



陕西省高职院校精品规划实验教材

供护理、临床医学、口腔、检验、药学、影像、
中医、预防等专业使用

(第2版)

病原生物与免疫学

实验与学习指导

● 主编 刘 鹏 李晓红



第四军医大学出版社

陕西省高职院校精品规划实验教材

供护理、临床医学、口腔、检验、药学、影像、中医、预防等专业使用

病原生物与免疫学 实验与学习指导

第2版

主 编 刘 鹏 李晓红

编 者 (以姓氏笔画为序)

方 宁(咸阳职业技术学院)

刘 鹏(商洛职业技术学院)

李晓红(汉中职业技术学院)

韩晓云(商洛职业技术学院)

雷 立(商洛职业技术学院)

蔚振江(汉中职业技术学院)

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物与免疫学实验与学习指导/刘鹏, 李晓红主编. —2 版. —西安: 第四军医大学出版社, 2013. 7 (2014. 1 重印)

ISBN 978 - 7 - 5662 - 0371 - 7

I. ①病… II. ①刘… ②李… III. ①病原微生物 - 实验 - 高等职业教育 - 教学参考资料 ②免疫学 - 实验 - 高等职业教育 - 教学参考资料 IV. ①R37 - 33 ②R392 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 157114 号

bingyuanshengwu yu mianyixue shiyan yu xuexi zhidao

病原生物与免疫学实验与学习指导

出版人: 富 明

责任编辑: 张永利

责任校对: 黄 璐

出版发行: 第四军医大学出版社

地址: 西安市长乐西路 17 号 邮编: 710032

电话: 029 - 84776765

传真: 029 - 84776764

网址: <http://press.fmmu.edu.cn>

制版: 绝色设计

印刷: 西安市建明工贸有限责任公司

版次: 2013 年 7 月第 2 版 2014 年 1 月第 5 次印刷

开本: 787 × 1092 1/16 印张: 14.25 字数: 330 千字

书号: ISBN 978 - 7 - 5662 - 0371 - 7/R · 1216

定价: 29.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

前 言

病原生物与免疫学是一门重要的医学基础课,为了更好地适应医学高职高专教育事业的发展,满足教学需要,培养学生的实际动手能力,我们编写了适用于医学高职高专教育的《病原生物与免疫学实验与学习指导》。

本书在编写的过程中首先坚持实用性原则,实验部分根据陕西省内高职高专院校的实际情况,突出增加了一些临床广泛开展的实验项目,去除了一些临床上不常用的实验项目,使之更加实用。习题部分多数为历年执业助理医师资格考试及执业护士资格考试仿真题,有助于学生顺利通过执业资格考试。其次坚持先进性原则,实验部分在1版的基础上增加了一些近几年新开展的实验,使教学内容适应时代需要。再次坚持系统性原则,本教材通过从实验目的、原理、实验用品、步骤、结果、注意事项及临床意义等方面进行全面阐述,有利于学生系统、全面地掌握实验,也有利于培养学生的实际动手能力,为学生步入临床打下坚实的基础。

另外,教材部分章节的重点实验附有朗朗上口的记忆口诀,有利于学生学习过程中加深记忆。

全书分为两篇。上篇为实验指导,包括医学免疫学、病原微生物学和人体寄生虫学实验,其中医学免疫学实验5个,病原微生物学实验8个,人体寄生虫学实验2个。下篇为习题部分,涵盖《病原生物与免疫学》各章复习题。书后有附录,介绍染色液配制、常用细菌培养基的制备、试剂及溶液配制、实验报告等。

本教材适用于高职高专医学类各专业。建议教学时数24课时,各院校可根据实际情况予以取舍。

全书由商洛职业技术学院、汉中职业技术学院与咸阳职业技术学院长期从事理论及实验教学、具有丰富实验教学经验的教师合作编写。在此对各位编者付出的辛勤劳动致以诚挚的谢意!

