 和 HBeAg 消失,抗 HBc 尚未出现,此时抗 HBc-IgM 可能阳性。④被动获得抗 HBc,如经输血或胎盘获得。⑤假阳性。区分假阳性,可用以下方法鉴别:a. 随访观察其他抗原抗体的变化;b. 检测 HBV-DNA,如为阳性,则提示低水平携带;c. 观察疫苗接种反应,出现“回忆”反应为既往感染,原发反应为假阳性,无反应为低水平携带。

(6) Pre - S1 和 Pre - S2 在血清中的出现和消失与 HBV - DNA 和 HBeAg 的消长相一致,均作为体内有 HBV 复制及有传染性的标志。

乙肝二对半临床意义综合判断见表 5 - 1。

表 5 - 1 乙肝二对半临床意义综合判断简表

HBsAg	抗 HBs	HBeAg	抗 HBe	抗 HBc	临床意义

+	-	+	-	+	急性肝炎、慢性肝炎活动期,有传染性(俗称大三阳)
+	-	-	+	+	急性乙型肝炎、病毒复制减弱;慢性乙型肝炎、传染性弱(俗称小三阳)
+	-	-	+	-	急性 HBV 感染,趋向恢复,慢性 HBsAg 携带者
-	-	-	+	+	近期既往感染,急性 HBV 感染恢复期
+	-	-	-	+	急性肝炎、慢性肝炎表面抗原携带者,传染性弱
-	-	-	-	+	急性窗口期,或既往感染过
-	+	-	+	+	康复期,近期感染过 HBV,有免疫力
-	+	-	-	+	既往感染过,乙型肝炎恢复期,仍有免疫力
-	+	-	-	-	康复期或疫苗接种后
-	-	-	-	-	现在或过去未感染乙型肝炎病毒

注：“+”，阳性；“-”，阴性

2. 丙型肝炎病毒(HCV)

丙型肝炎病毒是肠道外传播的非甲非乙型肝炎的主要病原体,所导致的肝炎称为丙型肝炎,是常见的慢性进行性肝病之一。

【临床意义】

抗体阳性为 HCV 感染。抗 HCV 阳性持续 6 个月以上预示转为慢性丙肝的可能性较大。但目前的检测方法仍未解决假阳性问题,对于那些不具危险因素者,需用确认试验(免疫印迹法)来排除假阳性。

3. 丁型肝炎病毒(HDV)

丁型肝炎病毒是一种缺陷病毒,只有在 HBV 已经存在于肝内或同时侵入肝内才能建立感染。根据与 HBV 感染的关系,可将 HDV 感染分为两种类型:同步感染和重叠感染。前者指 HDV 与 HBV 同时或先后感染,患者在此之前无 HBV;后者是指在慢性

HBV 感染的基础上发生 HDV 感染,HDV 复制比同步感染高。

【临床意义】

丁型肝炎的完整诊断,需要对数种标志物作出综合分析。同步感染的血清学特征是,抗 HBs - IgM、抗 HBe - IgM 和抗 HDV - IgM 抗体阳性。重叠感染的血清学特征是,抗 HBs - IgG 和抗 HBe - IgG 持续存在,以及抗 HDV - IgM 抗体和 HDV - RNA 阳性、抗 HDV - IgG 抗体水平升高。

4. 戊型肝炎病毒(HEV)

戊型肝炎病毒经胃肠道传播,呈爆发性流行和地方性流行。

【临床意义】

急性期血清抗 HEV - IgM 阳性或者恢复期抗 HEV - IgG 滴度比急性期高 4 倍以上,提示有 HEV 感染。

5. 庚型肝炎病毒(HGV)

庚型肝炎病毒可能是非肠道传播。HGV 感染者常合并 HCV、HBV 感染,偶尔合并 HIV 感染。

【临床意义】

患者感染庚型肝炎病毒(HGV)。可引起急性和慢性肝炎,患者病毒血症可长期持续 9 年,HGV 可通过输血传播。

(四) 人类免疫缺陷病毒(HIV)血清学诊断

【试验原理】

检测 HIV 抗体的血清学试验包括初筛试验和确证试验。初筛试验阳性需重复试验(包括不同厂家的试剂),若仍为阳性再做确证试验。初筛试验是用 HIV - I 和 HIV - II 两型抗原去检测血清中的抗体。确证试验是用电泳的方法将病毒的蛋白按分子量大小分开,再与血清中的抗体结合,观察出现针对何种蛋白的抗体,提高了试验的敏感性和特异性。

【参考值范围】

阴性。

【样本要求】

静脉血(抗凝)。

【临床意义】

感染 HIV 后,早期无任何临床表现。初筛试验阳性需重复试验(包括用不同厂家的试剂盒),若仍为阳性再做确证试验。确证试验阳性方可认为该患者 HIV 抗体阳性。由于目前尚无一种治疗方法可以完全从患者体内彻底清除病毒,所以确证试验证实检出抗 HIV 抗体即为 HIV 感染者。艾滋病的诊断应注意以下问题:① HIV 感染 2 周内,目前的任何方法均无法检测到病毒。② 2 周后出现病毒血症,可选择检测病毒抗原或检测病毒逆转录酶活性的方法。③ 感染 6~8 周开始,选择检测抗体的方法,直到 HIV 病毒出现。因为这段时间内 HIV 抗原很难从血清中测到,待发展到艾滋病后病毒才重新出现。④ 对于可疑的患者,尤其是来自疫区的可疑人员,抗 HIV 抗体阴性,至少随访 6 个月。⑤ 艾滋病的诊断要慎之又慎,阳性结果,要经过严格的确证试验证实。由国家卫生部授权的艾滋病检测中心实验室方可发出确证试验报告。⑥ 一旦发现了阳性结果,一方面应立即按国家传染病规定的乙类传染病上报程序迅速上报,同时应严格按新颁布的 HIV 感染者管理规定对患者进行善后处理。对已成年患者应通知本人,并向其说明阳性结果的检测意义以及 HIV 感染与艾滋病之间的关系,同时还要忠告他(她)有义务不从事可将病毒传给他人的活动。另一方面,检测单位也有责任为患者保密,以使其能在原来的环境中生活下去,这不仅仅是出于对患者的人道,避免因无知而产生的歧视,同时也是有效控制艾滋病蔓延的重要保证。

