

感染性疾病的微生物学检查

袁杰 李红橙 李蓉 主编



湖北科学技术出版社

感染性疾病的微生物学检查

袁 杰 李红橙 李 蓉 主编

湖北科学技术出版社

《感染性疾病的微生物学检查》编委会

主 编 袁 杰 李红橙 李 蓉

副 主 编 李森权 刘菊华 崔红梅
 李亚莉 谢亚玲

编 委 (以姓氏笔画为序)

王姣平 帅 荣 杨 柳
沈 渝 周 维 易善珍
胡如华 曹永春 谭建东

主 审 唐由凯 刘作春

内 容 提 要

由病原微生物引起的多种感染性疾病,其诊断除可根据临床症状、体征和一般检查外,采取合适的临床标本进行微生物学检查,确诊病因是极为重要的。微生物学的检查主要有形态学检查、分离培养及代谢产物的检查、免疫学检查(抗原、抗体检查)、核酸的检测四大方面。

本书共十八章,涉及细菌、放线菌、螺旋体、支原体、立克次体、衣原体、病毒和病原性真菌的微生物学检查。本书可供大中专医学院校临床医学专业学生、护理专业学生、检验专业学生使用,亦可供临床各科医生和检验人员参考。

前 言

感染性疾病的微生物学检查,在临床工作中对于感染性疾病的诊断十分重要,它是确定病因,为临床医生提供重要信息、制定治疗方案的关键一环。我们根据多年的临床检验工作、带教实践和临床工作的需要编写了本书。该书对医学院校学生的临床实习工作具有指导作用,也可供青年医生和检验人员参考。

编写过程中得到了湖北民族学院医学院微生物学教研室唐由凯教授和湖北民族学院附属医院检验科刘作春主任的大力帮助和指导,在此谨表深切谢意。

由于我们的水平有限,书中难免有不妥之处,恳请广大读者批评指正。

编 者

2010年6月

目 录

第一章 化脓性细菌	(1)
第一节 葡萄球菌的微生物学检查法	(1)
第二节 链球菌的微生物学检查法	(3)
第三节 肺炎链球菌的微生物学检查法	(4)
第四节 脑膜炎奈瑟菌的微生物学检查法	(7)
第五节 淋病奈瑟菌的微生物学检查法	(10)
第六节 铜绿假单胞菌的微生物学检查法	(13)
第七节 培养化脓性细菌常用的培养基	(14)
第二章 肠道感染细菌	(17)
第一节 大肠埃希菌的微生物学检查法	(17)
第二节 志贺菌的微生物学检查法	(18)
第三节 沙门菌的微生物学检查法	(21)
第四节 霍乱弧菌的微生物学检查法	(23)
第五节 副溶血性弧菌的微生物学检查法	(26)
第六节 幽门螺杆菌的微生物学检查法	(29)
第七节 弯曲菌的微生物学检查法	(30)
第八节 常用的培养肠道细菌的培养基	(31)
第三章 厌氧性细菌	(36)
第一节 破伤风梭菌的微生物学检查法	(36)
第二节 产气荚膜梭菌的微生物学检查法	(37)
第三节 肉毒梭菌的微生物学检查法	(39)
第四节 供厌氧芽胞梭菌培养及生化反应的培养基	(40)
第四章 呼吸道感染细菌	(43)
第一节 结核分支杆菌的微生物学检查法	(43)
第二节 麻风分支杆菌直接涂片染色镜检	(46)
第三节 白喉棒状杆菌的微生物学检查法	(46)
第四节 嗜肺军团菌的微生物学检查法	(49)
第五节 百日咳鲍特菌的微生物学检查法	(51)
第六节 流感嗜血杆菌的微生物学检查法	(52)
第七节 呼吸道细菌培养常用的培养基	(54)
第五章 动物源性细菌	(58)
第一节 布氏菌的微生物学检查法	(58)
第二节 炭疽芽孢杆菌的微生物学检查法	(60)
第三节 鼠疫耶氏菌的微生物学检查法	(62)