由于编者水平有限,书中难免有不足之处,恳请专家、同行及广大师生提出宝贵意见。

刘 鹏

2013年4月

目 录

上篇 实验指导

病原生物与免疫学实验目的及要求	(3)
病原生物与免疫学实验室规则	(4)
病原生物与免疫学实验室意外的紧急处理	(5)
第一章 医学免疫学实验	(6)
实验一 免疫器官和细胞形态学观察	(6)
实验二 凝集反应	(11)
实验三 沉淀反应	(14)
实验四 免疫标记技术	(18)
实验五 超敏反应及常用生物制品介绍	(25)
第二章 病原微生物学实验	(28)
实验一 细菌的基本形态和特殊结构观察	(28)
实验二 革兰染色法	(32)
实验三 细菌的分离培养及代谢产物检查	(33)
实验四 细菌的分布与消毒灭菌	(43)
实验五 病原性球菌	(50)
实验六 肠道杆菌	(53)
实验七 分枝杆菌	(56)
实验八 病毒及其他微生物	(57)
第三章 人体寄生虫学实验	(64)
实验一 医学蠕虫	(64)
实验二 医学原虫和医学节肢动物	(72)

下篇 习题部分

第一章 医学免疫学	(83)
第一节 免疫学概论	(83)
第二节 抗原	(84)
第三节 免疫球蛋白与抗体	(86)
第四节 补体系统	(89)
第五节 免疫系统	(91)

上 篇

实 验 指 导

病原生物与免疫学实验目的及要求

病原生物与免疫学实验是病原生物与免疫学的重要组成部分,是病原生物与免疫学教学过程中的重要环节之一,是理论与实验研究的技术基础。通过实验,加深、巩固对理论内容的理解与记忆,学习、掌握有关医学微生物学的基本操作技术,树立无菌观念;更重要的是通过实验培养学生实事求是的科学态度和独立分析问题与解决问题的能力,为对有关疾病的诊断与防治,对医学微生物学的科学研究工作所必要的实验方法与技术打下一定的基础。实验形式分教师示教和学生操作两种,前者主要验证理论,后者可从不同角度进行基本技术训练和反复练习,掌握基本技能。为了提高实验课效果,保证实验课质量,要求学生做到:

1. 实验前必须做好预习,以了解实验的内容、目的、理论依据、操作方法及注意事项,避免或减少错误的发生。
2. 实验过程中坚持严肃性、严格性与严密性,对操作的实验要在全面理解的基础上,按步骤依次进行操作,并进行积极地思考;对示教内容要仔细观察并与有关理论密切联系。
3. 如实记录,分析结果,得出结论。如结果与理论不符,应尽量分析,探讨原因,以培养训练自己的思维能力,最后写出实验报告。

病原生物与免疫学实验室规则

实验是验证理论,对学生进行基本技能训练和培养科学研究能力的手段,为保证实验效果,同时避免病原微生物的实验室内传染,保障实验操作者的安全,特制订如下规则:

一、学生在实验课前,应认真预习所要进行实验的内容,明确实验目的,了解实验原理,熟悉所要使用的仪器、药品的性质及操作程序,如有疑问,应事先请教指导教师。

二、尽量不带个人生活、学习用品入实验室,必须要带的物品如书本、文具应放在远离实验操作的指定位置。

三、进入实验室应穿白大衣,离开时将白大衣脱下并反折叠带走。在实验室内应保持安静,遵守秩序,不得大声喧哗、随便走动或拆卸仪器、搬弄标本。

四、实验室内禁止吸烟、进食及饮水,严禁用嘴吸移液及湿润标签,尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。

五、如遇不慎打破菌种管或使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应及时报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。