250

(五) 梅毒螺旋体血清血检查

【试验原理】

梅毒血清学检查包括非梅毒螺旋体血清学试验和梅毒螺旋体血清学试验。前者常用心脂质作为抗原,检测患者血清中的抗脂质抗体。后者用密螺旋体抗原检患者血清中的抗密螺旋体抗体。

【参考值范围】

阴性。

【临床意义】

梅毒的诊断要结合病史和临床表现。非梅毒螺旋体血清学试验可以作为筛查试验,确证要进行梅毒螺旋体血清学试验。已知病史或有梅毒体征者,若本试验阳性,即证实是梅毒患者;如初次试验阴性者,可能反应抗体尚未升高,可在2~4周后复查。病史不详或无体征者,如初次试验效价在1:8以下,间隔2~4周应复查,如效价上升两个滴度以上或两次试验都是高效价,可作为梅毒病的证据。检测抗体滴度可监测梅毒病情进展及观察疗效。要注意假阳性可出现在重症感染、免疫接种后、妊娠、红斑狼疮等多系统自身免疫性疾病、肿瘤、衰老、使用麻醉药、麻风、疟疾、回归热、雅司病等情况时,但通常效价在1:8以下。

(邵海枫)

第六章 临床免疫学检验

一、非特异免疫功能测定

(一) 多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 趋化功能测定

人体内有許多天然趋化因子,趋化功能是指粒细胞在趋化因子作用下向病原体定向移动的能力,是吞噬、杀菌的首要环节。当体内趋化因子减少或细胞本身对正常趋化因子缺乏反应时,可导致吞噬细胞趋化运动减弱。常用方法有琼脂糖凝胶板法和滤膜法(Boyden室法),采用患者肝素抗凝血检测。

【原理】

(1) 琼脂糖凝胶板法:在趋化因子(补体片段、细菌产物)吸引下,中性粒细胞向趋化因子作定向移动。根据其在琼脂糖凝胶板下移动的距离,即可判定其趋化功能。

(2) 滤膜法:于特制的 Boyden 趋化室上室内置白细胞悬液,下室内置趋化因子,中间隔以一定孔径的滤膜。白细胞受趋化因子吸引,从上室穿过滤膜进入下室。检测滤膜上穿过来的白细胞数即可判定受检患者白细胞的趋化功能。

【临床意义】

粒细胞趋化功能实验有助于探讨多种药物对免疫功能的影响或用于以易感染倾向为主要表现的患者。白细胞趋化功能缺陷见于 Chediak - Higashi 综合征、迟钝白细胞综合征、肌动蛋白(actin)功能不全症、膜糖蛋白缺陷症、高 IgE 综合征、先天性鱼鳞癣、糖尿病、烧伤、新生儿、反复感染和中性粒细胞减少症等。

【参考值范围】

(1) 新生儿趋化指数为 2.0 ~ 2.5,成人为 3.0 ~ 3.5(琼脂糖凝

胶板法)。

(2) 在试验方法建立并稳定后,检测一定数量的正常人,以其结果($\bar{x} \pm s$)作为正常值(滤膜法)。

【注意事项】

(1) 应通过预试验选择趋化因子和白细胞的最适浓度。浇注琼脂糖凝胶板时应于水平台面上进行,以保持胶板厚度均匀。为使结果有可比性,孔径、孔距及加样量都应严格标准化。

(2) 为使试验结果有较好的可重复性和可比性,正式试验前应通过预试验选择最适白细胞浓度和趋化因子浓度。在测量结果时,应注意固定采用一种计数方法(滤膜下表面计数或滤膜内计数)。

(二) 中性粒细胞吞噬与杀菌功能测定

吞噬细胞在趋化因子(细菌产物、 C_3a 、 C_5a 等)作用下定向移动至细菌周围后,借助于体液中的调理素通过胞饮作用将细菌吞噬,形成噬菌体。白细胞内溶酶体随即与噬菌体融合,释放各种溶组织酶进入噬菌体内,通过细胞内有氧氧化作用将细菌杀灭。细胞内杀菌是多种因素共同作用的复杂过程,某些代谢性酶、蛋白、补体缺陷症的患者,其吞噬、杀菌过程都会受到影响。

常用检测方法为白色念珠菌法、葡萄球菌法和溶菌法,采用患者肝素抗凝血检测。

【原理】

(1) 白色念珠菌法:白细胞与白色念珠菌共育后加入美蓝染液作活体染色,可观察白细胞对念珠菌的吞噬情况。如白色念珠菌被染成蓝色,表示该菌已被杀死,而活菌对染料排斥。

(2) 葡萄球菌法:此法提高了吞噬系统中细菌/细胞比例,使达100:1,从而缩短了吞噬反应的时间。通过计算吞噬初速度来反映吞噬细胞的吞噬活性。

(3) 溶菌法:中性粒细胞在调理素参与下与细菌共育,然后定期取出,于蒸馏水中溶解后培养,计算菌落数,即可判定中性粒细胞的杀菌功能。