最新临床检验新技术操作规范及检验项目数据速查实用手册

主编　何真

中国科技文化出版社
吉 林 电 子 出 版 社

前　　言

本书内容包括医院检验科管理，血液学检验，体液、排泄物及脱落细胞学检验，生物化学检验，免疫学检验，微生物学检验和分子生物学检验等。作为标准化操作规范。本书对国内外近年来检验学科发展的，特别是具有良好发展趋势的新技术、新方法、新项目等也予以编入。新内容在各个章节中均有所反映，同时摒弃了一些比较陈旧、落后的内容，但对某些基层单位尚有指导意义的少数内容还是予以保留。总之，本书的编写目标是实用性与先进性兼顾，法规性与参考性并存，并力求文字简明，表达准确，便于掌握。但由于篇幅较大，编审人员较多，内容与行文风格难免有不协调之处，希望各单位和检验工作者将实际使用过程中发现的问题，及时指正，以便再版时改进。

本书编委会

2005 年5 月

第一篇

临床疾病检验项目

第一章　常见症状

发　热

发热是急诊患者就诊常见主诉之一，是指体温上升，超过了正常的体温。正常的体温是36.5～37 ℃，如体温在38 ℃，持续了48h 以上，服退热药后，体温虽下降，但是几小时后又回升，就要赶快去看医生。发热到39 ℃是高热，高热过久可能对脑组织造成伤害，不能忽视。

体温表显示的人体温度：36～37 ℃正常；37～38 ℃发热；8～39 ℃高热；高于40 ℃可能有危险性的高热。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血沉，血钾、钠、氯化物检查，肝功能，肾功能，CO_2 结合力测定，血培养及药物敏感试验，血肥达反应，外斐反应，血涂片找疟原虫，脑脊液常规、生化及培养（必要时）。

【检验结果判定】

1）白细胞（WBC）总数及中性粒细胞白分比明显增高，提示各种原因引起的化脓性感染。

2）白细胞总数增高或偏低，提示为某些病毒感染或伤寒病。

3）白细胞分类（DC）检查中发现幼稚细胞，提示可能为白血病。

4）红细胞（RBC）、血红蛋白（Hb）、血小板（PT）均降低，提示可能为某些严重感染或恶性肿瘤。

5）尿常规镜检红细胞（RBC）、白细胞（WBC）较多，尿蛋白增加，提示为泌尿系感染或肾炎、肾结核及肿瘤。

6）血沉增快，提示为急性感染、结核病、肿瘤或结缔组织病。

7）肝功检查丙氨酸氨基转移酶（ALT）、麝香草酚浊度试验值增高，提示为有肝脏损害，胆红素值升高，提示为有胆道感染。

8）血肥达反应阳性，提示可能为伤寒病。

9） 外斐反应阳性，提示可能为斑疹伤寒。

10） 血培养及脑脊液培养如培养出致病菌，将有非常重要的临床意义。

恶心、呕吐

恶心是呕吐的前驱反射动作，通过这一动作可使胃内容物返流，经食管自口腔吐出，此现象称为呕吐。临床上常见于消化系统疾病、泌尿系统疾病、内分泌与代谢疾病、血液系统疾病、心血管疾病、妇产科疾病、中枢神经系统疾病。

【检验项目选择】

血常规，尿常规（包括尿糖），尿酮体试验，尿妊娠试验，便常规、潜血，肝功能，肾功能，血糖，胰多肽试验，血电解质，心肌酶谱，血、尿淀粉酶，乙型肝炎抗原抗体检查，血培养，脑脊液常规、培养。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数及中性粒细胞百分数增高，提示为各种急、慢性炎症。

2） 尿常规检查可见尿中出现大量白细胞及红细胞，提示可能为肾盂肾炎。

3） 尿常规检查可见尿中出现大量红细胞，提示可能为肾或输尿管结石。

4） 血糖升高，尿糖及尿酮体阳性，提示为糖尿病酮症酸中毒；

5） 便常规检查可见便中出现大量白细胞及红细胞，提示为急性胃肠炎；如伴有脓细胞提示为细菌性痢疾。

6） 肝功能检查丙氨酸氨基转移酶（ALT）升高，提示可能有各种肝脏损害；如伴有胆红素升高，提示可能为急性胆囊炎、胆石症、急性肝炎。

7） 血及尿淀粉酶升高，提示为急性胰腺炎。

8） 肾功能检查：血尿素氮、肌酐均升高，提示可能为肾功能不全。

9） 心肌酶谱测定天门冬氨酸氨基转移酶、肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶升高，提示可能为心肌梗死。

10） 乙型肝炎表面抗原阳性，提示为乙型肝炎。

疲倦

疲倦是很多疾病的症状。白天没有理由的疲倦乏力，夜间睡眠时间比平时多。突如其来的十分疲累困倦的感觉，常是严重疾病来临的症状。

【检验项目选择】

血常规，尿常规（包括尿糖），便常规及隐血试验，痰涂片检查血沉，血糖，肝功能，肾功能，血电解质测定，血清总三碘甲状腺原氨酸，血清总甲状腺素，血清游离三碘甲状腺原氨酸，血清游离甲状腺素，心肌酶谱。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白降低，提示为各种贫血引起的疲倦。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检可见大量的红细胞及白细胞，提示可能为急、慢性肾炎及肾功能不全引起的疲倦；尿糖阳性，提示可能为糖尿病引起的疲倦。

3）便常规及隐血试验：便镜检可见大量的红细胞及白细胞，提示可能为消化道炎症、结核或肿瘤引起的疲倦；隐血试验阳性，提示可能为消化道溃疡或肿瘤引起的疲倦。

4）血沉增快：提示可能为各种感染、肿瘤及结缔组织病引起的疲倦。

5）痰涂片检查：查到结核杆菌，提示为肺结核引起的疲倦。

6）肝功能检查：谷丙转氨酶升高，麝香草酚浊度试验阳性，白蛋白降低，提示可能为慢性肝炎或肝硬化引起的疲倦。

7）肾功能检查：血尿素氮、肌酐均升高，提示可能为肾功能不全或尿毒症引起的疲倦。

8）血清总三碘甲状腺原氨酸、血清总甲状腺素、血清游离三碘甲状腺原氨酸及血清游离甲状腺素测定：均升高，提示为甲状腺功能亢进引起的疲倦；如降低，提示为甲状腺功能减退引起的疲倦。

9）心肌酶谱测定：乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶均升高，提示可能心肌炎引起的疲倦。

10）血电解质测定：血钾降低，提示为各种低血钾疾病引起的疲倦。

厌食

厌食是指食欲减退或消失。主要是由于中枢神经系统功能失调所致，也可由于局部或全身病变的影响，使胃肠张力减退，从而影响神经中枢而致厌食。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，便常规，肝功能，肾功能，乙型肝炎抗原抗体检查，甲状腺功能检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分数增高，提示为各种感染性疾病。

2）尿常规检查尿中可见红细胞及白细胞、尿蛋白阳性，提示可能为肾炎或肾功能不全。

3）便常规检查便中可见大量红细胞及白细胞，提示可能为肠炎或细菌性痢疾。

4）肝功能检查丙氨酸氨基转移酶（ALT）升高，提示可能为各种急、慢性肝病。

5）甲状腺功能检查血清总三碘甲状腺原氨酸、血清总甲状腺素、血清游离三碘甲状腺原氨酸及血清游离甲状腺素降低，提示可能为甲状腺功能减退。

吞咽困难

吞咽困难是指吞咽时胸骨后或颈部有疼痛或梗阻感，食物难以下咽。临床表现为咽部疾病、食管疾病、纵隔疾病、心血管疾病、内分泌疾病、结缔组织疾病、神经系统疾病。

【检验项目选择】

血常规，血沉，心肌酶谱，甲状腺功能检查，脊髓灰质炎测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分数增高，提示可能为咽部、扁桃体及食管炎症。

2）心肌酶谱测定天门冬氨酸氨基转移酶、肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶升高，提示可能为心肌梗死。

3）甲状腺功能检查：血清总三碘甲状腺原氨酸、血清总甲状腺素、血清游离三碘甲状腺原氨酸及血清游离甲状腺素升高，提示为甲亢。

腹痛

腹痛，是指胃脘以下，耻骨以上的部位发生的胀痛、绞痛、隐痛及烧灼疼痛，是一种常见的临床症状。按照起病的急缓程度可以分为急性腹痛和慢性腹痛。其病因可略分两类：一类是由于腹内脏器病变所致；另一类是由于腹外脏器病变或全身性病变所致。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，尿常规（包括尿糖），尿酮体试验，尿淀粉酶，便常规，便潜血试验，血淀粉酶，血糖，肝功能，肾功能，血电解质，黄疸指数。

【检验结果判定】

1）白细胞总数升高，提示可能为急性肠炎、急性肠梗阻、急性胰腺炎等。

2）白细胞总数及中性粒细胞百分比均升高，可能为胃及十二指肠穿孔、急性胆道感染、急性阑尾炎等。

3）红细胞、血红蛋白进行性下降，可能为肝脾破裂、宫外孕等。

4）便常规镜检，可见多数白细胞及红细胞，提示为急性肠炎；如见蛔虫卵，提示为胆道蛔虫病。

5）尿常规镜检可见多数红细胞，提示可能为泌尿系结石。

6）血淀粉酶轻度升高，提示可能为胃及十二指肠穿孔。

7）血淀粉酶及尿淀粉酶明显升高，提示为急性胰腺炎。

8）血黄疸指数升高，可能为急性胆道感染。

腹泻

正常人每日或隔日排成形便1 次，少数人习惯于每日排便2～3 次，如大便次数增多并稀薄或伴有粘液或脓血的情况，称为腹泻。腹泻可分为急性腹泻和慢性腹泻，急性腹泻多有较强的季节性，好发于夏秋二季，慢性腹泻是指反复发作或持续2 个月以上的腹泻。临床上常见于胃十二指肠疾病、肝脏疾病、胆道疾病、胰腺疾病、小肠疾病、大肠疾病、内分泌疾病等。

【检验项目选择】

血常规，血沉，便常规、培养，肝功能，血糖，甲状腺功能检查，五肽胃泌素试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数升高，提示可能为某些肠道感染性疾病。

2）红细胞计数及血红蛋白值均下降，提示可能为某种消化道肿瘤。

3）便常规检查白细胞数增多，提示为各种细菌引起的急性或慢性肠炎。

4）便常规检查嗜酸粒细胞增多，提示为过敏性结肠炎。

5）便涂片找到虫卵，提示为寄生虫感染引起的肠道疾病。

6）有粘液及脓血便，提示可能为各种肠道炎症。

7）肝功能检查如丙氨酸氨基转移酶及胆红素升高，提示为各种原因引起的肝脏损害。

便血

消化道血液从肛门排出，大便带血或完全为血便，色鲜红、暗红或柏油样，称为便血。临床上常见于胃肠道疾病，如胃、十二指肠溃疡、食管静脉曲张，细菌性痢疾、血吸虫病、血小板减少、凝血功能障碍及白血病等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，便常规、培养，骨髓检查。

【检验结果判定】

1）红细胞计数、白细胞计数、血小板计数显著降低，血红蛋白下降，提示可能为再生障碍性贫血。

2）便常规检查有大量白细胞和红细胞，提示可能为细菌性痢疾。

3）便常规检查发现血吸虫卵，提示为血吸虫病。

4）便常规检查发现阿米巴原虫，提示为阿米巴痢疾。

5）出、凝血时间延长，提示为凝血功能障碍。

咳嗽、咳痰

咳嗽是一种生理保护性反射动作，是呼吸系统常见症状之一。凭借这一动作机体将呼吸道异物或分泌物排出体外，称为咳痰。

【检验项目选择】

血常规，血沉，嗜酸粒细胞计数，痰涂片及培养，免疫球蛋白测定，类风湿因子测定，自身抗体测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比均升高，提示为上呼吸道或肺部细菌感染。

2）白细胞计数正常或偏低及中性粒细胞百分比降低，提示为病毒或其他原因引起的感染。

3）嗜酸粒细胞计数升高，提示为支气管哮喘及其他过敏性疾病等。

4）痰涂片有大量脓细胞，提示为支气管与肺部细菌性感染。

5）痰涂片找到瘤细胞，提示可能为恶性肿瘤。

6）痰涂片发现革兰阳性球菌或阴性杆菌，痰培养阳性，提示为感染性疾病。

7）痰涂片有大量细菌，痰培养阴性，提示可能为厌氧菌感染。

咯血

咯血是指喉以下呼吸道的出血经口腔咯出。临床常见于支气管扩张、肺结核、肺炎、高血压心脏病等。

【检验项目选择】

血常规，肾功能，血电解质，便常规，便潜血试验，痰涂片找结核菌、癌细胞及痰培养。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数及中性粒细胞百分比升高，提示可能为肺脓肿、大叶性肺炎、或葡萄球菌败血症。

2） 痰涂片找结核菌阳性，提示可能为肺结核。

3） 痰涂片找到癌细胞可为肺癌。

4） 痰培养可查到致病菌。

呕血

呕血是上消化道出血时，血液自口腔吐出，可混有食物残渣，血色暗红或呈现咖啡色，多伴有恶心及上腹部不适，常同时排出黑色柏油样粪便。临床上主要见于食管疾病、胃疾病、十二指肠疾病、肝脏疾病、胆道及胰腺疾病等。

【检验项目选择】

血常规，便常规、隐血试验，肝功能，蛋白电泳，肾功能，乙型肝炎抗原抗体测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数稍高或正常、血红蛋白及血小板数降低，提示可能为肝硬化。

2） 肝功能检查如丙氨酸氨基转移酶及麝香草酚浊度试验数值升高，白蛋白与球蛋白比值小于1，提示为肝硬化；如胆红素升高，提示为肝硬化或胆道出血。

血尿

血尿是指用肉眼见到红色或显微镜下可见红细胞增多的尿液。临床上可发生于肾小

球疾病、肿瘤、泌尿系感染、泌尿系结石、泌尿系损伤、血液病、免疫性疾病、心血管疾病及内分泌－代谢性疾病等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，尿常规，血沉，肾功能，血肌酐，内生肌酐清除率，血酸性磷酸酶，前列液检查 (男性)。

【检验结果判定】

1) 白细胞计数及中性粒细胞百分比升高，提示有感染。

2) 白细胞计数明显升高，分类计数出现幼稚细胞，血红蛋白下降，提示可能为白血病；如血小板计数减少，提示可能为血小板减少性紫癜或流行性出血热。

3) 血沉增快，提示可能为结核或肿瘤。

4) 血尿素氮、血肌酐、内生肌酐清除率下降，提示为氮质血症或尿毒症。

5) 尿常规检查尿中红细胞数及白细胞数均升高，并伴有脓细胞，提示为泌尿系感染、肾结核、肾栓塞、肾盂肾炎、肾结石等。

6) 尿常规检查尿中红细胞数明显增多，提示为泌尿系结石、肿瘤或外伤。

7) 尿常规检查尿中红细胞数及白细胞数增加同时伴有蛋白、管型，提示为肾小球疾病。

血酸性磷酸酶升高，提示可能为前列腺癌。

呼吸困难

呼吸困难是指病人有吸气时氧气不足或呼气时明显费力、延长而缓慢的感觉，表现为呼吸频率、深度和节律的改变。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，红细胞压积，肝功能，肾功能，血电解质，血气分析，免疫球蛋白测定，血清补体测定，类风湿因子测定，自身抗体测定，查红斑狼疮细胞。

【检验结果判定】

1) 白细胞计数升高，提示为细菌感染性疾病。

2) 嗜酸粒细胞计数升高，提示为哮喘等过敏性疾病。

3) 免疫球蛋白IgM 升高，提示为支气管哮喘。

4) 抗核抗体、类风湿因子阳性、血清补体降低，提示为结缔组织疾病。

胸痛

胸痛是指胸部疼痛而言，为临床常见症状之一，可由某些理化因素刺激肋间神经、膈神经、脊神经后根和迷走神经分布的支气管、心脏及主动脉的神经末梢而引起。

【检验项目选择】

血常规，血沉，痰涂片及培养，肝功能，血清心肌酶谱，乙型肝炎抗原抗体测定，甲胎蛋白，血、尿淀粉酶测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比升高，提示为各类肺炎、胸膜炎、心包炎、脓胸等。

2）白细胞计数升高，白细胞分类有幼稚细胞，提示为白血病。

3）痰涂片找到癌细胞，提示可能为支气管癌。

4）肝功能检查如丙氨酸氨基转移酶升高，提示为肝炎。

5）血、尿淀粉酶测定值升高，提示为急性胰腺炎。

6）心肌酶谱测定天门冬氨酸氨基转移酶、肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶升高，提示可能为心肌梗死。

头痛

头痛是临床常见症状之一，大部分为功能性头痛，但有时却是一些严重器质性疾病的早期症状。主要表现如偏头痛、三叉神经痛、高血压及脑血管病变等。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，血脂，血液流变学检查，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数升高，提示可能为感冒。

2）白细胞计数显著升高及中性粒细胞百分比升高，提示可能为流行性乙型脑炎。

3）血脂升高，提示可能为高血压。

心悸

心悸是自觉心跳快而强，并伴有心前区不适感。临床上常见于各种心律失常、甲状

腺功能亢进、低血糖、贫血、各种器质性心血管疾病及心血管神经官能症等。

【检验项目选择】

血常规，血糖，心肌酶谱，尿3－甲－4 羟苦杏仁酸测定，甲状腺功能检查。

【检验结果判定】

1） 红细胞计数低于3 $\times 10^{12}$/L、血红蛋白低于70g/L，提示可能为各种贫血性疾病。

2） 血糖降低，提示为低血糖症。

3） 尿3－甲－4 羟苦杏仁酸测定值升高，提示可能为嗜铬细胞瘤。

4） 心肌酶谱测定天门冬氨酸氨基转移酶、肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶升高，提示可能为心肌梗死。

黄疸

黄疸是指血清胆红素超出正常范围，表现为巩膜、皮肤及黏膜呈黄色的征象。临床上可见于急性和慢性肝炎、溶血性疾病、脾肿大、胆道结石、消化道肿瘤等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，尿常规，尿三胆试验，便常规及潜血试验，肝功能，血脂，碱性磷酸酶测定（AKP），γ－谷氨酰转肽酶（γ－GT），亮氨酸转肽酶（LAP），5－核苷酸酶（5－NT），血浆凝血酶原时间测定，血清结合胆酸测定（CCA），血清铁/铜比值（Fe/Cu），免疫球蛋白测定，甲胎蛋白（AFP），血清脂蛋白X（LP－X），抗人球蛋白试验。

【检验结果判定】

1） 红细胞（RBC）、血红蛋白（Hb）含量均降低，网织红细胞计数升高，提示为各种溶血引起的黄疸。

2） 尿三胆试验：如尿胆红素（UBIL）阴性、尿胆原明显升高，提示为溶血性黄疸；如尿胆红素（UBIL）明显升高，而尿胆原阴性，提示为肝细胞性或阻塞性黄疸。

3） 便常规检查如粪胆素明显增加，提示为溶血性黄疸；如粪胆素正常或阴性，提示为肝细胞性或阻塞性黄疸。

4） 血脂测定，阻塞性黄疸胆固醇升高；肝细胞性黄疸胆固醇与甘油三酯均降低。

5） 肝功能检查：如血清间接胆红素值明显升高、结合胆红素值轻度升高，提示为各种原因引起的溶血性黄疸；如这两种胆红素值均升高，丙氨酸氨基转移酶升高，提示为急性肝炎和其他各种肝脏损害引起的黄疸；如结合胆红素值明显升高，间接胆红素值

轻度升高，提示为肝外胆管阻塞或肝内胆汁淤积引起的阻塞性黄疸。

6）碱性磷酸酶测定（AKP）、γ－谷氨酰转肽酶（γ－GT）、亮氨酸转肽酶（LAP）、5－核苷酸酶（5－NT）测定，阻塞性黄疸时各种酶的活性均升高。

7）血浆凝血酶原时间测定：肌肉注射维生素K，能使延长的凝血酶原时间得以纠正时，提示为阻塞性黄疸，否则为肝细胞性黄疸。

8）血清结合胆酸（CCA）明显升高，提示为癌性阻塞性黄疸。

9）血清铁/铜比值（Fe/Cu）正常值为0.8～1.0，阻塞性黄疸为0.1～0.5，肝细胞性黄鱼>1。

10）免疫球蛋白肝外型阻塞性黄疸正常，原发性胆汁性肝硬化IgM明显升高。

11）血清脂蛋白X（LP－X）升高，提示为阻塞性黄疸。

12）抗人球蛋白试验阳性，提示为自身免疫性溶血性贫血引起的黄疸。

腹胀

腹胀常为多种疾病的首发症状。正常人胃肠道内存在100～150毫升气体，分布于胃与结肠部位，当胃肠道存在过量的气体时，即称为腹胀。临床上常见于肠炎、痢疾、肝病、胰腺炎及消化道肿瘤等。

【检验项目选择】

血常规，便常规、培养，肝功能，血钾、钠、氯，血、尿淀粉酶测定，乙型肝炎抗原抗体测定，甲胎蛋白。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比升高，提示可能为急性或慢性胃肠炎。

2）便常规检查有大量白细胞和红细胞，提示为肠炎或细菌性痢疾。

3）肝功能检查丙氨酸氨基转移酶及麝香草酚浊度试验值均升高，提示为急性和慢性肝炎、肝硬化；胆红素脂升高，提示为各种肝胆疾病。

4）血、尿淀粉酶测定二者均升高，提示为急性胰腺炎。

惊厥

惊厥是小儿常见的急诊，尤多见于婴幼儿。由多种原因使脑神经功能紊乱所致。表现为突然的全身或局部肌群呈强直性和阵挛性抽搐，常伴有意识障碍。惊厥频繁发作或持续状态能危及生命或使患儿遗留严重的后遗症，影响小儿智力发育和健康。

【检验项目选择】

血常规，尿常规（包括尿糖），尿酮体试验，尿三氯化铁试验，便常规，血小板计数，血糖，肝功能，肾功能，血氨（必要时），血钾、钠、氯化物、钙、磷、镁测定，血气分析（必要时），脑脊液测压、常规、生化、细胞学检查、细菌学检查（必要时）。

【检验结果判定】

1）白细胞显著增多、中性粒细胞百分数增高，提示为细菌性感染。

2）白细胞分类（DC）检查中原始幼稚细胞增多，提示可能为脑膜白血病。

3）尿三氯化铁试验阳性，提示为苯丙酮尿症。

4）血糖降低，提示可能为低糖血症。

5）血钙降低，提示可能为低钙血症。

昏迷

昏迷即意识丧失，是脑功能的严重障碍，引起高级神经中枢的极度抑制状态。表现为意识丧失、运动、感觉及反射障碍、对外界刺激的反应消失。病变多波及双侧大脑半球或脑干。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，尿常规（包括尿糖），尿酮体试验，血糖，肝功能，肾功能，胆碱酯酶，血氨（必要时），一氧化碳定性，血钾、钠、氯化物，血气分析，脑脊液常规、生化、细胞学检查、细菌学检查（必要时）。

【检验结果判定】

1）白细胞显著增多，中性粒细胞百分数增高，常提示有中枢神经系统感染。

2）血糖增高、尿酮体试验阳性，常提示有内分泌系统疾患。

3）血糖低于1.68～1.96mmol/L，提示有中枢神经系统功能障碍。

4）血糖超过33.6mmol/L、尿糖强阳性、尿酮体阴性或弱阳性、血尿素氮（BUN）和肌酐（Cr）显著升高，提示为高渗性非酮症高血糖。

消瘦

由于体内脂肪与蛋白质减少，体重下降超过正常标准10%时，即称为消瘦。临床上常见于营养不良、慢性感染及恶性肿瘤等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规（包括尿糖），便常规、潜血，痰涂片检查，肝功能，肾功能，血糖，乙型肝炎抗原抗体测定，甲胎蛋白，甲状腺功能测定。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白降低，提示可能为各种贫血性疾病或营养不良。

2）尿常规检查尿中可见红细胞、白细胞及尿蛋白质阳性，提示可能为肾炎或肾功能不全。

3）便常规检查便中可见红细胞、白细胞增多，提示为慢性肠炎。

4）便潜血阳性，提示可能为消化道溃疡或肿瘤。

5）痰涂片找到结核杆菌，提示为肺结核。

6）血糖升高，提示为糖尿病。

7）肝功能检查：如丙氨酸氨基转移酶及麝香草酚浊度试验值升高，白蛋白与球蛋白比值小于1，提示为肝硬化。

8）甲状腺功能检查：血清总三碘甲状腺原氨酸、血清总甲状腺素、血清游离三碘甲状腺原氨酸及血清游离甲状腺素测定均升高，提示为甲亢。

肥胖

由于体内脂肪过多积聚，体重超过正常标准的20％时，即称为肥胖，分为单纯性和继发性。临床上所指的“肥胖”都是继发性的，是由某些疾病引起的。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，尿常规（包括尿糖），血糖，血胰岛素、C－肽测定，甲状腺功能检查，尿17－羟类固醇、17－酮类固醇。

【检验结果判定】

1）嗜酸粒细胞计数减少，提示为库欣综合征。

2）血糖明显降低，血胰岛素、C－肽测定脂明显升高，提示胰岛β细胞瘤。

3）甲状腺功能检查：血清总三碘甲状腺原氨酸、血清总甲状腺素下降，提示为甲状腺功能减退。

4）尿17－羟类固醇、17－酮类固醇升高，提示为皮质醇增多症。

闭经

月经开始的年龄是11～14 岁，也有早于11 岁，或迟过17 岁才开始的。月经的周期为24～35 天。最初几年可能不太规则，以后就渐渐趋于正常。疾病、紧张、过度的体力劳动都可能造成无月经状态，称闭经。

【检验项目选择】

血雌激素测定，卵泡刺激素测定，黄体生成素测定，甲状腺功能检查。

【检验结果判定】

1） 血雌激素测定、卵泡刺激素测定及黄体生成素测定：均降低，提示可能为垂体或下丘脑性闭经；雌激素测定降低，卵泡刺激素测定及黄体生成素测定值升高，提示为卵巢性闭经。

2） 甲状腺功能检查：血清总三碘甲状腺原氨酸、血清总甲状腺素、血清游离三碘甲状腺原氨酸及血清游离甲状腺素测定均升高，提示为甲状腺功能亢进引起的闭经；以上各值均降低，提示为甲状腺功能尖减退引起的闭经。

胸腔积液

脏层和壁层胸膜之间为一潜在的胸膜腔，在生理状态下，人体的胸膜内仅有微量液体起润滑作用。病理情况下，腔内液体增多，形成积液，称胸腔积液，也称胸水。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，尿常规，血、尿淀粉酶测定，血胆固醇测定，胸水检查。

【检验结果判定】

1） 血沉在结缔组织病、感染性、肿瘤性胸水时增快。

2） 尿常规、血胆固醇测定，有利于肾病综合征的判定。

3） 血、尿淀粉酶测定，对急性胰腺炎有确诊意义。

4） 胸水检查：

①胸水中的pH 值测定，对鉴别诊断有一定意义。癌性胸水pH 值多在7.40 左右；结核性胸水pH 值多为7.30～7.35 ；而脓胸、类风湿恶性循环胸水，pH 值多在7.20 以下。

②化脓菌感染的胸水中有大量的白细胞、脓细胞，涂片或培养可确定感染菌。

③胸水中有嗜酸性粒细胞明显增多，提示为过敏或寄生虫感染。

④多次检查胸水，可找到瘤细胞，提示为肿瘤引起的胸水。

⑤红细胞增高，提示为创伤、肿瘤或肺梗塞。

⑥结缔组织病胸水中，抗核抗体、类风湿因子、狼疮细胞可阳性，总补体降低。

⑦脓胸及类风湿恶性循环关节炎胸水中葡萄糖定量常低于1.1mmol/L。

⑧胰腺炎胸水中的淀粉酶含量，常高于血清水平。

腹水

在正常情况下，人体的腹腔仅有少量液体，主要起润滑作用，其产生和吸收经常处于动态平衡，任何病理原因加速其产生或减少其吸收时，就会出现积液，发生在腹腔的称腹水。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，尿常规，尿三胆，便常规、隐血试验，肝功能，肾功能，甲胎蛋白测定，腹水检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数显著增多，中性粒细胞百分数增高，提示有腹水感染。

2）便隐血试验阳性，提示可为肝硬化、肝癌、尿毒症等。

3）腹水检查：

①血性腹水：腹水呈不同程度的洗肉水样或镜检有大量红细胞，提示可能为结核性腹膜炎、出血坏死性胰腺炎、重症肝炎、急性门静脉血栓形成、肝癌破裂、异位妊娠或卵巢滤泡破裂等。

②癌性腹水：多呈血性，红细胞在5×10^9/L以上，蛋白含量较高，腹水白蛋白/血清白蛋白≥0.462，乳酸脱氢酶高于血清乳酸脱氢酶，葡萄糖含量降低，腹水葡萄糖/血清葡萄糖<1.0，癌胚抗原升高，甲胎蛋白阳性，提示多见于门静脉或肝静脉癌栓阻塞、肿瘤压迫下腔静脉阻塞、腹膜转移癌、胰腺癌、肾癌等。

③乳糜腹水：如腹水外观呈白色、乳状，比重1.012～1.018，蛋白含量>40g/L，以白蛋白为主，甘油三酯高于血浆水平，提示常见于腹腔肿瘤、淋巴管阻塞性疾病及外伤等；如腹水外观呈黄色、混浊，比重<1.012，蛋白含量为1～30g/L，以球蛋白为主，甘油三酯低于血浆水平，提示常见于慢性腹腔感染、门静脉肝硬化等。

④胰源性腹水：外观混浊，淀粉酶与脂肪酶均高于血清水平，提示常见于急性胰腺炎合并腹膜炎、慢性胰腺炎或胰腺囊肿、胰腺癌等。

⑤胆汁性腹水：外观呈胆汁样，提示见于胆囊结石穿孔。

⑥漏出液：外观清澈透明，静置不凝固，淡黄色，比重＜1.018，蛋白含量＜25g／L，细胞计数常少于0.25 ×10^9／L，主要为间皮细胞及少量淋巴细胞，腹水中电解质、葡萄糖、尿酸、尿素氮浓度与血浆中水平接近，提示常见于肝硬化、充血性心力衰竭、肾病综合征及营养不良等。

⑦渗出液：外观多呈草黄色，稍混浊或呈脓性，静置可凝固，比重＞1.018，蛋白含量＞25g／L，细胞计数＞0.5 ×10^9／L，提示常见于结核性腹膜炎、原发性腹膜炎、内脏穿孔合并腹膜炎、腹腔肿瘤合并腹膜转移等。

关节痛

关节痛是指关节周围肿胀、潮红、发热和运动受限。它往往不是一个独立的疾病，而是多种疾病的临床表现。常见于风湿性关节炎、化脓性关节炎、结核性关节炎、痛风、系统性红斑狼疮及关节外伤等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血沉，抗“O”试验，类风湿因子测定，24h 尿酸，血尿酸，乳酸脱氢酶（LDH），肌酸磷酸激酶（CPK），免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，提示可能为某些感染及类风湿性关节。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检尿中红细胞及白细胞增多，提示可能为红斑狼疮等。

3）血沉测定：血沉增快，提示可能为风湿热、骨关节结核、结缔组织病等。

4）抗“O”试验：阳性，提示为风湿热、结节性红斑狼疮等。

5）类风湿因子测定：阳性，提示为类风湿性关节炎、硬皮病等。

6）24h 尿尿酸及血尿酸测定：升高，提示为痛风。

7）乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸磷酸激酶（CPK）测定：升高，提示可能为多发性肌炎。

8）免疫球蛋白测定：免疫球蛋白A、G、M 升高，提示可能为结缔组织病。

多尿

24h 尿量大于2.5L 称为多尿。生理性多尿可见于饮水过多、精神紧张、失眠等；

病理性多尿可见于糖尿病、尿崩症、肾脏疾病等。

【检验项目选择】

尿常规，尿糖，血糖，血电解质测定，血抗利尿激素测定。

【检验结果判定】

1）尿常规检查：尿比重降低，提示可能为尿崩症引起的多尿。

2）尿糖及血糖测定：尿糖阳性，血糖升高，提示为糖尿病引起的多尿。

3）血电解质测定：血钙增高，提示可能为甲状旁腺功能亢进引起的多尿；血钾降低，提示为低血钾疾病引起的多尿。

4）血抗利尿激素测定：降低，提示为尿崩症性多尿。

呼吸衰竭

呼吸衰竭系呼吸功能严重障碍，除引起呼吸衰竭的原发症状外，主要是缺氧和二氧化碳潴留所致的多脏器功能紊乱的表现。如呼吸困难、紫绀、精神错乱、狂躁、昏迷、抽搐、多汗、血压升高及肾功能衰竭等。

【检验项目选择】

血常规，红细胞压积，尿常规，肝功能，肾功能，血气分析。

【检验结果判定】

1）红细胞计数增多，当动脉血氧饱和度低于85％时，可在血流量较大的口唇、指甲出现紫绀。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，尿中出现红细胞和管型，提示为肾功能衰竭。

3）血气分析：氧分压稍有下降，血氧饱和度急剧下降，动脉血氧分压（PaO_2）小于8kPa 可作为呼吸功能衰竭的诊断指标；血红蛋白减少，SaO_2 低于正常，血氧含量仍可在正常范围；动脉血二氧化碳分压（$PaCO_2$）＞6.65kPa 可作为呼吸功能衰竭诊断指标；酸碱度（pH）低于7.35 提示为失代偿性酸中毒，高于7.45 提示为失代偿性碱中毒；标准碳酸氢根（SB）下降，提示为代谢性酸中毒，升高，提示为代谢性碱中毒；实际碳酸氢根（AB）＞标准碳酸氢根（SB）时，表示有 CO_2 潴留；二氧化碳结合力（CO_2CP）降低，提示为代谢性酸中毒或呼吸性碱中毒时，升高，提示为代谢性碱中毒或呼吸性酸中毒。

贫血

指在一定容积的循环血液内红细胞计数、血红蛋白量以及红细胞压积均低于正常标

准者称为贫血。其中以血红蛋白最为重要，成年男性低于120g/L（12.0g/dl），成年女性低于110g/L（11.0/dl），一般可认为贫血。

临床上将贫血分为三大类：①红细胞生成减少，如再生障碍性贫血、缺铁性贫血、巨幼细胞性贫血等；②红细胞破坏过多，如各类溶血性贫血；③急性和慢性失血性贫血。

【检验项目选择】

血常规，红细胞比积，网积红细胞计数，平均红细胞容积（MCV）、平均红细胞血红蛋白量（MCH）及平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）的测定，血清铁测定，铁蛋白及总铁结合力测定，尿常规及隐血试验，便常规及隐血试验，肝功能，肾功能，血肌酐，骨髓检查，抗人球蛋白试验，血清三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定，血清总甲状腺素（T_4）测定。

【检验结果判定】

1）网积红细胞计数：降低，提示为再生障碍性贫血。

2）平均红细胞容积（MCV）、平均红细胞血红蛋白量（MCH）及平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）的测定：平均红细胞容积（MCV）、平均红细胞血红蛋白量（MCH）增高，提示为巨幼细胞性贫血；平均红细胞容积（MCV）、平均红细胞血红蛋白量（MCH）及平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）均正常，提示可为急性失血性贫血、溶血性贫血及再生障碍性贫血等；平均红细胞容积（MCV）及平均红细胞血红蛋白量（MCH）降低，提示为慢性炎症性贫血、肾性贫血；平均红细胞容积（MCV）、平均红细胞血红蛋白量（MCH）及平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）均降低：提示为缺铁性贫血、铁幼粒细胞性贫血、珠蛋白生成障碍性贫血及慢性失血性贫血。

3）血涂片检查：如查到球形红细胞，提示可为溶血性贫血；查到靶形红细胞，提示可为地中海贫血、溶血性贫血及缺铁性贫血等；见到无红细胞大小不均，提示为巨幼细胞性贫血；查到嗜多色性红细胞，提示为各种增生性贫血特别是急性溶血性贫血；查到嗜碱性点彩红细胞，提示为铅中毒及巨幼细胞性贫血；查到卡－波环，提示为严重贫血、溶血性贫血、巨幼细胞性贫血、铅中毒及白血病时；查到豪－周氏小体，提示为溶血性贫血、巨幼细胞性贫血及其他增生性贫血。

4）尿隐血试验阳性，提示为阵发性睡眠性血红蛋白尿引起的贫血。

5）便隐血试验阳性，提示为失血引起的贫血。

6）血清铁测定、铁蛋白及总铁结合力测定：血清铁及铁蛋白降低，总铁结合力增高，提示为缺铁性贫血。

7）肾功能检查：血尿素氮及肌酐均升高，提示为肾功能不全或尿毒症引起的贫血。

8）抗人球蛋白试验阳性，提示为自身免疫性溶血性贫血。

9）血清三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定、血清总甲状腺素（T_4）测定：均降低，提示为甲状腺功能低下引起的贫血。

淋巴结肿大

由于某些细菌感染、肿瘤、结缔组织病等原因，而引起分布在颌下、颈下、腋下及腹股沟等处的浅表淋巴结明显肿大，并有不同程度的压痛，称为淋巴结肿大。

【检验项目选择】

血常规，便隐血试验，嗜异性凝集试验，布氏杆菌凝集试验，补体测定，旧结核菌素试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比增高，提示为各种细菌感染引起的淋巴结肿大。

2）红细胞计数及血红蛋白降低，提示可能为恶性组织细胞病引起的淋巴结肿大。

3）血涂片出现原始或幼稚白细胞，提示为白血病引起的淋巴结肿大；出现异型淋巴细胞，提示可能为传染性单核细胞增多症引起的淋巴结肿大。

4）嗜酸粒细胞百分比增高，提示为变态反应引起的淋巴结肿大。

5）便隐血试验阳性，提示可能为消化道肿瘤淋巴结转移。

6）嗜异性凝集试验阳性，提示可能为传染性单核细胞增多症引起的淋巴结肿大。

7）布氏杆菌凝集试验阳性，提示为布鲁菌病引起的淋巴结肿大。

8）补体测定：补体C_3、C_4均升高，提示可能为各种传染病、急性炎症引起的淋巴结肿大。

9）旧结核菌素试验阳性提示为结核病引起的淋巴结肿大。

鼻出血

鼻出血是指血液从鼻腔内流出，是由于鼻部疾病引起，也可能由全身其他疾病所引起。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，肝功能，肾功能。

【检验结果判定】

1）白细胞计数明显升高，血涂片可见幼稚细胞，提示为白血病引起的鼻出血。

2）白细胞计数、红细胞计数及血小板计数均下降，提示为再生障碍性贫血引起的鼻出血。

3）血小板计数明显降低，提示为血小板减少性紫癜引起的鼻出血。

4）肝功能检查：谷丙转氨酶（ALT）、浊度试验阳性，白蛋白与球蛋白比值倒置，提示为肝硬化引起的鼻出血。

5）肾功能检查：血尿素氮及肌酐均升高，提示为慢性肾功能不全或尿毒症引起的鼻出血。

第二章　呼吸系统疾病

流行性感冒

流行性感冒简称流感，是流行性感冒病毒引起的常见急性呼吸道传染病，传播力强，常呈地方性流行，当人群对新的流感病毒变异株尚缺乏免疫力时，可酿成世界性大流行，其特点为突然发生与迅速传播。主要临床表现为突发高热、头痛、咳嗽、咽痛、全身酸痛、乏力及呼吸道炎症等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血凝抑制试验，鼻黏膜细胞荧光抗体染色检查，中和试验，补体结合试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数多正常或偏低。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检尿中可见少数红细胞及白细胞，热退后很快消失。

3）鼻黏膜细胞荧光抗体染色检查：阳性，有诊断意义。

4）血凝抑制试验、中和试验、补体结合试验：痊愈期血清抗体滴度超过初期滴度4倍以上有诊断价值，阳性率一般可达60％～80％。

急性气管－支气管炎

急性气管支气管炎是由感染、物理、化学刺激或过敏引起的气管－支气管黏膜的急性炎症。临床主要症状有咳嗽和咳痰。常见于寒冷季节或气候突变时节。也可由急性上呼吸道感染迁延而来。

【检验项目选择】

血常规，尿常规。

【检验结果判定】

白细胞计数多增高。

慢性支气管炎

慢性支气管炎（简称慢支）是指气管、支气管黏膜及其周围组织的慢性非特异性炎症。临床上以咳嗽、咳痰或伴有喘息及反复发作的慢性过程为特征。病情若缓慢进展，常并发阻塞性肺气肿，甚至肺动脉高压、肺原性心脏病。它是一种严重危害人民健康的常见病，尤以老年人多见。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞计数，痰涂片、培养及药物敏感试验。

【检验结果判定】

1）慢支急性发作期或并发肺部感染时白细胞计数及中性粒细胞百分比增高。

2）喘息型嗜酸性粒细胞可增多。

3）痰涂片可见大量中性粒细胞、脓细胞或嗜酸性粒细胞及革兰阳性球菌或阴性杆菌。

4）痰培养可见肺炎球菌、流感嗜血杆菌、甲型链球菌及奈瑟球菌等。

阻塞性肺气肿

阻塞性肺气肿，由慢性支气管炎或其他逐渐引起的细支气管狭窄，终末细支气管远端气腔过度充气，并伴有气腔壁膨胀、破裂而产生，临床上多为慢支的常见并发症，主要病因是吸烟。

【检验项目选择】

血常规，血气分析，痰培养及药物敏感试验。

【检验结果判定】

1）早期有或无低氧血症。

2）后期有低氧血症和高碳酸血症，动脉血氧分压（PaO_2）降低，二氧化碳分压（$PaCO_2$）升高，并可出现失代偿性呼吸性酸中毒，pH 值降低。

慢性肺原性心脏病

慢性肺原性心脏病是由于肺、胸廓或肺动脉血管慢性病变所致的肺循环阻力增加、

肺动脉高压、进而使右心肥厚、扩大，甚至发生右心衰竭的心脏病。患病年龄多在40岁以上，随着年龄增长而患病率增高。急性发作以冬、春季多见。临床表现为心悸、气急、紫绀，病情加重时，可见颈静脉怒张、肝肿大、浮肿、腹水等。

【检验项目选择】

血常规，血气分析，肾功能，肝功能，血钾、钠、氯、钙、镁，痰培养及药物敏感试验。

【检验结果判定】

1）合并感染时，白细胞总数及中性粒细胞百分比增高。

2）肝功能检查丙氨酸氨基转移酶可升高。

3）肺心病肺功能失代偿期可出现低氧血症或合并高碳酸血症，当PaO_2 <8.0kPa（60mmHg）、$PaCO_2$ >6.6kPa（50mmHg），表示有呼吸衰竭。

支气管哮喘

支气管哮喘（简称哮喘），是一种以过敏原或非过敏因素引起的气道变应性炎症和气道高反应性为特征的疾病。易感者对此类炎症表现为不同程度的可逆性气道阻塞症状。临床上表现为反复发作性伴有哮鸣音的呼气性呼吸困难、胸闷或咳嗽，可自行或治疗后缓解。若长期反复发作可使气道（包括胶原纤维、平滑肌）重建，导致气道增厚与狭窄，成为阻塞性肺气肿。

全球约有1.6亿患者，各地患病率约1%～5%不等，我国患病率接近1%，半数在12岁以前发病，成人男、女患病率大致相同。约20%的患者有家族史。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞计数，痰涂片、培养及药物敏感试验，免疫球蛋白。

【检验结果判定】

1）如并发感染可有白细胞总数及中性粒细胞百分比增高。

2）急性发作时可有嗜酸性粒细胞增高。

3）痰涂片镜检可见大量白细胞、嗜酸性粒细胞及夏科雷登晶体。

4）痰培养可培养出致病菌。

5）外源性哮喘免疫球蛋白IgE增高。

支气管扩张症

支气管扩张症是常见的慢性支气管化脓性疾病，大多数继发于呼吸道感染和支气管阻塞，尤其是儿童和青年时期麻疹、百日咳后的支气管肺炎，由于破坏支气管管壁，形成管腔扩张和变形。临床表现为慢性咳嗽伴大量脓痰和反复咯血。随着人民生活的改善，麻疹、百日咳疫苗的预防接种，以及抗生素的临床应用，已使本病的发病率大为减少。

【检验项目选择】

血常规，痰涂片、培养及药物敏感试验。

【检验结果判定】

1）白细胞总数及中性粒细胞百分比增高。

2）痰涂片有大量细菌，厌氧菌培养阳性。

3）如经常咯血不止，要做血型及交叉试验备用。

成人呼吸窘迫综合征

成人呼吸窘迫综合征（ARDS）是急性呼吸衰竭的一种类型。是由于肺外或肺内的严重疾病过程引起肺脏血管与组织间液体运行功能紊乱、肺微血管壁通透性增加，肺间质及肺泡水肿，肺表面活性物质缺乏，肺泡壁萎缩。这些改变使通气/血流比例失常，肺静动脉分流增大，导致严重低氧血症和极度呼吸困难。因其临床类似婴儿呼吸窘迫征，而它们的病因和发病机制不尽相同，故用“成人”，以示区别。

ARDS起病急骤，发展迅猛，如不及早诊治，其病死率高达50％以上（45％～90％），常死于多脏器功能衰竭。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，血培养及药物敏感试验，血钾、钠、氯化物，血气分析。

【检验结果判定】

动脉血氧分压（PaO_2）＜8.0kPa（60mmHg），早、中期动脉血二氧化碳分压$PaCO_2$＜4.67kPa（35mmHg）或正常，肺泡气与动脉血氧分压差（$PA-aDO_2$）吸空气时＞4.0kPa（30mmHg），吸纯氧时＞13.3kPa（100mmHg）。

肺炎球菌肺炎

肺炎球菌肺炎是由肺炎球菌或称肺炎链球菌所引起，占院外感染肺炎中的半数以上。肺段或肺叶呈急性炎性实变，患者有寒战、高热、胸痛、咳嗽和血痰等症状。近年来由于抗菌药物的广泛应用，临床上轻症或不典型病较为多见。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，血气分析，痰涂片、培养及药物敏感试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数、中性粒细胞百分比多增高，并可见核左移或毒性颗粒，年老体弱、酗酒、免疫低下者的白细胞计数常不增高，但中性粒细胞百分比仍增高。

2）痰涂片检查有大量中性粒细胞和革兰阳性成对或短链状球菌，在细胞内者更有意义。

3）血气分析PaO_2及$PaCO_2$下降。

巨细胞病毒肺炎

巨细胞病毒肺炎是由于巨细胞包涵体病毒感染而引起的肺部疾病，在先天性或后天性病例中大多数症状不明显，出现症状者称为巨细胞包涵体病，巨细胞病毒肺炎是这类病的一个组成部分。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，间接血凝抑制及补体结合试验，呼吸道分泌物及尿培养，酶联免疫吸附试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数多正常或偏低。

2）尿常规检查：尿沉渣涂片后可找到有包涵体的巨细胞。

3）呼吸道分泌物及尿培养：应用人胚肺纤维母细胞可从患者呼吸道分泌物及尿培养分离出巨细胞病毒。

4）间接血凝抑制及补体结合试验：抗体滴度可升高。

酶联免疫吸附试验（ELISA）：测定巨细胞病毒CMVIggM 或IgG 抗体，CMV －IgM 抗体阳性表示近期感染，有诊断价值；单份血CMV －IgG 抗体阳性表示既往感染，而急性期和恢复期双份血清CMV －IgG 抗体效价呈大于4 倍增高时有诊断意义，表示有近期感染。

肺脓肿

肺脓肿是由于多种病原菌引起的肺部化脓性感染，早期为肺组织的感染性炎症，继而坏死、液化、外周有肉芽组织包围形成脓肿。临床特征为高热、咳嗽，脓肿破溃进入支气管后咳出大量脓臭痰。多发生于壮年，男多于女。自抗生素广泛应用以来，发病率有明显降低。

【检验项目选择】

血常规，血培养，痰液检查，痰涂片、培养及药物敏感试验，痰军团菌培养。

【检验结果判定】

1）急性肺脓肿血白细胞总数可达（20～30）×10^9/L，中性粒细胞在90％以上，核明显左移，常有中毒颗粒。

2）慢性白细胞可稍升高或正常，红细胞和血红蛋白减少。

3）痰液外观呈脓性、黄绿色，可有血性，放置后可分为三层，上层为粘液泡沫，中层为降液，底层为大量脓渣。

4）痰涂片可见大量白细胞、脓细胞及细菌，痰培养可有致病菌生长。

5）如痰涂片可见大量细菌，而普通培养阴性，多为厌氧菌感染，行厌氧菌培养可获阳性结果。

肺结核

肺结核是由结核杆菌引起的一种慢性肺部感染性疾病，有发热、盗汗、食欲减退、乏力、体重减轻、月经紊乱、精神不振或易于激动等全身中毒性症状和咳嗽、咯血、胸痛、呼吸困难等呼吸系统症状。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，血沉，痰涂片查结核杆菌、培养，结核菌素试验，血清抗结核抗体测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数可降低，见于急性粟粒性血行播散型肺结核。

2）红细胞计数及血红蛋白降低，见于慢性肺结核。

3）血沉增快，见于活动性肺结核。

4）痰涂片查到结核杆菌可明确诊断。

5）结核菌素试验可为阳性。

6）血清抗结核抗体测定，阳性率为62％～94％，有辅助诊断意义。

结核性胸膜炎

结核性胸膜炎临床上已排除其他原因引起的胸膜炎，包括结核性脓胸。多为肺结核的并发症，是靠近肺表面的结核病灶溃破进入胸膜腔后合并的感染。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，血沉，胸水常规、生化及培养。

【检验结果判定】

1）胸水常规检查细胞数多在10 $\times 10^9/L$ 以上，可见大量脓细胞。

2）胸水涂片可找到结核杆菌，细菌培养阳性率较高。

军团病肺炎

军团病是由嗜肺军团杆菌引起的以肺炎为主的急性感染性疾病。有时可发生暴发流行。病原菌主要来自土壤和污水，由空气传播，自呼吸道侵入。军团病起病急骤，高热伴寒战，恶心呕吐，有时伴腹痛与水样腹泻，2～3d 后出现干咳，胸痛，偶带血丝，但很少有脓性痰。重者还有气急、呼吸困难和意识障碍。病死率约15％。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，血钾钠氯化物，血气分析，直接或间接荧光抗体试验，痰军团病多链聚合酶（PCR）检查，血、痰、胸液军团菌培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数增高。

2）肝功能检查丙氨酸氨基转移酶可升高。

3）肾功能检查血尿素氮增高。

4）直接或间接荧光抗体试验阳性。

5）血、痰、胸液军团菌培养有嗜肺军团菌生长可获确定诊断。

老年肺炎

老年肺炎常缺乏明显呼吸系症状，症状多不典型，病程进展快，临床体征可出现脉

速、呼吸快，胸部听诊可闻及湿性罗音，或伴有呼吸音减弱及支气管肺泡呼吸音。老年肺炎易发生水、电解质紊乱，酸中毒。因并发慢性病者较多，易发生多脏器功能衰竭，死亡率高。

【检验项目选择】

血常规，C 反应蛋白阳性，血沉，血气分析。

【检验结果判定】

1）血常规检查白细胞总数可增高或不高，但半数以上可见核左移。

2）大多数C 反应蛋白阳性。

3）血沉可增快。

4）合并慢性阻塞性肺疾病时，因肺泡换气不良二氧化碳分压升高。

特发性肺纤维化

特发性肺纤维化病因未明，弥散性肺间质纤维化局限于肺部。均属急性型，进展急剧，有发热、咳嗽、胸闷、胸部紧迫感或胸痛和呼吸困难等。本病多在40～50 岁发病，男性稍多于女性，是遍及全世界的疾病，近10 年来发病率及病死率皆升高，绝大多数为慢性型，发病年龄越高，病程越长。急性型罕见。近年多数学者认为系自身免疫性疾病，可能与遗传因素有关。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞计数，血沉，血清蛋白电泳，免疫球蛋白，抗核抗体，类风湿因子，补体C_3、C_4，血气分析，查红斑狼疮细胞，痰涂片、培养。

【检验结果判定】

1）嗜酸性粒细胞计数可增高。

2）血沉可增快。

3）免疫球蛋白IgA 、IgE 、Ig 增高。

4）抗核抗体、类风湿因子可阳性。

5）补体C_3、C_4 可降低。

6）可查到红斑狼疮细胞。

7）痰涂片可查到嗜酸性粒细胞、癌细胞及含铁血黄素吞噬细胞。

矽肺

矽肺是尘肺中最为常见的一种类型，是由于长期吸人大量含有游离二氧化硅粉尘所引起，以肺部广泛的结节性纤维化为主的疾病。因肺组织代偿能力强，早期患者肺功能损害不明显。随着肺纤维化增多，肺弹性减退，可出现限制性通气改变，严重时影响呼吸功能，丧失劳动能力。

【检验项目选择】

肝功能，肾功能，血清免疫球蛋白测定，血清铜蓝蛋白测定，痰培养及药物敏感试验，血气分析。

【检验结果判定】

1）免疫球蛋白IgE 可增高

2）血清铜蓝蛋白升高。

3）痰培养可培养出致病菌。

结节病

结节病是一种多系统多器官受累的肉芽肿性疾病。常侵犯肺、双侧肺门淋巴结，临床上90％以上有肺的改变，其次是皮肤和眼的病变，浅表淋巴结、肝、脾、肾、骨髓、神经系统、心脏等几乎全身每个器官均可受累。本病为一种自限性疾病，大多预后良好，有自然缓解的趋势。

【检验项目选择】

血常规，血沉，肝功能，肾功能，血清蛋白电泳，血清碱性磷酸酶，血钾、钠、氯、钙测定，尿钙测定，血清血管紧张素转换酶（ACE）测定，血气分析。

【检验结果判定】

1）白细胞计数减少。

2）血红蛋白下降。

3）血钙、尿钙升高。

4）血尿素氮升高。

5）血清血管紧张素转换酶（ACE）测定明显升高。

肺栓塞

肺栓塞是由于血凝块阻塞肺动脉或其分支的肺部疾患，栓子的主要来源为下肢深静脉、盆腔静脉或右心脱落的血栓。肺栓塞时，肺实质可以正常或形成肺梗塞、肺不张和肺泡出血。临床表现突然出现呼吸困难，剧烈胸痛、咯血，甚至晕厥等症状。有腹腔手术或长期卧床史。

【检验项目选择】

血常规，出、凝血时间，血浆纤维蛋白原降解产物，血浆纤溶酶－抗纤溶酶复合物测定，肝功能，肾功能，心肌酶谱，血液流变学，血气分析。

【检验结果判定】

1）白细胞计数正常或增高。

2）血红蛋白增高。

3）纤维蛋白原降解产物增高。

4）血浆纤溶酶－抗纤溶酶复合物增高。

5）心肌酶谱测定谷草转氨酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）及磷酸肌酸激酶（CPK）增高。

6）血气分析肺泡氧分压与动脉血氧分压差增大。

肺炎支原体肺炎

肺炎支原体肺炎是由肺炎支原体所引起的呼吸道感染，有咽炎、支气管炎和肺炎。肺炎支原体经口、鼻的分泌物在空气中传播，引起散发的呼吸道感染或者小流行。

本病约占非细菌性肺炎的1/3 以上，或各种原因引的肺炎的10％。常于秋季发病。病人中儿童和青年人居多，婴儿有间质性肺炎时应考虑支原体肺炎的可能性。

【检验项目选择】

血常规，血沉，血冷凝集试验，血清特异性补体结合试验，血清特异性抗体测定，链球菌MG 凝集试验阳性。

【检验结果判定】

1）白细胞总数正常或稍增多，中性粒细胞百分比增加。

2）冷凝集试验多数阳性。

3）链球菌MG 凝集试验半数病人阳性。

克雷白杆菌肺炎

肺炎克雷白杆菌肺炎是由肺炎克雷白杆菌引起的急性肺部炎症，多见于老年、营养不良、慢性酒精中毒、已有慢性支气管－肺疾病和全身衰竭的患者。本病起病急剧，有高热、咳嗽、痰量多和胸痛，可有紫绀、气急、心悸，约半数患者有畏寒，可早期出现休克。病死率较高。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，痰培养及药敏试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数多数增加，但也可正常或减少。中性粒细胞增高可不明显，但有核左移或中毒颗粒。

2）痰涂片或培养可找到革兰阴性杆菌。

葡萄球菌肺炎

葡萄球菌肺炎是由葡萄球菌所引起的急性肺部化脓性感染。病情较重，常发生于免疫功能已经受损的病人，如糖尿病、血液病（白血病、淋巴瘤、再障等）、艾滋病、肝病、营养不良、酒精中毒以及原已患有支气管－肺病者。儿童患流感或麻疹时，葡萄球菌可经呼吸道而引起肺炎，若未予恰当治疗，病死率较高。皮肤感染灶（痈、疖、毛囊炎、蜂窝组织炎、伤口感染）中的葡萄球菌亦可经血循环而产生肺部感染，细支气管往往受阻而伴发气囊肿，尤多见于儿童患者。脓肿可以溃破而引起气胸、脓胸或脓气胸，有时还伴发化脓性心包炎、胸膜炎等。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，痰培养及药敏试验，血培养及药敏试验，血钾、钠、氯化物，血气分析。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，中性粒细胞百分比增加，核左移并有中毒性颗粒。

2）痰培养阳性，有诊断意义。

单纯性肺嗜酸粒细胞浸润症

单纯性肺嗜酸粒细胞浸润症亦为寄生虫和药物所引起的变态反应，在肺间质、肺泡壁及终末细支气管壁有嗜酸粒细胞浸润灶，可无临床症状，轻咳少量粘液痰，胸部X线示小片或大片模糊阴影，呈游走性。一般无需治疗。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，痰涂片、培养，夜间抽血查微丝蚴，便浓集查虫卵。

【检验结果判定】

1）嗜酸性粒细胞计数可增高。

2）痰涂片可见较多嗜酸粒性细胞。

哮喘型肺嗜酸粒细胞增多症

哮喘型肺嗜酸粒细胞增多症是以曲菌为主所致的反复哮喘发作为特征的变态反应。在肺泡和间质有多量嗜酸粒细胞浸润，终末细支气管扩张并充满稠性粘痰。可找到真菌丝。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血清IgE、IgM、IgG 测定，痰涂片常规及查曲菌菌丝，痰真菌培养，血清曲菌沉淀抗体测定。

【检验结果判定】

1）嗜酸性粒细胞计数可增高。

2）痰涂片可见较多嗜酸粒性细胞。

3）血清曲菌沉淀抗体测定有80％阳性。

热带嗜酸粒细胞增多症

热带嗜酸粒细胞增多症为丝虫等感染所致，肺部嗜酸粒细胞和组织细胞浸润，可呈支气管肺炎分布，伴小支气管坏死和嗜酸性脓肿。有哮喘样发作性剧咳、痰少，不易咳出，感胸闷、乏力、体质差。经抗丝虫药治疗后，症状数天缓解，肺部病变较慢消失。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，免疫球蛋白IgE、IgM、IgG 测定，夜间抽血查微丝蚴，便浓集查虫卵，丝虫补体结合试验，冷凝集试验。

【检验结果判定】

1） 嗜酸性粒细胞计数可增高。

2） 痰涂片可见较多嗜酸性粒细胞。

3） 抽血查微丝蚴可呈阳性。

4） 丝虫补体结合试验可呈阳性。

5） 冷凝集试验效价可升高。

肺念珠菌病

支气管肺念珠菌病是一种常见的肺真菌病，由念球菌属（主要是白色念珠菌）感染所致。本病多为继发性感染，在人体抵抗力降低的情况下发病。临床上可分为3 型：①支气管炎型；②肺炎型；③过敏型。

【检验项目选择】

血常规，痰涂片，痰真菌培养。

【检验结果判定】

1） 痰涂片可见大量嗜酸性粒细胞、真菌的菌丝和芽孢。

2） 痰真菌培养阳性有诊断意义。

肺曲霉病

肺曲霉病大多数是在原有肺部疾患的基础上或因长期使用抗生素和激素后继发感染。临床上分4 型：①肺曲霉球；②变态反应性曲霉病；③支气管－肺炎型曲霉病；④继发性肺曲霉病。主要表现为咳嗽、咳痰和反复咯血。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞计数，痰涂片，痰真菌培养，曲霉抗原皮肤试验及血清沉淀试验。

【检验结果判定】

1） 嗜酸性粒细胞计数升高。

2） 痰涂片或培养可发现曲霉菌丝或孢子。

3）曲霉抗原皮肤试验及血清沉淀试验阳性。

肺吸虫病

肺吸虫病是主要寄生于肺部的慢性地方性寄生虫病，亦可由成虫、虫卵的异位寄生或侵入脑、脊髓、腹腔、肠、肾、皮下等组织，产生相应的症状，因此本病是一种全身性疾病。临床上有轻度发热、盗汗、疲乏、食欲不振、咳嗽、胸痛、咯棕红色果酱样痰等症状。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞计数，痰涂片或24h 浓缩法找肺吸虫卵，肺吸虫成虫抗原皮内试验，肺吸虫补体结合试验，脑脊液补体结合试验。

【检验结果判定】

1）嗜酸性粒细胞明显增多。

2）痰直接涂片或24h 浓缩法找到肺吸虫卵者可确诊（四川肺吸虫病痰中可找不到虫卵）。

3）肺吸虫成虫抗原皮内试验阳性。

4）肺吸虫补体结合试验阳性。

第三章　肿　　瘤

食管癌

食管癌是发生在食管上皮组织的恶性肿瘤，估计全世界每年约有20 万人死于食管癌。男多于女，发病年龄多在40 岁以上。早期无吞咽困难，但有的病例可有咽下食物梗阻感，胸骨后针刺样疼痛或烧灼和食管内异物感。随病情发展，症状逐渐加重。

当癌肿引起的食管痉挛、水肿及炎症消退，或部分癌肿脱落后，梗阻症状可暂时减轻。持续胸痛或背痛多表示癌已侵犯食管外组织。如侵犯喉返神经，可发生声音嘶哑；癌肿侵入主动脉，可引起大呕血；如侵入气管，形成食管气管瘘，或由于高度阻塞致食物返流入呼吸道，可引起进食时呛咳及肺部感染。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，肝功能，肾功能，血电解质，便隐血试验。

【检验结果判定】

1） 血红蛋白进行性降低。

2） 血钾、钠、氯化物减低。

肺癌

肺癌是最常见的肺部原发性恶性肿瘤，是一种严重威胁人民健康和生命的疾病。半个世纪以来世界各国肺癌的发病率和死亡率逐渐上升，尤其在发达国家。本病多在40 岁以上发病，高峰发病年龄在60 ～79 岁之间。男女患病率为2.3 ∶1 。种族、家属史与吸烟对肺癌的发病均有影响。临床表现为顽固性咳嗽、咯血、胸痛、胸闷、气急、发热、喘鸣、消瘦及恶病质等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血沉，肝功能，肾功能，血气分析，血电解质，血清碱性磷酸酶（AKP），血清转铁蛋白，血清癌胚抗原（CEA），血清乳酸脱氢酶（LDH），痰涂片、培

养及药物敏感试验，脑脊液常规、生化、找癌细胞（必要时），胸水常规、生化、找癌细胞（必要时）。

【检验结果判定】

1）痰涂片找癌细胞，阳性率可达60％～90％。

2）血清转铁蛋白可降低。

3）血清癌胚抗原可增高。

4）血清乳酸脱氢酶（LDH）可增高。

胃癌

胃癌是消化道恶性肿瘤中最多见的癌肿，胃癌的发病率在不同国家，不同地区差异很大。日本、智利、芬兰等为高发国家，而美国、新西兰、澳大利亚等国家则发病较低，两者发病率可相差10倍以上。我国也属胃癌高发区，其中以西北地区最高，东北及内蒙古次之，华北华东又次之，中南及西南最低。本病的检出率有逐年增多的趋势。

胃癌多发于40岁以上，41～60岁者约占2/3，男女之比约为3.6∶1。临床表现为早期有上腹不适、隐痛、消化不良、食欲不振、厌食肉类，晚期有进行性消瘦、贫血、低热、食欲消失、低蛋白血症致全身浮肿。

【检验项目选择】

血常规，血沉，便常规、隐血试验，胃液检查，血清胃泌素测定，血清癌胚抗原（CEA）。

【检验结果判定】

1）血液检查呈小细胞低色素性贫血。

2）血沉大多增快。

3）便隐血试验多持续阳性。

4）胃液可混有血液或呈咖啡色样沉渣，乳酸、乳酸脱氢酶、β葡萄糖醛酸酶增高。

5）血清胃泌素显著升高。

6）血清癌胚抗原（CEA）可呈阳性。

原发性肝癌

原发性肝癌可分为肝细胞型，胆管细胞型和混合型3种类型，其中绝大多数为肝细

胞型。原发性肝癌为我国常见恶性肿瘤之一。死亡率在恶性肿瘤中居第三位，仅次于胃癌和食管癌。流行病学调查，肝癌的病死率地理差别很大。据世界卫生组织统计，在世界范围内肝癌死亡率列第五位。

临床表现为上腹部不适、隐痛、食后闷胀、腹内肿块、肝脾肿大、黄疸、腹水、尿黄等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，出、凝血时间，凝血酶原测定，肝功能，肾功能，血清碱性磷酸酶，γ－谷氨酰转肽酶（γ－GT）同工酶，血清铁蛋白（SF），α_1 抗胰蛋白酶（α_1－AT），甲胎蛋白（AFP），腹水涂片、生化检查。

【检验结果判定】

1）甲胎蛋白检测对诊断原发性肝癌有较强的敏感性与特异性，其阳性率为70％左右。

2）血清铁蛋白虽非特异性，但除肝癌、胰腺癌中度升高外，其他消化道肿瘤如食管癌、胃癌、直肠癌均不升高，阳性率为66％。肝癌患者治疗有效者血清铁蛋白下降，而恶化和再发者升高，持续增高则预后不良，故血清铁蛋白测定可作为疗效监测手段之一，特别是对AFP 阴性的患者尤有意义。

3）α_1 抗胰蛋白酶（α_1AT）测定，肝癌的阳性率为65％。

4）γ－谷氨酰转肽酶（γ－GT）同功酶测定，肝癌的阳性率为50％。

5）凝血酶原测定，肝癌的阳性率为72％。

心脏粘液瘤

心脏粘液瘤是临床上最常见的心脏原发性肿瘤，多属良性，恶性者少见。粘液瘤可发生于所有心脏的心内膜面，95％发生于心房，约75％位于左心房，20％位于右心房，左、右心室各占2.5％。左心房粘液肿瘤常发生于卵圆窝附近，临床上常因瘤体堵塞二尖瓣口，导致二尖瓣口狭窄或关闭不全，粘液瘤可发生于任何年龄，但最常见于中年，以女性多见。

【检验项目选择】

血常规，血沉，血清蛋白电泳。

【检验结果判定】

1）血红蛋白降低。

2）血沉可增快。

3）血清蛋白电泳 α_2 及β球蛋白增高。

乳腺癌

乳房的恶性肿瘤绝大多数系源于乳腺的上皮组织（乳癌），少数可源自乳房的各种非上皮组织（各种肉瘤），偶可见到混合性的癌肉瘤。为妇科常见病、多发病，常见于40～60岁的妇女，30岁以下的女性发病机会较少，20岁左右的青年女子多数为良性纤维腺瘤。

乳腺癌早期为无痛的单发小肿块、质硬、表面不平滑、境界不清楚、活动性差、或与皮肤粘连，使皮肤凹陷，乳头下陷或移位。晚期癌肿块侵入胸肌筋膜，并与之固定，肿块不易移动。进一步发展，形成皮肤水肿并呈橘皮样改变，以后发生溃破、出血，扩散至乳房及其周围皮肤、腋窝，锁骨上淋巴结则发生很多硬的小结节并肿大。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，肝功能，肾功能，血清酸性磷酸酶（ACP），血清癌胚抗原（CEA），组织多肽抗原（TPA）。

【检验结果判定】

1）血清酸性磷酸酶（ACP）可升高。

2）血清癌胚抗原（CEA）可增高。

3）组织多肽抗原（TPA）可增高。

大肠癌

大肠癌包括直肠与结肠部分癌瘤，直肠癌发生的原因，到当前为止仍然不十分明了，不过多数认为可能与食物或遗传有关。在食物方面，由于人们对肉类、蛋白质、脂肪的摄取量提高很多，大肠癌有明显增加的趋势。遗传方面，肠癌病人的家族人群患癌的机会比一般人高。总之，肠癌的形成是由许多因素造成的，绝对不是由单一因素所导致的，而且它是由多种步骤演变而成。

临床上主要表现为腹部肿块、腹胀、腹痛、大便脓血或大便变形等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，便常规、隐血试验，肝功能，肾功能，血电解质，血清癌胚抗原（CEA）测定。

【检验结果判定】

1）血红蛋白可降低。

2）定期做便隐血试验，对早期发现大肠癌有着重要的意义。

3）血清癌胚抗原（CEA）增高，原发性结肠癌阳性率为45％～80％。

前列腺癌

前列腺癌是男性生殖系常见的恶性肿瘤。前列腺癌的发病率在国内外有很大差别。欧美各国发病率较高，东方发病率比较低。但是，近几年，在我国的发病率有上升的趋势。临床表现尿频、尿急、排尿不畅、尿流变细变慢，严重时可出现血尿、尿痛、尿潴留等。

【检验项目选择】

尿常规，尿液涂片找前列腺癌细胞，前列腺液检查，血清酸性磷酸酶（ACP），血清碱性磷酸酶（ALP），前列腺特异抗原（PSA），血清精浆蛋白（f－Sm）测定，血清肌酸激酶（CK－BB）测定，血清癌胚抗原（CEA），骨髓酸性磷酸酶（BMAP）测定。

【检验结果判定】

1）前列腺液检查白细胞、红细胞增多。

2）酸性磷酸酶（ACP）、碱性磷酸酶均可升高。

3）血清精浆蛋白（f－Sm）和前列腺特异抗原（PSA）在前列腺癌和转移时均可升高。

4）血清肌酸激酶（CK－BB）89％可出现阳性，治疗后可消失。

胰腺癌

胰腺癌大约占人类全部癌症发病率的3％，占全部癌病死亡率的5％左右。多数胰腺癌发生在65岁以后。吸烟是惟一已知的致病危险因素，可以增加胰腺癌的发病机会达2～3倍。胰腺癌的发病还与高胆固醇、高脂肪饮食以及与接触环境中某些化学致癌物有关。

病人可出现厌食、体重减轻、放射性背痛、黄疸、肝脾和胆囊肿大等症状。

【检验项目选择】

便常规、隐血试验，尿三胆，肝功能，血清碱性磷酸酶（ALP），γ－谷氨酰转酞酶（γ－GT），亮氨酸氨基肽酶（LAP），脂蛋白－X（LP－X），血、尿淀粉酶，脂肪酶测

定，血清胰腺转肽酶（PGGT）、总转肽酶（TGGT），血糖及糖耐量试验，糖抗原Ca_{19-9}，胰胎抗原（PoA），胰腺相关抗原（PCAA），胰腺特异性抗原（P_aA），血清癌胚抗原（CEA）。

【检验结果判定】

1）便隐血常呈阳性。

2）在阻塞性黄疸时，尿胆红素强阳性，完全阻塞尿胆原可为阴性，粪胆原减少或消失。

3）血清淀粉酶及脂肪酶含量均升高，提示胰管梗阻合并胰腺炎。

4）血清碱性磷酸酶（ALP）、γ－谷氨酰转酞酶（γ－GT）、亮氨酸氨基肽酶（LAP）、脂蛋白－X（LP－X）等均升高。

5）血清胰腺转肽酶（PGGT）、总转肽酶（TGGT）之比＞1，对胰腺癌的诊断价值较大。

6）血糖及糖耐量试验升高，提示胰岛细胞被癌细胞破坏。

7）血清癌胚抗原可升高。

8）糖抗原被认为是诊断胰腺癌的重要指标，诊断正确率可达90％。

9）糖抗原Ca_{19-9}、胰胎抗原（PoA）、胰腺相关抗原（PCAA）的阳性率在67％以上。

10）胰腺相关抗原（PCAA）与胰腺特异性抗原（P_aA）联合监测诊断率可达成94％。

膀胱癌

膀胱癌是指膀胱原发的癌肿。依其浸润深度的不同，可分为原位癌或浸润癌，膀胱癌在泌尿系统各癌肿中，发病率较高。以间隙性无痛性肉眼血尿为特点，可伴尿频、尿急、尿痛等类似膀胱刺激症状，晚期有严重贫血。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，肝功能，肾功能，尿沉渣脱落细胞检查。

【检验结果判定】

1）晚期红细胞及血红蛋白降低。

2）尿沉渣脱落细胞检查阳性率约在50％～70％。

恶性葡萄胎

葡萄胎的水泡样组织已超过子宫腔范围，侵入子宫肌层深部或在其他部位发生转移者，称为恶性葡萄胎。5％～20％的葡萄胎可变成恶性葡萄胎或绒毛膜癌，恶性葡萄胎虽具有恶性肿瘤特点，但治疗效果及预后均较绒毛膜癌为好。临床表现为停经、阴道流血、子宫体异常增大，个别恶性葡萄胎病人，绒毛侵蚀穿破子宫肌层及浆膜层时，可引起不同程度的腹腔出血，急性腹痛，出血多时可发生休克。

【检验项目选择】

血常规，血或尿中绒毛膜促性腺激素（hCG）测定。

【检验结果判定】

1）红细胞减少、血红蛋白降低。

2）血或尿中绒毛膜促性腺激素（hCG）含量较正常高，尿稀释试验常在1∶500以上仍为阳性，且停经12周以后仍不下降。

第四章　消化系统疾病

反流性食管炎

反流性食管炎系指由于胃和（或）十二指肠内容物反流入食管，引起食管黏膜的炎症、糜烂、溃疡和纤维化等病变，属于胃食管反流病。临床表现为咽下困难、返流、剑突下烧灼感或疼痛及出血等。

【检验项目选择】

血常规，便常规及隐血试验，食管滴酸试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白可降低。

2）便隐血试验可为阳性。

3）食管滴酸试验阳性。

胃肠道功能紊乱

胃肠道功能紊乱又称胃肠神经官能症或胃肠神经症，是一组胃肠综合征的总称，多有精神因素的背景，以胃肠道运动功能紊乱为主。临床表现主要在胃肠道涉及进食和排泄等方面的不正常，也常伴有失眠、焦虑、注意力涣散、健忘、神经过敏、头痛等其他功能性症状。

【检验项目选择】

血常规，便常规及隐血试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白可轻度降低。

2）便常规及隐血试验：可见便有少许粘液，隐血试验阴性。

急性胆囊炎

急性胆囊炎是由于细菌侵袭或胆囊管阻塞而引起的胆囊炎，临床表现为右上腹部阵发性绞痛、伴有明显触痛和腹肌强直及恶心、呕吐等消化道症状。

【检验项目选择】

血常规，尿三胆，肝功能，血淀粉酶，血清碱性磷酸酶。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比明显升高，并呈核左移。

2）尿三胆检查：尿胆红素阳性。

3）血淀粉酶升高。

4）肝功能检查：丙氨酸氨基转移酶（ALT）升高，黄疸指数增高。

5）血清碱性磷酸酶可升高。

慢性胆囊炎

慢性胆囊炎常为急性胆囊炎的遗患，或由胆固醇代谢紊乱引起的胆囊病变，胆囊壁可以从轻度增厚到纤维性萎缩，临床表现为上腹部不适感和消化不良等。

【检验项目选择】

血常规，尿三胆，肝功能，血淀粉酶，血清碱性磷酸酶，十二指肠引流液检查。

【检验结果判定】

十二指肠引流液检查：如不能收集到B 胆汁时，提示胆囊收缩功能不良或胆囊管梗阻；比重及粘稠度降低。

急性单纯性胃炎

急性单纯性胃炎是由于化学因素（如烈酒、药物等）、物理因素（如摄人过于粗糙食物、进食过多等）及生物因素（细菌或细菌毒素等）、引起的急性胃黏膜炎性变化。

本病发病急，常于进污染食物后数小时至24h 发病。临床主要症状为上腹部不适、腹痛、恶心、呕吐、吐物为酸臭的食物，呕吐剧烈时可吐出胆汁，甚至血性液体。如同时合并肠炎，可出现脐周绞痛，腹泻大便呈糊状或黄色水样便，不带脓血，一日数次至

十数次；全身可伴有发冷发热、脱水、电解质紊乱、酸中毒，甚至休克；体征可有上腹或脐周轻压痛、肠鸣音亢进。一般患者病程短，3～5d 即可治愈。

【检验项目选择】

血常规，血电解质测定，血培养，呕吐物或可疑食物培养。

【检验结果判定】

1）白细胞计数在正常范围内或轻度增高，沙门菌属感染者可轻度减少。

2）血电解质测定：血钾、钠可降低。

3）呕吐物或可疑食物培养可能发现致病菌。

4）血培养阴性。

乳糜泻

乳糜泻是患者对麸质（麦胶）不耐受引起小肠黏膜病变为特征的一种原发性吸收不良综合征。

起病大多缓慢，症状的个体差异很大，发病年龄有两个高峰，即婴幼儿（添加麦类食物后）及青壮年。病程表现为发作与缓解的波动性，进食麦类（小麦、大麦、黑麦、燕麦）食物症状加重（活动期），忌麦类食物症状缓解。临床主要表现为腹泻伴有腹胀、肠鸣、软弱、乏力、消瘦、体重减轻及口腔炎、舌炎、贫血、皮肤黏膜出血倾向等。

【检验项目选择】

血常规，便常规，蛋白质测定，血电解质测定，血清补体测定，免疫球蛋白测定，白细胞移动抑制试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白降低，可为巨细胞性、小细胞性或混合性贫血。

2）便常规检查：镜下可见大量的脂肪滴。

3）蛋白质测定：白蛋白及球蛋白均降低。

4）血清补体测定：补体 C_3、C_4 降低。

5）免疫球蛋白测定：血清免疫球蛋白IgA 降低。

6）白细胞移动抑制试验阳性。

急性糜烂性胃炎

急性糜烂性胃炎是以胃黏膜发生不同程度糜烂、浅溃疡和出血为特征的病变，本病

是上消化道出血的常见病因之一，约占20％～30％。

【检验项目选择】

血常规，血电解质，肾功能，血型及交叉配血，便隐血试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白可降低。

2）便隐血试验阳性。

慢性胃炎

慢性胃炎系指不同病因引起的各种慢性胃黏膜炎性病变，是一种常见病，其发病率在各种胃病中居首位。自纤维内镜广泛应用以来，对本病认识有明显提高。慢性胃炎通常分为浅表性胃炎和萎缩性胃炎两类。临床表现为慢性上腹烧灼痛、钝痛或饱胀感，进食后为甚；食欲不振、恶心、返酸和嗳气可间歇或长期存在；胃糜烂者可呕血或柏油样大便；萎缩性胃炎可伴有贫血、舌炎、腹泻及消瘦。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，便隐血试验，胃液分析，胃蛋白酶原测定，血清壁细胞抗体（PCA），胃泌素测定，幽门螺杆菌检查。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白均可降低。

2）胃液分析：浅表性胃炎，胃酸正常或偏高；萎缩性胃炎胃酸降低。

3）胃蛋白酶原测定浅表性胃炎一般正常，萎缩性胃炎可减少。

4）血清壁细胞抗体（PCA）、胃泌素测定，有助于萎缩性胃炎分型，胃体胃炎（A型）血清壁细胞抗体（PCA）阳性，胃泌素显著升高；胃窦胃炎（B型）血清壁细胞抗体（PCA）阴性，胃泌素正常或偏低；浅表性胃炎血清壁细胞抗体（PCA）偶有阳性。

5）幽门螺杆菌检查阳性可以明确慢性胃炎的诊断。

消化性溃疡

消化性溃疡，因溃疡的形成和发展与胃液中胃酸和胃蛋白酶的消化作用有关，故由此而得名。它发生在与胃酸接触的部位如胃和十二指肠，也可发生于食管下段、胃空肠吻合口附近，约95％～99％的消化溃疡发生在胃或十二指肠，故又分别称为胃溃疡或十二指肠溃疡。临床表现为上腹部钝痛、刺痛、烧灼样痛或饥饿样痛，疼痛与进食有明

显的节律性。胃溃疡是进食后疼痛，至下次进餐缓解；十二指肠溃疡常发生饭前空腹痛或夜间饥饿性痛，进食后缓解。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，便隐血试验，胃液分析。

【检验结果判定】

1）便隐血试验阳性，提示溃疡活动期，经积极治疗，多在1～2周内阴转。

2）胃液分析：胃溃疡时胃酸分泌正常或稍低于正常，十二指肠溃疡则多增高，以夜间及空腹时更明显；基础胃酸分泌量（BAO）超过15mmol/h，五肽胃泌素试验高峰排酸量（PAO）超过40mmol/h，基础胃酸分泌量（BAO）/高峰排酸量（PAO）超过0.4～0.6（正常值低于0.2），提示为十二指肠溃疡。

吸收不良综合征

吸收不良综合征是指各种原因的小肠营养物质吸收不良所引起的综合征。营养物质的吸收必须经过充分的消化作用，因此，广义的吸收不良综合征包括消化不良与吸收不良，故又称为消化吸收不良综合征。许多疾病均可引起，其中脂肪吸收障碍最具特征。临床主要表现为腹泻、乏力、倦怠、精神不振、腹胀、腹痛、体重下降、轻度贫血及肠鸣音亢进等。

【检验项目选择】

血常规，便常规，血钾、钠、氯、钙、镁测定，便苏丹Ⅲ染色镜检查脂肪滴，便脂肪定量检查，脂肪吸收试验，木糖吸收试验，维生素B_{12}吸收试验。

【检验结果判定】

1）肉眼观察一次全量大便，如为淡黄色，在病理情况下，可提示脂肪不消化。

2）便常规显微镜下可发现脂肪颗粒。

3）便脂肪定量检查，24h便脂肪量超过6g，可认为脂肪吸收不良。

4）脂肪吸收试验，低于95%，为吸收不良。

5）维生素B_{12}吸收试验吸收不良时减少。

溃疡性结肠炎

溃疡性结肠炎是慢性非特异性溃疡性结肠炎的简称，为一种原因未明的直肠和结肠慢性炎性疾病。主要临床表现是腹泻、粘液脓血便、腹痛和里急后重。病情轻重不等，

多反复发作或长期迁延呈慢性经过。

本病可发生于任何年龄，以20～50岁为多见。男女发病率无明显差别。本病在欧美较常见，但我国的发病率较低，且病情一般较轻。

【检验项目选择】

血常规，血沉，便常规、隐血试验，凝血酶原时间测定，血清蛋白电泳，血电解质，血清免疫球蛋白测定，血补体试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数和中性粒细胞百分比可升高，提示为活动期。

2）红细胞及血红蛋白均下降，可出现小细胞低色素性贫血，提示为病程反复发作后。

3）血沉可加快。

4）便隐血试验可为阳性。

5）凝血酶原时间延长。

6）血清蛋白电泳白蛋白可降低，球蛋白可升高。

7）血清钾、钠、氯可降低。

炎症性肠病

炎症性肠病是病因未明的胃肠肉芽肿性炎性疾病，病变多见于末回肠和邻近结肠，常呈节段性分布。临床主要表现腹痛、腹泻、腹块、瘘管形成及肠梗阻，伴有发热、贫血等。发病年龄多在15～40岁，男性稍多于女性。

【检验项目选择】

血常规，便常规、隐血试验，血沉，血清蛋白电泳，血电解质。

【检验结果判定】

1）白细胞计数和中性粒细胞百分比可升高。

2）便常规可见大量的红细胞、白细胞及脓细胞。

3）便隐血试验常呈阳性。

急性出血性坏死性肠炎

急性出血性坏死性肠炎是与C型产气荚膜芽孢杆菌感染有联系的一种急性肠炎，本病病变主要在小肠，病理改变以肠壁出血坏死为特征。其主要临床表现为腹痛、便

血、发热、呕吐和腹胀。严重者可有休克、肠麻痹等中毒症状和肠穿孔等并发症。

【检验项目选择】

血常规，血电解质，肾功能，便常规、培养及隐血试验。

【检验结果判定】

1）白细胞增多，以中性粒细胞百分比增多为主，常有核左移。

2）红细胞及血红蛋白常降低。

3）便隐血试验强阳性，镜检可见大量红细胞，偶见脱落的肠系膜，可有少量或中等量脓细胞。

克隆病

克隆病是病因未明的胃肠肉芽肿性炎性疾病。目前已将本病和溃疡性结肠炎统称为炎症性肠病。病变多见于末回肠和邻近结肠，常呈节段性分布。临床主要表现腹痛、腹泻、腹块、瘘管形成及肠梗阻，伴有发热、贫血等。发病年龄多在15～40岁，男性稍多于女性。

【检验项目选择】

血常规，血电解质，血沉，肝功能，血清蛋白电泳，便培养、隐血试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数可增高。

2）血红蛋白可降低。

3）血沉常增快。

4）血清钾、钙及白蛋白均可降低。

5）便隐血试验常呈阳性。

原发性胆汁性肝硬化

原发性胆汁性肝硬化又名肝内梗阻性胆汁性肝硬化，其主要病变是肝内小胆管的非化脓性炎症与梗阻。多见于50岁左右的女性，有长期深度黄疸病史，肝脾肿大，病程缓慢，可达数月至数年，主要临床表现为进行性阻塞性黄疸，偶有间歇性右上腹痛，约半数病人合并溃疡性结肠炎、克隆病等。

【检验项目选择】

尿三胆试验，血脂，肝功能，血清碱性磷酸酶（ALP），γ－谷氨酰转肽酶（GGT），

血清蛋白质测定，血清蛋白电泳，纤维蛋白原测定，血清抗线粒体抗体（AMA），血清免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1）尿三胆试验：尿胆红素阳性，由于胆道梗阻的程度不同，尿胆原可减少或缺如。

2）肝功能检查：丙氨酸氨基转移酶（ALT）正常或轻度升高，浊度试验多呈阳性，胆红素一般呈中度增高，以间接胆红素升高为主，血清胆红素浓度与原发性胆汁性肝硬化预后有关，如胆红素急骤上升，提示预后不良。

3）血脂测定：血清胆固醇及甘油三酯增高，如降低提示为肝功能衰竭。

4）碱性磷酸酶（ALP）及γ－谷氨酸转肽酶（GGT）测定：两者均增高，黄疸出现后增高更显著，比正常可高2～6倍。

5）血清蛋白质测定：血清蛋白早期无明显变化，晚期白蛋白降低，球蛋白升高，白蛋白与球蛋白的比值下降，甚至倒置。

6）蛋白电泳：α、β和γ球蛋白增多。

7）纤维蛋白原测定：早期病例常降低，注射维生素K后尚可恢复正常；晚期因肝功能衰竭，注射维生素K后仍得不到纠正。

8）血清抗线粒体抗体（AMA）阳性，且滴度常在1∶128以上，为本病特征性的改变；

9）免疫球蛋白测定：免疫球蛋白IgM明显增高。

药物性肝病

药物性肝病简称药肝，是指由于药物或及其代谢产物引起的肝脏损害。可以发生在以往没有肝病史的健康者或原来就有严重疾病的病人，在使用某种药物后发生程度不同的肝脏损害，均称药肝。与人类各种肝病的表现相同，如肝细胞坏死、胆汁瘀积、细胞内微脂滴沉积或慢性肝炎、肝硬化等。临床主要表现为发热、皮疹、皮肤搔痒和黄疸等。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，血糖，血电解质，淋巴细胞转化试验，白细胞移动抑制试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增加，嗜酸性细胞升高，达6％以上。

2）肝功能检查：丙氨酸氨基转移酶（ALT）升高，黄疸指数增高。

3）淋巴细胞转化试验及白细胞移动抑制试验为阳性。

肝性脑病

肝性脑病又称肝性昏迷，是由严重肝脏病变引起的伴有神经精神症状的综合征，其发生和发展常标志着肝病严重或肝细胞功能衰竭，病死率很高。临床主要表现为黄疸、发热、肝臭、出血、腹水等。

【检验项目选择】

血电解质测定，肝功能，肾功能，血氨，血浆5－羟色胺（5－HT）测定，血浆5－羟色氨酸（5－HTP）测定，乳酸测定，血清亮氨酸，苯丙氨酸。

【检验结果判定】

1）肝功能检查：丙氨酸氨基转移酶（ALT）正常或轻度升高，浊度增高，血清白蛋白降低，γ球蛋白明显升高。

2）血电解质测定：血钾、钠、氯、钙、镁均降低。

3）肾功能检查：血尿素升高。

4）血浆5－羟色胺（5－HT）及血浆5－羟色氨酸（5－HTP）测定：两者均有特异性升高。

5）乳酸测定：可升高。

6）血氨测定：血氨升高是诊断本病的重要指标，其浓度与昏迷深度不成正比。

肝硬化

肝硬化是一种常见的慢性肝病，是由一种或多种病因长期或反复作用，引起肝脏弥漫性损害。在病理组织学上有广泛的肝细胞变性、坏死、再生及再生结节形成，结缔组织增生及纤维隔形成，导致肝小叶结构破坏和假小叶形成，肝脏逐渐变形、变硬而发展成为肝硬化。临床上早期由于肝脏功能代偿较强，可无明显症状；后期则有多系统受累，以肝功能损害和门脉高压为主要表现，并常出现消化道出血、肝性脑病、继发感染、癌变等严重并发症。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，凝血酶原时间测定，尿常规，尿三胆，肝功能，血脂，血氨，血清碱性磷酸酶（ALP），γ－谷氨酰转肽酶（γ－GT），乳酸脱氢酶（LDH），单胺氧化酶，胆碱酯酶（ChE），血清蛋白电泳，甲胎蛋白（AFP），乙型及丙型肝炎标志物