六、实验中被污染过的器材、物品及其他盛过有菌物的容器,应用完后立即投入已准备的消毒剂(如来苏尔)中,不可随意扔放。

七、注意观察分析实验结果,独立思考解决实验中所遇到的问题,要严格按操作程序进行实验。

八、要爱护公共财物,节约水电及试剂材料,不得将实验物品私自带出实验室。如遇仪器、用品损坏,应报告指导教师并按规定予以赔偿。

九、实验结束后,应清理实验用品,实验废弃物(包括实验动物尸体)应收入或倒入指定的位置和容器内。每一位同学均应服从卫生值日安排,认真负责地做好清洁卫生。

十、离开实验室前,应用“84”消毒液将双手浸泡 5 ~ 10 分钟,然后用清水洗净。最后离开同学应注意关水、关电、关窗、关门。

病原生物与免疫学实验室意外的紧急处理

1. 皮肤破伤 包括皮肤的破损、针刺和切割伤,应尽可能挤出损伤处的血液,除尽异物,用肥皂和清水冲洗伤口或沾污的皮肤;如果黏膜破损,应用生理盐水(或清水)反复冲洗。伤口应用消毒液(如 75% 酒精、0.2% 次氯酸钠、0.2% ~ 0.5% 过氧乙酸、0.5% 碘伏等)浸泡或涂抹消毒,并包扎伤口。

2. 烧伤 涂以湿润烧伤膏等烧伤治疗剂。

3. 化学药品腐蚀伤 若为强酸,先用大量清水冲洗,再以 5% 碳酸氢钠或 5% 氢氧化钠溶液中和;强碱腐蚀则先以大量清水冲洗后,再以 5% 醋酸或 5% 硼酸洗涤中和。

4. 液体溅入眼睛 立即用生理盐水连续冲洗至少 10 分钟,必须迅速,避免揉擦眼睛。

5. 衣物污染

(1) 尽快脱掉实验服以防止感染物污染皮肤并进一步扩散,洗手并更换实验服。

(2) 将已污染的实验服放入高压灭菌器。

(3) 清理发生污染的地方及放置实验服的地方。

(4) 如果个人衣物被污染,应立即将污染处浸入消毒剂,并更换干净的衣物或一次性衣物。

6. 吸入病原菌菌液 应立即吐入容器内消毒,并用 1:1000 高锰酸钾溶液漱口;可根据菌种不同,服用抗菌药物予以预防。

7. 桌面污染 菌液流洒桌面,应倾倒适量“84”消毒液或 0.1% 新洁尔灭于污染面,让其浸泡半小时后抹去;若手上沾有活菌,亦应浸泡于上述消毒液 10 分钟后,再以肥皂及水洗刷。

8. 地面污染 被溅的地面用经消毒剂浸泡的吸水物质覆盖,消毒剂起作用 10 ~ 15 分钟后,用消毒剂冲洗清理该地方,并以可行的方法移走吸水性物质。

9. 严防火灾 如发生火灾应沉着处理,切勿慌张,应立即关闭电源。如系酒精、二甲苯、乙醚等起火,切忌用水,应迅速用沾水的布类或沙土覆盖扑火。

10. 感染动物逃跑 应立即抓回,并对污染区进行处理。

(刘 鹏)

第一章 医学免疫学实验

实验一 免疫器官和细胞形态学观察

免疫器官(immune organ)按其发生和功能不同,分为中枢免疫器官和外周免疫器官。中枢免疫器官包括胸腺和骨髓,是免疫细胞发生、分化和成熟的场所。外周免疫器官包括淋巴结、脾和黏膜相关淋巴组织等,是成熟淋巴细胞(T细胞、B细胞)定居、增殖及接受抗原刺激发生适应性免疫应答的部位。免疫细胞(immune cell)包括淋巴细胞、单核-巨噬细胞、树突状细胞、粒细胞、肥大细胞等。其中T细胞和B细胞被称为免疫活性细胞。本实验重点介绍免疫器官的观察、吞噬细胞的吞噬现象观察、E花环形成试验、淋巴细胞转化试验。

实验目的 ①学会观察吞噬细胞的吞噬现象。②学会观察E花环形成试验结果;熟悉E花环形成试验的步骤及临床意义;了解E花环形成试验的原理。③学会观察淋巴细胞转化试验结果;熟悉淋巴细胞转化试验的步骤及临床意义;了解淋巴细胞转化试验的原理。④了解小鼠胸腺及脾脏的位置及形态。

