



卫生部“十一五”规划教材

全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等学校医学成人学历教育(专科)配套教材

供药学专业用

微生物学与免疫学 实验指导

主 编 李朝品



人民卫生出版社

卫生部“十一五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材
全国高等学校医学成人学历教育(专科)配套教材
供药学专业用

微生物学与免疫学 实验指导

主 编 李朝品

副主编 赵金红

编 者 (以姓氏笔画为序)

田 晔	安徽理工大学医学院	李朝品	安徽理工大学医学院
刘继鑫	齐齐哈尔医学院	陈 琳	安徽理工大学医学院
吕跃山	哈尔滨医科大学	陈 曦	北华大学医学院
许礼发	安徽理工大学医学院	赵金红	皖南医学院
张荣波	安徽理工大学医学院	曹志然	河北大学医学部

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学与免疫学实验指导 / 李朝品主编. —北京:
人民卫生出版社, 2007.10

ISBN 978 - 7 - 117 - 09280 - 7

I. 微… II. 李… III. ①医药学:微生物学 - 实验 - 医学院校 - 教材②医药学:免疫学 - 实验 - 医学院校 - 教材 IV. R37 - 33 R392 - 33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第148390号

微生物学与免疫学实验指导

主 编: 李朝品

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园3区3号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010 - 67605754 010-65264830

印 刷: 三河市宏达印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 9.75 插页: 2

字 数: 221千字

版 次: 2007年10月第1版 2007年10月第1版第1次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-09280-7/R · 9281

定 价: 17.00元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010 - 87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

前 言

微生物学与免疫学是医药类各专业学生必须学习的一门重要专业基础课程，微生物学与免疫学实验技术对于疾病的诊断、治疗以及预防等具有重要作用。随着现代科学技术的发展，微生物学和免疫学检验逐渐走向自动化，但是微生物学和免疫学的基本实验技术仍不可忽略。全面掌握实验技术有利于提高医药工作者工作效率，开发新的检测方法、医疗仪器以及治疗方案，另外药物开发中微生物学和免疫学实验更是重要和有效的研究手段。

为适应我国高等医药教育改革和发展的需要，根据新形势下成人高等教育发展的现实需求，我们于2006年底启动了旨在提供给成人专科药学专业使用的微生物学与免疫学教材，为了配合其实验教学，我们又编写了这本实验指导。全书共分为免疫学实验和微生物学实验两篇，免疫学部分介绍了基于固有免疫功能检测的实验、抗原抗体反应的检测实验、有关细胞免疫功能检测的实验以及细胞因子的检测；微生物学部分介绍了细菌形态检测法、细菌培养法、外界因素对细菌的影响、病原性球菌的微生物学检测、肠道杆菌的分离与鉴定、其他细菌的微生物学检测、真菌的常规检验法和病毒的检查方法等。每个实验包括实验相关理论、实验原理、实验器材、实验方法、实验结果和注意事项，部分实验之后附有思考题，以求让学生全面理解和掌握实验技术。附录中介绍了微生物学和免疫学中常用的试剂及其配制方法，以满足实验准备阶段的选择和配制需要。另外全书最后还附有部分彩图，以供实验者在实验观察中做对照。

本书除作为药学专业专科层次成人教育教材使用外，也可兼为其他医药学相关专业相应教育层次使用。我们通过本书能够达到很好的辅助微生物学与免疫学实验教学，使学生同时具备较扎实的理论基础和实验技能，培养学生严谨的工作作风以及发现问题和解决问题的能力，为将来走向实际工作打下良好基础。

本书能如期付印得益于各位编委们的通力合作及相关学校的大力支持，在此谨向对本书给予大力支持的同志致以衷心感谢！由于编写时间仓促，编者水平有限，书中若出现不妥、疏漏之处，敬请读者批评指正，以便在今后的修订中逐渐完善。