检测，免疫球蛋白测定，腹水检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数、血小板计数及血红蛋白均降低。

2） 尿常规偶有蛋白尿、管型尿。

3） 尿三胆试验可能阳性。

4） 肝功能检查：血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）升高，提示为肝硬化合并活动性肝炎；如天门冬氨酸氨基转移酶明显升高，提示肝细胞严重受损；总胆红素及直接胆红素升高，提示肝硬化失代偿期。

5） 血清蛋白电泳白蛋白降低（A）、球蛋白（G）升高，白蛋白降低（A）／球蛋白（G）比值降低或倒置。

6） 凝血酶原时间延长，并与病情严重程度成正比。

7） 血清碱性磷酸酶（ALP）、γ－谷氨酰转肽酶（γ－GT）、乳酸脱氢酶（LDH）、单胺氧化酶可正常或轻度升高。

8） 胆碱酯酶（ChE）活力如极度下降，提示预后不良。

9） 血氨升高，提示可能有肝性脑病。

10） 血脂检查，血胆固醇降低，提示为肝硬化失代偿期。

11） 免疫球蛋白A、G、M 均可升高。

12） 腹水检查，若为血性，除考虑并发结核性腹膜炎外，应高度疑有癌变。

急性胰腺炎

急性胰腺炎是一种常见的疾病，乃胰酶消化自身胰腺及其周围组织所引起的化学性炎症，临床症状轻重不一，轻者有胰腺水肿，表现为腹痛、恶心、呕吐、腹胀、发热及轻度黄疸等。重者胰腺发生坏死或出血，可出现休克和腹膜炎，病情凶险，死亡率高。本病好发年龄为20～50 岁，女性较男性多见。

【检验项目选择】

血常规，红细胞压积，血钾、钠、氯、钙，血糖，尿糖，血清脂肪酶，胰蛋白酶，肝功能，血清碱性磷酸酶（ALP），天门冬氨酸氨基转移酶（AST），肾功能，肌酐，二氧化碳结合力，血、尿淀粉酶，尿淀粉酶肌酐清除率。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数及中性粒细胞百分比均升高。

2） 红细胞压积可升高50％。

3） 血淀粉酶、尿淀粉酶测定均明显升高，尿淀粉酶升高比血清为迟，约于发病后8～12h 开始升高，维持时间较长，下降也比血淀粉酶迟，连续增高时间可达1～2 周，因此适用于就诊较晚的病例。

4） 尿淀粉酶肌酐清除率比值增高。

5） 血清脂肪酶升高，对血、尿淀粉酶已恢复正常者有诊断意义。

6） 丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）可升高，血清胆红素可异常，血清白蛋白可降低。

7） 血糖、血尿素氮均可升高。

8） 血钾及钙均可降低，如果血钙低于1.75mmol/L，提示预后不良。

慢性胰腺炎

慢性胰腺炎系指胰腺泡和胰岛组织萎缩、胰腺实质广泛纤维化的病理过程。常伴有钙化及假性囊肿形成。临床上主要表现为腹痛、腹泻或脂肪泻，消瘦及营养不良等胰腺功能不全的症候。典型慢性胰腺炎在我国较为少见，确诊较难。

【检验项目选择】

便常规，24h 便脂肪定量，尿糖，血、尿淀粉酶，血脂肪酶，血糖，葡萄糖耐量试验，血浆胰多肽测定（PP），血浆胰岛素测定。

【检验结果判定】

1） 便常规镜检可见脂肪滴及未消化的肌纤维。

2） 便脂肪定量增高，提示脂肪吸收不良。

3） 尿糖阳性，空腹血糖增高。

4） 血清淀粉酶及脂肪酶定量除急性发作期，一般不增高。

5） 血浆胰多肽（PP）测定可显著下降。

6） 血浆胰岛素测定，多数正常，偶有升高。

肠结核

肠结核是临床上较为常见的肺外结核病，是因结核杆菌侵犯肠道而引起的慢性感染。绝大多数继发于肠外结核，特别是开放性肺结核。发病年龄多为青壮年，女略多于男。临床表现为腹痛、腹部肿块、午后发热、盗汗、食欲减退、消瘦、贫血、乏力等。

【检验项目选择】

血常规，便常规、培养，便浓缩找结核菌，血沉，肝功能，肾功能。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数正常，淋巴细胞百分比常偏高。

2） 红细胞计数及血红蛋白常偏低，呈轻、中度贫血，以溃疡型患者为多见。

3） 血沉常增快。

4） 增生型肠结核便检查多无明显改变。溃疡型肠结核粪便镜检可见少量脓细胞和红细胞。

结核性腹膜炎

结核性腹膜炎是由结核杆菌引起的慢性弥漫性腹膜感染。以儿童、青壮年多见，女略多于男。临床以右下腹痛为主，进餐后加重及低热、盗汗、消瘦、乏力、贫血等。

【检验项目选择】

血常规，血沉，肝功能，肾功能，腹水查常规、浓缩找结核杆菌、结核菌培养。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数多正常或稍偏高，少数偏低，腹腔结核病灶急性扩散者或干酪型患者的白细胞计数可增高。

2） 沉降可作为病变活动的简易指标，在本病活动期一般增快，病变趋于静止时逐渐正常。

3） 腹水为草黄色渗出液，静置后自然凝固，少数呈血性，偶见乳糜性，但有时由于低蛋白血症，腹水性质可接近漏出液，腹水葡萄糖＜3.4㎜ol／L，pH ＜7.35 时，提示细菌感染；腹水腺苷脱氨酶活性增高，提示结核性腹膜炎。本病腹水的一般细菌培养阴性，浓缩找到结核杆菌的阳性机会很少，结核菌培养的阳性率也低，但腹水动物接种阳性率可达50％以上。

肝结核

肝结核系指结核杆菌经肝动脉或门静脉进入肝脏，也可经淋巴管、胆管或邻近病灶直接感染而引起的肝脏疾病。

【检验项目选择】

血常规，血沉，肝功能，碱性磷酸酶，结核菌素试验，穿刺液涂片及培养。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数大多正常或降低。

2） 血红蛋白降低，多为轻度或中度贫血。

3） 血沉增快。

4） 肝功能检查：胆红素增加、白蛋白降低和球蛋白升高。

5） 结核菌素试验阳性。

穿刺液涂片及培养：涂片可找到抗酸菌，结核杆菌培养可为阳性

肠梗阻

肠内谷物不能顺利通过肠道，称为肠梗阻。肠梗阻的主要临床表现是腹痛、呕吐、腹胀，无大便和无肛门排气。这些症状的出现和梗阻发生的急缓、部位的高低、肠腔堵塞的程度有密切关系。

【检验项目选择】

血常规，红细胞比积测定，便常规，血电解质测定，血二氧化碳结合力测定，血浆蛋白质测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数及中性粒细胞百分比升高。

2） 血红蛋白及红细胞比积测定均升高。

3） 便常规检查：镜检可见大量的红细胞。

4） 血电解质测定：血钾降低。

5） 血浆蛋白质测定：可降低。

肠道蛔虫病

肠道蛔虫钻入胆道即引起胆道蛔虫病。是一种常见的胆道寄生虫病，约占胆道疾病的8％～12％，可发病于任何年龄，以儿童、青年多见，无性别差异，农村较为多见。处理不当，可引起多种并发症，危害甚大，也是原发性胆管结石的原因之一。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞，肝功能，血清碱性磷酸酶（ALP），血、尿液粉酶血培养，呕吐物、十二指肠液、胆汁或便中查蛔虫虫卵。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比正常或轻度升高，当出现合并症时则显著增高。

2）嗜酸性粒细胞多增高。

3）血红蛋白可降低，提示为继发性贫血。

4）呕吐物、十二指肠引流液、胆汁或便中可查见蛔虫虫卵。

5）血、尿淀粉酶可升高，提示合并胰腺炎。

6）血培养可为阳性，提示合并败血症。

7）肝功能检查丙氨酸氨基转移酶（ALT）可升高，提示可有肝脏损害。

急性阑尾炎

急性阑尾炎是由于粪石、食物残渣，在阑尾扭转、细菌感染、胃肠功能紊乱等情况下，阑尾的肌肉、血管会发生痉挛，血液运输发生障碍，引起局部发炎。临床典型表现为右下腹转移疼痛、局限性压痛、腹肌紧张和反跳痛等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比均可增高，化脓性阑尾炎时，白细胞计数可达（15～20）×10^9/L，中性粒细胞百分比可达90％以上。

2）尿常规检查：尿镜检可见少量红细胞，提示为盲肠后位阑尾炎。

第五章　传染病及寄生虫病

肺包虫病

肺包虫病是细粒棘球绦虫（犬绦虫）的幼虫在人体肺部引起的慢性寄生虫病。细粒棘球绦虫寄生在犬、狼、狐等终宿主的肠道内，虫卵随粪便排出体外，污染牧场的土壤、饮水和食物。被人、家畜等中间宿主吞服后，在十二指肠内孵化出六钩蚴，穿人肠壁，进入肠系膜小静脉，然后随血循环进入门静脉系统。大多数幼虫停留在肝脏，发育成棘球蚴亦即包虫囊，少数幼虫可进入肺，或经肺进入体循环，到达其他器官组织，发育成为包虫囊。

早期多无症状，感染2～3 年后，当囊肿压迫或并发炎症时可出现咳嗽、咳痰、进性性胸痛及咯血等，部分病人有发热、乏力、食欲减退、哮喘。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，包虫皮内试验，包虫补体结合试验，间接血凝试验。

【检验结果判定】

1）嗜酸粒细胞计数增高。

2）包虫皮内试验：阳性，可达60％～90％。

3）包虫补体结合试验：约70％阳性。

4）间接血凝试验：约83％～97％阳性。

脑囊虫病

脑囊虫病是猪绦虫的幼虫（囊尾蚴）寄生脑部所致，它约占人体囊虫病的80％以上。其感染方式有内在自身感染、外在自身感染及外来感染。病人自身并无绦虫寄生，因摄人附有虫卵的蔬菜或瓜果后而感染。绦虫卵在十二指肠中孵化成囊尾虫幼，钻人肠壁，经肠系膜静脉进入体循环和脉络膜，从而进入脑实质、蛛网膜下腔和脑室系统，引起各种损害。表现为神经症状多样性、多灶性和不稳定性，刺激症状较麻痹症状占优

势，症状进展缓慢和波动等。

【检验项目选择】

血常规，便常规，嗜酸性粒细胞计数，脑脊液检查，血清或脑脊液囊虫补体结合试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高。

2）嗜酸性粒细胞计数增高，可高达30％以上。

3）便常规检查：镜见便中可找到绦虫卵或成虫节片。

4）脑脊液检查：可见压力增高，白细胞计数增多，以嗜酸性粒细胞为主，最高可达80％～90％；蛋白含量增高，糖含量正常或稍降低。

5）血清或脑脊液囊虫补体结合试验：阳性。

绦虫病

绦虫病是猪肉绦虫或牛肉绦虫寄生于人体小肠引起的疾病。症状轻微，常因粪便中发现白色节片而就医。由于虫体吸取人体养料并刺激肠壁及其代谢产物的毒性作用，使部分病人有腹痛、腹胀、腹泻、恶心、乏力等症状。

【检验项目选择】

嗜酸粒细胞计数，便常规，肛门拭子查虫卵。

【检验结果判定】

1）嗜酸粒细胞计数可轻度增高。

2）便常规检查：镜检查到绦虫卵，可确定诊断。

3）肛门拭子查绦虫卵的阳性率较高。

蛲虫病

蛲虫病多发生于儿童，城市高于农村，集居儿童高于散居儿童。人是绕虫惟一宿主，蛲虫感染者是蛲虫病的惟一传染源。传染方式有自身及异体感染两种。

一般症状轻微，主要表现是夜间肛门及阴部奇痒，因而失眠，烦躁不安，夜惊等。由于蛲虫可钻人黏膜深层引起轻度炎症。亦可出现消化不良、恶心、呕吐、腹痛、食欲减退等症状。

【检验项目选择】

便常规。

【检验结果判定】

便常规检查虫卵阳性率较低，须于清晨大便前，轻轻擦肛门后再查虫卵。

钩虫病

钩虫病是十二指肠钩虫或美洲钩虫寄生于人体小肠所致的疾病，钩虫病的传染源是钩虫病患者和感染者，钩虫感染在我国分布极广，它是严重危害我国人民尤其是农民健康的寄生虫病之一，本病主要是经皮肤接触感染。农民赤足下地，幼虫易钻入皮肤而致病，故农村中感染率较高。钩虫卵在低于5～10 ℃时易死亡，而25～30 ℃和湿润土壤最适于虫卵孵化和幼虫生长。故我国南方钩虫病的流行远较北方为重。临床以贫血、营养不良、浮肿、腹痛及胃肠功能障碍为主要表现。

【检验项目选择】

血常规，网织红细胞计数，红细胞比积，嗜酸粒细胞计数，便涂片、培养，便隐血试验，血清蛋白质测定，血清铁。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及嗜酸粒细胞计数增加。

2）红细胞计数减少，血红蛋白及红细胞比积降低，提示为小细胞低色素性贫血。

3）血清蛋白质测定，白蛋白可降低。

4）血清铁可降低。

5）便涂片查到虫卵，即可确诊。

急性阿米巴痢疾

急性阿米巴痢疾是溶组织阿米巴引起的肠道急性感染性疾病，以近端结肠和盲肠为主要病变部位。病情轻重悬殊，典型的以痢疾症状为主，易于复发，变成慢性起病较慢，中毒症状较轻，并有反复发作倾向，有果酱样大便。

【检验项目选择】

血常规，便常规，血凝抑制试验。

【检验结果判定】

1）白细胞总数和分类正常，暴发型和有继发细菌感染时白细胞总数和中性粒细胞

比例增高，慢性患者有轻度贫血。

2）便常规检查：肉眼观呈暗红色果酱样，有特殊腥臭，粪质较多，含血及粘液。镜检可见大量粘集成团的红细胞、少量白细胞和夏科－雷登结晶；找到活动的、吞噬经细胞的阿米巴滋养体有确诊价值。

3）血凝抑制试验阳性。

轮状病毒性肠炎

轮状病毒性肠炎主要发生在婴幼儿，常由A 组轮状病毒引起，发病高峰在秋季，故名“婴儿秋季腹泻”，B 组轮状病毒可引起成人腹泻。

【检验项目选择】

便常规，血清免疫球蛋白测定，咽部分泌物免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1）便常规检查：便外观呈水样，镜检偶有少数白细胞。

2）免疫球蛋白测定：早期免疫球蛋白IgM 抗体可增高，2～4 周出现IgG 抗体。

3）咽部分泌物免疫球蛋白测定：免疫球蛋白IgA 抗体可增高。

亲气水单胞菌肠炎

亲气水单胞菌以往认为是低毒力的条件致病菌，现明确是儿童急性腹泻的重要病原菌之一，本菌产生的肠毒素不耐酸、耐热，作用于胃肠道上皮细胞，引起腹泻。

【检验项目选择】

便常规，便培养。

【检验结果判定】

1）便常规检查：镜检可见红细胞及白细胞。

2）便培养阳性即可确诊。

伪膜性肠炎

伪膜性肠炎是主要发生于结肠的急性黏膜坏死性炎症，并覆有伪膜。此病常见于应用抗生素治疗之后，故为医源性并发症。现已证实是由难辨梭状芽孢杆菌的毒素引起，

病情严重者可以致死。

【检验项目选择】

血常规，便常规，便培养，血清蛋白质测定，血清电解质测定。

【检验结果判定】

1）白细胞增多，多在（10～20）×10^9/L以上，甚至高达40×10^9/L或更高，以中性粒细胞增多为主。

2）便常规检查：镜检可见红细胞及白细胞。

3）血清蛋白质测定：白蛋白及球蛋白降低。

空肠弯曲菌肠炎

空肠弯曲菌肠炎是由空肠弯曲菌引起的急性肠道传染病。临床表现为发热、腹痛、血性便等。

【检验项目选择】

便常规，便培养，间接血凝抑制试验。

【检验结果判定】

1）便常规检查：外观为粘液便或稀水便，镜检有较多中性粒细胞性白细胞及较多红细胞，是本病的一个主要特征。

2）间接血凝抑制试验：双份血清抗体效价呈4倍或以上增长，即可确诊。

钩端螺旋体病

钩端螺旋体病是由致病性螺旋体所引起的人兽共患的自然疫源性急性传染病。临床表现的轻重差异很大，主要症状为骤然起病、高热、头痛、明显的腓肠肌痛、眼结膜充血、淋巴结肿大及出血倾向等，部分病人可出现黄疸，肺部大出血为早期致死的主要原因。

【检验项目选择】

显微镜凝集试验，血清凝集抑制试验。

【检验结果判定】

显微镜凝集试验：当效价大于1∶400或双份血清效价4倍增长可确诊。

柯萨奇病毒感染

柯萨奇病毒是一种肠病毒，分为A 和B 两类，妊娠期感染可引起非麻痹性脊髓灰质炎性病变，并致胎儿宫内感染和畸形。

【检验项目选择】

鼻咽部分泌物、大便、血液培养，补体结合试验。

【检验结果判定】

1） 鼻咽部分泌物、大便、血液培养：可培养出柯萨奇病毒。

2） 补体结合试验：抗体滴度升高4 倍可确诊。

弓形虫病

弓形虫病或弓形体病是由弓形体原虫所致的一种人畜共患的寄生虫性传染病。人体感染后轻型者常无症状，重型者可引起各种症状，如高热、肌肉疼痛、关节疼痛、淋巴结肿大等。孕妇急性弓形虫感染时，弓形虫可通过胎盘感染胎儿，直接威胁胎儿健康。

【检验项目选择】

间接免疫荧光试验，IgM 一免疫荧光试验，直接凝集反应，酶联免疫试验。

【检验结果判定】

1） 间接免疫荧光试验：抗弓形虫IgG 抗体阳性。

2） IgM 免疫荧光试验：感染5～6 天即出现阳性结果，可持续3～6 月，适于早期诊断，由于IgM 的分子量大，母亲的IgM 一般不能通过胎盘传给胎儿，如新生儿血清中含有抗弓形虫IgM ，提示可为先天性弓形虫病。

3） 直接凝集反应：主要用于测抗弓形虫IgM ，以1 ：16 凝集作为阳性，感染后5～6 天则能测得阳性结果。

4） 酶联免疫试验：阳性，其敏感性和特异性均较高。

肺隐球菌病

肺隐球菌病为新型隐球菌感染引起的亚急性或慢性内脏真菌病。主要侵犯肺和中枢神经系统，但也可以侵犯骨骼、皮肤、黏膜和其他脏器。

【检验项目选择】

痰、胸液和脑脊液作墨汁涂片或培养，补体结合试验。

【检验结果判定】

1）痰、胸液和脑脊液作墨汁涂片或培养，检出隐球菌时即可确诊。

2）补体结合试验：补体结合反应阳性有助于诊断。

流行性斑疹伤寒

流行性斑疹伤寒又称虱传斑疹伤寒，是普氏立克次体通过体虱传播的急性传染病，其临床特点为持续高热、头痛、瘀点样皮疹和中枢神经系统症状，自然病程约为2～3周。患流行性斑疹伤寒后数月至数年，可能出现复发，称为复发型斑疹伤寒。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血小板计数，尿常规，外斐试验，补体结合试验。立克次体凝集试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数多在正常范围内，嗜酸粒细胞显著减少或消失，血小板数一般降低。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，偶有红细胞、白细胞及管型。

3）外斐试验：血清凝集效价一般大于1∶160有诊断意义，效价有4倍以上增长者具诊断价值，但流行性斑疹伤寒患者常在第2周末或恢复期达到有诊断意义的水平或高峰，继而效价迅速下降，于3～6个月内转为阴性。

4）补体结合试验：在病程第1周内即可达有意义的效价（1∶40），第1周阳性率为50％～70％，第2周可达90％以上，低效价可维持10～30年，故可用于流行病学调查。所有立克次体病均应用补体结合试验作抗体检查，其中用斑疹伤寒群及斑点热群立克次体可溶性抗原测得的抗体阳性结果仅说明某群立克次体感染，再用颗粒抗原检测抗体方可进一步明确是患何种立克次体病。

5）立克次体凝集试验：阳性反应的出现较外斐试验为早，特异性较高，病程第5d即可有80％以上病例呈阳性；试管法＞1∶40，微量法＞1∶4为阳性反应，2～3周时阳性率可达95％以上，效价于病程1月左右达高峰，而后迅速下降而于数月内消失，流行性斑疹伤寒现症患者的凝集抗体属于IgM。

回归热

回归热是由于回归热螺旋体经虫媒传播引起的急性传染病，临床特点为周期性高热伴全身疼痛、肝脾肿大和出血倾向，重症可有黄疸。根据传播媒介不同，可分为虱传回归热（流行性回归热）和脾传回归热（地方性回归热）两种类型。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，尿常规，肝功能，脑脊液检查，发热期取血或骨髓涂片。

【检验结果判定】

1）白细胞总数增高，中性粒细胞百分比增加；多次发作后可有贫血，血小板及出凝血时间大多正常，但重症者可有异常。

2）尿常规检查：尿蛋白微量，镜检可见红细胞、白细胞及管型。

3）肝功能检查：血清丙氨酸转氨酶常升高，血清胆红素可增高。

4）脑脊液检查：脑脊液压力稍增高，蛋白及淋巴细胞轻度增加。

5）发热期取血或骨髓涂片染色镜检或暗视野检查可发现螺旋体，有诊断意义。

黑热病

黑热病又称内脏利什曼病，是由杜氏利什曼原虫引起、经白蛉传播的慢性地方性传染病。临床表现为起病缓慢、长期反复不规则发热、进行性脾肿大、贫血、消瘦等，而全身中毒症状相对较轻。

【检验项目选择】

血常规，血浆蛋白质测定，穿刺液涂片。

【检验结果判定】

1）白细胞计数降低，中性粒细胞明显减少。

2）红细胞计数、血小板计数及血红蛋白减少，呈中度贫血。

3）血浆蛋白质测定；血浆球蛋白显著增高，白蛋白减少，白蛋白与球蛋白比值可倒置。

4）骨髓、淋巴结或脾、肝组织穿刺涂片，找到利杜体或穿刺物培养查到鞭毛体可确诊。

脊髓灰质炎

脊髓灰质炎又称小儿麻痹症，是由脊髓灰质炎病毒引起的急性传染病。临床以发热、上呼吸道症状、肢体疼痛，少数病例出现肢体弛缓性瘫痪。

【检验项目选择】

血常规，血沉，脑脊液常规、生化、细胞学检查，脊髓灰质炎病毒抗体，咽拭子及肛门拭子病毒分离。

【检验结果判定】

1）白细胞总数及中性粒细胞百分比大多正常，少数患者白细胞及中性粒细胞轻度增高。

2）血沉增快，提示为急性期。

3）脑脊液检查早期中性粒细胞增高，以后以淋巴细胞为主；蛋白正常，以后逐渐增加；氯化物正常，葡萄糖正常或轻度增高；至瘫痪出现后第2 周，细胞数迅速降低，蛋白量则继续增高，形成蛋白细胞分离现象。

4）发病起一周内可从咽部及便内分离出病毒。早期从血液或脑脊液中也可分离出病毒，虽机会较小，但其意义较大。

5）血清脊髓灰质炎病毒抗体，第1 周末可达高峰，尤以特异性IgM 上升为快，阳性者可做出早期诊断。

淋病

淋病是淋病双球菌引起的急、慢性接触性传染病，主要引起泌尿生殖器黏膜的炎症，属于性传播性疾病之一，主要通过性交直接接触传染，少数通过内裤、便盆、浴盆等间接传染，孕妇有淋病，分娩时新生儿经过产道感染。男性临床表现为尿意窘迫、尿频、尿急、尿痛。女性表现为尿道口红肿及脓性分泌物、尿频、尿急、尿痛和阴道脓性白带或前庭大腺肿疼痛或溢脓。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，脓汁涂片作革兰染色、细菌培养。

【检验结果判定】

根据有性接触史，临床症状典型，脓汁涂片作革兰染色，在多形核白细胞内找到淋病双球菌，即可诊断，如表现不典型，可进一步作细菌培养。

麻疹

麻疹是由麻疹病毒引起的急性呼吸道传染病。临床特征为发热、流涕、咳嗽、眼结膜炎、口腔黏膜斑及全身皮肤斑丘疹。

【检验项目选择】

血常规，痰培养十药敏，鼻咽部、眼分泌物或尿沉渣涂片染色查找多核巨细胞，鼻、咽、眼分泌物及尿沉淀物涂片荧光抗体染色，血凝抑制、补体结合抗体试验，麻疹病毒抗体免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数减少，淋巴细胞百分比偏低。

2）鼻咽部、眼分泌物或尿沉渣涂片染色查找多核巨细胞（含核5～80个），前驱期及出疹期均可发现，出疹前2d阳性率最高，有早期诊断价值，尿沉渣镜检可发现单核细胞浆内包涵体。

3）鼻、咽、眼分泌物及尿沉淀物涂片，荧光抗体染色，可在脱落细胞内查及麻疹病原抗原，阳性率更高，有早期诊断价值。

4）血凝抑制、补体结合抗体试验，急性期和恢复期血清呈4倍升高，均有诊断价值。

5）麻疹病毒抗体免疫球蛋白IgM阳性，提示有近期感染。

水痘

水痘是由水痘－带状疱疹病毒所引起的急性呼吸道传染病。水痘属于原发性感染，多见于儿童，临床上以轻微全身症状以及皮肤、黏膜分批出现迅速发展的斑疹、丘疹、疱疹结痂为特征。

【检验项目选择】

血常规，疱疹刮片染色查多核巨细胞，疱疹刮片染色查核内包涵体，疱疹液细胞培养，血清补体结合抗体试验，疱疹液细胞培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数正常或稍增高。

2）疱疹刮片染色可查到多核巨细胞。

3）疱疹刮片染色查核内包涵体，可找到核内嗜酸性包涵体。

4）血清补体结合抗体试验，双份血清抗体效价呈4 倍以上增加。

5）疱疹液做细胞培养，其病毒分离阳性率较高。

传染性单核细胞增多症

传染性单核细胞增多症是由EB 病毒（EBV）所致的急性自限性传染病。其临床特征为发热，咽喉炎，淋巴结肿大。

【检验项目选择】

血常规，嗜异性凝集试验，血清抗EB 病毒抗体检测。

【检验结果判定】

1）白细胞总数正常或稍增多，最高可达（30～50）×10^9/L，淋巴细胞显著增多，并出现异常淋巴细胞。

2）血清抗EB 病毒抗体检测：以抗EBV－IgM 和IgG 较为常用前者出现早、消失快、灵敏性与特异性高，有早期诊断价值，后者出现时间早，滴度较高且可持续终身，宜用于流行病学调查。

流行性出血热

世界上人类病毒性出血热共有13 种，根据该病肾脏有无损害，分为有肾损及无肾损两大类。在我国主要为肾综合征出血热。在病原体未解决前，我国称流行性出血热；由于特异性血清学诊断的确立及病原学的解决，1982 年世界卫生组织统一定名为肾综合征出血热。现我国仍沿用流行性出血热的病名。

本病是由病毒引起以鼠类为主要传染源的自然疫源性疾病。是以发热、出血倾向及肾脏损害为主要临床特征的急性病毒性传染病。

临床上一般分为4 期：发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血小板计数，凝血酶原时间，纤维蛋白测定，肝功能，血电解质，肾功能，肌酐，血浆鱼精蛋白副凝试验（3P 试验），补体测定，血清免疫球蛋白测定，出血热特异性抗体IgM 和IgG 检测。

【检验结果判定】

1）早期白细胞总数正常或偏低，3～4d 后即明显增高，多在（15～30）×10^9/L 之间，中性粒细胞明显左移，并可出现幼稚细胞，重型、危重型可出现晚幼粒，中幼粒，

甚至早幼粒细胞，呈现类白血病反应；异型淋巴细胞在1～2d 即可出现，且逐日增多，一般为10％～20％，部分达30％以上，对诊断有参考价值。

2） 红细胞和血红蛋白，发热期开始上升，低血压期逐渐增高，休克期明显上升，至少尿期下降，其动态变化可作为判断血液浓缩与血液稀释的重要指标。

3） 血小板全病程均有不同程度降低，低血压及少尿期最低，并有异型、巨核血小板出现，多尿后期始恢复，血小板显著减少是本病一项特征性表现。

尿蛋白阳性，尿中还可有红细胞、管型或膜状物，显著的尿蛋白是本病的重要特点。

4） 肾功能检查，尿素氮及肌酐低血压休克期轻、中度增高，少尿期至多尿期达高峰，以后逐渐下降，升高程度及幅度与病情成正比。

5） 二氧化碳结合力，发热后期即下降，低血压休克期明显，少尿期亦有下降，多尿期逐渐恢复至正常。

6） 血钾在发热期可有降低，休克期仍低，少尿期上升为高血钾，多尿期又降低。但少尿期亦有呈低血钾者，血钠及氯在全病程均降低，以休克及少尿期最显著，血钙在全病程中亦多降低。

7） 肝功能检查，丙氨酸氨基转移酶（ALT）及胆红素值均升高。

8） 血清免疫球蛋白测定可见IgM 和IgA 增高，早期尤其以IgM 增高为著。

9） 补体测定，急性期补体水平下降，血清总补体及补体C_3、C_4 含量，在发热期即开始下降，低血压及少尿期尤著，病情危重者明显降低。

10） 血清特异性IgM 和IgG 抗体，前者在第1 病日即可检出，第2 病日阳性率88.2％，第3 病日达100％；IgG 在第2 病日即可检出，第4～5 病日阳性率达75％。

狂犬病

狂犬病又称恐水症，为狂犬病病毒引起的一种人畜共患的中枢神经系统急性传染病。多见于狗、狼、猫等食肉动物。人多因被病兽咬伤而感染。临床表现为特有的狂躁、恐惧不安、怕风恐水、流涎和咽肌痉挛，终至发生瘫痪而危及生命。

【检验项目选择】

血常规，血钾、钠、氯，二氧化碳结合力，狂犬病抗体、抗原测定，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数轻度增高，中性粒细胞百分比多在80％以上。

2） 狂犬病毒抗原可见效价上升，曾经接种狂犬疫苗的患者，中和抗体须超过1：

5000 方可诊断为本病。

3） 脑脊液检查，细胞数及蛋白含量稍增高。

登革热

登革热是登革热病毒引起、伊蚊传播的一种急性传染病。临床特征为起病急骤，高热，全身肌肉、骨髓及关节痛，极度疲乏，部分患者可有皮疹、出血倾向和淋巴结肿大。

本病于1779 年在埃及开罗、印度尼西亚雅加达及美国费城发现，并据症状命名为关节热和骨折热。1869 年由英国伦敦皇家内科学会命名为登革热。

20 世纪，登革热在世界各地发生过多次大流行，病例数百万计。在东南亚一直呈地方性流行。我国于1978 年在广东流行，并分离出第Ⅳ型登革热病毒。此后，于1979、1980、1985 年小流行中分离出Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型病毒。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，尿常规，脑脊液检查，补体结合试验，红细胞凝集抑制试验及中和试验。

【检验结果判定】

1） 白细胞减少，第4～5d 降至低点（2×10^9/L），退热后1 周恢复正常，分类中性粒细胞百分比减少，淋巴细胞相对增高，可见中毒颗粒及核左移，多数病例血小板减少，最低可达13×10^9/L。

2） 单份血清补体结合试验效价超过1∶32，红细胞凝集抑制试验效价超过1∶1280 者有诊断意义。

3） 双份血清恢复期抗体效价比急性期高4 倍以上者可以确诊。

4） 中和试验特异性较高，中和指数超过50 者为阳性。

艾滋病

艾滋病（AIDS）是获得性免疫缺陷综合征的简称，是由人类免疫缺陷病毒引起的一种严重传染病。艾滋病通过性接触及输血或血制品等方式侵入人体，特异性地破坏辅助性T 淋巴细胞，造成机体细胞免疫功能严重受损。临床上由无症状病毒携带者发展为持续性全身淋巴结肿大综合征和艾滋病相关综合征，最后并发严重机会性感染和恶性肿瘤。本病目前尚无有效防治方法，病死率极高，已成为当今世界最为关注的公共卫生问

题。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，尿常规，肝功能，肾功能，免疫球蛋白测定，免疫复合物测定，抗HIV 抗体测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数多下降至4 ×10^9/L 以下，分类中性粒细胞百分比增加，淋巴细胞明显减少，多低于1 ×10^9/L 。

2） 红细胞计数、血红蛋白均降低，少数病人血小板可减少。

3） 免疫球蛋白升高，免疫复合物增加。

4） 抗HIV 抗体测定，阳性有诊断意义，说明被检查者已感染HIV ，并具有传染性。

疟疾

疟疾又名打摆子，是由疟原虫经按蚊叮咬传播引起的一组寄生虫病。临床上以周期性定时性发作的寒战、高热、出汗，以及贫血和脾大为特点。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血钾、钠、氯化物，肾功能，外周血厚滴血片找疟原虫，骨髓涂片找疟原虫，血清疟原虫抗原测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数 （WBC） 正常或偏低，单核细胞百分比例偏高。

2） 红细胞 （RBC） 及血红蛋白 （Hb） 可降低。

3） 外周血厚滴血片、骨髓涂片找疟原虫，一般发作前数小时内检查，阳性率较高。

4） 血清疟原虫抗原测定可为阳性。

细菌性痢疾

细菌性痢疾是由志贺菌属痢疾杆菌引起的肠道传染病。临床以发热、腹泻、里急后重、粘液脓血便为特征。

【检验项目选择】

血常规，便常规，便培养及药敏试验，便中志贺菌可溶性抗原测定，血钾、钠、氯

化物，肾功能。

【检验结果判定】

1） 急性菌痢白细胞总数和中性粒细胞百分比多增高，中毒型菌痢可达（15～30）×10^9/L 以上，有时可见核左移现象。

2） 慢性菌痢红细胞计数及血红蛋白可轻度下降。

3） 便常规镜检，可见较多白细胞或成堆脓细胞以及少量红细胞和巨噬细胞。

4） 便培养，痢疾杆菌阳性，是确诊的依据。

5） 便中志贺菌可溶性抗原测定如葡萄球菌A 蛋白协同凝集（SPA）试验阳性，有快速诊断的价值。

血吸虫病

血吸虫病是由血吸虫的成虫寄生于人体所引起的地方性疾病，主要流行于亚、非、拉美的73 个国家，患病人数约2 亿左右。以发热、变态反应、腹痛、腹泻、肝脾肿大为特点。我国流行的是日本血吸虫（简称血吸虫病）。

【检验项目选择】

血常规，血钾、钠、氯化物，肝功能，肾功能，血清蛋白测定，间接血凝试验，便直接涂片及沉淀孵化试验。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数及嗜酸粒细胞百分比均明显增加，白细胞总数多在10 ×10^9/L 以上。

2） 红细胞计数及血红蛋白晚期可降低。

3） 肝功能检查，血清谷丙转氨酶轻度增高。

4） 血清蛋白测定，白蛋白明显下降，球蛋白显著升高，浊度试验大多阳性。

5） 便沉淀检查易找到血吸虫卵，孵化阳性率极高，阳性率可高达80 %左右。

6） 间接血凝试验可为阳性，有辅助诊断意义。

流行性腮腺炎

流行性腮腺炎是由腮腺病毒所引起的急性传染病。临床特征为起病急、发热及腮腺非化脓性肿痛等特点，病情严重可侵犯各种腺组织或神经系统及肝、肾、心脏、关节等器官。本病好发儿童，亦可见于成人。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血、尿淀粉酶测定，补体结合与血凝抑制试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数正常或偏高，后期淋巴细胞百分比增多，有并发症时白细胞计数可明显增高。

2）尿常规检查，肾脏受累时可出现尿蛋白、红细胞及白细胞等。

3）血、尿淀粉酶测定，90％轻度和中度增高，有辅助诊断意义，淀粉酶增高程度往往与腮腺肿胀程度成正比。

4）补体结合与血凝抑制试验，早期及恢复期，双份血清抗体效价有4 倍以上增高，或单份血清抗体效价大于1 ∶64 者有诊断意义。

流行性乙型脑炎

流行性乙型脑炎简称乙脑，是由嗜神经的乙脑病毒所致的中枢神经系统性传染病。经蚊等吸血昆虫传播，流行于夏秋季，多发生于儿童，临床上以高热、意识障碍、惊厥、呼吸衰竭及脑膜刺激征为特征。部分患者留有严重后遗症，重症患者病死率较高。

【检验项目选择】

血常规，血钾、钠、氯化物，肾功能，脑脊液检查，血清补体结合试验血凝抑制试验，中和试验，乙脑病毒抗原检测，酶联免疫吸附试验，白细胞粘附抑制试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数一般在（10～30）×10^9/L，以中粒细胞为主，占80％以上，核左移，嗜酸粒细胞可减少。

2）脑脊液外观清亮或微混，蛋白稍增加，糖定量正常或偏高，氯化物正常，白细胞计数增加，多数在（0.05～0.5）×10^9/L 之间，在病初以中性粒细胞占多数，以后逐渐以淋巴细胞增多为主，化脓性脑膜炎患者脑脊液中的免疫球蛋白IgM 明显升高，结核性脑膜炎患者则以免疫球蛋白IgA、IgG 升高显著，而病毒性脑膜炎患者在后期时免疫球蛋白IgG 可有升高。

3）血清补体结合试验，阳性率在80％以上，可用于判断近期感染。

4）血凝抑制试验，抗体出现较早，但有假阳性，效价于第2 周达高峰。

5）中和试验，特异性较高，发病数周出现阳性，2 个月效价最高，抗体可维持十几年。

6）乙脑病毒抗原检测，采用免疫荧光法，方法快速，阳性率高，有早期诊断价

值。

7）酶联免疫吸附试验，检测血清中的乙脑抗体IgM 阳性，有早期诊断价值。

8）白细胞粘附抑制试验，于病程3～6d 出现阳性，特异性较高。

伤寒

伤寒是由伤寒杆菌引起的经消化道传播的急性传染病。临床特征为持续高热、全身中毒症状、相对缓脉、肝脾肿大、玫瑰疹及白细胞减少等。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血小板计数，尿常规，便潜血试验，便培养及药敏试验，肝功能，血培养及药敏试验，骨髓培养及药敏试验，肥达反应，葡萄球菌A 蛋白协同凝集（SPA）试验，免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数减少，中性粒细胞百分比可降低，嗜酸粒细胞减少或消失，如血小板计数下降，提示病情严重。

2）尿蛋白阳性、偶见少量管型。

3）便潜血试验阳性。

4）血培养发病第1 周阳性率可达80％以上，以后阳性率下降。

5）骨髓培养全病程均可获较高的阳性率，第1 周可高达90％，且较少受抗菌药物的影响。

6）便培养在第3～5 周时阳性率较高，但在判断结果时，要注意排除慢性胆道带菌者。

7）肥达反应，O 等于或大于1∶80，H 等于或大于1∶160。

8）葡萄球菌A 蛋白协同凝集（SPA）试验可为阳性。

9）免疫球蛋白A、G、M 可升高。

霍乱

霍乱是由霍乱弧菌引起的急性肠道传染病。临床表现轻重不一，轻者仅有轻度腹泻，重者剧烈吐泻大量米泔水样排泄物，并引起严重脱水、酸碱失衡、周围循环衰竭及急性肾功能衰竭。

【检验项目选择】

血常规，红细胞压积，血钾、钠、钙、氯化，肾功能，便或呕吐物悬滴直接镜检，便或呕吐物细菌培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数增高，可达（15～60）×10^9/L，分类计数中性粒细胞和单核细胞百分比增高。

2）红细胞计数和红细胞压积增高。

3）血清钠、钾降低，输液后更明显，但多数氯化物正常，并发肾功能衰竭者血尿素氮升高。

4）采集患者新鲜便或呕吐物悬滴直接镜检，可见呈穿梭状快速运动的细菌，涂片染色镜检见到排列呈鱼群状革兰阴性弧菌。

流行性脑脊髓膜炎

流行性脑脊髓膜炎简称流脑，又称脑膜炎球菌病，是由脑膜炎双球菌引起的化脓性脑膜炎。临床表现为突然高热、头痛、呕吐、皮肤黏膜瘀斑瘀点，以及颈项强直等脑膜刺激征。

【检验项目选择】

血常规，血钾、钠、氯化物，肾功能，血培养及药敏试验，脑脊液检查，脑脊液培养及药敏试验，皮肤瘀点和脑脊液沉淀涂片检查。

【检验结果判定】

1）白细胞总数明显升高，可达20 ×10^9/L 以上，中性粒细胞百分比大于80 %，重者可出现中毒颗粒及空泡。

2）脑脊液检查，压力增高，外观呈混浊或脓样，蛋白显著增高，糖含量明显减少，氯化物降低，白细胞数常达1 ×10^9/L 以上，以中性粒细胞为主。

3）皮肤瘀点和脑脊液沉淀涂片检查，阳性率可达80 %左右，有早期确诊价值。

鼠疫

鼠疫是由鼠疫杆菌引起的自然疫源性烈性传染病。临床主要表现为高热、淋巴结肿痛、出血倾向、肺部特殊炎症等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，尿常规，便培养，淋巴结穿刺液，脓、痰、血、脑脊液涂片检查、细菌培养，特异性血清学检查。

【检验结果判定】

1）白细胞总数大多升高，常达（20～30）×10^9/L以上，初期为淋巴细胞增高，以后中性粒细胞显著增高。

2）红细胞、血红蛋白及血小板减少。

3）尿常规可见尿蛋白及血尿。

4）便培养常阳性。

5）淋巴结穿刺液、脓、痰、血、脑脊液涂片革兰染色，可以找到革兰阴性两端浓染的短杆菌，约50％～80％阳性率。

6）血培养在腺鼠疫早期阳性率为70％，晚期可达90％左右。败血症时可达100％阳性。

炭疽杆菌病

炭疽是由炭疽杆菌所致的人畜共患传染病。原系食草动物（羊、牛、马等）的传染病，人因接触这些病畜及其产品或食用病畜的肉类而被感染。临床上主要表现为局部皮肤坏死及特异的黑痂，或表现为肺部、肠道及脑膜的急性感染，有时伴有炭疽杆菌性败血症。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，采集病灶渗出物、分泌物、呕吐物、痰、粪、血及脑脊液等作涂片或培养。

【检验结果判定】

1）白细胞计数大多数增高，一般为（10～20）×10^9/L，少数可高达（60～80）×10^9/L，分类以中性粒细胞为主。

2）采集病灶渗出物、分泌物、呕吐物、痰、粪、血及脑脊液等作涂片或培养，可以发现病原菌。

白喉

白喉是由白喉杆菌引起的急性呼吸道传染病。临床特征为咽、喉、鼻部黏膜充血、

肿胀。由于细菌产生的外毒素所致全身中毒症状，严重者可并发心肌炎和末梢神经麻痹。本病呈世界性分布，四季均可发病，以秋季冬季较多。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能，补体C_3、C_4，咽拭子涂片及培养。

【检验结果判定】

1）白细胞增高，中性粒细胞增高显著并有中毒颗粒。

2）咽拭子涂片可找到棒状杆菌。

3）补体C_3、C_4，在急性期或恢复期补体C_3明显下降。

猩红热

猩红热为乙型溶血性链球菌A 族引起的急性呼吸道传染病。临床特征是突发高热、咽喉炎、全身鲜红色皮疹和疹后明显的脱屑。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，肝功能，肾功能，咽拭子培养，血培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数增高，可达（10～20）×10^9/L，中性粒细胞占80％以上，可见中毒颗粒，出疹后嗜酸性粒细胞可增高。

2）尿常规检查，可有少量蛋白，并发肾炎时蛋白增加，并有红细胞、白细胞及管型。

3）咽拭子培养可获得乙型溶血性链球菌A 族球菌，可确定诊断。

风疹

风疹是儿童时期常见的一种较轻的急性传染病，主要是由于母亲在怀孕早期感染风疹而引起，其临床特征为上呼吸道的轻度炎症、低热、特殊的斑丘疹和耳后、枕部及颈后淋巴结的肿大。

【检验项目选择】

血常规，血凝抑制试验，补体结合试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数偏高。

2）血凝抑制试验、补体结合试验：双份血清抗体效价，增高4 倍以上为阳性，证

明近期曾感染风疹。

急性病毒性肝炎

急性病毒性肝炎是由数种不同型肝炎病毒所致，病原主要侵犯肝脏引起肝炎，临床表现为黄疸型或无黄疸型。目前已确知至少存在有甲型、乙型、丙型、丁型及戊型5 种肝炎病毒。甲型肝炎主要经粪－口途径传播，90％为黄疸型，预后较好。乙型和丙型肝炎传播途径为经血液及母婴传播，少见黄疸，易演变为肝硬化和肝癌。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，血清肝炎病毒标志物测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数及中性粒细胞百分比均可显著增多，甲、乙型肝炎白细胞数也可降低，偶可有异常淋巴细胞。

2） 尿三胆检查：尿胆原、胆红素阳性。

3） 肝功能检查：血清谷丙转氨酶（ALT）增高，可高于正常十倍至数十倍，随病情好转，一般于3～4 周下降至正常；黄疸指数增高；血清胆红素明显升高，提示有大量肝细胞坏死。

4） 血清肝炎病毒标志物测定：甲型肝炎病毒抗体（HAV）、甲型肝炎病毒抗体免疫球蛋白M 型（抗HAV－IgM）阳性；乙型肝炎病毒（HBV）、乙型肝炎表面抗原（HbsAg）、乙型肝炎核心抗体免疫球蛋白M 型（抗HBc－IgM）阳性；丙型肝炎病毒（HCV）、丙型肝炎病毒抗体免疫球蛋白G 型阳性；丁型肝炎病毒（HDV）、丁型肝炎病毒抗体免疫球蛋白M 型（抗HDV－IgM）阳性；戊型肝炎病毒（HEV）、戊型肝炎病毒免疫球蛋白M 型（抗HEV－IgM）阳性。

第六章　血液系统疾病

再生障碍性贫血

再生障碍性贫血（简称再障）是一种多能干细胞疾病，其特征为造血细胞缺乏，骨髓造血组织被脂肪组织替换，外周血液中全血细胞减少，临床上常出现较重的贫血，感染和出血。再障是一种比较常见的造血系统疾患，患者以青壮年占绝大多数，男性多于女性。约半数以上病例因找不到明显的病因，称为原发性再障。部分病例是由于化学、物理或生物因素对骨髓的毒性作用所引起的，称为继发性再障。再障类型分为急性再障（AA）和慢性再障（CAA）。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，红细胞压积，出、凝血时间血块退缩试验，酸化溶血试验，尿含铁血黄素试验，蔗糖溶血试验，中性粒细胞碱性磷酸酶试验肝功能，肾功能，血清铁测定，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）全血细胞减少，贫血属正细胞正色素性。

2）网织红细胞计数大多低于正常。

3）血小板计数减少，出血时间延长、血块退缩不良。

4）急性型血红蛋白下降较快，白细胞明现减少，中性粒细胞绝对值＜0.5 $\times 10^9$／L，网织红细胞＜1％，绝对值＜15 $\times 10^9$／L，血小板计数＜20 $\times 10^9$／L；慢性型血红蛋白下降较慢，白细胞、中性粒细胞绝对值及血小板数常比急性型高，网织红细胞一般不超过5％。

5）骨髓象检查，骨髓增生减低或重度减低，有核细胞显著减少，主要是粒及红系细胞减少，巨核细胞减少或消失。淋巴细胞比例增多，非造血细胞如浆细胞、组织细胞和组织嗜碱细胞增多。

6）酸化溶血试验、尿含铁血黄素试验、蔗糖溶血试验、中性粒细胞碱性磷酸酶试验，便于区别阵发性睡眠性血红蛋白尿。

血友病

血友病是一组先天性凝血因子缺乏，以致凝血活酶生成障碍的出血性疾病，以出血及关节病变为主要特点。其中包括血友病甲 (因子Ⅷ、AHG 缺乏)，血友病乙 (因子Ⅸ缺乏、PTC 缺乏) 及血友病丙 (因子Ⅺ、PTA 缺乏)。血友病甲多见，约为血友病乙的7倍。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出血时间，凝血时间，凝血酶原时间，白陶土部分凝血活酶时间 (KPTT)，简易凝血活酶生成试验及纠正试验，凝血活酶生成试验，凝血因子活性测定，第Ⅷ因子相关抗原测定，Ⅷ因子抗体测定。

【检验结果判定】

1) 凝血时间延长。

2) 凝血酶原消耗试验 (PCT)，不良。

3) 白陶土部分凝血活酶时间 (KPTT)，延长，是敏感的过筛试验。

4) 简易凝血活酶生成试验 (STGT) 生成不良。

5) 凝血因子活性测定，第Ⅷ因子减少，见于甲型血友病。

6) 第Ⅷ因子相关抗原测定减少。

7) Ⅷ因子抗体测定见于5%～20%的甲型血友病。

缺铁性贫血

缺铁性贫血是指体内可用来制造血红蛋白的贮存铁已被用尽，红细胞生成障碍所致的贫血，特点是骨髓、肝、脾及其他组织中缺乏可染色铁，血清铁蛋白浓度降低，血清铁浓度和血清转铁蛋白饱和度亦均降低，表现为小细胞低色素性贫血。临床表现为乏力、气急、心悸、眼花、耳鸣、头昏等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，红细胞压积，网织红细胞计数，肝功能，肾功能，血清铁蛋白，血清铁，血清铁蛋白，总铁结合力，血清铁饱和度，红细胞游离原卟啉 (FEP) 测定，骨髓象检查，骨髓铁染色。

【检验结果判定】

1) 白细胞计数正常或轻度减低。

2）红细胞计数及血红蛋白降低，平均红细胞体积降低，平均红细胞血红蛋白含量降低，平均红细胞血红蛋白浓度降低。

3）网织红细胞计数大多正常，血小板计数高低不一。

4）血涂片可见到红细胞大小不等，中心淡染区扩大，严重者可见环形红细胞。

5）血清铁蛋白、血清铁测定，均降低。

6）总铁结合力增高，血清铁饱和度减少。

7）红细胞游离原卟啉测定可增高。

8）骨髓象检查，骨髓增生活跃，粒红比例降低，红细胞系统增生明显活跃，中幼红细胞比例增多，体积比一般的中幼红细胞略小，边缘不整齐，胞浆少，染色偏蓝，核固缩，粒系细胞和巨核细胞数量和形态均正常，用普鲁士蓝染色可见骨髓含铁血黄素阴性，铁粒幼细胞阴性或减低。

巨幼细胞性贫血

巨幼细胞性贫血是由于叶酸、维生素B_{12}缺乏或其他原因引起DNA 合成障碍所致的一类贫血，此类贫血的共同特点是外周血呈大细胞性贫血，骨髓中出现巨幼红细胞。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，红细胞压积，网织红细胞计数，血清铁和血清铁蛋白测定，肝功能，血清结合珠蛋白，尿酸，碱性磷酸酶，血清乳酸脱氢酶，骨髓象检查，胃液分析。

【检验结果判定】

1）白细胞和血小板计数大多轻度减少，中性粒细胞分叶过多。

2）红细胞计数及血红蛋白降低，平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量高于正常，平均红细胞血红蛋白浓度正常。

3）网织红细胞计数稍升高。

4）血涂片中红细胞大小不匀，异形均很明显，以椭圆形的大红细胞较多，为大细胞性贫血，红细胞中可见到Cabot 环及Howell —Jolly 小体。

5）肝功能检查，血清间接胆红素增高。

6）血清铁和血清铁蛋白增高。

7）血清结合珠蛋白、尿酸和碱性磷酸酶均减低。

8）骨髓象检查，骨髓细胞特别是红系增生显著，粒：红比率降低，红系细胞体积呈明显的巨大，胞浆发育比胞核成熟，形成“核幼浆老”的现象；粒细胞系统和巨核细

胞系统中出现巨型晚幼粒、巨型杆状核粒细胞以及巨型和分叶过多的巨核细胞，骨髓铁增高。

9）胃液分析，胃液分泌量减少，恶性贫血患者的胃游离盐酸消失。

溶血性贫血

溶血性贫血系指红细胞破坏加速，而骨髓造血功能代偿不足时发生的一类贫血。如要骨髓能够增加红细胞生成，足以代偿红细胞的生存期缩短，则不会发生贫血，这种状态称为代偿性溶血性疾病。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，红细胞压积，网织红细胞计数，尿常规、隐血试验，尿三胆，尿含铁血黄素试验，肝功能，血浆结合珠蛋白，血浆游离血红蛋白，骨髓象检查，红细胞脆性试验，抗人球蛋白试验，酸化血清溶血试验，高铁血红蛋白还原试验。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白均下降，网织红细胞增多，但在发生再障危象时，网织红细胞数可减低或消失，一般呈正细胞正色素性贫血。

2）血涂片可见到球形、靶形、镰形、盔形或破碎红细胞。

3）尿中尿胆原增多而胆红素阴性。

4）尿含铁血黄素试验及隐血试验阳性。

5）血浆结合珠蛋白明显减少或消失，血清间接胆红素增高。

6）血浆游离血红蛋白浓度增高。

7）骨髓象检查，骨髓红细胞增生明显活跃，粒红比例下降或倒置。

慢性粒细胞白血病

慢性粒细胞白血病（CML）是发生于造血干细胞水平上的克隆性疾病。细胞呈恶性增生，以细胞成熟障碍为特征，临床为一慢性过程，大量白血病细胞浸润引起脾脏明显肿大以及新陈代谢增高等表现。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，中性粒细胞碱性磷酸酶，肝功能，肾功能，血电解质，血糖，血尿酸，乳酸脱氢酶，乙肝抗原抗体检测，丙肝抗体检测，多聚酶链（PCR）检测，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数显著增高，常在50 ×10^9/L 以上。

2） 红细胞计数及血红蛋白早期正常或轻度减少，晚期降低。

3） 血小板计数增高，网织红细胞计数多增高。

4） 血涂片中的中性晚幼粒、中性中幼粒及杆状核占大多数，嗜碱粒细胞比例增高，成熟红细胞大小不均，可见有核红细胞、异形红细胞，嗜多染及点彩红细胞，但无泪滴状红细胞。

5） 血尿酸、乳酸脱氢酶测定值均可升高。

6） 骨髓象检查，骨髓有核细胞增生明显活跃或极度活跃，粒红比例高达10～50∶1，中性粒细胞碱性磷酸常减低或阴性。

慢性淋巴细胞白血病

慢性淋巴细胞白血病（CLL）是由于淋巴细胞肿瘤样增殖，其特点为成熟形态的淋巴细胞在体内积聚使血液和骨髓中淋巴细胞增多，淋巴结、肝、脾肿大，最后累及淋巴系统以外的其他组织，CLL 细胞呈单克隆性增殖，95％以上的慢淋为B 细胞型，3％～5％为T 细胞型。

CLL 在我国发生率较低，仅占慢性白血病的10％，患者多为老年人，50 岁以上占90％，男女之比为2∶1。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，肝功能，血浆蛋白电泳，血清免疫球蛋白，乙肝抗原抗体检测，丙肝抗体检测，抗人球蛋白试验，糖原染色，中性粒细胞碱性磷酸酶，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数升高，多在（30～200）×10^9/L 之间，以成熟小淋巴细胞为主，常占60％～90％，有时可见少数幼稚淋巴细胞和个别原始淋巴细胞。

2） 红细胞计数和血红蛋白早期正常，晚期减低。

3） 血小板计数早期正常，晚期减低。

4） 血涂片多数病例的慢淋细胞形态和正常淋巴细胞一样，核仁不明显，部分病例的慢淋细胞似较正常淋巴细胞略幼稚，即染色质略疏松，核仁较明显，但比急淋的原始细胞小，染色质的浓缩现象，仍属成熟淋巴细胞，血片中涂抹细胞和篮状细胞明显增多，这是CLL 血象的特征之一。

5）免疫功能检查：5％～8％的患者可出现免疫性溶血，40％～50％病例的正常免疫球蛋白减少，抗人球蛋白试验阳性见于20％的病例。

6）骨髓象检查：骨髓增生明显活跃或极度活跃，淋巴细胞系显著增多，占40％以上，以成熟小淋巴细胞为主，形态基本与外周血一致，原始淋巴细胞一般不超过1％～2％，易见蓝状细胞；糖原染色（PAS）部分细胞呈强阳性反应，部分呈颗粒状阳性；中性粒细胞碱性磷酸酶积分不一定增高，有些病例在早期甚至降低，此特征与急淋不同。

白细胞减少症

白细胞持续低于4.0 $\times10^9$/L，称为白细胞减少症。病人可无症状或有非特异性症状，如乏力、体力减退、并有易感染倾向。是否合并感染视粒细胞减少程度。感染部位以肺、尿路、皮肤等多见。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，肝功能，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数多在（2～4）$\times10^9$/L，中性粒细胞绝对值减低。

2）血红蛋白和血小板正常。

3）骨髓象检查：骨髓象一般正常，典型患者呈粒系增生不良或成熟障碍，粒细胞可有空泡、中毒颗粒及核固缩等退行性变。

急性粒细胞缺乏症

粒细胞缺乏症，是由于外周血中性粒细胞绝对值低于（0.5～1.0）$\times10^9$/L，使机体极易合并严重感染，病情危重，死亡率高，需积极抢救。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，肝功能，骨髓象检查，血、尿、痰培养及药敏试验，咽拭子培养。

【检验结果判定】

1）白细胞明显减少，常低于2 $\times10^9$/L，中性粒细胞绝对值在0.5 $\times10^9$/L 以下，严重者分类仅占1％～2％，甚至为零，绝大多数为淋巴细胞和单核细胞。

2）红细胞和血小板变化不大。

3）血涂片粒细胞浆内有中毒颗粒及空泡。

4）血沉增快，严重感染者可伴肝功能异常，主要是总胆红素定量升高。

5）骨髓象检查：骨髓粒细胞增生不良，有一过性原始粒细胞和早幼粒细胞增多，但成熟粒细胞极少见，红细胞系、巨核细胞系一般正常。

过敏性紫癜

过敏性紫癜是一种常见的变态反应性出血性疾病，主要累及毛细血管。无血小板减少和凝血障碍，除皮肤紫癜外尚可有腹部、关节及肾脏受累表现。可见于任何年龄，但儿童及青少年多见，男多于女性（2.5∶1）。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血小板计数，嗜酸性粒细胞计数，出、凝血时间，血块收缩试验，肾功能，血清免疫球蛋白测定，类风湿因子测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增加，嗜酸性粒细胞增加。

2）血小板计数正常，偶有轻度减少，但一般不少于$80\times10^9/L$。

3）出、凝血时间正常，血块收缩良好。

4）尿蛋白阳性、尿液中可见红细胞及管型。

5）血沉常增快。

6）血清免疫球蛋白IgA和IgG常增高，以前者明显。

7）肾功能不全时可有尿素氮及肌酐增高。

原发性血小板减少性紫癜

原发性血小板减少性紫癜是一种免疫性综合病征，是常见的出血性疾病。特点是血循环中存在抗血小板抗体，使血小板破坏过多，引起紫癜；而骨髓中巨核细胞正常或增多，幼稚化。临床上可分为急性及慢性两种，二者发病机理及表现有显著不同。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出血时间，血块收缩试验，血小板粘附、聚集试验，毛细血管脆性试验，凝血酶原消耗试验，抗人球蛋白试验，血小板抗体测定，血小板表面相关抗原、相关补体，循环免疫复合物，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）急性型血小板明显减少，多在20 $\times10^9$/L 以下。出血严重时可伴贫血，白细胞可增高，偶有嗜酸性粒细胞增多。

2）慢性者，血小板多在（30～80）$\times10^9$/L，常见巨大畸形的血小板。

3）红细胞及血红蛋白降低程度与出血量呈正比。

4）出血时间延长，凝血酶原消耗时间缩短，血块收缩不佳。

5）血小板粘附、聚集功能减弱。

6）血小板抗体测定阳性率为60 %以上。

7）血小板表面相关抗原、相关补体及循环免疫复合物均明显升高。

8）抗人球蛋白试验可为阳性。

9）骨髓象检查：骨髓象急性型巨核细胞数正常或增多，多为幼稚型，细胞边缘光滑，无突起、胞浆少、颗粒大，无血小板形成；慢性型，巨核细胞一般明显增多，以颗粒型巨核细胞增多为主，但胞浆中颗粒较少，嗜碱性较强，血小板形成减少。

弥散性血管内凝血

弥散性血管内凝血（DIC）是多种原因致弥漫性微血管内血栓形成，继之因凝血因子及血小板被大量消耗及纤维蛋白溶解亢进而发生的出血综合征。本征亦称消耗性凝血病或去纤维蛋白综合征。临床表现为出血、溶血、栓塞、休克等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出血时间，凝血时间（试管法），凝血酶原时间，白陶土部分凝血活酶时间测定（KPTT），凝血酶时间（TT），纤维蛋白原定量，优球蛋白溶解时间（ELT），鱼精蛋白副凝试验（3P 试验），肝功能。

【检验结果判定】

1）血小板计数少于100 $\times10^9$/L 有诊断价值，特别是呈进行性降低。

2）血涂片上可见碎裂、畸形红细胞，>2 %。

3）DIC 早期，即弥散性微血栓形成期，血液凝固时间缩短。后期凝血时间延长。凝血酶原时间延长，超过正常对照3s 以上有意义。

4）白陶土部分凝血活酶时间测定（KPTT）在DIC 的高凝期缩短，在消耗性低凝血期延长，超过正常对照10s 以上有意义。

5）纤维蛋白原定量在DIC 时被消耗，小于1.5g/L 有意义；但在感染、妊娠、恶性肿瘤、创伤或休克等“应激”状态下，纤维蛋白原量可增加。

6）凝血酶时间（TT），DIC 时TT 延长，比正常对照延长3s 以上有诊断价值。

7）鱼精蛋白副凝集试验（3P 试验）见于DIC 的早期为阳性，DIC 晚期为阴性，但此试验假阳性率高，局部血管内凝血亦可阳性。

恶性组织细胞病

恶性组织细胞病（恶组）是单核－巨噬细胞系统中组织细胞的恶性增生性疾病。临床表现以发热、肝脾淋巴结肿大、全血细胞减少和进行性衰竭为特征。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，肝功能，肾功能，髓片酸性磷酸酶染色，髓片中性粒细胞碱性磷酸酶染色，髓片非特异性酯酶染色及氟化钠抑制试验，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）早期白细胞增高，但迅速全血细胞减少，为本病突出表现之一。

2）贫血出现较早，呈进行性，严重者血红蛋白可降至20～30g/L。

3）血小板计数大多减少，晚期更甚。

4）晚期血涂片有时可出现少数中、晚幼粒细胞，部分病人血涂片可找到恶组细胞。

5）骨髓象检查：骨髓增生高低不一，晚期多数增生降低，三系细胞均减少，骨髓中出现异常组织细胞是诊断本病的重要依据。

6）中性粒细胞碱性磷酸酶阴性或积分低，对恶组的鉴别诊断有一定价值。

骨髓增生异常综合征

骨髓增生异常综合征是造血干细胞增殖分化异常所致的造血功能障碍。主要表现为外周血全血细胞减少，骨髓细胞增生，成熟和幼稚细胞有形态异常即病态造血。部分患者在经历一定时期的MDS 后转化成为急性白血病；部分因感染、出血或其他原因死亡，病程中始终不转化为急性白血病。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，肝功能，肾功能，血清铁蛋白测定，乙肝抗原抗体检测，抗碱血红蛋白，血、尿溶菌酶，骨髓象检查，髓片铁染色，过氧化物酶染色，糖原染色，氯醋酸酯酶染色，α醋酸萘脂酶及氟化钠抑制试验，中性粒细胞碱性磷酸酶染色。

【检验结果判定】

1）外周血全血细胞减少，其程度依不同分型而异，偶有白细胞增多，如难治性贫血（RA）以贫血为主，难治性贫血伴有原始细胞增多（RAEB）或转变中的RAEB（RAEB－T）则常有明显的全血细胞减少。

2）血涂片可见大红细胞及血小板，幼粒、幼红细胞及单核细胞增多。

3）骨髓象检查：大多数患者骨髓增生明显或极度活跃，少数增生正常或减低，至少有两系出现病态造血，如红系增生过多或过少，环状铁粒幼细胞增多，幼红细胞核分叶、多核、核形异常及巨幼样变；粒细胞浆内颗粒过多、过少或无，核分叶过多或过少，核浆发育失衡；巨核细胞形态异常，有小巨核细胞等；细胞形态异常反映了MDS的病态造血，检出小巨核细胞是MDS的支持诊断指标之一。

4）抗碱血红蛋白（HbF）阳性者亦有较强的急性白血病转化倾向。

5）血、尿溶菌酶可增高。

阵发性睡眠性血红蛋白尿

阵发性睡眠性血红蛋白尿，简称PNH，是一种获得性红细胞膜缺陷引起的慢性溶血。其特点为常在睡眠后解酱油色或葡萄酒色尿。可伴全血细胞减少、感染和血栓形成。临床上根据病人红细胞对补体敏感性的不同分为PNHI型、PNH II型、PNH III型三型；按血红蛋白尿发作情况分为频发型、不发作型、偶发型三型。

本病虽少见，但近年来有增多趋势，我国北方多于南方。半数以上发生在20～40岁青壮年，男性多于女性，与遗传及种族无关。本病起病隐袭缓慢，呈慢性过程，以贫血、出血为首发症状者较多，以血红蛋白尿起病者较少。且本病可与再生障碍性贫血相互转化，患者主要死亡原因为出血及感染。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，血电解质，肝功能，肾功能，酸化血清溶血试验，糖水溶血试验，尿潜血，尿含铁血黄素试验，蛇毒因子溶血试验，中性粒细胞碱性磷酸酶，骨髓项检查。

【检验结果判定】

1）全血细胞减少，约占1/4，呈正色素或小细胞低色素性贫血。

2）网织红细胞计数正常或偏高。

3）酸化血清溶血试验、糖水溶血试验、尿潜血、尿含铁血黄素试验阳性。

4）中性粒细胞碱性磷酸酶阳性率及积分均降低。

5）骨髓项检查：频发型早期骨髓红系增生明显活跃，后期增生低下，酷似再障。不发作型及偶发型可始终增生低下，易与再混淆。

6）PNH 诊断标准：首先临床表现符合PNH ；其次实验室检查酸化血清溶血试验（Ham 试验）、糖水试验、蛇毒因子溶血试验、尿潜血或尿含铁血黄素试验中凡符合下述任何一种情况，即可诊断：①二项以上阳性；②一项阳性，但须具备以下条件：a．两次以上阳性，或一次阳性，但操作正规，有阴性对照；b．有溶血证据；c．能排除其他溶血，如G6PD 缺乏所致溶血，自身免疫性溶血性贫血等。

7）再障—PNH 综合征：根据病情演变和特征，下列不同情况均属本综合征，但应分别标明。①再障→PNH ：指原有肯定的再生障碍性贫血，转为可确定的PNH ，再障的表现已不明显；②PNH →再障：指原有肯定的PNH ，转为明确的再障，PNH 的表现已不明显；③PNH 伴有再障特征：指PNH 伴有骨髓增生低下，巨核细胞减少，网织红细胞不增高等再障表现者；④再障伴有PNH 特征：指再障伴有PNH 的有关化验结果阳性者。

葡萄糖—6 －磷酸脱氢酶缺乏症

G6PD 缺乏症是一种遗传性代谢缺陷，为X 伴性不完全显性遗传，男性发病多于女性。由于G6PD 缺乏症变异型很多，临床表现差异极大，轻型者可无任何症状，重型者可表现为先天性非球形红细胞溶血性贫血，一般多表现为服用某些药物、蚕豆或在感染后诱发急性溶血，重者可危及生命。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，尿三胆，尿含铁血黄素试验，尿潜血，肝功能，肾功能，血电解质，血清游离血红蛋白，血清结合珠蛋白，高铁血红蛋白还原试验，变性珠蛋白小体生成试验，葡萄糖—6 －磷酸脱氢酶荧光斑点试验和活性测定，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白降低。

2）网织红细胞计数增高。

3）血涂片有的可见破碎的红细胞。

4）尿三胆检查，尿胆原增多而胆红素阴性。

5）尿含铁血黄素试验及尿潜血试验阳性。

6）血清结合珠蛋白减少、直接胆红素及间接胆红素增高。

7）血清游离血红蛋白增高。

8） 高铁血红蛋白还原试验降低。

9） 变性珠蛋白小体生成试验增高。

10） 葡萄糖－6 磷酸脱氢酶荧光斑点试验和活性测定荧光很弱或无荧光。

11） 骨髓象检查：红系增生明显活跃，占有核细胞的50％以上。

纯红细胞再生障碍性贫血

纯红细胞再生障碍性贫血（简称纯红再障）是一种比较少见的贫血。其特点是贫血显著，白细胞和血小板正常。骨髓中红细胞系统极度减少，而粒细胞和巨核细胞系统增生正常。纯红再障可分为先天性和获得性。先天性病因不明，多见婴儿，且多于6 个月内发病。获得性可分为原发性及继发性。原发性大多数病例是自身免疫性疾病，少数病例病因不明。继发性可与胸腺瘤、感染、药物、化学性、溶血性贫血、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、急性肾功能衰竭、严重营养缺乏及其他肿瘤等有关。多见于成年人，多数为可恢复性。少数可转成全血细胞减少。

临床表现疲乏无力、头晕、眼花、耳鸣、心悸、面色苍白等。一般无感染和出血现象，肝脾淋巴结不大。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，红细胞压积，平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量、平均红细胞血红蛋白浓度，酸溶血试验，抗人球蛋白试验，血清铁、总铁结合力及铁蛋白测定，免疫球蛋白测定，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数及血小板计数均在正常范围内，极少数患者可有轻度白细胞或血小板减少，白细胞分类正常。

2） 红细胞及血小板形态正常。

3） 血红蛋白降低。

4） 网织红细胞数绝对值减少。

5） 红细胞压积降低。

6） 酸溶血试验、抗人球蛋白试验均阴性。

7） 血清铁、总铁结合力及铁蛋白测定可增加。

8） 免疫球蛋白测定，部分增高，尤其IgG 可增高。

9） 骨髓象检查：骨髓红系增生明显降低，粒细胞及巨核细胞系的各阶段在正常范围内。因骨髓象是各细胞系的百分比，故当红系严重减少时，则粒系的百分比相对增

加，但原粒及早幼粒增加不多，极少数患者的巨核细胞可以增多，三系无病态造血的形态异常。

血管性假血友病

血管性假血友病简称VWD，是仅次于血友病的最常见遗传性出血性疾病。其特点为自幼即有出血性倾向，出血时间延长和因子Ⅷ含量减低。其遗传方式为常染色体显性遗传，个别亚型呈隐性遗传。男女均可发病，双亲均能传递，有的病人双亲可无出血症状。本病多在儿童期发生出血倾向，少数病人至成年以后才出现临床症状。本病的出血症状与典型的血友病相似，但程度稍轻，不过也有较严重的。病情可随年龄增长而减轻。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，阿司匹林耐量试验，白陶土部分凝血活酶时间，血小板粘附试验，血浆第Ⅷ因子测定，Ⅷ因子相关抗原测定，血浆因子Ⅷ：C 测定。

【检验结果判定】

1）血小板形态和计数正常。

2）出血时间延长或阿斯匹林耐量试验阳性。

3）血小板粘附试验延长或正常。

4）活化的部分凝血活酶时间延长或正常。

5）Ⅷ因子相关抗原（WF：Ag）减低或正常。

6）因子Ⅷ：C 凝血活性减少或正常。

淋巴瘤

淋巴瘤是原发于淋巴结或淋巴组织的恶性肿瘤，在遗传性或获得性免疫障碍的情况下，淋巴细胞长期受到外源性或内源性抗原的刺激，导致增殖反应，由于T 抑制细胞的缺失或功能障碍，淋巴细胞对抗原刺激的增殖反应失去正常的反馈控制，因而出现无限制的增殖，最后导致淋巴瘤的发生。临床上分为霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤两大类。

本病常有全身无力、消瘦、食欲不振、盗汗及不规则发热。少数可有周期性发热。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血小板计数，肝功能，肾功能，血沉，乳酸脱氢酶，碱

性磷酸酶，5′－核苷酸酶，血清钙、铜、锌，血清铁蛋白，血清免疫球蛋白测定，补体测定，抗人球蛋白试验，脑脊液检查，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）白细胞除骨髓受累之外一般正常。

2）嗜酸性粒细胞可增多，约有1/3 患者淋巴细胞绝对值减少。

3）血红蛋白可降低，呈小细胞低色素性贫血，偶为溶血性贫血。

4）血小板可降低，提示有骨髓受累，或继发于脾功能亢进。

5）血涂片可偶见浆细胞和Reed －sternberg 细胞。

6）血沉加快提示病情处于活动。

7）乳酸脱氢酶升高反映瘤细胞增殖速度快。

8）病情进展时血清铜及铁蛋白升高，缓解期则下降；锌与之相反。

9）碱性磷酸酶升高可能有肝或骨骼受累。

10）肝脏受累者同时可伴有5′－核苷酸酶升高。

11）高钙血症提示有骨侵犯。

12）血清免疫球蛋白测定可正常或增高，晚期可减少。

13）补体C_3 可升高。

14）抗人球蛋白试验阳性。

15）脑脊液检查β_2 微球蛋白升高提示有中枢神经系统受累。

16）骨髓象检查：骨髓未受淋巴瘤侵犯之前，一般无异常，如能在骨髓涂片中找到里－斯（Reed －sternberg）细胞，对诊断有价值；这种细胞体积大、直径为15 ～20 μm，胞核可为分叶状、双核（镜影细胞）或多核；染色质分布不均、浓集成块；核膜厚而深染；核仁大而圆，可达8 μm，核仁周围有空晕区。

急性淋巴细胞白血病

急性淋巴细胞白血病是原始与幼稚淋巴细胞在造血组织中无限制增殖的恶性疾病，发病急、进展快，临床主要表现为发热、贫血、出血、骨痛、肝脾淋巴结肿大及中枢神经系统损害等，多见于儿童和青少年。按免疫标志分为非T 细胞型和T 细胞型。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，骨髓象检查，血清溶菌酶，血尿酸，血电解质测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，多数在（10 ～50）×10^9/L，少数大于100 ×10^9/L，可见大量

原始淋巴细胞、幼淋巴细胞，核型呈切迹、凹陷、折叠、分叶等畸形，并伴有篮状细胞，粒细胞减少。

2）红细胞和血红蛋白中、重度减少，呈正常细胞正色素性贫血，可见幼红细胞，成熟红细胞形态大致正常。

3）血小板计数多减少，常在50×10^9/L以下。

4）骨髓象检查：骨髓增生明显活跃或极度活跃，原幼淋巴细胞明显增生，大于30%可确定诊断，核染色质细致或粗糙；其他各阶段细胞减少，巨核细胞增生显著减少或缺如，红系细胞增生明显抑制；细胞化学染色过氧化酶染色（POX）呈阳性反应，中性粒细胞碱性磷酸酶染色（NAP）活性增高，糖原染色（PAS）20%～80%反应强阳性。

5）血清溶菌酶测定：常降低。

6）血尿酸测定：可增高。

7）血电解质测定：血钾、血钠、血氯、血钙可降低。

遗传性球形红细胞增多症

遗传性球形红细胞增多症是红细胞膜有先天性缺陷的一种溶血性贫血。其临床特点为贫血、黄疸、脾肿大、血液中球形红细胞增多，病程呈慢性贫血，并伴有反复急性发作的溶血。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，尿三胆，肝功能，酸化甘油溶解试验，红细胞渗透脆性试验，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数正常或稍增高，血涂片镜检可见小球形红细胞，这些细胞数目多少不一，其特征是细胞直径小（6～7 μm），厚度增大，约为2.2～3.4 μm（正常为1.9～2 μm），胞体小而染色深，无中央淡染区及双凹盘状。

2）血小板计数正常或偏低。

3）网织红细胞计数增高。

4）红细胞渗透脆性试验：脆性显著增加。

5）酸化甘油溶解试验：呈阳性。

6）骨髓象检查：骨髓红细胞系统增生极度活跃，以中晚幼红细胞居多。

急性失血性贫血

急性失血性贫血是因外伤或疾病致血管破裂，或凝血、止血障碍等原因使大量血液在短期内丢失，使血容量急剧减少，而引起的急性失血后贫血。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，红细胞比积，血清乳酸脱氢酶，结合珠蛋白测定，血清胆红素测定，骨髓象检查（必要时）。

【检验结果判定】

1）急性失血后2～6h，白细胞迅速增高，可达（10～30）$\times 10^9/L$，主要是中性粒细胞增多，核左移，甚至出现幼粒细胞。

2）急性失血早期血红蛋白和红细胞比积可仍在正常范围内，其后随着血液稀释，血红蛋白量和红细胞比积才逐渐下降，出血后2～3d 最为显著，贫血呈正细胞正色素性。

3）网织红细胞在急性失血后3～5d 内开始升高，6～12d 达高峰，但一般不会超过15%。

4）急性失血后1～2h 内，血小板开始升高。

5）血清胆红素测定：直接胆红素增高。

6）血清乳酸脱氢酶测定：可升高。

7）结合珠蛋白测定：可降低。

8）骨髓象检查：骨髓增生活跃，主要是幼红细胞增生为主。

地中海贫血

地中海贫血是由于血红蛋白的珠蛋白肽链合成受抑，使血红蛋白合成量减少，而引起的一类贫血，分为α－地中海贫血和β－地中海贫血。临床表现为贫血、黄疸、肝脾肿大等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，红细胞渗透脆性试验，血红蛋白电泳。

【检验结果判定】

1）白细胞计数和血小板计数可增多，血红蛋白降低，呈小细胞低色素性贫血；血涂片可见有数量不等、形状异常的红细胞，如靶形、泪滴形红细胞等。

2）红细胞渗透脆性试验：红细胞渗透脆性降低。

3）血沉可降低。

4）血红蛋白电泳：可见异常血红蛋白带。

不稳定血红蛋白病

不稳定血红蛋白病是由于血红蛋白分子中珠蛋白基因突变使α或β链上的氨基酸发生替代或缺失，导致分子结构不稳定，而引起的溶血性贫血。临床表现为贫血、黄疸、肝脾肿大、发育不良等。

【检验项目选择】

血常规，网织红细胞计数，红细胞渗透脆性试验，血红蛋白电泳，自身溶血试验及纠正试验，红细胞变性珠蛋白小体试验，血红蛋白稳定性试验，热不稳定试验，异丙醇试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白降低，呈正细胞正色性贫血，血涂片中可见异形红细胞、球形红细胞、嗜多色性和嗜碱性点彩红细胞。

2）网织红细胞计数增高，与贫血程度成正比。

3）红细胞渗透脆性试验：红细胞脆性正常或轻度升高，但在37 ℃孵育24 ～48h，则脆性明显增高。

4）自身溶血试验及纠正试验：自身溶血试验溶血增加，加入葡萄糖后溶血部分被纠正。

5）红细胞变性珠蛋白小体试验：阳性。

6）血红蛋白稳定性试验、热不稳定试验及异丙醇试验：均阳性。

原发性纤维蛋白溶解症

原发性纤维蛋白溶解症是指由于某些原因，纤溶酶原被激活为纤溶酶或纤溶酶抑制物减少，引起高纤溶酶血症，继后降解纤维蛋白原，水解其他血浆凝血因子，造成以低纤维蛋白原血症为主的低凝状态。临床表现为各种部位的严重出血。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，部分凝血活酶时间，凝血酶原时间，血浆纤维蛋白原测定，优球蛋白溶解时间，血浆纤溶酶原测定，血浆D－二聚体测定。

【检验结果判定】

1） 血小板计数可正常。

2） 出血时间正常，凝血时间、部分凝血活酶时间、凝血酶原时间以及凝血酶时间延长。

3） 血浆纤维蛋白原测定：血浆纤维蛋白原定量明显降低。

4） 优球蛋白溶解时间测定：明显缩短。

5） 血浆纤溶酶原测定：降低。

6） 血浆D－二聚体测定：增高。

红细胞丙酮酸激酶缺陷症

红细胞丙酮酸激酶缺陷症又称遗传性非球形性细胞溶血性贫血，是由于红细胞酶缺陷，糖酵解发生障碍，能量供应不足而引起的溶血性疾病。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，网织红细胞计数，自身溶血试验及纠正试验，丙酮酸激酶活性测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数和血小板计数正常，贫血程度不一，红细胞无特征性改变，可有轻度大小不等、靶形、核固缩、棘状红细胞和有核红细胞等，网织红细胞增多。

2） 自身溶血试验及纠正试验：48h 后自溶明显增加，孵育前加入葡萄糖不能纠正溶血，但加入ATP 可纠正溶血。

3） 丙酮酸激酶活性测定：活性降低，酶活性低于正常50％以下者，即有诊断意义。

铁粒幼红细胞性贫血

铁粒幼红细胞性贫血是由一组病因不同的血红素合成障碍和铁利用不良所引起的贫血。特点是骨髓中出现大量“环形”铁粒幼红细胞，且铁剂治疗无效。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血清铁测定，血清转铁蛋白测定，血清总铁结合力测定，红细胞原卟啉（FEP）和锌卟啉（ZPP）测定，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）白细胞、血小板计数一般正常，血红蛋白降低，多在70～100g/L，呈小细胞低色素性贫血，网织红细胞减低，或增高不明显。

2）血清铁测定：降低。

3）血清转铁蛋白测定：增高。

4）血清总铁结合力测定：增高。

5）红细胞原卟啉（FEP）和锌卟啉（ZPP）测定：升高。

6）骨髓象检查：骨髓增生明显活跃，红细胞系统增生明显，以中幼和晚幼红细胞为主，亦可有巨幼样变，用普鲁士蓝染色出现病理性铁粒幼红细胞及“环形”铁粒幼红细胞。

蓝组织细胞增生症

海蓝组织细胞增生症系常染色体隐性遗传性疾病，是由于神经鞘磷脂酶活性降低，受累组织中神经鞘磷脂和神经糖脂积聚，经组织化学染色呈海蓝色颗粒，因此称为海蓝组织细胞增生症。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及血红蛋白正常，血小板计数减少。

2）骨髓象检查：可见海蓝组织细胞，其苏丹黑及糖原染色呈阳性反应。

第七章　循环系统疾病

风湿性心瓣膜病

风湿性心瓣膜病系由于反复风湿性心脏炎发作，发生心瓣膜及其附属结构（腱索、乳头肌）病变，导致瓣膜狭窄和关闭不全的瓣膜功能异常，产生血液动力学障碍，即为慢性风湿性瓣膜病，心瓣膜损害患者往往有反复风湿活动史，但近1/2病人无明确风湿热病史而出现心瓣膜病。本病为我国常见的心脏病之一，多见于20～40岁成人。风湿性心瓣膜病以二尖瓣最常见，其次为主动脉瓣，后者常与二尖瓣病损同时存在称联合瓣膜病。易侵犯二尖瓣及主动脉瓣原因，可能与两者所承受压力负荷较大有关。瓣膜功能异常的主要原因为风湿热发作，但也可由于非风湿性所引起，需注意鉴别。

临床主要表现为心慌、胸闷、憋气、头晕、头胀、心前区疼痛等，少数病人可发生咯血。

【检验项目选择】

血常规，血沉，抗链球菌溶血素0试验，粘蛋白，肝功能，肾功能，血电解质，血气分析。

【检验结果判定】

1）抗链球菌溶血素0试验可增高。

2）粘蛋白增高。

3）血沉可加快。

风湿热心脏炎

风湿热是甲族乙型溶血性链球菌感染后的免疫性晚期续发病。各器官有非细菌性炎症，临床上以多发性游走性关节炎、心脏炎、皮肤环形红斑及皮下结节等为主要表现。其特点为反复风湿活动发作，若波及心脏则产生心脏瓣膜永久性损害，导致风湿性心脏病。

本病多发生于气候多变的冬春季节，在潮湿拥挤的环境中发病较多，好发年龄5～15 岁，复发多在初发后的3～5 年内，复发可导致心脏损害加重。近年来由于抗生素的应用及居住、营养条件等的改善，发病率已明显下降。

【检验项目选择】

血常规，血沉，抗链球菌溶血素O 试验，粘蛋白，C 反应蛋白，咽拭子培养，血清蛋白电泳，补体测定。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数及中性粒细胞百分比增高。

2） 血红蛋白降低。

3） 血沉及C 反应蛋白：贫血时增快，C 反应蛋白阴性，心衰病人血沉正常，C 反应蛋白阳性。

4） 粘蛋白升高。

5） 咽拭子培养要采取新鲜标本，立即培养，阳性者只说明有此菌感染，阴性者不能排除风湿热。

6） 抗链球菌溶血素O 试验：抗“O”在感染后2 周开始升高，至第5～6 周达高峰，下降较慢，抗“O”滴度≥500U 才有意义，滴度的高低与下降速度与病的严重性及预后无关，升高只说明近期有溶血性链球菌感染，不是本病特异性诊断指征。

急性感染性心内膜炎

急性感染性心内膜炎，50％～60％发生于正常心瓣膜，瓣膜及腱索可有溃疡穿孔，腱索断裂及大而脆的赘生物，赘生物脱落为细菌栓子，导致栓塞及迁移性脓肿。

临床主要表现为起病急，进展快，有高热、寒战、乏力、咳嗽，呼吸困难、抽搐、偏瘫、皮肤出血点及栓塞现象。心脏早期多无杂音，个别起病后短期内出现新的杂音并迅速变为高调、粗糙及出现心力衰竭。葡萄球菌感染可并发肺脓肿、脑脓肿及其他迁移脓肿等为表现。

【检验项目选择】

血常规，血沉，肝功能，肾功能，血培养及药物敏感试验。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数增高。

2） 血红蛋白降低。

3） 应多次连续做血培养阳性率较高。

亚急性感染性心内膜炎

亚急性感染性心内膜炎远较急性者为常见且重要。是由于微生物感染所致的心内膜炎症。临床表现为发热、贫血、脾肿大、心脏杂音、黏膜皮肤淤点、栓塞等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血沉，肝功能，肾功能，血培养及药物敏感试验，类风湿因子免疫复合物。

【检验结果判定】

1）白细胞计数正常或增高。

2）血红蛋白降低，有进行性贫血现象。

3）尿蛋白阳性。

4）血沉增快。

5）血培养阳性可确定诊断，为了提高培养的阳性率，需注意要在抗生素应用前，连续培养3 次，每次抽血量10ml，同时作需氧及厌氧培养，培养时间要长，不少于3周。如培养结果阳性，应作药敏试验。

高血压

高血压病是当前世界上威胁人类健康重要疾病之一，全世界有4 亿～5 亿高血压患者。据1991 年第三次高血压抽查结果显示，我国15 岁以上人口高血压的患病率为11.88％。大多数高血压病人无明确的病因，称为原发性高血压，即高血压病；另有5％～10％的高血压继发于其他疾病，称为继发性高血压。第三次全国高血压会议对高血压病的诊断标准进行了修改，取消了临界高血压的诊断，只要收缩压≥18.64kPa（140mmHg）或舒张压≥12.1kPa（90mmHg），即可诊断为高血压。其中血压在18.64～21.2kPa（140～159mmHg）/12.1～21.2kPa（90～99mmHg）为轻度高血压，血压在160～179/100～109mmHg 为中度高血压，血压≥180/110mmHg 则为重度高血压。

早期多无症状，偶尔体检时发现血压增高，或在精神紧张，情绪激动或劳累后感头晕、头痛、眼花、耳鸣、失眠、乏力、注意力不集中等症状，可能系高级精神功能失调所致。早期血压仅暂时升高，随病程进展血压持续升高，脏器受累。

【检验项目选择】

血糖，血脂，肾功能，血肌酐，尿3－甲基－4 羟苦杏仁酸（VMA）测定，24h 尿

醛固酮，血浆醛固酮测定，24h 尿17－羟类固醇，17－酮类固醇测定，血浆蛋白测定。

【检验结果判定】

1） 血红蛋白明显降低，尿中有蛋白、红细胞、脓细胞、尿细菌培养阳性，血清尿素氮升高，血肌酐升高，血浆蛋白降低，提示为肾实质病变引起的高血压。

2） 尿中肾上腺素、去甲肾上腺素或其代谢产物3－甲基—4 羟苦杏仁酸 （VMA），如显著增高，提示为嗜铬细胞瘤引起的高血压。

3） 血钾降低，17－羟类固醇正常，血肾素活性降低，安体舒通试验阳性，提示为原发性醛固酮增多症引起的高血压。

4） 血糖升高，24h 尿中17－羟类固醇及17－酮类固醇增多，地塞米松抑制试验及促肾上腺皮质激素兴奋试验阳性，提示为皮质醇增多症引起的高血压。

动脉粥样硬化是动脉硬化中最常见而重要的类型，其特点是受累动脉的内膜有类脂质的沉着，复合糖类的积聚，继而纤维组织增生和钙沉着，并有动脉中层的病变。本病主要累及大型及中型的肌弹力型动脉，以主动脉、冠状动脉及脑动脉为多见，常导致管腔闭塞或管壁破裂出血等严重后果。