实验内容 ①免疫器官的观察(小鼠免疫器官的解剖学观察)。②吞噬细胞的吞噬现象观察。③E花环形成试验。④淋巴细胞转化试验。

一、免疫器官的观察

【实验原理】

小鼠是啮齿目中体形较小的动物,淋巴系统很发达,包括胸腺、脾脏、淋巴管、外周淋巴结及肠道派氏集合淋巴结。小鼠的胸腺和脾是研究T细胞和B细胞特性与功能最主要的材料来源。观察其组织结构、细胞数目及活性等,可进一步了解该机体的免疫状况。本实验通过解剖小鼠,观察胸腺、脾脏等免疫器官的形态和位置。

【实验用品】

1. 昆明种小白鼠。
2. 浓度3%来苏尔水溶液。
3. 眼科镊,眼科剪,小鼠解剖台等。

【实验方法】

1. 小鼠脱臼处死,投入盛有3%来苏尔水的缸内,浸泡5分钟。取出小鼠,仰卧位置于小鼠解剖台上,使动物腹部朝上。
2. 以镊子提起耻骨处皮肤,用剪刀沿正中线直剪开至下颌部,然后钝性分离皮

肤,再把皮肤向四肢剪开。

3. 注意观察腹壁,用剪刀沿正中中线自阴部至膈肌为止剪开,观察脾脏的位置及大小。观察后将脾脏完整取出,剪去脂肪及筋膜组织,吸干,称重,按下列公式计算脾脏指数:脾脏指数(spleen index, SI) = 脾脏重量(mg) / 小鼠个体重量(g)。

4. 切开膈肌,剪断胸骨及两侧肋软骨,翻起胸骨,观察胸腺,胸腺位于小鼠胸骨后,心脏前上方,内有许多大淋巴细胞(即前胸腺细胞)及特定的上皮网状细胞(分泌胸腺激素)。观察后将胸腺完整取出,吸干,称重,按下列公式计算胸腺指数:胸腺指数(thymus index, TI) = 胸腺重量(mg) / 小鼠个体重量(g)。

5. 解剖结束后,按实验室要求处理动物。

【注意事项】

1. 操作应轻柔仔细,剥离胸腺时要特别小心,以保证两叶完整性。
2. 计算胸腺及脾脏指数时,尽量将胸腺及脾脏完整取出,并去掉其他组织,以利于准确计算。

【临床意义】

胸腺和脾脏指数是每 10g 体重脏器的重量(mg),其高低取决于其中淋巴细胞增殖的程度,可初步估计免疫功能的强弱,对于判断免疫功能的强弱具有一定的临床意义。

二、吞噬细胞的吞噬现象观察

【实验原理】

体内具有吞噬功能的细胞群按其形态的大小分为两类:一类为大吞噬细胞,即组织中的巨噬细胞和血液中的单核细胞。它们对异物有吞噬和消化的功能,在机体非特异性免疫、特异性免疫和免疫调节中具有重要的作用,因此,通过测定吞噬细胞的吞噬作用可判断机体的免疫力。另一类为小吞噬细胞,即血液中的中性粒细胞。中性粒细胞的功能包括黏附、移动、吞噬、杀菌等,是机体天然免疫力的重要组成部分。

【实验用品】

1. 中性粒细胞吞噬葡萄球菌标本片。
2. 巨噬细胞吞噬鸡红细胞标本片。
3. 其他 香柏油、显微镜、擦镜纸、二甲苯。

【实验方法】

1. 中性粒细胞吞噬葡萄球菌镜下观察 油镜下寻找中性粒细胞,观察胞浆中有无吞噬的细菌。镜下可见染成紫色的细胞核及被吞噬的细菌,细胞质则为淡红色。

2. 巨噬细胞吞噬鸡红细胞镜下观察 在油镜下,鸡红细胞为淡红色、椭圆形、有核的细胞。而体积较大圆形或不规则的细胞,其表面有许多似毛刺状的小突起(伪足),细胞质中有数量不等的蓝色颗粒(为吞入的含台盘蓝淀粉形成的吞噬泡)即为巨噬细胞。可见有的鸡红细胞(一至多个)紧贴附于巨噬细胞的表面;有的巨噬细胞