李朝品

2007年8月

目 录

微生物学与免疫学实验室规则·····	1
--------------------	---

第一篇 免疫学实验

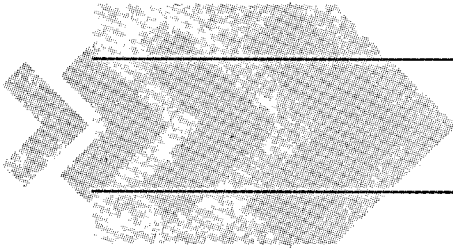
第一章 基于固有免疫功能检测的实验·····	3
第二章 基于抗原抗体反应的检测实验·····	9
第三章 有关细胞免疫功能检测的实验·····	36
第四章 细胞因子的检测·····	50

第二篇 微生物学实验

第五章 细菌形态检测法·····	55
第六章 细菌培养法·····	62
第七章 外界因素对细菌的影响·····	72
第八章 病原性球菌的微生物学检测·····	79
第九章 肠道杆菌的分离与鉴定·····	97
第十章 其他细菌的微生物学检测·····	106
第十一章 真菌的常规检验法·····	127
第十二章 病毒的检查方法·····	132

附 录

附录一 微生物学与免疫学实验常用试剂的配制·····	141
附录二 彩图·····	151



微生物学与免疫学实验室 规则

微生物学与免疫学实验课的目的是使学生加深和巩固对理论课内容的理解和体会,是印证理论、训练学生基本技能和培养学生科学研究能力的重要方式。通过实验可以了解和熟悉微生物学与免疫学中最基本和最常用的实验方法的原理和具体的操作技术,为今后临床实践和科研工作打下良好基础。在实验过程中,有可能接触到某些病原微生物,因此在实验过程中应牢固建立“无菌观念”,为提高实验课的效果,同时为保障实验操作者的安全,避免病原微生物的实验室传染,在实验室进行微生物学与免疫学实验必须遵守以下实验室规则:

1. 进入实验室必须穿白工作衣,离开实验室时脱下,反折带走。
2. 尽量不带个人生活、学习用品,书包、衣物等进入实验室,必要的用具带入后,应放在远离操作部位的指定位置。
3. 实验室内严禁吃东西、饮水,严禁吸烟。
4. 实验室内应保持安静,不得高声谈笑,随便走动,以免影响他人的实验。
5. 实验室内应保持整洁、有秩序,不得拆卸仪器、搬弄标本,严禁用嘴吸移液及润湿标签,尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。被污染过需要回收的吸管、滴管、试管、玻片等物用完后应立即投入已准备的消毒液中,不得放在桌面上或水槽内。
6. 实验中应注意节约试剂材料,爱护公物,不得将实验室任何物品私自带走。如遇仪器、用品损坏,应报告指导教师并按规定予以赔偿。
7. 如遇不慎而打破菌种管或使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应立即报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。
8. 实验完毕,整理桌面,值日生打扫室内卫生,最后离开的同学应注意关好水电、门窗,洗手后离室。

(李朝品)



第一篇 免疫学实验

第一章

基于固有免疫功能检测的实验

实验一 吞噬细胞的吞噬试验

一、中性粒细胞吞噬功能试验

【实验原理】

外周血液中的中性粒细胞即小吞噬细胞,通过趋化、调理、吞入和杀菌等几个步骤,能吞噬和消化衰老、死亡细胞及病原微生物等异物,是机体非特异性免疫的重要组成部分,称为小吞噬现象。本试验取人外周血在体外与葡萄球菌混合,孵育一段时间后取出涂片,瑞氏染色,观察并计算中性粒细胞的吞噬百分率和吞噬指数,可反映机体的非特异性免疫功能。

【实验材料】

1. 标本 抗凝人血(3.8%枸橼酸钠一滴加于无菌小试管中)。
2. 试剂 葡萄球菌 18h 孵育的斜面或肉汤培养物、瑞氏染液、双蒸水和香柏油。
3. 器材 试管、玻片、采血针、酒精棉球、吸管、滴管、显微镜。

【实验方法】

1. 取小试管一支,用滴管加入一滴 3.8% 枸橼酸钠溶液。
2. 用酒精棉球消毒手指和采血针,从消毒部位取 2~3 滴血加入小试管中。
取一滴菌液加入小试管中,用吸管混匀。置 37℃ 水浴箱水浴 15min,中途混匀一次。
3. 取出小试管,用吸管将试管中血液打匀后取血半滴于载玻片上,用另一载玻片推成薄血片。
4. 待血片自干后,用瑞氏染液染色。瑞氏染色法方法为:取瑞氏染液数滴滴于上述血片上先染 1min,然后加等量蒸馏水,轻轻晃动混匀,继续染 5min,水洗,用吸水纸吸