第六章 放线菌与诺卡菌	(64)
第一节 放线菌的微生物学检查法	(64)
第二节 诺卡菌的微生物学检查法	(65)
第七章 螺旋体	(67)
第一节 钩端螺旋体的微生物学检查法	(67)
第二节 梅毒螺旋体的微生物学检查法	(70)
第八章 支原体和脲原体	(80)
第一节 肺炎支原体的微生物学检查法	(80)
第二节 溶脲脲原体尿素酶试验	(81)
第九章 立克次体的微生物学检查法	(83)
第一节 直接涂片染色镜检	(83)
第二节 外斐氏反应	(84)
第十章 衣原体的微生物学检查法	(85)
第一节 标本直接涂片染色镜检	(85)
第二节 沙眼衣原体荧光抗体染色法	(85)
第三节 ELISA 法检测沙眼衣原体抗体	(86)
第四节 沙眼衣原体的分离培养与检查	(86)
第十一章 病毒感染的血清学检查	(88)
第一节 中和试验	(88)
第二节 血凝及血凝抑制试验	(89)
第十二章 病毒形态学检查	(93)
第十三章 病毒抗原及抗体的检测	(94)
第一节 乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg) 的检测	(94)
第二节 乙型肝炎病毒表面抗体(抗 - HBs) 的检测	(95)
第三节 乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg) 的检测	(98)
第四节 乙型肝炎病毒 e 抗体(抗 - HBe) 的检测	(101)
第五节 乙型肝炎病毒核心抗体(抗 - HBc) 的检测	(103)
第六节 人类免疫缺陷病毒抗体(HIV - Ab) 的检测	(106)
第十四章 病毒核酸的检测	(109)
第一节 乙型肝炎病毒(HBV) DNA 杂交试验	(109)
第二节 乙型肝炎病毒(HBV) DNA 的 PCR 检测法	(111)
第十五章 病原性真菌的形态学检查	(113)
第一节 真菌的基本形态检查	(113)
第二节 真菌染色标本制作法	(114)
第三节 浅部真菌病临床标本镜检法	(115)
第十六章 病原性真菌的分离培养	(116)
第一节 沙保弱氏琼脂斜面培养法	(116)
第二节 真菌小培养法	(117)
第十七章 病原性真菌感染的免疫学检查	(119)

第一节	白假丝酵母菌抗体的检测法	(119)
第二节	新生隐球菌抗体的检测法	(119)
第十八章	真菌毒素的检测	(121)
第一节	产毒菌株荧光反应测定法	(121)
第二节	黄曲霉毒素抑菌试验	(121)
参考文献		(123)

第一章 化脓性细菌

第一节 葡萄球菌的微生物学检查法

病原性葡萄球菌(金葡菌)可引起皮肤黏膜、各种组织器官的化脓性炎症、败血症,还可产生肠毒素引起食物中毒。

一、标本直接涂片染色镜检

(一) 材料

1. 标本

依据感染部位及不同病情采取标本。

- (1) 化脓性病灶的脓汁。
- (2) 败血症采取血液。
- (3) 脑膜炎患者采取脑脊液。
- (4) 食物中毒者则分别采取剩余食物,病人的呕吐物和粪便。

2. 实验材料

革兰氏染色液一套,载玻片、香柏油、接种环、酒精灯、光学显微镜。

(二) 方法 制作标本片,革兰氏染色、油镜观察。

(三) 结果 光镜下可见葡萄球菌呈球形或略呈椭圆形,直径0.5~1.5μm,平均1μm,典型者排列呈葡萄串状,革兰氏染色阳性,要注意的是,当衰老、死亡、在陈旧培养物中或被中性粒细胞吞噬后的菌体常转为革兰氏染色阴性。

二、分离培养

(一) 材料

- 1. 标本(同标本直接涂片染色镜检)
- 2. 实验材料 血琼脂平板、温箱、接种环、酒精灯。

(二) 方法 无菌操作,将标本接种于血琼脂平板上(分离划线技术),接种完毕后,将血琼脂平板置37℃温箱培养24h后观察结果。

(三) 结果 对比血琼脂平板上金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的异同,注意菌落的大小、形态、颜色和有无溶血环。

细 菌	菌落大小	形态	颜色	溶血环
金黄色葡萄球菌				
表皮葡萄球菌				

三、血浆凝固酶试验(方法略)

四、耐热核酸酶试验

(一) 原理 耐热核酸酶是由致病性葡萄球菌产生的,此酶耐热,100℃ 15 min 或 60℃ 2h 不被破坏,此酶能降解 DNA 或 RNA,从而使 DNA 或 RNA 长链水解成寡核苷酸链。根据 DNA 长链可被酸沉淀,寡核苷酸链可溶于酸的特点,来判断是否有核酸酶将 DNA、RNA 降解。临床上常将耐热核酸酶作为测定葡萄球菌有无致病性的重要指标之一。