已将一至数个红细胞部分吞入;有的巨噬细胞已吞入1个或数个红细胞在胞质中刚刚形成椭圆形的吞噬泡。

【结果判定】

1. 中性粒细胞吞噬百分率 即100个中性粒细胞中吞噬有细菌的细胞数。中性粒细胞吞噬指数 = 100个中性粒细胞中所吞噬的细菌总数/100。

2. 巨噬细胞吞噬百分率 即100个巨噬细胞中吞噬有鸡红细胞的细胞数,吞噬百分率正常值为60%左右。巨噬细胞吞噬指数 = 100个巨噬细胞中所吞噬的鸡红细胞总数/100。

【注意事项】

镜下鸡红细胞呈橄榄球形,有清楚的细胞核,亦呈橄榄球形,染色后清晰可见,注意与小白鼠的红细胞相区别。

【临床意义】

1. 吞噬百分率及吞噬指数对于临床诊断一些恶性肿瘤及免疫缺陷病有一定价值。
2. 可作为肿瘤放疗、化疗、免疫治疗疗效观察的参考指标。
3. 吞噬指数的动态观测对于判断肿瘤复发转移有一定价值。

三、E花环形成试验

【实验原理】

正常人的T淋巴细胞表面具有能与绵羊红细胞(SRBC)表面糖肽相结合的受体(E受体),即CD2分子。是T细胞特有的表面标志。在体外一定条件下,T细胞能直接与SRBC结合,形成玫瑰花样细胞团,形如花瓣,故称E花环形成试验(erythrocyte rosette test)。根据此原理设计的E花环形成试验,主要用于了解机体细胞免疫功能。广泛应用于肿瘤免疫、移植免疫及免疫性疾病的研究,为某些疾病诊断和防治提供免疫学方面的重要参考。

【实验用品】

1. 肝素抗凝血2ml。
2. 聚蔗糖-泛影葡胺分层液。
3. pH7.2~7.4 Hanks液。
4. 瑞氏染色液。
5. 0.8%戊二醛溶液(用Hanks液将戊二醛配成0.8%,然后用1mol/L NaOH将pH调至7.2~7.4)。
6. 吸收灭活的小牛血清(小牛血清经56℃ 30分钟灭活后,取1体积压积SRBC,加2体积灭活小牛血清,混匀后置37℃ 30分钟,离心沉淀红细胞,吸取上清,放4℃冰箱保存备用)。
7. 1% SRBC悬液(无菌脱纤维的绵羊静脉血100ml加Alsever保存液50ml,置

4℃冰箱保存,一般不宜超过2周。用前以 Hanks 液洗3次,1500r/min 10分钟,弃上清,将压积红细胞用 Hanks 液配成1% SRBC 悬液,细胞浓度约为 $8 \times 10^7/\text{ml}$ 。

【实验方法】

1. 在试管中先加入4ml淋巴细胞分层液;取2ml肝素抗凝血,用 Hanks 液等倍稀释后,缓慢沿试管壁加入试管内,使加入的血液与淋巴细胞分层液形成明显界面。

2. 水平离心 2000r/min 20分钟。

3. 用吸管小心吸取中层白色雾状的淋巴细胞层的细胞(图1-1),用 Hanks 液洗三遍。

4. 取单个核细胞悬液0.1ml,加等量血细胞稀释液,混匀,按常规方法计数四大格细胞数。细胞浓度(细胞数/ml) = 四大格细胞数/ $4 \times 10^4 \times$ 稀释倍数。用 Hanks 液配成 $10^7/\text{ml}$ 细胞悬液。