干后镜检。

【实验结果】

1. 油镜检查 寻找中性粒细胞,如果染色结果正确,可见细胞核及被吞噬的细菌染成紫色,而粒细胞的细胞浆则为淡红色。

见下图 1-1。

2. 计数

(1) 吞噬百分率:观察 100 个中性粒细胞,计算其中吞噬有细菌的中性粒细胞数,计算出吞噬细胞百分率。

(2) 吞噬指数:观察 100 个中性粒细胞,计算其中被吞噬的细菌总数,平均每个中性粒细胞吞噬的细菌数即为吞噬指数。

$$\text{吞噬指数} = \frac{\text{被吞噬细菌总数}}{\text{计数吞噬细胞总数}}$$

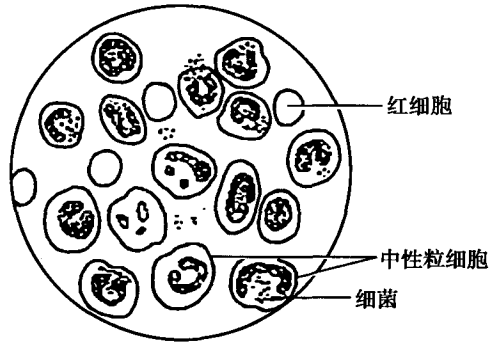


图 1-1 中性粒细胞吞噬试验

二、单核巨噬细胞吞噬功能试验

【实验原理】

巨噬细胞具有很强的吞噬功能,可非特异性吞噬大颗粒异物(如白色假丝酵母菌、鸡红细胞或葡萄球菌等),称为大吞噬现象。本试验将鸡红细胞注入小鼠腹腔中,腹腔巨噬细胞可吞噬和消化鸡红细胞,一段时间后取巨噬细胞观察吞噬现象并根据颗粒物质被巨噬细胞吞噬的多少,计算吞噬百分率和吞噬指数,以反映巨噬细胞的吞噬功能。

【实验材料】

1. 试验对象 小鼠 1~2 只。
2. 试剂 1% 鸡红细胞(CRBC)悬液(取肝素抗凝鸡血 1ml 与生理盐水 99ml 混匀)、6% 可溶性淀粉肉汤(肉汤培养基 100ml 加入可溶性淀粉 6g,经煮沸灭菌)。
3. 器材 瑞氏染液、注射器、试管、吸管、剪刀、镊子等。

【实验方法】

1. 试验前 3 天,于小鼠腹腔内注射可溶性淀粉肉汤 1ml。
2. 试验当天再于小鼠腹腔内注射 1% 鸡红细胞(CRBC)悬液 1ml。
3. 注射后 30 分钟,处死小鼠,取腹腔液涂片,冷风吹干后瑞氏染色,油镜下观察,绘图记录。

【实验结果】

鸡红细胞是有细胞核的,镜下巨噬细胞的细胞核和鸡红细胞的细胞核均染成蓝色,巨噬细胞的胞浆呈浅红色,记数 100 个巨噬细胞,按下列公式计算吞噬百分率和吞噬指数。

$$\text{吞噬百分率} = (\text{吞噬 CRBC 的细胞数} / 100 \text{ 个巨噬细胞数}) \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = 100 \text{ 个巨噬细胞吞噬 CRBC 的总数} / 100 \text{ 个巨噬细胞数}$$

参考值:吞噬百分率 62.70% ~ 71.38%,吞噬指数 1.058 ± 0.049。

在计数的同时,可观察 CRBC 的消化程度,以判断巨噬细胞的杀伤功能。红细胞按消化程度可分为 4 级。I 级:未消化,胞质浅红或浅黄带绿色,胞核浅紫红色;II 级:轻度消化,胞质浅黄绿色,核固缩染成蓝色;III 级:重度消化,胞质淡染,胞核成浅灰黄色;IV 级:完全消化,只见形状类似 CRBC 的空泡,胞核隐约可见。