(二) 材料与方法 实验材料

1. 甲苯胺蓝核酸琼脂;
2. 金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌培养物;
3. 载玻片、37℃ 孵育箱、干燥热力灭菌器等。

(三) 方法

1. 玻片法: 取溶化好的甲苯胺蓝核酸琼脂 3 ml 铺于洁净载玻片上,凝固后打上 4~8 个直径为 2 mm 的孔,每孔滴加经沸水浴细菌培养物 1 滴,置 37℃ 孵育 3 h,观察粉红色圈的大小,应用时设对照。

2. 平板法: 在分离金黄色葡萄球菌的琼脂平板上挑选所需的菌落并做标记,置 60℃ 干燥热力灭菌器 2h,取出后每个平板倾注 10 ml 预先溶化好的甲苯胺蓝核酸琼脂,经 37℃ 3h 观察结果。

(四) 结果 产生耐热核酸酶的金黄色葡萄球菌菌落周围呈粉红色圈为阳性,表皮葡萄球菌为阴性。

五、药敏试验(方法略)

六、葡萄球菌肠毒素检查

(一) 原理

某些金黄色葡萄球菌可产生耐热肠毒素,引起人类毒素性食物中毒。将食物中毒病人的呕吐物或剩余物培养后,经加热、离心,取上清液,给实验动物注射,可判断其中是否有耐热的肠毒素。

(二) 材料

标本、NaCl 高盐肉汤培养基,体重 500g 左右的幼猫(6~8 周龄)、离心机、沉淀管、注射器等。

(三) 方法

1. 将食物中毒病人的呕吐物或剩余物接种于高盐肉汤管中,经 37℃ 24h 培养后,再分离纯菌种,培养 48h。

2. 将高盐肉汤煮沸 30min,杀死细菌及破坏其他毒素,将煮沸液 3000 r/min 离心 1h。

3. 取上清液 2ml 注入幼猫腹腔或静脉。

4. 于 4h 内观察结果。

(四) 结果

观察幼猫有无呕吐、腹泻、体温升高、死亡等现象。若有这些现象出现。提示有肠毒素存在。

(袁 杰)

第二节 链球菌的微生物学检查法

链球菌(A 群) 引起人类多种疾病,主要有三种类型: ①皮肤及皮下组织感染和呼吸道感染; ②猩红热; ③风湿热和急性肾小球肾炎。

一、标本直接涂片染色镜检

(一) 材料

标本:

依据不同疾病,采取有关标本。

①创伤感染取脓液; ②咽喉、鼻腔等病灶的棉拭; ③败血症取血液。

(二) 方法 制片; 革兰氏染色; 光学显微镜油镜观察。

(三) 结果 描述镜下所见细菌的形态、排列和染色性,光镜下可见链球菌呈球形或椭圆形,直径 0.6 ~ 1.07 μ m,呈链状排列,从 4 ~ 8 个至 20 ~ 30 个细菌组成,革兰氏染色阳性,注意的是,若培养日久老龄菌或被中性粒细胞吞噬后可被染成革兰氏阴性,链的长短与菌种和生长环境有关,在液体培养基中形成的链状排列常比取材于固体培养基者长。

二、分离培养

(一) 材料

- 1. 标本(同标本直接涂片染色镜检) 。
- 2. 实验材料: 血琼脂平板、温箱、接种环、酒精灯。

(二) 方法 无菌操作 将标本接种于血琼脂平板上(分离划线技术) ,接种完毕后将血琼脂平板置 37℃ 温箱培养 24h 后观察结果。

(三) 结果 对比血琼脂平板上甲型溶血性链球菌和乙型溶血性链球菌菌落的区别,注意菌落周围溶血环的大小、颜色、透明度。

细 菌	菌落大小	颜色	有无溶血环	色泽及透明度
甲型溶血性链球菌				
乙型溶血性链球菌				
丙型链球菌				

三、血清学试验: 抗链球菌溶血素 “O” 试验

(一) 原理 链球菌在感染者体内产生溶血素 “O”,它有很强的抗原性,可刺激机体产生抗溶血素 “O” 抗体(抗 “O” 抗体, ASO) ,导致血清中 ASO 滴度增高。测定血清中抗 “O” 抗体,可用于链球菌感染的诊断。血清中 ASO 的测定方法有多种,在这里仅介绍快速乳胶法。