5. 取0.1ml淋巴细胞悬液,加入0.1ml 1% SRBC 及0.05ml灭活小牛血清,混匀。

6. 37℃静置5分钟,500r/min 低速离心5分钟后,放入冰箱,2小时或过夜。

7. 取出试管,吸弃上清液,加0.8%戊二醛溶液1滴,轻轻旋转混匀,置4℃冰箱固定15分钟。

8. 取出后,轻轻旋转试管,使沉淀细胞重新悬浮;取1滴涂片,自然干燥后,瑞氏染色,高倍下观察。

【结果判断】

凡能结合3个SRBC者即为E花环阳性细胞。计数200个淋巴细胞,算出花环形成细胞百分率。

【注意事项】

1. SRBC 最好是新鲜的,一般采血后保存在 Alsever 保存液中,2周内可以用,超过2周SRBC与淋巴细胞的结合能力下降。

2. 从采血到测定,不得超过4小时,若用分离的淋巴细胞,放置时间也不得超过4小时,否则SRBC受体会自行脱落。

3. 计数前应将沉于管底的细胞予以重悬,但只宜轻缓旋转试管,使细胞团块松开即可,不能过猛或强力吹打,否则花环会消失或减少。

4. 要求全部试验在室温(16℃~23℃)中进行。

【临床意义】

1. 可用于先天性细胞免疫缺陷病的检测。

2. 可用于肿瘤患者疗效观察及预后判断。

3. 可用于评价迟发型超敏反应、某些感染和组织器官移植,了解机体细胞免疫状态。

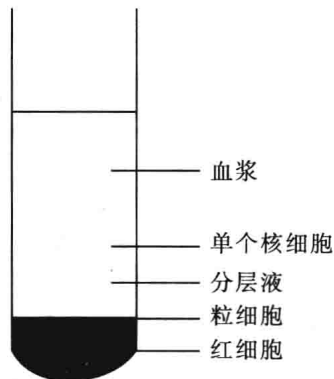


图1-1 离心法分离单个核细胞示意图

四、淋巴细胞转化试验

【实验原理】

体外培养的淋巴细胞在植物血凝素(PHA)、刀蛋白 A(ConA)等非特异性有丝分裂原的刺激下,可转化为淋巴母细胞,称为淋巴细胞转化试验(lymphocyte transformation test)。PHA 是最常用的物质,根据 PHA 刺激 T 细胞分裂的程度,可以间接估计 T 细胞识别特异性抗原的增殖反应程度,从而反映人体细胞免疫水平。

【实验用品】

- 1. PHA 溶液(50 ~ 200μg/ml)、1640 完全培养液。
- 2. 离心机、CO₂ 培养箱、显微镜等。

【实验方法】

- 1. 采用全血微量法时,取肝素抗凝血 0.2ml,注入含 0.2ml PHA 的 3ml 1640 完全培养液中。若采用淋巴细胞分离法,则使每管培养的淋巴细胞数为 3 × 10⁶/ml 的细胞悬液。同时设正常对照。
- 2. 转化培养。37℃ 培养 72 小时,每天摇匀 1 次。
- 3. 将细胞悬液经离心后,取沉淀细胞制成推片。姬姆萨染色,油镜观察计数。

【结果判断】

根据细胞大小、核和胞浆特征等进行判别。常见的细胞类型有:淋巴母细胞(转化型)、成熟淋巴细胞(未转化型)、过渡型淋巴细胞(表 1 - 1)。

表 1 - 1 淋巴细胞转化前后形态特征比较

项目	未转化型	转化型	过渡型
大小(μm)	7 ~ 10	20 ~ 35	12 ~ 16
核与胞浆比例	大	小	稍大
核位置	几乎占全部胞浆	中央或稍偏	偏一侧
核仁	少或无	一个或数个	有或无
染色体	致密	疏松有分裂象	疏松
核周围透明区	不明显	明显	有
胞浆内空泡	不明显	明显	有或无
胞浆或碱性	不明显	明显	有

计数时,上述 3 种均可作为转化细胞。一般计数 200 个淋巴细胞,转化率按公式计算:

转化率 = $\frac{\text{转化的淋巴细胞数}}{\text{转化的淋巴细胞数} + \text{未转化的淋巴细胞数}} \times 100\%$

淋巴细胞转化率正常值为 60% ~ 80% ,50% 以下为降低。

【注意事项】

1. 本实验要求严格无菌操作,否则会影响实验结果。
2. PHA 的加入量要适当,过多或过少都会影响转化率。一般需根据不同的厂家、批号及实践经验定量。

【临床意义】

1. 淋巴细胞转化试验是检测细胞免疫功能的常用方法之一,细胞免疫缺陷或功能低下者,其转化率均低于正常人。
2. 估计疾病的疗效和预后 恶性肿瘤或慢性白色念珠菌病,经转移因子或免疫增强剂治疗后,其转化率可由治疗前的低值转变为正常,反之则预后不良。