【注意事项】

1. 小鼠处死后立即注入生理盐水 2ml,轻柔腹部,可获得较多的巨噬细胞。
2. 腹腔注射鸡红细胞后收集巨噬细胞的时间过短则吞噬的鸡红细胞较少,时间过长则鸡红细胞易被消化。

【临床意义】

小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定的方法较为简便、易于操作、重复性好,但不能直接应用于临床。

【思考题】

1. 简述巨噬细胞吞噬功能测定的原理和常用于人巨噬细胞吞噬功能测定的方法。
2. 试述巨噬细胞吞噬和杀菌机制。

实验二 正常血清的杀菌作用——溶菌酶的测定

【实验原理】

溶菌酶是一种碱性蛋白,主要来源于吞噬细胞,广泛分布于血清、泪液、唾液等分泌物中,能溶解革兰阳性菌细胞壁中的乙酰氨基多糖成分,使细菌失去细胞壁,发生渗透性溶解而破裂死亡。

将死菌混入琼脂后,打孔,加入含溶菌酶的被检物,可溶解细菌形成溶菌环,溶菌环的大小与溶菌酶含量呈一定关系,从标准曲线上可以查出被检物中溶菌酶的含量。

【实验材料】

1. 试剂

(1) 1/15mol/L 等渗缓冲液 PBS:

A 液:磷酸二氢钾 9.07g,氯化钠 5.0g,溶于 1000ml 蒸馏水中。

B 液:磷酸氢二钠 23.87g,氯化钠 5.0g,溶于 1000ml 蒸馏水中。

将 A 液和 B 液以 10:3 比例混合,调 pH 6.4 而成。

(2) 加热杀死的微球菌培养物 50~100mg/ml:常规法接种微球菌于琼脂营养斜面培养基,37℃ 培养 24~48h,即可长出黄色菌落。用少量 pH6.4 等渗缓冲液将菌落洗下,加热 70~80℃ 60 分钟,灭菌,过滤。上清液于分光光度计(波长 600nm),以缓冲液调零,调节菌液浓度为 0.4 光密度,冰箱保存。

(3) 溶菌酶标准液:称取干燥溶菌酶 2mg,用 pH 6.4 等渗缓冲液溶解,完全溶解后起始酶浓度为 1mg/ml,储存液置冰箱保存,备用。

2. 器材 1ml 和 5ml 无菌吸管、10mm × 100mm 小试管、毛细吸管、平皿、打孔器(内径 3mm)、微量加样器、分光光度计、水浴箱和温箱等。

【实验方法】

1. 加热融化 10.0g/L 琼脂,冷却至 60 ~ 70℃ 时,将死微球菌混入(浓度为 0.5 ~ 1mg/ml),立即分装到 9cm 平皿内,每个平皿 5ml,琼脂厚度为 4mm。
2. 琼脂凝固后,打孔,孔径 2mm,间距 15mm,每孔加入 0.025ml 被检物。室温下放置 12 ~ 18 小时,测量溶菌环的直径。
3. 同时将各种浓度的溶菌酶标准液加入小孔内,测量溶菌环的直径,用半对数纸制成标准曲线,从曲线上查出被检物含量。

【实验结果】

参考值:血清 5 ~ 15mg/L,尿 0 ~ 2mg/L。

【注意事项】

测量溶菌环的直径要准确。

【临床意义】

测定溶菌酶含量的变化,可以反应机体的免疫状态,过高或过低都是某些疾病表现;对鉴别白血病类型有重要意义;肾脏疾病时,尿液中溶菌酶含量可增加。

【思考题】

1. 溶菌酶测定试验的原理。
2. 溶菌酶测定试验的临床应用。

实验三 血清补体的测定

【实验原理】

绵羊红细胞(SRBC)作为抗原与其相应的抗体(溶血素)结合后,通过经典途径激活补体,产生膜攻击复合物,使红细胞溶解,当致敏红细胞浓度恒定时,溶血程度与补体的量和活性呈正相关,所以通过检测溶血程度可测得血清补体活性。