抗链球菌溶素血素 “O” 试验(antistreptolysin “O” test) 的快速乳胶法是将羧化聚苯乙烯胶乳与溶血素 “O” 共价交联制成 ASO 胶乳试剂。ASO 高滴度的病人血清被适量的溶血素中和掉正常水平的抗体后,还有 ASO 多余,这些多余的抗体即与 ASO 乳胶试剂反应,出现清晰均匀的乳胶颗粒。

(二) 材料

1. 溶血素“O”溶液,用时摇匀。
2. ASO 胶乳试剂,用时摇匀。
3. 阳性控制血清和阴性控制血清各 1 瓶(已经稀释灭活,可直接使用)。

(三) 方法

1. 血清标本用生理盐水 1:15 稀释(0.1 ml 血清 + 1.4 ml 生理盐水),56℃灭活 30 min。
2. 在反应板(为黑色背底)各格子上分别滴加稀释灭菌血清 1 滴(约 50μl)以及阳性和阴性控制血清 1 滴,各再滴加溶血素“O”溶液 1 滴,轻轻摇动 1min,使其充分混匀,均匀分布于方格内。
3. 滴加 ASO 胶乳试剂 1 滴,轻轻摇动 3min(室温为 18~20℃),将反应板平放在实验桌上。

(四) 结果

有清晰凝集者为阳性,不出现清晰凝集者为阴性,阴性者的 ASO ≤ 250 IU/ml。

阳性者的 1:15 稀释血清,进一步稀释为 1:30,1:60,再重复步骤 2 和 3,出现凝集的血清稀释度和 ASO 滴度间的关系大致如下:

稀释度	ASO(IU/ml)
1:15	400
1:30	800
1:60	1600

(五) 注意事项

1. ASO 胶乳加入后,轻轻摇动到指定的时间应立即记录结果,超过规定时间后再出现的凝集不判为阳性,阳性控制血清应在指定时间内出现清晰凝集,但不能将阳性控制血清出现凝集的时间视为判断结果的时间界限。
2. 室温降低 10℃,在胶乳试剂加入后应延长反应时间 1min,室温升高 10℃,应缩短反应时间 1 min。
3. 对所有阳性血清应进行半定量测定,才能对临床医生的判断有更大帮助。

(袁 杰)

第三节 肺炎链球菌的微生物学检查法

肺炎链球菌主要引起人类大叶性肺炎、支气管炎、脑膜炎,也可引起中耳炎、乳突炎、副鼻窦炎和败血症等。

一、标本直接涂片染色镜检

(一) 材料

标本

临床标本:根据病种采取痰液标本、脓液标本、血液标本、脑脊液标本。

(二) 方法 将肺炎链球菌培养物或临床标本沉淀物,涂片进行革兰氏染色镜检。

(三) 结果 革兰氏阳性球菌、菌体呈矛头状、多成双排列、宽端相对、尖端向外、菌体周围有透明环此即荚膜位置所在、荚膜需用特殊染色才可见(见荚膜染色法)。

二、分离培养

(一) 材料

- 1. 标本(同标本直接涂片染色镜检) 。
- 2. 实验材料: 血琼脂平板、温箱、接种环、酒精灯。

(二) 方法 无菌操作,将标本接种于血琼脂平板上(分离划线技术) 。接种完毕后,将血琼脂平板置 37℃ 温箱培养 24 ~48h 后,观察结果。

(三) 结果 肺炎链球菌在血平板上菌落细小,灰白色,圆形略扁,半透明,有草绿色 α 溶血环(与甲型溶血性链球菌很相似) ,若卵育时间大于 48h,肺炎链球菌产生足量的自溶酶,菌体渐溶解,菌落中央下陷呈脐状。

三、胆汁溶菌试验

(一) 原理

肺炎链球菌可产生自溶酶,可使细菌本身发生溶解。自溶酶可被胆汁、胆盐或其他表面活性物质激活而进一步活化,加速菌体的自溶,促使细菌在短期内溶解。

(二) 材料

- 1. 肺炎链球菌菌液及血琼脂平板培养物,甲型溶血性链球菌菌液及血琼脂平板培养物。
- 2. 10% 去氧胆酸钠溶液(去氧胆酸钠 10g,95% 酒精 10ml,蒸馏水 90ml,将胆盐先溶解于酒精内,加蒸馏水至 100ml 即成) ,或猪胆汁,生理盐水。
- 3. 水浴箱、试管、吸管等。