动脉粥样硬化多见于40 岁以上的男性和绝经期后的女性。本病常伴有高血压、高胆固醇血症或糖尿病等。脑力劳动者较多见，为老年人主要病死原因之一。

【检验项目选择】

血糖，血脂，肾功能，高密度脂蛋白，脂蛋白电泳。

【检验结果判定】

1） 血胆固醇、甘油三酯增高。

2） 高密度脂蛋白降低。

3） 脂蛋白电泳图形异常，多数患者表现为第III或第IV型高脂蛋白血症。

急性心肌梗死

急性心肌梗死是指冠状动脉急性闭塞，血流中断，所引起的局部心肌的缺血性坏死，临床表现可有持久的胸骨后疼痛、休克、心律失常和心力衰竭。

本病在欧美诸国多见，如美国每年约有130 万人发生心肌梗死，而我国此病的患病率和死亡率虽较发达国家明显较低，但近年也有增加趋势。北京、天津等华北地区较华南、华东稍多。欧洲1976 年资料的年发病率，在20 ～64 岁组人口中，男性为3.40 ‰，女性0.9 ‰。

【检验项目选择】

血常规，出凝血时间，血小板计数，凝血酶原时间，血沉，肝功能，肾功能，血电解质，心肌酶谱测定，尿肌红蛋白。

【检验结果判定】

1）发病开始24～48h后白细胞可以增至（10～20）×10^9/L，中性粒细胞百分比增多，嗜酸粒细胞减少或消失，血沉增快，均可持续1～3周。

2）心肌酶谱测定是诊断该病的重要指标，肌酸磷酸激酶（CPK）在发病6～8h开始升高，24h达最高峰。2～3d下降至正常。此酶在其他组织细胞中含量不多，所以特异性较强，CPK—MB的峰值常可反映梗死的范围。谷草转氨酶（GOT）在发病6～12h开始升高，20～48h达最高峰，3～5d恢复正常。因该酶还存在于肝细胞中，所以特异性较差。乳酸脱氢酶在梗塞后8～10h开始上升，3～5h达最高峰，约持续8～14d方恢复正常，其同功酶LDH1特异性高。

3）血肌红蛋白在心肌梗死2～4h开始上升，4h达最高峰，较血清酶出现早，持续3～5日恢复正常。

法乐四联症

在紫绀型先心病中最常见（占70%～75%），为复合性先天性畸形，包括肺动脉口狭窄，室间隔缺损，主动脉骑跨于缺损的心室间隔上或右位和右心室肥厚四种畸形。

【检验项目选择】

血常规，红细胞比积，血糖，血脂，肾功能。

【检验结果判定】

红细胞计数、血红蛋白浓度和红细胞比积均显著升高。

心肌炎

心肌炎常是全身性疾病在心肌上的炎症性表现，由于心肌病变范围大小及病变程度的不同，轻者可无临床症状，严重可致猝死，诊断及时并经适当治疗者，可完全治愈，迁延不愈者，可形成慢性心肌炎或导致心肌病。临床上以病毒性心肌炎最为常见。临床可出现发热、胸闷、胸痛、心悸、气急及心律失常等。

【检验项目选择】

血常规，血沉，心肌酶谱测定，C反应蛋白，抗“O”，血清中合抗体测定，血、咽

拭子培养。

【检验结果判定】

1）白细胞计数在病毒性心肌炎可正常、偏高。

2）血沉大多正常，急性期亦可增快。

3）C 反应蛋白大多正常，急性期为阳性。

4）心肌酶谱测定：天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸磷酸激酶（CPK）及其同功酶（CPK－MB）均升高，慢性心肌炎多在正常范围。

5）血、咽拭子培养如阳性有重要诊断价值。

克山病

克山病，亦称地方性心肌病，于1935 年在我国黑龙江省克山县发现，因而命名克山病。

其病因一方面是由于病区水土中微量元素硒、钼、镁或有关营养物质缺乏，失去平衡引起代谢紊乱而导致心肌损伤，另一方面是由病毒感染引起的。主要发生在我国从东北到西南的狭长地带内。

【检验项目选择】

血常规，血沉，心肌酶谱测定，肝功能。

【检验结果判定】

1）急型白细胞总数增多，血沉加快，血清天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）、肌酸磷酸激酶（CPK）增高。

2）慢型丙氨酸氨基转移酶（GPT）增高。

急性心包炎

急性心包炎是心包脏层和壁层的急性炎症。病因大都继发于全身性疾病，临床上以非特异性、结核性、风湿性以及心肌梗死、尿毒症和肿瘤等引起者较为多见，近年来，由于抗生素药物的广泛应用，细菌性和风湿性已明显减少，而急性非特异性心包炎渐趋增多。

主要表现为发热、气急、干咳、呼吸困难及心前区疼痛等。

【检验项目选择】

血常规，血沉，心肌酶谱测定，肝功能，肾功能，心包穿刺液涂片、培养、查瘤细

胞。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞明显增高，提示为化脓性心包炎。

2）白细胞计数正常，淋巴细胞百分比增加，提示为结核性心包炎。

3）心包穿刺液为渗出性、脓性或血性，涂片及培养可能查出病原菌，肿瘤性心包积液可查出瘤细胞，有重要的诊断价值。

梅毒性心血管病

系由梅毒螺旋体进入主动脉外膜滋养血管引起慢性炎症、血管闭塞，而后发生主动脉中层弹力纤维和肌肉层坏死、纤维化瘢痕形成，导致主动脉炎、主动脉瘤、冠状动脉口狭窄和主动脉瓣关闭不全等病变，出现相应的临床表现。少数病例亦可侵人心肌。本病为后天性传染，多在受染后10 ～25 年始出现心血管的临床症状和体征。

【检验项目选择】

血常规，血沉，心肌酶谱测定，肝功能，肾功能，梅毒血清学试验，梅毒螺旋体抗体试验。

【检验结果判定】

1）梅毒血清学试验阳性，可做出诊断。

2）若有典型临床表现，但梅毒血清学试验反应阴性者，可作梅毒螺旋体抗体试验。

第八章　泌尿系统疾病

急性肾小球肾炎

急性肾小球肾炎（简称急性肾炎）是由免疫反应而引起的弥漫性肾小球损害，多数属于急性链球菌感染后肾炎。它是以急性发作的血尿、蛋白尿、浮肿、高血压或伴短暂氮质血症为主要特征的一组综合征，有称为急性肾炎综合征，儿童及青少年多见。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血沉，肾功能，肌酐清除率，血脂，乙肝两对半和丙肝抗体测定，血电解质，血清补体试验，抗“O”，尿纤维蛋白降解产物（FDP），血清循环免疫复合物，冷球蛋白试验，24h 尿蛋白定量，肌酐清除率，血清补体试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白可有短暂轻度下降。

2）血沉增快。

3）尿镜检可见大量的红细胞和数量不等的白细胞、颗粒管型及红细胞管型，红细胞形态多皱缩，边缘不整或呈多形性，红细胞管型存在更有助于急性肾炎的诊断。

4）尿常规检查：蛋白尿为本病的一个重要特点，尿蛋白含量不一，一般1～3g／24h，（尿蛋白定性十～＋＋＋），数周后尿蛋白逐渐减少，固定在微量～十之间，多在1 年后转阴或微量。

5）尿比多在1.020 以上。

6）尿纤维蛋白降解产物（FDP）值增高。

7）尿素氮及肌酐清除率测定：尿素氮升高，肌酐清除率下降。

8）血清循环免疫复合物、冷球蛋白试验阳性。

9）血清补体浓度80％～95％患者在起病后2 周内可有血清总补体及C_3 降低，4 周后开始复升，6～8 周恢复到正常水平。

10）抗“O”增高，提示有链球菌感染史。

急进型肾小球肾炎

急进型肾小球肾炎（简称急进性肾炎）是一组病情发展急骤，伴有少尿、蛋白尿、血尿和肾功能进行性减退的肾小球疾病，预后差，如治疗不当，经数周或数月即进入尿毒症期，其病理特点为广泛的肾小球新月体形成。临床上可分3 型：Ⅰ型（抗肾小球基膜型）、Ⅱ型（免疫复合物型）、Ⅲ型（无免疫复合物）。多见于青壮年男性。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，肝功能，肾功能，血电解质，24h 尿蛋白定量，血肌酐，肌酐清除率，血清免疫复合物，血、尿纤维蛋白降解产物（FDP），冷球蛋白试验，类风湿因子，血清补体试验。

【检验结果判定】

1）血红蛋白降低。

2）尿常规始终可见镜下血尿，常伴红细胞管型。

3）尿蛋白为中等量，亦可呈大量。

4）肾功能及肌酐测定：血尿素氮及肌酐呈持续性增高，内生肌酐清除率明显降低。

5）血电解质测定：血钾增高，血钙、血磷一般正常。

6）尿纤维蛋白降解产物（FDP）值增高。

7）血清补体一般正常，冷球蛋白试验阳性。

慢性肾小球肾炎

慢性肾小球肾炎（简称慢性肾炎）是一组病因不同，病理变化多样的慢性肾小球疾病。临床特点为病程长，病情逐渐发展，有蛋白尿、血尿及不同程度高血压和肾功能损害，于患病2～3 年或20～30 年后，终将出现肾功能衰竭。临床分为普通型、肾病型、高血压型、混合型、急性发作型五型。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血沉，肝功能，肾功能，乙肝“两对半”，血电解质，血脂，血蛋白电泳，24h 尿蛋白定量，肌酐清除率，尿蛋白电泳，血、尿纤维蛋白降解产物（FDP），血清补体试验，抗溶血性链球菌O 试验。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白成比例下降，呈轻、中度正色素性贫血。

2）血沉增快。

3）尿比重偏低，多在1.020 以下，疾病晚期常固定在1.010 。

4）尿蛋白微量～＋＋＋不等，尿中常有红细胞及管型（颗粒管型、透明管型），急性发作期有明显血尿或肉眼血尿。

5）内生肌酐清除率降低，血尿素氮及肌酐升高。

6）血清电解质一般无明显异常。

7）抗溶血性链球菌O 试验阳性。

8）血、尿纤维蛋白降解产物（FDP）阳性。

9）血清补体试验：总补体或C_3 下降。

10）乙型肝炎表面抗原（HbsAg）阳性。

肾病综合征

肾病综合征是由多种病因引的以大量蛋白尿、低蛋白血症、水肿、高脂血症为其临床特点的一组症候群。可分为原发性与继发性肾病综合征。原发性肾病综合征，病因及发病机理尚未明了。基本病理缺陷是肾小球毛细血管基底膜通透性增加，根据临床表现的不同可分为原发性肾病Ⅰ型和Ⅱ型。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，出、凝血时间，血液流变学，血沉，肝功能，肾功能，血脂，血电解质，血蛋白电泳，24h 尿蛋白定量，肌酐，肌酐清除率，尿蛋白电泳，血、尿纤维蛋白降解产物（FDP）测定。

【检验结果判定】

1）尿常规检查：尿中除有大量蛋白外，可见透明管型或颗粒管型，有时也可见脂肪管型。

2）血、尿纤维蛋白降解产物（FDP）测定：Ⅰ型正常，Ⅱ型增高。

3）血沉增快，多与水肿相平行。

4）血浆总蛋白降低，白蛋白/球蛋白可倒置。

5）血脂测定：血胆固醇Ⅰ型增高，Ⅱ型可不增高。

6）肾功能及肌酐测定：血尿素氮、肌酐有一过性增高。

急性肾盂肾炎

急性肾盂肾炎是指肾盂黏膜及肾实质的急性感染性疾病，主要是大肠杆菌的感染，另外还有变形杆菌、葡萄球菌、粪链球菌及绿脓杆菌等引起。表现为高热、寒战、全身酸痛、乏力、恶心及尿频、尿急、尿痛等。

【检验项目选择】

血常规，中段尿常规，中段尿培养十药敏十菌落计数，血沉，肝功能，肾功能，血电解质，血培养（必要时），血糖。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比均升高。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检尿中可见红细胞数目多少不一，脓尿（每高倍视野≥5 个白细胞）为其特征性改变，若平均每高倍视野中有0～3 个白细胞，而个别视野中可见成堆白细胞，仍有诊断意义，如发现白细胞管型，特别是粘有细菌者，尤有诊断意义。

3）新鲜中段尿培养及菌落计数是确诊的重要指标，尿培养阳性，菌落计数＞1×10^8/L（10 万/ml），即有诊断价值。

4）新鲜中段尿直接涂片，用革兰染色后镜检，找到细菌，或新鲜中段尿10ml 离心后取沉渣直接涂片找细菌，每高倍视野细菌数15～20 个以上，均具有诊断意义。

5）血沉可增快。

慢性肾盂肾炎

慢性肾盂肾炎是指尿路感染病史超过1 年并有肾盂、肾盏黏膜和间质纤维化瘢痕变形，或经治疗后仍有肾小管功能减退者。

【检验项目选择】

血常规，中段尿常规，中段尿培养十药敏十菌落计数，中段尿高渗培养（必要时），尿液抗体包裹细菌检查，肾功能，肌酐，血电解质。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比均升高，提示为慢性期急性发作。

2）尿常规检查：尿蛋白一般为微量或少量，尿沉渣镜检可有少量红细胞及白细胞，若发现白细胞管型有助于诊断，但非本病所特有。

3） 尿培养同急性肾盂肾炎，但阳性率较低，有时需反复检查方可获得阳性结果。

4） 尿液抗体包裹细菌检查阳性时，有助本病诊断，据此可与膀胱炎相鉴别。

5） 血电解质测定：血钾增高，提示为少尿。

6） 肾功能、肌酐测定：晚期出现肾小球功能障碍，血尿素氮及肌酐可增高。

急性肾功能衰竭

急性肾功能衰竭是一组综合征，系由于休克、某些急性中毒、严重感染、溶血、复合伤、烧伤、挤压伤等引起急性肾小管坏死所致，其他体液改变如代谢性酸中毒，电解质平衡紊乱等是否发生，则决定于起基础损伤或病变的性质与程度，肾衰的时间长短和轻重，以及治疗方式和水平等。在早期诊断和正确治疗下大多数患者能够完全恢复，否则死亡率甚高。

临床按尿量分为两型：少尿－无尿型和多尿型。少尿－无尿型的急性肾衰占极大多数。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，肝功能，肾功能，肌酐，肌酐清除率，血电解质，尿常规，尿比重，尿钠。

【检验结果判定】

1） 红细胞计数及血红蛋白均下降，白细胞计数增高，血小板减少。

2） 尿常规检查：尿蛋白阳性，尿比重降低，常小于1.015 ，尿呈酸性，尿沉渣镜检可见粗大颗粒管型，少数红细胞及白细胞。

3） 肾功能及肌酐测定：血尿素氮及肌酐均升高，二氧化碳结合力亦降低。

4） 肌酐清除率下降。

5） 尿肌酐与血清肌酐比值测定可小于20 。

6） 血电解质测定：血中钾、镁、磷增高，血钠正常或略降低，血钙降低。

7） 尿钠升高。

慢性肾功能衰竭

慢性肾功能衰竭是指各种慢性肾脏病晚期，肾实质已严重毁损，致使氮质代谢产物潴留，水、电解质及酸碱平衡失调，内分泌紊乱等所表现的一种临床症候群，发病率约占人群万分之0.5 左右。临床上按肾功能损害程度分为肾功能代偿期、氮质血症期、肾

功能衰竭尿毒症早期及肾功能衰竭尿毒症晚期4 期。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血小板计数，肝功能，肾功能，肌酐，血电解质，血脂，血气分析，乙肝两对半，出、凝血时间，24h 尿蛋白定量，肌酐清除率。

【检验结果判定】

1） 红细胞计数降低，血红蛋白一般在80g/L 以下，终末期可降至20 ～30g/L，可伴有血小板降低或白细胞计数偏高。

2） 尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检可见红细胞、白细胞或管型，尿比重多在1.018 以下，尿毒症时固定在1.010 ～1.012 之间。

3） 肾功能、肌酐测定：血尿素氮、肌酐可增高。

4） 肌酐清除率降低。

5） 血电解质测定：血钙下降，血磷升高。

肾小管性酸中毒

肾小管性酸中毒系远端或近端肾小管功能缺陷，不能在肾小管腔液与管周液之间建立起有效的pH 梯度，泌氢及生成氨减少，使氢离子滞留体内，致产生酸中毒。临床表现为多尿、烦渴、多饮，常有骨骼及肌肉疼痛，未明原因的双肾结石和肾钙等。

【检验项目选择】

尿常规，肾功能，血糖，尿糖，血钾、钠、氯、钙、磷、镁，血气分析，24h 尿钾、钠、氯测定。

【检验结果判定】

1） 尿pH 值在6.0 以上。

2） 血钠、血钾及血钙降低，血氯明显增高。

过敏性紫癜性肾炎

过敏性紫癜性肾炎是过敏性紫癜并发的肾脏损害，肾脏病理改变以肾小球系膜病变为主。临床表现为特征性的出血性皮疹、关节炎、胃肠病变及肾的损害，部分患者起病前有呼吸道感染及药物、食物过敏史。本病属非遗传性疾病，但存在遗传好发倾向，常发生于10 岁以下儿童，成人较少见，好发于寒冷季节，男女发病无明显差异。本病大多数预后良好，有自限性，也有反复发作或迁延数月甚至数年。

【检验项目选择】

血常规，出、凝血时间，血小板计数，尿常规，肝功能，肾功能，24h 尿蛋白定量，肌酐清除率。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，以中性粒细胞和嗜酸性粒细胞为主。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜下可见大量红细胞，提示有肾脏损害。

第九章　神经系统疾病

急性脊髓炎

急性脊髓炎是指脊髓的一种非特异性炎性病变，多发生在感染之后，炎症常累及几个髓节段的灰白质及其周围的脊膜，并以胸髓最易受侵而产生横贯性脊髓损害症状。部分病人发病后，瘫痪和感觉障碍的水平均不断上升，最终甚至波及上颈髓而引起四肢瘫痪和呼吸肌麻痹，并可伴高热，危及病人生命安全。

【检验项目选择】

血常规，血培养及药物敏感试验，尿培养及药物敏感试验，血沉，血电解质，血糖，肾功能，脑脊液常规、生化、细胞学检查。

【检验结果判定】

1）白细胞总数可稍增高。

2）脑脊液检查：细胞总数特别是淋巴细胞可有不同程度的增高，蛋白含量增高，但也可正常。

散发性脑炎

散发性脑炎是由病原体侵入中枢神经系统而引起的疾病，主要包括病毒性脑炎和感染后变态反应性脱髓鞘性脑病等两类疾病。常见的症状有精神障碍、瘫痪、头痛、发热、意识障碍、恶心呕吐及癫痫性抽搐等。

【检验项目选择】

血常规，血沉，肝功能，肾功能，血电解质，脑脊液常规、生化、细胞学检查及涂片找结核杆菌和新型隐球菌，脑脊液细菌培养及药敏试验，血清单纯疱疹病毒IgG 抗体测定。

【检验结果判定】

1）白细胞总数正常或轻度增高，白细胞分类正常或嗜中性粒细胞百分比增高。

2）血沉正常或加快。

3）脑脊液检查：病毒性脑炎时脑脊液白细胞数增加，早期为嗜中性粒细胞明显增高，1 至数天后淋巴细胞占优势，还可见浆细胞和淋巴细胞样细胞，蛋白质正常或轻度增高。脱髓鞘性脑病时脑脊液白细胞数正常或稍增加，分类可见淋巴细胞百分比升高，还可见大淋巴细胞、淋巴细胞样细胞、浆细胞及激活型单核细胞，嗜中性粒细胞少见。蛋白质多为正常。以上两种病变其脑脊液改变是相对的，不能为病毒性脑炎或脱髓鞘性脑病提供确诊依据。

脑出血

脑出血系指脑实质内的血管破裂引起大块性出血所言，约80％发生于大脑半球，以基底节区为主，其余20％发生于脑干和小脑。临床特点为活动中或情绪不稳定，突然发病，病情发展迅速，头痛、烦躁、呕吐，数分钟内进入昏迷。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出凝血时间，尿常规，尿糖，尿酮体，血电解质测定，血糖，肾功能，脑脊液检查（必要时）。

【检验结果判定】

1）白细胞计数和中性粒细胞百分比增高。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，呈暂时性。

3）尿糖阳性，呈暂时性，提示病情严重。

4）脑脊液检查：本病颅内压力多数增高，并呈血性，但约25％的局限性脑出血脑脊液外观也可正常，腰穿易导致脑疝形成或使病情加重，故须慎重考虑。

蛛网膜下腔出血

蛛网膜下腔出血是指脑底或脑浅表部位的血管破裂，血液直接进入蛛网膜下腔而言。临床表现为剧烈头痛、呕吐、短暂意识不清、局灶性或全身性癫痫发作，眼底视乳头水肿，玻璃体下片状出血、一侧动眼神经麻痹、短暂性偏瘫、失语、偏盲等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，凝血酶原时间，血钾、钠、氯化物，肝功能，肾功能，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数升高，发病初期可以达到（20～30）×10^9/L。

2）脑脊液检查：外观呈血性，压力明显增高，红细胞明显增多，白细胞轻度增多。

脑血栓

脑血栓形成是指在颅内外供应脑部的动脉血管壁发生病理性改变的基础上，在血流缓慢、血液成分改变或血粘度增加等情况下形成血栓，致使血管闭塞而言。本病起病较缓慢，多在安静状态下发生，如睡醒后发现肢体不灵活，口角歪斜、讲话不清等症状。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血纤维蛋白原及凝血酶原时间测定，尿常规，尿糖，尿酮体，血糖，血脂，肾功能，血电解质测定，血液流变学检查，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1）血脂检查：胆固醇及甘油三酯可升高。

2）脑脊液检查：脑脊液外观为无色透明，压力、细胞数和蛋白多正常。

脑栓塞

脑动脉栓塞后，由其供应的脑组织发生缺血、缺氧、水肿和坏死。如缺血梗塞区中伴有点状出血时，称为出血性或红色梗塞，否则称为缺血或白色梗塞。梗塞后8h 脑组织灰白质界线不清，梗塞区脑组织水肿，随后软化和坏死，1 个月左右液化的脑组织被吸收，并成胶质疤痕或空洞。由于小栓子引起的脑血管痉挛，大栓子形成的广泛脑水肿、颅内压增高，甚至可形成脑疝。此外，炎性栓子还可引起局限性脑炎或脑脓肿等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血纤维蛋白原及凝血酶原时间测定，尿常规，尿糖，尿酮体，血糖，血脂，肾功能，血电解质测定，血液流变学检查，脑脊液检查，血培养及药敏试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数可正常或轻度升高。

2）脑脊液检查：脑脊液可正常，压力增高，提示可能出现大面积梗塞及发生脑水肿；红细胞增多提示为出血性梗塞；白细胞增多，提示为感染性梗塞。

震颤麻痹

震颤麻痹又称帕金森病，是中年以后发病，以静止性震颤、肌强直、运动徐缓为主要表现的一种常见的神经系统变性疾病。

【检验项目选择】

肝功能，肾功能，血电解质测定，血脂分析，脑脊液检查，脑脊液高香草酸测定，脑脊液多巴胺抗体测定。

【检验结果判定】

1）脑脊液检查：在少数患者中可有轻微蛋白升高。

2）脑脊液高香草酸测定：多数患者可降低，有诊断意义。

3）脑脊液多巴胺抗体测定：可为阳性，有早期诊断意义。

小舞蹈病

小舞蹈病是与风湿密切相关的、临床以不规则舞蹈样不自主动作和肌张力降低为主要表现的一种弥散性脑病。

【检验项目选择】

血沉，血电解质测定，肝功能，肾功能，抗“0”测定，血清粘蛋白测定。

【检验结果判定】

1）血沉增快。

2）抗“0”测定可升高。

肝豆状核变性

肝豆状核变性是一种常染色体隐性遗传的铜代谢障碍疾病，由于铜在体内过度蓄积，损害肝、脑等器官而致病。临床表现为肢体震颤、肌强直以及精神症状、肝硬化症状、肾脏病症状等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血电解质测定，肝功能，肾功能，血清铜蓝蛋白，血清铜氧化酶测定，24h 尿铜定量测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及血小板减少。

2）血红蛋白降低。

3）血清铜氧化酶降低。

4）当天24h 尿铜排泄量为阳性。

5）肝功能检查：丙氨酸氨基转移酶（ALT）、麝香草酚浊度试验（TTT）均可升高，血清白蛋白（A）/球蛋白（G）比值可下降或倒置。

肌营养不良症

肌营养不良症是由遗传因素所致的以进行性骨骼肌无力为特征的一组原发性骨骼肌坏死性疾病，临床上主要表现为不同程度和分布的进行性加重的骨骼肌萎缩和无力。也可累及心肌。

【检验项目选择】

肝功能，血沉，抗“O”测定，血清肌酸磷酸激酶（CPK），血清肌红蛋白（MB），血清丙酮酸酶（PK），醛缩酶（ADL），乳酸脱氢酶（LDH），24h 尿尿酸、肌酐测定。

【检验结果判定】

1）血清肌酸磷酸激酶（CPK）增高是诊断本病重要而敏感的指标，可在出生后或出现临床症状之前已有增高。

2）血清肌红蛋白（MB）在本病早期及基因携带者中也多显著增高。

3）血清丙酮酸酶（PK）也很敏感，但正常人血清PK 值随年龄增长而减低，因此不同年龄组要用不同标准值。

4）醛缩酶（ADL），乳酸脱氢酶（LDH），谷草转氨酶（GOT），谷丙转氨酶（GPT）等，也可增高，但均非肌病的特异改变，亦不敏感。

5）24h 尿酸、肌酐测定：尿酸增高，肌酐减少。

偏头痛

最重要和常见的为血管性头痛，呈现与脉搏一致的搏动性痛或胀痛。低头、受热、用力、咳嗽等均可使头痛加重。检查可见颞动脉隆起，搏动增强，压迫后头痛可减轻。

【检验项目选择】

肝功能，肾功能，血液流变学检查，血5－羟色胺含量测定，尿内5－羟吲哚乙酸。

【检验结果判定】

尿内5－羟吲哚乙酸及血5－羟色胺含量测定：在急性发作时，血中5－羟色胺含量降低，尿内5－羟吲哚乙酸增高。

癫痫

癫痫是大脑神经元突发性异常放电，导致短暂的大脑功能障碍的一种慢性疾病。由于异常放电神经元所涉及的部位不同，可表现为发作的运动、感觉、植物神经、意识及精神障碍。它是多种原因引起的临床常见的症状之一。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血电解质测定，肝功能，肾功能，血糖，囊虫抗体试验，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1）囊虫抗体试验阳性，提示癫痫是由脑囊虫引起的。

2）正在服药治疗的患者，怀疑药物对骨髓、血液产生影响时，应做血常规检查。

3）正在服药治疗的患者，怀疑药物影响肝、肾功能时，要做肝功能、肾功能检查。

急性感染性多发性神经炎

急性感染性多发性神经炎又称急性多发性神经根神经炎或Guillain－Barre 综合征。主要损害多数脊神经根和周围神经，也常累及颅神经，是多发性神经炎中一种特殊类型。

本病可见于任何年龄，但以青壮年男性为主。四季均有发病，夏、秋季节多见，起病呈急性或亚急性，少数起病较缓慢。临床主要表现运动障碍、感觉障碍、植物神经功能障碍等症状。

【检验项目选择】

血常规，血沉，血电解质测定，肝功能，肾功能，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1）白细胞总数增高及血沉增快，提示病情严重或有肺部并发症。

2）脑脊液检查：脑脊液蛋白含量增高而白细胞数正常或轻度增加，为本病的典型症状之一，但少数病人脑脊液蛋白含量始终正常。

重症肌无力

重症肌无力是累及神经肌肉接头处突触后膜上乙酰胆碱受体（AchR）的自身免疫性疾病。临床表现为眼睑下垂、眼球活动障碍和复视、面部表情肌无力呈苦笑面容及全身骨骼肌无力等。

【检验项目选择】

血清抗乙酰胆碱受体抗体测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）及血清总甲状腺素（T_4）测定，抗胆碱酯酶药物试验。

【检验结果判定】

1）血清抗乙酰胆碱受体抗体测定：阳性，诊断率为85％～95％。

2）抗胆碱酯酶药物试验：阳性。

周期性麻痹

周期性麻痹是以骨骼肌反复发作弛缓性麻痹及发作时血清钾降低为主要特征的疾病，其病因不明。临床分为低血钾性、高血钾性、正常血钾性三型。

【检验项目选择】

尿钾测定，血钾测定。

【检验结果判定】

1）尿钾测定：尿钾降低，为低血钾性周期性麻痹，尿钾增高，为高血钾性周期性麻痹，尿钾正常，为正常血钾性周期性麻痹。

2）血钾测定：血钾降低，为低血钾性周期性麻痹，血钾增高，为高血钾性周期性麻痹，血钾正常，为正常血钾性周期性麻痹。

第十章　免疫及内分泌

系统疾病

系统性红斑狼疮是一种较常见的累及多系统多器官的自身免疫性疾病，由于细胞和体液免疫功能障碍，产生多种自身抗体。发病机理主要是由于免疫复合物形成，确切病因不明，病情呈反复发作与缓解交替过程。临床主要表现为低热、乏力、倦怠、食欲不振、体重下降、关节痛、肌肉痛、皮肤黏膜有红斑狼疮以及累及心、肺、肾、神经、血液系统而表现出相应的症状。

本病以青年女性多见，我国患病率高于西方国家，可能与遗传因素有关。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，尿常规，肝功能，肾功能，肌酐，血浆蛋白测定，血清蛋白电泳测定，血脂，24h 尿蛋白质定量，血清补体，免疫球蛋白，类风湿因子测定，循环免疫复合物，抗核抗体，抗双链DNA 抗体，抗Sm 抗体，血红斑狼疮细胞检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数和血小板计数减少，血红蛋白降低，或表现为全血细胞减少。

2）血沉常增快。

3）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜下可见红细胞、白细胞及管型。

4）肾功能及肌酐测定：尿素氮和肌酐升高，提示有严重肾损害。

5）血浆蛋白测定：血浆球蛋白增高，特别在有肾变性肾炎时，白蛋白/球蛋白比例可倒置。

6）血脂测定：血胆固醇增高。

7）抗核抗体（ANA）在病情活动时几乎100％阳性。阴性时更换检查方法可能出现阳性，抗核抗体阴性时不能完全排除本病，需结合临床和其他实验室检查资料综合分析。

8）抗双链DNA（ds－DNA）抗体对本病诊断的特异性较高，但阳性率较低。

9）抗Sm 抗体为本病的特异性抗体，约在30％系统性红斑狼疮（SLE）中呈阳性

反应。

(10) 血清蛋白电泳测定：γ－球蛋白及α_2－球蛋白比例升高。

(11) 血清补体测定：补体C_3及补体C_4降低。

(12) 免疫球蛋白测定：免疫球蛋白A、G、M 升高。

(13) 循环免疫复合物测定可为阳性。

(14) 类风湿因子测定可为阳性。

(15) 血红斑狼疮细胞检查可呈阳性。

类风湿性关节炎

类风湿性关节炎是以关节和关节周围组织非化脓性炎症为主的全身性疾病，常伴关节外病症状，故称类风湿病。关节腔滑膜炎症、渗液、细胞增殖、肉芽肿形成，软骨及骨组织破坏，最后关节强直及功能障碍。多侵犯小关节，如手、足及腕关节等，常为对称性，呈慢性经过，可有暂时性缓解，由于多系统损害，血清中可查到自身抗体，故认为本病是自身性疾病。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，嗜酸性粒细胞计数，血沉，肝功能，肾功能，血清蛋白电泳、血清补体，免疫球蛋白，免疫复合物，类风湿因子，抗核抗体测定，血液流变学检查，关节滑液检查。

【检验结果判定】

(1) 红细胞计数增高，淋巴细胞百分比及血小板计数增多，提示为病情活动期。

(2) 嗜酸性粒细胞计数增高，是类风湿性关节炎伴严重全身性并发症的象征。

(3) 血红蛋白降低，呈正细胞正色素性贫血。

(4) 血沉增快。

(5) 类风湿因子测定，多为阳性。

(6) 血清蛋白电泳测定：γ－球蛋白及α_2－球蛋白值升高。

(7) 免疫球蛋白测定：免疫球蛋白A、G、M 升高。

(8) 血液流变学检查：全血粘度及血浆粘度增加。

(9) 关节滑液检查：外观呈草绿色，粘度下降，蛋白含量增加，白细胞计数增高，类风湿因子滴度高于血清。

银屑病

银屑病俗称牛皮癣，是一种常见的具有特征性皮肤损害的慢性易于复发的皮肤病。临床分为寻常型、脓疱型、关节病型、红皮病型4 型。

【检验项目选择】

血常规，血沉，C 反应蛋白，血清碱性磷酸酶，类风湿因子测定。

【检验结果判定】

1．脓疱型银屑病

1） 白细胞计数增高。

2） 血沉增快。

3） C 反应蛋白测定：阳性。

4） 血清碱性磷酸酶可升高。

2．关节病型银屑病

类风湿因子测定为阳性。

皮肌炎

皮肌炎是一个以皮肤损害及骨骼肌非化脓性炎症为特征的疾病。如只侵犯肢体近端肌肉则称为多发性肌炎，其特点为肌肉萎缩、关节挛缩、胃肠道受累及钙质沉着，肌肉活体检查以闭塞性血管炎和肌束周围萎缩等改变为主，而成人则以间质性浸润为主。

【检验项目选择】

血常规，血沉，24h 尿肌酸测定，血清蛋白电泳，补体测定，血清谷草转氨酶，血清肌酸磷酸激酶，血清乳酸脱氢酶，血清醛缩酶，血清抗多发性肌炎－1（PM－1）抗体测定。

【检验结果判定】

1） 红细胞及血红蛋白可轻度下降。

2） 血沉可增快或正常。

3） 24h 尿肌酸测定：可增高。

4） 补体测定；补体C_3，C_4 均降低。

5） 血清谷草转氨酶、乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶、醛缩酶的浓度均增高，尤其是

后两种酶来自横纹肌，其浓度的上升，对诊断的价值较大，且可作为判定病情活动性的指标。

6） 血清抗多发性肌炎-1（PM-1）抗体测定：可为阳性。

干燥综合征

干燥综合征是一种慢性进行性炎症性自身免疫性疾病。病变主要侵犯泪腺和大小唾液腺等外分泌腺，导致腺体破坏，分泌减少或缺乏。临床表现以眼和口腔干燥为主要症状，并伴多系统受累。

【检验项目选择】

血常规，血沉，血清β_2微球蛋白测定，血清蛋白电泳，类风湿因子测定，免疫球蛋白测定，血循环免疫复合物测定，抗核抗体（ANA）测定，抗可溶性核抗原抗体测定，唾液检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数正常或偏低。

2） 红细胞计数及血红蛋白降低。

3） 血沉可增快。

4） 血清β_2微球蛋白测定：在急性期升高，缓解期降低，定期测定血清β_2微球蛋白可判定其活动性。

5） 免疫球蛋白测定：均可增高。

6） 类风湿因子测定：阳性率可达70%～90%。

7） 抗核抗体测定：阳性率可达50%～80%。

8） 血循环免疫复合物测定：可为阳性。

9） 抗可溶性核抗原抗体测定：抗SS_a抗体、抗SS_b抗体可为阳性。

10） 唾液检查：免疫球蛋白IgG及IgM水平增高。

肥胖病

肥胖病指皮下脂肪积聚过多。一般认为体重超过按身长计算的平均标准体重20%，或者超过按年龄计算的平均标准体重加上两个标准差（SD）以上时，即为肥胖病。

肥胖病的主要原因为：①过食，摄人的热能超过了消耗量，因而剩余的热能转化为脂肪而积聚于体内；②休息过多，缺乏运动；③遗传因素；④神经精神疾患脑炎之后偶

见发生肥胖病。

临床表现为畏热、多汗、呼吸短促、易感疲乏、下肢浮肿、重者可引起骨关节炎、平足、静脉曲张以及嗜睡、健忘、脑功能障碍等。

【检验项目选择】

血糖，葡萄糖耐量试验，血脂，肝功能，肾功能，血电解质测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）及血清总甲状腺素（T_4）测定，血清促甲状腺激素（TSH），血浆促肾上腺皮质激素（ACTH），24h 尿17－羟皮质类固醇（17－OHCS）和17－酮皮质类固醇（17－KS）。

【检验结果判定】

1）葡萄糖耐量试验轻度降低。

2）血脂测定：血胆固醇及甘油三酯均偏高。

3）血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）、血清总甲状腺素（T_4）、测定：可正常。

4）24h 尿17－羟皮质类固醇（17－OHCS）和17－酮皮质类固醇（17－KS）测定：可偏高。

维生素性A 缺乏病

维生素A 缺乏病是因体内缺乏维生素A 而引起的全身性疾病，其主要病理变化是全身上皮组织显现角质变性，视网膜感光色素再合成不足，可出现皮肤干燥、脱屑及对暗适应能力降低，继之结膜、角膜干燥，最后角膜软化，甚至穿孔，故又称为夜盲症、干眼症及角膜软化症等。

【检验项目选择】

血浆维生素A 含量测定，中段尿常规。

【检验结果判定】

1）血浆维生素A 含量测定：降低，有诊断意义。

2）中段尿常规检查：高倍镜下见到上皮细胞，有诊断价值。

维生素D 缺乏病

是由于维生素D 缺乏引起钙磷代谢紊乱而造成的代谢性骨骼疾病。其特点为骨样组织钙化不良引起的骨骼生长障碍，重者造成骨骼畸形、甚至骨折。在儿童时期，即骨骺尚未联合以前发病的称佝偻病；骨骺板已闭的成人发生骨钙化障碍称骨软化病。

【检验项目选择】

血清钙、磷测定，血清碱性磷酸酶。

【检验结果判定】

1） 血清钙、磷测定：均降低。

2） 血清碱性磷酸酶测定：血碱性磷酸酶活性明显增高。

坏血病

坏血病是由于长期缺乏维生素C （抗坏血酸） 所引起的周身性疾病，临床表现为全身乏力、面色苍白、食欲减退、呕吐、牙齿松动脱落、骨关节和肌肉疼痛等。

【检验项目选择】

维生素C 含量测定，维生素C 耐量试验。

【检验结果判定】

维生素C 含量测定：低于5.7umol/L，有诊断

慢性淋巴细胞性甲状腺炎

慢性淋巴细胞性甲状腺炎又称桥本甲状腺炎，是自身免疫性甲状腺炎的一种常见的类型，多见于中年人，但任何年龄组均可累及。女性发病率显著高于男性，约为20∶1，起病隐匿而缓慢，常在无意间发现甲状腺肿大，中等大小，少数患者可有局部不适甚至疼痛，甲状腺肿大多呈对称性，伴有锥体叶的肿大，腺体表面可呈分叶状，质坚韧如橡皮，甲状腺功能多正常，但有的患者可伴有甲亢。

【检验项目选择】

血沉，肝功能，血浆蛋白测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3），血清总甲状腺素（TT_4）、血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3），血清游离甲状腺素（FT_4）、血清促甲状腺激素（TSH），甲状腺球蛋白抗体（TGAb），甲状腺微粒体抗体（TMAb）。

【检验结果判定】

1） 血沉常增快。

2） 血浆蛋白测定：血清球蛋白增高，白蛋白降低。

3） 甲状腺球蛋白抗体（TGAb） 约60％～80％的患者呈阳性，甲状腺微粒体抗体约95％呈明显的阳性反应。

慢性肾上腺皮质功能减退症

慢性肾上腺皮质功能减退症是当两侧肾上腺绝大部分被破坏，出现种种皮质激素不足的表现，称肾上腺皮质功能减退症。可分原发性及继发性。原发性慢性肾上腺皮质功能减退症又称阿迪森病，比较少见；继发性可见下丘脑－垂体功能低下患者，由于CRF或ACTH 的分泌不足，以致肾上腺皮质萎缩。

临床表现为疲乏无力、精神萎靡、食欲减退、恶心、怕冷、喜用高盐饮食、性功能减退及色素沉着等。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血糖及耐量试验，血电解质测定，24h 尿17－羟皮质类固醇（17－OHCS）和17－酮皮质类固醇（17－KS），血浆皮质醇测定，血浆促肾上腺皮质激素（ACTH）测定。

【检验结果判定】

1）淋巴细胞计数及嗜酸粒细胞计数偏高。

2）血红蛋白降低，有轻度正细胞正色素性贫血。

3）血糖及耐量试验：血糖偏低，葡萄糖耐量试验呈低平曲线或反应性低血糖。

4）血电解质测定：病人血清钠偏低，血清钾偏高。

5）24h 尿17－羟皮质类固醇（17－OHCS）和17－酮皮质类固醇（17－KS）测定：可降低。

6）血浆皮质醇测定：多明显降低。

7）血浆促肾上腺皮质激素（ACTH）测定：明显增高，提示为原发性肾上腺皮质功能减退；显著降低，提示为继发性肾上腺皮质功能减退。

肢端肥大症和巨人症

肢端肥大症和巨人症都是由于生长激素（GH）的慢性高分泌状态所致，一般见于垂体前叶的分泌生长激素的腺瘤。患者的骨骼与软组织可过度生长，同时伴内分泌代谢紊乱。在骨骺闭合前，表现为巨人症；在骨骺闭合后，则表现为肢端肥大症，如果在青春期发病，肢端肥大症与巨人症可同时并存。

【检验项目选择】

血钙，血磷，血清碱性磷酸酶测定，血糖及葡萄糖耐量试验，血脂，血浆生长激素

（GH）测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3），血清总甲状腺素（T_4）、血清促甲状腺激素（TSH），血浆促肾上腺皮质激素（ACTH），促甲状腺激素释放激素（TRH）兴奋试验。尿羟脯氨酸，血清硫酸脂化因子。

【检验结果判定】

1）血磷升高。

2）葡萄糖耐量试验：呈糖尿病曲线。

3）血脂测定：血胆固醇、游离脂肪酸升高。

4）血浆生长激素（GH）测定升高。

5）促甲状腺激素释放激素（TRH）兴奋试验：可明显升高。

下丘脑综合征

下丘脑综合征是由于多种病因累及下丘脑引起功能损害的一组疾病，主要特点是内分泌功能紊乱与植物神经功能失调，以及睡眠、体温调节和性功能障碍，尿崩症，多食肥胖或厌食消瘦，精神失常，癫痛等症候群。

【检验项目选择】

血常规，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3），血清总甲状腺素（T_4），血清促甲状腺激素（TSH），血浆促肾上腺皮质激素（ACTH），促甲状腺激素释放激素（TRH），脑脊液检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数可升高。

2）脑脊液检查：压力增高，提示颅内有占位病变。

糖尿病

糖尿病是一组以高血糖为特征的内分泌一代谢疾病。其特点为由于胰岛素的绝对或相对不足和靶细胞对胰岛素的敏感性降低，引起碳水化合物、蛋白质、脂肪、电解质和水的代谢紊乱。典型糖尿病可有多饮、多尿、多食及消瘦、乏力等表现。

【检验项目选择】

血糖及耐量试验，24h 尿糖，尿蛋白定量，糖化血红蛋白，血清C 肽测定，血脂，肝功能，肾功能，血电解质测定，血气分析，血肌酐，血尿酸，乳酸，β_2 微球蛋白测定，血液流变学测定。

【检验结果判定】

1）尿糖测定：尿糖阳性是诊断本病的重要依据。

2）血糖测定：空腹血糖升高，多次空腹血糖高于7.7mmol/L可以诊断糖尿病，但空腹血糖正常不能排除糖尿病；餐后2h血糖，一般作为糖尿病控制情况的监测，如果高于11.1mmol/L（200mg/dl）可以诊断糖尿病，如果仅9.5mmol/L应进行糖耐量检查以明确诊断。

3）糖耐量试验口服葡萄糖75g（12岁以下为1.75g/kg），服糖后1h、2h、3h重复测血糖，血糖≥11.1mmol/L即可诊断糖尿病。

4）糖化血红蛋白明显增高，广泛应用于诊断和治疗的监测。

5）血清C肽测定：显著降低，提示有酮症酸中毒。

6）血脂测定：胆固醇及甘油三酯均可升高。

糖尿病酮症酸中毒

指糖尿病患者在各种诱因的作用下，胰岛素分泌明显不足，生糖激素不适当升高，造成的高血糖、高血酮、酮尿、脱水、电解质紊乱、代谢性酸中毒等病理改变的综合征。

【检验项目选择】

血常规，尿糖，尿酮体，血糖，血电解质测定，肝功能，肾功能，血气分析。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，中性粒细胞百分比增高，可达80%以上。

2）尿常规：尿蛋白可阳性，尿镜检有时可见管型。

3）尿糖、尿酮体阳性。

4）血糖增高，多在22.2mmol/L以上。

5）肾功能测定：血尿素氮增高，二氧化碳结合力下降。

6）血电解质测定：血钾、血钠可降低。

糖尿病乳酸酸中毒

系不同原因引起血乳酸持续增高和pH减低（<7.35）的异常生化改变所致的临床综合症，后果严重死亡率高。

【检验项目选择】

尿糖，尿酮体，血糖，乳酸，血电解质测定，肝功能，肾功能，血气分析。

【检验结果判定】

1）尿糖、尿酮体阳性。

2）血糖升高。

3）血乳酸增高，一般大于5mmol/L。

4）血气分析：血pH <7.35，阴离子间隙>18mmol/L，$NaHCO_3$ <20mmol/L。

高渗性非酮症性糖尿病昏迷

是糖尿病的严重急性合并症之一，特点为血糖极高而无明显的酮症酸中毒，脱水，血浆渗透压增高，进行性意识障碍，死亡率高。预后与病人年龄、病情轻重有关，更取决于及时诊断，得当处理。

【检验项目选择】

尿糖，尿酮体，血糖，血电解质测定，肝功能，肾功能，血气分析，血浆渗透压。

【检验结果判定】

1）尿酮体（-）或（+）～（++）。

2）血糖极高，一般大于33.3mmol/L。

3）有效血浆渗透压>320mOsm/L。

单纯性甲状腺肿

单纯性甲状腺肿是指多种原因引起的弥漫性或结节性甲状腺肿，无明显甲状腺激素分泌异常。可呈地方性分布（地方性甲状腺肿），也可呈散发性分布（散发性甲状腺肿）。病因有：①缺碘：摄碘不足及需碘增加，长期摄碘过多也可阻碍碘的有机化而引起甲状腺肿；②致甲状腺肿物质：如摄食过多抑制甲状腺激素合成的食物（卷心菜、萝卜、洋葱、大豆类食品）以及药物（如硫脲类、磺胺类、锂、钻、过氯酸盐、对氨柳酸、含碘药物等）；③遗传性甲状腺激素合成障碍。

【检验项目选择】

血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3），血清总甲状腺素（TT_4），血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3）、血清游离甲状腺素（FT_4），血清促甲状腺激素（TSH），血浆促肾上腺皮质激素（ACTH）、甲状腺球蛋白抗体（TGAb），甲状腺微粒体抗体（TMAb），甲状腺摄^{131}

I 率，24h 尿碘。

【检验结果判定】

1）血清总甲状腺素（T_4）正常或稍低。

2）血清促甲状腺激素（TSH）增高。

3）甲状腺摄^{131}I 率增高，提示为地方性甲状腺肿；甲状腺摄^{131}I 率正常，提示为散发性甲状腺肿。

亚急性甲状腺炎

亚急性甲状腺炎又称急性非化脓性甲状腺炎、病毒性甲状腺炎、巨细胞性甲状腺炎等。是由病毒或病毒产生变态反应引起的甲状腺炎症。多发病急骤，临床症状有畏寒、发热、疲乏、无力、颈部疼痛及甲亢表现等。

【检验项目选择】

血常规，血沉，血脂，血清蛋白电泳，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3），血清总甲状腺素（T_4），血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3），血清游离甲状腺素（FT_4），血清促甲状腺激素（TSH），甲状腺吸^{131}I 碘率，甲状腺球蛋白抗体（TGAb），甲状腺微粒体抗体（TMAb）。

【检验结果判定】

1）白细胞计数正常或增高。

2）血沉明显增快。

3）血脂测定：血胆固醇正常或偏低。

4）血清蛋白电泳：白蛋白减少，γ 和 α_1－球蛋白值升高。

5）血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）、血清总甲状腺素（T_4）、血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3）、血清游离甲状腺素（FT_4）测定：正常或增高。

6）血清促甲状腺激素（TSH）降低。

7）甲状腺球蛋白抗体（TGAb）、甲状腺微粒体抗体（TMAb）测定：可轻度阳性。

8）甲状腺吸^{131}I 碘率明显降低，这一特征对诊断本病有重要意义。

原发性甲状旁腺功能亢进症

原发性甲状旁腺功能亢进症是由于甲状旁腺腺瘤、增生肥大或腺癌所引起的甲状旁腺激素分泌过多，其病因不明。临床表现为恶心、呕吐、口渴、多尿、心律不齐、健

忘、注意力不集中等。

【检验项目选择】

血钙，血磷，血清碱性磷酸酶，24h 尿钙、磷，肾功能，血浆蛋白，血气分析，血清甲状旁腺素（PTH）测定，血清抗酒石酸酸性磷酸酶，皮质醇抑制试验。

【检验结果判定】

1）血钙测定：早期血钙大多增高，对诊断最有意义。血钙如反复多次超过2.7mmol/L，应视为疑似病例，超过2.8mmol/L 意义更大。

2）血磷测定：血磷多数低于1.0mmol/L（3.0mg/dl）。

3）血清甲状旁腺素测定均明显增高。

4）血清碱性磷酸酶在单纯表现为尿结石者，早期可正常，但有骨病表现者，几乎均有不同程度的增高。

5）血清抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）常成倍增高。

6）尿钙、尿磷测定：可增高。

低血糖

低血糖指由多种原因引起的血糖浓度过低所致的综合症。一般以血浆血糖浓度低于2.8mmol/L 为低血糖，儿童低血糖诊断标准比成人值低1.11mmol/L。临床表现主要有头昏、心慌、出汗、饥饿感、震颤、意识障碍等。

【检验项目选择】

血糖，肝功能，肾功能，禁食试验，血清胰岛素试验，血清胰高血糖素试验，血清C 肽测定。

【检验结果判定】

1）血糖测定：空腹正常或偏低，发作时血糖低于2.8mmol/L，注射葡萄糖后症状缓解。

2）禁食试验；不典型病例可测禁食16h 血糖3 次，如高于3.9mmol/L 可排除空腹低血糖，如低于2.22mmol/L 可肯定诊断；22～3.9mmol/L 为可疑低血糖。

3）血清胰岛素和血糖比值大于0.3。

甲状腺功能亢进症

甲状腺功能亢进症简称甲亢，又称毒性弥漫性甲状腺肿，是一种自身免疫性疾病，

临床表现有怕热、多汗、激动、食欲亢进伴消瘦、心动过速、特殊眼征（突眼）、甲状腺肿大、震颤等表现。

【检验项目选择】

血脂，尿肌酸，血清总甲状腺素（TT_4）测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3）测定，反三碘甲状腺原氨酸（rT_3）的测定，血清游离甲状腺素（FT_4），血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3），甲状腺^{131}I碘摄取率，T_3抑制试验，血清促甲状腺激素（TSH），促甲状腺激素释放激素（TRH）兴奋试验，抗甲状腺球蛋白抗体（TGA），抗甲状腺微粒体抗体（TMA）。

【检验结果判定】

1）血脂测定：血胆固醇可降低。

2）尿肌酸测定：可增高。

3）血清总甲状腺素（TT_4）及血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3）两值均升高，TT_3增高幅度常大于TT_4。

4）血清反三碘甲状腺原氨酸（rT_3）明显增高。

5）血清游离甲状腺素（FT_4）T_4和血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3）明显增高。

6）甲状腺^{131}I碘摄取率增高，3h大于25%，或24h大于45%（近距离法），峰值前移。

7）促甲状腺激素释放激素（TRH）兴奋试验不受其兴奋。

8）血清促甲状腺激素TSH测定：降低。

9）抗甲状腺球蛋白抗体（TGA）和抗甲状腺微粒体抗体（TMA）均可阳性。

甲状腺功能减退症

甲状腺功能减退症简称甲减，是由于甲状腺激素合成或分泌不足而引起的一种综合征。其特征是机体代谢率降低，严重者可形成粘液性水肿。根据年龄不同分为克汀病（在胎儿期或新生儿期内发病伴智力和体格发育障碍），成人型甲减（以粘液性水肿为主要特征），幼年型甲减（介于克汀病和成年型甲减之间）。

【检验项目选择】

血常规，血糖，血脂，血清磷酸肌酸激酶（CPK），血清乳酸脱氢酶（LDH），基础代谢率，甲状腺^{131}I碘摄取率，血清总甲状腺素（TT_4）测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3）测定，血清游离甲状腺素（FT_4），血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3），甲状腺^{131}I碘摄取率，促甲状腺激素释放激素（TRH）兴奋试验，血清促甲状腺激素（TSH），促甲

状腺激素兴奋试验，抗甲状腺球蛋白抗体（TGA），抗甲状腺微粒体抗体（TMA）。

【检验结果判定】

1）血红蛋白降低，呈小细胞低色素性或大细胞高色素性贫血。

2）血糖降低。

3）血脂测定：血胆固醇、甘油三酯均可增高。

4）血清磷酸肌酸激酶（CPK）、血清乳酸脱氢酶（LDH）均增高。

5）基础代谢率测定：降低，常在-30%以下。

6）甲状腺^{131}碘摄取率测定：显著降低。

7）血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3）、血清总甲状腺素（TT_4）、血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3）、血清游离甲状腺素（FT_4）均下降，且血清总甲状腺索（TT_4）下降较血清总三碘甲状腺原氨酸（TT_3）明显。

8）血清促甲状腺激素（TSH）测定：原发性甲减时血清促甲状腺激素（TSH）显著升高，垂体甲减或下丘脑甲减血清促甲状腺激素（TSH）不升高。

9）促甲状腺激素释放激素（TRH）兴奋试验：有助于原发性、垂体性和下丘脑性甲减的鉴别，如促甲状腺激素原来正常或偏低者，用促甲状腺激素释放激素刺激后，血促甲状腺激素升高，并呈延迟反应，表示病变在下丘脑；如促甲状腺激素不升高，提示病变在垂体。

10）促甲状腺激素兴奋试验：如用促甲状腺激素后，甲状腺^{131}碘摄取率不升高，提示病变在甲状腺；如呈延迟反应，提示病变为垂体或下丘脑。

11）抗甲状腺球蛋白抗体（TGA）和抗甲状腺微粒体抗体（TMA）均可升高。

皮质醇增多症

皮质醇增多症又称柯兴综合征，是肾上腺皮质分泌过量的糖皮质激素所致的疾病，常引起糖、蛋白质、脂肪、水和电解质紊乱。临床表现为向心性肥胖、满月脸、高血压、皮下瘀斑、多毛、水肿、月经异常、肌无力、精神障碍、色素沉着、糖尿、发育迟缓等。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸粒细胞计数，血电解质测定，血糖及耐量试验，二氧化碳结合力，尿17－羟类固醇（17－OHCS），尿17－酮类固醇（17－KS），24h尿游离皮质醇及血浆皮质醇，促肾上腺皮质激素（ACTH）兴奋试验。

【检验结果判定】

1）红细胞（RBC）、白细胞（WBC）总数偏离，嗜酸粒细胞（E）及淋巴细胞（L）减少。

2）血糖及耐量试验：血糖增高，糖耐量呈糖尿病曲线。

3）血电解质测定：血钾降低，血钠增高。

4）二氧化碳结合力可增高。

5）尿17－羟类固醇（17－OHCS）、尿17－酮类固醇（17－KS）测定：尿17－羟类固醇（17－OHCS）及尿17－酮类固醇（17－KS）中度增多，提示为垂体性柯兴病，尿17－羟类固醇（17－OHCS）及尿17－酮类固醇（17－KS）明显增高，提示为肾上腺皮质癌。

6）24h 尿游离皮质醇及血浆皮质醇测定：基础值增高，正常昼夜节律变化消失，下午降低不明显，有时反而升高。

7）促肾上腺皮质激素（ACTH）兴奋试验：如为增生，可升高5～7 倍；如为腺瘤，反应可正常或稍高；如为肾上腺癌，则无反应。

原发性醛固酮增多症

原发性醛固酮增多症是由于肾上腺皮质肿瘤或增生，致醛固酮分泌增多、水钠潴留，体液容量扩张而抑制了肾素－血管紧张素系统的一种内分泌疾病。临床表现为高血压、低血钾、碱中毒及儿童发育障碍等。

【检验项目选择】

血电解质测定，肝功能，肾功能，血糖及葡萄糖耐量试验，24h 尿醛固酮，24h 尿钾、钠，血、尿醛固酮，低钠试验，安体舒通（螺内酯）试验。

【检验结果判定】

1）血电解质测定：血钾降低、血钠增高、血镁降低。

2）血二氧化碳结合力可轻度升高。

3）血糖及葡萄糖耐量试验：血糖可降低，葡萄糖耐量试验50％呈糖尿病曲线。

4）24h 尿钾、钠测定：尿钾增高、尿钠降低。

5）血、尿醛固酮测定；血、尿醛固酮增高。

6）安体舒通试验：阳性。

7）低钠试验；试验后尿钠下降，可改善低血钾和高血压。

嗜铬细胞瘤

嗜铬细胞瘤是肾上腺髓质、交感神经节及其他嗜铬组织持续或间断地释放大量儿茶酚胺，引起持续性或阵发性高血压并导致多个器官功能及代谢紊乱的一种内分泌疾病。临床表现为低热、头痛、恶心、多汗、心悸、心律失常及高血压等。

【检验项目选择】

血常规，尿糖，血糖及糖耐量试验，胰高血糖素试验，肾功能，基础代谢率，甲状腺^{131}I 碘摄取率，血清蛋白结合碘试验，血清总甲状腺素（T_4）测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定，血、尿儿茶酚胺，24h 尿儿茶酚胺，24h 尿香草基杏仁酸（VMA）。

【检验结果判定】

1）白细胞计数升高。

2）尿糖阳性。

3）血糖及糖耐量试验：血糖可升高，糖耐量试验降低。

4）胰高血糖素试验阳性。

5）基础代谢率升高。

6）甲状腺^{131}I 碘摄取率、血清蛋白结合碘试验均正常。

7）血清总甲状腺索（T_4）测定、血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定：均可正常。

8）血、尿儿茶酚胺及24h 尿儿茶酚胺、24h 尿香草基杏仁酸（VMA）测定：显著升高，在正常高限的2 倍以上时诊断更有意义。

胰岛素瘤

胰岛素瘤也称胰岛β细胞瘤，是由胰岛β细胞形成的具有分泌功能的腺瘤或癌，临床以反复发作的空腹期低血糖症为特征，发病多见于20～50 岁。

【检验项目选择】

血糖，口服糖耐量试验，血清胰岛素和C 肽测定，饥饿试验。

【检验结果判定】

1）血糖测定：血糖低于2.8mmol/L，提示病情发作时。

2）血浆胰岛素及C 肽低血糖时可增高。

3）口服糖耐量试验：典型者呈低平曲线，部分糖耐量可降低，少数呈早期低血糖或正常糖耐量曲线。

4）饥饿试验阳性。

尿崩症

尿崩症又称垂体加压素缺乏症，以多尿、烦渴、多饮和排出大量稀释性尿为特点，是由于抗利尿激素分泌不足或肾脏对抗利尿激素反应缺陷所致。

【检验项目选择】

尿常规，禁饮－加压素试验，血浆抗利尿激素测定。

【检验结果判定】

1）尿颜色淡如水样，每日尿量可达4～10L，尿比重低于1.006，尿渗透压低于200mOsm/kg。

2）禁饮－加压素试验：禁水6～8h后，尿比重低于1.010，注射加压素后，尿比重升至1.015以上。

3）血浆抗利尿激素测定：降低。

垂体性侏儒症

垂体性侏儒症是指下丘脑－垂体病变引起的生长激素（GH）分泌不足所致的生长发育障碍，发病始于婴儿期或儿童期。临床表现为身体矮小、性器官不发育、智力正常但肌肉发育和体力不如同年龄组等。

【检验项目选择】

血糖，口服葡萄糖耐量试验，血脂，血钙、磷测定，血清碱性磷酸酶，生长激素测定，胰岛素低血糖试验，基础代谢率，甲状腺^{131}I碘摄取率，血清蛋白结合碘试验，血清总甲状腺素（T_4）测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定，尿17－羟类固醇（17－OHCS），尿17－酮类固醇（17－KS），促甲状腺激素释放激素兴奋试验。

【检验结果判定】

1）口服葡萄糖耐量试验为低平曲线。

2）血脂测定：血胆固醇升高。

3）生长激素测定：降低。

4）胰岛素低血糖试验不升高。

5）基础代谢率、甲状腺^{131}碘摄取率、血清蛋白结合碘试验、血清总甲状腺素（T_4）测定、血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定：均偏低。

6）尿17－羟类固醇（17－OHCS）、尿17－酮类固醇（17KS）测定；均偏低。

7）促甲状腺激素释放激素兴奋试验不升高或延迟出现。

范可尼综合征

范可尼综合征是由于肾小管功能障碍，应被肾小管吸收的物质如葡萄糖、氨基酸、尿酸、磷酸盐、重碳酸盐，都在尿中大量排出，从而出现骨骼变化、骨龄减低和生长缓慢等临床特征的一种先天代谢性疾病。

【检验项目选择】

血电解质测定，肾功能，尿糖，血糖，血清碱性磷酸酶。

【检验结果判定】

1）尿糖偏高，血糖正常。

2）肾功能测定：血尿素氮增高，二氧化碳结合力降低。

3）血电解质测定：血钾、血磷降低，血钙正常。

4）血清碱性磷酸酶测定：增高。

高磷酸酶血症

高磷酸酶血症是由于骨组织代谢紊乱而引起的常染色体隐性遗传性疾病，主要表现为过多的溶骨和成骨过程，使骨化不全，受累部位多见于颅骨、胫骨、股骨、脊柱等。

【检验项目选择】

血电解质测定，血清碱性磷酸酶，尿亮氨酸测定。

【检验结果判定】

1）血电解质测定：血清钙增高，血磷正常。

2）血清碱性磷酸酶明显升高。

痛风

痛风是一种漂呤核苷酸代谢紊乱所致的疾病，表现为血尿酸浓度增高，反复发作关

节炎，尿酸钠盐沉积在关节周围引起严重关节损害，累及肾脏引起慢性间质性肾炎和尿酸肾结石形成等。

【检验项目选择】

血清尿酸盐测定，24h 尿尿酸测定，关节腔穿刺液检查。

【检验结果判定】

1）血清尿酸盐测定：可增高。

2）24h 尿尿酸测定：可增高。

3）关节腔穿刺液检查：可见尿酸盐结晶，有诊断意义。

第十一章　儿科疾病

新生儿硬肿症

新生儿硬肿症系指新生儿期由多种原因引起的皮肤和皮下脂肪变硬，伴有水肿、低体温的临床综合征。单纯由寒冷引起者又称新生儿寒冷损伤综合症，重症多合并多器官功能损害。患儿多表现为不吃、不哭、少动、体温下降、皮肤变硬如橡皮状等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，红细胞比积，血糖，C 反应蛋白，血电解质测定，肾功能，肌酐，血气分析。

【检验结果判定】

1）红细胞比积测：可升高。

2）血糖可降低。

新生儿败血症

新生儿败血症是指新生儿期病菌侵入血液循环并在其中生长繁殖及产生毒素而造成的全身感染。发病率约占活产婴的1％～10％，出生体重越轻，发病率越高。根据国内近年报告其病死率在早产儿高达30％，足月儿为11.3％～19.2％。因症状隐匿而无特异性，早期诊断常有困难，必须提高警惕，及时作出诊断并作彻底的治疗。临床症状不典型，除有一般感染表现外，可有黄疸、淤点、浆膜腔积液等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血沉，C 反应蛋白，血电解质测定，二氧化碳结合力，血培养十药敏试验，病灶分泌物培养十药敏试验，中段尿定量培养十药敏试验，脑脊液细菌培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数高于15 $\times10^9$/L，或出生3d 后大于20 $\times10^9$/L，出现核左移现象。

(2) C 反应蛋白可增高。

(3) 血培养时抽血量至少要5ml，血培养2 次或2～3 份标本均有同一种细菌，且与药物敏感试验一致，脑脊液、浆膜腔液、尿液或深部组织能分离出同一细菌，均有诊断意义。

新生儿黄疸

黄疸是新生儿期一种常见的临床症状。正常人血清胆红素含量3.4～13.7umol/L（0.2～0.8mg/dl），若超过25.7～34.2umol/L（1.5～2.0mg/dl）即出现黄疸。但新生儿皮肤血管丰富，色泽红润，血清胆红素含量达51.3～68.4umol/L（3～4mg/dl）时肉眼才能辨出黄疸。年长儿或成人出现黄疸都是病理现象，新生儿则分生理性和病理性两种。临床表现为肝大、肝功能异常、嗜睡及惊厥等。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，血清胆红素测定。

【检验结果判定】

血清胆红素测定：如足月儿在生后24h 以内，早产儿在48h 以内出现黄疸，黄疸程度较重持续时间过长，足月儿超过2 周以上，早产儿超过3 周，或黄疸退后复现者，并伴有其他临床症状，血清结合胆红素大于25.7umol/L（1.5mg/dl）者，应视为病理性黄疸。

新生儿肝炎

新生儿肝炎为起病于新生儿期的一组临床综合征，主要表现为阻塞性黄疸、肝脏肿大及肝功能能损害，由于病因较多，对每一病例的确切原因难以确定，故常称为新生儿肝炎综合征。

【检验项目选择】

肝功能，血清碱性磷酸酶，甲胎蛋白，乙型肝炎病毒表面抗原，红细胞过氧化氢溶血试验，尿常规，尿三胆试验，便常规，中段尿细菌定量培养十药敏试验，尿液或母宫颈刮片找巨细胞包涵体。

【检验结果判定】

(1) 尿常规检查：尿颜色深黄。

(2) 便常规检查：便颜色呈浅黄色，甚至呈白陶土色。

3）肝功能检查：血清转氨酶增高，胆红素增高，以结合胆红素增高为主，絮状浊度试验早期变化不明显。

4）血清碱性磷酸酶降低。

5）甲胎蛋白阳性。

6）红细胞过氧化氢溶血试验可阳性。

7）尿三胆检查：尿胆原阳性，尿胆红素根据胆管阻塞程度可呈阳性或阴性反应。

8）收集婴儿尿液或母宫颈刮片找巨细胞包涵体等可作病因诊断。

母儿血型不合溶血病

新生儿溶血病是孕妇和胎儿之间血型不合而产生的同族血型免疫疾病，可发病于胎儿和新生儿的早期。当胎儿从父方遗传下来的显性抗原恰为母亲所缺少时，通过妊娠、分娩，此抗原可进入母体，刺激母体产生免疫抗体。当此抗体又通过胎盘进入胎儿的血循环时，可使其红细胞凝集破坏，引起胎儿或新生儿的免疫性溶血症。这对孕妇无影响，但病儿可因严重贫血，心衰而死亡，或因大量胆红素渗入脑细胞引起核黄疸而死亡，即使幸存，其神经细胞和智力发育以及运动功能等，都将受到影响。

母儿血型不合，主要有ABO 和Rh 型两大类，其他如MN 系统也可引起本病，但极少见。ABO 血型不合较多见，病情多较轻，易被忽视。Rh 血型不合在我国少见，但病情严重，常致胎死宫内或引起新生儿核黄疸。

【检验项目选择】

血常规，网织红细胞计数，有核红细胞计数，血型，血糖，二氧化碳结合力，血清胆红素测定，直接抗人球蛋白试验，母亲抽血测ABO 血型、Rh 血型、Rh 抗体、抗A 和抗B 抗体。

【检验结果判定】

1）红细胞计数和血红蛋白均下降，网织红细胞可增至5％～6％，幼红细胞在生后1～2d 内可达2～10 个/100 个白细胞；

2）血清胆红素测定：直接胆红素增高。

3）直接抗人球蛋白试验：阳性。

4）孕妇如为O 型血，而其夫为A、B、AB 型者应作特异性抗体检查，阴性者提示已被致敏，Rh 血型不合抗体效价＞1∶32，ABO 血型不合抗体效价＞1∶512 者提示病情严重。

小儿急性肺炎

急性肺炎是小儿时期常见的疾病，重症肺炎是婴幼儿时期主要死亡原因之一，近年来采用中西医结合治疗，其病死率已有明显下降。婴幼儿以急性支气管肺炎为多见。

【检验项目选择】

血常规，中性粒细胞碱性磷酸酶活性测定，C 反应蛋白，咽拭子细菌培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数增高，约为（15～20）×10^9/L。中性粒细胞增高可有核左移及胞浆内中毒颗粒，碱性磷酸酶活性测定阳性率及积分均增高，积分多达200 以上，提示为细菌性肺炎。

2）白细胞总数降低，提示为金黄色葡萄球菌肺炎和流感杆菌肺炎。

3）白细胞总数正常或减少，淋巴数比例增加，中性粒细胞数无增高，碱性磷酸酶活性积分低于60，提示为病毒性肺炎。

4）C 反应蛋白试验：在细菌性感染、败血症等此值上升，升高与感染的严重程度呈正比；当治疗有效时下降，治疗无效时继续上升；病毒及支原体感染时不增高。

性早熟

性早熟是指性成熟的发生较正常儿童提早2.8 个标准差（SD）者。目前考虑女孩在8 岁以前、男孩在10 岁以前出现第二性征者即为性早熟。其中无特殊原因可查者，称为特发性真性性早熟。本病以女孩多见。

【检验项目选择】

血钙、磷，血清碱性磷酸酶，卵泡刺激素（FSH），促黄体生成激素（LH），雌二醇（E_2），男性血　酮（T），24h 尿卵泡刺激素（FSH），促黄体生成激素（LH），雌二醇（E_2），男性尿　酮（T），24h 尿17－酮类固醇，24h 尿17－羟类固醇。

【检验结果判定】

1）女性特发性真性性早熟血中卵泡刺激素（FSH）、促黄体生成激素（LH）、雌二醇（E_2）、24h 尿卵泡刺激素（FSH）、促黄体生成激素（LH）、雌二醇（E_2）可显著升高。

2）男性特发性真性性早熟，血　酮（T）、尿　酮（T）可显著升高，尿17－酮类固醇可升高。

百日咳

百日咳是由百日咳杆菌引起的急性呼吸道传染病，婴幼儿多见。临床上以阵发性痉挛性咳嗽、咳后伴有鸡鸣样回声及呕吐为特征。病程可长达2～3 月，故名百日咳。

【检验项目选择】

血常规，鼻咽拭子细菌培养，百日咳特异性抗体免疫球蛋白IgM 测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数显著升高，痉挛期增高最为明显，白细胞总数可达（30～50）×10^9/L，淋巴细胞占60%～80%。

2）病初用鼻咽拭子、痉咳期用咳喋法细菌培养，培养出百日咳杆菌阳性率较高。

3）百日咳特异性抗体免疫球蛋白IgM 测定：可阳性。

小儿病毒性心肌炎

病毒侵犯心肌，引起心肌细胞变性、坏死和间质性炎症，称为病毒性心肌炎。多数病例在发病前1～2 周有上呼吸道感染或消化道感染的前驱病史，各年龄均可发病，但以儿童多见，好发于夏秋季。

【检验项目选择】

血沉，抗“O”，肌酸磷酸激酶（CPK），天门冬氨酸氨基转移酶（AST），乳酸脱氢酶（LDH），抗心肌抗体（AMA）。

【检验结果判定】

1）肌酸磷酸激酶（CPK）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）测定：均可升高。

2）抗心肌抗体（AMA）测定可增高。

新生儿窒息

新生儿窒息是指胎儿在宫内或产程中呼吸障碍引起缺氧，临床分为宫内窒息和新生儿窒息两种。

【检验项目选择】

血常规，血糖，血电解质，二氧化碳结合力，肾功能，血气分析。

【检验结果判定】

血气分析：动脉血酸碱度（pH）等于或低于7.25，动脉血氧分压（p_aO_2）低于6.65kPa，提示为严重缺氧。

新生儿肺透明膜病

新生儿肺透明膜病是由于肺表面活性物质缺乏，而导致新生儿呈进行性呼吸困难、紫绀、呼吸性呻吟、呼吸衰竭等。临床上多见于早产儿及极低出生体重儿。

【检验项目选择】

血常规，血电解质测定，二氧化碳结合力，血气分析，胃液泡沫稳定试验。

【检验结果判定】

1）血气分析：动脉血酸碱度（pH）、动脉血氧分压（P_aO_2）下降，动脉血二氧化碳分压（P_aCO_2）升高，剩余碱减少。

2）胃液泡沫稳定试验：无泡沫，为阴性。

新生儿低钙血症

新生儿低钙血症是指血清总钙低于1.75mmol/L或游离钙低于0.9mmol/L者。临床表现为易激、惊跳及抽搐。

【检验项目选择】

血钙测定，碱性磷酸酶，24h尿钙试验。

【检验结果判定】

1）血钙测定：血清总钙低于1.75mmol/L或游离钙低于0.9mmol/L，即可确诊。

2）血清碱性磷酸酶可增高。

3）24h尿钙测定：可降低。

营养不良

营养不良是一种慢性营养缺乏症，临床可出现精神萎靡、食欲不振、消瘦、皮肤苍

白干燥、肌肉发育不良等，同时可伴有营养性贫血、多种维生素缺乏等。常见于3 岁以下儿童。

【检验项目选择】

血常规，血电解质，血糖，血清蛋白质测定，血脂，血淀粉酶，胆碱酯酶，免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1） 红细胞计数及血红蛋白可稍降低。

2） 血糖可偏低。

3） 血脂测定：胆固醇降低。

4） 血清蛋白质测定：血清总蛋白、白蛋白均降低。

5） 血淀粉酶、胆碱酯酶均降低。

6） 免疫球蛋白测定：免疫球蛋白降低。

营养不良性贫血

营养不良性贫血是指由于营养成分的缺乏而影响造血功能障碍所引起的一类贫血。常见的有大红细胞性贫血、小红细胞性贫血。临床表现主要为指甲、口唇、眼结膜苍白。

【检验项目选择】

血常规，平均红细胞体积，平均红细胞血红蛋白含量，血小板计数，血清维生素B_12 及叶酸测定，血清铁及总铁结合力测定，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞计数和血小板计数在重症病例可减少，中性粒细胞核分叶过多有一定的诊断价值。

2） 平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白含量测定：两值均增高，提示为大细胞性贫血。

3） 血清维生素B_12 及叶酸测定：血清维生素B_12 及叶酸降低为大红细胞性贫血。

4） 血清铁降低、血清总铁结合力增高为小红细胞性贫血。

5） 骨髓象检查：大红细胞性贫血，骨髓增生明显活跃，出现巨幼红细胞；小红细胞性贫血，骨髓铁减少或消失。

小儿结核病

小儿结核病是由于结核杆菌感染而引起的一种慢性传染病，临床表现大多起病缓慢，可出现长期低热、食欲不振、消瘦、盗汗等慢性结核病症状。

【检验项目选择】

血常规，血沉，痰涂片及培养，结核菌素试验。

【检验结果判定】

1）白细胞计数可升高。

2）血沉可加快。

3）结核菌素试验阳性。

4）痰涂片及培养可找到或培养出结核杆菌。

呆小病

呆小病是由于婴幼儿时期甲状腺激素合成、分泌不足所引起的，临床表现有黄疸延迟消退、反应低下、体格及智力发育落后、特殊面容等。

【检验项目选】

血清总甲状腺素（T_4）测定，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定，血清游离甲状腺素（FT_4），血清游离三碘甲状腺原氨酸（FT_3），甲状腺^{131}I 碘摄取率，血清促甲状腺激素（TSH）。

【检验结果判定】

1）血清总甲状腺素（T_4）测定、血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）测定：血清总甲状腺素（T_4）下降，血清总三碘甲状腺原氨酸（T_3）多在正常范围，严重者下降。

2）血清促甲状腺激素（TSH）可升高。

3）甲状腺^{131}I 摄取率降低。

瑞氏综合征

瑞氏综合征是儿童期的一种急性脑病，其病理特点是急性脑水肿伴肝脏脂肪变性，临床表现为发病前有呼吸道或消化道感染史，继之可出现惊厥、昏迷、呼吸不规则等。

多见于6 个月～4 岁儿童。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，出、凝血时间，凝血酶原时间，肝功能，乳酸脱氢酶，肌酸磷酸肌酶，血氨，血糖，血电解质，脑脊液检查。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数及中性粒细胞百分比均增高。

2） 血小板计数减少。

3） 出、凝血时间及凝血酶原时间测定：均延长。

4） 血糖降低。

5） 血电解质测定：血钠偏低。

6） 肝功能检查：丙氨酸氨基转移酶升高，血总胆红素可偏高。

7） 乳酸脱氢酶及肌酸磷酸肌酶测定：早期均升高。

8） 血氨可升高。

9） 脑脊液检查：压力增高。

皮肤黏膜淋巴结综合征

皮肤黏膜淋巴结综合征是一种原因不明的小儿急性发热发疹性疾病，临床表现持续高热，双眼球结膜充血，唇发红、干裂、渗血，舌乳头似杨梅状，皮疹，手足坚实性肿胀，单侧或两侧淋巴结肿大。一般以2 岁以内发病率最高，10 岁以后极少见。

【检验项目选择】

血常规，血沉，尿常规，肝功能，C 反应蛋白，蛋白电泳，血培养及药敏试验。

【检验结果判定】

1） 白细胞总数及中性粒细胞百分比均增高。

2） 血沉增快。

3） 尿常规检查：尿蛋白阳性，尿镜检白细胞可增高。

苯丙酮尿症

苯丙酮尿症是由于先天性氨基酸代谢障碍而引起的一种疾病，临床表现智力低下，毛发黄褐色、皮肤白皙、尿及汗有特殊的霉臭味，出生后4 ～6 周尿中出现苯丙酮酸。

【检验项目选择】

尿三氯化铁试验，尿2，4－二硝基苯肼试验，血浆苯丙酮酸测定，苯丙氨酸耐量试验。

【检验结果判定】

1）尿三氯化铁试验出现绿色反应为阳性。

2）尿2，4－二硝基苯肼试验呈黄色或有黄色沉淀为阳性。

3）血浆苯丙酮酸浓度增高达0.36～4.88mmol/L有确定诊断意义。

肝糖原累积症

肝糖原累积症是由于肝、肾等组织的细胞缺乏葡萄糖－6－磷酸酶导致糖原分解过程障碍而引起的先天性糖原代谢紊乱性疾病。临床表现为肝肿大，无黄疸，体型矮胖，有低血糖倾向。

【检验项目选择】

尿常规，尿酮体，肝功能，肾功能，血脂，血糖及糖耐量试验，血尿酸，肾上腺素试验，胰高血糖素试验。

【检验结果判定】

1）尿常规检查：尿比重增高，尿酮体可为阳性。

2）血糖降低，多数在2.2～3.4mmol/L之间，少数可低于0.56mmol/L。

3）血脂测定：甘油三酯、胆固醇部分患儿可升高。

4）血尿酸年长儿可明显升高。

5）胰高血糖素试验阳性可确定诊断。

腺病毒肺炎

腺病毒除引起上呼吸道感染外，还可引起小儿肺炎，多见于6个月～2岁的婴幼儿，腺病毒肺炎最为危重。

大多数病例起病时或起病不久即有持续性高热，经抗生素治疗无效；自第3～6病日出现嗜睡、萎靡等精神症状，嗜睡有时与烦躁交替出现，面色苍白发灰，肝肿大显著，以后易见心力衰竭、惊厥等合并症。

【检验项目选择】

血常规，中性粒细胞碱性磷酸酶，酶联免疫吸附试验，免疫球蛋白测定。

【检验结果判定】

1）白细胞总数较低，中性粒细胞不超过70％。

2）中性粒细胞碱性磷酸酶测定：明显低下，如并发化脓性细菌感染则又上升。

3）酶联免疫吸附试验：阳性，有诊断意义。

4）免疫球蛋白测定：免疫球蛋白IgM 升高，有诊断意义。

毛细支气管炎

急性毛细支气管炎是婴幼儿较常见的一种下呼吸道感染病，仅见于2 岁以下婴幼儿，多数是1～6 个月的小婴儿，发病与该年龄支气管的解剖学特点有关。其临床症状如肺炎，且喘憋更著。临床上较难发现未累及肺泡与肺泡间壁的纯粹毛细支气管炎，故认为是一种特殊类型的肺炎，有人称之为喘憋性肺炎。

【检验项目选择】

血常规，尿常规，血气分析，间接血凝抑制试验，鼻咽拭子培养。

【检验结果判定】

1）白细胞总数及分类多在正常范围或偏低，分类中性粒细胞和嗜酸性粒细胞不增高。

2）尿常规检查：尿液检查多为正常，部分病例有微量蛋白与少许白细胞。

3）血气分析检查：可有代谢性酸中毒。

4）间接血凝抑制试验：滴度升高。

急性坏死性肠炎

急性坏死性肠炎是由于小肠的急性炎症而引起广泛性出血，故又称急性出血性肠炎。各年龄小儿均可得病，多见于学龄儿童，以4～10 岁占绝大多数，春夏季发病较高，发病急骤，临床表现为突发腹痛、呕吐、腹泻、便血并伴有高热及中毒症状等。

【检验项目选择】

血常规，便常规及隐血试验，血小板计数，出、凝血时间，凝血酶原时间测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，并有核左移现象。

2）血小板计数偏低。

3）出、凝血时间测定：正常。

4）凝血酶原时间测定：凝血酶原时间延长。

5）便常规及隐血试验：早期无腹泻者，取大便作潜血试验，均呈阳性。

第十二章　理化因素疾病

急性巴比妥类药物中毒

口服或误服巴比妥类药物5～10 倍即可引起急性中毒，临床可出现头痛、眩晕、嗜睡、语言不清、视物模糊、昏睡、昏迷等。

【检验项目选择】

血电解质测定，肝功能，肾功能，血、尿及首次胃抽取物药物鉴定。

【检验结果判定】

血、尿及首次胃抽取物药物鉴定试验有诊断意义。

有机磷农药中毒

有机磷农药中毒是由于吸人、口服或皮肤接触高浓度的有机磷农药而引起的，临床表现为头晕、头痛、恶心、呕吐、流涎、多汗、视物模糊、乏力、肌肉震颤、惊厥、昏迷、大小便失禁等。

【检验项目选择】

血电解质测定，肝功能，肾功能，血气分析，全血胆碱酯酶活力测定，呕吐物或洗胃初次抽取的胃内容物药物鉴定。

【检验结果判定】

全血胆碱酯酶活力测定：轻度中毒下降70％～50％，中度中毒下降50％～30％，重毒中毒下降至30％以下。

急性苯中毒

是由于意外事故或违反安全操作规程而于短时间内吸入大量高浓度苯所致。临床表现为头痛、头晕、咳嗽、流泪、恶心、呕吐、昏睡、神志模糊，重者可迅速发生昏迷、

抽搐、呼吸麻痹等。

【检验项目选择】

血常规，血小板计数，血电解质测定，肝功能，肾功能，骨髓象检查。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及血小板计数减少，部分患者可出现红细胞及血红蛋白降低，中性粒细胞胞浆中毒颗粒增多。

2）严重中毒者骨髓可显示再生障碍性贫血或白血病骨髓象。

氯气中毒

多因事故或违章操作吸人大量的氯气而引起人体中毒，临床表现为流泪、干咳，重者可出现持续性咳嗽、痰中带血丝、呼吸困难、烦躁不安以至于昏迷等。

【检验项目选择】

血常规，肝功能，肾功能。

【检验结果判定】

白细胞计数及中性粒细胞百分比均增高。

铅中毒

是由于长期密切接触铅而引起的中毒，临床表现为头痛、头晕、失眠、记忆力减退、周身无力、四肢肌肉或关节酸痛、食欲不振、腹胀、便秘、腹泻、腹隐痛或绞痛等。

【检验项目选择】

血常规，网织红细胞计数，尿常规，尿铅，血铅，肝功能，肾功能，红细胞锌原叶啉测定。

【检验结果判定】

1）红细胞计数及血红蛋白均降低，呈轻度低色素性贫血。

2）网织红细胞计数增多，可见大量嗜碱性点彩红细胞。

3）尿常规检查：尿蛋白可阳性，镜见可见红细胞、白细胞及管型。

4）尿铅及血铅均升高。

5）红细胞锌原卟啉测定：可增高。

急性汞中毒

是由于吸人大量汞蒸气而引起的中毒。临床表现为咳嗽、胸痛、发热、虚弱、头痛、头昏、睡眠障碍、食欲不振、腹痛、腹泻等。

【检验项目选择】

尿常规，血汞，尿汞，肝功能，肾功能，血电解质测定。

【检验结果判定】

1）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检可见红细胞及管型。

2）血汞、尿汞含量增高。

3）肾功能检查：血尿素氮增高，二氧化碳结合力降低。

一氧化碳中毒

一氧化碳（即煤气）中毒大多由于煤炉没有烟囱或烟囱闭塞不通，或因大风吹进烟囱，使煤气逆流入室，或因居室无通气设备所致。中毒机理是一氧化碳与血红蛋白的亲和力比氧与血红蛋白的亲和力增高200～300倍，使一氧化碳极易与血红蛋白结合，形成碳氧血红蛋白，失去携氧能力，造成组织窒息。

临床表现为头痛、头晕、眼花、耳鸣、恶心、呕吐、心悸、胸闷、四肢无力、步态不稳、烦躁、神志恍惚、昏厥、昏迷等。

【检验项目选择】

碳氧血红蛋白测定。

【检验结果判定】

碳氧血红蛋白测定：阳性。

毒蛇咬伤中毒

是由于人体被毒蛇咬伤后而引起的一种中毒症状。临床表现为局部麻痒、红肿、剧痛、出血不止，严重者可出现恶心、呕吐、腹痛、腹泻、头晕、嗜睡、四肢无力、语言不清及呼吸困难等。

【检验项目选择】

血常规，尿常规及隐血试验，血电解质测定，肝功能，肾功能，出、凝血时间，凝血酶原时间测定。

【检验结果判定】

1）白细胞计数增高，并出现中毒颗粒。

2）红细胞计数降低。

3）尿常规检查：尿蛋白阳性、镜检可见管型，隐血试验阳性。

4）肝功能检查：血总胆红素增高。

5）血电解质测定：血钾升高。

6）凝血酶原时间测定；可延长。

中暑

中暑症出现于盛夏季节，多见于我国南部及中部奇热地区，有高温环境特别是骤然高热或持续闷热、无风、烈日暴晒头部或露天作业史，临床表现为长期发热、口渴、多尿、大量出汗、眼花、耳鸣、恶心、呕吐、心悸、胸闷、四肢无力、昏厥、昏迷等。

【检验项目选择】

血常规，嗜酸性粒细胞计数，血小板计数，尿常规，便常规及培养，血电解质测定，肝功能，肾功能，全血胆碱酯酶活力测定，脑脊液检查（必要时）。

【检验结果判定】

1）白细胞计数及中性粒细胞百分比增高，嗜酸性粒细胞计数及血小板计数减少。

2）尿常规检查：尿蛋白阳性，镜检可见管型。

3）肾功能检查：血尿素氮升高，二氧化碳结合力降低。

4）血电解质测定：血钠、血氯降低。

5）必要时作全血胆碱酯酶活力测定、脑脊液检查、便常规及培养、血片查疟原虫等以排除流行性乙型脑炎、脑膜炎、脑血管意外、有机磷农药中毒、细菌性食物中毒及脑型疟疾等。

淹溺

溺水是由于落入水中而导致窒息、缺氧，是小儿时期常见的意外事故，尤以每年夏秋两季更是常见。临床表现为面部肿胀、青紫、眼充血、口腔和鼻腔充满血性泡沫和泥

沙、肢体冰冷、抽搐、昏迷等。

【检验项目选择】

血常规，红细胞压积测定，血电解质测定，肾功能。

【检验结果判定】

血电解质测定：淡水淹溺者血钠、血钙、血氯均减低；海水淹溺者，血钠、血镁、血氯均升高。

第 二 篇

血液学检验

第一章　一般血液学检验

第一节　血液学标本的前处理

一、抗凝剂的选择

1．枸橼酸钠

枸橼酸钠能与钙离子结合形成络合物从而阻止血液凝固。其常用浓度为109mmol/L（3.2%或2.06g/L），1份抗凝剂能抗凝9份血液。常用于血沉测定（0.4ml抗凝剂加1.6ml血液）、凝血因子检测（0.2ml抗凝剂加1.8ml血液）等。