补体活性与溶血程度的关系呈“S”形曲线,溶血程度在 30% ~ 70% 的范围内补体的含量稍有变动即能影响溶血程度。当 50% 溶血时,其溶血程度与补体含量的关系最敏感,这是因为在半溶血时补体量的轻微增减即可引起溶血程度的明显变化。所以目前总补体测定多采用 50% 溶血活力(complement hemolysis 50%)测定,简称为 CH50 溶血试验。

【实验材料】

1. 标本 患者或健康人血清。
2. 试剂 SRBC 悬液、兔抗羊溶血素(适当稀释)、补体(新鲜豚鼠血清)、pH7.4 巴比妥缓冲液、生理盐水、高渗(17g/L)盐水。
3. 器材 离心机、37℃ 水浴箱、试管、吸管。

【实验方法】

1. SRBC 的制备 将脱纤维 SRBC 生理盐水洗 3 次,每次 2000r/min 10 分钟,取压积红细胞,用巴比妥缓冲液配成 2×10^8 /ml SRBC 悬液。
2. 滴定用补体的准备 取豚鼠 2 ~ 3 只,采心脏血,分离出血清后备用,使用前用生理盐水作 1:40 ~ 1:60 稀释。最好是当日采血,及时使用,否则补体活性会降低。

3. 溶血素滴定 溶血素在使用前应进行效价滴定及适当稀释,滴定的程序和步骤列在表 1-1 中。

表 1-1 溶血素滴定程序表

试管编号	溶血素稀释度	试剂加入(ml/管)				假定结果
		溶血素	豚鼠血清	缓冲液	SRBC 悬液	
1	1:1000	0.1	0.2	0.2	0.1	全溶
2	1:2000	0.1	0.2	0.2	0.1	全溶
3	1:3000	0.1	0.2	0.2	0.1	全溶
4	1:4000	0.1	0.2	0.2	0.1	全溶
5	1:5000	0.1	0.2	0.2	0.1	半溶
6	1:6000	0.1	0.2	0.2	0.1	微溶
7	1:8000	0.1	0.2	0.2	0.1	不溶
8	1:10000	0.1	0.2	0.2	0.1	不溶
9	(对照)	—	—	0.5	0.1	不溶

以完全溶血的溶血素最高稀释倍数作为该溶血素的效价,表示为每 1ml 血清含有溶血素的单位(U/ml)。表中所示的溶血素效价为 1:4000,也就是每 1ml 血清含有溶血素 4000 单位(4000U/ml)。在 CH50 和补体结合试验时常采用 2U/ml 的溶血素浓度,故将该溶血素作 1:2000 稀释即可应用。

4. 50% 溶血标准管的制备 取 2×10^8 /ml SRBC 悬液 0.5ml,加蒸馏水 2.0ml,混匀使 SRBC 全部溶解;加入 2.0ml 高渗盐水校正为等渗溶液;最后加 2×10^8 /ml SRBC 悬液 0.5ml,即成为 50% 溶血状态的细胞悬液。取此悬液 2.5ml,随试验管一起温育,即为 50% 溶血标准管。

5. 补体溶血试验 取受检血清 0.15ml,加 pH7.4 巴比妥缓冲液 2.85ml,使血清成 1:20 稀释,然后按表 1-2 所示操作。

表 1-2 CH50 操作程序表(单位 ml)

试管编号	1:20 稀释血清	巴比妥缓冲液	2U/ml 溶血素	SRBC 悬液	CH50 相应总补体值
1	0.10	1.40	0.5	0.5	200
2	0.15	1.35	0.5	0.5	133
3	0.20	1.30	0.5	0.5	100
4	0.25	1.25	0.5	0.5	80
5	0.30	1.20	0.5	0.5	66
6	0.35	1.15	0.5	0.5	57
7	0.40	1.10	0.5	0.5	50
8	0.45	1.05	0.5	0.5	44

续表

试管编号	1:20 稀释血清	巴比妥缓冲液	2U/ml 溶血素	SRBC 悬液	CH50 相应总补体值
9	0.50	1.00	0.5	0.5	40
10	0.60	0.90	0.5	0.5	32
11	—	1.50	0.5	0.5	—