(三) 方法

- 1. 试管法 按表排列试管并按要求加入各材料,摇匀,置 37℃ 水浴箱中 15 ~30 min 观察结果。

胆汁溶菌试验

材 料	试管号(ml)			
	1	2	3	4
10% 去氧胆酸钠溶液	0.2	0.2	—	—
肺炎链球菌菌液	0.8	—	0.8	—
甲型链球菌菌液	—	0.8	—	0.8
生理盐水	—	—	0.2	0.2

- 2. 平板法 各加 1 滴 10% 去氧胆酸钠溶液(或猪胆汁) 于肺炎链球菌血琼脂平板培养物及甲型溶血性链球菌血琼脂平板培养物上,37℃ 孵育 30 min 后观察结果。

(四) 结果

- 1. 试管法 如细菌悬液仍为混浊状,视为阴性,细菌悬液由混浊变为透明状,则为胆汁溶菌试验阳性。
- 2. 平板法 菌落消失者为阳性,菌落不消失者为阴性。

(五) 注意事项

做此试验时注意菌液的 pH 值以 7.6 为宜,故一般菌液中加入胆汁后到一定时间仍不

溶菌时,最好加 1 滴稀释的 NaOH,然后再进行观察。

四、葡糖发酵试验

(一) 原理 肺炎链球菌发酵菊糖产酸,使培养基中指示剂改变颜色。

(二) 材料 肺炎链球菌,甲型链球菌,菊糖发酵管,接种环,酒精灯等。

(三) 方法 取菊糖发酵管 2 支,分别接种肺炎链球菌及甲型溶血性链球菌,置 37℃ 温箱孵育 18 ~ 24h 后观察结果。

(四) 结果 培养基由紫色变为黄色为阳性,不变色为阴性,肺炎链球菌为阳性,甲型溶血性链球菌为阴性。

五、奥普托率(Optochin) 敏感试验

(一) 原理

Optochin 即乙基氢化羧基奎宁(化学分子式为 $C_2H_5O_5 \cdot C_9H_5N \cdot CHOH \cdot C_7H_{11}N \cdot C_2H_5$),水溶液比较稳定,可冷藏数周,也可高压蒸汽灭菌。几乎所有肺炎链球菌都对 Optochin 敏感,故该试验可鉴别肺炎链球菌和甲型溶血性链球菌。尤其是某些肺炎链球菌菌株胆汁溶菌试验结果不明显,但都对 Optochin 敏感,因此该试验更可靠。

(二) 材料与方法

1. 菌种,肺炎链球菌 18 ~ 24h 培养菌液,甲型溶血性链球菌 18 ~ 24h 培养菌液。

2. 培养基,血琼脂平板 2 个。

3. Optochin 滤纸片(5μg/片)或 6mm 滤纸片及 1:4000 的 Optochin 水溶液。

4. 镊子,无菌棉签。

(三) 方法

1. 将肺炎链球菌和甲型溶血性链球菌分别涂布于血琼脂平板各 1 个。

2. 把直径 6mm 的滤纸片放于 1:4000 Optochin 水溶液中,浸湿后分别贴于涂有细菌的平板上。或直接用 Optochin 滤纸片。

3. 置 37℃ 培养 18h 后观察结果。

(四) 结果

肺炎链球菌平板上滤纸片周围可见直径大于 20mm 的抑菌圈,甲型溶血性链球菌则无或仅有直径小于 10mm 的抑菌圈。

六、动物毒力试验

(一) 原理

在肺炎链球菌中,有少数不产生荚膜,故无致病力,具有荚膜的肺炎链球菌因荚膜具有抵抗吞噬细胞的吞噬致病力最强。可致动物死亡,小白鼠对肺炎链球菌很敏感,故可用来作肺炎链球菌的毒力鉴定,同时可纯化肺炎链球菌。