2．二乙胺四乙酸（EDTA）盐

此类盐包括EDTA二钠、EDTA二钾、EDTA三钾3种，抗凝机制与枸橼酸钠相同。1.5mgEDTA盐能抗凝1ml血液。其中EDTA二钠的溶解度较低，不能配成高浓度溶液；EDTA三钾碱性太强，影响红细胞和血红蛋白的测定；EDTA二钾对血细胞的影响最小。抗凝血在室温下放置4～6h不影响红细胞体积，是血液细胞分析仪最适合的抗凝剂。操作时将150g/L的EDTA二钾水溶液10μl加入试管内（不必烘干，便于混匀），抽血1.0ml混匀即可。

3．肝素

肝素是一种含有硫酸基团的粘多糖，分子量为1500u，具有多方面抗凝作用，主要是通过增强抗凝血酶活性，间接抑制凝血活酶形成和灭活凝血酶。常用药用肝素浓度为100～250U/ml，一般取0.20ml置于试管或小瓶内在37～50℃下烘干，能抗凝5ml血液（血气分析时直接用1000U/ml肝素湿润针筒后抽血）。由于肝素能使血小板聚集，因此一般不用于血细胞分析，而作为血细胞比容和红细胞渗透脆性试验时的较理想的常用抗凝剂。

二、标本的采集

㈠ 毛细血管采血

【器材】

一次性无菌三棱针、消毒干棉球、75％乙醇棉球、20μl 一次性微量吸管。

【操作】

1） 成年人的采血部位以左手无名指为宜，婴幼儿于拇指或足跟两侧采血。

2） 轻轻按摩采血部位使其充血，用75％乙醇棉球消毒局部皮肤。

3） 紧捏采血部位，用无菌三棱针穿刺皮肤，动作须迅速，刺入深度以2～3mm 为宜。

4） 擦去第1 滴血，按需要依次用20μl 微量吸管采血，标本先测血小板，再依次测红细胞、血红蛋白、白细胞、血型等。

5） 采血完毕后用干棉球按压伤口止血。

㈡ 静脉采血

【器材】

一次性注射器、3％碘酊棉球、75％乙醇棉球、止血带、抗凝管（瓶）。

【操作】

1） 根据检验目的核对患者姓名、联号、准备的器材。

2） 让患者坐位或卧位伸出手臂，握紧拳头，用止血带扎紧上臂使静脉怒张。

3） 用3％碘酊消毒皮肤。

4） 取出一次性注射器，并检查针头连接处是否漏气或松动。

5） 根据血管分布情况，将注射器针头与手臂约成30°角顺利进针至血管内抽血。

6） 抽取检测项目所需血量后松开止血带，用干棉球按住进针口并拔出针头。

7） 抗凝剂与血液严格按要求配比。血液加入试管内应立即摇匀以免凝固。

8） 如果进针或抽血过程不顺利，应换另外静脉重抽，以免血小板聚集或出现微小凝块。

三、标本的运输和保存

1） 在室温下EDTA 二钾抗凝的静脉血中白细胞、红细胞、血小板可稳定24h，白细胞分类结果可稳定6～8h，血红蛋白可稳定数天，但白细胞形态在2h 后可发生变化，需要借助显微镜分类的标本要及时推片固定。标本在4℃冰箱内贮存的时间可适当延长，但低温对血小板计数和血小板体积两项检测结果影响较大。

(2) 使用半自动血细胞分析仪时，由于大多采用末梢法采血，标本往往直接稀释，血细胞在高稀释状态下会自溶破坏而影响检测结果，因此标本不宜保留过久，一般要求在1h 内测定完毕。

(3) 测定血沉、血细胞比容应在2h 内完成。夏天气温较高，标本在运输和保存时应加盖盖住，以免标本浓缩。

第二节　血液学一般检验

一、血红蛋白测定

【原理】

血红蛋白被高铁氰化钾氧化成高铁血红蛋白，再与氰离子（CN^-）结合形成稳定的氰化高铁血红蛋白（HiCN）。后者在540nm 波长处有吸收峰，可用分光光度计直接测定或用HiCN 参考液比色法测定。此法称HiCN 法。

【试剂】

血红蛋白转化液（HiCN 试剂）：氰化钾50mg，高铁氰化钾200mg，无水磷酸二氢钾140mg，TritonX －1001.0ml，蒸馏水加至1L，纠正pH 至7.0～7.4。

【操作】

(1) 取全血20μl，加入5.0mlHiCN 试剂中混匀后静置5min。

(2) 分光光度计，波长540nm，比色杯光径1.0cm，以HiCN 试剂调零，测定样品吸光度值。

【计算】

血红蛋白（g/L）＝测定管吸光度值×64458 ÷44000 ×251 ＝测定管吸光度值×367.7

式中64458 为血红蛋白相对分子质量；44000 为血红蛋白摩尔吸光系数；251 为稀释倍数。

【参考值】

男性：120～160g/L，女性：110～150g/L，新生儿：170～200g/L。

【注意事项】

(1) 血红蛋白测定方法很多，但HiCN 法是国际血液学标准化委员会推荐的参考方法，其他方法都应以HiCN 法为基准绘制标准曲线。

(2) HiCN 试剂不宜储存在塑料瓶或广口瓶内，且应在4℃冰箱保存，否则CN^-会丢失而使测定结果偏低。

3）HiCN 试剂在遇到高白细胞或高球蛋白标本时会出现混浊现象，应进行离心后再比色，以免浊度干扰。

4）氰化钾是剧毒品，试剂配置时要严格按照剧毒品管理程序操作。为防止污染环境，比色后废液应集中于广口瓶内，按每升废液加次氯酸钠溶液40ml，或加硫酸亚铁2.0g、氢氧化钠2.0g 处理后3h 方可排入下水道。

【临床意义】

1）生理性增多：新生儿、高原地区居住者。

2）病理性增多：真性红细胞增多症、肺源性心脏病、脱水等。

3）病理性减少：各种贫血、白血病、大量失血后等。

二、红细胞计数

【原理】

用等渗稀释液将血液作一定比例稀释后充人计数池，在显微镜下计数。

【试剂】

红细胞稀释液（赫姆液）：氯化钠1.0g，无水硫酸钠2.5g，氯化高汞0.5g，蒸馏水加至100ml，溶解后加20g/L 伊红溶液1 滴，过滤备用。

【操作】

1）取一小试管，加红细胞稀释液2.0ml。

2）用微量吸管采血10μl，擦干吸管外面的血液，将吸管中血液慢慢加入稀释液试管中，用上清液吸洗吸管2～3 次，然后摇匀试管。

3）充入计数池后静置2～3min，用高倍镜计数5 个中方格内的红细胞数。

【计算】

红细胞数/L =5 个中方格内的红细胞数÷100 ×10^{12}

【参考值】

男性：（4.0～5.5）×10^{12}/L，女性：（3.5～5.0）×10^{12}/L，新生儿：（6.0～7.0）×10^{12}/L。

【临床意义】

与血红蛋白测定一致，两者同时测定有助于贫血的鉴别诊断。

三、白细胞计数

【原理】

用稀酸将血液中成熟红细胞全部破坏后注入计数池，在显微镜下计数白细胞。

【试剂】

白细胞稀释液：乙酸2.0ml，蒸馏水98.0ml，10g/L 亚甲蓝溶液3 滴。

【操作】

1） 取一小试管，加白细胞稀释液0.38ml。

2） 用微量吸管采血20μl，擦去吸管外余血，将血液加入试管并吸洗吸管2～3 次，然后摇匀试管。

3） 稀释液充入计数池后静置2～3min，待白细胞下沉后用低倍镜计数4 个大方格内的白细胞数。

【计算】

$$白细胞数/L = 4\text{ 个大方格内的白细胞数} \times 50 \times 10^6$$

【参考值】

成人：（4～10）×10^9/L，儿童：（5～12）×10^9/L，新生儿：（15～20）×10^9/L。

【注意事项】

一些贫血患者血液中出现有核红细胞，会影响白细胞计数，应通过校正公式排除其影响。校正公式：

$$白细胞数 = X \times 100 \div (100 + Y)$$

式中X 为未校正前白细胞数；Y 为在分类计数时，每计数100 个白细胞时计数到的有核红细胞数。

【临床意义】

1） 生理性增多：新生儿、剧烈运动、妊娠晚期、极度恐惧与疼痛等。

2） 病理性增多：大部分细菌性感染、尿毒症、烧伤、手术后、传染性单核细胞增多症、白血病等。

3） 减少：病毒性感染、伤寒、副伤寒、疟疾、再生障碍性贫血、放疗后、化疗后、非白细胞增多性白血病等。

四、血小板计数

【原理】

用稀释液将血液适当稀释并破坏红细胞，混匀后注入计数池内，在显微镜下计数。

【试剂】

1） 许汝和稀释液：分析纯尿素10g、枸橼酸钠0.5g、甲醛0.1ml，蒸馏水加至100ml，溶解过滤，保存冰箱备用。

2） 草酸铵稀释液：草酸铵1.0g、EDTA 二钠0.012g，用蒸馏水溶解并加至100ml，过滤后冰箱保存备用。

【操作】

1）取一小试管，加入0.38ml 稀释液。

2）用微量吸管采血20μl，擦去吸管外余血，将血液加入试管并吸洗吸管2～3 次。

3）稀释液充人计数池，静置2～3min，用高倍镜计数5 个中方格内的血小板数。

【计算】

$$\text{血小板数}/L = 5\text{ 个中方格内的血小板数} \times 10^9$$

【参考值】

（100～300）$\times 10^9/L$。

【注意事项】

1）血小板试剂不应有镜下可见的颗粒，配好后必须过滤，若存放时间太久则要重新过滤。

2）标本充注计数池后应静置10min 左右，使血小板沉到同一平面，便于计数。

3）末梢血采集后应在1h 内测试完毕，以免影响测定结果。

【临床意义】

1）增多（>400 $\times 10^9/L$）：慢性粒细胞白血病、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、急性失血、急性溶血、脾切除后等。

2）减少（<100 $\times 10^9/L$）：再生障碍性贫血、白血病、放疗后、化疗后、原发性血小板减少性紫癜、弥散性血管内凝血、巨大血小板综合征等。

五、白细胞分类计数

【原理】

取血液在玻片上推制成均匀的薄血片，用复合染料染色，根据各类细胞的着色不同予以分类计数，得出相对比值。

【试剂】

1．瑞特－吉姆萨复合染液

Ⅰ液：取瑞特粉1g、吉姆萨染粉0.3g 于研钵中，加少量甲醇，研磨成稀糊状，倒入棕色瓶中，加1ml 甘油，用甲醇补足到500ml。每天早晚各振摇3min，连续5d 即可使用。

Ⅱ液（pH6.4～6.8 磷酸盐缓冲液）：无水磷酸二氢钾6.64g，无水磷酸氢二钠2.56g，加水800ml，用磷酸调整至pH6.4～6.8，加水至1L。

2．快速染色液

Ⅰ液：无水磷酸二氢钾6.64g，无水磷酸氢二钠2.56g，伊红B2.5g，蒸馏水1L，苯酚40ml，煮沸，冷却备用。

Ⅱ液：亚甲蓝4.0g，蒸馏水1L，高锰酸钾2.4g，煮沸，冷却备用。

3．快速单一染色液

（1）储存液：瑞特染粉2.0g，吉姆萨染粉0.6g，天青Ⅱ0.6g，甘油10ml，聚乙烯吡咯烷酮（PVP）20g，甲醇1L。

（2）pH6.4～6.8的磷酸盐缓冲液：无水磷酸二氢钾6.64g，无水磷酸氢二钠0.26g，苯酚4.0ml，蒸馏水加至1L。

将（1）液和（2）液按3∶1混合放置两周后备用。

【操作】

（1）取1滴血于洁净的玻片上推制成长约3～4cm的薄血片，要求头、体、尾清晰可分。

（2）室温中自然干燥（如室温太低则应放在孵箱内加快干燥以免细胞皱缩）。

（3）染色：①瑞特－吉姆萨染色法：加Ⅰ液3～5滴于血膜上，待覆盖全部血膜后加5～10滴Ⅱ液，5～10min后用水冲洗干净待干。②快速染色法：将干燥血片浸入快速染色液Ⅰ液中，30s后水洗，浸入Ⅱ液30s，水洗待干镜检。③快速单一染色法：将干燥血片浸在染液中30s后水洗待干镜检。

（4）选择体尾交界的区域，用油镜计数100～200个白细胞，根据形态特征分类并计算出相对比值。

【计算】

$$\text{各类白细胞计数}=\frac{\text{该类白细胞数}}{\text{所计白细胞总数}\ (100\sim200)}$$

【参考值】

中性杆状核粒细胞：0.01～0.05（1%～5%）；中性分叶核粒细胞：0.50～0.70（50%～70%）；

淋巴细胞：0.20～0.40（20%～40%）；

单核细胞0.03～0.08（3%～8%）；

嗜酸性粒细胞0.005～0.05（0.5%～5%）；

嗜碱性粒细胞：0～0.01（0%～1%）。

【临床意义】

1．增多

（1）中性粒细胞：见于大多数细菌性感染、急性出血及溶血、手术后、重金属中毒、粒细胞白血病等。

（2）淋巴细胞：百日咳、结核、各种病毒性感染、淋巴细胞白血病等。

（3）单核细胞：结核、伤寒、亚急性细菌性心内膜炎、疟疾、单核细胞白血病等。

（4）嗜酸性粒细胞：变态反应、寄生虫病、皮肤病、烧伤后、某些白血病等。

5）嗜碱性粒细胞：重金属中毒、霍奇金病、慢性粒细胞白血病等。

2．减少

1）中性粒细胞：伤寒、副伤寒、疟疾、各种病毒感染、化学物质中毒、化疗和放疗后、再生障碍性贫血、粒细胞缺乏症等。

2）淋巴细胞：各种感染急性期、细胞免疫缺陷症等。

3）嗜酸性粒细胞：伤寒、副伤寒、使用肾上腺皮质激素后。

【注意事项】

1）5 岁以下的儿童，正常生理条件下中性粒细胞和淋巴细胞的比值可以倒置。

2）白细胞总数超过20 $\times10^9$/L 时应分类200 个细胞；白细胞总数低于2 $\times10^9$/L 时可分类50 个细胞，并在检测报告后面附以说明。

3）在白细胞分类计数时发现细胞形态明显异常的，应给予描述和提示性报告。常见的白细胞异常变化有以下几种情况：①中性粒细胞核左移：指杆状核细胞比例增多，如晚幼粒、中幼粒出现则为极度左移。核左移伴有白细胞数增多者称再生性左移，多见于急性化脓性感染；核左移伴有白细胞数减少者，称退行性左移，常见于抵抗力低下时的重度感染。②核右移：血片中见到较多的4 叶、5 叶核的中性粒细胞，这是造血功能衰退或造血物质缺乏的表现，预后不佳。③中毒性颗粒：胞浆内部分或全部颗粒变粗，着色深。④空泡：可出现在胞浆或胞核内，常有多个，是细胞脂肪变性后未能着色所致。⑤杜氏小体：胞浆内出现嗜碱性点、线、片或云雾状物质，可能是核浆发育不平衡所致，是细胞严重毒性变的表现。⑥退行性变：表现为胞体肿大、结构模糊、边缘不清，有核固缩、肿胀、破碎、溶解等变化，是细胞衰老死亡的表现。⑦异常淋巴细胞：细胞体积增大，胞浆量增多，颜色深蓝，胞浆内出现数量不等的空泡，核结构有疏松表现。根据形态不同可分为3 型：空泡型、不规则单核样型、幼稚型。异常淋巴细胞的出现是各种病毒或钩端螺旋体感染的表现。

六、嗜酸性粒细胞直接计数

【原理】

血液中的嗜酸性粒细胞在含有伊红的低渗溶液中能保持完整的形态并被染成红色，而红细胞和其他白细胞则被溶解，故可以在显微镜下直接计数标本中的嗜酸性粒细胞。

【试剂】

以下3 种稀释液可任选1 种使用。

1）Hinkelmann 液：伊红0.2g，苯酚0.5ml，甲醛0.5ml，蒸馏水加至100ml。

2）乙醇－伊红稀释液：90％乙醇30ml，甘油10ml，碳酸钾1g，枸橼酸钠0.5g，20g/L 伊红溶液10ml，蒸馏水加至100ml。

3）伊红－丙酮稀释液：20g/L 伊红溶液5ml，丙酮5ml，蒸馏水90ml。

【操作】

1）取一小试管，加0.38ml 稀释液。

2）常规法取20μl 新鲜末梢血加入试管混匀，室温放置5～10min。

3）摇匀后充盈计数板，用低倍镜计数10 个大方格的嗜酸性粒细胞数。

【计算】

嗜酸性粒细胞数/L =10 个大方格内的嗜酸性粒细胞数×20 $\times 10^6$

【参考值】

(0.5～0.30) $\times 10^9$/L。

【临床意义】

与白细胞分类计数时的嗜酸性粒细胞变化相同。

【注意事项】

1）嗜酸性粒细胞计数的稀释液置冰箱保存，且保存时间最好不要超过1 个月。

2）血液与稀释液混匀后应放置5～10min，使其他细胞破坏完全，并使嗜酸性细胞染色鲜艳；但放置时间不宜过长，如超过30min 则有可能导致嗜酸性细胞破坏而使检验结果数值偏低。

3）对于住院和作药物刺激试验的患者应注明采血时间，以便临床考虑生理变化的影响。

七、红斑狼疮细胞检查

【原理】

红斑狼疮患者血液内有一种红斑狼疮因子，是IgG 类的抗核抗体，它能作用于白细胞膜使之受损，并使细胞核肿胀，失去原有的染色质致密结构，形成一种均匀无结构的云雾状物体，称为均匀体。这种均匀体被成熟的中性粒细胞吞噬后即形成红斑狼疮细胞。

【操作】

1）抽取静脉血约3ml 于清洁试管中，待血液凝固后用竹签捣碎并挑除残余血块。

2）将余下的血液以2000r/min 离心10min，使白细胞聚集在表层，有利于红斑狼疮细胞的形成。

3）置于37 ℃孵箱内孵育2h。

4）吸取白细胞层置于血细胞比容管内再以2000r/min 离心10min。

5）弃去血清，吸取白细胞层，推制3～4 张薄血片。

6）瑞特染色并镜检。

【参考值】

见到两个以上的中性粒细胞吞噬均匀体即为阳性。

【临床意义】

(1) 多见于系统性红斑狼疮，且病情活动期比缓解期阳性率高。

(2) 结缔组织性疾病，如类风湿性关节炎、结节性动脉炎、硬皮病、皮肌炎等也可以见到此细胞。

(3) 阴性结果不能否定系统性红斑狼疮的诊断，应结合其他免疫学检查及临床表现。

【注意事项】

(1) 整个操作过程不能超过3h，时间太短狼疮细胞形成不佳；时间太长则细胞溶解过多。二者都影响检验结果。

(2) 要注意与果馅细胞区别。果馅细胞多为单核细胞吞噬淋巴细胞的核所形成，其核仍保持染色质结构和染色特性。

八、血细胞比容测定

【原理】

将一定量的抗凝血加入特制的比容管中，经过一定速度和时间离心后观察比容管中红细胞层占全血的高度比。

【试剂】

干燥EDTA 二钾3mg，或肝素钠0.2mg 分装于小试管，能抗凝2ml 血液。

【操作】

(1) 抽取静脉血约2ml，立即注入抗凝管内摇匀。

(2) 用细长的吸管吸取抗凝血，将吸管插入比容管的底部，缓慢注入抗凝血至刻度“10”处，注意不能有气泡产生。

(3) 水平离心机以3000r/min 离心30min，读取红细胞层的毫米数，再离心10min，至红细胞层面不再下降为止。此时红细胞柱层高度毫米数×0.01 即为血液中血细胞比容值。

【参考值】

男性：0.42～0.49（42%～49%）；女性：0.37～0.43（37.5%～43%）。

【临床意义】

增高：大面积烧伤、脱水、各种原因所致的低氧血症等；减低：各种原因引起的贫血等。

【注意事项】

血细胞比容（hematocrit，Hct 或Ht 或HCT，亦作packed cell volume，PCV）即红细胞压积。ICSH 建议用PCV 表示。Hct 则常用于表示血细胞分析仪上测定的结果。

九、红细胞沉降率测定

（一）魏氏法

【原理】

将一定量的抗凝血置于特制的刻度管内（魏氏血沉管），刻度管垂直立于室温下，红细胞会自然下沉，60min 后测量管内血浆高度即为红细胞沉降率（血沉）。

【试剂】

109mmol/L 枸橼酸钠水溶液，此液于室温下两周内有效。

【操作1】

1）在试管内加入上述抗凝剂0.4ml。

2）用注射器抽取静脉血并准确注入1.6ml 于试管内，迅速摇匀。

3）用魏氏血沉管将抗凝血吸至“0”刻度处擦去管外的血液，血沉管垂直立于血沉架上并开始记时。

4）60min 后准时记录血浆高度，以mm/h（指试验开始的第一小时结果）报告。

（二）动态血沉分析仪法

【原理】

将枸橼酸钠抗凝血加入特制的小试管内，垂直放置仪器内部固定的孔位。按照设定，仪器的光电检测部件会定时上下扫描每根小试管，根据玻璃管、血浆、全血的透光度不同，仪器自动记录每次的血浆高度。通过计算机处理，仪器可以报告60min 的血沉值并绘制血沉－时间（H－t）曲线。

【操作】

1）预先设定仪器的扫描时间和报告方式。

2）在特制的小试管内加入0.4ml 枸橼酸钠抗凝剂（109mmol/L）。

3）准确抽取1.6ml 静脉血加入上述试管内，加盖，颠倒混匀。

4）放入仪器的测定空位，仪器立即开始初始扫描。按照设定，仪器会定时扫描、自动打印出结果和绘制H－t 曲线。

【参考值】

男性：<15mm/h；女性：<20mm/h。

【临床意义】

1）生理性增高：幼儿、妇女妊娠3 个月至产后1 个月等。

2）病理性增高：急性炎症、风湿病活动期、活动性结核病、组织重度破坏、严重贫血、恶性肿瘤、重金属中毒等。

【注意事项】

1）试剂的浓度以及与血液的比例要准确，并要充分摇匀。

2）抽血后必须在3h 内测定，室内温度应控制在18～25℃。

3）血沉管要垂直放置，否则红细胞沉降加快。

4）H－t 曲线的临床应用。红细胞沉降过程可分为3 个阶段：第一阶段是红细胞聚集期；第二阶段是红细胞快速沉降期；第三阶段是红细胞缓慢沉积期。不同患者这3 个阶段的发生时间相差很大，因此各种疾病所表现出来的H－t 曲线也不一样。根据H－t 曲线特性，可将血沉动态变化分成5 种类型：持续速降型、持续缓降型、前期速降型、后期速降型、阶梯型。健康男性以阶梯型为主，女性以持续缓降型为主；结核病活动期以前期速降型为主；风湿热、急性炎症、恶性肿瘤、系统性红斑狼疮等以持续速降型多见，而良性肿瘤、结核病病情稳定期则以持续缓降型或后期速降型为主。

十、网织红细胞计数

【原理】

网织红细胞是尚未完全成熟的红细胞，其胞浆内有嗜碱性的RNA 物质，经煌焦油蓝或新亚甲蓝活体染色后呈浅蓝色或深蓝色的网状结构。

【试剂】

煌焦油蓝（或新亚甲蓝）溶液：煌焦油蓝（或新亚甲蓝）1g、枸橼酸钠0.4g、氯化钠0.85g，溶于100ml 蒸馏水中，过滤后备用。

【操作】

1）在一小试管内加两滴煌焦油蓝（或新亚甲蓝）溶液。

2）加入新鲜血液2 滴于上述试管中混匀，室温放置15～30min。

3）摇匀后取1 滴制成薄血片，干燥后用油镜计数1000 个红细胞中的网织红细胞数，以相对比值报告。

【计算】

$$网织红细胞计数=\frac{所计网织红细胞数}{1000}$$

【参考值】

成年人和儿童：0.005～0.015（0.5%～1.5%）；新生儿：0.03～0.06（3%～6%）。

【临床意义】

1）增多：表示骨髓红细胞系增生旺盛，多数贫血（再生障碍性贫血除外）均可增高，恶性贫血或缺铁性贫血在药物治疗有效时网织红细胞计数值短期内增多。

2）减少：见于原发性或继发性再生障碍性贫血。

【注意事项】

1）煌焦油蓝（或新亚甲蓝）溶液需定期过滤，以免颗粒性杂质干扰。

2）网织红细胞是活体染色，血标本要新鲜，染色时室温最好控制在20～35 ℃。

3）经验不足者，可用瑞特染液复染后计数，但可能会使计数结果偏低。

4）镜检范围应在血片的体尾交界处细胞均匀分布的区域。为观察方便，可用米勒窥盘或自制小孔纸片放于目镜中缩小视野，以便计数。

5）检测结果低于0.003（0.3％）的标本应计数2000 个红细胞，更低者，可报告“计数2000 个红细胞，未见到网织红细胞”。

6）网织红细胞除了以相对比值报告外，临床上有时还需要网织红细胞的绝对值，其计算方法是将相对比值乘以红细胞计数值即可。

7）仪器法检测网织红细胞见本章第五节血液细胞的自动化分析。

十一、点彩红细胞计数

【原理】

点彩红细胞的性质尚未完全明了，有人认为可能是发育过程中受到损害的尚未完全成熟的红细胞。其胞浆内有残存的变性RNA，可以用一般的碱性染料使之着色。

【试剂】

碱性亚甲基蓝染液：亚甲基蓝0.5g、碳酸氢钠3.0g、蒸馏水100ml，溶解后过滤备用。此液可保存2～3 周。

【操作】

1）常规法推制薄血片，自然干燥，用甲醇固定3min。

2）用碱性亚甲蓝染液染色1～3min，水洗待干。

3）用油镜计数1000 个红细胞中有深蓝色颗粒的嗜碱性点彩红细胞数量，以相对比值报告。

【计算】

$$\text{点彩红细胞计数}=\frac{\text{所计点彩红细胞数}}{1000}$$

【参考值】

小于0.0001（绝对值＜$100/10^6$ 红细胞）。

【临床意义】

增多：多见于重金属或有机物中毒和部分恶性肿瘤及骨髓增生活跃的继发性贫血。

十二、异常红细胞形态观察

各种贫血患者的红细胞在体积、形态、结构、着色等方面有不同程度的改变。通过对外周血红细胞染色后的形态分析有助于贫血的鉴别和诊断。外周血红细胞形态的异常改变有以下4 种。

1．大小异常

正常红细胞大小比较一致，一般直径为6 ～9 μm （体积为80 ～100fl）。直径大于10 μm （体积大于110fl） 的称大红细胞，直径大于15 μm （体积大于120fl） 的称巨红细胞，多见于巨幼细胞贫血、骨髓增生异常综合征等；直径小于6 μm （体积小于80fl） 的称小红细胞，见于缺铁性贫血、肾性贫血等。

2．形态异常

(1) 球形红细胞：红细胞的直径变小、厚度增加，细胞中心染色较正常红细胞深。常见于遗传性球形红细胞增多症、自身免疫性溶血性贫血、某些异常血红蛋白病 (Hbs 及HbC 病) 。

(2) 椭圆形红细胞：红细胞长短径比例失调而致畸形。某些正常人或由于制片不当亦可见到此类细胞，但一般不超过15 %；遗传性椭圆形红细胞增多症和出现大细胞的贫血可超过25 %。

(3) 靶形红细胞：红细胞比正常红细胞扁薄，中心染色浅，边缘着色较深呈靶状。主要见于珠蛋白生成障碍性贫血、重度的缺铁性贫血、某些血红蛋白病、脾切除后、肝胆疾病等。

(4) 镰形红细胞：细胞狭长弯曲成镰刀状。主要见于遗传性镰形红细胞增多症。

(5) 口形红细胞：红细胞的中间淡染区呈扁口状。多见于口形红细胞增多症、急性乙醇中毒等。

(6) 棘形红细胞：红细胞外形呈针刺状或尖刺状。可见于棘细胞增多症 (遗传性血浆β－脂蛋白缺乏症) 、重症肝炎、肝硬化晚期以及制片不当的血片。

(7) 皱缩红细胞和锯齿红细胞：红细胞表面有圆形棘刺样突起。可见于重金属中毒、尿毒症、微血管病性溶血性贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿症以及干燥太慢的血片。

(8) 裂片红细胞：包括头盔形、三角形、泪滴形红细胞及红细胞碎片。可见于弥散性血管内凝血、体外循环后、脾功能亢进症、骨髓纤维化、肾功能不全、血栓病等。

3．染色异常

(1) 着色过浅：红细胞中心淡染区扩大。多见于缺铁性贫血、地中海贫血及一些血

红蛋白病。

(2) 着色过深：红细胞中心无淡染区。多见于各种大细胞性贫血。

(3) 嗜多色性红细胞：红细胞被染成灰蓝色、灰红色、淡灰色等，细胞较正常红细胞大，这是一类尚未成熟的红细胞，多染色性物质是一种核糖体，会随着细胞逐渐成熟而消失。多见于各种增生性贫血。

4．结构异常

(1) 点彩红细胞：用亚甲基蓝染液染色后红细胞胞浆内有散在的深蓝色颗粒。此类细胞增多表示骨髓增生旺盛或有紊乱现象，某些重金属中毒时也可以大量出现。

(2) 卡波环：成熟的红细胞胞浆内有紫红色的细环状物质，呈圆形或“8”字形，可能是残留的核膜。可见于恶性贫血、溶血性贫血、铅中毒。

(3) 豪－乔小体：红细胞内含有紫红色圆形小体，大小、数量不等，可能是残留的核染色质微粒。可见于增生性贫血、脾切除后、巨幼细胞贫血、恶性贫血等。

(4) 有核红细胞：正常人血片中不出现，多见于溶血性贫血、各种白血病。

第三节　血液寄生虫检验

一、疟原虫检查

[操作]

(1) 薄血片法：以常规法将末梢血或抗凝血推制薄血片，干燥后用瑞特染色、镜检。

(2) 厚血片法：在洁净的玻片上滴待检血液2 滴。自然干燥后逐滴加蒸馏水漂洗血红蛋白，直至血膜呈灰白色。不必待干，用瑞特染色、镜检。

[结果]

用油镜检查血片，根据找到的疟原虫种类报告结果（间日疟、三日疟、恶性疟）以及各个阶段（环状体、滋养体、裂殖体）。如报告“未检出疟原虫”，镜检范围不得少于200 个视野。

[注意事项]

(1) 在患者发热后10h 内采血标本阳性率较高。

(2) 阳性标本应复制两份厚、薄血片备案，并按传染病法有关规定登记卜报卫生行政部门指定的疫情机构。

(3) 3 种疟原虫各阶段的形态特征见表2－1－1。

表2－1－1　薄血片上3 种疟原虫各阶段的形态特征

阶段	形态特点	间日疟原虫	三日疟原虫	恶性疟原虫
早期滋养体（环状体）	虫体大小	较大，约为红细胞的1/3	较大，约为红细胞的1/3	较小，约为红细胞的1/6
	细胞浆	浅蓝色，环状较薄	浅蓝色，环状较厚	浅蓝色，环状较薄，常位于红细胞边缘，有时1 个红细胞内有2 个环状体
	染色质	红色小点，每个环状体1个	红色小点，每个环状体1个	红色小点，每个环状体有1～2 个或更多
晚期滋养体	虫体大小	可长得很大，充满红细胞	较小	外周血查不到
	细胞浆	呈阿米巴状，变化很多	呈带状，变化少	
	疟色素	棕黄色，短杆状，分散	黄绿色，粗粒状，分散	
	斑点	薛氏小点，鲜红细小，均匀分布	齐氏小点，红色	
裂殖体	虫体大小	很大	较小	外周血查不到
	细胞浆	松散，不规则	坚实较圆	
	裂殖子数目	12～24 个	6～12 个	
	裂殖子形态	排列不规则	呈花朵样排列	
配子体	虫体大小	圆形，约为红细胞的1/2	圆形，与红细胞等大	半圆形，雄性两端圆钝，雌性两端较尖
	细胞浆	深蓝色	深蓝色	蓝色
	疟色素	沿边分布	沿边分布	褐色，密集于中央
	红细胞	胀大	缩小或正常	正常或缩小

二、微丝蚴检查

【操作】

1）鲜血片法：滴1 滴鲜血于玻片中央，加2 滴水混合，盖上盖玻片，立即低倍镜下寻找活动的类似蚯蚓样的微丝蚴。报告找到（或未找到）微丝蚴。

2）厚血片法：滴2～3 滴鲜血于玻片上制成直径约2cm 的血膜，自然干燥，连续滴加蒸馏水，将血膜漂洗成灰白色，立即镜检报告。如需鉴定虫种，应再干燥、固定、染色。

3）试管浓缩法：取新鲜的静脉抗凝血2ml，加8ml 蒸馏水，于试管中颠倒混匀使红细胞充分破坏，然后1500r/min 离心5min，取沉渣涂片镜检报告。

【注意事项】

1）根据微丝蚴的生活特性，应在夜间患者熟睡后采集标本。

2）未经染色的微丝蚴与棉花纤维很相似，要仔细区别。

三、回归热螺旋体检查

回归热螺旋体为回归热的病原体，归类于疏螺旋体属，能活动，有3～12 个疏松的螺旋形结构，形态不规则，长短不一，约8～30 μm，可在血液中找到。

【操作】

1）薄血片法：按常规推制血片，瑞特染色，油镜检查。回归热螺旋体出现于红细胞间隙，容易识别。

2）厚血片法：滴2～3 滴鲜血于玻片上制成直径约2cm 的血膜，自然干燥，连续滴加蒸馏水，将血膜漂洗成灰白色，干燥、固定、瑞特染色后镜检可提高阳性率。

3）暗视野映光法：抗凝血滴于载玻片上，加盖玻片，镜检。可见活动的螺旋体。

4）报告方式："检出回归热螺旋体"或"未检出回归热螺旋体"。

【注意事项】

1）血标本采集必须在发热期间。

2）回归热螺旋体可以从骨髓穿刺液中找到，阳性率比外周血高。

四、黑热病利－朵体检查

利－朵体是黑热病的病原体，为血液内鞭毛虫的一种。由于在体内被单核细胞吞噬，即变为无鞭毛的利什曼型。其在单核细胞内繁殖，直至单核细胞破裂。原虫钻到内脏时又被单核－巨噬细胞所吞噬，再进行增殖。所以，利－朵体是原虫在人体内发育的无鞭毛阶段。

利－朵体为圆形或卵圆形小体，直径2.4～5.2 μm，瑞特染色细胞浆为浅蓝色，内部有紫红色的圆核和像小棍形的动基体。利－朵体大多在人体的单核细胞或巨噬细胞内，偶然见于中性分叶核细胞内，单独游离于细胞外的也不少。

【操作】

1）穿刺淋巴结、肝、脾或骨髓等，制成薄涂片。

2）瑞特染色后油镜检查。

3）报告方式："找到黑热病利－朵体"或"未找到黑热病利－朵体"。

第四节　一氧化碳血红蛋白定性试验

【原理】

一氧化碳与血红蛋白结合，形成樱红色的一氧化碳血红蛋白。它具有较强的抗碱能

力。

【试剂】

50g/L 氢氧化钠溶液。

【操作】

1） 取2 支试管，各加蒸馏水3～5ml。

2） 测定管加患者的血液3 滴；另一管加正常血3 滴对照。

3） 摇匀后观察测定管是否呈樱红色。

4） 在两管内各滴加氢氧化钠溶液1 滴，对照管变褐色，测定管仍呈樱红色即阳性，与对照管一致则为阴性。

【注意事项】

1） 观察结果要及时，否则樱红色容易褪色。

2） 本试验敏感性较差，当血液中一氧化碳血红蛋白达到一定浓度时才阳性。因此，若本试验结果阴性，尚应结合临床症状综合判断。

【临床意义】

用于急性煤气中毒辅助诊断。

第五节　血液细胞的自动化分析

20 世纪50 年代初Coulter 研制出第一台血细胞计数仪以来，经过近半个世纪的发展，血液细胞分析仪在原理、结构、功能和性能等各方面都有不断的改进和发展，特别是近20 年来计算机技术结合激光散射、荧光标记、细胞化学染色等技术以后，各种血液细胞分析仪已不再是简单的细胞计数器，它们能够快速、准确地为临床提供多种细胞参数及分子水平的检验资料，已成为临床不可缺少的诊断仪器。

一、血液细胞分析仪的检测原理

㈠ 白细胞检测原理

1．白细胞计数原理

1） 电阻抗法：血细胞是一种不良导体，将血标本稀释、溶血后制成白细胞悬液后，在负压的作用下，悬液流经一个带有微孔的恒压电路时，每个细胞会产生一个电阻脉冲信号，这些信号经过微机的放大、甄别、整形等处理，最后根据这些信号计算出单位体积内的白细胞数。

(2) 光学法：血标本在稀释液和溶血剂的作用下制成一定浓度的白细胞悬液，根据流体力学的鞘流技术原理，使得白细胞一一流经仪器检测器，每个细胞在通过检测器时都会受到一束固定波长的激光照射，微机根据光的折射、反射、前向角等信号来识别和计数细胞。

【注意事项】

(1) 电阻抗法计数的是“颗粒”的数量，“颗粒”毋须有完整的细胞结构，这使某些易溶淋巴细胞（脆性淋巴细胞）不易漏检。其缺点是：①容易受到有核红细胞、抗溶血红细胞、血小板团块及其他颗粒性物质的干扰。②由于细胞仪的微孔管无法使细胞逐个通过（一般白细胞测试孔径为100μm，红细胞/血小板测试孔径为80μm），细胞悬液通过测试孔时往往会出现细胞“重叠”现象而使检测结果偏低，特别是标本中细胞数超出一定线性范围时。为了排除重叠损失，仪器设有一个补偿系统，可通过下列公式进行计算以自动校正：

$n''=p(d'/1000)^2$　　补偿后细胞数$=n'+n''$　　$p=2.5(d/100)2500/V$

式中n''为重叠损失数；n'为未加补偿时计数值；p为补偿系数；d为小孔直径；V为计数体积。

(2) 光学法细胞计数的优点是可以有效排除有核红细胞、抗溶血红细胞、血小板团块、其他颗粒性物质的干扰，其缺点是对易溶淋巴细胞（脆性淋巴细胞）容易漏检。一些五分类血细胞分析仪同时用两种方法进行计数，当两种方法的结果不符时仪器会提示并根据干扰因素的大小报告一个较为准确的结果。

2．白细胞分类原理

白细胞分类是血细胞分析仪的重要技术指标，各个公司研制的不同型号的血细胞分析仪对细胞进行分类的技术原理也不一样。

(1) 两分群、三分群血细胞分析仪原理：通常两分群、三分群血细胞分析仪均采用单一的电阻法，即在溶血素的作用下，白细胞发生皱缩，仪器根据白细胞颗粒产生的电阻脉冲信号的数量计算出单位容积内白细胞总数；再根据脉冲信号的强弱计算出细胞体积。在体积分析过程中，微机将皱缩的白细胞在35～450fl范围内分成256个通道，每个通道1.64fl。根据通过不同通道细胞的数量，仪器可以得到以体积为横坐标轴、以相对数量为纵坐标轴的白细胞分布二维直方图。从而将白细胞分为小细胞群（以淋巴细胞为主），中间类型细胞群（以单核细胞、嗜酸性细胞、嗜碱性细胞、部分幼稚细胞为主），大细胞群（以成熟中性粒细胞为主）。

(2) 五分类血细胞分析仪原理：①体积、电导、光散射法：血标本在特殊的稀释液和溶血剂作用下红细胞被破坏，但白细胞形态和结构仍保持自然状态。当白细胞在鞘流

技术的引导下流经检测器时，会同时受到V、C、S3 种技术的检测。V（olume）是利用电阻抗法测定细胞体积；C（onductivity）是利用高频电磁波，根据各种细胞核浆的电导性不同测量细胞内部结构、核浆比例；S（catter）是利用光散射原理测量细胞内颗粒的大小、密度等结构特性。计算机根据这3 种技术得到的资料综合分析，将中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性细胞、嗜碱性细胞一一分开，并有异常淋巴细胞、幼稚细胞、有核红细胞、抗溶血红细胞等提示信息，同时仪器能提供白细胞、红细胞、血小板的直方图及白细胞分类散点图。②多角度消偏振激光散射法（multiangle polarized scatter separation，MAPSS）：血标本在特殊鞘液的作用下，红细胞内血红蛋白可游离出细胞外，红细胞变得透明（成为影细胞），而白细胞的内部结构和膜结构基本保持自然状态。当细胞悬液的鞘流经过检测器时，仪器从4 个不同的角度得到每个细胞的光信号。这4 个角度分别为：0°前向角光散射（1°～3°）初步测定细胞的大小；10°狭角光散射（7°～11°）测定细胞内部结构及其复杂性指征；90°垂直光散射（70°～110°）测定细胞内部颗粒和胞浆成分；90°消偏振光散射（70°～110°）利用嗜酸性细胞内颗粒特有的消偏振特性，将嗜酸性细胞直接分离出来。计算机综合4 个角度的光信号，将白细胞分类，并提供提示信息和相关图谱。③电阻抗与射频技术分类法（adio frequence，RF）：这类血细胞分析仪通过4 个不同的检测系统来完成白细胞的分类：嗜酸性细胞、嗜碱性细胞利用其特有的抗酸和抗碱能力，在各自特殊试剂的作用后，进入独立通道直接计数；在直流电和交流电的同时作用下，仪器根据细胞大小以及细胞内部的核结构、核浆比例、胞浆颗粒等信息对中性、淋巴、单核细胞加以区分；幼稚细胞由于其膜上脂质成分比成熟细胞少，在硫化氨基酸的保护下具有一定的抗溶血能力，在独立的通道内可以直接计数。④光散射与细胞过氧化物酶染色法（peroxidasestain，POX）：血标本进入仪器，在一系列的预处理液和白细胞过氧化物酶染色后流经检测器。每个细胞在激光束的照射下，各类细胞因过氧化物酶含量不同，具有不同的光吸收信号；根据每个细胞的前向角大小可以得到细胞的体积数据，同时仪器有单独的嗜碱性细胞直接计数通道，计算机根据这些信息得出细胞分类结果。

（二）红细胞检测原理

1．红细胞（RBC）计数、红细胞体积（MCV）、血细胞比容（HCT）、红细胞分布宽度（RDW）检测一般采用电阻抗法。原理同白细胞计数。

2．血红蛋白浓度（HGB）测定

大多数的血细胞分析仪均采用溶血比色法。血标本在溶血素的作用下，红细胞破坏，溶血素与血红蛋白结合成稳定的氰化高铁血红蛋白（或HGB－季胺盐衍生物）。溶血液在流经比色池时仪器根据吸光度计算出HGB 的含量。

3．红细胞平均血红蛋白含量（MCH）、红细胞平均血红蛋白浓度（MCHC）检测根据RBC、HCT、HGB 计算而得。

【注意事项】

1）用仪器测定的血细胞比容是每个细胞信号的累加，与手工测定的结果有差异，前者略低。

2）不同类型的血细胞分析仪使用的溶血剂成分略有不同，但主要成分是季胺盐。

3）对不同的仪器，红细胞分布宽度有两种表示方法——s 或CV%。

（三）血小板检测原理

血小板测定与红细胞计数原理一致，仪器将直径2～30fl 的颗粒统计为血小板，大于36fl 的颗粒统计为红细胞。

（四）网织红细胞检测原理

网织红细胞内残留的RNA 与特殊的染料结合后在通过激光检测器时仪器根据细胞的反射光信号（或发射光信号）将其与成熟红细胞和其他细胞区别并计数。根据染料性质的不同可分为反射光测定法和发射光测定法。

1）反射光测定法：网织红细胞经亚甲蓝染色后，胞浆内的RNA 与染料结合形成蓝色颗粒。这些颗粒在激光的照射下会产生特殊的反射光，而成熟红细胞则没有这一特性。仪器根据反射光信号可以计数网织红细胞的百分比（Ret%）、绝对值（Ret#）、网织红细胞成熟指数（RMI）等相关指标。

2）发射光测定法：网织红细胞内的RNA 与吖啶橙、碱性槐黄等荧光染料结合后在一定波长的激光照射下会发出固定波长的荧光。仪器根据发光细胞的数量和光强度信号以及红细胞测定的相关参数可以得到网织红细胞绝对值、高荧光强度网织红细胞（HFR）百分比、中荧光强度网织红细胞（MFR）百分比、低荧光强度网织红细胞（LFR）百分比、网织红细胞平均体积（MCVr）、网织红细胞分布宽度（RDWr）、网织血红蛋白分布宽度（HDWr）、网织血红蛋白浓度（HCr）、网织红细胞平均血红蛋白浓度（MCHCr）等参数。

【注意事项】

散射光测定法测定网织红细胞易受增多的白细胞和血小板、嗜碱性点彩红细胞、脂浊、疟原虫等影响，发射光测定法则不易受增多的白细胞和血小板、溶血、凝血、脂浊的影响，但易被疟原虫和豪－乔小体干扰。

二、常用血液细胞分析仪检测的参数及临床应用

㈠ 常用血液细胞分析仪测定参数及参考范围

见表2 -1 -2 。

表2 -1 -2　常用血液细胞分析仪测定参数及参考范围

测定参数名称	常用英文缩写符号	参考范围
白细胞计数	WBC	(4.0 ~10.0) ×10^9/L
中性粒细胞绝对值	NEU (L)	(1.8 ~5.8) ×10^9/L
淋巴粒细胞绝对值	LYMPH #	(1.5 ~3.0) ×10^9/L
单核细胞绝对值	MON #	(0.1 ~1.5) ×10^9/L
嗜酸性粒细胞绝对值	EOS #	(0.05 ~0.5) ×10^9/L
嗜碱性粒细胞绝对值	BAS #	(0.01 ~0.05) ×10^9/L
中性粒细胞百分比	NEU %	0.55 ~0.75 (55 % ~75 %)
淋巴细胞百分比	LYMPH %	0.20 ~0.45 (20 % ~45 %)
单核细胞百分比	MON %	0.04 ~0.16 (4 % ~16 %)
嗜酸性粒细胞百分比	EOS %	0.01 ~0.06 (1 % ~6 %)
嗜碱性粒细胞百分比	BAS %	0 ~0.01 (0 ~1 %)
大体积未染色细胞绝对值	LUC	(0.05 ~0.40) ×10^9/L
大体积未染色细胞百分比	LUC %	0.01 ~0.04 (1 % ~4 %)
红细胞计数	RBC	男性：(4.0 ~5.5) ×10^{12}/L 女性：(3.5 ~5.0) ×10^{12}/L
血细胞比容	HCT	男性：0.4 ~0.5 女性：0.37 ~0.48
平均红细胞体积	MCV	82 ~94fl
红细胞分布宽度	RDW -CV	11.0 % ~14.5 %
血红蛋白浓度	HGB	男性：120 ~160g/L 女性：110 ~150g/L 儿童：170 ~190g/L
平均红细胞血红蛋白含量	MCH	26 ~32pg
平均红细胞血红蛋白浓度	MCHC	320 ~360g/L
血红蛋白分布宽度	HDW	24 ~34g/L
血小板计数	PLT	(100 ~300) ×10^9/L
血小板体积分布宽度	PDW	15 % ~18 %

续表

测定参数名称	常用英文缩写符号	参考范围
平均血小板体积	MPV	6.5～13.0fl
血小板比积	PCT	0.0011～0.0028（0.11%～0.28%）
大血小板比积	LPR	>0.36（36%）
网织红细胞绝对值	Ret#	（18～75）×10^9/L
网织红细胞百分比	Ret%	0.005～0.015（0.5%～1.5%）
网织红细胞成熟指数	RMI	0.103～0.34（10.3%～34.0%）
高荧光强度网织红细胞百分比	HFR	0.01～0.045（1.0%～4.5%）
中荧光强度网织红细胞百分比	MFR	0.07～0.15（7%～15%）
低荧光强度网织红细胞百分比	LFR	0.80～0.90（80%～90%）
网织红细胞平均体积	MCVr	106～116fl
网织红细胞分布宽度	RDWr	15～19
网织血红蛋白分布宽度	HDWr	28～38

【注意事项】

（1）各类型的血液细胞分析仪可提供不同的参数项目。一般的两分群或三分群血液细胞分析仪能提供15～18个参数及3个直方图，五分类血液细胞分析仪能提供23～38个参数、3个直方图、2～10个细胞散点图。在这些参数中，有些可以直接用于临床疾病的诊断和治疗；有些参数仅作为实验室提示和参考之用；有些尚处于研究和探索过程中。

（2）血液细胞参数的参考范围各文献或书籍报道略有差异，主要是因为目前大家引用的参考值有3个不同来源：①沿用国内20世纪60年代、70年代制订的参考范围；②引用国外权威文献；③直接引用仪器厂家提供的参考值。由于国内近几十年来没有做大规模的正常人群调查，早期的参考范围不一定适合现代；国外报道的参考范围与国内报道的参考值存在着地区和种族间差异；仪器厂家（大多数是国外厂商）提供的参考值有一定的局限性。因此各实验室、各种型号仪器的参考值允许有一定差异。根据国外一些权威实验室的做法，每一种血液细胞分析仪均应建立自己实验室的参考值供临床参考，而且，有些参数的参考值还应随季节的变化而调整（如嗜酸性细胞计数等）。

（二）部分血液细胞参数的临床应用

1．红细胞分布宽度（RDW）

RDW是红细胞形态指标，反映红细胞体积大小的一致性。RDW值大说明红细胞大

小均一性差，RDW 值小说明红细胞大小比较均匀。根据不同型号的仪器，RDW 有两种表示方法：RDW －s 和RDW －CV。由于RDW －s 易受红细胞体积个体差异的影响，临床诊断的灵敏度和特异性较差，大多数仪器以及临床习惯采用RDW －CV 表示。RDW 与其他参数结合，在贫血诊断和治疗观察方面有很大意义。

1）用于缺铁性贫血和轻型β－珠蛋白生成障碍性贫血的鉴别：缺铁性贫血和β－珠蛋白生成障碍性贫血均为小细胞低色素性贫血，但100％的缺铁性贫血患者RDW 值增大，而90％的珠蛋白生成障碍性贫血患者RDW 值正常。

2）用于缺铁性贫血早期诊断：根据病程，缺铁性贫血分为隐性缺铁前期、隐性缺铁期、缺铁性贫血期。在这3 个时期RDW 值均明显增大，因此RDW 增大是缺铁性贫血诊断的特异性指标。一般认为，如果临床上表现为小细胞低色素性贫血，但RDW 值正常者缺铁的可能性很小。

3）用于贫血的形态学分类：RDW 与MCV、MCH、MCHC 结合将临床上的贫血从形态学角度分成6 类，各类贫血与红细胞形态参数的关系见表2 －1 －3。

2．血小板参数的临床意义

血小板数量和功能的测定在出血性疾病诊断和治疗方面有重要意义，但血小板功能测定需要特殊的设备，且操作繁琐，因此不能广泛开展。人们在研究过程中发现，血小板的功能与形态指标有密切关系，因此可以通过对血小板形态指标的分析，判断血小板功能。

1）正常人群血小板数量为（100～300）×10^9/L，血小板体积为6.5～13.0fl。正常人群的血小板数量与血小板体积呈非线性的负相关。

2）血小板体积用于鉴别血小板减少的病因。血小板破坏增加如特发性血小板减少性紫癜、弥散性血管内凝血等患者血小板体积增大；骨髓增生低下如再生障碍性贫血患者，血小板体积减小或正常。

3）血小板体积用于骨髓造血功能恢复的预示分析。在化疗结束和骨髓移植早期，血小板体积增大是骨髓功能恢复的第一征候，比血小板计数、红细胞计数等增多要早1～2d。

表2 －1 －3　各类贫血的形态学参数改变

诊断	HGB	MCH	MCV	MCHC	RDW	常见疾病
大细胞非均一性贫血	↓	↑	↑	N	↑	巨幼细胞性贫血，骨髓增生异常综合征，部分慢性粒细胞白血病（白细胞绝对值高），自身免疫性溶血性贫血

续表

诊断	HGB	MCH	MCV	MCHC	RDW	常见疾病
大细胞均一性贫血	↓	↑	↑	N	N	部分急性再生障碍性贫血
正细胞非均一性贫血	↓	N	N	N	↑	慢性再生障碍性贫血，骨髓纤维化，阵发性睡眠性血红蛋白尿，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症，急性白血病，慢性白血病（白细胞绝对值低）
正细胞均一，感染性贫血	↓	N	N	N	N	急性失血，溶血，恶性肿瘤，中毒
小细胞非均一性贫血	↓	↓	↓	↓	↑	缺铁性贫血，血红蛋白H病，铁粒幼细胞贫血
小细胞均一性贫血	↓	↓	↓	↓/N	N	肾小球肾炎，恶性肿瘤（病程长），珠蛋白生成障碍性贫血

注：↑增大，↓减小，N 正常范围

4）血小板体积用于临床上出血倾向的分析。血小板体积大，则血小板粘附聚集力强，代谢活跃、止血功能好，即使血小板计数较低也不一定有出血倾向；相反血小板体积小，则血小板功能差，一旦血小板计数降低，会呈现明显的出血倾向。

3．网织红细胞参数的临床意义

网织红细胞参数在贫血鉴别诊断方面有较大意义（见第二节血液学一般检验），但对某些疾病的动态观察和疗效分析的灵敏度不够，特别是化疗和骨髓移植患者，网织红细胞测定往往受输血的影响而不能真正反映骨髓造血恢复情况；网织红细胞成熟指数（RMI）的变化则能较真实地反映骨髓的增生情况。其计算公式为：

$$RMI = (HFR + MFR) / LFR \times 100\%$$

式中HFR、MFR、LFR 的意义参见表2-1-2。

（三）血液细胞直方图

血液细胞分析仪不仅能提供大量的检测参数，还能提供细胞分布的直方图。分析直方图的变化有助于了解检测数据的可靠性，对加强质量控制以及辅助临床诊断均有重要意义。不同的仪器由于内部设置技术不同，显示直方图的方式和形状略有不同，但所有的直方图都是以横坐标表示体积大小，纵坐标表示相对数量。

1．正常红细胞直方图

仪器在36～360fl 范围内分析红细胞。正常红细胞分布在50～200fl，且有两个群体：主细胞群和大细胞群，主细胞群图形为两侧对称、较为狭窄的正态分布曲线；次细胞群分布在125～200fl 之间，主要是一些较大红细胞或网织红细胞。见图2－1－1。

2．正常血小板直方图

仪器在2～30fl 范围内分析血小板。正常血小板曲线呈对数正态分布，主要集中于3～15fl 的区域。见图2－1－2。

3．正常白细胞直方图

仪器在35～450fl 范围内分析白细胞。根据仪器型号不同，其内部设置也有差异，可将细胞分为2 群或3 群。见图2－1－3。

图2－1－1　正常红细胞直方图

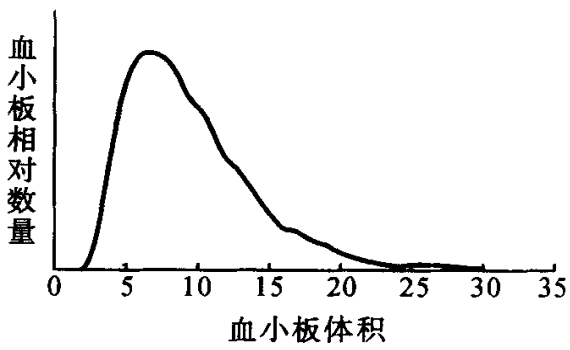


图2－1－2　正常血小板直方图

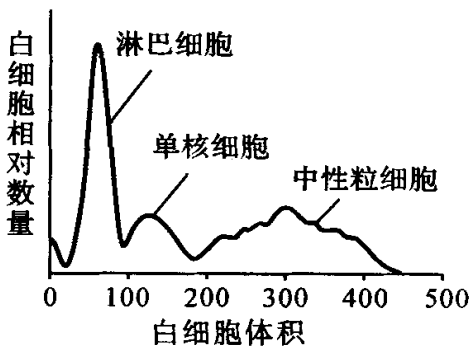


图2－1－3　正常白细胞直方图

4．常见的红细胞直方图异常现象

(1) 主细胞群明显左移，若底部变宽多见于缺铁性贫血；底部变窄多为轻型的珠蛋白生成障碍性贫血。

(2) 主细胞群明显右移，多见于叶酸缺乏引起的巨幼细胞贫血。

(3) 主细胞群曲线宽度增大，各种贫血、白血病、药物治疗过程中均可出现。

(4) 主细胞群出现双峰或多峰，可见于骨髓纤维化、心瓣膜病、体外循环术后、骨髓移植成功后等。

5．常见血小板直方图异常现象

(1) 血小板聚集的直方图。由于血小板聚集成团块，造成血小板计数偏低，且血小板直方图出现平坦、多峰等现象，此时可见白细胞直方图的左端（紧贴淋巴细胞区域）出现异常波峰。

(2) 有小红细胞（或碎裂红细胞）干扰的血小板直方图。由于小红细胞或红细胞碎

片的体积与大血小板接近，导致血小板计数值偏高，直方图表现为血小板与红细胞的图谱重叠面积增大，甚至粘连。

对于这类标本必须用手工法对血小板计数加以复核。

6．白细胞直方图异常现象

1）中性粒细胞数显著增多。

2）中性粒细胞数显著减少。

3）中间类型细胞显著增多。中间类型细胞体积位于90～160fl 左右区域内，这一范围内的细胞最复杂，除了单核细胞外还包括各种异常细胞如幼稚细胞、异常淋巴细胞、嗜酸性细胞等。因此，这个区域的直方图如有明显改变（往往伴有“M”细胞值偏高），该标本必须涂片镜检。

4）抗溶血红细胞干扰。某些肝硬化、肝癌、重症肝炎、胆道疾病、骨髓瘤等疾病以及某些药物的作用可以使红细胞产生抗溶血现象，这些抗溶血红细胞可干扰白细胞的计数值和直方图。这类标本必须采用仪器的“抗溶血程序”进行测定或用手工法计数。

第二章　血型鉴定、配血与输血

第一节　输血安全与输血前检测

近百年来，输血作为一种特殊的、至今尚无法替代的治疗手段，已拯救了无数人的生命。随着现代医学的发展，输血学逐渐发展为一门多学科交叉的新兴学科，尤其是成分输血具有显著的作用和重要的意义。然而，倘若输血不当，也会产生严重的不良反应，甚至危及生命：而且输血传播疾病的危险客观存在，所以医疗机构必须切实加强临床用血管理，保证输血安全。世界卫生组织（WHO）将输血安全列为重要工作之一，并为此提出了三大战略，即“从低危献血者采血，控制血液来源的质量”，“严格筛检血液”和“合理用血”。

一、血源

医疗机构的临床用血，即健康人的全血和血液成分必须由县级以上卫生行政部门指定的采供血机构供给，紧急临床用血和特殊血型的临床用血也必须经上述采供血机构采集或联系供应。采供血机构必须由省级以上卫生行政部门批准设置，并经省级以上卫生行政部门检查验收合格，发给采供血执业许可证后方可执业。

国家严禁无采供血执业许可证的单位或个人采集临床用血。严禁采供血机构跨地区采供血。严禁医疗机构跨地区取血。

医疗机构开展的患者自身输血、自体输血除外。

患者亲友及所在单位和社会互助献血必须在当地采供血机构进行。

医疗机构不得出售无偿献血的血液。医疗机构不得使用原料血浆。

国家对医疗机构因科研需要直接使用脐带血，实行审批制度，由使用单位提出申请，二级卫生行政部门同意后，报省级卫生行政部门审批。

二、操作规程

医疗机构应根据上述法律法规制定本单位的实施细则或操作规程。

医护人员必须严格执行上述法律法规，必须严格执行各项专业技术操作规程，并定

期对执行情况进行检查和分析。

三、合理、科学用血

合理、科学用血可以节约宝贵的血液资源，减少由于临床医生对输血认识不足而产生的盲目输血、盲目要求输新鲜血、全血而造成的浪费和滥用血液，避免筛选检测的项目和传染病窗口期等客观存在的血液传播疾病的危险。

要做到合理、科学用血，就必须进行成分输血。成分输血的主要原则是给患者输注其病情所需要的血液成分，即缺什么补什么。因此，补充血红蛋白、血小板或凝血因子等将减少输血传播疾病的危险，提高输血安全性。所以成分输血是合理、科学用血最有效的方法。

四、输血前检测

输血前的检测涵盖血液的检测，该项工作由采供血机构完成。

受血者检查由医疗机构执行。输血科（血库）在核对确认受血者血液样本后，应检查确认受血者血型、交叉配血。检查受血者血清丙氨酸氨基转移酶及乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病病毒和梅毒螺旋体等感染情况。在检测时，所用的检测方法应与采供血机构一致，试剂应经国家批检合格并在有效期内使用，同时做好室内外质控。

第二节　ABO 血型系统鉴定

ABO 血型是最早发现的一个血型系统，在输血工作中极其重要。这是因为，一个人的红细胞上若缺乏A 抗原或B 抗原，其血清中则有抗A 抗体或抗B 抗体，因此，如果在输血中忽视了ABO 血型鉴定，就会发生血型不合的输血而导致溶血性输血反应。

一、ABO 血型鉴定

常规的ABO 血型鉴定，应包括用已知的特异性抗体试剂检查红细胞的抗原（正向定型）和用已知的试剂红细胞检查血清中的抗体（反向定型）。常用的方法有试管法、搪瓷板法。近年又有凝胶微柱法。本节介绍前两种方法，后者可参考市售配套试剂和器材说明书进行操作。

㈠ 试管法

【原理】

用标准抗A 抗体、抗B 抗体及抗A、B 抗体分型血清测定红细胞上有无A 抗原或

(和) B 抗原 (正定型)，或用已知A 型、B 型及O 型红细胞测定血清中有无相应的抗A 抗体或 (和) 抗B 抗体 (反定型) 来鉴定ABO 血型。

【试剂】

1) 抗A 抗体、抗B 抗体 (效价均不低于1 ∶128) 及抗A 、B 抗体 (O 型) 分型血清。

2) 已知A 型、B 型及O 型红细胞悬液。

3) 受检者血清。

4) 受检者2 %红细胞悬液。

【操作】

1) 取洁净小试管3 支，分别标明抗A 抗体、抗B 抗体和抗A 、B 抗体，用滴管分别加入相应的分型血清，再分别加入受检者2 %红细胞悬液1 滴，混匀 (正定型)。

2) 另取洁净小试管3 支，分别标明A 、B 和O ，用滴管分别加受检者血清各1 ～2 滴于试管底部，再分别以滴管加入2 %已知A 型、B 型和O 型红细胞悬液1 滴，混匀 (反定型)。

3) 立即以1000r/min 离心1min ，轻轻摇动试管，使沉于管底的红细胞浮起，肉眼及显微镜观察有无凝集或溶血现象。

【结果判断】

受检者红细胞加分型血清及受检者血清加试剂红细胞后根据表2 -2 -1 判断受检者血型。

表2 -2 -1　ABO 血型正反定型结果

受检者血型	受检者红细胞加			受检者血清加		
	抗A 抗体	抗B 抗体	抗A 、B 抗体	A 型红细胞	B 型红细胞	O 型红细胞
A	+	-	+	-	+	-
B	-	+	+	+	-	-
O	-	-	-	+	+	-
AB	+	+	+	-	-	-

注：+ 凝集；- 不凝集

【注意事项】

1) 分型血清的质量必须符合要求，市售的应有批准文号；用后应立即放人冰箱保

存以免其效价下降及细菌污染。

(2) 试管、滴管必须清洁干燥，防止标本溶血。

(3) 离心时间过长或速度过快，易出现假阳性结果，反之易出现假阴性结果。

(4) 如室温过低，应提高室温至20 ℃左右，或将试管放入37 ℃水浴保温，但是37 ℃环境可使反应减弱。

(5) 判定结果后，应立即记录并仔细核对，以防笔误。

(6) 操作时一般应先加血清，后加红细胞悬液，便于核对是否漏加血清。

(7) 正反定型不一致时，需进一步鉴定，以确定不一致的原因。

(二) 搪瓷板法

【原理】

同试管法。

【试剂】

抗A 抗体、抗B 抗体及抗A 、B 抗体分型血清。

【操作】

(1) 在搪瓷板方格内滴加抗A 抗体、抗B 抗体及抗A 、B 抗体分型血清各1 滴，在分型血清旁滴加相当于分型血清1/10 体积的受检者全血。

(2) 用玻棒充分混匀分型血清和受检血标本，在室温 (18 ～22 ℃) 中停留1 min 后，轻轻摇动瓷板，观察凝集结果。

【结果判断】

同试管法。

【注意事项】

夏季气温较高时，水分蒸发快，为防止血滴蒸发干燥，要及时观察结果，或在血滴上加1 滴9g/L 氯化钠溶液，以防检测出现假阳性结果。

二、A_1 和A_2 亚型鉴定

【原理】

A 型和AB 型一般可分为A_1、A_2、A_1B 和A_2B4 种亚型。B 型人血清中含有抗A 抗体、抗A_1 抗体两种抗体，抗A 抗体可凝集A_1 型、A_2 型、A_1B 型和A_2B 型红细胞，而抗A_1 抗体只能凝集A_1 型和A_1B 型红细胞。

【试剂】

抗A_1 抗体分型试剂 (人源或植物种子血凝素) 、受检者2 %红细胞悬液、已知A_1 和A_2 型2 %红细胞悬液。

【操作】

1）取洁净玻片2 张，1 张供测定受检红细胞用，另1 张标明A_1 型和A_2 型，供对照用。

2）将抗A_1 抗体分型血清各1 滴，分别滴在受检者玻片上、对照的A_1 型和A_2 型玻片上。

3）分别将受检者红细胞悬液及已知A_1 型和A_2 型红细胞悬液1 滴，滴在上述抗A_1 抗体分型试剂上，用玻棒将分型试剂和红细胞悬液混匀。

4）轻轻转动玻片，在室温中放置10min，观察结果。

【结果判断】

如已知的A_1 型红细胞凝集，已知的A_2 型红细胞不凝集，而受检者红细胞凝集是A_1 型，不凝集是A_2 型。

【注意事项】

1）新生儿红细胞ABO 血型抗原较弱，不宜作亚型检定。

2）检查时必须按说明书掌握反应时间。

3）如A_1 型和A_2 型已知红细胞均与抗A_1 型抗体分型试剂凝集，说明抗A_1 型抗体分型试剂有问题；若A_1 型和A_2 型已知红细胞均不凝集，应再观察一些时间，若始终不凝集，也说明抗A_1 型抗体分型试剂有问题。

三、其他A 亚型鉴定

比A_2 型更弱的A 亚型国内已有一些报道，这些细胞的特征是A 抗原位点数很少，H 物质活性增加。其频率在几千分之一到万分之一之间。其鉴定主要根据各自的特点相互比较，尚无特定的抗血清加以区别，可根据如下原则划分弱A 亚型：①红细胞与抗A 抗体及抗A_1 抗体的凝集程度；②红细胞与抗A、B 抗体的凝集程度；③红细胞上H 物质活性的强度；④血清中是否存在抗A_1 抗体；⑤分泌型人唾液中所含A 物质及H 物质的活性。

四、B 亚型鉴定

目前已检出的B 亚型较A 亚型少，B 亚型的命名一般与A 亚型命名相互平行。但关于是否存在B_2 亚型尚无定论。

A 亚型及B 亚型的鉴定见表2－2－2。

表2－2－2　A 亚型及B 亚型的鉴定

红细胞表现型	红细胞与已知抗血清反应					血清与试剂红细胞反应				分泌型唾液内含型物质
	抗A 抗体	抗B 抗体	抗A、B 抗体	抗H 抗体	抗A_1 抗体	A_1	A_2	B	O	
A_1	＋＋＋＋	0	＋＋＋＋	0	＋＋＋＋	0	0	＋＋＋＋	0	A、H
Aint	＋＋＋＋	0	＋＋＋＋	＋＋＋	＋＋	0	0	＋＋＋＋	0	A、H
A_2	＋＋＋＋	0	＋＋＋＋	＋＋	0	＋	0	＋＋＋＋	0	A、H
A_3	＋＋mf	0	＋＋mf	＋＋＋	0	＋	0	＋＋＋＋	0	A、H
A_m	0／±	0	＋／±	＋＋＋＋	0	0	0	＋＋＋＋	0	A、H
A_x	0／±	0	＋／＋＋	＋＋＋＋	0	＋＋	0／＋	＋＋＋＋	0	H
Ael	0	0	0	＋＋＋＋	0	＋＋	0	＋＋＋＋	0	H
B	0	＋＋＋＋	＋＋＋＋	0		＋＋＋＋＋＋＋＋		0	0	B、H
B_3	0	＋mf	＋＋mf	＋＋＋＋		＋＋＋＋＋＋＋＋		0	0	B、H
B_m	0	0	0	0／±		＋＋＋＋＋＋＋＋		0	0	B、H
B_x	0	0	0／±	0／＋＋		＋＋＋＋＋＋＋＋		0	0	H

注：＋～＋＋＋＋表示凝集强度顺增；±表示弱凝集；mf 表示混合外观凝集；○表示无凝集。A_2 型常有抗A_1 抗体，A_3 通常无抗A_1 抗体，但少数A_3 在其血清中有抗A_1 抗体

第三节　Rh 血型系统及其他血型鉴定

Rh 血型系统可能是红细胞血型系统中最复杂的一个血型系统。由于红细胞抗原的组成不同而显示不同的型别。一般所谓的Rh 阳性与阴性是根据受检者红细胞与抗D 抗体发生凝集与否而定，发生凝集者即有D 抗原，称Rh 阳性；反之，不带有D 抗原，称Rh 阴性。其他Rh 抗原鉴定与D 抗原鉴定一样，不同的只是加相应的Rh 抗血清。鉴定Rh 血型的方法视所用抗血清的抗体性质而定，如盐水抗体可用盐水法；如为不完全抗体，应选用酶、聚凝胺、抗人球蛋白等方法。

人类除ABO 和Rh 血型系统的抗原外，还可在红细胞上检出其他很多血型抗原。本节介绍MN 血型和P 血型的鉴定。

一、Rh 血型鉴定

【原理】

用抗C 抗体、抗c 抗体、抗D 抗体、抗E 抗体及抗e 抗体5 种血清，可检出18 种Rh 型别，见表2－2－3。

表2－2－3　用5 种抗血清鉴定Rh 血型结果判断

与各抗血清的反应					受检者	用前4 种	临床上	血清学上
抗C 抗体	抗c 抗体	抗D 抗体	抗E 抗体	抗e 抗体	Rh 表现型	抗体报告方式	通称的Rh 阳性及阴性	区分的Rh 阳性及阴性
＋	＋	＋	＋	＋	CcDEe	CcDE	Rh 阳性	Rh 阳性
＋	－	＋	－	＋	CCDee	CCDee	Rh 阳性	Rh 阳性
＋	＋	＋	－	＋	CcDee	CcDee	Rh 阳性	Rh 阳性
＋	－	＋	＋	－	CCDEE	CCDE	Rh 阳性	Rh 阳性
－	＋	＋	＋	－	ccDEE	ccDE	Rh 阳性	Rh 阳性
－	＋	＋	－	＋	ccDee	ccDee	Rh 阳性	Rh 阳性
－	＋	＋	＋	＋	ccDEe	ccDEe	Rh 阳性	Rh 阳性
＋	－	＋	＋	＋	CCDEe	CCDE	Rh 阳性	Rh 阳性
＋	＋	＋	＋	－	CcDEE	CcDE	Rh 阴性	Rh 阳性
＋	－	－	－	＋	CCdee	CCdee	Rh 阴性	Rh 阳性
－	＋	－	＋	－	ccdEE	ccdE	Rh 阴性	Rh 阳性
＋	＋	－	＋	＋	CcdEe	CcdE	Rh 阴性	Rh 阳性
＋	＋	－	－	＋	Ccdee	Ccdee	Rh 阴性	Rh 阳性
－	＋	－	＋	＋	ccdEe	ccdE	Rh 阴性	Rh 阳性
＋	－	－	＋	－	CCdEE	CCdE	Rh 阴性	Rh 阳性
＋	－	－	＋	＋	CCdEe	CCdE	Rh 阴性	Rh 阳性
＋	＋	－	＋	－	CcdEE	CcdE	Rh 阴性	Rh 阳性
－	＋	－	－	＋	ccdee	ccdee	Rh 阴性	Rh 阴性

注：＋凝集，－不凝集

【试剂】

（1） Rh 抗血清：常用的为盐水反应性抗D 抗体、抗C 抗体、抗E 抗体、抗c 抗体、抗e 抗体计5 种。

（2） 受检者5 %红细胞悬液。

（3） 已知Rh 阳性和Rh 阴性5 %红细胞悬液各1 份。

【操作】

（1） 取洁净小试管5 支，分别标记并各加上述5 种抗血清1 滴，再各加5 %受检者红细胞悬液1 滴混匀，以3000r／min 离心15～20s，肉眼及显微镜下观察凝集反应。

（2） 阳性对照管和阴性对照管中，分别加入盐水反应性抗D 抗体1 滴，在阳性对照管中加D 抗原阳性红细胞悬液，阴性对照管中加D 抗原阴性红细胞悬液各1 滴混匀，以3000r／min 离心15～20s，肉眼及显微镜下观察反应结果。

【结果判断】

如阳性对照管凝集，阴性对照管不凝集，受检管凝集，则表示受检红细胞上有相应抗原；受检管不凝集，则表示受检红细胞上没有相应抗原。用5 种Rh 抗血清检查可有18 种表型，结果判断见表2－2－3。

【注意事项】

1）若临床上只需检查受检者为阳性或阴性，那么只需用抗D 抗体1 种抗血清进行鉴别。如为阴性，应进一步用抗人球蛋白试验证实，以排除D^U（弱D）血型的可能。

2）Rh 抗原、抗体的凝集反应凝块比较疏松，观察结果时，不可用力振摇，只能轻轻转动试管。

3）Rh 阴性对照红细胞可通过正常人AB 型血清1 滴加5 %Rh 阳性红细胞悬液1 滴混匀，再与受检管一起离心后得到。

4）如鉴定结果只与抗D 抗体凝集，与抗C 抗体、抗c 抗体、抗E 抗体、抗e 抗体均不凝集，则受检标本为Rh 缺失型，以－D －表示。

二、D^U 血型鉴定

【原理】

D^U 是D 抗原的变异体，是一种弱的抗原。它与各批或数批抗D 抗体在盐水介质及酶试验中不发生凝集，但在间接抗人球蛋白试验中发生凝集。

【试剂】

1）抗D 抗体血清：不同生产厂家或批号的抗D 抗体血清3 ～5 批。

2）抗人球蛋白试剂。

3）受检者5 %红细胞悬液。

【操作】

1）将已定为Rh 阴性的受检者红细胞与抗D 抗体在37 ℃孵育30 ～60 min（应按抗D 抗体说明书提示的孵育时间孵育）。

2）用大量9g/L 氯化钠溶液洗涤红细胞3 次，留底层细胞。

3）加最适稀释度的抗人球蛋白试剂2 滴，充分混匀。

4）以3000r/min 离心15 ～20s，肉眼及显微镜下观察凝集反应。

【结果判断】

在间接抗人球蛋白试验中不凝集者，可确认为Rh 阴性。若发生凝集者，多为D^U（弱D）血型细胞。

【注意事项】

D^U 血型者经输注D 阳性红细胞后可产生抗D 抗体，因此如果患者血型为D^U，应视作Rh 阴性，需输入Rh 阴性血液。任何供血者被检出是D^U 后，应视作Rh 阳性，不能输给Rh 阴性血型患者。

三、其他血型鉴定

㈠ MN 血型鉴定

抗M 抗体、抗N 抗体可引起配血不合、输血反应及新生儿溶血病。临床上还常应用MN 血型观察输入体内的红细胞寿命。

【试剂】

抗M 抗体、抗N 抗体血清，受检者2 %红细胞悬液。

【操作】

1） 取干净玻片1 张，划成两等分，分别标明抗M 抗体及抗N 抗体字样。

2） 按标记分别加抗M 抗体和抗N 抗体各1 滴于两侧，再加受检红细胞各1 滴用玻棒混匀后，置室温20 min 后观察结果。

【结果判断】

手持玻片，轻轻转动数次，以肉眼观察结果，按表2 -2 -4 判断血型。

表2 -2 -4　MN 血型结果判断

血型	抗M 抗体	抗N 抗体
M 型	+	-
N 型	-	+
NM 型	+	+

注：+凝集，-不凝集

【注意事项】

抗M 抗体及抗N 抗体血清系由动物经免疫和再吸收后制得，故每次试验需作阳性对照和阴性对照，并严格掌握鉴定温度及时间。

㈡ P 血型鉴定

在人红细胞上可能存在P_1、P_2、P_1^K、P_2^K 和P5 种表型，其中以P_1、P_2 型为主，其他3 种极为少见。临床上一般用抗P_1 抗体血清将红细胞分为P_1 型和P_2 型两种。检查P 血型是为了排除一些由于抗P_1 抗体所致的配血不合。

【试剂】

抗P_1 抗体分型血清、受检者2 %红细胞悬液、已知P_1 和P_2 型2 %红细胞悬液。

【操作】

1） 取划有方格的白搪瓷板1 块，标明受检者和P_1、P_2 对照，各加抗P_1 抗体血清1 滴，按上述标记再分别加受检者、已知P_1 和P_2 细胞悬液1 滴，用玻棒分别混匀。

(2) 徐徐转动瓷板，置室温20min 观察结果。

【结果判定】

P_1 对照红细胞凝集，P_2 对照红细胞不凝集，受检者红细胞凝集为P_1 型，反之为P_2 型。

第四节　新生儿溶血病检测

新生儿溶血病是由母婴血型不合引起的被动同种免疫性疾病，可见于ABO、Rh、MN、Kell、Duffy 等血型系统。但以ABO、Rh 血型系统为多见。

一、ABO 血型新生儿溶血病血清学检查

ABO 血型新生儿溶血病是由于母体的IgG 型抗A (B) 抗体通过胎盘进入胎儿体内，与胎儿相应抗原的红细胞结合，引起胎儿以溶血为主的病理损害。多见于O 型产妇所生的A 型或B 型婴儿，由于母亲在怀孕ABO 血型不合的胎儿以前就可有高效价的IgG 型抗A (B) 抗体，所以ABO 血型新生儿溶血病往往发生在第1 胎。

【材料和试剂】

(1) 患婴抗凝及不抗凝血。

(2) 母亲及父亲凝固血。

(3) 广谱抗人球蛋白试剂。应用其最适稀释度的抗人球蛋白试剂。

(4) 经木瓜酶处理的5%O 型、A 型、B 型红细胞悬液。

【操作及原理】

1．患婴及其父母ABO 血型鉴定

这是检查新生儿溶血病的首要步骤。如母子ABO 血型不合 (母O 型、子A 型或B 型，母A 型、子B 型或AB 型，母B 型、子A 型或AB 型)，则对患婴进行以下3 项试验。

2．直接抗人球蛋白试验

(1) 将患婴红细胞用大量9g/L 氯化钠溶液洗涤3～4 次，制成2%红细胞悬液。

(2) 取小试管2 支，标明受检及对照，各加患婴2%红细胞悬液1 滴，然后在受检管中加广谱抗人球蛋白试剂1 滴，在对照管中加9g/L 氯化钠溶液1 滴，混匀后立即以3000r/min 离心15s，轻轻转动试管，用肉眼及显微镜观察结果。

(3) 镜下见有3～4 个红细胞凝集，并均匀分布在游离红细胞之间者为阳性，无凝集者为阴性。对照管应不凝集，如此管凝集，说明患婴红细胞本身有自凝现象，试验结

果无参考意义。

3．患婴红细胞抗体释放试验

(1) 患婴红细胞洗涤3 次，取红细胞约1ml 于试管中，然后加0.2ml22 %牛白蛋白(或AB 型血清或9g/L 氯化钠溶液) 混匀、加塞。横卧旋转试管，使红细胞覆盖在管壁上形成一薄层，然后，将试管横放在-6 ～-3 ℃冰箱中让其冻结 (至少10min)，取出放入37 ℃水浴中融化、离心，吸取上层含有红色的液体 (即释放液) 备用。

(2) 将释放液分成3 份，分别加入标有A 、B 、字样的小试管中，再按标记分别加入木瓜酶处理过的5 %O 型、A 型、B 型红细胞悬液1 滴，37 ℃水浴致敏1h ，取出后洗涤3 次倾去上清液，然后加入广谱抗人球蛋白试剂1 滴，以3000r/min 离心15s ，肉眼及显微镜观察结果。

(3) 结果判断见表2 -2 -5 。

表2 -2 -5　患婴红细胞抗体释放试验的意义

指示红细胞			意义
O 型	A 型	B 型	
-	+	-	释放出IgG 抗体A 抗体
-	-	+	释放出IgG 抗体B 抗体
-	+	+	释放出抗C 抗体 (交叉反应性抗体) 或同时释放出IgG 抗A 、B 抗体
-	-	-	未释放出抗体
+	不定	不定	释放出ABO 血型以外的抗体

4．患婴血清中游离抗体测定

(1) 取小试管3 支，标明O 、A 、B ，每支试管中加患婴血清2 ～4 滴，再分别加入相应的木瓜酶处理过的5 %O 型、A 型、B 型红细胞悬液1 滴，37 ℃致敏1h 。

(2) 若致敏后已发生凝集，说明存在相应抗体，可按表2 -2 -6 判断结果；若不凝集，则将红细胞洗3 次后加抗人球蛋白试剂1 滴，以3000r/min 离心15s ，肉眼及显微镜观察结果。

(3) 结果判断见表2 -2 -6 。

【注意事项】

木瓜酶处理红细胞的制备

1．木瓜酶间接液的配制

(1) 10g/L 木瓜酶液：木瓜酶粉1g 加9g/L 氯化钠溶液100ml，溶解后离心或过滤取上清液分装安瓿或小试管，冷藏备用。

(2) 0.1mol/L 磷酸氢二钠溶液：含12 分子结晶水磷酸氢二钠3.6g 加蒸馏水100ml 溶解配成，分装安瓿或小试管，冷藏备用。

表2－2－6　患婴血清中游离抗体测定的意义

指示红细胞			意义
O 型	A 型	B 型	
－	＋	－	游离的IgG 抗体A 抗体
－	－	＋	游离的IgG 抗体B 抗体
－	＋	＋	游离的C 抗体抗A、B 抗体或抗C 抗体（交叉反应性抗体）
－	－	－	无游离抗体
＋	不定	不定	释放出ABO 血型以外的抗体

注：＋ 凝集，－ 不凝集

(3) 激活剂：L－盐酸半胱氨酸0.2g，加9g/L 氯化钠溶液100ml 配成。

以上3 液临用时各取1 份，等量混匀。

2．酶处理红细胞

经3 次洗涤后取1 体积红细胞与1 体积木瓜酶间接液混合后，置37℃水浴孵育10min，再洗涤2～3 次，配成5％红细胞悬液，4℃可保存1 周。

二、Rh 血型新生儿溶血病血清学检查

母子Rh 血型不合是引起Rh 新生儿溶血病的原因。Rh 阴性女性与Rh 阳性男性婚配，他们的子女多为Rh 阳性。Rh 阴性者的血清中并无天然存在的Rh 抗体（偶见天然的抗E 抗体、抗C 抗体），必须经过免疫才能产生。第1 胎Rh 阳性胎儿在分娩时，其红细胞进入母体循环后，刺激母体产生Rh 抗体，对抗从父亲遗传而来的母体所缺乏的胎儿抗原。当第2 胎又怀Rh 阳性胎儿时，这种IgG 类的Rh 抗体可通过胎盘进入第2 胎胎儿体内，破坏其相应红细胞，引起以溶血为主的病理损害，所以Rh 血型新生儿溶血病往往发生于第2 胎。

【材料和试剂】

(1) 与ABO 血型新生儿溶血病血清学检查材料和试剂中的1、2、3 相同。

(2) 抗C 抗体、抗c 抗体、抗D 抗体、抗E 抗体、抗e 抗体血清。

(3) 配组红细胞。

(4) 氯仿。

【操作及原理】

1．产妇血清学检查

检查丈夫、产妇、患婴的ABO 和Rh 血型，如果丈夫、产妇或母子间的ABO 血型是相合的，则可直接以丈夫和患婴红细胞为对象，做盐水、酶或聚凝胺和抗人球蛋白3种试验，以检测产妇血清中有否针对其丈夫或患婴的不完全抗体。如有ABO 系统以外的不完全抗体，则应进一步用配组红细胞做盐水、酶或聚凝胺和抗人球蛋白试验来确定该抗体的特异性。抗体特异性检出后应检查产妇红细胞是否不存在与其相应的抗原以验证抗体的可靠性，并滴定抗体的效价；如在产妇血清中未找到针对其丈夫或婴儿的红细胞抗体，则应用配组红细胞来检测抗体，以确定特异性及效价，然后用与产妇血清凝集的配组红细胞来吸收产妇血清后的释放液，再与其丈夫（或婴儿）红细胞进行试验。如果该不完全抗体能凝集其丈夫（或婴儿）红细胞，则表示该抗体可以引起新生儿溶血病，否则表示该抗体与新生儿溶血病无关。

2．患婴血清学检查

下列3 项试验阳性，便可证实患婴红细胞被来自母亲IgG 的Rh 抗体所致敏。

(1) 直接抗人球蛋白试验（方法同ABO 血型新生儿溶血病血清学检查）。常呈强阳性。

(2) 释放试验（氯仿释放法）：①洗涤患婴红细胞3～6 次后取细胞；②1 体积红细胞加1 体积9g/L 氯化钠溶液；③加入2 体积的氯仿；④塞住塞子，用力摇动10s，然后反复颠倒，充分混匀1min，除去塞子，将试管放入56℃水浴5min，偶尔用玻棒搅拌；⑤3000r/min 离心5min 后出现明显3 层，顶层为血红蛋白色彩的释放液，中层为红细胞基质，底层含有氯仿；⑥将释放液用配组细胞检测其特异性。

(3) 游离抗体测定：用配组红细胞做盐水、酶或聚凝胺和间接抗人球蛋白试验，确定其特异性。由于从产妇通过胎盘而来的不相合IgG 抗体，可能大部分已被患婴红细胞吸附，因此游离在其血清中的抗体量常不多，甚至检测不到。因此Rh 血型新生儿溶血病血清学检查，常以直接抗人球蛋白和抗体释放这两项试验阳性即可确定。

3．患婴换血或输血时的交叉配合试验

患婴所具有的抗体都来自母亲，故换血或输血用的血液应与母亲血清不凝集。如母婴ABO 血型相合，患婴体内大部分抗体被其红细胞吸附，抗体总量总是低于母亲血清中的含量，所以可采用患婴母亲血清与供血者红细胞作主侧间接抗人球蛋白试验，如果

配合的话，也一定与患婴血清配合。如母婴ABO 血型不合，则可采用患婴红细胞释放液或血清 (最好不用，以防假阴性) 与供血者红细胞作间接抗人球蛋白试验。

在次侧配血中，因患婴红细胞上已有不完全抗体致敏，所以进行不完全抗体配血法时，这种被抗体致敏的红细胞可发生凝集。因此直接抗人球蛋白试验呈阳性的患婴红细胞与供血者血清发生凝集时，不作配血禁忌，只要主侧相合即可换血或输血。

【注意事项】

1) 放标本的试管应清洁干燥，防止标本溶血。

2) 采取产妇不抗凝血5ml，丈夫抗凝血1ml，患婴不抗凝血4ml、抗凝血1ml。

第五节　交叉配血

交叉配血试验也称不配合性试验，是安全输血绝对必要的。输血前检查受血者血清中有无能破坏供血者红细胞的抗体 (称主侧交叉配血) 和供血者血清中有无能破坏受血者红细胞的抗体 (称次侧配血)。如受血者 (供血者) 血清中没有检到使供血者 (受血者) 红细胞破坏的抗体，称“交叉配血相合”，反之称为“交叉配血不合”。因此交叉配血试验是检验受血者或供血者任何一方是否有对抗对方红细胞的抗体。其目的是尽可能确保任何一位受血者接受了供血者的血液后，不引起有害反应。交叉配血试验根据抗体的类型、反应的温度以及反应的介质各异，而实行不同的方法。本节介绍盐水介质配血法、木瓜酶配血法、凝聚胺配血法、间接抗人球蛋白配血法以及低离子强度盐溶液间接抗人球蛋白配血法。近年推出的微柱凝胶间接抗人球蛋白配血法可参考厂方提供的配套试剂器材说明书进行操作。