将各管混匀,放 37℃ 水浴 30min 后,取出观察结果。

【实验结果】

检测结果可以用目测法,也可以用比色法,使用后者时最好先行 2500r/min 离心 5min,将各不同稀释度的试验管与 50% 溶血标准管比较,以溶血状态(或吸光度)最接近标准管者为终点管,血清的总补体活性按下式计算:

$$1/\text{血清用量} \times \text{稀释倍数} = \text{血清总补体活性(U/ml)}$$

正常值:50 ~ 100U/ml。

【注意事项】

1. 本方法简便、快速,但是敏感度较低。
2. 补体性质不稳,容易失活,所以试验结果易受许多因素的影响,应严格控制试验条件和注意试验操作。
3. 受检血清必须新鲜,室温放置 2 小时以上可使补体活性下降。
4. 实验器材必须洁净,残留的清洁剂或酸碱等物质均可使补体受破坏。
5. 致敏 SRBC 吸附溶血素的量直接影响溶血程度,所以必须准确滴定溶血素效价,并注意加入 SRBC 的量要恒定。
6. pH 变化、钙和镁离子的增加、反应总容积的增加等均可使补体溶血活性下降。

【临床意义】

临床多用于补体系统缺陷病、某些自身免疫病、变态反应性疾病及传染性疾病的诊断。

血清补体活性增高常见于急性炎症或感染、妊娠、肝脏疾病、肿瘤、糖尿病、急性心肌梗死、外科手术后、溃疡性结肠炎、风湿和类风湿等;血清补体活性降低常见于遗传性血管神经性水肿、免疫复合物病(如急性肾炎、SLE 活动期、冷球蛋白血症等)、代谢缺陷(如严重肝脏疾病、膜增生性肾炎等)及营养不良等。

【思考题】

1. 为何采用 50% 溶血作为结果判定标准?
2. 如何计算血清补体活性?
3. 进行本试验时应注意哪些事项?

(李朝品)

第二章

基于抗原抗体反应的检测实验

实验一 凝集反应(直接凝集、间接凝集)

一、直接凝集反应

(一) 玻片直接凝集试验

细菌玻片直接凝集试验

【实验原理】

已知抗体与相应颗粒性抗原(如细菌、立克次体、钩端螺旋体、红细胞等)混合,在有适当电解质存在的条件下,如两者对应便发生特异性结合而形成肉眼可见的凝集物,即为阳性;如两者不是对应的就无凝集物出现,即为阴性。该试验属定性试验,常用于细菌的菌种鉴定、分型和检查人红细胞 ABO 血型。

【实验材料】

1. 标本 伤寒杆菌、痢疾杆菌斜面培养物。
2. 试剂 1:40 稀释的伤寒杆菌诊断血清和生理盐水。
3. 器材 洁净载玻片、接种环、酒精灯、记号笔、吸管。

【实验方法】

1. 取洁净载玻片 2 张,各用记号笔画为二等份,在玻片的左上角标明 1、2。如图 2-1 所示。

1 生理盐水 +伤寒杆菌	1:40伤寒杆菌诊断 血清+伤寒杆菌	2 生理盐水 +痢疾杆菌	1:40伤寒杆菌诊断 血清+痢疾杆菌
-----------------	-----------------------	-----------------	-----------------------

图 2-1 细菌玻片直接凝集试验

于上述两玻片的左端用灭菌的接种环各加生理盐水 1~2 环,同样右端各加 1:40 伤寒杆菌诊断血清 1~2 环。

2. 将接种环在酒精灯火焰上烧灼灭菌,冷却后取少许伤寒杆菌培养物,先置于第 1 号玻片左端与生理盐水混匀,再取同种细菌加至第 1 号玻片右端与伤寒杆菌诊断血清混匀,轻轻摇动玻片,1~2min 后观察结果。