思考题

1. E 花环形成试验的原理是什么?
2. E 花环形成试验的临床意义是什么?
3. 淋巴细胞转化试验的原理是什么?
4. 镜下鉴别淋巴母细胞、过渡型淋巴细胞及淋巴细胞的要点是什么?

(刘 鹏)

实验二 凝集反应

凝集反应(agglutination reactions)是细菌、细胞等颗粒性抗原或表面包被抗原的颗粒性物质与相应的抗体在电解质存在的条件下结合,出现肉眼可见的凝集团块,称为凝集反应。凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应。由于凝集反应具有灵敏度高、操作简单等特点,是免疫学检验常用技术之一。常用于细菌的鉴定、抗原的检测、抗体的检测和疾病诊断。本实验重点介绍临床常用的直接凝集反应和间接凝集反应。

实验目的 ①掌握玻片法直接凝集反应的原理、操作方法及临床意义。②掌握类风湿因子检测的原理、操作方法、注意事项及临床意义。

实验内容 ①直接凝集反应(细菌鉴定、肥达反应)。②间接凝集反应(类风湿因子检测)。

一、直接凝集反应

直接凝集反应(direct agglutination reactions)是颗粒性抗原与相应抗体直接结合,形成肉眼可见的凝集团块,称为直接凝集反应。直接凝集反应可以分为玻片法和试管法。玻片法为定性试验,具有操作简单、快速,常用于菌种鉴定和 ABO 血型鉴定等。

试管法为半定量试验,常用于检测抗体的效价。例如临床诊断伤寒及副伤寒所用的肥达反应(widal test)。

(一)玻片法直接凝集反应(细菌鉴定)

【实验原理】

玻片凝集反应(slide agglutination reactions)是将已知的抗体直接与未知的颗粒性抗原物质(如细菌、立克次体、钩端螺旋体等)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;如两者不对应便无凝集物出现,即为阴性。此法属定性试验,主要用于检测抗原,如ABO血型鉴定、细菌鉴定和分型等。本实验主要介绍应用玻片法凝集反应鉴定菌种。

【实验用品】

1. 伤寒沙门菌诊断血清(有商品供应)。
2. 伤寒沙门菌菌种、大肠埃希菌菌种。
3. 生理盐水、载玻片、吸管、接种环、酒精灯等。

【实验方法】

1. 取载玻片一张(平置实验台上),用特种铅笔或记号笔划分为3格,并标明1、2、3。
2. 取巴氏吸管一支,套上乳胶皮头后,吸取1:10稀释的伤寒杆菌诊断血清1~2滴于第1、2格内,另取巴氏吸管一支,吸取生理盐水1~2滴于第3格内。
3. 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与第1、3格内的诊断血清、生理盐水混合并涂抹成均匀悬液。然后用同样方法取少许大肠杆菌培养物与第2格内的诊断血清混合并涂抹成均匀悬液。静置数分钟后观察结果。

【结果判定】

如上述混合悬液由均匀混浊状变为澄清透明,并出现大小不等的乳白色凝集块者即为阳性(+);如混合物仍呈均匀混浊状则为阴性(-)。如肉眼观察不够清楚,可将玻片置于显微镜下用低倍镜观察(图1-2)。

【注意事项】

1. 伤寒沙门菌为肠道致病菌,在实验中务必严格无菌操作,遵守实验规则,用后的载玻片应立即投入指定的容器中,接种环必须做灭菌处理。
2. 取细菌培养物时,不宜过多,与抗血清混合涂抹时,必须将细菌涂散,涂均匀,但不宜涂得太宽,以免很快干涸而影响结果观察。

【临床意义】

可用于伤寒沙门菌感染的定性诊断。

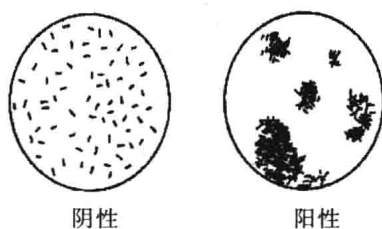


图1-2 玻片凝集反应示意图