一、盐水介质配血法

【原理】

以盐水为介质，作主侧和次侧配血试验，可以检出完全抗体。

【试剂】

受检者血清及2%红细胞悬液、供血者血清及2%红细胞悬液、9g/L 氯化钠溶液。

【操作】

1) 取洁净小试管2 支，分别标明主侧管 (受血者血清＋供血者红细胞)、次侧管 (受血者红细胞＋供血者血清)。

2) 在主侧管中加受血者血清2 滴和供血者2%红细胞悬液1 滴，次侧管中加供血者血清2 滴和受血者2%红细胞悬液1 滴。

3）离心1min 或3000r/min 离心15～20s，肉眼及显微镜观察结果。

【结果判断】

ABO 同型配血，主、次侧管均无凝集及溶血，表示配血相合，无输血禁忌，可以输血。

【注意事项】

1）配血时，如发现有溶血现象，排除试管因素后，即表示配血不合，切勿误为不凝集。

2）冬季室温较低，应将试管保温或提高室温以防冷凝集素干扰。

3）盐水介质配血只能发现完全抗体，若结果为阴性，可将原标本接着做木瓜酶、聚凝胺、抗人球蛋白配血法，以检出不完全抗体。

二、木瓜酶配血法

【原理】

同盐水介质配血法，用以检出不完全抗体。

【试剂】

1）10g/L 木瓜酶液：木瓜酶1g 溶于100ml pH 为5.3 的磷酸盐缓冲液（0.067mol/L 磷酸氢二钠3ml，加0.067mol/L 磷酸二氢钾97ml）中滤过，小剂量分装，冻存。

2）受血者血清及2%红细胞悬液。

3）供血者血清及2%红细胞悬液。

【操作】

1）取小试管2 支，分别标明主侧管、次侧管。

2）于主侧管中加受血者血清2 滴、供血者2%红细胞悬液及10g/L 木瓜酶液各1滴；次侧管中加供血者血清2 滴、受血者2%红细胞悬液及10g/L 木瓜酶液各1 滴混匀，置37℃水浴30min，后用常用台式小离心机以1000r/min 离心1min 或3000r/min 离心15～20s，肉眼及显微镜观察结果。

3）阳性对照：已知IgG 型抗D 抗体血清1 滴，加2%Rh 阳性红细胞悬液及10g/L 木瓜酶液各1 滴，与（2）同时进行试验。

4）阴性对照：AB 型血清1 滴，加2%Rh（0）阳性红细胞悬液及10g/L 酶液各1滴，与（2）同时进行试验。

【结果判断】

阳性对照阳性，阴性对照阴性，主侧管、次侧管无溶血及凝集，表示配血相合。

【注意事项】

木瓜酶能破坏MN、Ss、FY^b、Xg^a 等血型抗原，且可能产生非特异性凝集，因此本

法不能测定所有的抗体，但可作为一种参比方法。

三、凝聚胺配血法

【原理】

凝聚胺（polybrene）是一种多价阳离子溴化已二甲胺多聚物，具有中和肝素的作用，溶解后产生许多正电荷，能中和红细胞表面唾液酸所带的负电荷，使红细胞的Zeta电位降低，诱发红细胞产生可逆的非特异性凝聚。此时若有IgG抗体存在，它与红细胞直接搭桥，当非特异性凝聚被再悬液驱散后，只有抗原、抗体引起搭桥的特异性凝集依然存在。

【试剂】

1）低离子介质葡萄糖25g，EDTA钠盐1g，加蒸馏水至500ml。

2）0.5g/L聚凝胺溶液：聚凝胶（polybrene）5g，加入50ml 9g/L氯化钠溶液中，成为贮存液。临用时用9g/L氯化钠溶液稀释20倍。

3）再悬液：0.2mol/L枸橼酸三钠溶液60ml与50g/L葡萄糖溶液40ml混合即成。

4）受血者、供血者血清和2%红细胞悬液。

【操作】

1）取洁净小试管2支，分别标明主、次侧管。

2）于主侧管中加受血者血清2滴和供血者2%红细胞悬液1滴，次侧管中加供血者血清2滴和受血者2%红细胞悬液1滴。

3）每管中各加低离子介质0.6ml，混匀，在室温中孵育1min。

4）每管中各加0.5g/L聚凝胺溶液2滴，混匀，在室温中孵育15s。

5）以3000r/min离心10s，弃去上清液。

6）轻摇试管，目测红细胞有无凝集现象，如没有凝集，必须重做。

7）在每管中各加2滴再悬液，轻轻转动试管，肉眼及显微镜观察结果。

【结果判断】

同盐水介质配血法。

【注意事项】

1）加再悬液后，应轻轻转动试管，不可过猛，并应立即读取结果（包括镜下观察），最迟也不要超过3min，以防弱凝集迅速消散，导致假阴性结果。

2）聚凝胺是抗肝素药物，如受血者（供血者）血液中含有肝素，试验时应多加数滴聚凝胺试剂。

3）为保证聚凝胺的功效，3种试剂要按顺序加入，在未加入低离子介质前不要先加聚凝胺。

4）本法对IgG 型Rh 抗体最敏感，但对抗K 抗体不够敏感。

5）本法操作时不能混有神经氨酸酶或水解蛋白酶。

四、间接抗人球蛋白配血法

【原理】

同盐水介质配血法，用以检出不完全抗体。

【试剂】

广谱抗人球蛋白血清、不完全抗D 抗体血清、受血者血清及2％红细胞悬液、供血者血清及2％红细胞悬液、2％Rh 阳性红细胞悬液、AB 型血清。

【操作】

1）取试管2 支，分别标明主、次侧管。

主侧管加受血者血清2 滴和供血者2％红细胞悬液1 滴，次侧管加供血者血清2 滴和受血者2％红细胞悬液1 滴。

2）混匀，置37℃水浴中孵育45～60min，取出试管后，用大量9g/L 氯化钠溶液洗涤红细胞3 次，倾去上清液，管口用滤纸或纱布吸干，加最适稀释度的抗人球蛋白血清2 滴。

3）混匀，以3000r/min 离心15～20s 后用肉眼及显微镜观察结果。

4）阳性对照是不完全抗D 抗体血清加2％Rh 阳性红细胞悬液；阴性对照是AB 型血清加2％Rh 阳性红细胞悬液，余按（2）、（3）进行。

【结果判断】

同盐水介质配血法。

【注意事项】

对试验结果阴性者，应再加不完全抗D 抗体致敏的红细胞悬液1 滴于试管中，离心后如无凝集，则表示结果不可靠应重做；如有凝集，说明抗人球蛋白血清存在，结果有效。

五、低离子强度盐溶液间接抗人球蛋白配血法

【原理】

降低介质的离子强度，可以增加抗原与大多数抗体的摄人率（增加引力），加速反应速度，因而能减少孵育时间。在配血试验中，本法有两种不同的方法：一种是直接以低离子强度盐溶液（LISS）配制红细胞悬液，称为LISS 配制法；另一种是将LISS 加到血清与红细胞悬液的混合液中，称为LISS 追加法。

【试剂】

1）同间接抗人球蛋白配血法试剂（1）～（6）。

1）LISS 溶液：氯化钠1.75g 和甘氨酸18g 置1L 容量瓶内，加磷酸盐缓冲液（0.15mol/L 磷酸二氢钾11.3ml 和0.15mol/L 磷酸氢二钠8.7ml 混合）20ml，加蒸馏水至1L，用1mol/L 氢氧化钠溶液调pH 至6.7，加叠氮钠0.5g 防腐。

1.LISS 配制红细胞悬液法

【操作】

1）用9g/L 氯化钠溶液洗供血者和受血者红细胞3 次，再用LISS 洗涤1 次，用LISS 配成3%红细胞悬液。

2）取试管2 支，分别标明主、次侧管。主侧加等量的受血者血清和供血者3%LISS 红细胞悬液，次侧加等量的受血者3%LISS 红细胞悬液和供血者血清。

3）置37℃水浴孵育15min，取出试管，观察有无溶血及凝集现象，记录结果。

4）用大量9g/L 氯化钠溶液洗红细胞3 次，倒尽末次洗液，加最适稀释度的抗人球蛋白血清2 滴。

5）混匀，以3000r/min 离心15～20s，用肉眼及显微镜观察结果。

【结果判断】

同盐水介质配血法。

2.LISS 追加法

【操作】

1）取试管2 支，标明主、次侧管。主侧管加受血者血清3 滴和供血者2%红细胞悬液1 滴，次侧管加受血者2%红细胞悬液1 滴和供血者血清3 滴。

2）在主、次侧管中各加LISS 溶液3 滴混匀。

3）余按LISS 配制红细胞悬液法的（3）～（5）步骤进行。

【结果判断】

同盐水介质配血法。

第六节　成分输血

一、概述

成分输血是用物理的或化学的方法分离全血，将全血制备成各种较浓和较纯的血制品以供临床输用。血液成分分离制备的方法目前有两种，一种是手工制备，另一种是用血细胞分离机从单一供血者采集高度浓缩的某种成分，而将其他成分输回给供血者。目前国内外已经把成分输血的比例作为一个国家或地区输血技术是否先进的标志，同时根

据临床是否输用适宜成分作为衡量临床医师水平的标准之一。

成分输血之所以能够迅速发展，在于其较全血输注有很多的优越性。第一，治疗效果显著。成分输血的原则是确定患者缺什么成分就补充什么成分。将全血中的某种成分分离、纯化得到高浓度且便于保存和运输的血液制品，把多个献血者的同一种血液成分混合成为一个有效的治疗剂量，输注给缺乏这种成分的患者，可得到很好的治疗效果。第二，成分输血可以降低输血反应。目前已知的各种血细胞及血浆蛋白抗原系统繁多而复杂，全世界50 多亿人中除同卵双胎外，几乎没有完全同型者，因此全血输注引起的同种免疫概率很高，容易导致各种免疫性输血反应。第三，成分输血可以一血多用，节省血源。

20 世纪90 年代后，随着成分输血技术的发展，临床上开展了外周血和脐血造血干细胞的提取、保存、移植和继承性免疫治疗及利用生物工程技术制备各种血液成分等工作。血浆置换术、细胞置换术和细胞成分单采减除术等也是成分输血技术的延伸与发展。

二、各种血液成分及其临床应用

㈠ 红细胞

1．浓缩红细胞

定义：200㎖ 全血经静置自然沉淀24h 以上，或经离心去除大部分血浆为1 单位(国际上一般以450㎖ 全血为1 个单位，我国将200㎖ 全血定为1 个单位) 浓缩红细胞，血细胞比容0.75 。采用三联袋分离制备的浓缩红细胞保存期同全血。

功能：提供携氧能力和增加血容量。

适应证：适用于治疗血容量正常仅需要增加携氧能力和红细胞数量的患者。如慢性贫血患者、贫血伴心、肝、肾病患者等。

禁忌证：药物引起的贫血、凝血因子缺乏。

输注剂量：同全血。

2．红细胞悬液

定义：200㎖ 全血经静置自然沉淀24h 以上，或经离心去除血浆，再加入50㎖ 红细胞保养液即为1 单位红细胞悬液。血细胞比容 (HCT) 60 %±5 %。采用三联袋分离制备的红细胞悬液保存期同全血。

功能：提高携氧能力和增加血容量。

适应证：贫血患者，当用来换血时，应使用7d 内的红细胞悬液。

禁忌证：同浓缩红细胞。

输注剂量：同全血。

3．少白细胞红细胞

定义：在浓缩红细胞或红细胞悬液的基础上去除了白膜层或使用白细胞滤器滤除了白细胞而成。血细胞比容同浓缩红细胞或红细胞悬液，白细胞数≤2.5 ×10^8 或≤2.5 ×10^6。用三联袋制备者保存期同全血，打开密闭系统后应在24h 内使用。

功能：增加携氧能力及血容量，减少输血不良反应（非溶血性发热输血反应）的发生。

适应证：曾经有过两次或两次以上输血发热反应患者；也可作为巨细胞病毒感染阴性的红细胞使用。

禁忌证：同浓缩红细胞。

输注剂量：同全血。

4．洗涤红细胞

定义：全血经离心去除血浆和白膜层，再用无菌9g/L 氯化钠溶液洗涤红细胞3～6次，最后加50ml 9g/L 氯化钠溶液制成。血细胞比容在0.70～0.80。在24h 内使用。

功能：增加携氧能力及血容量，减少输血不良反应的发生。

适应证：已有红细胞、血小板抗体者，有输血过敏反应者，自身免疫性溶血性贫血、阵发性睡眠性血红蛋白尿患者及器官移植受者。

禁忌证：无绝对禁忌证。

输注剂量：输注1 单位洗涤红细胞可增加血红蛋白3.5g/L。

5．去甘油解冻细胞

定义：常为采血后6d 内的全血加入甘油（冰冻保护剂）而成，冻存在－80℃可长达10 年。使用前先解冻，用9g/L 氯化钠溶液洗涤，去掉甘油，最后加入9g/L 氯化钠溶液50ml 即可。血细胞比容通常为0.70～0.80。应在24h 内使用。

功能：增加携氧能力及血容量。

适应证：多用于稀有血型患者、自身输血等。

禁忌证：无绝对禁忌证。

输注剂量：同洗涤红细胞。

6．照射红细胞

定义：所有类型的红细胞经血液辐射仪（放射源可为Cs 或Co）照射后即为照射红细胞。其中的T 淋巴细胞已失活。

功能：同红细胞。

适应证：免疫功能低下、器官移植患者，主要预防移植物抗宿主病发生。

禁忌证：无绝对禁忌证。

输注剂量：同红细胞。

7．年轻红细胞

定义：利用细胞分离机采用间断或连续流动分离制成，主要由年龄较轻的红细胞（包括网织红细胞）组成。每单位年轻红细胞（由400ml全血制成）血红蛋白含量在40g以上，网织红细胞计数比分离前的全血增加1倍以上，半存活期为（45.2±8.2）d［成熟红细胞为（34.8±5.4）d］。

功能：增加携氧能力及补充血容量，对长期依赖输血者可延长输血间隔，减少肝脏铁累积，延迟或阻止血色病的发生。

适应证：需要长期输注红细胞的慢性贫血患者，如珠蛋白生成障碍性贫血、慢性再生障碍性贫血等。

禁忌证：无绝对禁忌证。

输注剂量：同红细胞。

（二）白细胞

1．浓缩白细胞

定义：由200ml全血经离心后，取白膜层即为1单位浓缩白细胞，总容量约为18～22ml，相当于全血中60%以上的粒细胞，粒细胞总数约为0.5×10^{9}。

功能：增加机体抗感染能力。

适应证：粒细胞计数低于500/μl，骨髓功能可望恢复、粒细胞能控制的感染（由革兰阴性菌所致）、抗生素治疗无效者。

禁忌证：骨髓功能异常且不能恢复者、巨细胞病毒感染患者。

输注剂量：每天输注20单位，连续输注3～6d。

2．机采粒细胞

定义：利用细胞分离机从单一献血员分离出1×10^{10}粒细胞（容积200ml），同时含有20～40ml红细胞及血小板（约1.0×10^{11}～3.0×10^{11}）。（22±2）℃静置保存24h，应尽早输注。

功能：同浓缩白细胞。

适应证：同浓缩白细胞。

禁忌证：同浓缩白细胞。

输注剂量：同浓缩白细胞。

㈢ 血小板

1．机采血小板

定义：利用血细胞分离机从单一献血员采集出2.5 ×10^{11}～5.0 ×10^{11}血小板，容量150～350㎖。22～24 ℃振荡保存于血小板孵箱1～5d。

功能：止血、提升血小板数。

适应证：

⑴ 原发性和继发性骨髓功能低下，如急性髓细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、化疗患者、自体/异体骨髓移植或造血干细胞移植、再生障碍性贫血、全骨髓衰竭、骨髓增生异常综合征。

⑵ 非出血患者如高白细胞白血病，特别是急性髓细胞白血病或慢性粒细胞白血病急变；血小板计数急剧下降；发热；黏膜出血；伴有组织分解或坏死的感染；合并弥散性血管内凝血以及血小板减少的患者做侵入性检查或手术时。

禁忌证：与血小板减少无关的出血、特发性血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜患者。

输注剂量：血小板有效输注量＝要增加的血小板数量（×10^{9}/L）×该患者的循环血量（L）×1.5（1.5为常数）。

2．浓缩血小板

定义：200㎖全血通过离心可分离得到2.5 ×10^{10}血小板，即为1单位浓缩血小板。置22～24 ℃振荡保存24h，当天输注。

功能：同机采血小板。

适应证：同机采血小板。

禁忌证：同机采血小板。

输注剂量：同机采血小板。

3．少白细胞血小板

定义：通过某些型号的血细胞分离机或白细胞滤器使机采血小板中的白细胞数＜5 ×10^{8}（预防非溶血性发热输血反应）或＜5 ×10^{6}（预防巨细胞病毒感染或人白细胞抗原同种免疫）。余同机采血小板。

功能：同机采血小板。

适应证：同机采血小板。

禁忌证：同机采血小板。

输注剂量：同机采血小板。

4．辐照血小板

定义：血小板制品经过Cs 或Co 辐照后即为辐照血小板。其中T 淋巴细胞已灭活。余同机采血小板。

功能：同机采血小板。

适应证：特别适用于免疫功能不全或免疫损害、供受者有血缘关系需输注血小板以及人白细胞抗原选择性血小板或已知人白细胞抗原纯合子血小板的受血者。

禁忌证：同机采血小板。

输注剂量：同机采血小板。

㈣ 血浆

1．新鲜冰冻血浆

定义：全血采集后6h 内分离制备后冻成的血浆。－20 ℃可保存1 年。含全血中全部血浆蛋白和凝血因子，包括不稳定的凝血因子Ⅷ和凝血因子Ⅴ。

功能：参与正常凝血作用、补充血浆蛋白。

适应证：各种凝血因子缺乏、维生素K 缺乏、血浆转换、特发性血小板减少性紫癜等。

禁忌证：已知对新鲜冰冻血浆有过敏反应者、易发生循环超负荷者等。

输注剂量：1㎖ 新鲜冰冻血浆中含1 单位的凝血因子，70kg 体重患者输注200㎖ 新鲜冰冻血浆可提高其7 %的凝血因子水平。一般可输注5 ～10㎖/kg 体重。

2．普通冰冻血浆

定义：全血在保存期内分离制备后冻成的血浆，－20 ℃可保存5 年。含全血中的血浆蛋白和稳定的凝血因子，缺乏不稳定的凝血因子。

功能：同新鲜冰冻血浆。

适应证：除因子Ⅷ缺乏外的其他凝血因子缺乏。

禁忌证：同新鲜冰冻血浆及因子Ⅷ缺乏的患者。

输注剂量：同新鲜冰冻血浆。

㈤ 血浆衍生物

1．冷沉淀

定义：从新鲜冰冻血浆在1 ～6 ℃融化后得到的不溶解部分，含有凝血因子Ⅶ和Ⅷ、纤维蛋白原、血管性血友病因子、纤维蛋白原。

功能：参与止血。

适应证：血友病甲、血管性血友病、凝血因子Ⅷ缺乏、纤维蛋白原缺乏患者。

禁忌证：除上述适应外的情况。

输注剂量：200ml 新鲜冰冻血浆融化后可得冷沉淀内的因子Ⅷ凝血活性（Ⅷ：C）80～100 单位。

2．凝血因子Ⅷ

3．白蛋白

4．免疫球蛋白

第七节　输血不良反应和输血相关疾病

输血是临床治疗的重要组成部分，是抢救伤病员和防治疾病的主要手段之一。但输血也可引起不良反应，甚至是非常严重的不良反应；也可传播某些疾病，甚至是危害极其严重的传染病。因此，预防输血不良反应和输血相关性疾病，是临床医师和输血医学工作者的重要研究课题和使命。

一、输血不良反应的分类

㈠ 按发生时间分

1） 即刻反应：发生在输血过程中或输血后24h 内。

2） 迟发反应：发生在输血后数天～6 个月。

㈡ 按发生原因分

1．免疫性反应

红细胞、白细胞、血小板、血浆蛋白的同种异型抗原抗体反应。

2．非免疫性反应

1） 血管系统负荷过量。

2） 电解质紊乱。

3） 代谢性酸中毒。

4） 出血倾向。

5） 血色病。

㈢ 按发生后主要临床表现分

1） 发热反应。

2）变态反应。

3）细菌污染反应。

4）溶血反应。

5）肺水肿。

6）空气栓塞。

二、常见输血反应

㈠ 发热反应

发热反应可见于多种输血反应中，并且很可能是细菌污染或急性溶血性输血反应的首发症状。发热由于补体激活或一些细胞溶解，导致内源性致热原释放而引起。

症状与体征：发热、寒战（发热往往先于寒战）。

处理方法：停止输血、保持静脉通路、给予解热镇痛药如阿司匹林（用于非血小板减少症患者）、对乙酰氨基酚（退热净）、非甾体类抗炎药物。

㈡ 变态反应

变态反应由输入的可溶性血浆蛋白导致抗原抗体反应引起。临床症状与体征可以是局部皮肤表现（如荨麻疹、瘙痒，有时伴轻微发热）或全身变态反应（如支气管痉挛水肿）。反应轻微并局限者，在处理后症状和体征改善可继续输血。

对反应严重者，应立即停止输血，并保持静脉通路通畅，同时给予补液、复苏和肾上腺素/甾体类药物治疗。如果需要进一步输血，应选用洗涤血细胞制品。

㈢ 溶血反应

指输入的红细胞（少数情况下为受血者红细胞）在受血者体内发生异常破坏，血红蛋白逸出而导致的溶血反应，可分急性和迟发性两种。

1．急性溶血反应

多见于误输ABO 血型不合的血液；也可见于抗A（B）凝集素效价过高的O 型血液输给A 型、B 型、AB 型受血者，致受血者红细胞破坏；短时间内输入多个血型不相同的献血者的血或输血前红细胞已受到破坏者。

症状与体征：多在输血后10～30min 出现各种症状。典型症状为明显的寒战、腰背疼痛、头痛、发热、面潮红、心悸、胸痛、四肢酸痛、恶心、呕吐、腹痛、呼吸困难、紫绀、血红蛋白尿、血压下降、尿少、尿闭。严重者可出现休克、弥散性血管内凝血、急性肾功能衰竭。手术过程中常表现为伤口广泛渗血、出血不止和血压下降。

处理方法：立即停止输血；维持静脉输液；抗休克处理；抗过敏；予类固醇激素类药物；防止肾功能衰竭；防止弥散性血管内凝血。

2．迟发性溶血反应

多发生在Rh 或其他稀有血型不合输血，也可发生在器官移植时（因接受大量淋巴细胞，其产生抗体可致溶血）。

症状与体征：发热、寒战、腰痛、创面渗血、少尿、黄疸、贫血等。

处理方法：同急性溶血反应。

㈣ 细菌污染反应

贮存血中细菌污染比较罕见，但接受输血者后果严重。细菌污染血液的原因如下：静脉穿刺部位消毒不严、成分制备操作或处理过程中细菌污染、供者存在隐性菌血症。

症状与体征：寒战、高热、头痛、呕吐、面部潮红、皮肤黏膜充血、烦躁不安、大汗、呼吸困难、干咳，严重者可出现休克、弥散性血管内凝血、肾功能衰竭等。手术者可有血压下降、尿少、创面渗血不止等体征。

处理方法：立即停止输血，维持静脉输液，保持水、电解质平衡；抗感染治疗应尽早、足量给予广谱抗生素，选用敏感抗生素，慎用有损肾功能的药物；支持治疗如予新鲜血浆、丙种球蛋白、转移因子等。抗休克、防止弥散性血管内凝血及肾功能衰竭同急性溶血反应的处理。

三、常见输血并发症

㈠ 大量输血所致并发症

1．循环超负荷

见于大量输血或受血者心功能不全（老年人、儿童、原有心肺功能不全、严重贫血、低蛋白血症、大面积肺炎）、输血速度过快等。

症状与体征：输血中或输血后1h 内患者突然心率加快、心音变弱、烦躁不安、端坐呼吸、头痛、头胀、极度恐惧感、发绀、皮肤湿冷、大汗淋漓、咯粉红色泡沫样痰，双肺满布哮鸣音及湿啰音，颈静脉怒张，少数出现心律失常、昏厥、休克，严重者短时间内死亡。

处理方法：立即停止输血、输液；置患者于坐位或半卧位；呼气末正压给氧；强心、扩容；利尿；镇静；抗支气管痉挛；减少回心血量；止血带轮流结扎四肢等。

2．出血倾向

见于输入大量库存血液（其血小板数量及质量下降、枸橼酸过多进入体内）后。

症状与体征：手术创面或伤口渗血不止、胃肠道黏膜出血、皮肤紫癜，麻醉时患者出现原因不明的出血。

处理方法：补充新鲜血液、血浆、浓缩血小板、纤维蛋白原。发生弥散性血管内凝血者可用肝素。

3．枸橼酸盐中毒及低钙血症

症状与体征：血压下降、手足抽搐，心电图显示Q－T 间期延长、心律紊乱，甚至出现心室颤动、停搏。

处理方法：停止或减慢输血，适量补钙。

4．高钾血症

凡有肾功能不全、急性尿毒症、溶血性贫血、大面积肌肉损伤、无尿患者，当输入陈旧血液时，易发生高钾血症。

症状与体征：皮肤苍白、四肢湿冷、疲乏、软弱无力、手足感觉异常、肌肉酸痛、动作反应迟钝、嗜睡、神志模糊、声音嘶哑、呼吸肌麻痹、脉搏缓慢、心音远弱、心律失常。心电图显示T 波高耸，QRS 波群及P－R 间期增宽延长，P 波低宽或消失，房室传导阻滞等。

处理方法：终止输血，或输新鲜血；抗心律失常；增加血钠含量，使钾转移到细胞内；必要时进行透析疗法。

5．低钾血症

贮存血中失钾的红细胞输人体内、库血中产生碳酸氢纳，使大量血钾进入细胞内，均可降低血钾含量。

症状与体征：四肢无力、眼睑下垂、软瘫、腹胀、甚至烦躁不安、嗜睡、神志不清、心律紊乱、心力衰竭甚至死亡。

处理方法：纠正碱中毒，适量补钾。

6．高氨血症

肝功能不全或肝功能衰竭患者，大量、快速输入保存期太久的血液时，可导致血氨增高，患者可能出现精神淡漠或性格改变。对这些患者避免输用保存期太久的血液，尽量用浓缩红细胞或新鲜血。

7．低温

快速、大量输入未经加温的冷藏血，可使受血者体温降低，并可能发生代谢性酸中毒、低钙血症、甚至心律紊乱、心跳骤停。对临床抢救者需以100㎖/㎜in 速度输入3000㎖ 以上冷藏血、新生儿溶血病换血治疗时应采用血液加温处理。可使用一次性热交换器或使输血管通过38 ℃温水进行加温后再进入受血者血循环。

8．肺微栓塞

血液贮存1 周后，白细胞、血小板和纤维蛋白形成20～80 μm 的微聚物，不能被孔径170 μm 的标准输血器滤过。大量输血时，过多微聚物循环到肺，可引起肺微栓塞，以致出现支气管痉挛、充血性肺水肿、低氧血症、呼吸衰竭。大量输血时应选用去白膜的红细胞、洗涤红细胞或较新鲜的血液。

㈡ 反复多次输血所致并发症

1．输血后紫癜

较罕见，多发生在妇女，一般于输血后1 周左右发生。因受血者有血小板特异性抗体（抗PI^{A1}抗体），与献血者的PI^{A1}阳性血小板反应，形成抗原抗体复合物，附着于受血者血小板后，使其被吞噬破坏，导致血小板减少，出现寒战、高热、皮肤黏膜点状或斑状出血，重者可有呕血、便血、尿血、头痛、呼吸困难、休克。可进行血浆置换，也可应用肾上腺皮质激素、大剂量免疫球蛋白。

2．含铁血黄素沉着症和血色病

慢性贫血者长期多次输血，大量铁不断进入体内并贮积于肝脏所致。可用皮下注射铁整合剂（desferrioxamine）治疗。

3．移植物抗宿主病

严重免疫抑制、淋巴细胞减少症、骨髓抑制者输血后有发生移植物抗宿主病的危险，临床表现包括发热、皮疹、肝功能损害、腹泻、骨髓抑制、严重感染，最后可导致死亡。输血前用Ce、Cs 或Co 辐射仪对血液及其成分进行照射（照射剂量15～30Gy），以使淋巴细胞灭活，可较为有效地预防移植物抗宿主病的发生。

4．非心源性肺水肿

因反复多次输入血清免疫球蛋白、配型不合的白细胞和血小板后而发生的抗原抗体反应所致。临床表现非常严重，有典型的急性肺水肿症状与体征。发生反应时应立即停止输血，并给氧、利尿，应用抗组胺药物或肾上腺皮质激素。

㈢ 其他并发症

1．输血相关性急性肺损害

临床特点为明显呼吸窘迫、缺氧、低血压、发热和肺水肿，常于输血时或输血后4h 内发生。应停止输血、缓慢用9g/L 氯化钠溶液保持静脉通路、对症处理肺水肿和低氧血症，给氧、机械呼吸机正压通气，如液体量太多可利尿、ICU 监护直至肺泡间液体被吸收。

2．皮下血肿

因穿刺不当引起。应立即改换输血通路，局部冷敷（不超过24h）、手臂抬高。

3．局部感染

因无菌操作不严所致。应予局部抗感染，严重者伴全身症状时应用抗生素。

4．空气栓塞

多由于操作不当致空气进入静脉引起。主要表现为输血过程中患者突然胸痛、呼吸困难、咳嗽、发绀、血压下降、脉搏细快，乃至抽搐、晕厥、休克、急性呼吸衰竭甚至死亡。应立即停止输血，迅速将患者置头低足高左侧卧位，予吸氧及强心、镇静等处理。

5．血栓性静脉炎

输血输液时间过长，针头或导管刺激外周血管引起静脉发硬呈索条状，局部疼痛、发红、发热、淋巴结肿胀。可予局部消炎及抗生素治疗。

四、输血传播的疾病

通过输血传播的疾病主要有艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎、梅毒、疟疾、巨细胞病毒、成人T 淋巴细胞白血病和弓形体病等。

第八节　临床用血管理

一、机构

《医疗机构临床用血管理办法（试行）》对临床用血审批程序、用血指征、自身储血／输血条件、应急用血条件等作了明确规定。

《临床输血技术规范》严格规定了输血申请和血液的核对、储存、发放，明确了各类输血适应证和临床输血指南，对临床医生和输血医技人员正确应用临床输血技术和血液保护技术起到了极大的指导作用。

医疗卫生机构应当设立由医院领导、业务主管部门及相关科室负责人组成的临床输血管理委员会，负责临床用血的规范管理、技术指导和质量管理，开展临床合理用血、科学用血的教育和培训。

医疗卫生机构的医务部门负责具体落实院长和临床输血管理委员会所制定的有关输血的规章制度，并对执行情况予以监管，同时对实践中出现的情况进行分析，提出有关方案，并提交院长和临床输血管理委员会审定。

二级以上医疗机构应当设立独立的输血科（血库），在临床输血管理委员会的领导下，负责本单位临床用血的计划申报，负责临床用血的技术指导和技术实施，对临床用血制度执行情况进行检查，参与临床有关疾病的诊断、治疗与科研，确保贮血、配血和合理、科学用血措施的实施，杜绝浪费和滥用血液。

临床输血管理委员会指定的委员会成员专门负责临床用血的全面质量管理，对医疗机构执行有关临床用血的法律法规和内部制定的规章制度、操作规程进行监督，及时提出改进意见，确保输血安全。

二、计划用血、贮血

医疗机构临床用血应当遵循合理、科学的原则制定用血计划。输血科（血库）根据本医疗机构临床用血量，合理制订月、周临床用血计划，并提前报县级以上卫生行政部门指定的属地采供血机构，以便采供血机构动员、安排血液的采集、检验和分离。

输血科（血库）应根据不同的血液品种、血型、规格、采血日期（或有效期）贮备本医疗机构的临床用血量。不同时间采集贮备血液比例为1 周内≥67 %，1 ～2 周≤25 %，2 周以上≤8 %。

三、临床输血医学文书

同种异体血液的输注客观上存在输血不良反应的可能，况且由于检测试剂和病毒检测窗口期等的原因，输血传播疾病的危险也客观存在。所以医务人员必须切实做好与临床输血相关的医学文书工作。

1．《临床输血申请单》

申请输血应由经治医师逐项填写《临床输血申请单》，由主治医师核准签字。

2．《输血治疗同意书》

决定输血前，经治医师应当向患者或患者家属说明输注同种异体血液的目的、不良反应和经血液传播疾病的可能性，征得患者或家属同意，并在《输血治疗同意书》上签字。无家属签字的无自主意识患者的紧急输血，应报医院职能部门或主管领导同意，备案并记人病历。

3．《临床输血会诊单》

根据临床用血的管理规范，建立临床输血会诊制度。临床输血一次用血、备血超过2000㎖ 和医疗机构认为需要临床输血会诊的，须实行输血会诊制度。由经治医师提出并填写输血会诊单，由输血科医师会诊。会诊内容包括是否具备输血适应证，应该输注的血液成分、用血量、时间和注意事项等。

4．《输血不良反应回报单》

医务人员对输血不良反应应逐项填写《输血不良反应回报单》，输血科定期进行统计分析。

5．《输血记录单》

输血完毕后，医务人员将《输血记录单》填写完整并归入病历。

6．病历记录

医务人员应在病历记录中反映患者输血前后的情况。

临床用血的医学文书种类和基本格式由省级卫生行政部门制定，各医疗单位结合实际情况确定相应文书格式并加入单位识别名称。

临床用血的医学文书中，临床输血申请单》、《输血不良反应回报单》由输血科（血库）存档，与输血科（血库）的出入库、检验等有关资料一起保存10 年。其余随病历保存。

附录：部分与输血相关的法令、法规及办法

●《中华人民共和国献血法》

1997 年12 月29 日第八届全国人民代表大会常务委员会第二十九次会议通过

1997 年12 月29 日中华人民共和国主席令第九十三号公布　　自1998 年10 月1 日起施行

（全文略）

●卫生部《医疗机构临床用血管理办法（试行）》

卫生部卫医发【999】第06 号

第一条　根据《中华人民共和国献血法》第十六条规定，制定本办法。

第二条　本办法所称临床用血包括使用全血和成分血。

医疗机构不得使用原料血浆，除批准的科研项目外，不得直接使用脐带血。

第三条　县级以上人民政府卫生行政部门负责对所辖医疗机构临床用血的监督管理。

第四条　医疗机构临床用血应当遵照合理、科学的原则，制定用血计划，不得浪费

和滥用血液。

医疗机构临床用血，由县级以上人民政府卫生行政部门指定的血站供给。医疗机构开展的患者自身储血、自体输血除外。

第五条　医疗卫生机构应当设立由医院领导、业务主管部门及相关科室负责人组成的临床输血管理委员会，负责临床用血的规范管理和技术指导，开展临床合理用血、科学用血的教育和培训。

第六条　二级以上医疗机构设立输血科（血库），在本院临床输血管理委员会领导下，负责本单位临床用血的计划申报、储存血液，对本单位临床用血制度执行情况进行检查，并参与临床有关疾病的诊断、治疗与科研。

第七条　医疗机构要指定医务人员负责血液的收发工作，要认真核查血袋包装。核查内容如下：

（一）血站的名称及其许可证号；

（二）献血者的姓名（或条形码）、血型；

（三）血液品种；

（四）采血日期及时间；

（五）有效期及时间；

（六）血袋编号（或条形码）；

（七）储存条件。

血液包装不符合国家规定的卫生标准和要求应拒领、拒收。

第八条　医疗机构对验收合格的血液，应当认真作好入库登记，按不同品种、血型、规格和采血日期（或有效期），分别存放于专用冷藏设施内储存。经办人要签名和签署入库时间。禁止接受不合格血液入库。

第九条　医疗机构的储血设施应当保证完好，全血、红细胞、代浆血冷藏温度应当控制在2～6 ℃，血小板应当控制在20～24 ℃（6h 内输注），储血保管人员应当作好血液冷藏温度的24h 监测记录。储血环境应当符合卫生学标准。

第十条　医疗机构的医务人员应当严格执行《临床输血技术规范》。

《临床输血技术规范》由卫生行政部门另行制定。

第十一条　凡患者血红蛋白低于100g/L 和血细胞比容低于30％的属输血适应证。患者病情需要输血治疗时，经治医师应当根据医院规定履行申报手续，由上级医师核准签字后报输血科（血库）。

临床输血一次用血、备血量超过2000ml 时要履行报批手续，需经输血科（血库）医师会诊，由科室主任签名后报医务处（科）批准（急诊用血除外）。

急诊用血后应当按照以上要求补办手续。

第十二条　经治医师给患者实行输血治疗前，应当向患者或其家属告之输血目的、可能发生的输血反应和经血液途径感染疾病的可能性，由医患双方共同签署用血志愿书或输血治疗同意书。

第十三条　医疗机构的临床科室应当有专人持配血单（卡）领取临床用血。领血时，按本办法第七条规定，认真核查，不符合要求的应当拒绝领用。

输血科（血库）发血时，应当认真检查领血单（卡）的填写项目，合格后方可发血。未按第十一条规定办理申报手续的不得发血。

第十四条　医疗机构临床科室的医务人员给患者输血前，应当认真检查血袋标签记录，经核对血型、品种、规格及采血时间（有效期）。无误后，方可进行输血治疗，并将输血情况详细记人病历。

第十五条　对平诊患者和择期手术患者，经治医师应当动员患者自身储血、自体输血，或者动员患者亲友献血。

医疗机构要把上述工作情况作为评价医生个人工作业绩的重要考核内容。

自身储血、自体输血由在治医疗机构采集血液。

第十六条　医疗机构应针对医疗实际需要积极推行血液成分输血。医疗机构临床成分输血比例应当达到卫生部规定的要求。

第十七条　医疗机构临床所需成分血品种，由省级以上人民政府卫生行政部门批准的血站负责制备和供给。

第十八条　医疗机构科研用血由所在省、自治区、直辖市人民政府卫生行政部门负责审批。

第十九条　医疗机构因应急输血需要临时采集血液的，必须符合以下情况：

（一）边远地区的医疗机构和所在地无血站（或中心血库）；

（二）危及病人生命，急需输血，而其他医疗措施所不能替代；

（三）具备交叉配血及快速诊断方法检验乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒抗体、艾滋病病毒抗体的条件。

医疗机构应当在临时采集后10 日内将情况报告当地县级以上人民政府卫生行政主管部门。

第二十条　医疗机构临床用血的医学文书资料随病历保存，临床用血的医学文书种类和格式由各省、自治区、直辖市人民政府卫生行政部门制定。

第二十一条　医疗机构临床用血违反本办法规定的，由县级以上人民政府卫生行政部门依照有关法律、法规给予行政处罚；对直接责任人，由医疗机构及其上级行政主管部门酌情给予处分，情节严重，构成犯罪的，依法追究刑事责任。

第二十二条　本办法自发布之日起施行。

●卫生部《临床输血技术规范》

卫生部卫医发〔2000〕第184号

第一章　总　　则

第一条　为了规范、指导医疗机构科学、合理用血，根据《中华人民共和国献血法》和《医疗机构临床用血管理办法》（试行）制定本规范。

第二条　血液资源必须加以保护、合理应用，避免浪费，杜绝不必要的输血。

第三条　临床医师和输血医技人员应严格掌握输血适应证，正确应用成熟的临床输血技术和血液保护技术，包括成分输血和自体输血等。

第四条　二级以上医院应设置独立的输血科（血库）负责临床用血的技术指导和技术实施，确保贮血、配血和其他科学、合理用血措施的执行。

第二章　输血申请

第五条　申请输血应由经治医师逐项填写《临床输血申请单》，由主治医师核准签字，连同受血者血样于预定输血日期前送交输血科（血库）备血。

第六条　决定输血治疗前，经治医师应向患者或其家属说明输同种异体血的不良反应和经血传播疾病的可能性，征得患者或家属的同意，并在《输血治疗同意书》上签字。《输血治疗同意书》入病历。无家属签字的无自主意识患者的紧急输血，应报医院职能部门或主管领导同意、备案，并记入病历。

第七条　术前自身贮血由输血科（血库）负责采血和贮血，经治医师负责输血过程的医疗监护。手术室内的自身输血包括急性等容性血液稀释、术野自身血回输及术中控制性低血压等医疗技术由麻醉科医师负责调配合格血液。

第八条　亲友互助献血由经治医师等对患者家属进行动员，在输血科（血库）填写登记表，到血站或卫生行政部门批准的采血点（室）无偿献血，由血站进行血液的初、复检，并负责调配合格血液。

第九条　患者治疗性血液成分去除、血浆置换等，由经治医师申请，输血科（血库）或有关科室参加制定治疗方案并负责实施，由输血科（血库）和经治医师负责患者治疗过程的监护。

第十条　对于Rh（D）阴性及其他稀有血型患者，应采用自身输血、同型输血或配合型输血。

第十一条　新生儿溶血病如需要换血疗法的，由经治医师申请，经主治医师核准，并经患儿家属或监护人签字同意，由血站和医院输血科（血库）提供合适的血液，换血由经治医师和输血科（血库）人员共同实施。

第三章　受血者血样采集与送检

第十二条　确定输血后，医护人员持输血申请单和贴好标签的试管，当面核对患者姓名、性别、年龄、病案（历）号、病室/门急诊、床号、血型和诊断，采集血样。

第十三条　由医务人员或专门人员将受血者血样和输血申请单送交输血科（血库），双方进行逐项核对。

第四章　交叉配血

第十四条　受血者配血试验的血标本必须是输血前3 天之内。

第十五条　输血科（血库）要逐项核对输血申请单、受血者和供血者血样，复查受血者和供血者ABO 血型（正、反定型），并常规检查患者Rh（D）血型［急诊抢救患者紧急输血时Rh（D）血型检查可除外］，正确无误时可进行交叉配血。

第十六条　凡输注全血、浓缩红细胞、红细胞悬液、洗涤红细胞、冰冻红细胞、手工分离浓缩血小板等患者，应进行交叉配血试验。机器单采浓缩血小板应ABO 血型同型输注。

第十七条　凡遇有下列情况必须按《全国临床检验操作规程》有关规定作抗体筛选试验：交叉配血不合时；对有输血史、妊娠史或短期内需要接受多次输血者。

第十八条　两人值班时，交叉配血试验由两人互相核对；一人值班时，操作完毕后自己复核，并填写配血试验结果。

第五章　血液入库、核对、贮存

第十九条　全血、血液成分入库前要认真核对验收。核对验收内容包括：运输条件、物理外观、血袋封闭及包装是否合格，标签填写是否清楚齐全（供血机构名称及其许可证号、供血者姓名或条形码编号和血型、血液品种、容量、采血日期、血液成分的制备日期及时间、有效期及时间、血袋编号/条形码、储存条件）等。

第二十条　输血科（血库）要认真做好血液出入库、核对、领发的登记，有关资料需保存10 年。

第二十一条　按A、B、O、AB 血型将全血、血液成分分别贮存于血库专用冰箱不同层内或不同专用冰箱内，并有明显的标识。

第二十二条　保存温度和保存期如下：

品种	保存温度	保存条件及保存期
1．浓缩红细胞	4（±2）℃	酸性枸橼酸盐葡萄糖保存液：21d
		枸橼酸盐磷酸性葡萄糖保存液：28d
		枸橼酸盐磷酸性葡萄糖腺苷保存液：35d
2．少白细胞红细胞	4（±2）℃	与受血者ABO 血型相同
3．红细胞悬液	4（±2）℃	同浓缩红细胞
4．洗涤红细胞	4（±2）℃	24h 内输注
5．冰冻红细胞	4（±2）℃	解冻后24h 内输注
6．手工分离浓缩血小板	22（±2）℃	24h（普通袋）
	（轻振荡）	或5d（专用袋制备）
7．机器单采浓缩血小板	22（±2）℃	24h（普通袋）
	（轻振荡）	或5d（专用袋制备）
8．机器单采浓缩红细胞悬液	22（±2）℃	24h 内输注
9．新鲜液体血浆	4（±2）℃	24h 内输注
10．新鲜冰冻血浆	－20 ℃以下	1 年
11．普通冰冻血浆（FP）	－20 ℃以下	4 年
12．冷沉淀	－20 ℃以下	1 年
13．全血	4（±2）℃	同浓缩红细胞
14．其他制剂按相应规定执行		

当贮血冰箱的温度自动控制记录和报警装置发出信号时，要立即检查原因，及时解决并记录。

第二十三条　贮血冰箱内严禁存放其他物品；每周消毒1 次；冰箱内空气培养每月1 次，无霉菌生长或培养皿（直径90mm）细菌生长菌落数＜8cfu/10min 或＜2000cfu/m^3 为合格。

第六章　发　　血

第二十四条　配血合格后，由医护人员到输血科（血库）取血。

第二十五条　取血与发血的双方必须共同查对患者姓名、性别、病案（历）号、门急诊/病室、床号、血型、血液有效期及配血试验结果，以及保存血的外观等，准确无误时，双方共同签字后方可发出。

第二十六条　凡血袋有下列情形之一的，一律不得发出：

1 标签破损、字迹不清；

2 血袋有破损、漏血；

3．血液中有明显凝块；

4．血浆中呈乳糜状或暗灰色；

5 血浆中有明显气泡、絮状物或粗大颗粒；

6 未摇动时血浆层与红细胞的界面不清或交界面上出现溶血；

7．红细胞层呈紫红色；

8 过期或其他须查证的情况。

第二十七条　血液发出后，受血者和供血者的血样保存于2～6 ℃冰箱至少7d，以便对输血不良反应追查原因。

第二十八条　血液发出后不得退回。

第七章　输　　血

第二十九条　输血前由两名医务人员核对交叉配血报告单及血袋标签各项内容，检查血袋有无破损渗漏，血液颜色是否正常。准确无误方可输血。

第三十条　输血时，由两名医务人员带病历共同到患者床旁核对患者姓名、性别、年龄、病案号、门急诊/病室、床号、血型等，确认与配血报告相符，再次核对血液后，用符合标准的输血器进行输血。

第三十一条　取回的血应尽快输用，不得自行贮血。输用前将血袋内的成分轻轻混匀，避免剧烈震荡。血液内不得加入其他药物，如需稀释只能用静脉注射用9g/L 氯化钠溶液。

第三十二条　输血前后用静脉注射用9g/L 氯化钠溶液冲洗输血管道。连续输用不同供血者的血液时，前一袋血输尽后，用静脉注射9g/L 氯化钠溶液冲洗输血器，再接下一袋血继续输注。

第三十三条　输血过程中应先慢后快，再根据病情和年龄调整输注速度，并严密观察受血者输血不良反应，如出现异常情况应及时处理：

1．减慢或停止输血，用静脉注射9g/L 氯化钠溶液维持静脉通路；

2．立即通知值班医师和输血科（血库）值班人员。及时检查、治疗和抢救，并查找原因，做好记录。

第三十四条　疑为溶血性或细菌污染性输血反应，应立即停止输血，用静脉注射9g/L 氯化钠溶液维护静脉通路，及时报告上级医师，在积极治疗抢救的同时，做以下核对检查：

1．核对用血申请单、血袋标签、

交叉配血试验记录；

2．核对受血者及供血者ABO 血型、Rh（D）血型。用保存于冰箱中的受血者与供血者血样、新采集的受血者血样、血袋中血样，重测ABO 血型、Rh（D）血型、不规则抗体筛选及交叉配血试验（包括盐水相和非盐水相试验）；

3．立即抽取受血者血液，加肝素抗凝剂，分离血浆，观察血浆颜色，测定血浆游离血红蛋白量；

4．立即抽取受血者血液，检测血清胆红素含量、血浆游离血红蛋白含量、血浆结合珠蛋白测定、直接抗人球蛋白试验并检测相关抗体效价，如发现特殊抗体，应作进一步鉴定；

5．如怀疑细菌污染性输血反应，抽取血袋中血液做细菌学检验；

6．尽早检测血常规及尿血红蛋白；

7．必要时，溶血反应发生后5～7h 测血清胆红素。

第三十五条　输血完毕，医护人员对有输血反应的应逐项填写患者输血反应回报单，并返还输血科（血库）保存。输血科（血库）每月统计上报医务处（科）。

第三十六条　输血完毕后，医务人员将输血记录单（交叉配血报告单）贴在病历中，并将血袋送回输血科（血库）至少保存1d。

第三十七条　本规范由卫生部负责解释。

第三十八条　本规范自2000 年10 月1 日起实施。

第三章　止凝血和抗凝血检验

机体的止血功能主要由血管、血小板参与，凝血功能主要由凝血因子参与，抗凝血功能主要由抗凝物质和纤溶系统参与。在正常生理情况下，血管具有抗血栓形成的作用。当凝血因子有少量被激活并形成纤维蛋白时，抗凝物质中和已活化的凝血因子，纤溶系统溶解纤维蛋白，使机体的止血、凝血与抗凝血处于平衡状态。这样，血液既不会溢出血管外导致出血，也不会在血管内凝固导致血栓形成。

止凝血和抗凝血的检验是临床检验中重要的内容之一，分为血管壁及内皮细胞的测定、血小板的测定、凝血因子的测定、抗凝物质的测定、纤溶系统的测定。为了保证实验数据的真实性，在实验方法学可靠的条件下，需注意以下几个方面。

1．抗凝剂的选择

止凝血和抗凝血检验中，一般项目测定所用的抗凝剂是109mmol/L 枸橼酸钠，使用时严格按9 ∶1 配比 （即9 份新鲜血加1 份抗凝剂）。若患者血细胞比容值＞0.55 或＜0.20 时，用Mac Gann 公式计算抗凝剂的用量：

抗凝剂用量 （ml） =0.00185 ×全血量 （ml） × （1 －血细胞比容值）

2．标本的采集

采血前患者应处于平静和空腹状态 （剧烈运动、情绪紧张及饱食油腻等会影响血小板、凝血因子及纤溶物质的测定），所用的采血器材应用塑料制品，止血带不应扎得过紧，结扎时间不宜过长 （一般不超过5min）。采血要顺利，采血后一般取1.8ml 血标本加入已含0.2ml 枸橼酸钠溶液的专用试管中，马上颠倒混匀3 次以上，使抗凝充分，得到合格的测定标本。

3．标本的处理

检查标本是否合格，是测定工作开始前非常重要的步骤。首先要检查标本与送检单是否相符，然后检查送检标本抗凝是否充分 （颠倒试管观察是否有血凝块），并检查抗凝血总量是否符合要求等。将合格的抗凝血标本，经3000r/min 离心20min 后，吸取中层1/3 血浆 （即贫血小板血浆） 用于常规项目的测定。溶血的血浆会引起血小板活化和凝血时间缩短。高脂血浆、高黄疸血浆也常影响实验结果。凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间等通常要在当天短时间内即进行测定，其他项目不能当天测定的，可分离血浆置－20 ℃保存。

4．自动血凝仪的选择

止凝血和抗凝血检验以前多用手工法操作，通过目测判断凝固时间，整个过程操作较繁琐，结果易受个人技术差异影响。近几年，自动化血凝仪不断更新，仪器自动化程度越来越高，功能更加完善。自动血凝仪具有使用方便、结果准确及重复性强等优点，逐步在我国得到普及。根据工作原理分为光电比浊法和电子机械法两大类，除用凝固通道测定凝血因子外，还可通过比色通道、免疫比浊通道测定抗凝物质、纤溶成分的活性和含量。各单位在选择血凝仪时要考虑实验室的具体情况、工作范围、操作者素质、售后服务等，以免造成不必要的浪费。所选用的试剂要与仪器相匹配。

以前，患者的术前止凝血功能测定是通过Duke 法出血时间测定一期止血功能，用玻片法或毛细管法全血凝固时间测定内源凝血系统的功能。卫生部卫医发［2000］412 文件要求：在2001 年12 月31 日前停止使用Duke 法进行出血时间测定；停止使用玻片法和毛细管法进行全血凝固时间测定。代之以活化部分凝血活酶时间或全血凝固时间（试管法）替代，但出血时间检验项目不废除。若临床上怀疑有血管壁或血小板功能异常所致的出血性疾病（如血管性血友病、单纯性紫癜、过敏性紫癜等）时，可采用出血时间测定器法测定出血时间。用活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间和血小板计数联合测定取代以前的出凝血时间测定。

第一节　血管及内皮细胞功能测定

血管的结构分为内皮细胞层、中膜层和外膜层。血管及内皮细胞在生理情况下主要具有抗血栓形成的作用，因为血管可以合成、分泌抗血栓形成的物质，如血栓调节蛋白、前列环素、抗凝血酶、ADP 酶、纤溶酶原激活剂等。血管及内皮细胞在病理情况下具有止血、促血栓形成的作用，因为血管也可以合成和分泌促血栓形成的物质，如内皮素、组织因子、血管性假血友病因子、纤溶酶原激活剂抑制物等。血管及内皮细胞还在纤溶、血小板及白细胞的生理功能方面，在动脉粥样硬化、炎症、免疫反应、肿瘤转移等病理过程中起着重要作用。

一、出血时间测定

机体的一期止血功能由血管和血小板参与完成。出血时间（bleeding time，BT）是反映机体一期止血功能的试验。测定方法有Duke 法、Ivy 法及BT 测定器法。Duke 法所造成伤口的长度、深度难以控制且不敏感；Ivy 法虽比Duke 法敏感，但操作繁琐、伤口难标准化且留有疤痕；而BT 测定器法所造成的伤口“标准”，且敏感、重复性好，是国

际上推荐使用的方法。故现已停止使用Duke 法，改用BT 测定器法替代。一般外科手术患者，BT 不作为常规检查项目。如临床上有出血史，怀疑有血管壁或血小板功能缺陷时，可做此项测定。

【原理】

用BT 测定器在前臂皮肤上造成一个“标准”的伤口后，记录血液自然流出至自然停止所需要的时间即为出血时间。它与血小板数量和功能、血管结构和功能有关，还与皮肤厚度、皮肤弹性、凝血因子等有关。

【器材】

1）血压计。

2）BT 测定器：分单刀片、双刀片弹簧装置，刀片宽6mm，刀刃深1mm。该装置上有一按钮，按下此按钮，可使刀片弹出划伤皮肤。

【操作】

1）将血压计袖带缚于上臂并加压。成人压力维持在5.3kPa（40mmHg），儿童压力维持在2.6kPa（20mmHg）。

2）在肘前窝下两横指处常规消毒皮肤后，轻轻绷紧皮肤，将BT 测定器自然贴于皮肤表面，然后按下测定器上的按钮并启动秒表。

3）每隔30s 用滤纸轻轻吸取流出的血液，直至出血停止按停秒表，秒表所记录的时间即为BT。

【注意事项】

1）BT 测定器所贴近的皮肤要温暖，应避开水肿、充血、溃疡、疤痕及血管。

2）BT 测定器刀片所造成的伤口，要与前臂平行。

3）伤口的血应自然流出，不能挤压，滤纸吸取血液时应避免与皮肤接触。

4）试验前1 周不能服用阿司匹林等药物。

【参考值】

2～9min。

【临床意义】

1）BT 延长：见于血小板、血管异常，如血小板减少症（血小板数少于5×10^9/L）、血小板增多症、血小板无力症、获得性血小板功能异常、血管性假血友病、遗传性出血性毛细血管扩张症等。还可见于凝血因子严重缺乏，如低（无）纤维蛋白原血症、凝血酶原缺乏症、弥散性血管内凝血等。

2）BT 缩短：见于某些严重的血栓形成性疾病及血栓前状态。

二、毛细血管脆性试验

毛细血管脆性试验（capillary fragility test，CFT）除与毛细血管本身结构、功能有关

外，还与血小板数量、功能有关，因为血小板能填充血管内皮细胞之间的空隙及内皮细胞脱落所形成的空隙，维持血管内皮细胞层的完整性。

【原理】

用血压计袖带给毛细血管在一定时间内施加一定负荷后，观察一定范围内皮肤出血点的多少来判断毛细血管的脆性。又称为束臂试验。

【器材】

血压计。

【操作】

(1) 在前臂屈侧肘弯下4cm 处，画一直径为5cm 的圆圈。

(2) 用血压计袖带缚于该侧上臂，先测定血压，然后使血压计的压力维持在收缩压和舒张压之间 [一般为12kPa (90mmHg)]，持续8min 后解除压力。

(3) 约2min 后观察圆圈内新的出血点数。

【注意事项】

(1) 试验前要在画的圆内检查有无出血点，如有要予以标记，以免与新的出血点混淆。

(2) 本试验较敏感，正常人大约8% (尤其是女性) 呈阳性。

【参考值】

阴性，即直径5cm 的圆圈内新出血点：男性<5 个，女性<10 个。直径5cm 的圆圈内新出血点超过上述范围为阳性。

【临床意义】

CFT 反映机体一期止血的功能。阳性见于血管、血小板有缺陷的患者，如血小板减少性紫癜、血小板增多症、血小板无力症、血管性假血友病、获得性血小板功能异常、遗传性出血性毛细血管扩张症、过敏性紫癜、单纯性紫癜等。

三、阿司匹林耐量试验

正常人体内血栓烷A_2 (TXA_2) 和前列环素 (PGI_2) 的代谢处于动态平衡之中。TXA_2 是血小板膜上的花生四烯酸在血小板环氧化酶、TXA_2 合成酶作用下形成的，具有收缩血管和促血小板聚集的作用；PGI_2 是血管内皮细胞膜上的花生四烯酸在血管内皮细胞环氧化酶、PGI_2 合成酶作用下形成的，具有与TXA_2 相反的作用 (即舒张血管和抑制血小板聚集)。当TXA_2 与PGI_2 的平衡严重失调时，可引起出血或血栓形成。阿司匹林耐量试验 (aspirin tolerance test，ATT) 就是观察TXA_2 与PGI_2 平衡失调后患者出血情况的一项试验。

【原理】

利用阿司匹林具有抑制血小板环氧化酶的作用，使TXA_2合成减少。血管、血小板有缺陷的患者服用阿司匹林后，TXA_2和PGI_2明显失平衡，导致血管扩张、血小板聚集受抑制，出血时间明显延长。故测定患者服用阿司匹林前、后的出血时间，有助于判断血管、血小板是否有缺陷。

【试剂与器材】

阿司匹林1～2片（0.3g／片）、出血时间测定所需的器材。

【操作】

1）服用阿司匹林前测定出血时间。

2）成人口服阿司匹林0.6g（6岁以下口服0.3g），同时饮水200ml。

3）服用阿司匹林后2h测定出血时间。如结果有疑问，可于4h后重复测定出血时间。

【注意事项】

1）对阿司匹林过敏、出血时间明显延长、出血症状明显者不宜做本试验。

2）作试验前1周，禁用阿司匹林类药物及其他影响出血时间的药物。

【参考值】

阴性，即服用阿司匹林后的出血时间比服药前延长不超过2min；超过者为阳性。

【临床意义】

ATT阳性的意义基本上同出血时间，但较出血时间敏感。临床上主要用于轻型血管性假血友病及血小板疾病的辅助诊断。

四、血浆血管性假血友病因子抗原检测

凝血因子Ⅷ由血管性假血友病因子（von Willebrand factor，vWF）和凝血因子Ⅷ促凝活性（FⅧ：C）组成。WF是FⅧ：C的载体，具有稳定FⅧ：C的作用。vWF还参与血小板粘附和聚集。vWF由血管内皮细胞合成并储存在W－P小体内。当内皮细胞受损后，血中vWF含量会增加，故它是血管内皮细胞损伤的测定指标之一。但巨核细胞也可合成vWF（血中20％的vWF来源于血小板），故其特异性不高。测定方法有免疫比浊法、ELISA法、火箭电泳法等。本节介绍免疫比浊法。

【原理】

在待测标本（或一系列不同浓度的vWF标准液）中，加入足量的抗人vWF抗体，标本（或标准液）中的vWF与抗人vWF抗体结合形成抗原－抗体复合物，使反应液的浊度增加，浊度的高低与标本中的vWF含量呈正比。根据标准曲线可得出待测标本的vWF含量。

【试剂与器材】

vWF 抗血清、WF 标准品、109mmol/L 枸橼酸钠溶液、分光光度计。

【操作】

1）制作标准曲线（详见试剂盒说明书）。

2）标本测定：取待检血浆25μl，加vWF 抗血清1.0ml，置37℃中水浴15min 后，在340nm 处测定吸光度（以v WF 抗血清调零）。

3）根据标准曲线，得出待检标本的检测结果。

【注意事项】

1）当标本浊度过高时，应调整标本的稀释度。

2）脂浊、黄疸及轻度溶血对检测结果影响较小。

3）可采用自动血凝仪进行检测。

【参考值】

0.6～1.5（60%～150%）。

【临床意义】

1）血液中VWF 含量增高：WF 在血管内皮细胞损伤及许多应激情况下均增加。如血管病变（如糖尿病伴血管病变、周围血管病变），血栓形成性疾病（如心肌梗死、脑梗死），肾脏疾病（如肾小球疾病、肾病综合征、尿毒症），还有心绞痛、肺部疾病、肝脏疾病、急性白血病、妊娠高血压综合征、大手术后、剧烈运动后等等。

2）血液中vWF 含量减低：见于血管性假血友病，WF 是血管性假血友病诊断及分型的重要指标。

五、去甲基-6-酮-前列腺素F_{1a}检测

前列环素（PGI_2）是血管内皮细胞膜上花生四烯酸的代谢产物，它有活性但不稳定，可进一步形成较稳定、无活性的6-酮-前列腺素F_{1a}（6-K-PGF_{1a}），6-K-PGF_{1a}经肝脏氧化酶作用形成去甲基-6-酮-前列腺素F_{1a}（DM-6-K-PGF_{1a}）。故测定6-K-PGF_{1a}或DM-6-K-PGF_{1a}含量可反映体内PGI_2生成情况，是血管内皮细胞激活、损伤的分子标志物之一。由于DM-6-K-PGF_{1a}检测不受操作、体外因素的影响，因此能更准确地反映体内的真实情况。6-k-PGF_{1a}的检测方法有ELISA 法、放射免疫法，DM-6-K-PGF_{1a}的检测方法有ELISA 法。本节介绍ELISA 法DM-6-K-PGF_{1a}检测。

【原理】

将抗人DM-6-K-PGF_{1a}抗体包被在酶标板上，加入待测标本（或不同浓度的标准液）和酶标的DM-6-K-PGF_{1a}，两者竞争性地与板上的DM-6-K-PGF_{1a}抗体结合，酶标板经洗涤后，加底物显色，显色深浅与DM-6-K-PGF_{1a}含量呈反比，根据标准曲

线可得出待测标本的DM－6－K－PGF_{1a}。含量。

【试剂与器材】

1）DM－6－K－PGF_{1a}试剂盒（ELISA 法）：包被抗人DM－6－K－$PGFF_{1a}$抗体的酶标板、稀释液、洗涤液、酶标的抗人DM－6－K－PGF_{1a}抗体、DM－6－K－PGF_{1a}标准品等。

2）酶标仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【参考值】

（6.5±67.）ng/L。

【临床意义】

DM－6－K－PGF_{1a}含量异常见于冠心病、动脉粥样硬化、心肌梗死、脑血管病变、糖尿病等血栓前状态和血栓形成性疾病。疾病早期DM－6－K－PGF_{1a}。浓度可能增加，后期血管受损时DM－6－K－PGF_{1a}浓度常减少。

六、血栓调节蛋白检测

血栓调节蛋白（thrombomoduline，TM）又称为凝血酶调节蛋白，是凝血酶的受体。它由血管内皮细胞合成，位于内皮细胞膜表面，并与凝血酶结合形成复合物，从而使蛋白C 活化。TM 与蛋白C、蛋白S、活化蛋白C 抑制物组成蛋白C 系统，起抗凝作用。当内皮细胞损伤时，TM 脱落，血液中TM 含量增加，故血液中TM 可作为血管内皮细胞损伤的检测指标之一。检测方法有IRMA 法或发色底物法。本节介绍IRMA 法。

【原理】

将抗人TM 抗体包被在放免小杯上，加入待测标本（或不同浓度的标准品），标本中的TM 与杯上的抗人TM 抗体特异性结合，再加入I－抗人TM 抗体，测定杯中I 放射性，结合标准曲线计算出标本中的TM。

【试剂与器材】

1）TM 试剂盒（RMA 法）：包被抗人TM 抗体的小杯、稀释液、洗涤液、I－抗人TM 抗体、TM 标准品等。

2）γ－计数仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【参考值】

20～35 μg/L。

【临床意义】

血液中TM 含量增加主要见于存在血管内皮细胞损伤的血栓前状态和血栓形成性疾病，如弥散性血管内凝血、糖尿病、血栓性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、急性心肌梗死、脑梗死、肺梗死、急性白血病等。

七、内皮素－1 检测

内皮素（endothelin，ET）是迄今为止发现的收缩血管作用最强的物质。它有3 种不同的亚型，分别命名为ET－1、ET－2、ET－3，它们的生物学活性基本相似，但以ET－1 作用最强。ET－1 由内皮细胞合成并释放，当血管内皮细胞受损伤时，血中含量增加。因此ET－1 是血管内皮细胞损伤的分子标志物之一。检测方法有RIA、ELISA 法。本节介绍ELISA 法。

【原理】

将兔抗人ET 抗体包被在酶标板上，分别加入待测标本（或不同浓度的标准品）和酶标记的ET，两者竞争性地与包被在板上的兔抗人ET 抗体特异性结合，酶标板经洗涤后加底物显色，显色深浅与ET 含量呈反比。根据标准曲线可得出待测标本中的ET 含量。

【试剂与器材】

1）ET 试剂盒（ELISA 法）：包被兔抗人ET 抗体的酶标板、稀释液、洗涤液、酶标记的抗人ET 抗体、ET 标准品等。

2）酶标仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【参考值】

≤8ng/L。

【临床意义】

血液中ET－1 含量增加主要见于存在血管内皮细胞损伤的血栓前状态和血栓形成性疾病，如高血压病、动脉粥样硬化、肾脏疾病、冠心病、心绞痛、心肌梗死、脑梗死、系统性红斑狼疮、糖尿病伴血管病变、妊娠高血压综合征、急性白血病等。

第二节　血小板功能测定

血小板是血液中最小的细胞，其超微结构包括表面结构、骨架系统与收缩系统、特

殊膜系统、细胞器与内含物。血小板主要参与机体的止血过程，具有粘附功能、聚集功能、释放功能和收缩血块、促进血液凝固作用。此外，血小板还参与炎症、免疫反应及维持血管内皮细胞完整性的功能。

一、血小板粘附试验

血小板与非血小板表面的粘着称为血小板粘附。在体内，参与粘附的因素有血小板、血管性假血友病因子（vWF）及暴露的内皮下组织（胶原、基底膜、微纤维）。血小板膜上含有GPⅠb／Ⅸ复合物，它是vWF的受体。在体外，血小板可粘附于带负电的异物表面如玻璃、白陶土等，根据所使用玻璃器材不同，将血小板粘附试验（platelet adherence test，PAdT）分为玻璃珠柱法、旋转玻球法及玻璃漏斗法。

【原理】

将离体的新鲜全血置玻璃珠柱或玻璃漏斗或旋转的玻璃球中，同玻璃接触一定时间后，计数接触前、接触后血液中的血小板数，得出血小板粘附率。玻璃珠柱法和玻璃漏斗法还与血小板聚集功能有关，因为粘附之后聚集随之发生，并被阻留在柱和漏斗中，故有人称之为血小板滞留试验。

【试剂与器材】

玻璃珠柱或特制的玻璃漏斗或血小板粘附仪、血小板计数器材、109mmol／L枸橼酸钠溶液（旋转玻球法）或EDTA－二钠（玻璃漏斗法）。

【操作】

1．玻璃珠柱法

1）将针头及塑料针筒分别连接于玻璃珠柱两端的塑料管上。玻璃珠柱上有标线将其分为4段。

2）肘静脉常规消毒后行静脉穿刺。当血液接触玻璃珠时启动秒表，血液通过玻柱上每一段时间为5s，共20s。再以同样的速度抽血，当血液充满塑料管时，即可将针头从肘静脉中拔出。

3）取下针头、针筒后分别取玻璃珠柱后、前塑料管中的血作血小板计数。

4）计算血小板粘附率：血小板粘附率（%）＝

$$\frac{\text{粘附前血小板数}-\text{粘附后血小板计数}}{\text{粘附前血小板数}}\times 100$$

2．旋转玻球法

1）用塑料针筒静脉采血2.7ml，置于含有109mmol／L枸橼酸钠0.3ml的塑料试管中轻轻地混匀。

2）即刻取血1.5ml置于12ml的球形玻璃瓶中，将瓶固定于血小板粘附仪的转盘

上，以3r/min 的速度转动15min。

3）从球形瓶和试管中分别取血1ml（即粘附后血、粘附前血）置于两个大试管中，然后各加109mmol/L 枸橼酸钠19ml，颠倒混匀3 次，室温静置2h。

4）取上清液的中层标本，加入血小板计数板中直接计数。

5）计算血小板粘附率（同玻璃珠柱法）。

3．玻璃漏斗法

1）用塑料针筒静脉采血1.5ml。

2）即刻将血滴入玻璃滤器内，将滤过后的最初4 滴血收集在含0.5mgEDTA－二钠的试管中混匀，计数血小板数（即为粘附后血小板数）。

3）取针筒中剩余的血4 滴，收集在含0.5mgEDTA－二钠的试管中混匀，计数血小板数（即为粘附前血小板数）。

4）计算血小板粘附率（同玻璃珠柱法）。

【参考值】

玻璃珠柱法：62.5％±8.6％；玻璃漏斗法：31.9％±10.9％；旋转玻球法（12ml玻瓶）：男性34.9％±6.0％；女性39.4％±5.2％。

【注意事项】

1）严格控制血液与玻璃的接触时间，因为时间过长血小板粘附率上升，反之下降。

2）采血要顺利，避免混入气泡或形成凝块。

3）试验过程中所用的玻璃用品应硅化或用塑料制品。

4）每一份血的血小板计数应做双份，取其平均值。

5）粘附试验易受许多因素影响，故每一步均应严格按要求操作。

6）玻璃珠柱法操作前应检查各连接口及抽血器材气道是否通畅；玻璃珠柱用前应放置干燥器中，因受潮后血小板粘附率下降；玻璃珠柱为一次性用具，用后即丢弃。

【临床意义】

1）血小板粘附率增高：见于血栓前状态和血栓形成性疾病。如高血压病、糖尿病、妊娠高血压综合征、肾小球肾炎、肾病综合征、心脏瓣膜置换术后、心绞痛、心肌梗死、脑梗死、深静脉血栓形成等。

2）血小板粘附率减低：先天性和继发性血小板功能异常（以后者多见），如血管性假血友病、巨大血小板综合征、爱－唐综合征、肝硬化、尿毒症、服用阿司匹林等药物。

二、血小板聚集试验

在诱导剂等作用下，血小板之间相互粘着称为聚集，参与聚集的因素有血小板、纤维蛋白原、钙离子。血小板上含有GP Ⅱb／Ⅲa，它是纤维蛋白原的受体。血小板的聚集分为两种类型①初发聚集（又称为第一相聚集）：一般指由外源性诱导剂所诱导的聚集反应，在一定条件下可以解聚（即是可逆的）；②次发聚集（又称为第二相聚集）：指由血小板释放出的内源性诱导剂所诱导的聚集反应，此反应是不可逆的。血小板聚集试验（platelet agglutination test，PAgT）的测定方法为免疫比浊法（即血小板聚集仪法）。血小板聚集仪有单通道、双通道、四通道。

【原理】

在含有富血小板血浆的比浊管中加入诱导剂，仪器自动搅拌，随着血小板聚集的发生其透光度逐渐增高，记录仪自动记录血小板透光度的变化（即血小板聚集曲线）。通过血小板聚集曲线可分析血小板的聚集功能。血小板聚集曲线常有双峰，第一峰反映了血小板聚集功能，第二峰反映了血小板的释放和聚集功能。

【试剂与器材】

1）血小板聚集仪：主要由比浊系统、恒温装置、微型搅拌器及自动记录仪4部分组成。

2）血小板计数器材。

3）wren缓冲液（OBS）：将巴比妥钠1.155g和氯化钠1.467g溶于156ml的蒸馏水中，加0.1mol／L盐酸43ml，调整pH为7.35，再加9g／L氯化钠溶液880ml。OBS用以配制诱导剂。

4）109mmol／L枸橼酸钠溶液。

5）常用的诱导剂：11.2μmol／L ADP溶液，5.4μmol／L肾上腺素溶液，20mg／L花生四烯酸溶液，1.5g／LL瑞斯托霉素溶液，20mg／L胶原溶液（用9g／L氯化钠溶液配制）。

【操作】

1）开启自动血小板聚集仪，预温30min。

2）用塑料注射器从静脉顺利采血，置塑料的试管中，并以9∶1（即9份血加1份枸橼酸钠液）抗凝，颠倒混匀。

3）将抗凝血以800r／min离心10min后，取出上层血浆即为富血小板血浆；然后将试管以3000r／min继续离心20min后，取出上层血浆即为贫血小板血浆。

4）取一定量（国产聚集仪一般为270μl）的贫血小板血浆、富血小板血浆分别加置比浊管内，将贫血小板血浆、富血小板血浆比浊管置聚集仪测定孔中，分别将透光度调节为90、10。

5）在富血小板血浆中加入磁性搅拌棒，置37 ℃预温3 min。

6）开启自动记录仪的走纸开关，记录富血小板血浆基线30s；然后在富血小板血浆中加入1/10 体积的诱导剂，走纸6～10 min 后关闭记录开关。

7）根据血小板聚集曲线计算结果。按O'Brien 计算法计算出血小板最大聚集率、5 min 有效解聚率、坡度*，分析血小板聚集曲线（见图2－3－1）。下面公式中的h_1 为最大的透光度时距富血小板血浆基线的高度，h_2 为加入诱导剂后5 min 时的透光度距富

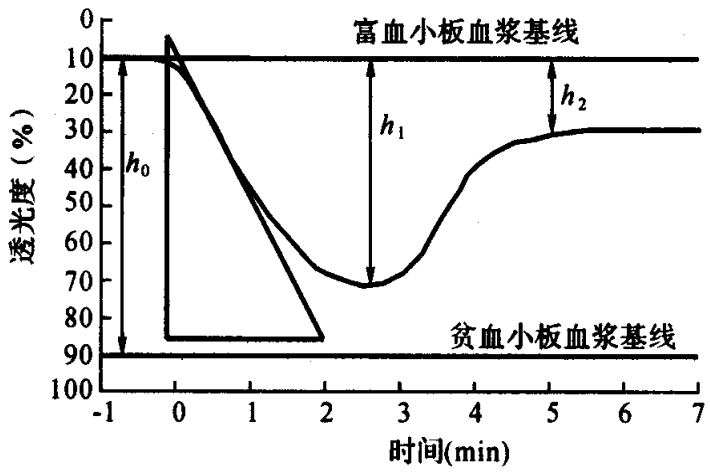


图2－3－1　血小板聚集曲线的参数分析

血小板血浆基线的高度，h_0 为富血小板血浆基线与贫血小板血浆基线的高度。

$$\text{血小板最大聚集率}=\frac{h_1}{h_0}\times 100\ \%$$

$$\text{5 min 有效解聚率}=\frac{h_1-h_2}{h_1}\times 100\ \%$$

[注意事项]

1）采血要顺利，以避免组织液混入引起血小板聚集。

2）采血前8h 内禁止吸烟，采血前1 周禁用影响血小板聚集的药物如阿司匹林、潘生丁、维脑路通等。

3）采血后3h 内完成测定，但制取富血小板血浆后30 min 内不应进行测定，因为此时血小板反应性差。

4）标本应置15～25 ℃室温中，不可置冰箱中，因低温可使血小板激活。

5）标本血浆的pH 值以6.5～8.5 为佳，否则血小板聚集受抑制或消失。

6）标本采集、测定过程中所用的玻璃器材应涂硅或用塑料器材，以免激活血小板。

7）不宜使用EDTA－二钠抗凝。

8）标本脂类过多或红细胞混入等因素可使血浆透光度下降，影响血小板聚集试验结果。

9）贫血小板血浆、富血小板血浆中的血小板要进行计数。贫血小板血浆中的血小

板数应少于10 ×10^9/L，并用贫血小板血浆调节富血小板血浆中血小板数至250 ×10^9/L。

(10) 诱导剂的浓度要准确，并注意保存。ADP 易分解为AMP，故要在-40 ℃保存。肾上腺素要避光保存。瑞斯托霉素溶液可反复冻融。胶原液可置4 ℃保存1 周。

(11) 测定血小板聚集功能的试验还有循环中血小板聚集体和体外自发性血小板聚集测定。前者利用甲醛固定循环中的血小板聚集体，而在EDTA 溶液中的血小板则解聚，比较两者的血小板数，即可得知体内血小板聚集情况。后者可利用富血小板血浆在血小板聚集仪中测定聚集率，但不加致聚剂，其聚集机制与血小板内源性ADP 释放有关。

【参考值】

各实验室应根据自己的实验条件建立自己的参考值，根据具体情况及实验结果调节诱导剂的浓度。各种诱导剂所测得的血小板最大聚集率：11.2 μmol/L ADP 溶液：(70 ±17)%，5.4 μmol/L 肾上腺素溶液：(65 ±20)%，20 mg/L 花生四烯酸溶液：(69 ±3)%，1.5g/L 瑞斯托霉素溶液：(67 ±9)%，20 mg/L 胶原溶液：(60 ±13)%。

【临床意义】

(1) 血小板聚集率增高：见于血栓前状态和血栓形成性疾病。如糖尿病、肾小球肾炎、肾病综合征、心脏瓣膜置换术后、心绞痛、心肌梗死、脑梗死、深静脉血栓形成、抗原－抗体复合物反应、高脂饮食、口服避孕药、吸烟等。

(2) 血小板聚集率减低：血小板无力症、巨大血小板综合征、低或无纤维蛋白原血症、肝硬化、尿毒症、服用阿司匹林等药物。

三、血浆β-血小板球蛋白和血小板因子4 检测

β-血小板球蛋白 (β-thromboglobulin，β-TG) 和血小板因子4 (platelet factor4，PF_4) 是血小板特有的两种蛋白质，存在于血小板α颗粒中。当血小板被激活时，这两种物质被释放至血中，故测定血浆中这两种蛋白质的含量可得知血小板在体内被激活的情况。但由于血小板离开机体后易活化，使血中这两种蛋白质检测结果偏高，故临床上β-TG 和PF_4 测定已较少采用。测定方法有放射免疫法、ELISA 法。本节介绍ELISA 法。

【原理】

将β-TG 抗体包被在酶标板上，加入待测标本 (或不同浓度的标准液)，其中的β-TG 与板上的β-TG 抗体结合，酶标板经洗涤后再加酶标抗体，最后加底物显色，显色深浅与β-TG 含量呈正比，根据标准曲线可得出待测标本的β-TG 含量。PF_4 测定原理与其相同。

【试剂与器材】

β-TG、PF_4 试剂盒 (ELISA 法)、酶标仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【注意事项】

采血要顺利，所用的试管均要硅化或用塑料制品，避免血小板在体外活化。

【参考值】

β-TG：（16.4±9.8）μg/L；PF_4：（3.2±2.3）μg/L。

【临床意义】

（1）β-TG 和 PF_4 含量增加：见于血栓前状态及血栓性疾病。如糖尿病伴血管病变、妊娠高血压综合征、系统性红斑狼疮、血液透析、肾病综合征、尿毒症、大手术后、心绞痛、心肌梗死、脑梗死、弥散性血管内凝血、深静脉血栓形成等。

（2）β-TG 和 PF_4 含量减少：α-贮存池病。

四、血栓烷 B_2 检测

当血小板受刺激后，血小板膜上的磷脂形成花生四烯酸，花生四烯酸在血小板膜上的血栓烷 A_2（thromboxane A_2，TXA_2）合成酶作用下形成 TXA_2，并进一步形成稳定的血栓烷 B_2（thromboxane B_2，TXB_2）。TXB_2 在体内的肝氧化酶作用下形成2，3-去二甲基血栓烷 B_2（DM-TXB_2）、11-去氢血栓烷 B_2（11-DH-TXB_2）。测定血浆中 TXB_2 可推断血小板被激活情况，但易受操作及体外因素影响，故直接测定 DM-TXB_2、11-DH-TXB_2 更能反映体内的真实情况。TXB_2 * 测定方法有 RIA、ELISA 法。本节介绍 ELISA 法。

【原理】

将 TXB_2 包被在反应板中，将待测标本（或不同浓度的标准液）和抗 TXB_2 抗体加入反应板中，标本中的 TXB_2 和反应板中的 TXB_2 竞争性地与抗 TXB_2B 抗体结合，酶标板经洗涤后，加入酶标抗体，最后加底物显色。显色深浅与血中 TXB_2 含量呈反比，根据标准曲线可得出待测标本的 TXB_2 含量。

【试剂与器材】

TXB_2 试剂盒（ELISA 法）、酶标仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【注意事项】

（1）所用的试管及注射器应为塑料器材，以免激活血小板，导致检测结果偏高。

（2）应采用 EDTA 二钠抗凝，以避免激活血小板，导致检测结果偏高。

（3）试验前10d 必须停止使用阿司匹林类药物。

【参考值】

（27 ±48）ng/L。

【临床意义】

1）TXB_2 含量增多：见于血栓前状态及血栓形成性疾病，如糖尿病、肾病综合征、妊娠高血压综合征、动脉粥样硬化、高脂血症、心肌梗死、心绞痛、深静脉血栓形成、大手术后等等。

2）TXB_2 含量减少：见于服用阿司匹林类药物或先天性环氧化酶缺乏等。

五、血小板膜表面相关抗体和相关补体检测

血小板上有GP IIb/IIIa、GP Ib/IX、GP IV等自身抗原，而GP IIb/IIIa 为主要的自身抗原。在某些免疫性疾病中，血小板膜表面存在着抗体（IgG、IgA、IgM）或补体，导致血小板破坏过多，因此测定血小板膜表面相关抗体（platelet associated immunglobulin，PAIg）或补体（plateletassociated complement，PAC）的含量有助于判断血小板减少的原因。测定血小板抗体的方法很多，其中国内最为常用的方法为ELISA 法。由于ELISA 所用的标本是血小板的溶解液，因易受到标本中血小板内免疫球蛋白和血浆免疫球蛋白含量的影响，而检出较多非特异性抗体。血小板抗体测定的参比方法为单克隆抗体特异性血小板抗原固相化法（MAIPA），用以测定血小板表面GP IIb/IIIa 等自身抗体，其敏感性、特异性均高于ELISA 法。流式细胞术与MAIPA 法的敏感性、特异性基本相同，随着流式细胞仪的普及，流式细胞术也将逐步成为临床实验室的一项常规测定项目。本节介绍目前国内常用的ELISA 法。

【原理】

将待测标本（或不同浓度的标准液）加入到已包被有抗人IgG 抗体的反应板中，标本中的IgG 与包被在板上的抗人IgG 抗体特异性结合。酶标板经洗涤后再将酶标抗体加入反应板中，最后加底物显色，显色深浅与血小板膜表面IgG 含量呈正比，根据标准曲线可得出待测标本的IgG 含量。血小板膜表面IgA、IgM 及补体C3 的含量测定原理与其相同。

【试剂与器材】

67mmol/L 的EDTA 二钠溶液，测定血小板膜表面相关抗体IgG、IgA、IgM、补体C3 的试剂盒（含有洗涤液、分离液等）、酶标仪。

【操作】

1）标本的制备：取静脉血4.5ml 注入含0.5ml67mmol/LL 的EDTA 二钠中。充分混匀后，以800r/min 离心10min，取上层血浆（富血小板血浆），再将富血小板血浆以3000r/min 离心20min，弃去上层液体。用血小板洗涤液将管底的血小板洗涤3～5 次后，

将血小板悬浮于PBS 液中，并将血小板数调整到10 ×10^9/L 。按1 ∶100 加入11 %Triton X －100 使血小板溶解。再将溶解液于4 ℃下放置30 min 后，以3000r/min 离心20 min ，取上清液立即测定或置低温冰箱中保存。

2） 其他操作详见说明书。

【注意事项】

1） 所用的试管及注射器均应用塑料制品。

2） 血小板要洗涤干净。

3） 血小板计数要准确，调整到10 ×10^9/L 。

4） 本试验影响因素较多，操作和结果解释时应该注意。

5） 服用激素者应停药2 周后方可进行测定。

【参考值】

PAIgG ：0 ～78.8ng/10^7 血小板；PAIgA ：0 ～2ng/10^7 血小板；PAIgM ：0 ～7ng/10^7 血小板；PAC3 ：0 ～129ng/10^7 血小板。

【临床意义】

1） 作为特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 诊断、治疗效果及预后观察的指标。90 %以上的ITP 患者PAIgG 含量增加，若同时测定PAIgA 、PAIgM 及PAC3 含量则ITP 检出阳性率可明显提高。治疗后有效者上述指标测定结果减少，复发时又增加。

2） 同种免疫性血小板减少性紫癜 (如多次输血) 、EVans 综合征、药物免疫性血小板减少性紫癜、慢性活动性肝炎、系统性红斑狼疮、恶性淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤等上述指标测定结果亦可增加。

六、血小板因子3 有效性试验

血小板因子3 (platelet factor3 ，PF_3) 是血小板上的膜磷脂形成的。当血小板被激活时，位于膜内侧的磷脂酰丝氨酸转至膜外侧形成PF_3，为凝血提供催化表面并吸附凝血因子Ⅴ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ，加速血液凝固。测定PF_3 有效性 (platelet factor3 availability ，pF_3a) 所用活化剂有白陶土和蝰蛇毒，因此分别称为白陶土血小板因子3 有效性试验 (platelet factor 3 availability test ，PF_3aT) 和蝰蛇毒PF_aT。本节介绍前者。

【原理】

用白陶土作为血小板的活化剂促进PF_3 形成，用氯化钙作为凝血反应的启动剂，分别将正常对照和患者的贫血小板血浆和富血小板血浆相互组合，比较各组凝固时间，可判断PF_3a 是否有缺陷。

【试剂】

109 mmol/L 枸橼酸钠溶液、400g/L 白陶土悬液 (以9g/L 氯化钠溶液作为溶剂) 、

0.025mol/L 氯化钙溶液。

【操作】

1） 制备待测标本及正常对照的富血小板血浆、贫血小板血浆 (详见PAgT 测定)。

2） 分别计数待测标本及正常对照的富血小板血浆、贫血小板血浆血小板数量。贫血小板血浆的血小板数应在20 $\times10^9$/L 以下。并用自身的贫血小板血浆使富血小板血浆的血小板数调整至250 $\times10^9$/L。

3） 取8 支0.8cm ×8cm 的玻璃试管，分4 组 (每组作双管测定)，4 组按表2 -3 -1 将富血小板血浆、贫血小板血浆混合后，置37 ℃预温2min。

表2 -3 -1　PF_3a 测定的试管分组

组别	待测血浆 (ml)		正常对照血浆 (ml)	
	富血小板血浆	贫血小板血浆	富血小板血浆	贫血小板血浆
1	0.1			0.1
2		0.1	0.1	
3	0.1	0.1		
4			0.1	0.1

4） 从第1 组起每隔2min 将40g/L 白陶土悬液0.2ml 加入试管中分别置37 ℃预温20min。

5） 试管置37 ℃水浴中，将0.025mol/L 氯化钙溶液0.2ml 加入第1 组中轻轻混匀。加入氯化钙后至出现纤维蛋白丝，此时即刻即为凝固时间。其余3 组方法同上。

【注意事项】

1） 标本测定前所用的玻璃器材应硅化或用塑料制品。测定的试管应用玻璃试管。

2） 贫血小板血浆及富血小板血浆中的血小板数应符合要求，并避免红细胞混入。

3） 40g/L 白陶土悬液使用前要混匀。白陶土加入标本后，标本孵育期间也要混匀数次。

4） 每一组测定应做2 次，取其平均值。

【结果分析与参考值】

第3 组、第4 组分别为患者和正常对照管。第1 组较第2 组凝固时间延长5s 以上为异常，见于PF_3a 减低。PF_3a 有缺陷或内源凝血因子有缺陷时第3 组凝固时间比第4 组长。

正常富血小板血浆的凝固时间不超过正常对照5s 以上。

【临床意义】

PF_3a 减低：见于先天性血小板PF_3a 缺乏症、血小板无力症、肝硬化、尿毒症、弥散性血管内凝血、异常蛋白血症、系统性红斑狼疮、特发性血小板减少性紫癜、骨髓增生异常综合征及某些药物影响等。

七、血小板表面颗粒膜蛋白－140 检测

血小板表面颗粒膜蛋白－140（granular membrane protein －140，GMP －140）又称为P－选择素，是血小板表面α颗粒上的一种膜蛋白。血管内皮细胞也能合成GMp －140，合成后贮存在棒－管状小体（W －P 小体）中。当血小板或内皮细胞受到刺激后，α颗粒或W －P 小体与细胞膜融合，GMP －140 在血小板膜上表达，血小板破坏时GMP －140 即进入血浆。故测定血小板表面GMP －140 含量可判断血小板在体内的活化情况。也可测定血浆中GMP －140 含量。检测血小板表面GMP －140 的方法有ELISA 法、流式细胞仪法及免疫荧光法。此处介绍免疫荧光法。

【原理】

用异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗GMP －140 抗体可与血小板表面的GMP －140 特异性结合。将血小板洗涤后，测定一定数量血小板膜上的荧光强度，根据荧光强度可计算出1 个血小板膜上GMP －140 分子数。