3. 同样取痢疾杆菌培养物加于第 2 号玻片两端。观察结果,并与 1 号玻片比较。

【实验结果判定】

本实验可用于伤寒杆菌感染的定性诊断。如果上述混合悬液由均匀混浊变为澄清透明,并出现大小不等的乳白色凝集块者,即为凝集反应阳性(+),如果混合物仍呈均匀混浊状者,则为凝集反应阴性(-)。如肉眼观察不够清楚,可在低倍镜下观察。本次实验结果应为:第 1 号玻片右端出现大小不等的乳白色凝集物,即阳性;第 1 号玻片的左端和第 2 号玻片的左右端无凝集块,即阴性。

【注意事项】

伤寒杆菌为肠道致病菌,实验过程中应严格无菌操作。结果观察后,将玻片放入盛有消毒液的指定容器内,切忌任意存放或冲洗。

人类 ABO 血型鉴定法

【实验原理】

人类 ABO 血型抗原有 A 和 B 两种,A 型血红细胞膜上有 A 抗原,B 型血红细胞膜上有 B 抗原,AB 型血红细胞膜上有 A 和 B 两种抗原,而 O 型血红细胞膜上 A 和 B 两种抗原均无。据此,如分别将抗 A 和抗 B 血清与待测红细胞混合,抗 A 和(或)抗 B 血清与红细胞表面上的相应抗原结合而引起红细胞凝集,根据凝集情况便可判定受试者的血型。

【实验材料】

1. 标本 人末梢血。
2. 试剂 标准抗 A 和抗 B 血清(常于血清内加适当染料以示区别,A 型为红色,B 型为蓝色)、生理盐水。
3. 器材 载玻片、记号笔、小试管、刺血针、75% 酒精棉球、无菌干棉球、毛细吸管、牙签(或小玻棒)、光学显微镜。

【实验方法】

1. 取洁净载玻片一张,用记号笔将其划分成两格,分别于其角上注明“A”、“B”二字。
2. 用酒精棉球消毒被检者的耳垂或手指尖端皮肤,用刺血针刺破皮肤,取 1~2 滴血放入盛有 1ml 的生理盐水的试管中,混匀,使成红细胞悬液(浓度约为 1%)。
3. 将抗 A 标准血清、抗 B 标准血清各一滴分别滴于 A、B 格内。
4. 用毛细滴管吸取待检红细胞悬液,于玻片上的抗 A 和抗 B 标准血清中各加一滴,然后用两支牙签或小玻棒分别搅拌混匀,也可轻轻晃动载玻片以促其充分混匀(注意严防两种血清接触),以加速反应速度。
5. 将玻片放置实验台上静置数分钟,在白色背景下观察结果。若肉眼观察不够清楚,可将玻片置低倍镜下观察。

【实验结果判定】

如果混合液由均匀红色逐渐变为透明,并出现大小不等的红色凝集块者即为红细胞凝集,记为(+);如果混合液仍为均匀混浊状,则表明红细胞未发生凝集,记为(-)。

血型鉴定试验结果及判定见表 2-1。

表 2-1 血型鉴定试验结果判定

血 型	血型诊断血清	
	抗 A	抗 B
A 型	+	-
B 型	-	+
AB 型	+	+
O 型	-	-

注：“+”表示凝集；“-”表示无凝集。

(二) 试管直接凝集试验(肥达反应)

【实验原理】

试管凝集试验是用已知的颗粒性抗原来检测未知抗体及其相对含量。肥达反应(Widal test)就是用已知的伤寒、副伤寒沙门菌的 O 和 H 抗原,检测受检血清中是否有相应抗体的半定量试管内凝集试验。人体感染伤寒或副伤寒沙门菌后,能产生与这些细菌起特异性反应的抗体(凝集素),这种抗体与伤寒或副伤寒沙门菌相混合,在适当电解质参与下出现肉眼可见的凝集现象。本试验是用伤寒杆菌 O 和 H 抗原及甲、乙型副伤寒 H 抗原(以 PA、PB 表示)与不同稀释倍数的患者血清作试管凝集试验。本试验可用于辅助诊断伤寒及副伤寒沙门菌引起的肠热症。