(二) 材料

1. 菌种 肺炎链球菌 18 ~ 24 h 培养菌液。

2. 动物 20g 左右健康小白鼠。

3. 培养基、血平板、无菌注射、碘酒、酒精等。

4. 解剖刀剪、镊子等。

5. 荚膜染色液一套、光学显微镜、香柏油、接种环、生理盐水。

(三) 方法

1. 取 20g 左右重的健康小白鼠 1 只,腹腔或皮下注射肺炎链球菌菌液 0.2ml,饲养观察。
2. 待濒临死亡时,及时解剖,取心血接种血平板做细菌培养。
3. 取其腹腔液涂片,做荚膜染色镜检。

(四) 结果

1. 有荚膜的肺炎链球菌,能使小白鼠在 12 ~ 36h 濒临死亡。
2. 血培养可获肺炎球菌纯培养物。
3. 有毒力的肺炎链球菌,荚膜染色镜检,可见有明显荚膜。

(五) 注意事项

在试验中要特别注意无菌操作,并用无毒力(无荚膜)的肺炎链球菌做对照试验。

(袁 杰)

第四节 脑膜炎奈瑟菌的微生物学检查法

脑膜炎球菌是流行性脑脊髓膜炎的病原体,目前我国流行的血清群 95% 以上是 A 群。

一、标本直接涂片染色镜检

(一) 材料

1. 临床标本: 依据病情采取以下标本

病人的脑脊液培养。

病人的血液。

病人的淤斑、淤点刺破后的渗出物

带菌者检查可采用鼻咽拭子。

2. 实验材料: 革兰氏染色液一套,载玻片、香柏油、接种环、酒精灯、光学显微镜。

(二) 方法

制作标本片;脑脊液需离心沉淀后,取沉淀物涂片;出血瘀斑,需经碘酊、乙醇消毒病变皮肤后,用无菌针头挑破出血斑,挤出少量血液或组织液,制成印片。革兰氏染色,用光学显微镜油镜观察。

(三) 结果

光镜下可见,膜脑炎奈瑟菌呈肾形或豆形,革兰阴性双球菌,两个细菌的接触面较平坦或略向内陷,直径 $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$,在患者脑脊液中,多位于中性粒细胞内,形态典型。

要注意的是:人工培养后可形成卵圆形或球状,排列较不规划,单个、成双或 4 个相联等,在孵育 24h 后的培养物中,常呈现衰退形态,菌体大小不一致,着色亦深浅不匀。

二、分离培养

(一) 材料

1. 标本(同标本直接镜检)。

2. 实验材料: 血清肉汤培养基,血琼脂平板,巧克力色琼脂平板,CO₂ 培养箱,接种环,酒精灯等。

(二) 方法

无菌操作,血液或脑脊液标本先接种至血清肉汤增菌后(24 h 培养),再在巧克力琼脂平板上划线分离,完毕后,将巧克力琼脂平板置于含 5% CO₂ 的环境中 37℃ 孵育 24h,观察脑

膜炎奈瑟菌在巧克力琼脂平板上的生长情况,菌落特点。

(三) 结果

37℃ 孵育 24 h 后,形成直径 1.0 ~ 1.5 mm 的无色、圆形、光滑、透明,似露滴状的菌落,在血琼脂平板上不溶血,在血清肉汤中呈混浊生长。

三、动物毒力试验

(一) 原理

脑膜炎奈瑟菌的主要致病物质是内毒素,与其他革兰阴性菌内毒素的致病作用一样,也可引起发热、血管舒缩功能紊乱、弥漫性血管内凝血和 Shwartzman 现象等病理反应。而脑膜炎奈瑟菌内毒素还更容易引起皮肤出血性紫癜和肾上腺出血坏死。动物实验可观察到上述病理反应。

(二) 材料

1. 脑膜炎奈瑟菌 18 ~ 24 h 培养菌液。
2. 动物 20g 左右重的健康小白鼠。
3. 注射器、酒精。
4. 解剖刀、剪、盘等。

(三) 方法

1. 取 20g 左右重的健康小白鼠 1 只,将其固定,暴露尾巴,用酒精反复揩擦,使尾部血管充血。
2. 取 18 ~ 24 h 培养的脑膜炎奈瑟菌菌液,60℃ 加热 5 ~ 10 min 杀死细菌成为粗制内毒素。
3. 取上述处理的菌液 1 ml,注入小白鼠尾脉静。
4. 约 5 h 后,用颈椎脱位法杀死(或已死)小白鼠,解剖观察。