【试剂与器材】

50g/L EDTA 二钠溶液、40g/L 多聚甲醛溶液、0.01mol/L PBS（pH7.4）、0.01mol/L PBS（含5g/L 牛血清白蛋白，pH 值7.4）、异硫氰酸荧光素（FITC）、FITC 标记的抗IgG 抗体、单克隆抗GMP －140 抗体、荧光分光光度计（激发光波长为495nm，发射光波长为507nm）。

【操作】

1）常规静脉采血后，用50g/LEDTA 二钠溶液9∶1 抗凝，800r/min 离心10min，吸取上层血浆即为富血小板血浆。

2）在富血小板血浆中加入等量的40g/L 多聚甲醛，混匀，室温放置30min。

3）用0.01mol/L PBS（含5g/L 牛血清白蛋白），洗涤血小板3 次。最后用血小板洗涤液将血小板浓度调整至1.0×10^{12}/L。

4）取血小板悬液1ml，加入单克隆抗GMP －140 抗体，使悬液浓度为5μg/ml。混匀后，置室温30min，然后用洗涤液洗涤2 次。最后加2ml 洗涤液制备成血小板悬液。

5）在血小板悬液中加入10μl FITC 标记的抗IgG 抗体。混匀后，置室温20min，然后用洗涤液洗涤2 次。最后加0.01mol/L PBS，使血小板数为250×10^9/L。

6）用0.1mol/LPBS 配制标准FITC 溶液。

7）用未加单克隆抗GMP－140抗体管作为非特异性结合对照管。

8）在荧光分光光度计上测定受检标本管、非特异性对照管及标准管的荧光强度。

9）结果计算：

GMP－140分子数／血小板＝

$$\frac{\text{受检标本管荧光强度}-\text{非特异性对照管荧火强度}}{\text{IgG 分子量}\times\text{血小板数/L}}\times\text{标准管荧火强度}$$

式中IgG分子量为165000u。

【注意事项】

1）采血要顺利，并用塑料制品，以免激活血小板。

2）血小板计数必须准确。

3）血小板要洗涤干净。

4）标本采集后，要立即进行测定。

【参考值】

550～1850 GMP－140分子数／血小板。

【临床意义】

血小板表面GMP－140增加：见于血栓形成性疾病，如心肌梗死、脑梗死等。

八、血块收缩试验

血块收缩试验（clot retraction test，CRT）反映血小板的收缩功能。血小板激活后，由于肌动蛋白、肌球蛋白的相互作用，血小板伸出伪足，搭在纤维蛋白网上。当伪足向心性收缩时，血块中血清析出，使血块变小，更有利于伤口止血和愈合。

【原理】

血液或血浆凝固后，由于血小板收缩使血清从纤维蛋白网眼中挤出而使血块缩小，观察血清占原有全血量（如定量法、试管法）或血浆量（如血浆法）的百分比，可反映血块收缩程度。血块收缩功能除与血小板数量和功能有关外，还与纤维蛋白原、纤维蛋白稳定因子等有关。

【试剂与器材】

1）定量法：有刻度并带玻璃棒木塞的离心管、血细胞比容管。

2）试管法：刻度离心管。

3）血浆法：109mmol/L枸橼酸钠溶液、0.05mol/L氯化钙溶液、刻度离心管。

【操作】

1．定量法

1）取一定量静脉血作血细胞比容测定，然后计算出血浆比容（1－血细胞比容

值）。

1）取静脉血5ml，沿管壁缓缓注入有刻度的离心管中，将中央带有长14cm 的玻璃棒（下段呈槌形）软木塞塞于管口后，置刻度离心管于37℃水浴箱中。

2）1h 后，将玻璃棒连同血块取出，并将血块置管壁轻轻挤压，然后将试管3000r/min 离心5min，去除管底有形成分即为析出的血清量。

3）计算按以下公式：

$$\text{血块收缩率}\ (\%) = \frac{\text{血清量}}{\text{全血量}\times\text{血浆比容}}\times 100\ \%$$

2．试管法

1）将静脉血1ml 注入0.8cm×8cm 的试管中，置37℃水浴箱中。

2）1h、24h 后分别观察血块收缩情况。

3）24h 后根据血块收缩程度及血清析出量，将结果分为以下几种。①不收缩：指血块不收缩，血块完全粘于管壁上，无血清析出；②收缩不良：指血块少部分收缩，大部分血块粘于管壁上，析出少量的血清；③部分收缩：指血块大部分收缩，小部分血块粘于管壁上，血清析出较多；④完全收缩：指血块完全收缩，血块完全游离于析出的大量血清中。

3．血浆法

1）制备富血小板血浆：取静脉血，用109mmol/L 枸橼酸钠溶液1∶9 抗凝，800r/min 离心10min，上层血浆即为富血小板血浆。

2）取富血小板血浆0.6ml，置有刻度的离心管中。置37℃水浴箱中3min。

3）加0.2ml 的0.05mol/L 氯化钙溶液（或20U/ml 凝血酶液），混匀后置37℃水浴箱中。

4）2h 后取出试管用竹签去除血浆凝块，观察析出血清量。

5）计算血块收缩率（%）：$\text{血块收缩率}\ (\%) = \frac{\text{析出血清量}}{\text{富血小板血浆量}}\times 100\ \%$

【注意事项】

1）所用的试管应干净，否则血块易粘于试管壁，阻碍血块收缩。

2）所用的刻度离心管刻度要准确。

3）水浴箱的温度严格控制在37℃。

4）红细胞增多症及严重贫血患者标本会影响定量法及试管法试验结果，应注意鉴别。

【参考值】

定量法：48%～64 畅；试管法：1h 开始收缩，24h 完全收缩；血浆法：>40%。

【临床意义】

1）血块收缩功能减弱：见于血小板减少症、血小板增多症、血小板无力症、低或无纤维蛋白原血症、严重凝血功能障碍。

2）血块收缩功能增强：纤维蛋白稳定因子缺乏症。

九、血小板生存时间测定

临床上引起血小板减少的原因有很多，如生成减少、破坏增加、消耗增多、分布异常等。测定血小板的生存时间有助于判断血小板减少的原因。

【原理】

血栓烷B_2（TXB_2）是血小板膜花生四烯酸代谢的产物，环氧化酶是此代谢中的主要酶之一。阿司匹林具有不可逆的抑制血小板环氧化酶的作用，致使血小板不能合成新的TXB_2，血清中TXB_2因而减少，直至新的血小板生成才能合成TXB_2。因此，观察患者服用阿司匹林后TXB_2的恢复情况，可推断血小板的生存时间。

【试剂与器材】

血小板洗涤液、血小板分离液、TXB_2放射免疫试剂盒、花生四烯酸标准液、阿司匹林、γ－计数仪。

【操作】

1）口服阿司匹林0.6g。

2）口服阿司匹林前及后第2、4、6、10、12天分别取血，经0.05mol/L EDTA－二钠抗凝后，用血小板分离液及洗涤液分离、洗涤血小板，并将血小板数调节至100×10^9/L。

3）取血小板悬液0.2ml，加花生四烯酸标准液（最终浓度为0.33mmol/L），37℃温育10min后，3000r/min离心10min，取上清液，保存于低温冰箱中待测。

4）用TXB_2试剂盒进行测定。

【参考值】

9.3±1.7）d。

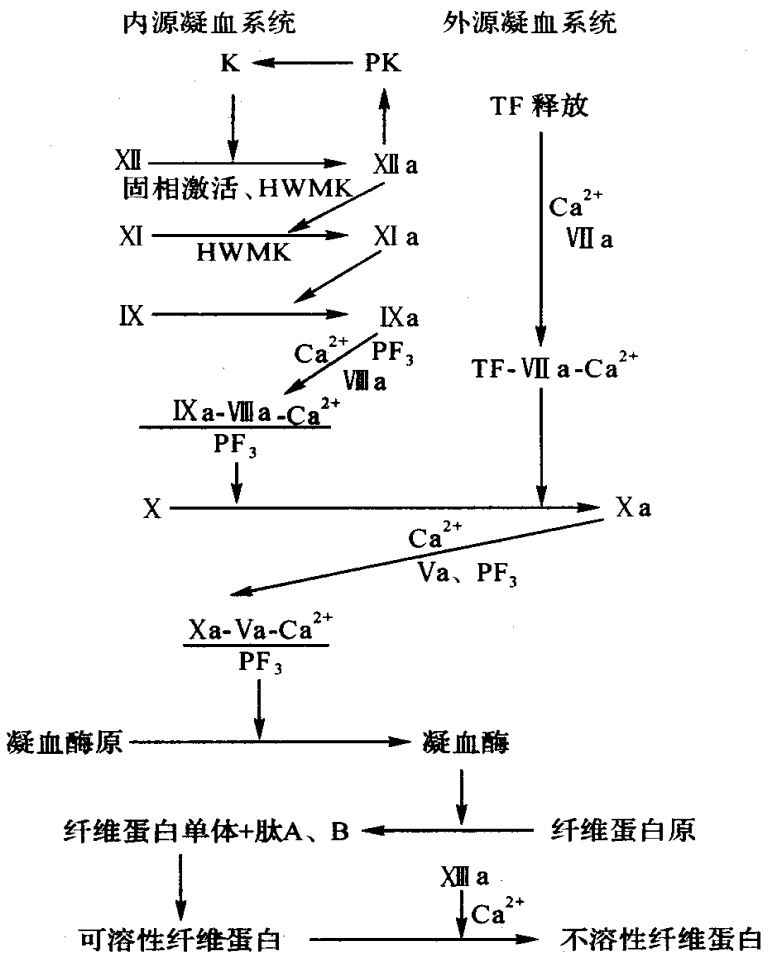
【临床意义】

血小板生存时间缩短见于特发性血小板减少性紫癜、弥散性血管内凝血、Evans综合征、脾功能亢进、血栓性血小板减少性紫癜及各种血栓性疾病。

第三节　内源凝血系统的检测

凝血因子有纤维蛋白原（FⅠ）、凝血酶原（FⅡ）、组织因子（FⅢ或TF）、钙离子

(FⅣ)、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ、Ⅷ、激肽释放酶原 (PK)、高分子量激肽原(HMWK)。人体中组织因子和钙离子很丰富，不会缺乏，其他凝血因子可由于遗传因素或获得因素导致缺乏。凝血机制由内源凝血系统和外源凝血系统组成，内源凝血系统是指FⅫ被激活至纤维蛋白形成的过程，外源凝血系统是指组织因子的释放至纤维蛋白形成的过程。内源凝血系统由内源凝血途径和共同途径组成；外源凝血系统由外源凝血途径和共同途径组成。内源凝血途径是指FⅫ被激活至Ⅸa－Ⅷa－Ca^{2+}－PF_3复合物形成的过程：外源凝血途径是指组织因子的释放至Ⅶa－TF－PF_3复合物形成的过程；共同途径是指Xa的激活至纤维蛋白形成的过程。凝血机制的简易图见图2－3－2。实际上内、外源凝血系统有密切关系，两者相互反馈调节，并受组织因子途径抑制物 (TFPI) 等其他抗凝物质调节。在生理情况下，启动凝血主要是外源凝血系统，但由于TFPI的存在，只能形成微量的凝血酶，而内源凝血系统可生成足量的凝血酶，以完成正常的凝血过程。凝血系统还可激活激肽系统、补体系统、纤溶系统。



K:激肽释放酶

图2－3－2　血液凝固机制简易图

临床上凝血因子检测的项目有很多，其中活化部分凝血活酶时间 (APTT) 是最常

用的内源凝血系统筛选试验，凝血酶原时间（PT）是最常用的外源凝血系统筛选试验，将两者结合可初步判断凝血因子的缺陷情况（见图2－3－3）。

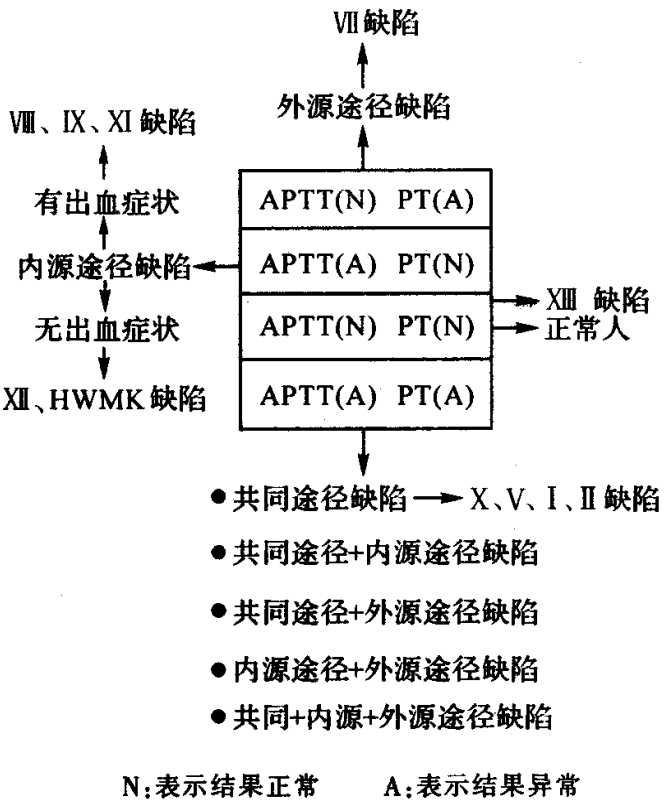


图2－3－3　凝血机制筛选试验结果分析

参与内源凝血系统的凝血因子有Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ、纤维蛋白原、凝血酶原、Ⅴ、Ⅹ等。内源凝血系统的检测有筛选试验、纠正试验、凝血因子活性和抗原性测定（后两者见本章第五节）。纠正筛选试验包括全血凝固时间、活化凝血时间、复钙时间、活化部分凝血活酶时间、简易凝血活酶形成试验等。其中活化部分凝血活酶时间最为常用。

一、全血凝固时间测定

血液在体外可被带负电荷物质（如玻璃、白陶土）所激活而启动内源凝血系统。根据所用的器材不同将全血凝固时间（clotting time，CT）分为玻片法、毛细管法、普通试管法、塑料管法及硅管（经硅化的试管）法。这5种方法中玻片法、毛细管法最不敏感，故卫生部文件卫医发〔2000〕412文件已明确规定在2001年底停止使用玻片法及毛细管法全血CT测定。现在使用的3种方法中，普通试管法最不敏感。以凝血因子Ⅷ为例，当凝血因子Ⅷ促凝活性在0.2以下时全血CT才延长，故临床上较少采用。硅管法最敏感，当凝血因子Ⅷ促凝活性在0.45以下时全血CT即可延长，但所用的试管需硅化且试验时间长，操作不方便，故临床上也较少使用。塑料管法虽操作方法简单、较敏感，但观察标本所需的时间较长。

【原理】

静脉血离体后与异物表面接触（如玻璃），Ⅻ被激活而启动内源凝血系统，最后生成纤维蛋白致使血液凝固。血液接触异物至凝固所需要的时间即为CT，故CT是内源凝血系统的筛选试验。

【操作】

以普通试管法为例。

1）取内径为8mm普通玻璃试管3支，编号1、2、3。

2）顺利抽取待测者的静脉血3ml，同时记时。去针头后依次沿试管壁缓慢注入血液1ml，然后将3支试管置37℃水浴箱中。

3）3min后，每隔30s轻轻将第1管倾斜1次，用以观察血液的流动性，直至将试管倒置血液不流动为止。依次观察第2管、第3管。以第3管的凝固为终点，记录第3管凝固时间即为CT。

【注意事项】

1）抽血要顺利，血液中不应有气泡、混入组织液及溶血现象。抽血不顺利者，全血CT会缩短。

2）所用的试管内径必须符合要求。内径小者，检测时血液与玻璃的接触面积大，CT缩短；反之延长。

3）试管必须干净，否则CT会缩短。

4）水浴箱的温度必须控制在37℃，温度下降CT延长，反之缩短。

5）观察血液流动情况时，倾斜试管的角度尽量小，以减少血液与玻璃的接触面积。

6）硅管法、塑料管法CT的测定方法同上，只是所用的试管不同。

【参考值】

普通试管法：4～12min；硅管法：15～30min；塑料管法：10～19min。

【临床意义】

1）CT延长：见于先天性内源凝血系统的因子（Ⅻ、Ⅺ、Ⅹ、Ⅸ、Ⅷ、Ⅴ、Ⅱ、Ⅰ）减少、缺乏，纤溶亢进，维生素K缺乏症，严重肝脏疾病，血中抗凝物质增加（如抗Ⅸ抗体、抗Ⅷ抗体、口服抗凝剂、使用肝素、FDP增加）等。

2）CT缩短：见于血栓前状态及血栓形成性疾病。

二、活化凝血时间测定

活化凝血时间（activated clotting time，ACT）是一种敏感的内源凝血系统筛选试验，可检出凝血因子Ⅷ促凝活性在0.45以下的患者。方法虽敏感，但凝固时间短，测定结

果不易判断；而且采血后须立即测定，2min 左右出结果，故属于床边试验。

【原理】

基本原理同全血凝固时间测定，不同的是在试管中先加入白陶土脑磷脂悬液，用以充分激活XI、XII因子，并为凝血提供催化表面，提高试验敏感性。

【试剂】

40g/L 白陶土脑磷脂悬液。

【操作】

1）取内径为8mm 的试管，加入40g/L 白陶土脑磷脂悬液0.2ml。

2）加入受检者未抗凝的新鲜血0.5ml，同时启动秒表，轻轻摇匀试管中液体，倾斜试管观察血液流动情况。

3）当血液停止流动时，记录的时间即为ACT。

【参考值】

1.0 ±0.6）min。

【临床意义】

同全血凝固时间测定。临床上适用于体外循环中肝素用量的测定、某些手术中患者及急诊患者凝血功能的测定等。

三、复钙时间测定

复钙时间 (recalcification time，RT）是内源凝血系统的筛选试验，但敏感性较低，当凝血因子VIII促凝活性在0.04 以下时RT 才延长，故临床上很少用RT 筛选内源凝血因子缺陷患者。

【原理】

抗凝剂与血浆中的钙结合从而使血液不能凝固。当在去钙的富血小板血浆中，重新加入一定量的氯化钙时，血浆将会凝固。观察加钙后至血浆凝固所需的时间即为RT。

【试剂】

0.025mol/L 氯化钙溶液、0.1mol/L 草酸钠溶液。

【操作】

1）富血小板血浆制备：采血后用0.1mol/L 草酸钠1∶9 抗凝，以800r/min 离心10min，取上层血浆即为富血小板血浆。

2）取富血小板血浆0.1ml 于玻璃试管中，置37℃水浴箱预温1min，加入氯化钙溶液0.1ml 混匀，同时启动秒表，记录至纤维蛋白丝出现的时间即为RT。重复2 次，取其平均值。

【注意事项】

1）测定待检标本时，同时要做正常对照。

2）加氯化钙溶液与启动秒表要同步。

3）试管要干净，试管内径要符合要求。

4）血小板明显减少者，RT 可延长。

5）采血应顺利，标本在短时间内进行测定。

【参考值】

（38 ±0.5）min。

【临床意义】

同全血凝固时间测定。

四、活化部分凝血活酶时间测定及纠正试验

活化部分凝血活酶时间（activated partial thromboplastiin time，APTT）是一种较敏感的内源凝血系统筛选试验。当凝血因子Ⅷ促凝活性在0.25 以下时，APTT 即延长，故是临床上最为常用的内源凝血系统筛选试验。延长的APTT 可通过纠正试验结果，初步判断凝血因子的缺乏情况。因方法繁琐、且不能确诊，所以纠正试验在临床上很少使用。有条件者往往直接测定凝血因子的活性。APTT 与血浆凝血酶原时间、血小板计数组合检测作为手术患者的术前常规检查项目，用以测定患者的止凝血功能。APTT 测定有手工法和自动血凝仪法，两者基本原理相同，但不同的仪器操作方法不同，故本节介绍手工法。

【原理】

用部分凝血活酶（是从组织因子中提取的脑磷脂）代替血小板膜磷脂，为凝血提供催化表面。用激活剂（常用白陶土）激活因子Ⅻ、Ⅺ。在贫血小板血浆中加入足量的白陶土部分凝血活酶悬液和钙离子，即可启动内源凝血系统，最终形成纤维蛋白，记录加钙至纤维蛋白形成的时间即为APTT。试验中的激活剂如果是白陶土又称为白陶土部分凝血活酶时间（KPTT）。如APTT 延长是由凝血因子缺乏引起的，可被相应少量（1/10）的纠正物纠正，分析纠正结果可以初步判断凝血因子缺乏情况。

【试剂】

1）标准血浆或正常混合血浆：作为正常对照血浆。

2）109mmol/L 枸橼酸钠溶液。

3）40g/L 白陶土部分凝血活酶悬液。

4）0.025mol/L 氯化钙溶液。

5）纠正物：①正常混合血浆：取20 名正常人的贫血小板血浆混合、分装，置低温冰箱中可保存2 个月。②正常血清：正常人全血凝固后，置37℃、1h 后分离所得的

血清。③正常吸附血浆：按1ml 正常贫血小板血浆加100mg 硫酸钡的比例混合，搅拌15min 后，以3000r/min 离心30min，取上层血浆即成。硫酸钡能吸附凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ。④正常吸附血清：基本同正常吸附血浆的制备，不同的是用正常血清代替正常贫血小板血浆。

【操作】

1）制备贫血小板血浆：常规抽血1.8ml 加入到含109mmol/L 枸橼酸钠溶液0.2ml 的塑料试管中颠倒混匀，3000r/min 离心10min 后，取上层血浆即为贫血小板血浆。

2）取正常对照血浆0.1ml 置于8mm 内径的玻璃试管中，加入白陶土部分凝血活酶0.1ml，混匀，置37℃水浴箱中温育3min（期间轻轻震荡）。

3）加入已置37℃预温的0.025mol/L 氯化钙溶液0.1ml，同步启动秒表。约30s 后取出试管，倾斜试管观察，至纤维蛋白形成时的时间即为正常对照APTT。

4）取待测标本贫血小板血浆0.1ml，以上述同样的方法测出其APTT。

5）纠正试验：取4 支试管，分别加入正常血浆、正常血清、正常吸附血浆及正常吸附血清0.01ml，然后在上述每一试管中加入APTT 延长的受检者血浆0.09ml 作为待测标本。其他操作同上。

【注意事项】

1）标本放置时间不宜超过2h，以免凝血因子Ⅴ、Ⅷ活性降低。

2）检测结果报告形式：待测APTT（s）、APTT 比值（即APTTR，为待测APTT 除以正常对照APTT）。

3）测定所用的试管必须为8mm 内径、干净的玻璃试管，其他所用的器材应硅化或用塑料制品。

4）白陶土脑磷脂悬液用之前要混匀。

5）除白陶土外，还可用硅藻土、二氧化硅微粒、鞣化酸等作为激活剂。

6）标本中有小凝块、溶血可使APTT 缩短，有大凝块可使APTT 明显延长或不凝固。

7）由于生产厂家、生产批号不同，白陶土部分凝血活酶活性不同，故每次测定标本时必须先做正常对照。如正常对照超过正常范围，提示白陶土部分凝血活酶质量不佳。

8）每一待测标本和正常血浆均应重复测定2～3 次，取其平均值。

9）严格按照操作步骤进行，如采血要顺利、1∶9 配比抗凝、剂量要准确、加氯化钙溶液和启动秒表必须同步、水浴箱温度严格控制在37℃、贫血小板血浆的制备要符合要求、结果判断要准确等，否则增加测定结果误差。

10）标本有严重脂浊、黄疸，常影响测定结果，甚至无法测定。

(1) 血细胞比容超出0.20～0.55 时，用1∶9 配比抗凝不合适，应用纠正公式调节抗凝剂的量 (详见本章前言)。

【参考值】

男性31.5～43.5s，女性32～43s，超过正常对照10s 以上为异常。但因所用的仪器、试剂等不同，参考值也不同。各实验室应根据自己的实验条件建立参考值。

【临床意义】

(1) APTT 临床意义基本上同全血凝固时间，但较之敏感。APTT 延长还可见于激肽释放酶原、高分子量激肽原缺乏。APTT 明显延长或不凝常见于抗凝物质增加、纤维蛋白原明显减少 (纤维蛋白原含量为1～2g/L，一般不会影响APTT)。

(2) APTT 是目前监测普通肝素临床使用情况的首选指标。使用中、大剂量肝素时必须作APTT 测定，一般以APTTR 在1.5～2.5 为佳。

(3) 纠正试验只能初步判断凝血因子缺乏情况。结果分析详见表2－3－2。

表2－3－2　APTT 纠正试验的结果及临床意义

加入物	缺乏Ⅷ或Ⅴ	缺乏Ⅸ或Ⅹ	缺乏Ⅺ或Ⅻ	缺乏Ⅱ	缺乏Ⅰ	血中有抗凝物质
待测标本	延长	延长	延长	延长	延长	延长
加正常血浆	＋	＋	＋	＋	＋	－
加正常吸附血浆	＋	－	＋	－	＋	－
加正常血清	－	＋	＋	－	－	－
加正常吸附血清	－	－	＋	－	－	－

注：＋说明结果纠正，－说明结果不纠正。判断纤维蛋白原是否缺乏常直接测定其血浆中含量

五、简易凝血活酶生成试验及纠正试验

凝血活酶是指Ⅴ－Ⅹ－Ca－PF_3 复合物或称凝血激酶、凝血酶原酶，它的形成与凝血因子Ⅴ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ有关。简易凝血活酶生成试验 (simple thromboplastin generation test，STGT) 由BiggsTGT 简化而来。实验因方法较繁琐且敏感性较差 (尤其是对Ⅸ、Ⅺ缺乏者)，且目前许多实验室均有条件直接测定凝血因子活性，故本试验及其纠正试验临床上已很少使用。

【原理】

用蒸馏水稀释待检血液，其溶血液中含有各种凝血因子及红细胞溶解产物红细胞素 (代替PF_3)。在孵育不同时间的溶血液中加入正常血浆及氯化钙，测定凝固时间，凝固时间长短与孵育溶血液中凝血活酶的量有关，故本试验反映了内源凝血系统凝血活酶的生成情况，如STGT 延长是由凝血因子缺乏引起的，可被相应少量 (1/10) 的纠正物纠

正，分析纠正结果可以初步判断凝血因子缺乏类型。

【试剂】

308mmol/L 氯化钠溶液、0.025mol/L 氯化钙溶液。纠正物：正常血浆、正常血清、正常吸附血浆、正常吸附血清（制备详见KPTT 纠正试验）。

【操作】

1）常规取静脉血0.4ml 加入到含5ml 蒸馏水的试管中，混匀即为溶血液。

2）在溶血液中加入308mmol/L 氯化钠溶液0.5ml 后混匀使其成为等渗液，并置37℃水浴箱预温。

3）在上述等渗液中加入0.025mol/L 氯化钙溶液0.25ml，同步启动秒表。并用竹签去除形成的纤维蛋白丝，此液即为孵育液。

4）取6 个试管编号，分别将0.1ml 氯化钙溶液加入试管中，置37℃水浴箱预温后待用。

5）1min45s 时取孵育液0.1ml 加入到1 号试管中，2min 时在1 号试管中加入正常血浆0.1ml 同时启动另一秒表，记录凝固时间。

6）每隔2min 重复第5 步骤。依次测定第2 至第6 号试管。

7）纠正试验：取4 支试管，分别加入正常血浆、正常血清、正常吸附血浆及正常吸附血清0.005ml，然后在上述每一试管中加入STGT 延长的受检者溶血液0.5ml 和308mmol/L 氯化钙溶液0.5ml 后混匀，置37℃水浴箱预温2min。然后将加有纠正物的4 支试管中的每一管按上述（3）～（6）步骤继续操作。

【注意事项】

1）因为纤维蛋白能吸附凝血酶使其失去作用，故须用竹签去除纤维蛋白丝。

2）所用的试管为8mm 内径的玻璃试管。

3）每步加样要准确，动作要熟练，结果判断要正确。

4）在测定6 管中，以凝固时间最短的一管作为试验结果。

【参考值】

正常人10～14s。

【临床意义】

1）STGT 延长：见于凝血因子Ⅴ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ先天性或获得性缺乏，抗凝物质增加。

2）纠正试验结果分析参照SPTT 测定。

第四节　外源凝血系统的检测

参与外源凝血系统的凝血因子有Ⅶ、纤维蛋白原、凝血酶原、Ⅴ、Ⅹ等。外源凝血系统的测定有筛选试验、纠正试验、凝血因子活性和抗原性测定（后两者见本章第五节）。筛选试验包括凝血酶原时间、肝促凝血酶原酶试验、蝰蛇蛇毒时间等。其中凝血酶原时间最为常用。

一、血浆凝血酶原时间测定及纠正试验

血浆凝血酶原时间（prothrombin time，PT）测定是临床上最常用的外源凝血系统筛选试验。延长的PT可做纠正试验，但其方法繁琐，且只能初步判断凝血因子缺陷情况，所以纠正试验在临床上很少使用。PT与活化部分凝血活酶时间、血小板计数组合检测作为手术患者术前常规检查项目，用以测定患者的止凝血功能。PT测定有手工法和仪器法之分，两者基本原理相同，但不同的仪器操作方法不同。本节介绍手工法。

【原理】

在贫血小板血浆中加入足量的含钙的组织凝血活酶即组织因子（tissue factor，TF），启动外源凝血系统，最终形成纤维蛋白，记录加钙至纤维蛋白形成的时间即为PT。如PT延长是由凝血因子缺乏引起的，可被相应的少量（1/10）纠正物纠正，通过纠正结果的分析可以初步判断凝血因子缺乏情况。

【试剂】

1）标准血浆或正常混合血浆（制备详见APTT）作为正常对照血浆。

2）109mmol/L枸橼酸钠溶液。

3）含钙组织凝血活酶，应标有国际敏感指数（SI）。

4）纠正物：正常血浆、正常血清、正常吸附血浆（制备详见KPTT纠正试验）及正常贮存血浆（将正常血浆置4℃冰箱中2～3周即成）。

【操作】

1）制备待测的贫血小板血浆：常规抽血1.8ml加入到含109mmol/L枸橼酸钠0.2ml的试管中颠倒混匀，3000r/min离心10min后，取上层血浆即为贫血小板血浆。

2）取正常对照血浆0.1ml置塑料试管或硅化的玻璃试管中，置37℃水浴箱中温育30s。

3）加入已置37℃预温的含钙组织凝血活酶0.2ml，同步启动秒表，同时不断震荡水浴箱中的试管，约10s时取出，倾斜试管观察，至纤维蛋白形成的时间即为正常PT。

4）取待测的贫血小板血浆0.1ml，以上述同样的方法测出PT。

5）纠正试验：取4 支试管，分别加入正常血浆、正常血清、正常吸附血浆及正常贮存血浆0.01ml，然后在上述每一试管中加入受检者血浆0.09ml，作为待测血浆。其他操作同上。

【注意事项】

1）国际标准化比值（INR）系统：组织凝血活酶由于制备的方法不同、来源不同、批号不同，对测定结果影响很大。为了使PT 的结果具有可比性，WHO 提出了INR 系统。所谓INR 系统就是用国际参比组织凝血活酶，标定所用组织凝血活酶的国际敏感指数（international sensitivity index，ISI），用标好ISI 的组织凝血活酶测定待测标本的PT，并同时测定正常对照血浆的PT，将待测的PT 除以正常对照的PT，算出凝血酶原时间比值（PTR），而$INR = PTR^{ISI}$，INR 是PT 的国际单位。国际参比组织凝血活酶是一种用特定的技术制备成的人脑复合物试剂，被命名为IRP67/40，它的ISI 为1。

2）检测结果报告形式：患者PT、PTR、INNR。此外，还可报告PT 的活动度。

3）标本中有小凝块、溶血会使PT 缩短，标本中有大凝块会使PT 明显延长或不凝固。

4）采血后，测定应在2h 内完成；标本置4～8℃冰箱，PT 可能会缩短。

5）购买的凝血活酶必须注明ISI 值。ISI 愈接近1，说明该试剂愈敏感，一般以ISI 小于2.0 为佳。

6）其他注意事项同APTT 注意事项（8）～（11）。

【参考值】

由于试剂的ISI 不同，参考值也不同。正常PT 为（12±1）s，超过正常对照3s 以上为异常，PTR 为1.00±0.05。

【临床意义】

1）PT 延长：见于外源凝血系统的因子（Ⅹ、Ⅶ、Ⅴ、Ⅱ、Ⅰ）先天性减少、缺乏，纤溶亢进，血中抗凝物质增加（如口服华法令、误食毒鼠药、使用肝素、FDP 增加），严重肝病，维生素K 缺乏症等。PT 明显延长或不凝常见于纤维蛋白原明显减少及抗凝物质增加。

2）PT 缩短：先天性Ⅴ因子增多症、口服避孕药、血栓前状态及血栓形成性疾病。

3）用于口服抗凝剂治疗的剂量监测：美国医师学会推荐深静脉血栓形成、肺梗死、心肌梗死、组织型心瓣膜置换术、瓣膜型心脏病和心房颤动的患者，口服抗凝剂治疗的最佳剂量是INR 为2.0～3.0 时。在心源性血管血栓和机械性心瓣膜置换术患者，INR 以2.5～3.5 为佳。

4）纠正试验的结果分析见表2－3－3。

二、肝促凝血酶原酶试验

肝脏是合成凝血因子的主要场所，当肝脏功能损伤时凝血因子Ⅶ最早受影响，导致血中含量下降，其次是凝血因子Ⅱ、Ⅹ。所以通过肝促凝血酶原酶试验（heparin－induced prothrombase test，HPT）测定凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ活动度可以判断肝脏功能损伤情况。但本试验操作较为繁琐，故临床上较少用。

表2－3－3　PT纠正试验的结果分析

加入物	缺乏Ⅷ或和Ⅹ	缺乏Ⅴ	缺乏Ⅱ	缺乏Ⅰ	血中有抗凝物质
待测标本	延长	延长	延长	延长	延长
加正常血浆	＋	＋	＋	＋	－
加正常贮存血浆	＋	－	＋	＋	－
加正常吸附血浆	－	＋	－	＋	－
加正常血清	＋	－	＋	－	－

注：＋说明结果纠正，－说明结果不纠正。判断纤维蛋白原是否缺乏常直接测定其血浆中含量

【原理】

外源凝血系统参与的凝血因子有Ⅰ、Ⅴ、Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ及组织因子、钙离子。在正常吸附血浆（含有Ⅰ、Ⅴ）中分别加入一系列稀释的正常血浆，测定其PT，得出标准曲线。正常吸附血浆加待测标本所测得的凝固时间与标本中凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ的活动度成正比。

【试剂】

含钙组织凝血活酶溶液、正常吸附血浆（制备见APTT）、9g/L氯化钠溶液、标准血浆或正常混合血浆（制备详见APTT）。

【操作】

1．标准曲线制备

（1）用9g/L氯化钠溶液将标准血浆按1∶6、1∶7、1∶8、1∶9、1∶10、1∶20、1∶30、1∶40稀释。

（2）取各稀释血浆0.1ml，分别加正常吸附血浆0.1ml，混匀后置37℃水浴箱中预温30s，然后加入已预温的含钙凝血活酶0.2ml，同时启动秒表，分别记录凝固时间。

（3）制备标准曲线：以1∶10稀释的标准血浆的凝固时间作为凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ100%活动度，分别标出其他各管的活动度。以凝固时间（s）为纵坐标，以活动度为横坐标，绘制标准曲线。

2．待检标本测定

将标本1∶10稀释后，按上述（2）方法进行测定，根据凝固时间从标准曲线中推算

出Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ活动度。

【注意事项】

每次作试验必须制备标准曲线，因为每次的正常吸附血浆、含钙组织凝血活酶及正常混合血浆或标准血浆中凝血因子活性均不同。

【参考值】

90.6％±13.4％。

【临床意义】

凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅹ活动度下降可用于判断肝脏疾病严重程度及预后。

三、蝰蛇蛇毒时间测定

蝰蛇蛇毒是一种强烈的凝血因子Ⅹ激活剂，可使血浆凝固。临床上蝮蛇蛇毒时间（Russell’viper venom time，RVVT）测定可与PT一起做，用于鉴别凝血因子Ⅶ或Ⅹ缺乏。

【原理】

在正常情况下，富血小板血浆中含有凝血因子Ⅴ、Ⅱ、Ⅰ，在其中加入一定量的蝰蛇蛇毒和氯化钙，可使血浆凝固。测定凝固所需的时间即为RVVT。

【试剂】

蝰蛇蛇毒溶液、0.025mol/L氯化钙溶液、109mmol/L枸橼酸钠溶液、正常混合血浆或标准血浆。

【操作】

1）取枸橼酸钠溶液1∶9抗凝的待检的富血小板血浆0.1ml，加入稀释的蝰蛇蛇毒溶液0.1ml，混匀后置37℃水浴箱中预温30s。

2）加已预温的0.025mol/L氯化钙溶液0.1ml，同时启动秒表，观察凝固时间。

3）取待检标本重复测定。取两次凝固时间的平均值作为待检标本的测定结果。

4）同时取正常血浆测定2次，取平均值作为正常对照。

【注意事项】

蝰蛇蛇毒溶液的稀释比例参见试剂说明书。

【参考值】

正常对照为13～14s，超过正常对照3s以上者即为异常。

【临床意义】

1）RVVT延长：见于凝血因子Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅹ缺乏，血小板减少，血中抗凝物质增加，纤溶亢进等。

2）RVVT缩短：见于血小板增多症、血栓前状态及血栓形成性疾病等。

3）鉴别凝血因子Ⅶ或X 缺乏：如果PT 延长、VVT 正常，提示凝血因子Ⅶ缺乏；如果PT 及RVVT 均延长，提示凝血因子X 缺乏。

第五节　凝血因子促凝活性和抗原性检测

凝血因子促凝活性检测是凝血因子缺陷的确诊试验之一。当PT 和/或APTT 延长时可选择性地进行凝血因子测定，以确定哪个或哪些凝血因子缺乏。遗传性凝血因子缺陷中以Ⅷ缺乏最为常见，其次为Ⅸ缺乏。一般来说，凝血因子的抗原性与活性是一致的，但也存在活性下降但抗原性正常的情况，因此，最好在测定因子活性的同时测定因子抗原性。

一、凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ促凝活性（Ⅷ:C、Ⅸ:C、Ⅺ:C、Ⅻ:C）检测

凝血因子促凝活性检测的方法有一期法、二期法和发色底物法。目前最常用的方法为一期法。测定的手段分手工法和自动血凝仪法，临床上手工法已逐步被自动血凝仪法代替，但两者测定的原理相同。因不同的血凝仪操作方法不同，本节介绍手工法，以Ⅷ:C（一期法）为例。

【原理】

用待测血浆、不同稀释度的正常血浆分别与乏Ⅷ:C 基质血浆混合（排除了其他因子的影响），测定APTT，得出标本的凝固时间及Ⅷ:C 标准曲线，根据标准曲线查出标本的Ⅷ:C。其他因子活性检测原理同上，所不同的是乏因子血浆，如测定Ⅸ:C 用乏Ⅸ:C 基质血浆，其他类推。

【试剂】

1）正常混合血浆或标准血浆。

2）109mmol/L 枸橼酸钠溶液。

3）40g/L 白陶土部分凝血活酶悬液。

4）0.025mol/L 氯化钙溶液。

5）pH 值7.3 咪唑缓冲液：5 份甲液加1 份乙液组成。甲液为咪唑1.36g、氯化钠2.34g 溶于蒸馏水200ml 中，再加0.1mol/L 盐酸溶液74.4ml，用蒸馏水加至400ml；乙液为0.13mol/L 枸橼酸钠溶液。

6）乏Ⅷ:C（或乏Ⅸ:C、乏Ⅺ:C、乏Ⅻ:C）基质血浆。

【操作】

1．标准曲线的制备

1）咪唑缓冲液将标准血浆倍比稀释成1∶10、1∶20、1∶40、1∶80、1∶160、1∶320。

(2) 上述稀释标准血浆各0.1ml，分别加入乏Ⅷ:C 基质血浆0.1ml、白陶土部分凝血活酶悬液0.1ml，置37℃水浴箱预温2min。

(3) 上述预温液中各加氯化钙溶液0.1ml，同时启动秒表，记录各管凝固时间。

(4) 用双回归方程制备标准曲线：以1∶10 稀释的标准血浆中的Ⅷ:C 活性为1，其他各管依次为0.50、0.25、0.125、0.0625、0.03125。以凝血因子活性为纵坐标，以各管凝固时间(s)为横坐标得出标准曲线。

2．标本的测定

常规采血，枸橼酸钠溶液1∶9 抗凝，取贫血小板血浆，然后用咪唑缓冲液将标本作1∶20 稀释，按上述(2)、(3) 测定血浆凝固时间。从标准曲线中得出Ⅷ:C 活性再乘以2 即为标本的检测结果。

【注意事项】

(1) 在制作标准曲线及测定患者标本之前，应先测定空白管(由乏基质血浆、咪唑缓冲液、白陶土部分凝血活酶悬液及氯化钙溶液各0.1ml 组成)，要求测得的凝固时间为240～250s，时间不符合可调节部分凝血活酶浓度。

(2) 如果待测标本的凝固时间过长，应减少稀释倍数，使凝固时间处于标准曲线的线性范围内。

(3) 因为每次试剂的活性不同，每次测定标本之前均要制备标准曲线。

(4) 待测的贫血小板血浆置低温冰箱中可保存2～3 个月，但不能反复冻融。

【参考值】

Ⅷ:C 1.030±0.257(103.0%±25.7%)，Ⅸ:C 0.981±0.304(98.1%±30.4%)，

Ⅺ:C 1.00±0.184(100.0%±18.4%)，Ⅻ:C 0.924±0.207(92.4%±20.7%)。

【临床意义】

(1) Ⅷ:C：减弱见于血友病甲(重型<2%，中型2%～5%，轻型5%～25%，亚临床型25%～45%)、血管性假血友病、Ⅷ:C 抑制物存在、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、某些自身免疫性疾病等；增强见于血栓前状态、血栓性疾病等。

(2) Ⅸ:C：减弱见于血友病乙、Ⅸ:C 抑制物存在、维生素K 缺乏、口服华法令、误食毒鼠药、严重肝脏疾病、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、使用肝素、某些自身免疫性疾病等；增强同Ⅷ:C。

(3) Ⅺ:C：减弱见于凝血因子Ⅺ缺乏症、严重肝脏疾病、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、使用肝素、某些自身免疫性疾病；增强同Ⅷ:C。

(4) Ⅻ:C：下降见于凝血因子Ⅻ:C 缺乏症，其他意义基本同Ⅺ:C 下降。

二、凝血因子II、V、VII、X 促凝活性（I：C、V：C、VII：C、X：C）检测

凝血因子II、V、VII、X 促凝活性检测方法种类同VIII、IX、XI、XII促凝活性检测，本节介绍手工法，以II：C（一期法）为例。

【原理】

用待测血浆、不同稀释度的正常血浆分别与乏II基质血浆混合（排除了其他因子的影响），做PT 测定得出标本的凝固时间及II：C 标准曲线，根据标准曲线查得标本的II：C 活性。其他凝血因子促凝活性检测原理同上，所不同的是乏因子血浆，如检测V：C 用乏V：C 基质血浆，其他类推。

【试剂】

正常混合血浆或商品化的标准血浆、109mmol/L 枸橼酸钠溶液、含钙（组织）凝血活酶悬液、9g/L 氯化钠溶液、乏II：C（或乏V：C、乏VII：C、乏X：C）基质血浆。

【操作】

1．标准曲线的制备

（1）用9g/L 氯化钠溶液将标准血浆倍比稀释成1：10、1：20、1：40、1：80、1：160、1：320 一系列浓度。

（2）取上述各稀释标准血浆0.1ml，分别加入乏II：C 基质血浆0.1ml，将每一管置37℃水浴箱预温30s 后，加含钙凝血活酶悬液0.2ml，同时启动秒表，记录各管凝固时间。

（3）以标准血浆的乏II：C 活性为纵坐标，以各管凝固时间（s）为横坐标根据回归方程制备标准曲线。详见VIII：C。

2．标本的测定

常规采血，用枸橼酸钠溶液1∶9 抗凝，取贫血小板血浆，然后用9g/L 氯化钠溶液将标本作1∶20 稀释，按上述（2）测定凝固时间。从标准曲线中得出II：C 活性再乘以2即为标本的检测结果。

【注意事项】

见VIII：C 测定注意事项（2）～（4）。

【参考值】

II：C 0.977±0.167（97.7%±16.7%），V：C 1.024±0.309（102.4%±30.9%），VII：C 1.30±0.173（103.0%±17.3%），X：C 1.030±0.190（103.0%±19.0%）。

【临床意义】

（1）II：C：减弱见于先天性II：C 缺乏症、口服华法令后、肝素增加、维生素K 缺乏、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、肝脏疾病、某些自身免疫性疾病等；增强见于血栓

前状态、血栓形成。

2）V：C：减弱见于先天性V：C缺乏症、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、严重肝脏疾病、某些自身免疫性疾病；增强同Ⅱ：C。

3）Ⅷ：C：减弱见于先天性Ⅶ：C缺乏症，口服华法令后（Ⅶ：C活性最先下降）、维生素K缺乏、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、肝脏疾病（肝脏疾病时Ⅶ：C活性最先下降）、某些自身免疫性疾病等；增强同Ⅱ：C。

4）X：C：减弱见于先天性X：C缺乏症，其它基本同Ⅱ：C。

三、凝血因子抗原性检测

凝血因子抗原性检测的方法常用火箭电泳法。根据凝血因子的促凝活性和抗原性检测结果，将凝血因子缺乏分为交叉反应物（cross reaction material，CRM）阳性（CRM$^+$）和阴性（CRM$^-$）。所谓CRM$^-$指凝血因子促凝活性和抗原性均降低，说明凝血因子合成减少；所谓CRM$^+$指凝血因子促凝活性降低，但抗原性正常或偏高，说明凝血因子分子结构异常。各种凝血因子抗原性测定的原理及方法基本相同。本节以Ⅷ：C抗原性（Ⅷ：CAg）为例。

【原理】

将Ⅷ：C抗血清（含抗Ⅷ：C抗体）与琼脂糖混匀浇板、打孔，在板上每孔中加入倍比稀释的正常血浆和待检标本（抗原），抗原与抗体发生结合并在电场的作用下形成火箭样沉淀峰，峰高与Ⅷ：C抗原性成正比。根据正常血浆中抗原性及其峰高制备标准曲线，然后根据待检标本的峰高即可从标准曲线中得出Ⅷ：CAg。其他凝血因子抗原性（如Ⅱ：Ag、Ⅴ：Ag、Ⅶ：Ag、Ⅸ：Ag、Ⅹ：Ag、Ⅺ：Ag、Ⅻ：Ag、Ⅷα：Ag、Ⅷβ：Ag）检测的方法同Ⅷ：CAg，不同的只是抗血清，如测Ⅱ：Ag，用凝血因子Ⅱ抗血清，其他类推。

【试剂与器材】

1）9g/L琼脂糖溶液：琼脂糖0.9g，加pH8.8的Tris－巴比妥缓冲液（巴比妥钠4.88g、巴比妥1.235g、Tris2.89g，加蒸馏水溶解至1L）100ml，加热溶解。

2）Ⅷ：C抗血清。

3）正常血浆（制备见KPTT测定）或标准血浆。

4）10g/L磷钼酸溶液。

5）电泳仪、电泳槽。

【操作】

操作详见说明书。

【参考值】

Ⅷ：C Ag　0.961 ±0.286　（96.1 % ±28.6 %），　Ⅱ：Ag　0.985 ±0.155　（98.5 % ±15.5 %），

Ⅴ：Ag　1.020 ±0.240　（102.0 % ±24.0 %），　Ⅶ：Ag　1.060 ±0.10　（106.0 % ±21.0 %），

Ⅸ：Ag　0.982 ±0.295　（98.2 % ±29.5 %），　Ⅹ：Ag　0.96 ±0.18　（96.0 % ±18.0 %），

Ⅺ：Ag　0.972 ±0.251　（97.2 % ±25.1 %），　Ⅻ：Ag　1.00 ±0.22　（100.0 % ±22.0 %），

ⅩⅢα：Ag　1.004 ±0.129　（100.4 % ±12.9 %），　ⅩⅢβ：Ag 0.88 ±0.125　（88.8 % ±12.5 %）。

【临床意义】

（1）Ⅷ：CAg：同Ⅷ：C 检测。血友病甲根据Ⅷ：C 和Ⅷ：CAg 检测结果分为CRM⁻型（占85 %）和CRM⁺型（占15 %）。

（2）Ⅱ：Ag、Ⅴ：Ag、Ⅶ：Ag、Ⅸ：Ag、Ⅹ：Ag、Ⅺ：Ag 及Ⅻ：Ag：临床意义同各自相应的凝血因子促凝活性检测＊根据凝血因子促凝活性和抗原性检测结果均可分为CRM 型和CRM⁺型。

（3）ⅫⅠα：Ag 和ⅩⅢβ：Ag：减弱见于先天性ⅩⅢ：C 缺乏。纯合子型ⅩⅢα：Ag ＜0.01、ⅩⅢβ：Ag 正常或减低，杂合子型ⅩⅢα：Ag　0.50、ⅩⅢβ：Ag 正常。获得性减少者临床意义同凝血因子Ⅻ定性试验。

四、纤维蛋白原检测

纤维蛋白原（fibrinogen，Fg）检测方法有很多，分为三大类：凝固法，物理、化学测定法，免疫测定法。随着自动血凝仪的普及，目前临床上常用PT 衍生法（PT－der 法），此法精密度高，但纤维蛋白原减少时检测结果偏高。美国国家临床检验标准委员会（NCCLS）推荐的方法为冯克劳斯法（von Clauss），本节介绍此法。

【原理】

在稀释的血浆中加入足量的凝血酶，可使纤维蛋白原转变为纤维蛋白，测定凝固时间。凝固时间的长短与血中的纤维蛋白原含量成反比。

【试剂】

（1）牛凝血酶液：100IU／ml。

（2）纤维蛋白原标准品。

（3）咪唑缓冲液：咪唑3.4g，氯化钠5.58g，加于约500ml 水中；加0.1mol／L 盐酸溶液186ml，调节pH 为7.3～7.4，最后加蒸馏水至1L。

【操作】

1．制备标准曲线

用缓冲液将纤维蛋白原标准品稀释为1∶5、1∶10、1∶15、1∶20。取不同稀释度的纤维蛋白原标准品各200μl于试管中，置37℃水浴4min后，加凝血酶100μl，同时启动秒表，记录凝固时间（s）。以不同稀释度的纤维蛋白原含量为横坐标，以相应的凝固时间为纵坐标，作双对数回归曲线。

2．待检标本测定

取待检者静脉血1.8ml加入到含有109mmol/L枸橼酸钠0.2ml的试管中，混匀、离心后取贫血小板血浆。用缓冲液将待检血浆按1∶10稀释，照上述方法测定凝固时间，从标准曲线中得出纤维蛋白原含量。

【参考值】

2～4g/L。

【注意事项】

（1）每管凝固时间测定应做双管，取其平均值。

（2）血中肝素、纤维蛋白降解产物含量过高，会使检测结果偏低。

（3）采血要顺利，如标本中有凝块会使检测结果降低。

【临床意义】

（1）纤维蛋白原含量增多：见于感染（病毒、细菌）、恶性肿瘤、糖尿病、结缔组织病、肾病综合征、风湿热、风湿性关节炎、多发性骨髓瘤、急性肾炎、尿毒症、外科手术后、休克、放疗、妊娠等非特异性应激反应。

（2）纤维蛋白原减少：见于弥散性血管内凝血的消耗性低凝期及继发纤溶亢进期、原发性纤溶亢进、严重肝脏损伤、溶栓治疗后、先天性纤维蛋白原缺乏症等。

五、纤维蛋白稳定因子定性试验

纤维蛋白稳定因子（又称为凝血因子ⅩⅢ）具有使可溶性纤维蛋白单体复合物（SFMC）形成不溶性纤维蛋白的作用，从而稳固纤维蛋白凝块。凝血因子ⅩⅢ测定分为ⅩⅢ定性试验（筛选试验）和ⅩⅢ亚甲基（ⅩⅢα、ⅩⅢβ）抗原性测定。本节介绍定性试验。

【原理】

根据SFMC可溶于5mol/L的尿素或2%的单氯（碘）醋酸溶液中，而不溶性纤维蛋白则不溶于其中。将血凝块置于尿素或单氯（碘）醋酸溶液中，观察血块的溶解情况即可初步判断凝血因子ⅩⅢ是否缺乏。

【试剂】

109mmol/L 枸橼酸钠溶液、5mol/L 的尿素或2%的单氯（碘）醋酸溶液、0.025mol/L 氯化钙溶液。

【操作】

1）取枸橼酸钠1∶9 抗凝的血浆0.1ml，加氯化钙溶液0.1ml，待血浆凝固。

2）凝固后，将凝块移人含有5mol/L 的尿素溶液中。

3）观察凝块溶解情况：先每隔5min 观察1 次，2h 后每隔2～4h 观察1 次，共观察24h。

【参考值】

24h 内凝块不溶解。

【临床意义】

24h 内凝块溶解（尤其在2h 内溶解）见于先天性凝血因子XIII缺乏症、肝脏疾病、弥散性血管内凝血、纤溶亢进、系统性红斑狼疮等。

第六节　凝血因子激活标志物的测定

凝血因子的活性和抗原性测定，不能反映出体内凝血因子的活化状态。通过测定凝血因子在活化过程中释放的特异性肽链或形成的物质，可作为凝血因子激活标志物，包括凝血酶原片段1+2、纤维蛋白肽A、可溶性纤维蛋白单体复合物及组织因子等。

一、凝血酶原片段1+2 检测

凝血酶原在凝血酶原酶的作用下，在N 端释放出由273 个氨基酸组成的凝血酶原活化肽片段1+2（prothrombin fragment 1 and 2，F_{1+2}）后，形成了中间产物，中间产物在凝血酶原酶继续作用下形成凝血酶。故F 1+2 是凝血酶原活化的特异性测定指标。

【原理】

将抗人F_{1+2}抗体包被在酶标板上，分别加入待测标本（或不同浓度的标准液），其中的F_{1+2}与酶标板上的抗人F_{1+2}抗体结合。酶标板经洗涤后再加酶标抗体，最后加底物显色，显色深浅与F_{1+2}含量呈正比。根据标准曲线可得出待测标本的F_{1+2}含量。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【参考值】

（0.67±0.19）mol/L

【临床意义】

F_{1+2}含量增加见于有凝血酶形成增多的血栓前状态及血栓形成性疾病。

二、纤维蛋白肽A 检测

纤维蛋白肽A（fibin peptide A，FPA）是在纤维蛋白原α链上N 端的一个小肽，由16 个氨基酸组成。纤维蛋白原在凝血酶的作用下，释放出FPA 后形成纤维蛋白单体Ⅰ。检测FPA 含量可反映血中凝血酶的形成情况。检测方法有高压液相法、ELISA 法。本节介绍ELISA 法。

【原理】

待检抗凝血用皂土素将纤维蛋白原去除后，将待测血浆（或不同浓度的标准液）分别与过量的抗人FPA 抗体结合（在试管中进行）后，将此种液体分别加到包被有人FPA 的酶标板上，此液中剩余的未结合的抗人FPA 抗体可与板上的FPA 结合，酶标板经数次洗涤后，加入辣根过氧化酶标记的二抗，与FPA 抗体结合，最后加底物显色，显色深浅与待检血浆中FPA 含量呈负相关。根据标准曲线可得出待测标本的FPA 含量。

【试剂与器材】

FPA 试剂盒、酶标仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【参考值】

（1.2 ±0.8）μg/L。

【临床意义】

FPA 含量增加见于有凝血酶形成增多的血栓前状态及血栓形成性疾病。这是原发性和继发性纤溶的鉴别指标及抗凝治疗过程中药物剂量的监测指标。

三、可溶性纤维蛋白单体复合物检测

纤维蛋白原在凝血酶的作用下，释放出FPA、FPB 后形成了纤维蛋白单体。当凝血酶浓度低时，纤维蛋白单体可自行聚合形成可溶性纤维蛋白单体复合物（soluble fibrin monomercomplex，SFMC）。故测定血中SFMC 的含量可反映体内凝血酶的活性。SFMC 检测有定性试验和定量试验（包括ELISA 法和RIA 法）。本节介绍定性试验。

【原理】

用包被纤维蛋白单体的人红细胞与SFMC 结合形成肉眼可见的颗粒。

【试剂与器材】

包被纤维蛋白单体的人红细胞，阳性、阴性对照血浆，109 mmol/L 枸橼酸钠溶液，震荡器。

【操作】

1）贫血小板血浆标本的制备：采血1.8ml，加入到含有0.2ml 枸橼酸钠溶液的试管中，混匀。3000r/min，离心20min 后，取上层血浆。

2）待测标本检测：取待测标本0.1ml、阴性对照0.1ml 及阳性对照0.1ml 分别置于3 个小试管中，然后分别加入包被纤维蛋白单体的人红细胞50μl，混匀后置37℃水浴箱中10min，将各管的内容物倒在板上的圆圈中央，置震荡器上震荡6min。观察结果。

3）结果观察：①无颗粒：阴性；②有均匀分布的细小颗粒：＋；③有稀少分布的大颗粒：＋＋；④颗粒巨大成簇分布：＋＋＋。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

阳性见于有凝血酶形成增多的血栓前状态及血栓形成性疾病。这是诊断弥散性血管内凝血和弥散性血管内凝血前状态的重要指标。

四、组织因子检测

在正常情况下组织因子（tissue factor，TF）广泛存在于机体各种组织中（以胎盘、脑及肺中的含量最为丰富），而人血中TF 的含量是极少的，当某种原因使组织中的TF 进入血中时，可激活外源凝血系统并可启动内源凝血系统。故测定血中TF 可反映凝血系统的激活情况。

【原理】

将待测标本及一系列浓度的TF 标准液加入到已包被有TF 抗体的反应板中，TF 与包被在板上的抗人TF 抗体特异性结合，再与酶标的TF 抗体结合，最后加底物显色，显色深浅与TF 含量呈正比。根据标准曲线可得出待测标本的TF 含量。

【试剂与器材】

TF 试剂盒（ELISA 法）、酶标仪。

【操作】

详见试剂盒说明书。

【参考值】

30～220ng/L。

【临床意义】

TF 含量增加见于某些血栓前状态及血栓性疾病，如深静脉血栓形成、脑梗死、心肌梗死、弥散性血管内凝血、急性早幼粒细胞白血病、内毒素血症、严重创伤、休克等。

第七节　生理性抗凝物质的检测

一、抗凝血酶活性检测

抗凝血酶（antithrombin，AT）是一种由肝脏、血管内皮细胞合成的单链糖蛋白，为依赖肝素的丝氨酸蛋白酶抑制物，是机体最重要的生理性抗凝物质，完成血浆中70%的抗凝功能。在肝素存在时，其灭活作用可增强2000倍，故又称为肝素辅因子Ⅰ。AT活性（ATactivity，AT：A）检测的方法有凝胶空斑法、凝固法、发色底物法。前两者由于重复性与灵敏度均很差操作又繁琐，故目前临床很少使用。本节介绍发色底物法。

【原理】

受检血浆中加入过量凝血酶，使AT与凝血酶1∶1形成复合物，剩余的凝血酶有酰胺酶活性，能使发色底物S-2238（H-D-Phe-Pip-Arg-PNA·2分子盐酸）中的Arg与对硝基苯胺（PNA）连接处的肽键断裂，游离出发色基团PNA。其显色程度与剩余凝血酶含量呈正相关，与AT：A呈负相关。

【试剂与器材】

自动血凝仪，主要试剂包括凝血酶、发色底物、通用参比血浆、通用质控血浆。

【操作】

根据仪器和试剂说明书进行操作。

1）输入标准曲线信息，用通用参比血浆进行定标。

2）将待检血浆、通用质控血浆稀释成一定浓度，然后与过量凝血酶混合反应一定时间再加发色底物反应。

3）记录速率或孵育一定时间测定吸光度值。

4）根据标准曲线求出待检标本AT：A。

【注意事项】

1）标本采用109 mmol/L枸橼酸钠溶液与血液1∶9抗凝，不可用肝素抗凝。

2）血浆中过高的纤维蛋白（原）降解产物及肝素抗凝治疗等，会使AT：A假性偏高。

3）严重脂浊、黄疸、溶血标本，会使AT：A假性偏低。

4）标本应及时分离血浆，于-20 ℃以下低温保存待检，取出后应立即在37 ℃水浴冻融。

【参考值】

108.5％±5.3％。

【临床意义】

1）AT：A 减低：见于先天性AT 缺陷（AT：Ag 和AT：A 均减低为CRM⁻型，AT：Ag 正常而AT：A 减低为CRM⁺型），获得性AT 缺陷（合成减少，见于严重肝脏疾病等；消耗增多，见于血栓前状态和血栓形成性疾病如弥散性血管内凝血、心绞痛、心肌梗死、脑血管疾病、深静脉血栓、肺梗死、妊娠高血压综合征等；丢失增加，见于肾病综合征等）。

2）AT：A 增高：见于血友病、白血病和再生障碍性贫血等急性出血期，还见于口服抗凝药物等。

二、抗凝血酶抗原检测

【原理】

1）火箭电泳法：受检血浆中AT 在含AT－III抗血清的琼脂糖凝胶中电泳，抗原和抗体相互作用形成火箭样沉淀峰。沉淀峰的高度与血浆中AT 含量成正相关。从标准曲线中计算出血浆中抗凝血酶抗原（AT：Ag）含量。

2）免疫比浊法：待检血浆中AT 与其相应特异抗体产生免疫复合物，用透射法测定其浊度，其浊度高低与血浆中AT：Ag 含量成正比。

【试剂和器材】

1）兔抗人AT 血清。

2）巴比妥－盐酸缓冲液（pH8.2，离子强度0.05mol/L）：称取巴比妥钠10.3g，溶于800ml 蒸馏水中，加1.0mmol/L 盐酸溶液14ml 混匀，测定pH 值，并以盐酸调pH 至8.2，然后用蒸馏水补足至1L

3）标准血浆。

4）10g/L 磷钼酸溶液。

5）10g/L 琼脂糖溶液：取琼脂糖1.0g，加巴比妥－盐酸缓冲液100ml，加热溶解。

6）电泳仪、电泳槽、玻璃板、框模、滤纸、打孔器、铁夹子、圆规等。

7）比浊法测定需用紫外分光光度计或自动生化分析仪。

【操作】

1．火箭电泳法

1）根据抗体效价和一般免疫火箭电泳要求制板、打孔。

2）将标准血浆用9g/L 氯化钠溶液作倍比稀释（即原液1：2、1：4、1：8、1：16），将待测血浆样本用9g/L 氯化钠溶液作1:5 稀释。

3）接电源，加样品端接负极，火箭走向端接正极，升电压于50V。每孔加入待检

稀释血浆5μl，每板均同时各加5 个不同稀释度的标准血浆5μl 作标准曲线。加样完毕，将电压调至140V （15V/cm） 电势梯度下，电泳6h。

4） 电泳完毕，将琼脂糖凝胶板置10g/L 磷钼酸溶液中，固定15～30min，量取各火箭样沉淀峰高度 （自加样孔上缘至峰尖的高度）。

5） 将标准的5 个读数，通过回归得到标准曲线，然后求出各待检标本AT：Ag 的含量。

2．免疫比浊法

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作和计算。

【注意事项】

1） 标本采用109mmol/L 枸橼酸钠与血液1∶9 抗凝，不可用肝素抗凝。

2） 制备琼脂糖凝胶板时温度要控制好，以免破坏抗体或使琼脂糖凝固。

3） 严重脂浊、黄*、溶血标本，用免疫比浊法检测结果会偏高，在自动生化分析仪上可用两点终点法给以纠正。

【参考值】

火箭电泳法：（290.0±30.2）mg/L；免疫比浊法：（285.0±75.0）mg/L。

【临床意义】

同AT：A 检测。

三、凝血酶－抗凝血酶复合物检测

当血液中有凝血酶形成时，抗凝血酶即与之结合形成凝血酶－抗凝血酶复合物（thrombin－antithrombin complex，TAT）。因此血浆中TAT 含量增多，表明机体凝血酶生成增多，凝血系统被激活，处于高凝状态。

【原理】

兔抗人凝血酶抗体包被于固相，待测血浆中的TAT 以其凝血酶与固相上的抗凝血酶抗体结合，然后加入酶标记的鼠抗人凝血酶抗体。后者与结合于固相的TAT 结合，再加底物显色。根据标准曲线，计算标本中TAT 的含量。

【试剂及器材】

1） 现有商品试剂盒：内含兔抗人凝血酶单克隆抗体、酶标抗体、TAT 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2） 酶标仪、酶标板等。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书。

【注意事项】

1）4 ℃贮存的标本应于72h 内测定。

2） 若标本中TAT 含量大于60 mg/L 时，应以正常人的贫TAT 血浆进行稀释后测定。

【参考值】

1.45 ±0.4） μg/L 。

【临床意义】

血浆TAT 含量增高，见于急性心肌梗死、不稳定性心绞痛、弥散性血管内凝血、深静脉血栓形成、脑梗死、急性白血病等。

四、肝素辅因子II活性检测

【原理】

受检血浆中的肝素辅因子II （Heparin cofactor II，HC－II） 能被硫酸皮肤素激活形成HC－II：A 。实验中加入过量的凝血酶，凝血酶与HC－II1 ：1 形成复合物，剩余的凝血酶能使合成的发色底物显色，其显色深浅与HC－II：A 呈负相关。

【试剂与器材】

1）0.5g/L 硫酸皮肤素溶液：用TEP 缓冲液溶解。

2）3NIHu/ml 人凝血酶：用9g/L 氯化钠溶液配制。

3） 基质（S－2238 －Polybrene） 溶液：肝素抑制剂Polybrene 用蒸馏水配成2g/L ，使S－2238 的浓度为3.0 mmol/L 。

4） 含聚乙二醇Tris －TEP 缓冲液：Tris60.6g ，EDTA 二钠27.9g ，PEG （分子量6000u）6.0g ，氯化钠9.9 mg ，用蒸馏水溶解后加至1L 。

5）50 %醋酸溶液。

6）109 mmol/L 枸橼酸钠溶液。

7） 酶标仪、酶标板等。

【操作】

1） 血浆制备：采用109 mmol/L 枸橼酸钠与血液1 ：9 抗凝，3000r/min 离心10 min ，取上层血浆。

2） 待测血浆稀释：取血浆50 μl ，加2.45 mlTEP 缓冲液（1 ：50 稀释）。

3） 标准血浆稀释：混合血浆用9g/L 氯化钠溶液作1 ：40 （125 %）、1 ：50 （100 %）、3 ：200 （75 %）、1 ：200 （25 %） 稀释，成为4 个HC－II浓度。

4） 检测过程：取稀释血浆（各标准管及待测管）100 μl ，加硫酸皮肤素溶液100 μl ，置37 ℃水浴中2 ～6 min ，加入凝血酶100 μl ，在37 ℃水浴中，精确放置300s ，加基质溶液100 μl ，再置37 ℃水浴中，精确放置120s ，加50 %醋酸溶液200 μl 。在酶标仪

上，于波长405nm 处测吸光度。

5） 空白管加样步骤：硫酸皮肤素溶液100μl，75％标准血浆100μl，基质溶液100μl，50％醋酸溶液200μl，最后加入凝血酶100μl。

6） 计算：以标准血浆HC－Ⅱ：A 为横坐标，吸光度A 值为纵坐标，绘制标准曲线。待测血浆HC－Ⅱ：A 可根据其A 值在标准曲线上读出。

【注意事项】

1）25％HC－Ⅱ：A 在波长405nm 处，A 值应在0.9～1.1 之间。若不在此范围，可调整凝血酶浓度。

2） 如受检标本有黄疸或脂浊，则需用1∶50 血浆作空白管调零。

3） 如受检标本含有肝素，则需先在50μl 受检标本中加50μl 兔抗人AT 抗体，再加2.40mlTEP 缓冲液（仍为1∶50 稀释）。

【参考值】

1.000±0.153（100.0％±15.3％）。

【临床意义】

HC－Ⅱ：A 减低见于先天性HC－Ⅱ缺陷和获得性HC－Ⅱ缺陷（如弥散性血管内凝血、重型肝炎等）。

五、蛋白C 活性检测

机体蛋白C 系统由蛋白C（proteinC，PC）、蛋白S（protein S，PS）、血栓调节蛋白（thrombomodulin，TM）及活化蛋白C 抑制剂（activated protein C inhibitor，APCI）组成。PC 在凝血酶与TM 以1∶1 形成的复合物作用下转变为活化蛋白C（activated protein C，APC）。APC 的主要作用：在磷脂和钙离子参与下灭活凝血因子FVa 和FⅧa，通过灭活纤溶酶原激活剂抑制物而激活纤溶系统。PS 为APC 的辅因子。PC 活性（PC activity，PC：A）检测的方法有凝固法和发色底物法，下面介绍发色底物法。

【原理】

从蛇毒液中提取的Protac，为PC 特异的激活剂，激活后的PC 作用于特异发色底物（chromzym－PC：A），释放出对硝基苯胺（PNA）可显色，显色的深浅与PC：A 呈线性关系。

【试剂与器材】

1） 缓冲液A：004mol/L 巴比妥缓冲液，PH7.4。

2） Protac 激活液：每瓶3u，加缓冲液A3ml，分装，置－20℃保存，使用时稀释成0.15u/ml。

3） 发色底物液：用双蒸馏水将Chromozym－PC：A 配成1.6mmol/L。

4）100mmol/L 枸橼酸钠溶液。

5）终止液为冰醋酸。

6）酶标仪及酶标板。

7）正常人混合血浆。

【操作】

1）血浆制备：采用109mmol/L 枸橼酸钠溶液与血液1∶9 抗凝，3000r/min 离心10min，取贫血小板血浆待检。

2）正常人混合血浆用缓冲液A 稀释成浓度为原液、80%、60%、40%、20%、10%等。

3）待检标本用9g/L 氯化钠溶液作1∶2 稀释。

4）将待测已稀释标本25μL 和6 个不同稀释度的正常人混合血浆各25μL 分别加入酶标板孔中，再向各孔加入激活液100μL，置37℃水浴温育8min。

5）再各加发色底物100μL，混匀，置37℃水浴中继续温育10min，使其充分显色，然后各加50μL 冰醋酸终止反应。

6）以缓冲液吸光度作为空白管，在酶标仪波长405nm 处读出各孔的吸光度值。

7）以正常人混合血浆的各稀释孔吸光度值为纵坐标，相应的PC∶A 值为横坐标作出标准曲线。根据标准曲线，得出待检标本PC∶A 值，并乘以2。

【注意事项】

1）检测可在全自动血凝仪上根据仪器和试剂说明书进行操作。

2）除发色底物法外，尚有白陶土部分凝血活酶时间法。

【参考值】

1.0024±0.1318（100.24%±13.18%）。

【临床意义】

1）PC∶A 减低：见于先天性PC 缺陷（Ⅰ型者PC∶Ag 和PC∶A 均降低，Ⅱ型者PC∶Ag 正常而PC∶A 降低）和获得性PC 减少（如弥散性血管内凝血、肝功能不全、手术后、口服双香豆素抗凝剂、呼吸窘迫综合征等）。

2）PC∶A 增高：见于冠心病、糖尿病、肾病综合征、妊娠后期等。

六、蛋白C 抗原检测

【原理】

本试验采用双抗体夹心法，即将抗蛋白C 抗体包被在固相载体上，然后加含PC 抗原的待检血浆，待检血浆中PC 抗原与固相上抗PC 抗体结合，再加酶标抗体后形成复合物，后者与底物作用呈现显色反应。在酶标仪上波长492nm 处测得的A 值与待检血

浆PC 抗原（PC：Ag）含量成正比。

【试剂和器材】

1）主要试剂：已包被抗人PC 抗体的反应板、酶标记的抗人PC 抗体、冻干标准血浆、底物、稀释液、洗涤液等。不同厂家试剂盒有所不同。

2）酶标仪。

【操作】

根据试剂盒说明书进行操作。

1）标准品稀释：冻干标准血浆用规定稀释液准确复溶。用稀释液作倍比稀释，得浓度为200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 μg/L 的标准血浆。

2）标本稀释：将待测血浆用稀释液作101 倍稀释（20 μl 待测血浆+2 ml 稀释液）。

3）加样：每孔加各浓度标准血浆和待测稀释血浆100 μl，空白对照孔中加入稀释液100 μl，37 ℃孵育90 min。

4）洗涤：弃去反应孔内液体，用洗涤液注满各孔，静置3s，甩干。反复3 次后拍干。

5）加酶标抗体：每孔加酶标抗体100 μl，37 ℃孵育60 min。洗涤同上。

6）显色：加显色液100 μl，37 ℃孵育15～20 min，加终止液50 μl。

7）比色：在酶标仪上波长492nm 处测定各孔吸光度，以空白孔调零。

8）计算：以波长492 mm 处吸光度值对PC 各标准血浆质量浓度在半对数坐标纸上作标准曲线，待测标本PC 含量可根据吸光度值从标准曲线上查出。查得数值乘以稀释倍数101，除以1000 即为PC：Ag 检测值，单位mg/L。

【注意事项】

1）血标本用109 mmol/L 构橼酸钠1∶9 抗凝，离心。血浆在2～8 ℃可保存12h；－20 ℃可保存1 个月。

2）酶标抗体、标准品、底物一经启用，应一次用完。

【参考值】

3.0～5.2 mg/L。

【临床意义】

同PC：A 检测。

七、血浆总蛋白S 检测

【原理】

将抗人血浆蛋白S（protein S，PS）血清包被于酶标反应板，加入受检血浆，受检血浆中的PS 结合于固相抗体上。然后加入酶标记的抗人PS 血清，与结合于反应板上的

PS 结合，最后加入底物显色，显色深浅与受检标本中PS 的量呈平行关系。根据受检者标本的吸光度值可从标准曲线中计算出血浆总PS （TPS） 的含量。

【试剂和器材】

主要试剂：已包被抗人PS 抗体的反应板、酶标记的抗人PS 抗体、冻干标准血浆、底物、稀释液、洗涤液等。不同厂家试剂有所不同。

【操作】

根据试剂盒说明书进行操作。

1） 标准品稀释：将冻干标准血浆用规定稀释液准确复溶。用稀释液作6 次倍比稀释，得质量浓度为1000 、500 、250 、125 、62.5 、31.25 、15.625 μg／L 的标准血浆。

2） 样品稀释：将待测血浆用稀释液作201 倍稀释 （10 μl 待测血浆＋2 ml 稀释液）。

3） 同PC ：Ag 测定步骤 （3） ～ （7）。

4） 计算：以波长492nm 处吸光度值对TPS 各标准血浆质量浓度在半对数坐标纸上作标准曲线，待测标本TPS 含量可根据吸光度值从标准曲线上查出。查得数值乘以稀释倍数201 ，除以1000 即为TPS 检测值，单位为mg／L 。

【注意事项】

同PC ：Ag 检测。

【参考值】

19.0 ～26.8mg／L 。

【临床意义】

TPS 含量减低：见于肝功能障碍、口服抗凝剂、先天性PS 缺乏以及严重深静脉血栓等疾病。

八、血浆游离蛋白S 检测

【原理】

待检血浆经沉淀处理去除结合PS 后，加至包被抗PS 抗体的酶标板反应中，再加入酶标抗体后形成复合物，后者与底物作用呈现显色反应。在酶标仪波长492nm 处测得的吸光度值与待测血浆游离蛋白S （free protein S ，FPS） 含量成正比。

【试剂】

现已有商品试剂盒供应，内含已包被抗PS 抗体的酶标板、酶标抗体、沉淀剂、PS 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

【操作】

1） 静脉采血1.8 ml ，置于含有0.2 ml 109 mmol／L 枸橼酸钠抗凝剂的试管中，3000r／min 离心10 min ，收集上层血浆。

(2) 取血浆510 μl，置于离心管中，37 ℃水浴5 min，在振荡条件下滴加入90 μl 的沉淀剂，继续水浴30 min，3000r/min 离心10 min，收集上清液。

(3) 其他具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作和计算。

【注意事项】

同PC：Ag 检测。

【参考值】

7.2～11.2 mg/L。

【临床意义】

同TPS 检测。

九、组织因子途径抑制物检测

组织因子途径抑制物（tissue factor pathway inhibitor，TFPI）是1995 年新确定的一种丝氨酸蛋白酶抑制物，它先抑制凝血因子Xa（FXa）活性，后形成TFPI－FXa－FⅦa－TF 四元复合物抑制FⅦa/TF 活性，故TFPI 是组织因子途径中的主要生理性抑制物。TFPI 主要来自血管内皮细胞，部分由巨核细胞合成。在外周血循环中出现的TFPI 80%～90%与脂蛋白结合，少量TFPI 游离于血浆中。在整个循环中有8%～10%TFPI 存在于血小板颗粒中（当血小板受刺激后可释放出来）。可用ELISA 法测定抗原性，发色底物法或凝固法测定其促凝活性等。本节介绍ELISA 法。

【原理】

采用双抗体夹心法，先将抗TFPI 抗体包被在固相上，再加待测血浆。血浆中TFPI 抗原与固相上抗体结合，然后加入酶标抗体形成复合物，后者与底物作用呈现显色反应，其显色深浅与血浆中TFPI 抗原含量成正比。

【试剂】

现已有商品试剂盒供应，内含已包被抗TFPI 抗体的酶标板、酶标抗体、TFPI 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作和计算。

【注意事项】

(1) 采血要顺利，不能混入组织液。

(2) 所用的试管及注射器应为塑料制品，以免激活血小板影响检测结果。

【参考值】

54～142 μg/L。

【临床意义】

TFPI 增高：见于肝脏疾病、糖尿病、肾病、恶性肿瘤、急性白血病等；TFPI 降低：见于弥散性血管内凝血、血栓形成性疾病、脂蛋白合成缺陷等。

第八节　病理性抗凝物质的检测

病理性抗凝物质包括类肝素抗凝物质、狼疮抗凝物质、凝血因子Ⅷ抑制物等。肝脏和许多其他器官可产生类肝素物质，也可产生肝素酶，后者灭活肝素和类肝素物质。在某些病理情况下，类肝素物质产生增多，肝素酶生成减少，故循环血液中类肝素物质含量增高，后者抑制凝血因子Ⅴ、Ⅷ、Ⅹ和凝血酶。狼疮抗凝物质可抑制凝血因子Ⅸa 和Ⅷa 形成的复合物，也可抑制凝血因子Xa 和因子Va 形成的复合物等。凝血因子Ⅷ抑制物属IgGκ型或IgGλ型抗体，这些抗体与凝血因子Ⅷ形成复合物，从而抑制凝血因子Ⅷ的凝血活性。

一、血浆凝血酶时间测定

【原理】

在凝血酶作用下，待检血浆中纤维蛋白原转变为纤维蛋白。加入凝血酶后所测得的血浆凝固时间即为血浆凝血酶时间（thrombin time，TT）。

【试剂和器材】

1）109mmol/L 枸橼酸钠溶液。2）凝血酶溶液：用9g/L 氯化钠溶液稀释浓凝血酶溶液，使正常对照血浆的凝固时间为16～18s。

3）血凝仪或秒表。

【操作】

1）采取静脉血与109mmol/L 枸橼酸钠溶液9∶1 抗凝，3000r/min 离心10min，得上清液贫血小板血浆。

2）取待检贫血小板血浆0.1ml，置于37℃水浴中温育5min。

3）加入凝血酶溶液0.1ml，记录凝固时间。如此重复2～3 次，取平均值。

【注意事项】

1）采血后宜在2h 内完成检测，置冰箱保存不应超过4h。

2）不宜用肝素或EDTA 盐抗凝。

3）稀释的凝血酶溶液不稳定，每次标本测定均应作正常对照，使其检测结果在16～18s 范围内，否则可用浓凝血酶溶液或9g/L 氯化钠溶液调整。

【参考值】

16～18s，若超过正常对照3s 以上者为异常。

【临床意义】

（1）TT 延长：见于肝素增多或类肝素抗凝物质存在、纤维蛋白原降解产物（FDP）增多及弥散性血管内凝血、低（或无）纤维蛋白原血症。

（2）TT 缩短：见于高纤维蛋白原血症。

二、甲苯胺蓝纠正试验

【原理】

甲苯胺蓝能中和肝素的抗凝作用。当凝血酶时间延长，可在待检血浆中加入甲苯胺蓝后，再测定凝血酶时间。若延长的凝血酶时间被纠正，则表示增多的为肝素或类肝素抗凝物质，否则为其他抗凝血酶类物质。

【试剂】

1g/L 甲苯胺蓝溶液、109mmol/L 枸橼酸钠溶液、凝血酶溶液（同TT 测定）。

【操作】

（1）取待检贫血小板血浆（制备同TT）0.1ml，加1g/L 甲苯胺蓝溶液0.1ml，摇匀，置37℃水浴中温育。

（2）即刻加入凝血酶溶液0.1ml，用秒表记录凝固时间，重复2～3 次，取平均值。

【参考值】

加甲苯胺蓝溶液后，TT 缩短5s 以上者，说明延长的TT 可被甲苯胺蓝纠正。

【临床意义】

延长的TT 被甲苯胺蓝纠正，提示待检血浆中肝素或类肝素抗凝物质增多，如肝素治疗、过敏性休克、使用氮芥、放疗后、严重肝病、弥散性血管内凝血、肝移植后等。

三、血浆肝素含量检测

肝素分为高分子肝素（UFH）和低分子肝素（LMWH）两种。UFH 主要抑制凝血因子IIa 的活性，其作用快、效果强，但维持时间短；LMWH 主要抑制凝血因子Xa 的活性，其作用慢、效果弱，但维持时间长。以下以UFH 为例。

【原理】

在待检血浆中加入抗凝血酶，使其与肝素形成复合物，再加入过量凝血酶。肝素－抗凝血酶复合物能抑制凝血酶活性，剩余的凝血酶能使发色底物显色，其颜色的深浅与血浆中剩余的凝血酶呈正相关，而与肝素的含量呈负相关。

【试剂与器材】

自动血凝仪。主要试剂包括：抗凝血酶、凝血酶、发色底物、缓冲液、通用参比血

浆、通用质控血浆。

【操作】

根据仪器和试剂说明书进行操作，具体步骤同AT：A 检测。

【注意事项】

1）LMWH 含量测定方法基本同上，但要将凝血酶换成凝血因子Xa。

2）除发色底物法外，尚有TT 法。

3）血浆在15～5 ℃可保存4h；－20 ℃可保存1 个月。

【参考值】

5～10U/L。

【临床意义】

在用肝素防治血栓性疾病以及血液透析、体外循环的过程中，需监测肝素的合理用量。理论上，使用LMWH 无需进行监测，但临床用量较大时仍有导致出血的危险，此时应进行监测。UFH 的治疗剂量可以分为3 个水平：

1）小剂量（5000～10000U/24h）腹部皮下注射，无需监测。

2）中剂量（10000～20000U/24h）使用时并发出血较多，应进行监测。

3）大剂量（20000～30000U/24h）容易并发出血，必须进行监测。

四、血浆凝血因子Ⅷ抑制物检测

【原理】

将待检血浆与已知凝血因子Ⅷ含量的正常血浆混合，温育一定时间后，检测剩余凝血因子Ⅷ的促凝活性。将待检温育混合物和正常血浆温育液的凝血因子Ⅷ促凝活性进行比较，以Bethesda 单位来计算抑制物的含量。1 个Bethesda 单位相当于灭活50％凝血因子Ⅷ的量。

【试剂】

1）0.05mol/L 咪唑缓冲液（pH7.3）：取0.34g 咪唑及0.585g 氯化钠，溶于约80ml 蒸馏水中，用0.1mol/L 盐酸调节溶液至pH7.3，最后加蒸馏水至100ml，混匀。

2）白陶土－脑磷脂悬液。

3）正常贫血小板混合血浆。

4）缺乏凝血因子Ⅷ血浆。

5）0.025mol/L 氯化钙溶液。

【操作】

1）用咪唑缓冲液制备1∶2（1 份待检血浆加1 份缓冲液）和1∶3（1 份待检血浆加2 份缓冲液）的稀释待检血浆。

2）温育混合液的制备：①取0.2ml 正常对照血浆加0.2ml 缓冲液。②1 ∶2 稀释待检血浆0.2ml 加正常对照血浆0.2ml。③1 3 稀释待检血浆0.2ml 加正常对照血浆0.2ml。将上述混合物置37℃水浴中温育2h。

3）用检测凝血因子Ⅷ的方法，检测以上各种温育混合液中凝血因子Ⅷ促凝活性（FⅧ∶C）。

【计算】

$$\text{剩余FⅧ∶C} = \frac{\text{温育后Ⅷ∶C}}{\text{温育前Ⅷ∶C}}$$

【注意事项】

1）其他凝血因子抑制物检测方法基本类同。

2）正常对照血浆可用日常测定PT、APTT 的标本，收集PT、APTT 正常的血浆混合而得。

【参考值】

无凝血因子Ⅷ抑制物存在时，剩余Ⅷ∶C 为1；有凝血因子Ⅷ抑制物存在时，剩余Ⅷ∶C ＜1。

【临床意义】

剩余Ⅷ∶C ＜1 见于血友病甲等。

五、狼疮抗凝物质检测

狼疮抗凝物质（lupus anticoagulant，LAC）是一种磷脂依赖性的病理性循环抗凝物质，为免疫球蛋白IgG、IgM 或两者混合型的抗磷脂抗体，主要存在于系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病、肿瘤，还可见于动、静脉血栓形成及习惯性流产患者。LAC 由于抑制磷脂的生物学特性，其对血液凝血系统除具有“抗凝”作用外，在临床上更为重要的是它的“促凝”作用，在机体内可抑制抗凝血过程，促进血栓形成。

1．筛选试验

【原理】

在待检血浆中加入激活剂（蝰蛇蛇毒）和钙离子，蝰蛇蛇毒可直接活化凝血因子X，使血浆凝固。若被检血浆中有LAC 存在，则血浆凝固时间延长。

【试剂】

109mmol/L 枸橼酸钠溶液、激活剂和钙离子混合液。

【操作】

1）血液与109mmol/L 枸橼酸钠溶液9∶1 抗凝，3000r/min 离心10min，得贫血小板血浆。

2）取待检贫血小板血浆0.2ml于试管中置37℃水浴中温育3min，加0.2ml激活剂和钙离子混合液，记录血浆凝固时间，重复2～3次，取平均值。

【注意事项】

1）每一次测定必须做正常对照。如果筛选试验结果超过正常对照20%，应加作确诊试验。

2）测定可在自动血凝仪上进行。

【参考值】

（37.5±4.5）s。

【临床意义】

血浆凝固时间延长见于有LAC存在，先天性凝血因子Ⅹ、Ⅴ、Ⅱ缺乏症，口服抗凝剂，肝素治疗以及弥散性血管内凝血等。

2．确诊试验

【原理】

筛选试验结果血浆凝固时间延长的待检血浆，若有LAC存在，则在加入脑磷脂后，脑磷脂能中和LAC，使延长的血浆凝固时间被纠正。

【试剂】

109mmol/L枸橼酸钠溶液、脑磷脂、激活剂和钙离子混合液。

【操作】

同筛选试验。

【注意事项】

每一次测定必须作正常对照。

$$\text{LAC 确诊试验比值}=\frac{\text{筛选试验血浆凝固时间}}{\text{确诊试验血浆凝固时间}}$$

【结果判断】

LAC确诊试验比值0.8～1.2为正常；1.2～1.5为弱阳性；1.5～2.0为阳性；>2.0为强阳性。

【临床意义】

确诊试验阳性见于系统性红斑狼疮、自发性流产、多发性血栓形成等。

第九节　纤维蛋白溶解系统的检测

纤维蛋白溶解（简称纤溶）系统是一系列的酶促反应，一般分为纤溶酶原激活和纤

维蛋白（原）降解两个阶段。使纤溶活性亢进的物质有组织型和尿激酶型纤溶酶原激活剂、纤溶酶等；使纤溶活性减低的主要物质有纤溶酶原激活剂抑制物－1、α_2 纤溶酶抑制剂等。纤溶亢进易发生出血，纤溶减弱则可导致血栓形成。

一、优球蛋白溶解时间测定

优球蛋白是血浆在酸性环境中所析出的蛋白质成分，其中含有纤溶酶原、纤溶酶原激活剂及纤维蛋白原等凝血因子，基本上不含纤溶系统抑制物。当纤溶功能亢进时，血浆中纤溶酶原激活剂及纤溶酶含量增加，表现为纤维蛋白凝块溶解时间缩短。

【原理】

血浆经稀释后，加稀醋酸使pH 值降低至4.5 时优球蛋白组分即沉淀，经离心可除去纤溶抑制物。而沉淀的优球蛋白组分中含各种凝血因子、纤溶酶原和纤溶酶原激活剂等。将此沉淀物溶解于缓冲液中，再加氯化钙使其凝固，置37 ℃下观察凝块完全溶解所需时间即为优球蛋白溶解时间（euglobulin lysis time，ELT）。