【实验材料】

1. 标本 患者血清(须经 56℃ 30min 灭活)。
2. 试剂 伤寒杆菌 O、H 及甲、乙型副伤寒菌液和生理盐水。
3. 器材 小试管、吸管、水浴箱。

【实验方法】

这里介绍单管稀释法。

1. 准备 28 支小试管,排成 4 排,每排 7 支。
2. 取中号试管 1 支,加生理盐水 3.8ml,用吸管吸取患者血清 0.2ml 加入其中混匀,即为 1:20 稀释血清,总量为 4ml。
3. 吸取 1:20 稀释的血清 2ml,在每排的第一管中各加入 0.5ml(这时中号试管中只剩 1:20 稀释血清 2ml)。
4. 再向上述中号试管中加入 2ml 生理盐水,混匀,即为 1:40 稀释血清,总量为 4ml。然后吸取此稀释度血清 2ml 向每排第二管各加 0.5ml。
5. 依次类推将血清不断作倍比稀释,并依次加入各管,直至每排的第六管为止。
6. 在各排的第 7 管中各加 0.5ml 生理盐水,做阴性对照。
7. 在第一排的各管中加伤寒杆菌 O 菌液 0.5ml;在第二排的各管中加伤寒杆菌 H 菌液 0.5ml;在第三排的各管中加 PA H 菌液 0.5ml;在第四排的各管中加 PB H 菌液 0.5ml。由于各管均加入 0.5ml 菌液,即又被稀释了一倍,所以每排各管中血清的最终稀释度发生了变化。见表 2-2。

表 2-2 肥达反应加样表

	试验管(每管 0.5ml)						对照管
	1号管	2号管	3号管	4号管	5号管	6号管	7号管
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	(NS 0.5ml)
第一排 O 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
第二排 H 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
第三排 PA 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
第四排 PB 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	—

【实验结果判定】

观察时在斜射光线下透视,观察试管中悬液的混浊程度及管底凝块的多少。先观察对照管,再分别观察各试验管的凝集情况,并与对照管相比较。根据混浊程度及管底凝块的多少,以“++++”、“+++”、“++”、“+”符号记录。

++++:上清液完全澄清,细菌凝集块全部沉于管底。

+++ :上清液澄清度达 75%,大部分细菌凝集块沉于管底。

++ :上清液澄清度达 50%,约 50%细菌凝集块沉于管底。

+ :上清液混浊,澄清度仅有 25%,管底仅有部分细菌凝集成块沉于管底。

- :液体均匀混浊,无凝集块。

血清的凝集效价(即滴度)是指能与一定量的抗原发生肉眼可见的明显凝集(即“++”凝集)的血清最高稀释倍数。血清效价代表血清中抗体的含量,血清效价越高,所含抗体的量愈多。一般认为,伤寒沙门菌 O 抗体凝集效价在 1:80 以上,H 抗体在 1:160 以上,甲、乙型副伤寒沙门菌凝集效价在 1:80 以上才有诊断价值。

【临床意义】

1. 首先应考虑当地正常人的凝集效价,凝集效价大于正常效价才有意义。

2. 伤寒病人的 O 凝集素常较 H 凝集素出现为早,存在于血清内的时间较短,而 H 凝集素出现较迟,但效价较高,存在于血清内时间亦较长,可达数年。

3. 因伤寒 H 凝集素在血内保持时间较长,而 O 凝集素较短,所以曾接种过伤寒菌苗者,O 凝集价在诊断上较重要。

4. 曾患过伤寒或曾接种过伤寒菌苗,新近又感染流行性感或布氏菌等疾病时,可产生高度的 H 凝集素及较低的 O 凝集素,这种反应称回忆反应。

5. 确诊为伤寒的患者中,约有 10% 的患者肥达氏反应始终为阴性,故阴性结果不能排除伤寒的诊断。

6. 采血的时间不同,肥达反应的阳性率也不同,发病第一周阳性率为 50%,第二周为 80%,第四周为 90%,恢复期凝集价最高,以后逐渐下降,以至转阴。临床上一般以双份血清(疾病早期和恢复期)的凝集价有 4 倍增高作为新近是否感染该病的指征。而单份血清的凝集价应达 1:160 以上才有诊断参考价值。

【注意事项】

1. 取样和加样应准确,稀释血清时应仔细核对并逐管进行,以防跳管和漏管。