(四) 结果 可见皮下弥漫性紫癜,肝脏淤血水肿,肾脏及肾上腺充血,肠系膜及腹壁血管明显充血。

四、玻片凝集试验(血清学分群鉴定)

(一) 原理

抗原抗体结合后,在玻片上发生肉眼可见的凝集现象,用已知抗体检测未知抗原,对新分离的脑膜炎奈瑟菌进行分群鉴定。

(二) 材料

1. 脑膜炎奈瑟菌诊断血清(抗体)
多价 I (包括 A、B、C、D 四群)。
多价 II (包括 1889、1890、1892、319 群)。
多价 III (包括 1916、1486、1811 群)。
2. 脑膜炎奈瑟菌培养物(抗原)。
3. 实验材料、清洁载玻片、接种环、酒精灯等。

(三) 方法

在一清洁玻片上按顺序分放一接种环多价 I、II、III 诊断血清,再用接种环蘸取待检菌少许,分别与上述三种多价血清混匀,摇动玻片,于 2 min 后观察结果。

(四) 结果

凝集者为颗粒状,不凝集者仍为混悬状,如果与某一多价血清凝集者后(多价 I)与其他两者不凝集者(多价 II、III)说明待检菌为 A、B、C、D 四群中之一,可进一步用群血清定群,如待检菌与 A 群血清发生凝集者,说明待检菌为 A 群,这在流行病学调查中及预防方面有着重要意义。

五、快速诊断法一: ELISA 双抗体夹心法

(一) 试剂

(1) 流脑 A 群多糖抗体 可从生物制品所购置抗血清,经 50% 饱和硫酸铵盐析得 γ - 球蛋白组分,再通过 SPA - Sepharose 4B 免疫吸附柱,获得 IgG,用作包被与酶标记抗体。

(2) HRP - 抗体结合物(辣根过氧化物酶 - 抗体结合物),用改良过碘酸钠法制备。

(3) 流脑多糖抗原 可自生物制品所购置,用作阳性对照。

(4) 正常人血清 56℃ 30min 灭活作阴性对照。

(5) 待测流脑患者血清、脑脊液 56℃ 30min 灭活。

(6) 其他试剂 同 ELISA 常法。

(二) 方法

(1) 将抗体用包被液稀释至 20 μ g/ml,每孔加 0.1ml,4℃ 过夜后洗 3 次。

(2) 待检标本用稀释液 1:10 稀释后每孔加 0.1ml,4℃ 过夜或 37℃ 2h,洗 3 次。

(3) 加 HRP - 抗体结合物:用稀释液稀释成工作浓度(经事先预试),每孔加 0.1ml,37℃ 2h 后洗 3 次。

(4) 每孔加底物 0.1ml,37℃ 20min,然后用 2mol/L H_2SO_4 终止反应,测 492nm 吸光度 (A) 值。

(三) 结果观察

用健康人血清标本按上述 ELISA 试验测 A 值,以大于此 A 值 95% 可信限上限 ($\bar{x} + 2SD$) 为阳性。

(四) 注意事项

此法敏感性高,可检出抗原浓度为 0.365 ng/ml,但待检标本应 56℃ 30 min 灭活,否则会出现假阳性。缺点是 ELISA 法试剂要求高,酶结合物浓度要求严格,保存较久的需先测定一下最适稀释倍数。另外,包被抗体一定要纯,否则影响特异性,可将从生物制品所购置的抗体用盐析法粗提,再用 Sepharose - SPA 亲和层析柱提纯。本法与细菌学检查及 CIE 合用可大大提高检出率。

六、快速诊断法二: SPA - 协同凝集试验

(一) 试剂

(1) 含 A 蛋白葡萄球菌悬液:可由生物制品所购置,也可自制。

(2) 高效价 A 群流脑免疫血清:可从生物制品所购置,也可以患者脑脊液中分离的 A 群流脑菌株,按一般方法免疫家兔制成,效价需 $>1:2560$ 。

(3) 抗体致敏含 A 蛋白葡萄球菌,取 1ml 10% SPA 菌悬液加入 0.1 ml A 群流脑高效价免疫血清,混匀后 37℃ 水浴 30 min,经常摇动。以 4000 r/min 离心 20 min,弃上清,沉淀物用 PBS 洗 2 次,配成 1% 悬液。

(二) 方法

(1) 取 10% SPA 菌悬液 4000 r/min 离心 20 min,弃上清液,在沉淀的菌体中加入 0.3 ml