【试剂】

1）109 mmol/L 枸橼酸钠溶液。

2）1 %醋酸溶液。

3）硼酸盐缓冲液（pH9.0）：取氯化钠9g，硼酸钠1g，加蒸馏水溶解后，加水至1L。

4）0.025 mol/L 氯化钙溶液或2U/ml 凝血酶溶液。

【操作】

1）取109 mmol/L 枸橼酸钠0.2 ml，加1.8 ml 待检血液，混匀，并分离血浆。

2）取尖底离心管1 只，加蒸馏水7.5 ml，加1 %醋酸溶液约0.12 ml，使pH 值为4.5，置冰浴中。

3）取0.5 ml 血浆加到上述置冰浴中的离心管中，混匀，继续置冰浴中10 min，使优球蛋白充分析出。

4）用3000r/min 离心5 min，倾去上清液，倒置离心管于滤纸上，吸去残余液体。

5）加硼酸盐缓冲液0.5 ml 于沉淀中，置37 ℃水浴中，轻轻搅拌使之完全溶解。

6）加入0.025 mol/L 氯化钙溶液或2U/ml 凝血酶溶液0.5 ml，开动秒表记录凝固时间。

7）置37 ℃水浴中，观察凝块完全溶解并记录时间。

【注意事项】

1）采血时止血带不宜扎得过紧，结扎时间不得超过5 min。

2）第 2）、3）步骤的操作要在15 min 内完成。

3） 观察溶解标本以不见絮状物为准。

4） 当纤溶极度亢进，体内纤溶酶原基本被消耗尽时，本试验可呈假阴性。

5） 采血前应避免过度活动和进食油脂食物。

6） 测定方法除加钙法外还有加凝血酶法。

【参考值】

加钙法：80～280min；加凝血酶法：88～336min。

【临床意义】

1） ELT 缩短（小于70min）：表明纤溶活性增强，见于原发性或继发性纤溶亢进。

2） ELT 延长：表明纤溶活性减弱，见于血栓前状态和血栓形成性疾病。

二、血浆硫酸鱼精蛋白副凝固试验

【原理】

血浆硫酸鱼精蛋白副凝固试验（plasma protamine paracoagulation test，3P 试验）是指纤维蛋白在纤溶酶的作用下产生纤维蛋白降解产物，后者可与纤维蛋白单体形成可溶性纤维蛋白单体复合物。硫酸鱼精蛋白可使该复合物中的纤维蛋白单体游离出来，自行聚合成肉眼可见的纤维状、絮状或胶冻状物质。此种无需凝血酶作用即能发生的凝固称为副凝固现象。

【试剂】

109mmol/L 枸橼酸钠溶液；10g/L 硫酸鱼精蛋白溶液（pH6.5），分装小管，置－20℃中备用。

【操作】

1） 取0.5ml 贫血小板的枸橼酸钠抗凝血浆放入试管中。

2） 置37℃水浴中3min。

3） 加10g/L 硫酸鱼精蛋白溶液0.05ml，混匀，置37℃水浴中15min，立即观察结果。

【结果判断】

阴性：血浆清晰不变，无纤维状、絮状或胶冻状物质产生。阳性：血浆中出现细或粗颗粒沉淀、或有纤维蛋白丝（网）或有胶冻形成。

【参考值】

阴性。

【注意事项】

1） 本试验不能用草酸盐、肝素或EDTA 盐等作抗凝剂。

2） 抽血不顺利、抗凝不完全、标本保存于冰箱、未及时观察结果或输液导管内采

血等均会导致假阳性结果。

3）若水浴温度太低或纤维蛋白原的含量过低均会造成假阴性结果。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

3P 试验阳性：见于弥散性血管内凝血早期或中期，严重创伤、大手术后、咯血、消化道大出血、恶性肿瘤等也可见阳性；3P 试验阴性：可见弥散性血管内凝血晚期和原发性纤溶症。

三、组织型纤溶酶原激活剂活性检测

组织型纤溶酶原激活剂（tissue-type plasminogen activator，t-PA）是一种丝氨酸蛋白酶，由血管内皮细胞的棒管小体产生并储存，在肝脏被清除，其半衰期略短于5min。纤维蛋白是t-PA 激活纤溶酶原必要的辅助条件，有无纤维蛋白存在，其激活纤溶酶原速度可相差400 倍。

【原理】

在t-PA 和纤维蛋白作用下，纤溶酶原转变为纤溶酶，后者使发色底物S-2251 释放出发色基团PNA。PNA 显色的深浅与t-PA 活性（t-PA activity，t-PA:A）呈正相关。

【试剂和器材】

1）商品化试剂盒，内含t-PA 标准品、去t-PA 人血浆、人纤溶酶原、发色底物S-2251、浓缩的TB 缓冲液、纤维蛋白、浓抗凝剂、浓酸化液等。

2）酶标仪、酶标板。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作。

【注意事项】

采血时最好不用止血带，加压后会使t-PA 进入血液。取血后尽快在低温分离血浆；标本必须酸化处理，否则受纤溶酶原激活剂抑制物（PAI）的影响较大。

【参考值】

（1.90±0.71）U/ml。

【临床意义】

1）t-PA:A 增高：表明纤溶活性亢进，见于原发性或继发性纤溶症，如弥散性血管内凝血等。

2）t-PA:A 减低：表明纤溶活性减弱，见于血栓前状态和血栓性疾病，如动脉

血栓形成、深静脉血栓形成、高脂血症、口服避孕药、脑缺血等。

四、组织型纤溶酶原激活剂抗原检测

【原理】

采用双抗体夹心法，将纯化t－PA 单克隆抗体包被在酶标反应板上，加受检血浆。血浆中t－PA 与包被在反应板上的t－PA 抗体结合，再加酶标记的t－PA 单克隆抗体与结合在反应板上的t－PA 结合，最后加底物显色，显色深浅与受检血浆中的t－PA 抗原性（t－PA：Ag）呈正相关。

【试剂和器材】

1）商品化试剂盒，内含已包被抗t－PA 抗体的酶标板、酶标t－PA 抗体、t－PA 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2）酶标仪。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作和计算。

【参考值】

1～12 μg/L。

【临床意义】

同t－PA：A 检测。

五、尿激酶型纤溶酶原激活剂活性检测

【原理】

纤维蛋白原和纤溶酶原在凝血酶和Ca^{2+}的作用下，形成富含纤溶酶原的纤维蛋白多聚体。尿激酶型纤溶酶原激活剂活性（urokinase－type plasminogen activator activity，u－PA：A）检测时，用琼脂糖凝胶使该多聚体固定在琼脂糖凝胶平板之中，然后加纤溶酶原激活剂如尿激酶于凝胶平板孔中。尿激酶立即作用于纤溶酶原，激活的纤溶酶使纤维蛋白多聚体溶解，形成圆形透明溶解斑，溶解斑直径大小与u－PA：A 的对数值成正比。其结果以尿激酶含量表示。

【试剂和器材】

1）纤维蛋白原：由Cohn－I 沉淀制备，蛋白含量12.5g/L，每支0.2ml 分装，冻干。

2）凝血酶：2U/0.2ml，冻干。

3）纤溶酶原：以新鲜正常人血浆，过Lys－sepharose 4B 亲和层析柱，吸附的纤溶酶原用6－氨基已酸洗脱，洗脱的纤溶酶原用9g/L 氯化钠溶液透析数次后，每支1ml 分

装备用（波长280nm 处吸光度值为2.5）。

4） 尿激酶参比标准：效价每支10000U。

5） 孵育箱。

【操作】

1） 取纤维蛋白原1 支溶解成2ml，加纤溶酶原1ml，在45℃条件下与1.6%琼脂糖2ml 混合，快速制成8cm×8cm 凝胶平板。

2） 取冻干凝血酶1 支，用9g/L 氯化钠溶液溶解成2ml，在45℃条件下与16g/L 琼脂糖2ml 混合，再均匀覆盖于上述凝胶平板上面，此时形成毛玻璃状的纤维蛋白凝胶。

3） 在纤维蛋白凝胶上打孔，每孔内径3mm，加不同稀释度的标本每孔10μl，37℃孵育6h，观察结果。纤维蛋白溶解斑（透明）直径与u-PA：A 对数成正比。根据标准品浓度与溶解斑直径在半对数纸上制备的标准曲线，可算出待测标本尿激酶含量。

【参考值】

小于1000U/L。

【临床意义】

在使用尿激酶治疗血栓性疾病时，血液中尿激酶含量升高。根据血浆中尿激酶含量指导合理用药。

六、纤溶酶原活性检测

纤溶酶原（plasminogen，PLG）为单链糖蛋白，主要由肝脏合成分泌入血，其半衰期约为2.2d。当血液凝固时，PLG 大量吸附于纤维蛋白网上，在t-PA 或尿激酶型纤溶酶原激活剂的作用下，激活形成纤溶酶，促使纤维蛋白溶解。

【原理】

受检血浆中加入链激酶和发色底物（S-2251），受检血浆中PLG 在链激酶的作用下，转变成纤溶酶，后者作用于发色底物，释出对硝基苯胺（PNA）而显色。显色的深浅与纤溶酶含量呈正相关，通过标准曲线计算求得血浆中PLG 活性（PLG activity，PLG：A）。

【试剂和器材】

1） 主要试剂：包括链激酶、发色底物、通用参比血浆、通用质控血浆。

2） 自动血凝仪。

【操作】

根据仪器和试剂盒说明书进行操作，一般步骤为：

1） 输入标准曲线信息，用通用参比血浆进行定标。

2） 将待检血浆、通用质控血浆稀释成一定浓度后与链激酶混合反应一定时间，再

加发色底物反应。

3） 记录速率或孵育一定时间测吸光度值。

4） 求出待检标本PLG ：A 。

【注意事项】

1） 每次试验需做质控血浆。

2） 脂浊、黄疸、溶血标本，会使FLG ：A 假性偏高。

【参考值】

0.5～1.40 （5 %～140 %）。

【临床意义】

1） PLG ：A 增高：表示纤溶活性减弱，见于血栓前状态和血栓性疾病。

2） PLG :A 减低：表示纤溶活性增强，见于原发性纤溶、继发性纤溶和先天性PLG 缺乏症。可分为CRM $^{+}$型 （PLG ：Ag 正常而PLG ：A 减低） 和CRM $^{-}$型 （PLG ：Ag 和PLG ：A 均减低）。

七、纤溶酶原抗原检测

【原理】

将纯化的兔抗人PLG 抗体包被在酶标反应板上，加入受检血浆，血浆中的PLG （抗原） 与包被在反应板上的抗体结合，然后加入酶标记的兔抗人PLG 抗体，酶标记的抗体与结合在反应板上的PLG 结合，最后加入底物显色，显色的深浅与受检血浆中PLG 的含量呈正相关。根据受检标本所测得的吸光度值，从标准曲线中计算出血浆中PLG 的含量。

【试剂与器材】

1） 商品化试剂盒，内含已包被兔抗人PLG 抗体的酶标板、酶标PLG 抗体、PLG 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2） 酶标仪。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作。

【参考值】

（0.2 ±0.3） g／L 。

【临床意义】

PLG 含量减低，表明其激活物的活性增强，见于原发性纤维蛋白溶解、重症肝炎、肝硬化、肝叶切除术、门脉高压症、肝移植、大手术、前置胎盘、胎盘早剥、肿瘤扩散、严重感染以及弥散性血管内凝血等。

八、纤溶酶原激活剂抑制物－1 活性检测

在所有纤溶酶原激活剂的抑制物中，以纤溶酶原激活剂抑制物1（plasminogen activatorinhibitor 1，PAI－1）最为重要。血浆中的PAI－1 主要由内皮细胞和肝脏分泌，在体外极不稳定，其活性半衰期约为20 min。血液中纤溶活性调节主要取决于内皮细胞分泌t－PA／PAI－1 的相对比例。血小板中含高浓度的PAI－1，可能是血中PAI－1 的另一重要来源。另外，单核细胞、纤维母细胞、平滑肌细胞和一些恶性肿瘤细胞均能合成并分泌PAI－1。

【原理】

受检血浆中加入纤溶酶原激活剂（tPA）和纤溶酶原，血浆中的PAI－1 和PA 形成复合物，剩余的PA 使纤溶酶原转变成纤溶酶，纤溶酶作用于发色底物（HD－Nva－CHA－Lys－PNA），释出PNA 而显色，其颜色的深浅与剩余的PA 活性呈正相关，而与血浆中PAI－1 活性（PAI－1 activity，PAI－1：A）呈负相关，从而间接测得PAI－1:A。

【试剂与器材】

1）商品化试剂盒，内含标准PAI－1：A，去PAI－1 血浆，其他与t－PA：A 检测发色底物法相同。

2）酶标仪、酶标板。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作。

【注意事项】

1）采血时最好不用止血带，若用止血带则不宜扎得过紧。

2）所用器具均需硅化或用塑料制品。

3）每一步反应的时间必须严格控制。

【参考值】

（6.4±2.6）U／ml。

【临床意义】

1）PAI:A 增高：见于血栓前状态和血栓性疾病。

2）PAI:A 减低：见于原发性和继发性纤溶亢进。

九、α_2－纤溶酶抑制剂活性检测

α_2－纤溶酶抑制剂（α_2－plasmininhibitor，α_2－PI）即α_2－抗纤溶酶（α_2－antiplasmin，α_2－AP）是血浆中抑制纤溶酶活性最主要的物质，由肝脏合成分泌。α_2－PI 抑制纤溶的作用有两方面：①在纤维蛋白形成之时即开始与纤溶酶原竞争纤维蛋白的赖氨酸结合部

位，干扰t－PA／PLG／Fb 之间有效结合；②当纤溶酶游离脱离纤维蛋白后，即将其灭活，防止纤溶酶降解纤维蛋白原。

【原理】

在待检血浆中加入过量纤溶酶，后者即可与血浆中 α_2－PI 结合成复合物。然后加入发色底物S－2251，剩余的纤溶酶可水解底物释放出PNA。其显色的深浅与血浆中剩余的纤溶酶活性呈正相关，与血浆中 α_2－PI 活性（α_2－PI activity，α_2－PI：A）呈负相关。

【试剂与器材】

1）主要试剂：纤溶酶、发色底物、通用参比血浆、通用质控血浆。

2）自动血凝仪。

【操作】

根据仪器和试剂说明书进行操作，具体步骤参见抗凝血酶活性检测。

【注意事项】

1）每次试验需做质控血浆。

2）脂浊、黄疸、溶血标本会使 α_2－PI：A 假性偏低。

3）血浆标本2～8 ℃可保存12h；－20 ℃可保存1 个月。

【参考值】

0.56±0.128（95.6 %±12.8 %）。

【临床意义】

1）α_2－PI:A 增高：表明体内纤溶活性增强，见于静脉和动脉血栓形成、恶性肿瘤和分娩后等。

2）α_2－PI：A 减低：见于肝病以及先天性 α_2－PI 缺乏症（根据 α_2－PI：A 和 α_2－PI：Ag 检测的结果，分为CRM^+型和CRM^-型）。

十、α_2－纤溶酶抑制剂抗原检测

【原理】

采用双抗体夹心ELISA 法，将抗 α_2－PI 抗体包被于酶标板上，加入受检血浆，血浆中 α_2－PI 与包被在反应板上的抗体结合。然后加入酶标记的 α_2－PI 抗体，这种抗体与结合在反应板上的 α_2－PI 结合，加入底物显色。显色的深浅与血浆中 α_2－PI 的含量呈正相关。根据测得的吸光度值，可从标准曲线中计算出血浆中 α_2－PI 抗原性（α_2－PI：Ag）。

【试剂与器材】

1）商品化试剂盒，内含已包被抗 α_2－PI 抗体的酶标板、酶标 α_2－PI 抗体、α_2－PI

标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2）酶标仪。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书。

【参考值】

（66.9 ±15.4）mg/L。

【临床意义】

同血浆 α_2 -PI：A 检测。

十一、纤维蛋白（原）降解产物检测

纤维蛋白（原）降解产物（fibrin degradation products，FDP）是循环中纤维蛋白（原）在纤溶酶作用下所生成的X（X'）、Y（Y'）、、E（E'）碎片的总称，它反映了纤溶系统的总体活性。

【原理】

将抗FDP 的抗体包被于固相载体上，加入含FDP 的待检血浆，FDP 与固相载体上的抗FDP 抗体形成复合物，复合物中的FDP 再与酶标记的抗FDP 抗体结合，生成双抗体夹心复合物，酶使底物显色，其显色的深浅与待检标本中PDF 含量成正比。

【试剂与器材】

1）商品化试剂盒，内含已包被抗FDP 抗体的酶标反应板、酶标记抗FDP 抗体、FDP 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2）酶标仪。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书，并严格按说明书操作步骤操作与计算。

【注意事项】

1）标本用血清或血浆，应稀释后进行测定。标本也可以采用尿液，尿液则不需稀释，可直接测定。

2）每测一次标本均要重新制作标准曲线，且标准曲线的，值须大于0.99。

【参考值】

血液FDP <5mg/L，尿液FDP（28 ±17）μg/L。

【临床意义】

1）血液中FDP 增多：见于原发性纤溶症、弥散性血管内凝血、恶性肿瘤、急性早幼粒细胞白血病、肺栓塞、深静脉血栓形成、肾脏疾病、肝脏疾病、器官移植术后排斥反应、溶栓治疗等。

2）尿液中FDP 增多：见于急性肾炎、慢性肾炎、尿毒症、肾移植术后排斥反应、妊娠毒血症以及弥散性血管内凝血等。

十二、血浆D－二聚体检测

D－二聚体（D－Dimer，D－D）为交联纤维蛋白在纤溶酶作用下所生成的特异性产物，其增多表明体内有纤维蛋白形成及溶解发生，是区别继发性纤溶症与原发性纤溶症的有用指标。测定的方法有定性与定量法。本节介绍定量ELISA 法。

【原理】

抗D－D 单克隆抗体具有较高的特异性，仅与血浆中纤维蛋白裂解产物D－D 发生反应，而与纤维蛋白原的裂解产物不发生反应。将此单克隆抗体包被于固相载体，加入待检血浆后，样本中的D－D 与单克隆抗体形成牢固的复合物，加酶标记的抗体，再加入酶底物显色，即可用比色方法测得待检血浆中D－D 的含量。

【试剂与器材】

1）商品化试剂盒，内含已包被抗D－D 单克隆抗体酶标反应板、酶标抗体、D－D 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2）酶标仪。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书。

【注意事项】

1）待检血浆应用枸橼酸钠、EDTA 二钠和肝素等抗凝剂均可，但抗凝剂用量不应超过血液总体积的10％。

2）待检血浆在室温中保存8h 或4℃保存4d，D－D 含量基本不变；若需长期保存，可置－20℃，检测时置37℃水浴中快速复融。

3）每测一次标本均要重新制作标准曲线，且标准曲线的，值须大于0.99。

4）在加样时，第一份标本和最后一份标本的加入时间间隔不能超过15min。

5）若标本的D－D 含量超过标准曲线的线性范围上限，将标本作适当稀释后再作测定，检测结果乘以稀释倍数。

6）现已有D－D 胶乳试剂盒及金标试剂盒供应，检测更方便，但检测结果不定量。

【参考值】

<0.4mg/L。

【临床意义】

D－D 增多：血栓前状态、血栓性疾病、弥散性血管内凝血、继发性纤溶症（在原发性纤溶症时正常，这是鉴别两者的重要依据）、溶栓治疗有效、出血明显者。

十三、纤溶酶－α_2－抗纤溶酶复合物检测

【原理】

利用双抗体夹心ELISA 法，兔抗人纤溶酶原多克隆抗体包板，将待测标本加入至已包被多克隆抗体的酶标板中，最后加入HRP 标记鼠抗人 α_2－PI 单克隆抗体，加底物显色液，根据酶标仪波长492nm 处的吸光度值来判断标本中 α_2－PI 的含量，间接测算纤溶酶－α_2－抗纤溶酶复合物 (plasmin－antiplasmin complex，PAP) 的含量。

【试剂与器材】

1) 商品化试剂盒，内含兔抗人纤溶酶原多克隆抗体、HRP 标记鼠抗人 α_2－PI 单克隆抗体、PAP 标准品、邻苯二胺、稀释液、洗涤液等。

2) 酶标仪、酶标板。

【操作】

具体操作详见试剂盒说明书。

【参考值】

(0.59 ±0.13) mg/L。

【临床意义】

1) PAP 是纤溶酶与 α_2－PI 形成的复合物，反映人体纤溶系统的状态，PAP 含量增多见于原发性和继发性纤溶亢进。

2) 在弥散性血管内凝血的早期，PAP 含量可正常或轻度下降，而在弥散性血管内凝血的继发性纤溶期，PAP 含量明显增多。

十四、纤维蛋白肽B$\beta_{1\sim42}$、B$\beta_{15\sim42}$检测

当纤溶酶作用于纤维蛋白原时，其最先反应是从Bβ链N 端断裂生成B$\beta_{1\sim42}$相关肽；而当其作用于纤维蛋白时，则从Bβ链N 端断裂生成B$\beta_{15\sim42}$肽。所以，这些相关肽的含量增多表明纤溶酶的激活。

【原理】

层析柱可以根据相对分子质量大小，将大小不同的多肽分离开来，再利用标准品对各种多肽进行定性和定量检测，如果将标准物质和待测样品标记荧光物质可以进一步提高测定的敏感性，从而确定纤维蛋白肽B$\beta_{1\sim42}$和B$\beta_{15\sim42}$的含量。

【试剂及器材】

纯化的人纤维蛋白原、凝血酶溶液、纤溶酶溶液、人纤维蛋白肽B$\beta_{1\sim42}$及B$\beta_{15\sim42}$标准品、甲醇、丙酮、丹磺酰氯、15mol/L 醋酸铵溶液 (用氨水调至pH8.0)、0.2mol/L 醋酸盐缓冲液) 0.2mol/L 碳酸氢钠溶液、高效液相色谱层析仪。

【操作】

1）制备纤维蛋白肽Bβ$_{1\sim42}$、Bβ$_{15\sim42}$及标准品Bβ$_{15\sim42}$：人纤维蛋白原按3g/L溶于醋酸铵溶液，加入凝血酶溶液，使凝血酶终浓度为2u/ml，加入纤溶酶溶液，使纤溶酶终浓度为0.03u/ml，37℃水浴3h后加入2倍体积的甲醇，使蛋白质沉淀；2500r/min离心15min，上清液置沸水中1min，再次离心，取上清液进行分析，并同标准品对照。

2）标准品Bβ$_{1\sim42}$：取纤维蛋白原3.3g/L溶于0.02mol/L Tris－盐酸、0.1mol/L氯化钠、pH7.8之溶液，加入纤溶酶溶液，其余同Bβ$_{15\sim42}$。

3）Bβ$_{1\sim42}$及Bβ$_{15\sim42}$荧光衍生：量取1ng的Bβ$_{1\sim42}$及Bβ$_{15\sim42}$样品，分别放人小试管中，干燥后溶于100μl0.2mol/L碳酸氢钠溶液中，真空抽干，加双蒸馏水100μl溶解，再加丹磺酰氯，混匀后以薄膜封口，避光，37℃孵育1h，黄色消褪即表示反应完成。

4）待测标本制备：静脉血2ml与肝素及抑肽酶混匀，离心后取血浆1ml，加入甲醇3ml沉淀蛋白质，2500r/min离心15min，取上清液，干燥后加入100μl碳酸氢钠溶液，真空抽至干燥，用去离子水100μl，再加丹磺酰氯，混匀后以薄膜封口，避光37℃孵育1h。

5）高效液相色谱：用LC－3型高效液相色谱层析仪，C－18ODS柱，紫外波长210nm，流动相由45％甲醇与0.05mol/L醋酸铵混合组成，荧光激发波长340nm，发射波长560nm，荧光检测流动相由31.7％丙酮与0.2mol/L醋酸盐缓冲液混合组成，流速为1.4ml/min，所有分离于60min内完成。

6）通过微机分析层析物峰高和面积数据，并通过与标准品的比较来算出待测样品中纤维蛋白肽Bβ$_{1\sim42}$及Bβ$_{15\sim42}$的含量。

【计算】

$$S_{标准}/S_{标本}=C_{标准}/C_{标本}$$

式中S代表峰面积；C代表浓度。

【参考值】

Bβ$_{1\sim42}$：0～3.9lnmol/L；Bβ$_{15\sim42}$：0.36～2.76nmol/L。

【注意事项】

标准品、标本制备时应注意封口，避光，37℃孵育，以免荧光强度减弱和标记不完全。层析过程条件要严格控制。

【临床意义】

血浆中纤维蛋白肽Bβ$_{1\sim42}$及Bβ$_{3\sim42}$含量均增多反映继发性纤溶活性增强，见于弥散性血管内凝血、继发性纤溶亢进期等。纤维蛋白肽Bβ$_{1\sim42}$增多而纤维蛋白肽Bβ$_{15\sim42}$不增多，仅见于纤维蛋白原溶解，提示原发性纤溶亢进。显然，这项检测有助于原发性和继发性纤溶亢进的鉴别。

第四章　溶血性贫血的检验

溶血性贫血是由于红细胞破坏增加、寿命缩短，超过骨髓造血代偿能力所发生的一类贫血。典型表现有“三增加”现象，即红细胞破坏增加、间接胆红素增加和网织红细胞增加。根据红细胞破坏场所不同，可分为血管内溶血和血管外溶血；根据溶血发生机制，可分为红细胞内在缺陷和外在因素两大类。红细胞内在缺陷包括红细胞膜结构与功能缺陷、红细胞酶缺陷、血红蛋白异常、卟啉代谢障碍等，外在因素包括免疫因素、感染因素、理化因素、生物因素和其他疾病因素等。

溶血性贫血的检验，首先要检查体内是否存在溶血，其次要进行一系列的病因学方面的检查，包括血液学、临床生物化学和免疫学检查等，才能确定溶血性贫血类型。

第一节　溶血性贫血的筛选检验

一、血浆游离血红蛋白测定

【原理】

血红蛋白中亚铁血红素具有过氧化物酶样活性，在酸性溶液中能催化过氧化氢氧化联苯胺，产生从绿→蓝→紫红色的颜色反应。在一定范围内，其颜色的深浅与血红蛋白浓度成正比。

【试剂】

1）2.0g/L 邻－甲联苯胺醋酸溶液：取邻－甲联苯胺0.2g，溶于60ml 冰醋酸中，再加蒸馏水至100ml。置于棕色瓶内，冰箱保存，可用数周。

2）1％过氧化氢溶液：临用前取3％过氧化氢溶液1 份，加水2 份稀释而成。

3）10％醋酸溶液。

4）血红蛋白标准液：可用商品试剂。或取经9g/L 氯化钠溶液洗涤3 次的浓缩红细胞，用等量蒸馏水溶解后，再加半量四氯化碳，剧烈振摇5min，高速离心取上清液，用氰化高铁血红蛋白法测定其浓度，并用9g/L 氯化钠溶液调节至100g/L，作为贮存标准液，冰箱保存备用。用时稀释成100mg/L 的应用标准液。

【操作】

1）取肝素抗凝血2ml，分离血浆备用。

2）取试管3 支，标明测定管、标准管、空白管。按表2 -4 -1 步骤操作。

3）充分混匀后，在波长435nm 处用空白管调零，读取各管吸光度值。

【计算】

血浆游离血红蛋白（mg/L）＝测定管吸光度值/标准管吸光度值×血红蛋白标准液浓度（mg/L）

表2 -4 -1　血浆游离血红蛋白测定操作步骤

加入物（ml）	测定管	标准管	空白管
被检血浆	0.02		
血红蛋白应用标准液		0.02	
蒸馏水			0.02
联苯胺醋酸溶液	1.0	1.0	1.0
1%过氧化氢溶液	1.0	1.0	1.0
	充分混匀，放置37℃水浴10min		
10%醋酸溶液	10.0	10.0	10.0

【注意事项】

1）所有容器应避免血红蛋白污染。标本勿溶血，以免出现假阳性结果。

2）过氧化氢要新鲜配制，否则检测结果偏低。

3）联苯胺有致癌作用，用时注意安全。

4）本法极灵敏，但特异性不强，易受血浆中肌红蛋白和其他一些具有过氧化物酶样活性物质的影响。

【参考值】

<40mg/L。

【临床意义】

1）蚕豆病、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、溶血性输血反应等血管内溶血性疾病，血浆游离血红蛋白显著增多。

2）珠蛋白生成障碍性贫血、自身免疫性溶血性贫血，血浆游离血红蛋白含量轻度增多。

3）红细胞膜缺陷等引起的血管外溶血，血浆游离血红蛋白含量不增多。

二、血清结合珠蛋白测定

【原理】

向被检血清中加入过量的血红蛋白（Hb），血清中的结合珠蛋白（haptoglobin，Hp）立即与Hb结合而生成Hp－Hb复合物。经电泳后分离出Hb和Hp－Hb两条区带。根据Hb具有过氧化物酶样活性，可以利用显色反应测定两条区带中Hb的含量。Hp对Hb的结合量能间接反映血液中Hp的含量，结果用mg血红蛋白/L表示。

【试剂】

1）巴比妥缓冲液：pH8.6，离子强度0.05。

2）醋酸纤维素薄膜（醋纤膜）浸湿液（pH8.1）：2－氨基2－甲基1，3－丙二醇700mg，硼酸20.6mg，巴比妥钠137.6mg，EDTA48.7mg，乳酸钙25.6mg，加入1mol/L盐酸4.8ml，再加蒸馏水至100ml，置冰箱保存。

3）30%过氧化氢溶液，置冰箱保存。

4）4mol/L硫酸。

5）0.5mol/L盐酸缓冲液（pH4.7）：醋酸钠（含3分子结晶水）34g，加醋酸14.4ml，再加蒸馏水至500ml，加数滴氯仿，混匀，置冰箱中保存。

6）5mmol/L联大茴香胺溶液：联大茴香胺123mg，加分析纯无水乙醇70ml，搅拌至充分溶解，加0.5mol/LpH4.7醋酸盐缓冲液30ml，经滤纸过滤，置棕色瓶内，放冰箱中保存，当溶液出现棕色时应弃去重配。

7）显色剂：临用前，联大茴香胺溶液10ml，加30%过氧化氢溶液0.1ml，混匀。

8）Hb溶液的制备与标化：新鲜抗凝血离心后去血浆，以10倍体积的9g/L氯化钠溶液洗涤红细胞3～4次，最后一次应尽量移去液体，加相当于红细胞容积2～3倍的蒸馏水，再加1体积四氯化碳，用力振摇10s后静置片刻，3000r/min离心5min，吸出上层清亮的Hb液。然后，按照ICSH推荐的氰化高铁血红蛋白方法测定Hb溶液中Hb准确浓度，再用蒸馏水稀释成33g/L的Hb溶液。

【操作】

1）血清0.1ml加33g/LHb溶液10μl，混匀，置37℃水箱中10min。此时标本中Hb的终末溶度为3g/L。

2）在电泳槽中加入pH值8.6巴比妥缓冲液，平衡两槽液面。

3）取2cm×8cm醋纤膜条，置浸液中湿润，用滤纸吸去多余水分。在一端2.5cm处加上述血清约5μl，待血清完全吸入薄膜后，将醋纤膜条置电泳槽上，加盖，平衡10min。选择电压100V，电流0.5mA/cm宽，电泳时间约为40min。此时可见两条Hb区带，阳极侧的一条区带为Hp－Hb，阴极侧的一条区带为游离Hb。切断电源，取出醋纤

膜条，趁潮湿时立即将两条区带分别剪下洗脱。

4）如果遇到只有一条肉眼可见的血红蛋白区带时，要区别是因Hp过多致所加Hb相对不够或是Hp缺如而引起。此时，应将醋纤膜条纵向剪成两条小条，一条用丽春红S染色，另一条用显色剂显色，然后把两小条醋纤膜仍按原样合并在一起，观察联大茴香胺显色区带的位置。若此区带的位置相当于α_2球蛋白位置，即为Hp－Hb区带，表示Hp过高使标本中的Hb全部结合，此时应另取0.1ml血清，加33g/LHb溶液20μl，重新电泳，计算结果时由于稀释倍数增加应乘以系数5500；若此带位置相当于β球蛋白位置，即是Hb区带，表示血清中Hp含量极低或者缺如。

5）洗脱：取2支12mm×100mm试管，编号C、F。各加蒸馏水1.0ml于试管中，将Hp血红蛋白区带剪下放人C管，游离Hb区带剪下放人F管，浸泡30min，混匀，移去醋纤膜条。

6）显色：另取3支16mm×150mm试管，编号为C、F、对照。C管和F管各加相应的上述洗脱液0.2ml，对照管加蒸馏水0.2ml，再各加显色剂1ml，混匀，置37℃水浴10min。取出，各加4mol/L硫酸4ml，充分混匀。

7）比色：选择波长530nm、光径1cm比色杯，以对照管调零，分别读取C管和F管的吸光度值。

【计算】

$$\text{血清Hp含量（mg血红蛋白/L）}=\frac{\text{C管吸光度值}}{\text{C管吸光度值}+\text{F管吸光度值}}\times 3000$$

【注意事项】

1）Hb溶液的浓度标化要准确，严格按照ICSH推荐的氰化高铁血红蛋白法标定。

2）对照管也可用非区带部分的醋纤膜洗脱液作对照。

3）如来不及作显色测定，可将显色液置冰箱内保存，保持24h内检测结果不变。

4）由于测定方法较多，如免疫扩散法、免疫火箭电泳法、免疫散射比浊法等，其操作规程及参考值应以试剂盒内说明为准。

【参考值】

血清Hp含量为（20±360）mg血红蛋白/L。其中男性（42±360）mg血红蛋白/L；女性（42±372）mg血红蛋白/L。

【临床意义】

Hp减少：见于各种溶血、肝脏疾病或无结合珠蛋白血症、巨幼细胞贫血、先天性无结合珠蛋白血症；Hp增高：见于妊娠、慢性感染、恶性肿瘤、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、胆道梗阻、激素疗法或口服避孕药后。

三、高铁血红素白蛋白检测

(一) Schumm 试验

【原理】

高铁血红素白蛋白能与黄色硫化铵饱和溶液形成一个容易识别的铵血色原（ammoniumhemochromogen）。用光谱仪观察结果，若在波长558nm 处有一最强吸收峰，表示有高铁血红素白蛋白存在。

【试剂】

黄色硫化铵饱和溶液：黄色硫化铵100g，加200ml 蒸馏水，放置24h，可见试剂瓶底尚有未溶解结晶即可使用。

【操作】

(1) 取血浆或血清1ml，在上面覆盖一层乙醚，然后加入0.1ml 的饱和黄色硫化铵溶液，混和。

(2) 用分光镜或分光光度计检查，若在波长558nm 处有一强吸收峰，即为阳性。

【临床意义】

正常人呈阴性。若检测结果阳性，提示血管内严重溶血。

(二) 分光光度计法

【原理】

根据高铁血红素白蛋白在624nm 处有强吸收峰性质，将血清或血浆按一定比例稀释后直接用分光光度计检测有无吸收峰。

【操作】

(1) 将血清或血浆高速离心，除去红细胞。

(2) 将血清或血浆（溶血严重标本作一定比例稀释）置1cm 光径比色杯中，以9g／L 氯化钠溶液作对照，用自动记录分光光度计扫描吸收光谱曲线，波长500～700nm，带宽≤1nm。

【结果判断】

若在波长624nm 处出现吸收峰，说明有高铁血红素白蛋白存在。

四、尿含铁血黄素试验

【原理】

又称Rous 试验。尿沉渣中含铁血黄素的三价铁与亚铁氰化钾作用，在酸性条件下，产生蓝色的高铁氰化钾沉淀，即普鲁士蓝反应。显微镜下可见到直径1～3μm 蓝色颗粒

分布于细胞内外。

【试剂】

1）20g/L 亚铁氰化钾溶液：用时新鲜配制。

2）3％盐酸溶液。

【操作】

1） 取混匀的新鲜尿液10ml，以2000r/min 离心5min，倾去上清液。

2） 在沉渣中加入新鲜配制的20g/L 亚铁氰化钾溶液及3％盐酸液各2ml，充分混匀，室温静置10min。

3） 再离心沉淀，取沉淀物涂片，加盖片后用高倍镜（必要时用油镜）检查。

4） 如见有分散的或成堆的直径1～3μm 的蓝色闪光颗粒，排除污染可能，即为阳性，若颗粒在细胞内则结果更为可信。

【注意事项】

1） 所有试管、玻片、试剂均应防止铁剂污染，否则易致假阳性结果。

2） 一般应作阴性对照，如亚铁氰化钾与盐酸混合后即显深蓝色，表示试剂已被污染，该试剂不宜再用。

3） 亦可用硫化铵代替亚铁氰化钾，结果形成不溶解的黑色沉淀，证明有含铁血黄素。此法即为硫化铵法。

【临床意义】

正常人呈阴性。无论有无血红蛋白尿，只要患者存在慢性血管内溶血，尿中有铁排出，本试验即呈阳性，并可持续几周。

五、其他

血清胆红素、尿胆原和尿胆素等项目检测分别见第三篇、第四篇有关章节。

第二节　红细胞膜缺陷的检验

一、红细胞渗透脆性试验

【原理】

测定红细胞在不同浓度低渗氯化钠溶液中的抵抗力。当红细胞处于低渗氯化钠溶液中，水分可渗入红细胞而使红细胞膨胀，膨胀到一定程度后红细胞可破裂发生溶血。这种抵抗力与红细胞表面积/容积的比值有关，比值越大其抵抗力也大，即渗透脆性降低；反之，抵抗力小，渗透脆性增高。

【试剂】

1）1250U/ml 肝素溶液：注射用肝素（12500U/ml）用9g/L 氯化钠溶液稀释10 倍。

2）10g/L 氯化钠溶液：氯化钠1.000g（分析纯，经100 ℃烘干），加双蒸馏水至100ml，混匀。

【操作】

1）取试管12 支，编号排列。

2）各管中分别按表2 -4 -2 加入10g/L 氯化钠溶液和双蒸馏水，将氯化钠溶液稀释成不同浓度。

3）抽取静脉血2ml，用原针头滴加静脉血于上述试管中各1 滴（约0.05ml），轻轻混匀，置室温2h，然后离心沉淀观察结果。

表2 -4 -2　红细胞渗透脆性试验操作步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10g/L 氯化钠溶液	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6
双蒸馏水	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0	0.9
氯化钠浓度（g/L）	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6	6.0	6.4

【结果判断】

从高浓度管开始观察，上清液出现透明红色、管底有红细胞沉淀管为开始溶血管；上清液透明、管底无红细胞沉淀管为完全溶血管。前者为开始溶血浓度，后者为完全溶血浓度。

【注意事项】

1）10g/L 氯化钠溶液要用双蒸馏水配制，加样力求准确。最好新鲜配制。

2）为避免加样错误，也可事先配制不同浓度的氯化钠溶液，存贮于100ml 试剂瓶内（可用1～3 个月）。用时各取2ml 即可。

3）标本可用肝素抗凝血，但以新鲜静脉血为佳。

4）严重贫血者标本，应将标本配成50％红细胞悬液后进行。对严重黄疸标本，开始溶血管不易观察，应用9g/L 氯化钠溶液洗涤红细胞后配成50％红细胞悬液后再作试验。

5）每次试验应同时作正常对照。

【参考值】

开始溶血浓度：4.2～4.6g/L；完全溶血浓度：3.2～3.6g/L。

患者与正常对照，溶血管的氯化钠浓度相差0.4g/L，具有诊断价值。

【临床意义】

1．红细胞渗透脆性增加

1）遗传性球形红细胞增多症、椭圆形红细胞增多症。因红细胞不能容纳正常红细

胞所能容纳的水分，在稍低浓度的氯化钠溶液中，渗入少量水分即可使红细胞膨胀破裂，发生溶血。但有10％上述疾病患者渗透脆性试验结果可正常，可作红细胞孵育渗透脆性试验。

⑵ 自身免疫性溶血性贫血及新生儿溶血病。由于红细胞与自身抗体结合，红细胞形成球形，渗透脆性增加。球形细胞的增多与脆性增加成正比。

⑶ 口形红细胞增多症。

2．红细胞渗透脆性降低

⑴ 各型珠蛋白生成障碍性贫血。由于血红蛋白含量少，红细胞须在更低浓度的氯化钠溶液中渗入更多的水分才能膨胀成球形，因而容易发生破裂而引起溶血。

⑵ 缺铁性贫血。因缺铁，血红蛋白合成减少，致使红细胞表面积/容积之比增大，渗透脆性降低。

⑶ 肝脏疾病。严重肝病时红细胞成棘形，表面积/容积之比增大，渗透脆性降低。

⑷ 阻塞性黄疸和脾切除术后也可见红细胞渗透脆性降低。

二、红细胞孵育渗透脆性试验

【原理】

将被检标本置于37℃水浴24h 后，再进行红细胞渗透脆性试验，测定其溶血情况。由于红细胞在孵育过程中，能量代谢继续进行，贮备的ATP 逐渐减少，导致红细胞膜对阳离子的主动转运受阻，造成Na^+在细胞内聚集而膨胀，红细胞渗透脆性增加。

【试剂】

⑴ 无菌肝素抗凝管：每管加1g/L 肝素溶液0.02ml，烘干。经55.16kPa（8 磅）15min 高压灭菌后备用。

⑵ 9g/L 氯化钠磷酸盐缓冲液（pH7.4，相当于100g/L 氯化钠溶液的渗透压）：氯化钠9.0g（分析纯，经100℃烘干），磷酸氢二钠1.365g 或含12 分子结晶水磷酸氢二钠1.712g，磷酸二氢钠0.184g 或含2 分子结晶水磷酸二氢钠0.243g，加蒸馏水至100ml。置冰箱保存数月。此液为贮存液，临用时用蒸馏水稀释10 倍。

【操作】

⑴ 肝素抗凝血3ml，分为2 份，1 份立即进行红细胞渗透脆性试验；另1 份加塞置37℃水浴24h 后再作红细胞孵育渗透脆性试验。

⑵ 将氯化钠磷酸盐缓冲液按表2－4－3 步骤稀释成不同浓度。

表2－4－3　红细胞孵育渗透脆性试验操作步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9g/L 氯化钠磷酸盐缓冲液	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
双蒸馏水	2.1	2.0	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0
氯化钠浓度（g/L）	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2	5.6	6.0

3）每管加肝素抗凝血0.05ml，轻轻混匀，放置室温（20℃左右）30min。

4）将各管混匀，然后离心取上清液，用分光光度计在波长540nm处，以9g/L氯化钠磷酸盐缓冲液调零点，测定各溶血管上清液的吸光度值。

5）溶血率计算：以1g/L氯化钠完全溶血管的吸光度为100%，从各管的吸光度值计算出相应氯化钠浓度的溶血率。

$$\text{溶血率}\ (\%) = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{完全溶血管吸光度值}} \times 100\ \%$$

6）红细胞中间脆性（MCF）：以溶血率为纵坐标、氯化钠浓度为横坐标作溶血曲线图，即为红细胞渗透脆性曲线。在曲线上，溶血率为50%的氯化钠浓度为红细胞中间脆性。

7）报告形式：以溶血曲线报告或以50%溶血率时的氯化钠浓度报告。

【注意事项】

1）孵育管及抗凝剂应灭菌，以免细菌生长而溶血。

2）血标本和缓冲液的pH值对试验结果影响较大，pH值下降，脆性增加。在孵育中试管应加塞子。9g/L氯化钠缓冲液配制时应标定pH值。

3）温度对试验结果影响也较大，温度升高则红细胞脆性降低，故试验应在规定的温度下进行。但温度高于56℃，则温度升高红细胞脆性反而增加。

4）每次试验应作正常对照。

【参考值】

未孵育时产生50%溶血率氯化钠浓度为4.00～4.40g/L；37℃孵育24h后产生50%溶血率氯化钠浓度为4.80～6.00g/L。

【临床意义】

1）孵育（37℃、24h）后，正常人红细胞渗透脆性可轻度增加，而遗传性球形红细胞增多症、先天性非球形红细胞溶血性贫血患者红细胞渗透脆性显著增加。

2）珠蛋白生成障碍性贫血、缺铁性贫血、脾切除术后等红细胞孵育渗透脆性降低。

三、自身溶血试验

【原理】

检测红细胞在37 ℃水浴箱孵育48h 后，自发产生溶血的程度。由于遗传性非球形红细胞溶血性贫血患者存在红细胞内酶的缺陷，糖酵解发生障碍，能量供应不足，不能维持细胞内外钠离子的平衡，使红细胞在自身血清中经温育而发生溶血。

【试剂】

1）100g/L 葡萄糖溶液（无菌）。

2）9g/L 氯化钠溶液（无菌）。

3）0.4mol/LATP 液：取ATP2.5g 溶于10ml 无菌9g/L 氯化钠溶液中，再用30g/LTris 溶液或0.1mol/L 氢氧化钠调节pH 至6.8。加热消毒后备用。

4）氰化高铁血红蛋白稀释液或0.4g/L 氨水（浓氨水0.16ml，加水至100ml）。

5）无菌肝素抗凝管：每管加1g/L 肝素溶液0.02ml，烘干，经55.16kPa（8 磅）15min 高压灭菌后备用。

【操作】

1）取静脉血4ml，分别加入4 支无菌抗凝管内，每管静脉血1ml，编号，然后按表2-4-4 步骤加入试剂。

2）将1、2、3 号管置37 ℃温育48h；4 号管放4 ℃冰箱48h。

3）将1、2、3 号管血液混匀，测定各管血细胞比容。然后各取血浆0.2ml，加氰化高铁血红蛋白稀释液4.8ml 为测定管。

4）取冰箱保存的4 号管全血0.1ml，加氰化高铁血红蛋白稀释液9.9ml，为溶血对照管。

5）另将4 号管血液离心，取血浆0.2ml，加氰化高铁血红蛋白稀释液4.8ml 作为空白调零，在波长540nm 处测定各管吸光度值。

6）计算各测定管的溶血率。

表2-4-4　自身溶血试验操作步骤

加入物（ml）	1	2	3	4
肝素抗凝血	1.0	1.0	1.0	1.0
100g/L 葡萄糖溶液	0.05			
0.4mol/L ATP 溶液		0.05		
9g/L 氯化钠溶液			0.05	

$$\text{测定管溶血率}\ (\%) = \frac{\text{测定管吸光度值} \times (1 - \text{血细胞比容})}{\text{溶血对照管吸光度值} \times 4} \times 100\ \%$$

【注意事项】

(1) 严格无菌操作。

(2) 若溶血明显可增大稀释倍数。

(3) 由于方法要求较高，如工作量较大或无条件开展的科室可用自溶筛选试验，操作如下：取血3ml，分装于3 支标有A、B、C 的无菌小试管内 (内含无菌肝素溶液0.1ml)。A 管置于室温；B 管置于37 ℃；C 管置于冰箱。各放置24h。取出后离心沉淀，观察上清液有无溶血现象 (最好同时作正常对照)。正常人抗凝血在37 ℃放置24h，仅轻微溶血。各种溶血性贫血溶血均加快，如要分型，则再进行自身溶血试验加以鉴别。

【参考值】

9g/L 氯化钠溶液管 (3 号管) 溶血率<3.5 %，95 %范围为0.4 %～4.5 %；加葡萄糖纠正管 (1 号管) 溶血率<0.6 %，95 %范围为0.3 %～0.7 %；加APT 纠正管 (2 号管) 溶血率<0.4 %，95 %范围为0 ～0.8 %。

【临床意义】

正常血液在37 ℃水浴24 ～48h，无溶血或很少溶血，但有膜缺陷的红细胞糖代谢消耗增加，钠离子经细胞膜进入胞内而积蓄，自身溶血增加，有些疾病加入葡萄糖或ATP 后溶血可纠正。详见表2 -4 -5。

表2 -4 -5　不同疾病的自身溶血试验及纠正试验结果及Dacie 分型

疾　病	9g/L 氯化钠溶液管	加葡萄糖管	加ATP 管	Dacie 分型*
遗传性球形红细胞增多症	↑	明显纠正	明显纠正	Ⅰ
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症	正常或↑	部分纠正	部分纠正	Ⅰ
已糖激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸甘油酸变位酶等缺乏症	轻度↑	纠正	纠正	Ⅰ
不稳定血红蛋白血症	轻度↑	纠正	纠正	Ⅰ/Ⅱ
自身免疫性溶血性贫血	↑	不一定	明显纠正	Ⅱ
丙酮酸激酶缺乏症	中度↑	不纠正	明显纠正	Ⅱ

注：↑示自身溶血增多，*不稳定血红蛋白血症大部分自身溶血异常，加葡萄糖纠正为Ⅰ型，不被纠正为Ⅱ型

四、蔗糖溶血试验

【原理】

蔗糖溶液离子浓度低，经温育通过C3 前活化素系统激活补体经典途径可导致溶血。由于阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者红细胞膜结构异常，在有补体的情况下红细胞膜容

易破坏而发生溶血。

【试剂】

92.4g/L 蔗糖溶液：蔗糖9.24g，加水100ml。冰箱保存，可用数月。

【操作】

1）取109mmol/L 枸橼酸钠抗凝血0.5ml，然后加入92.4g/L 蔗糖溶液4.5ml，混匀，放入37℃水浴30min。

2）取出后，低速离心，观察上清液溶血情况。

3）结果判断：上清液呈红色（溶血）为阳性，上清液呈无色透明为阴性。

【注意事项】

所用器材均应清洁干燥，以免溶血。也可用葡萄糖、乳糖、麦芽糖等替代蔗糖作试验。

【临床意义】

1）阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者呈阳性。

2）正常人和其他溶血性疾病患者均呈阴性。

3）巨幼细胞贫血、再生障碍性贫血、免疫性溶血性贫血、遗传性球形红细胞增多症等患者此试验也可偶有阳性。

4）白血病及骨髓纤维化患者也可出现阳性。

五、酸溶血试验

【原理】

阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者的红细胞有内在缺陷或异常，对补体敏感性很高，特别在酸性（pH6.4～6.5）条件下，红细胞经37℃孵育易发生破坏而溶血。此试验又称为Ham 试验。

【试剂】

0.2mol/L 盐酸、0.154mol/L 氯化钠溶液。

【操作】

1）取患者血5ml 置入离心管内，用玻璃珠搅动脱去纤维蛋白。用3 倍量的9g/L 氯化钠溶液洗涤2 次，最后用9g/L 氯化钠溶液配成50%红细胞悬液。

2）取正常同型血5ml，待凝固后分离血清，取其中2ml 血清置56℃水浴中30min 作为正常灭活血清。另2ml 血如上法制成50%红细胞悬液。

3）取6 支试管编号排列，按表2－4－6 步骤操作。

4）将各管混匀，于37℃水浴中温育1h 后，离心观察结果。

【结果判断】

第2 管有明显溶血，第1 管有轻度溶血，而3、4、5、6 管均无溶血，判为Ham 试验阳性。

【注意事项】

1） 本试验不能用抗凝血，因抗凝剂可阻碍溶血。

2） 宜采用新鲜血清，如血清陈旧，则往往补体失活，会产生假阴性结果。

3） 有时也可用简易试验代替。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

1） 酸溶血试验阳性主要见于阵发性睡眠性血红蛋白尿症。

表2 -4 -6　Ham 试验操作步骤

加入物 (ml)	1	2	3	4	5	6
正常血清	0.5	0.5		0.5	0.5	
正常灭活血清			0.5			0.5
0.2mol/L 盐酸		0.05	0.05		0.05	0.05
患者红细胞悬液	0.05	0.05	0.05			
正常红细胞悬液				0.05	0.05	0.05

2） 遗传性球形红细胞增多症和自身免疫性溶血性贫血可出现假阳性结果，但前者在正常灭活血清内仍呈阳性结果。

【附】 酸溶血简易试验

【操作】

1） 取试管1 支，加9g/L 氯化钠溶液5ml，加入患者末梢血十几滴，混匀，经离心弃去上清液，再加9g/L 氯化钠溶液洗涤1 次，最后配成50%红细胞悬液。

2） 取与患者同血型或AB 血型的正常对照血5ml，其中1ml 用来配成50%红细胞悬液 (经9g/L 氯化钠溶液洗涤2 次后)，余下的待其自然凝固，分离血清。

3） 取2 支试管标明测定管、对照管，按表2 -4 -7 步骤操作。

表2 -4 -7　简易试验操作步骤

加入物 (ml)	测定管	对照管
正常人血清	0.5	0.5
患者红细胞悬液	0.05	
正常人红细胞悬液		0.5
0.2mol/L 盐酸溶液	0.05	0.05

4）各管均置37 ℃水浴箱内1h，观察结果。

【结果判断】

测定管溶血、对照管不溶血为阳性，两管均不溶血为阴性。

【注意事项】

1）标本不宜用抗凝血，因抗凝剂中钾离子、钠离子可影响pH 值。

2）血清酸化后必须塞紧试管，否则二氧化碳逸出会影响血清pH 值。

3）为保证补体充足，最好采用多人混合新鲜血清作为正常人血清。

4）如患者经多次输血，血中异常红细胞相对减少，可造成本试验弱阳性或假阴性结果。

第三节　红细胞酶缺陷的检验

一、高铁血红蛋白还原试验

【原理】

利用亚硝酸盐使红细胞中血红蛋白变成高铁血红蛋白，红细胞内6－磷酸葡萄糖转变为6－磷酸葡萄糖酸的过程中，葡萄糖－6－磷酸脱氢酶起脱氢作用，可使氧化型辅酶Ⅱ变为还原型辅酶Ⅱ。实验中加美蓝（亚甲蓝）起递氢作用，还原型辅酶Ⅱ还有使氧化型谷胱甘肽转变为还原型谷胱甘肽的作用，Fe^{3+}转变为Fe^{2+}。葡萄糖－6－磷酸脱氢酶缺陷者脱氢作用减弱或缺乏，高铁血红蛋白还原率下降。

【试剂】

1）0.4mmol/L 美蓝溶液：美蓝（含3 分子结晶水）15mg，先加少量蒸馏水研磨，溶解后加蒸馏水至100ml。此液可保存3 个月。

2）0.18mol/L 亚硝酸钠和0.28mol/L 葡萄糖混合溶液：亚硝酸钠1.25g，葡萄糖5.0g，加蒸馏水至100ml。贮存于棕色瓶中，置4 ℃冰箱，可保存1 个月。

3）0.02mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.4）：磷酸氢二钠（含12 分子结晶水）5.786g，磷酸二氢钾0.5226g，加水至990ml。

4）109mmol/L（32g/L）枸橼酸钠溶液。

【操作】

1）取静脉血3ml（109mmol/L 枸橼酸钠0.3ml，加血2.7ml），加葡萄糖20mg，轻轻混匀。

2）将标本1000r/min 离心5min，严重贫血标本，吸弃部分血浆，使血细胞与血浆

之比为1∶1。

3）轻轻混匀后吸取1ml 血，加入预先加有美蓝溶液和亚硝酸钠－葡萄糖溶液各0.05ml 的试管中，轻轻来回摇动12 次（使血液与空气充分接触），然后置于37℃水浴箱温育3h。

4）温育后混匀，取血0.1ml 加于10ml 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液中，混匀作为A 管。

5）另取未温育管血0.1ml，加入10ml 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液中，混匀作为B 管。

6）于2min 后在635nm 波长下比色，测得A、B 管吸光度值。然后在B 管中加入0.18mol/L 亚硝酸钠－葡萄糖液0.05ml，混匀，5min 后比色，测得结果作为T 管吸光度值。

【计算】

$$\text{高铁血红蛋白还原率}\ (\%) = \left(1 - \frac{\text{A 管吸光度值} - \text{B 管吸光度值}}{\text{T 管吸光度值} - \text{B 管吸光度值}}\right) \times 100\ \%$$

【注意事项】

1）标本不能有凝块或溶血，以免影响测定结果。

2）血细胞比容<0.30 的标本，应调整红细胞与血浆之比为1∶1 左右，以免结果偏低出现假阳性；对黄疸较严重的标本，需经离心弃去黄疸血浆，用9g/L 氯化钠溶液配成1∶1 红细胞悬液后再测定。

3）草酸盐抗凝剂具有还原性，本实验不宜采用。

4）在急性溶血后由于衰老的红细胞已破坏，而新生的红细胞含有较多的酶，试验结果可能正常，因此，急性溶血患者应在3～4 周后复查。

【参考值】

高铁血红蛋白还原率>75%。

【临床意义】

蚕豆病、伯氨喹啉等药物引起的溶血性贫血患者，高铁血红蛋白还原率可显著降低，其中纯合子患者常在30%以下，杂合子患者约为31%～74%。

二、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶荧光斑点试验

【原理】

在葡萄糖-6-磷酸和氧化型辅酶Ⅱ存在下，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶能使氧化型辅酶Ⅱ还原成还原型辅酶Ⅱ。后者在波长340nm 紫外线照射下会产生荧光。

【试剂】

混合试剂的成分与配方如下：0.1mol/L 葡萄糖-6-磷酸1ml，7.5mmol/L 氧化型辅

酶Ⅱ1ml，0.7mol/LTris－盐酸（pH7.8）3ml，8mmol/L 氧化型谷胱甘肽1ml，10g/L 皂素2ml，蒸馏水2ml，此混合试剂分装后置－20℃保存，可稳定数月。

【操作】

1）标本采集：EDTA 钠盐、ACD 保养液或肝素抗凝全血，若置4℃保存，可稳定1周。亦可用肝素化毛细管从手指或足跟采取末梢血液。

2）取12mm×75mm 试管3 支，标明患者、正常（对照）和阳性（对照）。向试管各加入混合试剂200μl。

3）向各试管分别加入患者、正常和阳性的抗凝全血20μl，混合后置25℃室温中。

4）在反应0min（混合后立即吸出）、5min 和10min 时，分别从各试管吸出反应液1 滴，加于新华1 号滤纸上，使充分干燥。

5）在暗室内，用波长260～340nm 的紫外线照射滤纸上的斑点，检查有无荧光。

【结果判断】

正常人的0min 斑点无荧光，5min 和10min 出现荧光，而10min 斑点荧光最强。葡萄糖－6－磷酸脱氢酶缺乏的患者在0min、5min 和10min 均无荧光。

【注意事项】

1）本法直接测定还原型辅酶Ⅱ的量，特异性较好。

2）每次或每批试验要有葡萄糖－6－磷酸脱氢酶正常和缺陷者的标本作对照。

【临床意义】

葡萄糖－6－磷酸脱氢酶缺陷者荧光很弱或无荧光。杂合子或某些葡萄糖－6－磷酸脱氢酶变异体患者则可能有轻到中度荧光。

三、葡萄糖－6－磷酸脱氢酶测定

【原理】

红细胞葡萄糖－6－磷酸脱氢酶催化葡萄糖－6－磷酸氧化成6－磷酸葡萄糖－δ－内酯，后者很快氧化成6－磷酸葡萄糖酸，同时氧化型辅酶Ⅱ被还原成还原型辅酶Ⅱ。在波长340nm 处测定还原型辅酶Ⅱ的生成量，计算葡萄糖－6－磷酸脱氢酶的活性。

红细胞中还含有6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶，可催化6－磷酸葡萄糖酸脱羧，生成核酮糖－5－磷酸，同时也使氧化型辅酶Ⅱ还原成还原型辅酶Ⅱ。因此，由6－磷酸葡萄糖酸＋葡萄糖－6－磷酸组成的底物系统测得的活性，减去单独6－磷酸葡萄糖酸底物测得的活性，代表真正的葡萄糖－6－磷酸脱氢酶活性。

【试剂】

1）Tris－盐酸－EDTA 缓冲液（pH8.0，Tris－盐酸1mol/L，EDTA5mmol/L）：Tris 30.25g、EDTA 钠盐0.42g，加约200ml 蒸馏水，溶解，以5mol/L 盐酸调pH 至8.0

25 ℃），用蒸馏水稀释至250ml。

2）0.1mol/L 氯化镁溶液：称取5.08g 氯化镁（含6 分子结晶水），溶于蒸馏水中，稀释至250ml。

3）2mmol/L 氧化型辅酶 II 溶液：称取氧化型辅酶 II10mg，加蒸馏水6.5ml，溶解。

4）6mmol/L 葡萄糖－6－磷酸溶液：称取葡萄糖－6－磷酸二钠21.5mg，加蒸馏水10ml，溶解。

5）6mmol/L6－磷酸葡萄糖酸溶液：称取6－磷酸葡萄糖酸三钠20.6mg，加蒸馏水10ml，溶解。

上述各试剂在－20 ℃存放，可稳定数月。

【操作】

1）溶血液制备：新鲜抗凝血用9g/L 氯化钠溶液洗涤数次（3 次以上），除去血浆及白细胞层，然后用9g/L 氯化钠溶液制成血细胞比容为0.30 的红细胞悬液，置冰箱备用。用时以蒸馏水作25 倍稀释，即为溶血液。用氰化高铁血红蛋白法测定溶血液中血红蛋白浓度。

2）取4 支试管，2 支为B 管，2 支为U 管，按表2－4－8 步骤操作。

表2－4－8　葡萄糖－6－磷酸脱氢酶测定操作步骤

加入物（ml）	6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶		6－磷酸葡萄糖酸＋葡萄糖－6－磷酸脱氢酶	
	B	U	B	U
Tris－盐酸－EDTA 缓冲液	0.3	0.3	0.3	0.3
氯化镁溶液	0.3	0.3	0.3	0.3
氧化型辅酶 II 溶液	0.3	0.3	0.3	0.3
溶血液	0.6	0.06	0.6	0.6
蒸馏水	2.4	1.4	2.4	1.4
混匀，置37 ℃水浴10min				
葡萄糖－6－磷酸溶液				0.3
6－磷酸葡萄糖酸溶液		0.3		

混匀，置37 ℃在340nm 波长处每隔1min 读取1 次吸光度值，共6 次。根据5min 吸光度值的变化，求出每分钟吸光度增加的平均值（ΔA/min）。以B 管调零，读U 管吸光

度值。

【单位定义】

根据每升溶血液每分钟催化反应产生1μmol 的还原型辅酶Ⅱ为1 单位，换算成每克血红蛋白的酶活性。先分别求6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶及6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶＋葡萄糖－6－磷酸脱氢酶的活性，再求葡萄糖－6－磷酸脱氢酶的活性。

【计算】

G－6－PD 酶活性（U／L）＝（ΔA×1000）／6.22×3.0／0.06＝（ΔA×8040

式中6.22 为还原型辅酶Ⅱ的毫摩尔吸光系数；3.0 为反应液总体积（ml）；0.06 为溶血液体积（ml）。也可采用下式：

G－6－PD 酶活性（U／g 血红蛋白）＝（ΔA×8040）／血红蛋白（g／L）

葡萄糖－6－磷酸脱氢酶活性＝（6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶活性＋葡萄糖－6－磷酸脱氢酶活性）－6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶活性

【注意事项】

注意试剂的质量，最好同时作阴性对照和阳性对照；水浴和比色时的温度要准确。

【参考值】

葡萄糖－6－磷酸脱氢酶活性为（8.3±1.59）U／g 血红蛋白（37℃）。

【临床意义】

葡萄糖－6－磷酸脱氢酶缺乏者酶活性减低；新生儿或高网织红细胞标本酶活性较高。

四、丙酮酸激酶缺陷筛选试验

【原理】

丙酮酸激酶催化磷酸烯醇丙酮酸转化为丙酮酸，生成的丙酮酸在乳酸脱氢酶的催化下可转化为乳酸，同时，还原型辅酶Ⅰ（有荧光）被氧化为氧化型辅酶Ⅰ（无荧光），通过观察一定时间内荧光的消失情况可判断丙酮酸激酶的活性。又称荧光斑点试验。

【试剂】

反应液的配制：0.5mol／L 磷酸烯醇丙酮酸溶液30ml，30mmol／L 二磷酸腺苷（ADP）溶液100ml，15mmol／L 还原型辅酶Ⅰ（NADH）溶液100ml，80mmol／L 氯化镁溶液100ml，0.25mol／L 磷酸钾缓冲液（pH7.4）50ml，蒸馏水620ml。将上述6 种溶液混合即可（须新鲜配制，以免影响试验结果的准确性）。

【操作】

将1 体积洗涤后的红细胞与4 体积的9g／L 氯化钠溶液混合，配制成的20％红细胞悬液置－20℃以下冷冻，使红细胞完全溶解成血红蛋白液。血红蛋白液10μl 与反应液

100μl 充分混合后，取一小滴在滤纸上点一小斑点，然后在37℃中温育25min，再在滤纸上点第二个斑点，晾干后观察结果。

【结果判断】

1）丙酮酸激酶活性正常：25min 荧光消失（第一个斑点可见明亮的荧光，而25min 后斑点荧光消失）。

2）丙酮酸激酶活性缺乏：25min 后荧光不消失（第二个斑点仍可见明亮的荧光）。

【注意事项】

每次检查均采用已知丙酮酸激酶活性的标本作为对照，有助于结果的判断。

【临床意义】

丙酮酸激酶严重缺乏（纯合子）：荧光60min 内不消失；丙酮酸激酶中间缺乏（杂合子）：荧光25～60min 内消失。

五、丙酮酸激酶活性定量测定

【原理】

同荧光斑点试验。丙酮酸的生成速率与丙酮酸激酶活性成正比，而丙酮酸生成的量与随后反应中NADH 氧化的量相关。由于NADH 在波长340nm 处有一吸收峰，反应过程中NADH 氧化导致波长340nm 处吸光度值降低。

丙酮酸激酶是一种变构酶，在低浓度磷酸烯醇丙酮酸时，丙酮酸激酶活性可被微量的果糖－1，6－二磷酸刺激而增加，因此，应用低浓度果糖－1，6－二磷酸观察丙酮酸激酶被刺激的反应，有助于高浓度磷酸烯醇丙酮酸酶活性近于正常的丙酮酸激酶变异型的诊断。

【试剂】

1mol/L Tris－盐酸缓冲液（含5mmol/LEDTA，pH8.0）；0.1mol/L 氯化镁溶液；2mmol/LNADH 溶液；30mmol/LADP 溶液；60U/ml 乳酸脱氢酶（LDH）溶液；10mmol/L 果糖－1，6－二磷酸（FDP）溶液；50mmol/L 磷酸烯醇丙酮酸（PEP）溶液。

【操作】

1）血红蛋白溶血液的制备：新鲜抗凝血用9g/L 氯化钠溶液洗涤数次（3 次以上），除去血浆及白细胞层，然后用9g/L 氯化钠溶液制成30%的红细胞悬液备用。用时以蒸馏水作20 倍稀释，即为溶血液。可用氰化高铁血红蛋白法测定溶血液中血红蛋白浓度。

2）标本检测：按表2－4－9 列出的量在各管中加入试剂和被检血红蛋白液。

表2－4－9　丙酮酸激酶活性定量测定步骤

加入物（μl）	对照	高浓度磷酸烯醇丙酮酸	低浓度磷酸烯醇丙酮酸	低浓度磷酸烯醇丙酮酸＋果糖－1，6－二磷酸
1mol/LTris－盐酸缓冲液	100	100	100	100
0.1mol/L 氯化镁溶液	100	100	100	100
2mmol/LNADH 溶液	100	100	100	100
30mmol/LADP 溶液	50	20	20	
60U/mlLDH 溶液	100	100	100	100
10mmol/LFOP 溶液	50			
溶血液	20	20	20	20

续表

加入物（μl）	对照	高浓度磷酸烯醇丙酮酸	低浓度磷酸烯醇丙酮酸	低浓度磷酸烯醇丙酮酸＋果糖－1，6－二磷酸
蒸馏水	380	330	455	405
		37℃温育10min		
50mmol/L PEP 溶液	100	100	5	5

（3）以对照管为基准，37℃恒温下，记录波长340nm 处10min 内各测定管的吸光度变化。

【结果计算】

丙酮酸激酶活性（U/g 血红蛋白）＝（100×△A×V_c）/血红蛋白×6.2222×V_h 式中△A 为每分钟的吸光度变化；V_c 为测定体系总体积；V_h 为加入血红蛋白液总量；血红蛋白指血红蛋白液的血红蛋白浓度；6.22 为还原型辅酶INADH 在波长340nm 处的毫摩尔吸光系数。

【注意事项】

（1）血红蛋白液在－20℃存放不宜超过48h，在4℃存放不宜超过8h。

（2）常用抗凝剂有肝素、EDTA、枸橼酸钠和ACD 保养液等，ACD 保养液抗凝效果较好，此抗凝剂中约90%红细胞酶在4℃下仍能保持活性稳定达2 周以上。

（3）处理标本时，尽可能除去红细胞以外的其他细胞成分，因为白细胞中的丙酮酸激酶活性比红细胞中的丙酮酸激酶活性高出数倍。

【参考值】

1）正常成人为（5.0 ±1.99）u/g 血红蛋白。

2）低浓度磷酸烯醇丙酮酸的正常红细胞丙酮酸激酶活性为正常范围的（4.90 ± 3.71）%。

3）低浓度磷酸烯醇丙酮酸加果糖－1，6－二磷酸刺激后正常红细胞丙酮酸激酶活性为正常范围的（3.50 ±2.46）%。

【临床意义】

纯合子患者丙酮酸激酶活性在正常范围的25 %以下；杂合子患者丙酮酸激酶活性为正常范围的25 %～50 %。

第四节　免疫性溶血性贫血的检验

一、抗人球蛋白试验

抗人球蛋白试验（Coombs 试验）是检查结合在红细胞膜上的不完全抗体和C3 补体的一种十分敏感的方法，广泛应用于新生儿溶血病、自身免疫性溶血性贫血和输血反应的检测。其原理是用正常人球蛋白等免疫家兔，使其产生抗人球蛋白抗体（大部分含有抗C3d 等抗体）。该抗体与正常红细胞不起反应，但可与表面上吸附有不完全抗体的红细胞（致敏红细胞）发生凝集反应。

本试验有直接法和间接法两种。

（一）直接抗人球蛋白试验

【原理】

直接抗人球蛋白试验是检查红细胞表面是否吸附着不完全抗体。经9g/L 氯化钠溶液洗涤的致敏红细胞（表面结合有不完全抗体）在9g/L 氯化钠溶液介质中不发生凝集，加入抗人球蛋白血清后出现凝集者即为直接抗人球蛋白试验（Coombs 直接试验）阳性。

【试剂】

1）抗人球蛋白血清：宜使用广谱抗血清（除含免疫球蛋白外，还应含有抗C3d、C3b 抗体）。

2）不完全抗D 血清。

3）阳性对照红细胞悬液：取Rh 阳性的O 型红细胞（最好采自多人的混合血），经9g/L 氯化钠溶液洗涤后，取底层红细胞加等量抗D 血清，置37 ℃温浴1h，取出离心后弃去上清液，再用9g/L 氯化钠溶液配成10 %红细胞悬液备用。

4）阴性对照红细胞悬液：除不用抗D 血清致敏外，按上述（3）配制。

【操作】

1）制备被检标本10％红细胞悬液：取被检红细胞，用9g/L氯化钠溶液洗涤3次后，配成10％红细胞悬液。

2）加样：取试管3支，标明测定管、阳性对照管和阴性对照管，按表2-4-10步骤操作。

表2-4-10　直接试验操作步骤

加入物（滴）	测定管	阳性对照管	阴性对照管
被检标本红细胞悬液	2		
阳性对照红细胞悬液		2	
阴性对照红细胞悬液			2
抗人球蛋白血清	4	4	4

3）观察结果：各管混匀后，放置室温30min观察结果；或1000r/min离心1min，轻轻混匀后观察结果。

【结果判断】

阳性对照管凝集，阴性对照管不凝集，测定管凝集者为直接抗人球蛋白试验阳性；测定管不凝集者为直接抗人球蛋白试验阴性。

【注意事项】

1）标本应新鲜，试管要洁净，避免血浆蛋白污染，以防假阴性。

2）洗涤红细胞既要充分，又要尽可能缩短洗涤时间，以免包被的IgG被洗脱。每次洗涤要尽可能除去液体，加入9g/L氯化钠溶液后要充分混匀。

3）抗人球蛋白血清应按说明书使用最佳稀释度，以免产生前带或后带现象而误为阴性结果。

4）必要时，可将抗血清作倍量稀释，以出现凝集的最高稀释倍数的倒数为直接抗人球蛋白试验的效价。

5）对阴性结果最好进行核实，即在测定管内再加1滴阳性对照红细胞悬液，如出现凝集，则表示测定管内的抗人球蛋白确未被消耗，阴性结果正确。

6）如需检测体内致敏红细胞的免疫球蛋白类型，可分别用单价的抗IgG、抗IgM或抗C3血清进行测定。

7）网织红细胞比例很高的标本、全凝集或冷凝集标本以及脐带血标本等均可出现凝集现象。

【临床意义】

1） 直接抗人球蛋白试验阳性主要见于温抗体（IgG） 型自身免疫性溶血性贫血。

2） 同种免疫性溶血性贫血（新生儿溶血病、血型不合的输血反应） 以及药物免疫性溶血性贫血、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎及恶性淋巴瘤等直接抗人球蛋白试验也可呈阳性反应。

3） 其他由于红细胞表面吸附了抗体进而结合补体（C3） 的疾病，如阵发性寒冷性血红蛋白尿症，直接抗人球蛋白试验也可呈阳性反应。

（二） 间接抗人球蛋白试验

【原理】

间接抗人球蛋白试验是检查血清中是否存在游离的不完全抗体。即先将正常人Rh阳性的O 型红细胞加入被检血清中，若有不完全抗体，则可使红细胞致敏，经洗涤后加入抗人球蛋白血清，发生凝集者即为间接抗人球蛋白试验（Coombs 间接试验） 阳性。

【试剂】

正常人AB 型血清；其他同直接抗人球蛋白试验。

【操作】

1） 取试管3 支，标明测定管、阳性对照管和阴性对照管，按表2 -4 -11 步骤操作。

表2 -4 -11　间接试验操作步骤

加入物（滴）	测定管	阳性对照管	阴性对照管
被检血清	2		
抗D 血清		2	
AB 型血清			2
被检标本红细胞悬液	1		
阳性对照红细胞悬液		1	1

2） 混匀，置37 ℃水浴1h 后，用9g/L 氯化钠溶液洗涤3 次，最后每管配成10 %的红细胞悬液。

3） 每管各加2 滴抗人球蛋白血清，混匀后，放置室温30 min 观察结果；或1000r/min 离心1 min，轻轻混匀后观察结果。

【结果判断】

阳性对照管凝集，阴性对照管不凝集，测定管凝集者为间接抗人球蛋白试验阳性；测定管不凝集者为间接抗人球蛋白试验阴性。

【注意事项】

1）洗涤红细胞要充分、迅速，切勿用手指压住试管口进行颠倒混匀，以免手中蛋白混入而影响试验结果。

2）离心速度与时间要严格控制。原则上应以最小离心力、在最短时间能使阳性对照管出现阳性反应为宜。

【临床意义】

1）间接抗人球蛋白试验常用于Rh 或ABO 妊娠免疫性新生儿溶血病母体血清中不完全抗体的检测以及血型鉴定、输血前交叉配血试验等。

2）严重的自身免疫性溶血性贫血患者间接抗人球蛋白试验也可呈阳性反应。

二、冷热溶血试验

【原理】

阵发性寒冷性血红蛋白尿症是一种自身免疫性溶血综合征。患者体内含有IgG 型低温反应性抗体（Donath—Landsteiner 抗体，即D—L 抗体），在低温（4℃）时可结合于自身或正常人的红细胞上。一旦温度恢复至37℃，在补体的参与下，发生溶血反应。

【试剂】

含补体血清制备：取豚鼠心脏血5ml，分离血清，冰箱保存。临用时以9g/L 氯化钠溶液1∶10 稀释成含补体血清。

【操作】

1）取患者及同型或O 型正常人静脉血各5ml，其中1ml 抗凝，其余4ml 待凝固后分离血清分别为被检血清和正常人血清（均勿冷藏）。被检血清分成两份，一份经56℃水浴30min 灭活成被检灭活血清，另一份不灭活。

2）将抗凝血用9g/L 氯化钠溶液洗涤3 次后，分别配成50%红细胞悬液为被检红细胞悬液和正常红细胞悬液。

3）取试管8 支，编号，按表2—4—12 步骤操作。

4）将各管以1000r/min 离心5min，观察溶血现象。

【结果判断】

第1 管、第2 管溶血，其余各管不溶血为阳性。否则为阴性。

表2－4－12　冷热溶血试验操作步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	5	6	7	8
被检血清	0.5	0.5				0.5	0.5	0.5
正常人血清			0.5		0.5			
被检红细胞悬液	0.5			0.5	0.5	0.05	0.5	
正常红细胞悬液		0.05	0.05					0.05
被检灭活血清				0.5				
9g/L 氯化钠溶液						0.5	0.5	0.5
含补体血清	0.05	0.05	0.05	0.5	0.5			
温育温度（℃）	2	2	2	37	37	37	2	2
温育时间（min）	30	30	30	120	120	120	30	30

【注意事项】

操作过程室温须保持25 ℃以上，但第1 管、第2 管则最好在20 ℃以下操作；应严格控制温育温度和时间。

【临床意义】

1）正常人为阴性。

2）冷热溶血试验阳性者主要见于阵发性寒冷性血红蛋白尿症，亦可见于先天性梅毒、麻疹、水痘、流行性腮腺炎、传染性单核细胞增多症等某些病毒感染。

3）如果作人群普查，可用冷溶血筛选试验。

【附】冷热溶血筛选试验

1）取被检血3 ml，分别加入已预热37 ℃的3 支干燥试管内，每管1 ml，标明A、B、C 管。

2）待凝固后，将A 管置于37 ℃1 h，B 管置于4 ℃1 h，C 管则先置于4 ℃30 min，再置于37 ℃1 h。

3）试验结果如A、B 管不溶血，C 管溶血为阳性。

三、冷凝集试验

【原理】

冷凝集素综合征（CAS）患者血清中存在冷凝集素（IgM），在低温（0～4 ℃）时可使自身红细胞、O 型红细胞或受检者同型红细胞发生凝集，当温度上升至37 ℃后凝集现象消失。

【试剂】

1）9g/L 氯化钠溶液。

2）红细胞悬液：可用被检者收缩之血块制备，挤破血块（除去纤维蛋白），以大量温9g/L 氯化钠溶液洗涤3 次，最后制成50 %红细胞悬液；也可另取与患者同血型的正常人或O 型抗凝血1ml 进行制备。

【操作】

1）抽取患者静脉血4 ～5ml，立即置于37 ℃水浴箱中。

2）血块收缩后，离心分离出血清，置于清洁试管中。

3）第1 支试管加入血清0.5ml，第2 ～17 支试管中各加9g/L 氯化钠溶液0.5ml；第2 支试管再加入血清0.5ml，成两倍稀释，混合后吸出0.5ml 加至第3 管，依次进行至第16 管，稀释倍数为32768；第17 管为9g/L 氯化钠溶液对照。

4）每管各加红细胞悬液0.025ml，混匀后置2 ～5 ℃冰箱中，2h 后取出，立即观察凝集现象，并记录效价。然后再放入37 ℃水浴中温育2h，观察凝集现象是否消失。

【结果判断】

正常人冷凝集素效价小于1∶40。

【注意事项】

1）红细胞悬液制备要用去纤维法，并用温9g/L 氯化钠溶液洗涤。

2）在冬天观察水浴后的凝集情况，动作要快，避免室温影响试验结果。

【临床意义】

1）冷凝集素综合征患者冷凝集试验阳性，冷凝集素效价在1∶1000 以上，以1∶3000 多见。

2）支原体肺炎、传染性单核细胞增多症、疟疾、肝硬化、淋巴瘤及多发性骨髓瘤患者冷凝集素效价亦可增高，但不超过1∶4000。

第五节　血红蛋白异常的检验

血红蛋白异常一般可分两大类：一类是由于珠蛋白基因缺损或缺陷导致珠蛋白肽链的分子结构异常，称为异常血红蛋白；另一类是由于珠蛋白基因缺损或缺陷导致珠蛋白肽链合成不足或完全缺失，称为珠蛋白生成障碍性贫血。目前已发现的异常血红蛋白中，绝大部分是由于单个氨基酸被替换所致，此类血红蛋白可被常规电泳分离检测出来；尚有部分患者，则必须进一步通过其他实验检测、结合临床资料及家族调查等综合分析。而珠蛋白生成障碍性贫血一般采用分子生物学检查来诊断。

一、血红蛋白溶液制备

【原理】

抗凝血经9g/L 氯化钠溶液洗涤后，加蒸馏水溶解红细胞，用四氯化碳（或三氯甲烷）或甲苯提取，得到清晰透明的血红蛋白溶液。

【试剂】

抗凝剂：各种抗凝剂均可使用；9g/L 氯化钠溶液；四氯化碳（分析纯）。

【操作】

1）新鲜抗凝静脉血，离心除去上层血浆、白细胞和血小板等。

2）加入至少5 倍以上量的9g/L 氯化钠溶液洗涤红细胞3 次，最后一次以3000r/min 离心15min。

3）尽量弃去9g/L 氯化钠溶液，每毫升红细胞加1.4ml 蒸馏水和0.4ml 四氯化碳，在旋涡混合器上剧烈震荡5min，使彻底溶血。

4）以3000r/min 离心15mim，吸取上层血红蛋白溶液备用。

【注意事项】

1）标本要新鲜并应尽快除去血浆，以免血红蛋白被氧化为高铁血红蛋白。

2）血红蛋白溶液如需保存，应分装小试管内，有条件者可通人一氧化碳或管道煤气，制成一氧化碳血红蛋白后保存。保存的血红蛋白溶液不宜用于不稳定血红蛋白检查。

二、血红蛋白电泳分析

目前临床实验室常用有醋酸纤维素膜电泳、琼脂糖凝胶电泳、淀粉凝胶电泳、纸上电泳等。由于醋酸纤维素膜碱性电泳具有方法简便、电泳时间短、分辨率高、易于洗脱定量之优点，常用于异常血红蛋白的筛选。

（一）醋酸纤维素膜电泳

【原理】

各种血红蛋白（包括正常的或异常的）分子表面所带电荷性质和数量不同，它们的等电点也不同，在一定电场和pH 值的缓冲液中，其电泳速度和方向也不同。由此可将血红蛋白的不同组分分开，达到分离鉴定的目的。

【试剂】

1）0.26mol/LpH9.1Tris 缓冲液（用于阳极）：Tris252g，EDTA2.5g（或EDTA 二钠2.83g），硼酸1.9g，加水至1L。

2）pH8.6 巴比妥缓冲液（用于阴极）：巴比妥钠5.15g，巴比妥0.92g，加水至1L。

3）醋酸纤维素膜浸泡液：用于阳极和阴极的缓冲液等量混合即可。

4）氨基黑10B 染色液：氨基黑10B1.0g，磺基水杨酸10g，冰醋酸20ml，加水至400ml。

5）漂洗液：乙醇45ml，冰醋酸5ml，加水至100ml。

6）透明液：冰醋酸25ml，无水乙醇75ml。

[操作]

1）浸膜：将醋酸纤维素膜漂浮于浸泡液上，待其均匀浸透后才可使用，至少20min，防止产生气泡。

2）点样：取出薄膜用滤纸吸去多余浸泡液。吸取少量血红蛋白溶液于玻片上，用点样器或用盖玻片蘸取血红蛋白溶液点样于薄膜无光泽面，距阴极端1.5cm 处，点样约3～5μl，同时在平行位置上点上正常血红蛋白溶液作对照。

3）电泳：在电泳槽两侧槽内分别加入等量Tris 缓冲液（阳极）和巴比妥缓冲液（阴极），用两层滤纸或纱布作盐桥，将点样的薄膜搭在滤纸盐桥上，点样面朝下，点样端接负极（巴比妥缓冲液端），平衡5min，然后接通电源，将电压调至150V，电流量约为0.2mA/cm 薄膜宽，电泳20～30min。

4）染色：电泳完毕，取下薄膜置于氨基黑10B 染色液10min 取出，用漂洗液漂洗，换液数次，直至薄膜条呈洁白为止。

5）透明：将醋酸纤维素膜置透明液中浸湿，贴于洁净玻璃板上，用玻棒去除二者之间的气泡。于一层析缸内倒少量冰醋酸，将玻璃板反盖在层析缸上（有薄膜面向内）。以挥发的冰醋酸熏10～20min，待膜透明即可取下。

[结果判断]

1）正常成人的电泳图谱：见图2－4－1。显示4 条区带，最靠阳极端的为量多的血红蛋白A，约占95%，其后为量少的血红蛋白A_2，正常人约占2%～3%，再后为两条量更少的红细胞内的非血红蛋白蛋白质成分（称为NHP_1 和NHP_2）。血红蛋白F 也有可能在血红蛋白A 之后分离出来。

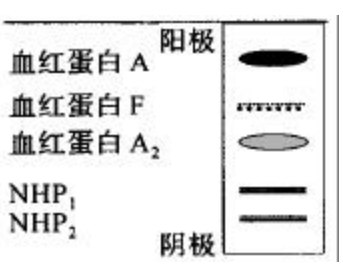


图2－4－1　正常血红蛋白电泳区带示意图

2）异常血红蛋白区带：出现异常血红蛋白区带的位置见图2－4－2。异常血红蛋白可分为H、J、A、G、D、E等6组，H组和J组为快速异常血红蛋白，G、D、E组为慢速异常血红蛋白。如有血红蛋白Barts，则位于血红蛋白H的稍后，两者可以分离。虽然一些最常见和最重要的异常血红蛋白都能用微量电泳法分离，但如果氨基酸的替代或缺失并不引起血红蛋白分子的电荷改变，则通常不能通过电泳方法分离。

【注意事项】

1）由于电泳中许多条件难以恒定，每次电泳分析一定要有正常血红蛋白同时电泳作参比对照。

2）血红蛋白溶液一定要新鲜，陈旧的标本因分解、氧化、沉淀析出等因素，会出现散乱的区带。

图2－4－2　异常血红蛋白电泳区带示意图

3）为保证电泳效果，电泳槽内缓冲液最多使用两次。

4）醋酸纤维素膜在浸泡液中应浸透，以免造成泳速不匀。

（二）琼脂糖凝胶电泳

【原理】

根据血红蛋白中各组分的等电点不同，在一定pH值的电场中，因其所带电荷差异而泳动速度不同，由此可将血红蛋白的各组成分分开。然后，由仪器自动进行染色、脱色、烘干固定，最后，通过扫描并由计算机得到电泳图谱和结果。也称全自动电泳仪分析法。

【试剂】

商品化试剂盒，一般包含琼脂糖凝胶、缓冲液、氨基黑10B等。

【操作】

按仪器要求的操作方法操作。

【结果分析】

1）正常人血红蛋白区带：参见图2－4－1和图2－4－3。

2）异常人血红蛋白区带：以血红蛋白A 为标准，异常血红蛋白可分为较血红蛋白A 泳动快的血红蛋白和较血红蛋白A 泳动慢的血红蛋白两部分。快血红蛋白有血红蛋白H 和血红蛋白J；慢血红蛋白则根据与血红蛋白A 的距离依次为血红蛋白S、血红蛋白D、血红蛋白E 等。见图2－4－4。

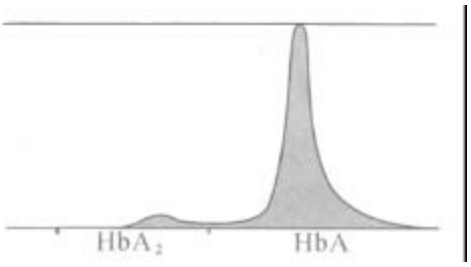


图2－4－3　正常血红蛋白电泳区带图

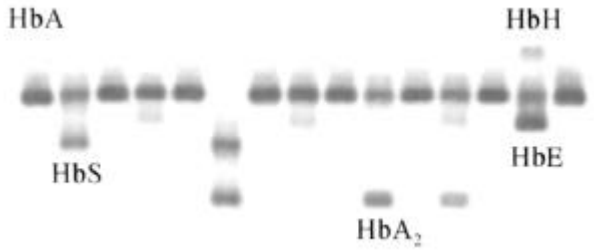


图2－4－4　异常血红蛋白电泳图

【注意事项】

1）建议每次试验做质控品血红蛋白A、F、C 和S 样品。

2）血红蛋白溶液一定要新鲜，陈旧的或冻融的标本因分解、氧化、沉淀析出等原因，电泳后会出现散乱的区带。

3）点样孔内注意不能含有气泡，整个加样过程应在2min 内完成。

三、血红蛋白A_2 定量和异常血红蛋白定量

【原理】

将电泳后的醋酸纤维素薄膜不同区带分别剪下，经洗脱比色，计算出各区带的血红蛋白含量。

【试剂】

醋酸纤维素膜电泳全套试剂、0.4mol/L 氢氧化钠溶液。

【操作】

1）电泳后的薄膜经染色、漂洗干净，将各区带分别剪下，放入相应的加有

0.4mol/L 氢氧化钠溶液试管内。除血红蛋白A 管加10ml0.4mol/L 氢氧化钠溶液，其余试管分别加2ml 氢氧化钠溶液。同时剪1 条与区带相近大小的空白薄膜浸于氢氧化钠溶液，作为空白对照。

(2) 各区带薄膜浸泡洗脱20min，不时振摇，待区带完全洗脱后，将洗脱液混匀，在波长640nm 处用空白薄膜洗脱液调零，测定各管吸光度值。

(3) 有条件可使用全自动电泳仪，最后直接由电脑扫描并计算打印出结果。

【计算】

$$\text{血红蛋白}A_2=\frac{\text{血红蛋白}A_2\text{ 吸光度值}}{\text{血红蛋白A 吸光度值}\times 5+\text{血红蛋白}A_2\text{ 吸光度值}}$$

如果有异常血红蛋白X，则

$$\text{血红蛋白X}=\frac{\text{血红蛋白X 吸光度值}}{\text{血红蛋白A 吸光度值}\times 5+\text{血红蛋白}A_2\text{ 吸光度值}+\text{血红蛋白X 吸光度值}}$$

【注意事项】

(1) 标本点样量不宜过多，以3～5μl 为佳。

(2) 高温天气，洗脱时间不可过长，以免蓝色洗脱液逐渐变成紫红色而影响测定结果。

(3) 由于电泳的影响因素很多，不同的实验室应建立自己的参考范围。

【参考值】

正常人血红蛋白A_2 为0.011～0.032 (1.1%～3.2%)；国内及国外血红蛋白A_2 参考范围详见表2-4-13 和表2-4-14。

表2-4-13　国内正常人群血红蛋白A_2 参考值

方法	均值㧑	95%范围
醋酸纤维素膜电泳法	0.0265	0.015～0.0310
淀粉胶电泳法	0.0221	0.178～0.270
琼脂胶电泳法	0.0670	0.0410～0.0970
滤纸电泳法	0.0306	0.0125～0.0466
EDTA 纤维素柱层析法0.0210	0.0160～0.0250	
DEAE 微量柱层析法	0.0250	0.0130～0.0320

注：摘自魏书珍，张秋业主编．儿科疾病的临床检验 (第2 版) ．北京：人民卫生出版社，1998。

表2－4－14　美国2岁内儿童血红蛋白A_2参考值

年龄（月）	均值聊	±2s
～1	0.08	0.04～0.13
～2	0.13	0.004～0.019
～3	0.22	0.10～0.30
～4	0.024	0.020～0.028
～5	0.25	0.21～0.031
～6	0.25	0.21～0.31
～8	0.027	0.019～0.035
～10	0.27	0.20～0.033
～12	0.27	0.20～0.033
13～16	0.26	0.16～0.33
17～20	0.29	0.021～0.35
21～24	0.28	0.21～0.35

注：摘自Hoffman R，et al. 血液学：基本原理与实践（第3版，英文影印版）. 北京科学出版社，2001。

【临床意义】

1）血红蛋白A_2增多：这是轻型β珠蛋白生成障碍性贫血较恒定的一个重要特征。少数恶性贫血、巨幼红细胞性贫血、某些不稳定血红蛋白病等血红蛋白A_2也会增高。

2）血红蛋白A_2减少：缺铁性贫血、铁粒幼细胞贫血等血红蛋白合成障碍性疾病均可导致血红蛋白A_2降低。

四、抗碱血红蛋白测定

【原理】

血红蛋白F和血红蛋白Barts抗碱变性能力要比血红蛋白A强。当血红蛋白溶液加入碱性物质中作用1min后，加入半饱和硫酸铵终止反应，变性的血红蛋白A可发生沉淀。过滤后用比色方法测定未变性的血红蛋白含量。

【试剂】

1）0.083mol/L氢氧化钠溶液：可用1mol/L氢氧化钠溶液稀释，标定校正至pH12.7后，置于塑料瓶中4℃冰箱贮存。若有沉淀或混浊，应弃去不用。

1）酸性半饱和硫酸铵溶液：取硫酸铵400g 加蒸馏水500ml，于37℃水浴24h，不时搅拌，以便达到过饱和，再冷却至25℃搅拌1 次，使过饱和的硫酸铵析出沉淀，上清液为饱和硫酸铵溶液。取饱和硫酸铵溶液400ml，加等量蒸馏水及1mol/L 盐酸溶液20ml 混匀即成。此液可长期保存。

【操作】

1）取0.083mol/L 氢氧化钠溶液1.6ml 加于试管中，置25℃水浴。

2）待5min 后加0.1ml 被检血红蛋白溶液，立即开动秒表，用吸管洗6 次，轻轻摇动试管10s。此步操作需在20s 内完成。

3）准确计时60s 后，加入酸性半饱和硫酸铵液3.gml，立即颠倒混匀6 次。

4）用滤纸过滤，取滤液在波长540nm 处比色，以蒸馏水作空白，读取抗碱血红蛋白的吸光度值。

5）另取血红蛋白溶液0.02m1，加入5ml 蒸馏水中，混匀，按上述方法比色，读出总血红蛋白的吸光度值。

【计算】

抗碱血红蛋白管的稀释度为51 倍，总血红蛋白管的稀释度为25l 倍，其比值为51：251 =0.203。

$$\text{抗碱血红蛋白} = \frac{\text{抗碱血红蛋白管吸光度值}}{\text{总血红蛋白管吸光度值}} \times 0.203$$

【注意事项】

1）血红蛋白标本必须新鲜制备，陈旧标本测定结果偏低。血红蛋白Barts 虽含7 肽链更多，但其抗碱能力只有血红蛋白F 的70%。

2）试验中试剂使用量和作用时间均须十分准确。

3）碱液浓度应准确，除氢氧化钠溶液外还可用氢氧化钾溶液，但其pH 值必须大于12，校准后最好是小分装密封保存；酸性半饱和硫酸铵溶液，其pH 值应为3.0，宜小批量分装。

4）过滤用纸应为化学试验用品，型号必须稳定，滤液必须清晰透明，否则应重新过滤1 次或离心沉淀。

5）所用试管、吸管等仪器不可沾污酸碱。

6）每次试验最好重复做两份。

【参考值】

抗碱血红蛋白参考值见表2 —4 —15、2 —4 —16。各实验室应建立自己的参考范围。

表2－4－15　不同年龄正常人群血红蛋白F 参考值

年龄	均值±标准差	95％范围
早产儿	0.8171±0.0194	0.7060～0．9140
足月儿	0.6979±0.0147	0.4500～0.8900
新生儿	0.68.39±0.0206	0.4840～0.9280
1～3 个月	0.3574±0.0411	0.0749～0.8170
4～6 个月	0.0808±0.0134	0.0243～0.3940
7～12 个月	0.0339±0.0029	0.0137～0.0078
1～3 岁	0.0258±0.0015 0.0102～0.0473	
4～6 岁	0.0181±0.0012	0.0009～0.0318
7～11 岁	0.0081±0.0006	0.0004～0.0017
12～16 岁	0.0093±0.0006	0.0004～0.0150
成人	0.0103±0.0005	0.0001～0.0275

注：摘自魏书珍，张秋业主编，儿科疾病的临床检验（第2 版），北京：人民卫生出版社，1998。

表2－4－16　美国2 岁内幼儿的血红蛋白F 参考值

年龄	均值	±2s
～7 天	0.75	0.61～0.80
～2 周	0.75	0.66～0.81
～1 个月	0.60	0.46～0.67
～3 个月	0.46	0.15～0.58
～3 个月	0.27	0.094～0.290
～4 个月	0.18	0.023～0.220
～5 个月	0.10	0.027～0.130
～6 个月	0.07	0.230～0.120
～8 个月	0.05	0.020～0.033
～10 个月	0.021	0.015～0.035
～12 个月	0.020	0.013～0.050
～24 个月	0.006	0.021～0．0035

注：摘自Hoffman R，et al。血液学：基本原理与实践（第3 版，英文影印版）。北京：科学出版社，2001。

【临床意义】

1）血红蛋白F 增多见于p 珠蛋白生成障碍性贫血。重型p 珠蛋白生成障碍性贫血患者血红蛋白F 可达80％—90％；轻型p 珠蛋白生成障碍性贫血患者血红蛋白F 也可轻度增高，一般在2％～5％，但也有正常者。

2）血红蛋白F 轻度增高见于急性白血病、再生障碍性贫血、红白血病、恶性肿瘤、遗传性球形红细胞增多症等患者。

3）2 岁以下儿童血红蛋白F 可生理性增多，因此评价血红蛋白F 临床意义应密切结合临床和年龄因素综合考虑。

五、血红蛋白F 酸洗脱试验

【原理】

血红蛋白F 除抗碱能力外，抗酸能力也较血红蛋白A 为强。因此，将血标本在酸性缓冲液中浸洗后，含有血红蛋白F 的红细胞不被洗脱而染色。

【试剂】

1）80％乙醇固定液。

2）0.1mol/L 枸橼酸溶液：无水枸橼酸9.6g，加水至500ml。

3）0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液：磷酸氢二钠（含12 分子结晶水）35.81g，加水至500ml。

4）枸橼酸－磷酸盐缓冲液：取上述0.1mol/L 枸橼酸溶液37.3ml 与0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液12.3ml 混合。H 值应在3.3 ±0.2，必要时可用0.1mol/L 枸橼酸溶液或0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液加以调节。冰箱保存，可用1 周。

5）苏木素染色液：取苏木素1g 溶于10ml 无水乙醇中，另取明矾2g 溶于200ml 蒸馏水中，然后两者混合，煮沸后即加氧化汞0.5g，继续加热至染液变成深紫色为止，随后放人冷水中冷却，次日过滤后备用。

6）10g/L 伊红染色液：取1g 伊红Y 溶于100ml 水中，加1 滴冰醋酸。

【操作】

1）取新鲜干燥血涂片置80％乙醇溶液中固定5min，水洗后自然干燥。

2）将固定后血片放人37℃枸橼酸－磷酸缓冲液中5min，随后取出，水洗后自然干燥。

3）在苏木素染色液中染色1min，使血片中的白细胞经染色后与阳性红细胞相区别。

4）水洗后，再用伊红染色液染色1min，水洗，干后镜检。

5）油镜下，含有血红蛋白F 的红细胞被伊红染成鲜红色，为阳性红细胞；仅留下淡影细胞膜者为阴性红细胞。计数1000 个红细胞中阳性红细胞所占百分率。

【注意事项】

1）血片要新鲜，应在2h 内固定染色，以免出现假阳性。

2）血涂片要薄，细胞均匀平铺，便于镜下观察。

3）缓冲液的pH 值、温度、染色时间应严格控制。必要时可用瑞特染液同时作对比染色。

【参考值】

红细胞血红蛋白F 阳性率脐带血几乎100％，新生儿为55％～85％，1 个月后的婴儿67％左右，4～6 个月婴儿偶见，正常成人在1％以下。

【临床意义】

1）重型β珠蛋白生成障碍性贫血血红蛋白F 阳性率与脐带血一样，可高达100％；轻型β珠蛋白生成障碍性贫血仅有少数红细胞血红蛋白F 阳性，而且细胞着色深浅不一。

2）遗传性血红蛋白F 持续综合征患者，红细胞均呈均匀红色，纯合子型染色深度与脐带血血片相似，而杂合子型的染色稍淡些，但也均匀一致，这一点可与轻型β珠蛋白生成障碍性贫血的红细胞染色深浅不一鉴别。

3）某些血液病如再生障碍性贫血、溶血性贫血等标本可出现少量血红蛋白F 阳性红细胞。

六、异丙醇试验

【原理】

异丙醇属非极性溶剂，它可使血红蛋白分子中的氢键结构破坏，稳定性下降。正常血红蛋白在17％异丙醇溶液中37℃保温40min 仍清晰透明或微混，而不稳定血红蛋白在5min 内即可产生混浊、沉淀。

【试剂】

1）0.1mol/LTris 缓冲液（pH7.4）：取三羟甲基氨基甲烷1.21g，先溶于少量蒸馏水中，以0.1mol/L 盐酸溶液校正至pH7.4（约需0.1mol/L 盐酸溶液70～80ml），最后加蒸馏水至100ml。密封冰箱保存。

2）17％异丙醇溶液：取异丙醇17ml 于100ml 容量瓶中，加pH7.4Tris 缓冲液至刻度，加盖密封，置冰箱内可保存1 周。

3）四氯化碳提取的血红蛋白溶液。

【操作】

1）取有塞试管2 支，各加17％异丙醇溶液2ml，置37℃水浴预热5min。

2）两管分别加入待测定和正常对照血红蛋白溶液0.2ml，混匀，塞紧塞子，立即

放入37 ℃水浴箱内并记时。

【结果判断】

如5 min 内出现浑浊，20 min 出现大块沉淀为强阳性；如20 min 内出现浑浊，40 min 内出现绒毛状沉淀为弱阳性，表示有不稳定血红蛋白存在（如血红蛋白M、血红蛋白H、血红蛋白E）；如40 min 时仅稍浑浊而无沉淀者为阴性。正常对照血红蛋白在40 min 时应无沉淀。

【注意事项】

1）本法影响因素较多，各项实验条件要严格控制，否则易导致假阳性。温度要控制在37 ℃；pH 值不得低于7.2；血红蛋白含量应在100 g/L 左右，不得低于75 g/L。

2）标本要新鲜，如保存过久，出现高铁血红蛋白，可导致假阳性结果。

3）高血红蛋白F 及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏的标本也可导致假阳性结果。

4）试剂配制后不宜放置过久，否则易导致假阴性结果。

5）每次最好用脐血作阳性对照。

【参考值】

6 个月后的小儿和成人均为阴性；1 个月内婴儿可出现阳性。

【临床意义】

异丙醇试验阳性提示存在不稳定血红蛋白如血红蛋白H、血红蛋白M、血红蛋白E，需作进一步鉴定才能确定为哪一种血红蛋白。

七、热不稳定试验

【原理】

不稳定血红蛋白对热不稳定，加热50 ℃即可出现沉淀。根据加温后血红蛋白溶液浓度的降低可计算出被沉淀的不稳定血红蛋白量。

【试剂】

1）0.1 mol/L Tris 缓冲液（配制见异丙醇试验）。

2）氰化高铁血红蛋白稀释液：取碳酸氢钠0.1 g，氰化钾5 mg，高铁氰化钾20 mg，加蒸馏水至100 ml。

【操作】

1）取血红蛋白溶液0.5 ml 加入5 ml 0.1 mol/L Tris 缓冲液中，混匀。

2）取试管两支，各加上述混匀液2 ml 后加塞，一管置于冰箱内作对照管，另一管作测定管，置于50 ℃水浴箱内并记时。

3）水浴2 h 后同时取出两管，以3000 r/min 离心5 min。

4）每管取0.1 ml 上清液，各加5 ml 氰化高铁血红蛋白稀释液，混匀。然后于空白

管内加入Tris 缓冲液0.1ml 和氰化高铁血红蛋白稀释液5ml 作对照。

5） 以空白管调零，在波长540nm 处测各管吸光度值。

【计算】

$$\text{不稳定血红蛋白（\%）} = \frac{\text{对照管吸光度值} - \text{测定管吸光度值}}{\text{对照管吸光度值}} \times 100\%$$

【注意事项】

1） 被检血红蛋白液要新鲜，因陈旧血红蛋白可转变为高铁血红蛋白而导致试验结果假阳性。

2） 严格控制试验条件，时间要准确，温度要恒定，以免导致试验结果假阳性。

【参考值】

不稳定血红蛋白（%）不超过5%。

【临床意义】

试验阳性结果提示有不稳定血红蛋白。

八、血红蛋白H 包涵体检测

【原理】

血红蛋白H 等不稳定血红蛋白，离体后在37℃中能与氧化还原染料煌焦油蓝发生蓝色沉淀反应，称为血红蛋白H 包涵体。现有人认为，这种包涵体与Heinz 小体为同一性质（即变性珠蛋白）的不同表现形态。

【试剂】

10g/L 煌焦油蓝溶液：煌焦油蓝1g，拘橼酸钠0.4g 溶于9g/L 氯化钠溶液100ml 中，临用前过滤，冰箱保存备用。可保存2 个月。

【操作】

1） 取试管1 支，加煌焦油蓝溶液0.5ml，加末梢血或静脉血4 滴，混合后加塞，置于37℃水浴中。

2） 在10min、1h 及24h 各取出1 滴血，制成薄涂片，立即风干。

3） 在油镜下观察，计数500 个红细胞，记录出现大小不等、数目不一、有折光的蓝色颗粒小体的红细胞数目，求出其阳性百分率。

【注意事项】

1） 制片后应及时计数。涂片存放过久，包涵体会消失。必要时涂片可存放于干燥器或37℃保温箱内。

2） 制片后不能用伊红美蓝染色液复染，否则计数结果偏低。

3） 包涵体需与网织红细胞鉴别。前者颗粒较大，呈圆形，弥散分布，整个红细胞

基质消失，而且需要温育10min 以上才能逐渐显象；后者颗粒分布一般呈蜘蛛网状，红细胞基质完整，与煌焦油蓝混合5～10min 便显象出来。

4） 其他不稳定血红蛋白也可产生包涵体，但需温育更长时间才能形成。

【参考值】

正常人群在1％以下。

【临床意义】

血红蛋白H 病，其血红蛋白H 包涵体可高达50％；而轻型α珠蛋白生成障碍性贫血患者偶见血红蛋白H 包涵体增多。

九、红细胞镰变试验

【原理】

在低氧分压条件下，各种血红蛋白可转变为还原状态。血红蛋白S 在还原状态下溶解度明显降低，从可溶状态聚合成短棒状凝胶，使红细胞变形呈镰刀状，称为镰变。在红细胞悬液中加还原剂以除去氧，如出现镰状细胞表明有血红蛋白S 存在。

【试剂】

1） 20g/L 偏重亚硫酸钠溶液：偏重亚硫酸钠（$Na_2S_2O_5$）200mg 溶于10ml 刚煮沸但已冷却的蒸馏水中（要新鲜配制）。

2） 凡士林－液体石蜡混合液：将两者等量混合加热溶解后备用。

【操作】

1） 取被检血1 滴于玻片上，加1 滴20g/L 偏重亚硫酸钠溶液，混匀。

2） 在血滴上加一盖玻片，然后用凡士林－液体石蜡混合液封固好盖玻片，将已封固的玻片置37℃保温箱。

3） 分别于15min、30min、60min、120min 及24h 用高倍镜观察有无镰状红细胞产生。计算镰状红细胞占观察红细胞的百分率。

4） 另取1 滴9g/L 氯化钠溶液代替还原剂作对照试验。

【注意事项】

1） 标本必须新鲜，否则含血红蛋白S 的红细胞与空气中的氧接触较长时间后，不易发生镰变反应。

2） 在保温期间为防止标本变干，可将标本隔水放人水浴箱内。

3） 应观察24h，如无镰状红细胞出现才可报告试验结果阴性。

4） 在输血后作此检查，结果可呈现假阴性。

【参考值】

血液中无镰状红细胞。

【临床意义】

1）纯合子型镰状细胞性贫血患者镰状红细胞可高达100％，杂合子型患者为50％左右。

2）其他一些血红蛋白异常，如含有血红蛋白I、血红蛋白C、血红蛋白Barts等患者也可出现红细胞镰变，但数量较少。

十、血红蛋白S溶解度试验

【原理】

在氧合状态下，血红蛋白S和血红蛋白A的溶解度相同；但在低氧分压情况下，血红蛋白S在2.5mol/L磷酸盐缓冲液中溶解度明显降低而发生沉淀。

【试剂】

1）连二亚硫酸钠（$Na_2S_2O_4$）粉末。

2）2.5mol/L磷酸盐缓冲液：磷酸氢二钾21.8g，磷酸二氢钾17.0g，加蒸馏水至100ml。

【操作】

1）血红蛋白溶液的制备：见前述。

2）取试管1支，加连二亚硫酸钠粉末20mg，再加2.5mol/L磷酸盐缓冲液1.8ml，使粉末溶解。

3）加被检血红蛋白溶液0.2ml，充分混匀，15min后用滤纸过滤。

4）取滤液0.2ml，加入含有连二亚硫酸钠粉末20mg的磷酸盐缓冲液3.8ml中，颠倒混匀3次。此管作为测定管。

5）另取被检血红蛋白溶液20μl，加入4ml蒸馏水中作为对照管。

6）上述两管经离心后取上清液在波长420nm处测定吸光度值，用蒸馏水调零。

【计算】

$$\text{可溶性血红蛋白}\ (\%) = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{对照管吸光度值}} \times 100\%,$$

$$\text{血红蛋白S}\ (\%) = 100 - \text{可溶性血红蛋白}\ (\%)$$

【注意事项】

1）高脂血症、多发性骨髓瘤、冷球蛋白血症等标本试验结果可出现假阳性；近期大量输血、新生儿及6个月以下婴儿标本可出现假阴性。

2）不同异常血红蛋白的溶解度不同，几种杂合子异常血红蛋白的溶解度依次为血红蛋白A＞血红蛋白G＞血红蛋白S，因此，单纯溶解度降低还不足以诊断血红蛋白S，必须结合其他检查诊断。

【参考值】

正常人群血液中不存在血红蛋白S。

【临床意义】

还原型血红蛋白S 溶解度降低是血红蛋白S 的特征。本试验主要用于诊断血红蛋白S，特别是与泳速相近的血红蛋白C 相区别，前者溶解度降低，后者溶解度正常。

十一、血红蛋白C 试验

【原理】

血红蛋白C 病患者的红细胞经染色后，可见红细胞内有棒状或六角形结晶体。在30g/L 氯化钠溶液中经37 ℃温育后结晶体更加明显。

【试剂】

30g/L 氯化钠溶液、瑞特染液。

【操作】

1）按常规制成血片及较厚血片数张，自然干燥，瑞特染色。

2）取小试管1 支，加30g/L 氯化钠溶液2 滴，被检血1 滴，混匀后加塞。置37 ℃温育1h，取出后制成血片，干后瑞特染色。

3）油镜下观察红细胞内有无棒状或六角形结晶。

【参考值】

正常人群血液中不存在血红蛋白C。

【临床意义】

血红蛋白C 病患者血液中，除靶形红细胞占40 %～90 %外，可见棒状或六角形结晶体，尤其是血片干燥缓慢时和患者脾切除术后。血标本加氯化钠溶液经37 ℃温育后，结晶体几乎出现于每个红细胞内，这对血红蛋白C 病诊断有很大价值。

十二、异常血红蛋白肽链分析

【原理】

在血红蛋白溶液中加入尿素和2 －巯基乙醇，使珠蛋白裂解为α和非α两种肽链，称为尿素裂解法。

【试剂】

1）pH8.5TEB 缓冲液：Tris10.2g，EDTA0.6g，硼酸3.2g 加水至1L，调pH 至8.5。

2）裂解液：尿素5.4g，2 －巯基乙醇2ml，加pH8.5TEB 缓冲液至10ml。

3）浸膜液：尿素48g，Tris1.14g，EDTA 钠盐0.12g，硼酸0.32g，加水至100ml。

4）电泳槽缓冲液：硼砂6.87g，硼酸5.56g，加水至1L，调pH 至8.5。

【操作】

1）取被检血红蛋白溶液0.1ml，加裂解液0.4ml，混匀，在室温中放置15～30min。

2）将醋酸纤维素膜用浸膜液浸泡完全，吸干后在膜中间划一加样线，按血红蛋白电泳法加样和电泳，时间约30min。

3）氨基黑10B 或丽春红S 染色、漂洗后判读结果。

【结果判断】

血红蛋白被裂解后，其中血红素游离出来，在电泳中迅速泳向正极并消失在电泳槽中。故在醋纤薄膜上仅见两条不含血红素的区带。β肽链带负电荷较多，向正极泳动快；α肽链向负极泳动。α肽链未裂解的血红蛋白A 则稍向正极泳动，在β带之后，含量极微。

如有异常血红蛋白可在β链和α链区带之外出现另一区带。通常在β带近旁者为β肽链异常的血红蛋白；在α带近旁者为α肽链异常血红蛋白。如在β带和α带之间出现异常区带者，则可参考血红蛋白电泳中异常血红蛋白的位置再作进一步分析。

【注意事项】

每次试验均应同时作正常对照试验；被检血红蛋白液裂解时间不得超过4h。

【参考值】

血红蛋白A 裂解后可电泳出4 条区带，分别为β带、血红蛋白A 带、血红蛋白A_2带、α带。

【临床意义】

若有异常血红蛋白，则出现异常血红蛋白和异常肽链；肽链合成速率检测对珠蛋白生成障碍性贫血的诊断有参考价值。

第五章　骨髓细胞形态学检验

第一节　骨髓细胞的生成和发育

骨髓细胞的生成和发育包括增殖、分化和成熟。所有的血细胞均来源于造血干细胞，细胞的发育顺序为干细胞→祖细胞→原始细胞→幼稚细胞→成熟细胞，详见图2－5－1。

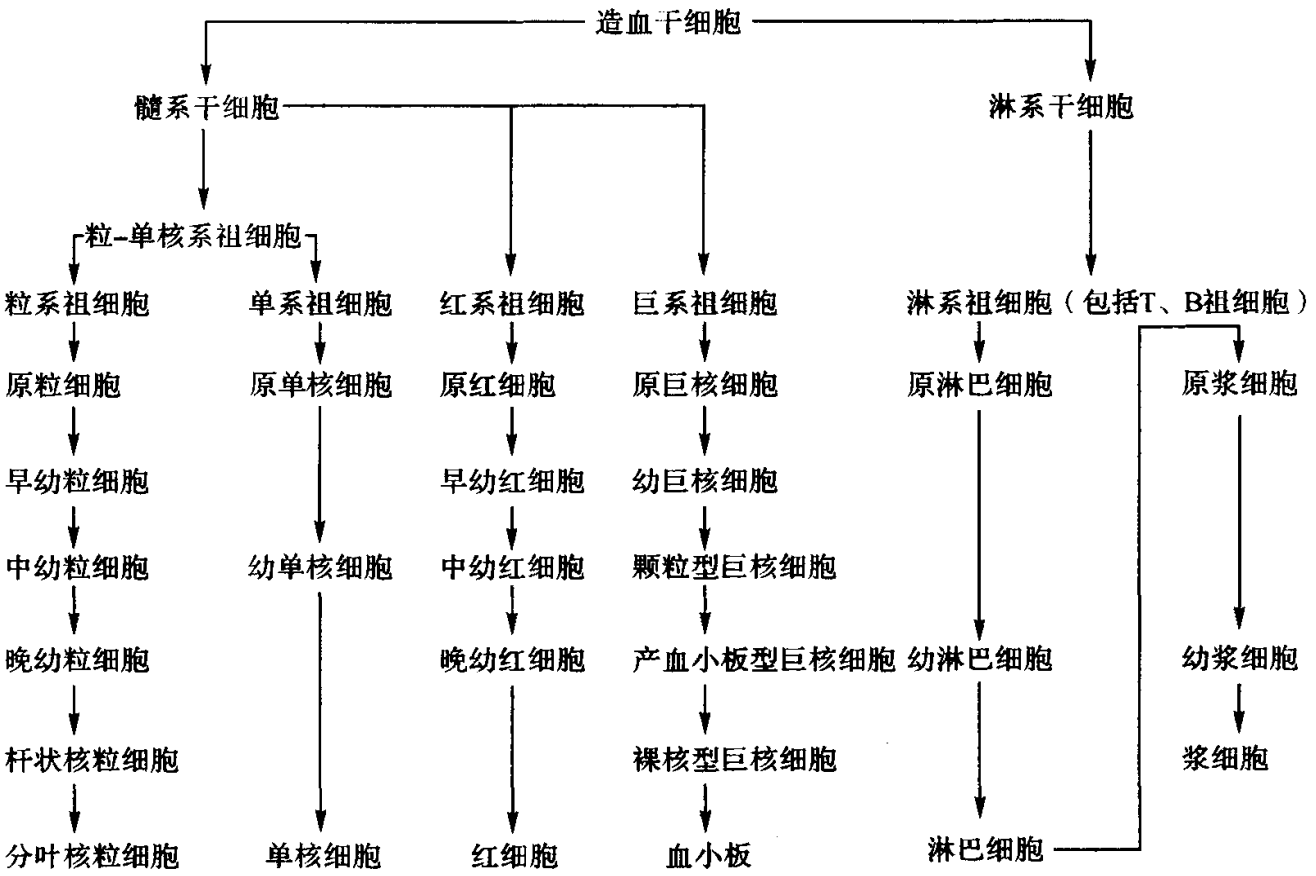


图2－5－1　各系血细胞的生成和发育模式简图

一、细胞的增殖

细胞的增殖是指一个母细胞通过分裂，形成2 个与母细胞有相同特性子细胞的过

程。细胞的增殖分为G_0期（静止期）、G_1期（DNA合成前期）、S期（DNA合成期）、G_2期（DNA合成后期）、M期（分裂期）。骨髓细胞主要分裂方式是有丝分裂，分为前期、中期、后期及末期，各期形态特点为：

1）前期（又称为单丝球期）：核膜模糊不清，核仁消失，核染色质由细变粗，聚集成染色体，宛如线团。

2）中期（又称为单星状期或赤道板期）：核膜完全消失，染色体呈“V”形，移向赤道板，在赤道板呈辐射状、星状排列。

3）后期（又称为双星状期或两极期）：核染色体数目增加一倍，平均分开，呈双星状，并移向细胞两极。

4）末期（又称为双丝球期）：胞质中间部位收缩呈哑铃状或以细丝相连，双星状核逐渐形成两个线团样核。

二、细胞的分化

细胞的分化是指细胞发育过程中失去某些潜能同时又获得新功能的过程。在这一阶段的细胞，其内部发生了某些变化，但形态学上尚无法辨认。具有分化能力的干细胞包括造血干细胞、髓系干细胞、淋系干细胞。造血干细胞具有高度的自我更新能力和多向分化能力，它可通过分化形成各种血细胞。髓系干细胞可分化为红系、粒系、巨核系、单核系等祖细胞，淋系干细胞可分化为T淋巴细胞祖细胞和B淋巴细胞祖细胞。祖细胞根据分化能力分为两种即多向祖细胞和单向祖细胞。粒－单核系祖细胞是一种多向祖细胞，它可分化为粒系祖细胞、单核系祖细胞，这两种祖细胞和其他祖细胞（如红系祖细胞、巨核系祖细胞、T淋巴细胞祖细胞、B淋巴细胞祖细胞）都是单向祖细胞，只能向单个细胞系统发育。

三、细胞的成熟

骨髓细胞的成熟是指原始细胞经幼稚阶段到成熟阶段细胞的发育过程。骨髓细胞分为髓系细胞和淋系细胞，前者分为粒细胞系统、红细胞系统、单核细胞系统、巨核细胞系统；后者分为淋巴细胞系统、浆细胞系统（有人将两者合称为淋巴－浆细胞系统）。每一个系统的细胞根据细胞成熟程度分为原始细胞、幼稚细胞和成熟细胞，细胞的划分是人为的，实际上细胞的发育是一个连续的过程。虽然每个系统的细胞形态各有其特点，但各种原始细胞到成熟细胞的发育过程具有一定形态学演变规律，详见表2－5－1。

第二节　正常骨髓细胞形态学

一、粒细胞系统

表2 —5 —1　骨髓细胞成熟过程中细胞形态的演变规律

项　　目	细胞形态变化规律	备　　注
胞体大小	大→小	巨核细胞由小变大，早幼粒细胞比原粒细胞大
核浆比例	大→小	
胞核大小	大→小	巨核细胞的核从小到大，成熟红细胞无核
核仁	有、清楚→模糊→无	有的成熟细胞中可见假核仁，原巨核细胞核仁常不清楚
核染色质	细致→粗	
核形	圆形→凹陷→分叶	有的细胞不分叶，如红细胞系统的核呈圆形
胞质量	少→多	小淋巴细胞除外
胞质嗜碱性	强→弱	
胞质颗粒	无→有	红细胞系统无颗粒

粒细胞系统有6 个阶段的细胞，包括原粒细胞、早幼粒细胞、中幼粒细胞、晚幼粒细胞、杆状核粒细胞和分叶核粒细胞。从中幼粒细胞阶段开始出现特异性颗粒，根据特异性颗粒不同又将中幼粒以下细胞分为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。粒细胞从原始到成熟的发育过程中，形态变化主要特征为：①胞体形态无明显变化，为圆形或类圆形；②颗粒变化的一般规律为：无颗粒→出现非特异性颗粒（又称为A 颗粒或嗜苯胺蓝颗粒）→出现特异性颗粒（即中性颗粒或嗜酸性颗粒或嗜碱性颗粒）→特异性颗粒增多、非特异性颗粒减少→仅有特异性颗粒；③核形变化的一般规律为：圆形→椭圆形→核一边扁平→肾形口→杆状→分叶状。各期粒细胞形态特点及粒细胞4 种颗粒的鉴别分别见表2 —5 —2 、表2 —5 —3 。

嗜酸性粒细胞包括嗜酸性中幼粒细胞、嗜酸性晚幼粒细胞、嗜酸性杆状核粒细胞、嗜酸性分叶核粒细胞。其特点基本上与同一阶段的中性粒细胞相似，最主要的不同之处为胞质中的特异性颗粒为嗜酸性颗粒而不是中性颗粒，而且其胞体比中性粒细胞略大些。

嗜碱性粒细胞包括嗜碱性中幼粒细胞、嗜碱性晚幼粒细胞、嗜碱性杆状核粒细胞、

嗜碱性分叶核粒细胞。其特点也基本与同一阶段的中性粒细胞相似，除特异性颗粒不同外，其胞体比中性粒细胞略小，成熟嗜碱性粒细胞胞质偏红、核结构常不清楚。有些成熟嗜碱性粒细胞与小淋巴细胞相仿，故要注意与小淋巴细胞鉴别，详见表2－5－4。

表2－5－2　各期粒细胞形态特点（以中性粒细胞为例）

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	颗粒	颜色
原粒细胞	10～20	圆或类圆形	圆或椭圆形	2～5个较小	细颗粒	较少	无	天蓝或深蓝色
早幼粒细胞	12～25	圃或椭圆形	核形同上，但常偏于一侧	常清楚	开始聚集	增多	出现A颗粒，少许覆盖核上	淡蓝或深蓝色
中性中幼粒细胞	10～20	圆形	椭圆或一侧开始扁平	常无	呈索块状	多	出现中性颗粒，A颗粒常较多	淡蓝或淡红色
中性晚幼粒细胞	10～16	圆形	明显凹陷呈肾形、半月形	无呈	小块状	多	中性颗粒丰富，A颗粒少或无	淡红色
中性杆状核粒细胞	10～15	圆形	呈带形、S形、U形等	无	呈粗块状	多	充满中性颗粒	上
中性分叶核粒细胞	10～14	圆形	分叶2～5叶）	无	同上	多	同上	同上

表2－5－3　粒细胞胞质中四种颗粒的鉴别

颗粒名称	大小	形态	数量	色泽	分布
中性颗粒	细小大小一致	细颗粒状	多	淡红或淡紫红色	均匀
嗜苯胺蓝颗粒	较中性颗粒粗大大小不一	形态不一	少量或中等量	紫红色	分布不一
嗜酸性颗粒	粗大大小一致	圆形或椭圆形	多	橘红或暗黄色	均匀
嗜碱性颗粒	最粗大大小不一	形态不一	不一定，常不多	深紫红或深紫黑色	分布不一，常覆盖在核上

表2 -5 -4　小淋巴细胞和小嗜碱性粒细胞的鉴别

细胞名称	胞体大小	胞质	颗粒	核形	核染色质
小淋巴细胞	6 -9 μm	极少，呈淡蓝色	常无，有时浆中有少许紫红色颗粒	类圆或有小切迹	染色质呈块状
小嗜碱性粒细胞	比小淋巴细胞略大或相似	极少或少见，常呈红色	有少许紫黑色颗粒，常覆盖在核上	轮廓不清楚	结构不清楚

二、红细胞系统

红细胞系统有5 个阶段的细胞，包括原红细胞、早幼红细胞、中幼红细胞、晚幼红细胞、红细胞。有核红细胞在发育成熟过程中形态变化主要特点为：①胞体呈圆形或类圆形；②核圆，居中；③胞质颜色变化为：深蓝色→灰蓝色→灰红色→淡红色；④胞质中无颗粒。红细胞系统中各期细胞的形态见表2 -5 -5 。

表2 -5 -5　各期红细胞形态特点

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	颗粒	颜色
原红细胞	15 ~25	圆或类圆形，常有瘤状突起	圆形常居中	1 ~2 个	颗粒状	较多	深蓝色不透明	无
早幼红细胞	1 ~18	同上	同上	模糊或无	粗颗粒状或小块	略增多	同上	无
中幼红细胞	8 ~15	圆形	同上	无	块状如击碎木块	较多	灰蓝、灰红或灰色	无
晚幼红细胞	7 ~10	同上	圆形，居中或偏位	无	固缩成团块状	多	淡红色或略带灰色	无
红细胞	6 ~9	同上	无			多	淡红色	无

三、单核细胞系统

单核细胞系统包括原单核细胞、幼单核细胞、单核细胞。单核细胞系统一般具有以下特点：①胞体较大，可有伪足；②胞核较大，不规则，常折叠，核染色质疏松；③胞质量较多，呈灰蓝色，常有空泡等特点。各期单核细胞形态见表2 -5 -6 。

表2 -5 -6　各期单核细胞形态特点

细胞名称	胞体		胞核			胞质			
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	浆色	颗粒	颜色
原单核细胞	14～25	规则或不规则	常不规则，可有凹陷、折叠	纤细疏松	常1个，大，清楚	较多	灰蓝色，不透明	无	可有
幼单核细胞	15～25	不规则	不规则形，常有凹陷、折叠	细索状	模糊或消失	多	同上	细小紫红色	可有
单核细胞	12～20	同上	不规则形，呈肾形、马蹄形、S形等	呈疏松条索状	消失	较丰富	同上或略带红色	灰尘样紫红色	常有

四、淋巴细胞系统

淋巴细胞系统分为原淋巴细胞、幼淋巴细胞和淋巴细胞（包括小淋巴细胞和大淋巴细胞）3个阶段。淋巴细胞系统一般具有以下形态特点：①胞体圆形或类圆形；②胞体小；③胞质量少，浆呈淡蓝色。各期淋巴细胞形态特点见表2 -5 -7。

表2 -5 -7　各期淋巴细胞形态特点

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	浆色	颗粒
原淋巴细胞	10～18	圆或类圆形	圆或类圆形	颗粒状	1～2个	少	透明淡蓝	无
幼淋巴细胞	10～16	同上	同上	较粗	模糊或消失	稍增多	同上	偶有少许深紫红嗜苯胺蓝颗粒
大淋巴细胞	12～15	同上	椭圆形常偏位	呈块状	消失，有时可见假核仁	较多	清澈淡蓝	常有
小淋巴细胞	6～9	同上	类圆形常有切迹	同上	同上	常很少淡蓝色		常无

五、浆细胞系统

浆细胞系统的细胞由B淋巴细胞转化而来，B淋巴细胞在一定条件下可母细胞化，形成原浆细胞、幼浆细胞、浆细胞。浆细胞系统一般具有以下形态特点：①核圆，核偏位；②胞质量多，深蓝色；③常有核旁淡染区及空泡。各期浆细胞形态特点见

表2 —5 —8 。

表2 —5 —8　各期浆细胞形态特点

细胞名称	胞体		胞核			胞质			
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	浆色	颗粒	空泡及核旁淡染区
浆细胞	12 ～25	圆或椭圆形	圆形偏位	颗粒状	2 ～5 个	多	不透明深蓝色	无	可有
幼浆细胞	12 ～16	椭圆形	同上	开始聚集	模糊或无	多	同上	可有少许	常有
浆细胞	8 ～15	同上	同上	块状	无	丰富	同上或呈红色	偶见少许	常有

六、巨核细胞系统

巨核细胞系统包括原巨核细胞、幼巨核细胞、颗粒型巨核细胞、产血小板型巨核细胞、裸核型巨核细胞及血小板，是骨髓中体积最大的造血细胞。除原巨核细胞外，其他巨核细胞一般具有以下形态特点：①胞体和胞核巨大，不规则；②成熟巨核细胞质量常极丰富，并有大量颗粒等特点。各期巨核细胞（包括血小板）形态特点见表2 —5 —9 。

表2 —5 —9　各期巨核细胞形态特点

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	浆色	颗粒
原巨核细胞	15 ～30	圆或不规则形，常有指状突起	圆形或不规则或双核	颗粒状排列紧密而不均匀	2 ～3 个不清晰	较少	深蓝不透明	无
幼巨核细胞	30 ～50	不规则	肾形、不规则或分叶	粗颗粒或小块状	常无	多	深蓝或淡蓝，近核处淡红	近核处有少许细小淡紫红色颗粒
颗粒型巨核细胞	40 ～70	同上	不规则或分叶	团块状或呈粗条纹状	无	极丰富	淡红色或夹杂有蓝色	充满淡紫红色颗粒

续表

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核形	核仁	染色质	量	浆色	颗粒
产血小板型巨核细胞	40～70	同上，且胞膜不清晰，多呈伪足状	同上	同上	无	极丰富	淡红色	同上，可有雏形血小板形成并释放
裸核型巨核细胞			同上	同上	无	无或有少许胞质		
血小板	2～4	圆、椭圆形或星状	无			很少	淡红或淡蓝色	细胞中央有细小淡紫红色颗粒

以上各系统中的原始细胞较相似，需要加以鉴别，详见表2－5－10。

表2－5－10　各种原始细胞的鉴别

细胞名称	胞体直径（μm）	胞体形态	核位置	核形	核染色质	核仁	胞质量	胞质颜色	颗粒	其他
原淋巴细胞	10～18	圆或椭圆形	居中或偏位	圆或类圆形	颗粒状	1～2个，小，边界清楚	少	淡蓝色	无	
原粒细胞	10～20	圆或椭圆形	居中或偏位	圆形	较细，颗粒状	2～5个，小，边界清楚	较少	淡蓝或深蓝色	无	
原单核细胞	14～25	圆或不规则形，可有伪足突起	居中或偏位	常不规则形，可扭曲、折叠	纤细疏松	1个，大，边界清楚	较多	淡蓝或灰蓝色	无	有时胞质中可见空泡
原红细胞	15～25	圆形，常有瘤状突起	居中	圆形	较粗，颗粒状	1～3个，较大，边界欠清楚	较多	深蓝色	无	常有核周淡染
原浆细胞	15～25	圆或椭圆形	偏位	圆形	颗粒状	2～5个，边界清楚	多	深蓝色	无	可有核旁淡染区及空泡
原巨核细胞	15～30	圆形或不规则常有指状突起	居中或偏位	圆形或不规则，常凹陷、折叠	粗，排列紧密	2～3个，边界模糊	较少	深蓝色	无	周围常有血小板，有时双核

七、其他细胞

常见的有组织嗜碱细胞（又称为肥大细胞）、网状细胞、成骨细胞（又称为造骨细胞）、破骨细胞、吞噬细胞、脂肪细胞、退化细胞，还有内皮细胞、纤维细胞等。常见的其他细胞形态特点见表2－5－11，其中成骨细胞要注意与浆细胞加以鉴别，破骨细胞要注意与巨核细胞加以鉴别。

退化细胞多数为推片时人为造成的。其大小及形态不一，有的细胞只有一个退化的核而无胞质，胞核呈蓝状、扫帚状或条纹状，核结构常模糊不清或呈均匀淡紫红色；有的细胞轮廓尚清楚，但胞膜已破裂，胞核和胞质均已被推散。由晚期早幼粒细胞和早期中幼粒细胞退化的细胞称为Ferrata细胞，其胞体大，胞膜破裂、边缘不整齐；胞质淡蓝色，其间散布若干嗜天青颗粒，呈推散状分布；胞核较大、卵圆形，核染色质粗网状，着色较淡，常可见核仁1～3个，有时核膜不完整。

第三节　异常骨髓细胞形态学

一、粒细胞系统

1．白血病性原粒细胞

表2－5－11　其他细胞形态特点

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核数及核形	染色质	核仁	量	浆色	颗粒
肥大细胞	12～20	梭形、蝌蚪形、圆形等	1个，居中，小圆形	结构不清	无	较丰富	淡红色	充满圆形、大小均匀的深紫色颗粒
成骨细胞	20～40	长椭圆形或不规则，边缘常呈云雾状	1个，偏位，圆或椭圆形	粗网状	1～3个淡蓝色	丰富	深蓝或淡蓝色，核远处常有淡染区	偶有少许紫红色颗粒
破骨细胞	60～100	不规则形边缘不整齐	1～100个，圆或椭圆形	粗网状	1～2个淡蓝色	极丰富	淡蓝或淡红色	常有大量细小或粗大紫红色颗粒

续表

细胞名称	胞体		胞核			胞质		
	直径（μm）	形态	核数及核形	染色质	核仁	量	浆色	颗粒
网状细胞	20～50	不规则形，边缘不整	1个圆或椭圆形	网状	1～2个	较丰富	淡蓝或淡红色	可有少许紫红色颗粒
吞噬细胞	不定	极不一致	1至数个，核形不定	疏松	有或无	不定	淡蓝或灰蓝色	可见多少许不一的吞噬物
脂肪细胞	30～50	圆或椭圆形	1个，偏位，小而不规则	致密	无	不定	淡红色	充满大小不一脂肪空泡

这类细胞形态变化较大，通常可见以下几种类型：

（1）典型原粒细胞。

（2）小型原粒细胞：似原淋巴细胞，其胞体小，胞质量少，核染色质较细致，核仁小而可见或模糊或不见。

（3）副原粒细胞：又称为Reider型原粒细胞，似原单核细胞，其核浆发育不平衡，胞核呈扭曲、折叠、肾形或分叶，核染色质细致，核仁大而明显。

除此之外，白血病性原粒细胞胞质中有时可见棒状小体、胞质呈浅红色等改变。

2．棒状小体（Auer小体）

棒状小体由胞质中的嗜天青颗粒融合而成，瑞特染色后显微镜下常呈红色棒状故名。其实并非均呈棒状，有时呈球形或卵圆形。棒状小体见于急性非淋巴细胞白血病细胞中，而在急性早幼粒细胞白血病中最易见且多，一般认为单核细胞系统中的棒状小体较为细长，粒细胞系统中棒状小体较为粗短。

3．颗粒异常增多的早幼粒细胞

胞体大小不一，常可见伪足突出；胞质中颗粒异常增多，常可见内浆（浆中充满颗粒）、外浆（浆中无颗粒），易见棒状小体（有时覆盖在核上）；核偏小，常扭曲、折叠甚至分叶，核染色质较细致，核仁可见。根据异常早幼粒细胞中颗粒的粗细分为粗颗粒型和细颗粒型，常见于急性早幼粒细胞白血病。

4．柴捆细胞

白血病细胞中多见数条或几十条棒状小体，形似柴捆，因而得名。常易破碎形成破碎的柴捆细胞。柴捆细胞见于急性早幼粒细胞白血病。

5．异常中性中幼粒细胞

指胞核发育明显落后于胞浆发育的中性中幼粒细胞。其形态特点为：胞体较大；胞质中常充满中性颗粒而呈均匀淡红色（尤其是近核处），有时可见内浆（浆呈淡红色）和外浆（浆呈蓝色）；胞核也较大、核染色质疏松，常可见明显的核仁。见于急性粒细胞部分分化型（M_{2b}）、骨髓增生异常综合征、化疗后等。

6．巨型晚幼粒细胞和巨型杆状核粒细胞

胞体大，约18～30 μm；胞质多；胞核肥大，呈肾型或杆状，染色质疏松。部分细胞胞体增大不明显但胞核明显肥大，有时核扭曲、折叠而似单核细胞。见于巨幼细胞性贫血、骨髓增生异常综合征、白血病化疗后等。

7．双核粒细胞

出现于早幼粒细胞至杆状核粒细胞阶段，见于骨髓增生异常综合征、急性髓细胞白血病、化疗后、苯中毒等。

8．颗粒减少粒细胞

指粒细胞颗粒明显减少，胞质呈清淡空白状或淡蓝色，在各阶段粒细胞均出现。见于骨髓增生异常综合征、急性髓细胞白血病、化疗后等。

9．环形杆状核粒细胞

指粒细胞杆状核呈环形。见于巨幼细胞性贫血、骨髓增生异常综合征、化疗后等。

二、红细胞系统

1．淋巴样幼红细胞

由于胞质中血红蛋白合成减少，导致胞质发育落后于胞核。其细胞特点为胞体小、边缘不整齐、胞质量少、浆偏蓝，核染色质致密。见于缺铁性贫血、铁粒幼红细胞性贫血、β珠蛋白生成障碍性贫血、慢性感染性贫血等，此外在血膜厚的部位也易出现假性的淋巴样幼红细胞。

2．巨幼红细胞

指由于叶酸、维生素B_{12}或内因子缺乏，使幼红细胞胞核发育落后于胞质的一类细胞，分为原巨幼红细胞、早巨幼红细胞、中巨幼红细胞、晚巨幼红细胞。

（1）原巨幼红细胞：胞体约18～35 μm，圆形；胞质丰富，深蓝色；核圆形、居中，染色质纤细颗粒状，排列呈疏松网状，核仁较大、较清楚。

（2）早巨幼红细胞：胞体约15～30 μm，圆形；浆深蓝色，无颗粒；核圆形、居中，染色质呈点状颗粒状，核仁模糊或无，核仁周围染色质较浓集。

（3）中巨幼红细胞：胞体约13～20 μm，圆形或卵圆形；浆灰蓝色或灰红色，可有

点彩、豪－乔小体；核圆形、居中，染色质呈疏松，间隙较大。

4）巨晚幼红细胞：胞体约10～15 μm，圆形或卵圆形；浆淡红色，常有点彩、豪－乔小体；核圆形或核碎裂，居中或偏位，染色质呈较致密点彩状或固缩块状。

3．类巨变幼红细胞

也称为幼红细胞巨幼样变，与叶酸或维生素B_{12}缺乏无明显关系。类巨变多见于中幼红细胞、晚幼红细胞，核染色质正常或较疏松，有时胞体增大明显而胞核增大不明显。见于骨髓增生异常综合征、红血病、红白血病、化疗后、铁粒幼红细胞性贫血、溶血性贫血、再生障碍性贫血等。

4．多核幼红细胞

胞体大或巨大，幼红细胞有2 个或2 个以上的核，多数出现于早幼红细胞、中幼红细胞及晚幼红细胞中。见于骨髓增生异常综合征、红白血病、红血病、化疗后等。

5．核碎裂幼红细胞

胞核呈分叶状、梅花状、锯齿状、哑铃状及花瓣状等，胞体正常或增大，多出现于晚幼红细胞和中幼红细胞阶段。见于骨髓增生异常综合征、红白血病、红血病、巨幼细胞性贫血、溶血性贫血、化疗后等。

6．红细胞造血岛

由多个幼红细胞围绕巨噬细胞而成。增多见于增生性贫血、化疗后恢复期、红白血病、红血病、骨髓增生异常综合征等。

三、单核细胞系统

1．白血病性原单核细胞

这类细胞形态变化较大，通常可见以下几种类型：

1）典型原单核细胞。

2）圆形核原单核细胞：其胞核圆形，胞质量多。

3）小型原单核细胞其胞体较小，胞质量较少，核常不规则。此类细胞易与原淋巴细胞、原粒细胞混淆。

2．恶性组织细胞

这类细胞有5 种，即异常组织细胞、多核巨组织细胞、吞噬性组织细胞、淋巴样组织细胞、单核样组织细胞，见于恶性组织细胞病，但后三者还可见于恶性淋巴瘤、噬血细胞综合征及部分原因不明的高热患者。

1）异常组织细胞：胞体大小不一，规则或不规则；核规则或不规则，可见双核，染色质细致网状，核仁常大而清楚；胞质量较丰富，深蓝或浅蓝色，可有空泡，深蓝色

者无颗粒，浅蓝色可有少许嗜苯胺蓝颗粒。

2）多核巨组织细胞：基本与异常组织细胞相似，但其胞体巨大，外形极不规则，多核或分叶状核。

3）吞噬性组织细胞：胞体巨大，单核或双核，胞质中可见吞噬大量的成熟红细胞、幼红细胞、血小板、中性成熟粒细胞、幼粒细胞等。

4）淋巴样组织细胞：似淋巴细胞及内皮细胞。白细胞椭圆形、圆形、不规则形或狭长弯曲呈拖尾状；胞质淡蓝色，有时可有细小颗粒；胞核常偏于一侧，染色质细致，偶见核仁。

5）单核样组织细胞：似单核细胞，但染色质细致，胞质淡蓝色，有时含有细小颗粒。

3．戈谢细胞

戈谢细胞见于戈谢病。其胞体大，约20～80 μm，多呈卵圆形；胞质很丰富，淡蓝色或淡红色，无空泡，有很多交织成网状或洋葱皮样的波纹状结构；核小，圆形或椭圆形，1 个至数个，偏位，核染色质呈粗网状，偶见核仁。

4．尼曼－匹克细胞

这种细胞又称为泡沫细胞，见于尼曼－匹克病。其胞体大，约20～100 μm；胞质很丰富，其中充满大小较一致、透明的脂肪滴，染色后呈空泡，形似蜂窝状、桑椹状或泡沫状；核小，圆形或椭圆形，1～2 个，偏位，染色质疏松，偶见核仁。

四、淋巴细胞系统

1．白血病性原淋巴细胞

这类细胞形态变化较大，通常可见以下几种类型：

1）典型原淋巴细胞。

2）大型原淋巴细胞：其胞体较典型原淋巴细胞大；核形规则或不规则，核染色质粗细不一，核仁1 个以上且明显；胞质较多、蓝色。要注意与原粒细胞、原单核细胞区分。

3）副原淋巴细胞：又称为 Reider 型原淋巴细胞，似原单核细胞，其胞体大小不一，以大居多；胞核呈肾形、凹陷、扭曲、折叠或分叶状等。

2．淋巴瘤细胞

恶性淋巴瘤晚期可侵犯骨髓，其瘤细胞常有明显的多态性。形态特点取决于淋巴瘤的组织学类型，常见的有以下几种：

1）分化较好的淋巴瘤细胞：以成熟淋巴细胞为主，不易与慢性淋巴细胞白血病区

分，但其细胞常有一定的多态性。

⑵ 分化较差的淋巴瘤细胞：以原淋巴细胞为主，常不易与急性淋巴细胞白血病区分，但其细胞多态性较明显。

⑶ 组织细胞型淋巴瘤细胞：其胞体大小不一（多数大或巨大），胞体不规则；胞质多少不一，常呈深蓝色，有时可见颗粒、空泡及吞噬物；胞核常明显异常（核不规则、凹陷、折叠、切迹、分叶、双核等），染色质较粗，核仁常大而清楚。此类淋巴瘤不易与恶性组织细胞病区分。

五、浆细胞系统

1．骨髓瘤细胞

这是一种单克隆的异常浆细胞，与正常浆细胞相比，具有明显异形性的特点。其胞体明显大小不一，核正常大小或大、巨大，核1 个或多个，圆形或畸形，染色质粗细不一，核仁大、清楚或无。见于多发性骨髓瘤。有时还可见下列细胞或包涵体：

⑴ 火焰细胞：胞质边缘或整个胞质呈红色。

⑵ Russel 小体：存在于胞质中，为粗大、红色的圆形包涵体。有时这种小球体可被有机溶剂溶解，而成为不着色的空泡。

⑶ Mott 细胞：指胞质中充满Russel 小体的浆细胞，这些小球体紧密堆集如桑椹，故又称为桑椹细胞。

2．浆细胞岛

浆细胞岛由3 个或3 个以上成熟浆细胞围绕巨噬细胞而成，见于免疫功能亢进、免疫性疾病、多发性骨髓瘤等。

六、巨核细胞系统

1．病态巨核细胞

病态巨核细胞是以胞核异常为特征的一组细胞，如何分类尚未统一，一般包括淋巴样小巨核细胞、单圆核小巨核细胞、大单圆核巨核细胞、多圆核巨核细胞。见于骨髓增生异常综合征、急性髓细胞白血病、慢性粒细胞白血病等。

⑴ 淋巴样小巨核细胞：其胞体大小在15 ～20 μm 以下；胞质少，浅红色或灰蓝色，可有少量淡紫红色颗粒或血小板；核常单个，圆形或椭圆形，无核仁。淋巴样巨核细胞又称为微小巨核细胞。

⑵ 单圆核小巨核细胞：胞体20 ～40 μm ；胞质较多，有淡紫红色颗粒或血小板；核小，1 个或2 个，圆形或椭圆形。

3）大单圆核巨核细胞：胞体20～0μm；胞质较丰富，有淡紫红色颗粒，多无血小板形成；核大，圆形，偏位。

4）多圆核巨核细胞：其主要特点为胞体大，约为40～80μm；胞质丰富，有淡紫红色颗粒，多无血小板形成；胞核小，多个，圆形，无核丝相连。

2．变性巨核细胞

指巨核细胞胞质和核中形成空泡（多少不一），颗粒明显减少。见于特发性血小板减少性紫癜、骨髓增生异常综合征、感染等。

七、其他细胞

如骨髓转移癌细胞，由其他实质性癌肿细胞向骨髓转移所致，多见于乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、食管癌等。转移癌细胞形态因原发肿瘤病理类型不同而不同，其胞体常明显大小不一（多数大），边缘常不规则、不清晰；胞质量多少不一，呈淡蓝色、深蓝色；胞核不规则、圆形或椭圆形，大小不一（多数大），为单核、双核或多核，核染色质粗或细，核仁常大而清楚。转移性癌细胞如为腺癌，常表现为胞体大小较一致，胞质量较多，核形规则等特点。癌细胞多数成堆存在，少数散在存在。

第四节　骨髓涂片常规检查

骨髓细胞形态学检验有多种方法，而最简单、最实用的是普通显微镜检查，它是诊断血液系统等疾病的重要手段之一。

一、骨髓涂片检查的适应证

1）不明原因外周血细胞数量及成分异常：如一系、二系或三系减少，一系、二系或三系增多，一系增多伴二系减少，外周血中出现原始细胞、幼稚细胞，血沉明显增加等。

2）不明原因发热、肝肿大、脾肿大、淋巴结肿大、骨痛、骨质破坏、肾功能异常、黄疸、紫癜等。

3）恶性血液系统疾病的定期复查及化疗后的疗效观察。

4）其他，如骨髓活检、骨髓细胞分化抗原检测、造血祖细胞培养、染色体核型分析、微生物及寄生虫学检查等。

二、骨髓穿刺

1．骨髓穿刺步骤

1）选择穿刺部位：骨髓穿刺部位选择一般要从以下几个方面考虑：①骨髓腔中红髓要丰富；②穿刺部位应浅表、易定位；③应避开重要脏器。临床上成人最为理想的穿刺部位是髂骨上棘（包括髂骨前、髂骨后上棘），髂骨多次取材不佳、髂骨造血功能低下等也可穿刺胸骨，小于2 岁的患者可穿刺胫骨。穿刺前应在体表部位做上标记。

2）选择体位：穿刺部位不同，其体位也有所不同。如髂骨后上棘采用侧卧位或俯卧位，髂骨前上棘和胸骨体采用仰卧位。

3）消毒与铺巾：用碘酒、酒精常规消毒，打开消毒的骨髓穿刺包，带上无菌手套，铺上孔巾。

4）局部麻醉：用2％利多卡因，在皮内注射形成一小皮丘，然后垂直进针，在进针的同时注射麻醉剂，直至骨膜。拔除针后，局部按摩。

5）进骨髓穿刺针：将穿刺针套上针芯后，用两指将穿刺部位皮肤固定，将穿刺针垂直进针，直至骨皮质时阻力增加，再用力后阻力明显下降，此时即进入了骨髓腔。成人进针深度约为进针达骨皮质后再进入0.5～1.0Cm。

6）抽吸骨髓液：拔除针芯，套上消毒针筒，然后抽吸少许骨髓液。

7）包扎伤口：取下针筒后，套上针芯，将整个穿刺针拔出，用消毒干燥棉球压迫伤口，并敷以消毒纱布，胶带固定。

2．骨髓穿刺及涂片制备注意事项

1）对于初诊的患者，骨髓穿刺检查要在治疗前进行，同时要送检血片4～6 张。

2）骨髓穿刺过程中要严格遵守无菌操作，防止骨髓感染。

3）抽取骨髓液时，量不宜过多（以小于0.2ml 为宜），以免稀释骨髓液。如同时需要做其他检查时，应先抽少许作骨髓涂片，然后再抽取一定量用作其他检查。

4）对于有出血倾向的患者，穿刺后压迫穿刺点的时间应长些，以免术后出血不止。

5）骨髓纤维化、骨髓中细胞极度增生、肿瘤细胞骨髓侵犯、骨髓增生减低等患者，可出现干抽。所谓干抽是指非技术错误或穿刺位置不当而抽不出骨髓液或只得到极少量骨髓液。

6）易穿刺的原因为骨质疏松、骨髓坏死、软骨症等，临床上常见的疾病有多发性骨髓瘤、恶性肿瘤骨髓转移等。

7）制作骨髓涂片时，动作要快，否则易使骨髓液凝固。同时玻片要干净。

8）应取骨髓小粒多的骨髓液制作涂片，至少要6～0 张，自然干燥，并注明患者的名字。

9）要规范填写骨髓细胞学检查申请单。

三、骨髓涂片检查步骤

㈠ 骨髓涂片染色

1．染色试剂

1）瑞特染液（又称为瑞特染色Ⅰ液）：瑞特染粉1g 将其倒人500ml 的甲醇（分析纯）瓶中，每天早、晚各震荡1 次，共10d，备用。如在瑞特染液中再加入吉姆萨染粉0.3g，称为瑞特－吉姆萨染液。

2）pH6.4～6.8 磷酸盐缓冲液（又称为瑞特染色Ⅱ液）：取无水磷酸二氢钾6.64g、无水磷酸氢二钠2.56g，加少量蒸馏水溶解后，加水至1L。必要时用磷酸盐调整pH 值。

2．染色步骤

1）将骨髓涂片的血膜面朝上、放平，将瑞特染色液滴加至片上，覆盖血膜固定30s 左右。

2）滴加pH6.4～6.8 的磷酸盐缓冲液并混匀，染色时间为15～20min。

3）流水冲洗、晾干，最后显微镜下检查。

3．注意事项

1）染色前，用肉眼观察骨髓涂片。取骨髓小粒多、血膜制备良好的骨髓片数张（一般为3～4 张）进行染色。并检查每一张涂片上是否已注明患者姓名，同时要注意辨认血膜的正反面。

2）染色时染液要覆盖整个血膜，染液和缓冲液约为1∶3，并要混匀。

3）染色时间根据片中有核细胞数量、室温等进行调节。有核细胞多、室温低的情况下，染色时间应长些，否则染色时间应短些。

4）流水冲洗涂片前，片上染液不应倒掉，而应将片子直接放在流水下冲洗，冲洗时间要长些，以免染液沉积在血膜上。

5）应留几张未染色的涂片，以备做细胞化学染色用。

㈡ 骨髓涂片观察

1．低倍镜观察

观察内容包括：①判断骨髓涂片的质量，如涂片的厚薄，骨髓小粒、油滴、染色

等。②判断骨髓增生程度，骨髓中有核细胞的多少可以反映出骨髓增生程度。骨髓增生程度的分级一般采用五级分类法，即增生极度活跃、增生明显活跃、增生活跃、增生减低及增生极度减低（详见表2－5－2）。③计数全片巨核细胞数量。④全片观察有无体积较大或成堆分布的异常细胞如骨髓转移癌细胞、戈谢细胞、尼曼－匹克细胞等，尤其要注意观察血膜尾部、上缘、下缘及头部。

表2－5－12　骨髓增生程度分级及标准

分　级	有核细胞数/1个高倍镜视野	有核细胞成熟红细胞	常见疾病
增生极度活跃	>100	1∶1	白血病
增生明显活跃	50～100	1∶10	白血病、增生性贫血
增生活跃	20～50	1∶20	白细胞减少症、轻度贫血
增生减低	5～10	1∶50	造血功能低下
增生极度减低	<5	1∶200	再生障碍性贫血

注：一个高倍轻视野中有核细胞数为10～20时，检验者要根据患者年龄、取材情况等做出分级判断

2．油镜观察

在有核细胞计数、分类前，应先观察各系的增生程度、大致形态和比例等情况，得出初步的诊断意见。

然后进行细胞分类、计数及细胞形态的观察，包括细胞大小、胞体形态、核染色质结构、核仁形态、核形、核位置、胞质量、颜色、颗粒等。由于涂片中巨核细胞数较少，一般不纳入骨髓细胞有核细胞分类的百分比内，而单独对巨核细胞计数和分类。通常计数全片中的巨核细胞数，并分类一定数量的巨核细胞。

最后，还要再一次进行全片观察（也可在高倍镜下观察），注意其他部位有否异常细胞、分裂象细胞、非造血细胞等情况，全片细胞分类情况与分类区域是否一致，必要时要重新计数。

㈢ 结果计算

计算各系细胞的总百分比及各期细胞百分比。一般情况下，百分比是指所有有核细胞（all nucleate cell，ANC）百分比。在某些白血病中，还要计算出非红系细胞（non erythroidcell，NEC）百分比，NEC是指去除幼红细胞、淋巴细胞、浆细胞、肥大细胞、巨噬细胞外的有核细胞百分比。

1）计算粒红比值（granulocyte/erythrocyte，G/E）：所谓粒红比值是指各阶段粒细胞（包括中性、嗜酸性、嗜碱性粒细胞）百分比总和与各阶段有核红细胞百分比总和之比。

2）计算各期巨核细胞百分比或各期巨核细胞的个数。

㈣ 填写骨髓细胞学检查报告单

1）填写患者姓名、性别、年龄、科室、病区、床号、住院号、本次骨髓涂片号、骨髓穿刺部位、骨髓穿刺时间、临床诊断等。

2）填写骨髓涂片取材、制备和染色情况。可采用“良好”、“尚可”、“欠佳”三级评价标准。

3）填写骨髓报告单中各期细胞百分比、骨髓增生程度、粒红比值等。

4）用文字描述骨髓片、血片及细胞化学染色的主要特征，其中骨髓片是报告单中的最重要部分。①骨髓片：描述时要求简单扼要、条理清楚、重点突出。一般骨髓片可参考以下方式进行描述：粒细胞系增生程度如何，占百分比多少，各期细胞比例、形态如何；红细胞系增生程度如何，占百分比多少，各期有核红细胞比例、形态如何，成熟红细胞形态如何；淋巴细胞比例、形态如何；单核细胞比例、形态如何；全片巨核细胞多少个，比例、形态如何，血小板数量、形态如何；是否有寄生虫、明显异常细胞等。②血片：描述有核细胞数量增减、分类、形态（包括成熟红细胞及血小板）、有否异常细胞等情况。③细胞化学染色：逐项描述每项细胞化学染色结果的阳性率、积分等。

5）填写诊断意见及建议。根据骨髓象、血象和细胞化学染色所见，结合临床资料尽可能地提出临床诊断意见或供临床参考的意见，必要时提出进一步做检查等建议。诊断意见种类分为肯定性、提示性、符合性、疑似性、待排性以及形态学描写等。

6）取图。目前国内骨髓报告单多数采用专用的图文软件系统，可同时打印出一幅或多幅彩图。

7）填写报告日期、签名，并对涂片进行登记、保存。

㈤ 骨髓涂片检查注意事项

1）细胞分类、计数时应选择厚薄均匀、细胞结构清楚、红细胞呈淡红色、背景干净的部位进行计数，一般在体尾交界处。厚的部位细胞胞体小、结构不清楚，易做出错误的判断，而尾部则胞体大的细胞和破碎细胞偏多。

2）计数要有一定次序，以免出现某些视野重复计数的现象。例如，可从右到左、从上到下，呈“S”形走势。

3）计数的细胞为除巨核细胞、破碎细胞、分裂象细胞以外的其他有核细胞，巨核细胞要单独进行计数和分类。

4）细胞计数一般至少要200 个有核细胞；增生明显活跃以上者则应计数400 ～500 个有核细胞。

5）由于细胞形态多变，故观察细胞时不能抓住某一、二个特点就轻易地做出肯定或否定的判断。而应全面观察细胞的胞体大小、形态：胞核大小、形态、位置、核染色质、核仁（包括数量、大小、清晰度）；胞质量、浆色、颗粒、空泡等；同时要注意与周围细胞进行比较。

6）血细胞的发育是一个连续不断的过程，为了便于识别，通常将各系细胞人为地划分若干阶段，但实际观察中常会遇到一些细胞，既具有上一阶段的某些特征，又有下一阶段的某些特征，由于血细胞是向成熟方向发育，故一般将这种细胞归人下一阶段。

7）个别细胞界于两个系统之间而难以判断时，可采用大数归类法。

8）对于急性白血病等患者，细胞分类计数应在细胞化学染色后再进行。

9）急性白血病时，各系统原始细胞虽各有特征，但有时极为相似，很难鉴别。这时应注意观察伴随出现的幼稚细胞、成熟细胞，与其比较，推测原始细胞的归属；并要结合细胞化学染色、外周血细胞形态检验等。

10）有时可见到难以识别的细胞，可参考涂片上其他细胞后做出判断，如仍不能确定可归人“分类不明”细胞，但不宜过多，若有一定数量，则应通过细胞化学染色、集体读片或会诊等方法确定细胞类型。

11）骨髓取材好的涂片中应有较多为骨髓小粒，显微镜下可见较多骨髓特有细胞（如幼红细胞、幼粒细胞、巨核细胞、浆细胞、网状细胞等），中性杆状核粒细胞/分叶核粒细胞比值大于外周血，有核细胞数大于外周血有核细胞数。骨髓稀释分为两种：①如抽吸骨髓液时混进血液，称为骨髓部分稀释；②如抽出的骨髓液实际上就是血液，称为骨髓完全稀释。骨髓稀释时要注意与再生障碍性贫血区分。

12）骨髓涂片中血小板减少也可以是人为造成的。如果患者血小板数量正常的骨髓涂片出现凝固现象，则显微镜下呈条索状，其间夹有一些有核细胞和大量聚集的血小板，而使其他部位血小板明显减少或不见。所以涂片中血小板少的患者，要排除标本凝固的可能性。

四、正常骨髓象

全国无统一的参考值，骨髓标本因采集部位的不同、被检者个体的差异、检验人民掌握各种细胞的熟练程度及细胞划分标准的不同而不同，如现在大多数单位采用的下列巨核细胞参考值就偏低，而且产血小板型巨核细胞比例过高。虽然各单位的参考值有所不同，但符合下列情况者，可大体上视为正常骨髓象。

1）骨髓有核细胞增生程度：增生活跃。

2）粒红比值为2～4∶1。

3）粒细胞系统占0.40～0.60，其中原粒细胞＜0.02，早幼粒细胞＜0.05，中性

中、晚幼粒细胞均<0.15，中性杆状核粒细胞多于中性分叶核粒细胞，嗜酸性粒细胞<0.05，嗜碱性粒细胞<0.1。

4）红细胞系统占0.20～0.25，其中原红细胞<0.01，早幼红细胞<0.05，以中幼红细胞、晚幼红细胞为主，平均各占0.10。

5）淋巴细胞系统占0.20（小儿可达0.40），均为成熟淋巴细胞，原淋巴细胞罕见，幼淋巴细胞偶见。

6）单核细胞系统<0.04，为成熟单核细胞，原单核细胞罕见，幼单核细胞偶见。

7）浆细胞<0.02，为成熟浆细胞。

8）巨核细胞在1.5cm×3.0cm的血膜上可见7～35个，其中原巨核细胞0.00，幼巨核细胞0.00～0.05，颗粒型巨核细胞0.10～0.27，产血小板型巨核细胞0.44～0.60，裸核型巨核细胞0.08～0.30。血小板较易见，成堆存在。

9）其他细胞如网状细胞、内皮细胞、成骨细胞、破骨细胞、肥大细胞、吞噬细胞等偶见，分裂象细胞少见，寄生虫和异常细胞未见。

第五节　骨髓涂片细胞化学染色

细胞化学染色是以细胞形态学为基础，结合化学反应的原理对血细胞内各种化学物质（酶类、脂类、糖类、铁、蛋白质、核酸等）作定性、定位、半定量分析的方法。以前称为组织化学染色（简称组化）。细胞化学染色临床上用于辅助判断急性白血病的细胞类型，辅助血液系统等疾病的诊断和鉴别诊断，观察疾病疗效和预后。

细胞化学染色的种类有很多，本节介绍中性粒细胞碱性磷酸酶染色、铁染色、过氧化物酶染色、苏丹黑染色、α－醋酸萘酚酯酶染色、醋酸AS－萘酚酯酶染色、α－丁酸萘酚酯酶染色、氯乙酸AS－D萘酚酯酶染色、酯酶双染色、酸性磷酸酶染色及过碘酸－雪夫反应。不同的细胞化学染色，染色步骤不同，但基本步骤为固定、显示及复染。

一、中性粒细胞碱性磷酸酶染色（Kaplow偶氮偶联法）

【原理】

成熟中性粒细胞碱性磷酸酶（neutrophilic alkaline phosphatase，NAP）在pH9.6左右碱性环境中，能水解基质液中的磷酸萘酚钠底物，释放出萘酚，后者与重氮盐偶联，生成不溶性的有色沉淀，定位于细胞质酶活性所在之处。

【试剂】

1）固定液：40％甲醛25ml，加无水乙醇至100ml。

（2）基质液（pH9.5～9.6）：①底物：α－磷酸萘酚钠。②丙二醇缓冲液（0.05mol/LpH9.7）：取0.2mol/L贮备液（即2－氨基－2－甲基－1，3－丙二醇10.5g，加蒸馏水至500ml）25ml，0.1mol/L盐酸5ml，将蒸馏水加至100ml。③重氮盐：坚固蓝RR或坚固紫酱GBC）。取①底物20mg溶于20ml②液中，再加③重氮盐20mg，混合后即为基质液。

（3）10g/L甲基绿溶液。

【步骤】

（1）用4℃固定液将新鲜血片固定30～60s，流水冲洗，晾干。

（2）将涂片放在基质液中，置37℃水浴箱中45min，然后流水冲洗。

（3）用10g/L甲基绿溶液复染10min，流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

（1）结果判断：阳性产物为红色颗粒。－：胞质淡蓝色，无红色颗粒；＋：胞质中有少量红色颗粒，但不超过胞质总面积的1/4；＋＋：胞质中有较粗的红色颗粒，占胞质总面积的1/4～1/2；＋＋＋：胞质中基本上充满红色颗粒，但密度较低；＋＋＋＋：胞质中充满粗大红色颗粒而呈深红色，甚至掩盖细胞核。

（2）结果计算：计数100个中性成熟粒细胞，并记录阳性细胞积分。积分标准："－"为零分，"＋"为1分，"＋＋"为2分，"＋＋＋"为3分，"＋＋＋＋"为4分。将100个中性成熟粒细胞中的阳性细胞积分相加即为NAP积分。NAP阳性率即为100个中性成熟粒细胞中阳性细胞所占的比例。

（3）结果报告：阳性率及积分。

【参考值】

积分为35～70。由于所用的试剂、试剂盒、实验室条件及观察人员的判断标准等均影响NAP的结果，所以各个实验室的参考值差异较大，应建立本实验室参考值。

【临床意义】

（1）NAP积分增加：见于细菌性感染、再生障碍性贫血、某些骨髓增生性疾病、慢性粒细胞白血病（加速期）、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、恶性淋巴瘤、骨髓转移癌、肾上腺糖皮质激素及雄激素治疗后等等。

（2）NAP积分下降：慢性粒细胞白血病（慢性期）、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、骨髓增生异常综合征、恶性组织细胞病等。

【注意事项】

（1）NAP染色也可采用钙－钴法，此法虽然试剂易得、价格低廉，但染色时间较长（需4个多小时）、较繁琐，所以临床已较少使用。

（2）基质液要临用前新鲜配制并过滤。可将基质液直接滴加在涂片上进行反应，这

样可染多张涂片。

3）涂片要新鲜，并应尽早固定染色。若不能及时测定，固定后应放4℃冰箱保存。

4）染色前要在血膜头部或玻片磨砂的部位做记号，以免出现差错；且要辨认涂片的正反面，并将血膜朝上放置在染色架上进行固定（采用蒸汽固定者，血膜朝下进行固定）。

5）染色中的每一步骤需加试剂时，试剂务必覆盖整个血膜，血膜要放置在水平的位置，以免试剂丢失、杂质沉积。

6）每一步反应完毕，应直接在自来水下冲洗，而不应将反应液倒掉后冲洗，以免杂质沉积。

7）细胞化学染色时，如果涂片中没有阳性对照细胞，应选择其他合适的涂片作为阳性对照。

二、铁染色

【原理】

铁染色（ferric stain）可反映骨髓中的贮存铁，后者主要存在于骨髓小粒和幼红细胞中。骨髓中的铁在酸性环境下与亚铁氰化钾作用，形成普鲁士蓝色的亚铁氰化铁沉淀。沉淀定位于含铁的部位。

【试剂】

1）酸性亚铁氰化钾溶液：浓盐酸与200g/L 亚铁氰化钾溶液以1∶5 混匀。将200g/L 亚铁氰化钾（用蒸馏水配制）2.5ml 注入干净的试管中，再将0.5ml 的浓盐酸缓慢加入试管中，在加浓盐酸的同时要混匀，使沉淀消失、液体变清。如果仍混浊可离心取上清液，或再滴加少许亚铁氰化钾溶液使沉淀消失。

2）10g/L 中性红溶液。

【步骤】

1）选择骨髓小粒丰富的骨髓片，将配制好的酸性亚铁氰化钾滴加在涂片血膜上，置室温20～30min，流水冲洗，晾干，观察骨髓小粒中的铁。

2）10g/L 中性红溶液复染30～60s 后，流水冲洗，晾干，观察中幼红细胞、晚幼红细胞胞质中的铁。

【结果】

1）结果判断：阳性产物为蓝色沉淀。①细胞外铁：观察骨髓小粒中铁的量，分为五级：－、＋、＋＋、＋＋＋、＋＋＋＋。－：无蓝色颗粒；＋：有少量铁颗粒和铁小珠；＋＋：有多量铁颗粒和铁小珠；＋＋＋：有许多铁颗粒和铁小珠，有少量铁小块；

＋＋＋＋：有极多铁颗粒和铁小珠，有许多铁小块。②细胞内铁：计数100 中幼红细胞、晚幼红细胞中阳性细胞（即有铁颗粒的细胞）所占的比例即为阳性率。根据铁颗粒多少、粗细及排列情况将细胞内铁分为Ⅰ型、Ⅱ型、Ⅲ型、Ⅳ型及环形铁粒幼红细胞。Ⅰ型：铁颗粒1～2 颗；Ⅱ型：铁颗粒3～5 颗；Ⅲ型：铁颗粒6～0 颗或粗颗粒1～4 颗；Ⅳ型：铁颗粒＞11 颗或粗颗粒＞5 颗；环形铁粒幼红细胞：铁颗粒在6 颗以上，其中2／3 围绕核周排列1／2 以上。

（2）结果报告：细胞外铁级别，细胞内铁阳性率及分型。

【参考值】

细胞外铁：＋～＋＋；细胞内铁：阳性率0.19～0.44，以Ⅰ型为主，少数为Ⅱ型。不同的实验室其细胞内铁的参考值相差较大，应建立本实验室的参考值。

【临床意义】

（1）缺铁性贫血：临床上将铁缺乏症分为三期即贮存铁缺乏期、缺铁性红细胞生成期、缺铁性贫血期。其细胞外铁均阴性，细胞内铁阳性细胞明显减少。

（2）铁粒幼细胞贫血及伴环形铁粒幼红细胞增多的难治性贫血，其环形铁粒幼红细胞占有核红细胞0.15 以上；细胞外铁也常增加。

（3）非缺铁性贫血如再生障碍性贫血、巨幼细胞贫血、溶血性贫血等，细胞外铁和细胞内铁正常或增加；而感染、肝硬化、慢性肾炎、尿毒症、血色病等，细胞外铁明显增加而铁粒幼红细胞可减少。

【注意事项】

（1）做铁染色的骨髓片可不必进行固定，因酸性亚铁氰化钾有固定作用。

（2）铁染色的结果应及时观察，时间过长蓝色可加深，造成结果假阳性或阳性程度增加。

（3）铁染色的操作器材应干净，以减少铁污染。

（4）复染可用瑞特染液，但染色时间要短。此法可使铁粒幼红细胞阳性率降低。

（5）观察细胞外铁时，复染前应在低倍镜下观察，必要时在油镜下观察。细胞内铁应在油镜下观察，并不断调节微调，否则会使阳性率下降。

（6）环境中的污染铁常干扰结果观察，尤其是细胞内铁，要注意辨认。

（7）酸性亚铁氰化钾及亚铁氰化钾应呈淡黄色，若试剂变蓝说明有铁污染，应弃之。

（8）其他同NAP 染色注意事项（4）～（7）。

三、过氧化物酶染色

(一) Washhburn 法

【原理】

粒细胞和部分单核细胞的溶酶体颗粒中含有过氧化物酶（peroxidase，POX），POX能分解过氧化氢而释放出新生氧，使无色联苯胺氧化成蓝色联苯胺，后者与亚硝基铁氰化钠结合，再进一步氧化形成棕黑色联苯胺，沉淀于细胞质内酶活性部位。

【试剂】

1）联苯胺溶液（又称为POXI液）：取联苯胺0.3g，加360g/L亚硝基铁氰化钠溶液（用蒸馏水配制）1ml，溶解于95%乙醇并加至100ml。贮存于棕色瓶中，可保存数月。

2）稀过氧化氢液（又称为POX II液）：即5ml蒸馏水中滴加3%过氧化氢1滴或在25ml蒸馏水中加3%过氧化氢0.3ml配置而成。

3）瑞特染液。

【步骤】

1）在新鲜血片或骨髓片上，加联苯胺液5～8滴，使之覆盖整个血膜，固定1～2min。

2）加等量稀过氧化氢液，混匀两液，作用4～8min后，用流水冲洗。

3）最后再用瑞特染液复染20～30min后，流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：阳性产物为棕黄色或棕黑色颗粒。－：无阳性颗粒。±：颗粒细小，分布稀疏。＋：颗粒较粗，常呈局灶性分布，约占胞质1/4。＋＋：颗粒粗大，分布较密，约占胞质1/4～1/2。＋＋＋：颗粒粗大，团块状分布，约占胞质1/2～3/4。＋＋＋＋：布满整个细胞，可覆盖核上。

2）正常血细胞反应结果：①粒细胞系统：分化差的原粒细胞呈阴性，分化好的原粒细胞及以下细胞均阳性，并随着粒细胞成熟，其阳性程度逐渐加强。嗜酸性粒细胞阴性，嗜碱性粒细胞阳性。②单核细胞系统：多数阴性，少数弱阳性。③网状细胞、吞噬细胞可阳性。④淋巴细胞、浆细胞、巨核细胞、有核红细胞、组织细胞均阴性。

3）结果报告：阳性率及分布情况。

【临床意义】

POX染色是临床上辅助判断急性白血病细胞类型首选的细胞化学染色。因为不同细胞类型的急性白血病，细胞染色结果常不同。急性淋巴细胞白血病为阴性（FAB分型规

定阳性率<0.03）；急性粒细胞白血病常阳性，急性早幼粒细胞白血病呈强阳性，急性单核细胞白血病呈阴性至弱阳性，急性粒单核细胞白血病中的原粒细胞、早幼粒细胞呈阳性，原单核细胞及幼单核细胞呈阴性至弱阳性。

【注意事项】

1）联苯胺有致癌作用，操作时应避免污染。因该法操作简便，仍为许多实验室所采纳。

2）联苯胺溶液若明显发绿，应重新配制。

3）稀过氧化氢液用前临时配制，加在未染色涂片上，应有气泡产生，否则说明失效，应重新配制。如果配制的H_2O_2液浓度过高，则有抑制过氧化氢酶的作用。

4）复染时间要充分，复染效果佳者细胞形态基本同瑞特染色。

5）一般首先观察中性成熟粒细胞是否强阳性，强阳性者说明本次染色是成功的。同时观察需要辨认的细胞（原始或幼稚细胞）反应结果。

6）涂片不能太厚，如太厚而过氧化氢液浓度过低，会导致血膜边缘阳性程度显示正常，其他部位阳性程度明显减弱或假阴性。

7）其他同NAP染色注意事项（3）～（6）。

（二）改良Pereira染色法

【原理】

粒细胞和部分单核细胞中POX能分解过氧化氢而释放出新生氧，使碘化钾氧化生成碘，碘再与煌焦油蓝作用形成蓝绿色沉淀，定位于细胞质内酶活性部位。

【试剂】

1）固定液：由甲醛10ml和无水乙醇90ml混匀而成。

2）应用液：①pH5.5碘化钾磷酸盐缓冲液：将100mg碘化钾溶于0.67mol/L磷酸盐缓冲液

（pH5.5）100ml中。②0.03%过氧化氢溶液。③10g/L煌焦油蓝溶液。取①液5ml，加②液1～3滴，再加③液2～5滴，混匀即可。

【步骤】将固定液滴加在血片或骨髓片上，作用30～60s后，流水冲洗，晾干；将应用液滴加在血膜上，作用2～5min，然后流水冲洗，显微镜下检查。

【结果判断】

阳性产物为蓝绿色颗粒，阳性程度分级及结果报告同Washburn法。

【临床意义】

同Washburn法。

【注意事项】

1）应用液要临用前配制，5ml 的磷酸盐缓冲液中0.035 过氧化氢溶液及10g/L 煌焦油蓝溶液的量应根据涂片中有核细胞的量而定。

2）其他同NAP 染色注意事项（3）～（6）。

四、苏丹黑染色

【原理】

苏丹黑B（Sudan black，SB）是一种脂溶性重氮染料，能溶解细胞内含脂结构（如中性脂肪、磷脂、糖脂和类固醇），而使脂类物质显示出来，呈棕黑色或深黑色。脂类物质在粒细胞中丰富，单核细胞中也有少量。

【试剂】

1）含10%甲醛的9g/L 氯化钠溶液。

2）苏丹黑B 染色液：①贮存液：取苏丹黑B 粉剂0.3g 溶于100ml 无水乙醇中，经常振摇使其溶解。此液在冰箱中可保存1 年。②缓冲液：取酚16g 溶于30ml 无水乙醇中，取磷酸氢二钠0.13g，溶于100ml 蒸馏水中，将两份溶液相混即成缓冲液，可保存1 年。

苏丹黑B 染色液由30ml①液和20ml②液混匀而成，将染色液过滤后密封，可保存6～12 个月。

3）70%乙醇。

4）瑞特染液。

【步骤】

1）将血片或骨髓片在含10%甲醛的9g/L 氯化钠溶液中蒸汽固定5～10min 后，流水冲洗3～5min，晾干。

2）将涂片浸入苏丹黑B 染色液中，37℃水浴30～50min。取出后，立即用70%乙醇漂洗约10s，流水冲洗。

3）用瑞特染液复染20～30min 后，流水冲洗、晾干，显微镜下检查。

【结果判断】

苏丹黑B 阳性反应的细胞类型、反应强度与POX 基本一致。

【临床意义】

本染色临床意义与POX 染色基本相似，但POX 染色的特异性高于本染色，而本染色的敏感性高于POX 染色，所以临床上本染色不如POX 染色常用。

【注意事项】

1）苏丹黑B 贮存液配制后，在室温中要经常振摇，数天后才能完全溶解。

2）苏丹黑B 染色液可重复使用。染色欠理想时，应及时更换。

3）70％乙醇脱色时，时间不宜太长，否则可将阳性颗粒脱去。

4）放置时间较长的涂片，应选用苏丹黑B 染色，不宜作POX 染色。

5）其他注意事项见NAP 染色（4）～（7）。

五、α－醋酸萘酚酯酶染色

【原理】

血细胞内的α－醋酸萘酚酯酶（α－naphythyol acetate esterase，α－NAE）在pH 中性条件下可使α－醋酸萘酚释放出α－萘酚，与重氮盐偶联形成不溶性有色沉淀，定位于细胞质内酶所在的部位。α－NAE 是一种中性非特异性能酶，有的细胞系列中此酶能被氟化钠抑制，所以作α－NAE 染色时，通常同时做氟化钠抑制试验。

【试剂】

1）甲醛或含10％甲醛的9g／L 氯化钠溶液。

2）基质液：①0.067mol／L 磷酸盐缓冲液（pH7.6）。②10g／Lα－醋酸萘酯酶溶液用505 丙酮溶液作为溶剂。③重氮盐：坚固蓝B。④氟化钠。取50ml①液，将1ml②液缓慢滴入其中，充分振摇、混匀。然后加③50mg，充分振摇、混匀，过滤后将过滤液（即基质液）分为两份（各25ml），其中一份基质液中加入氟化钠75mg，并做标记。

3）10g／L 甲基绿溶液。

【步骤】

1）将含10％甲醛的9g／L 氯化钠溶液滴加在涂片上固定5min 或用甲醛蒸汽固定5～10min 后，流水冲洗，晾干。

2）将已固定的涂片分别放人两份基质液中，置37℃水浴箱中60min 后，流水冲洗。

3）10g／L 甲基绿溶液复染5～10min，流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：阳性产物为棕黑色或灰黑色弥漫性颗粒沉淀。－：无棕黑色或灰黑色颗粒；＋：棕黑色或灰黑色颗粒占胞质1／2；＋＋：棕黑色或灰黑色颗粒占胞质3／4；＋＋＋：充满灰黑色或弥散灰黑色颗粒，但密度较低；＋＋＋＋：充满灰黑色或充满弥散灰黑色颗粒，但密度较高。

2）正常血细胞反应结果：单核细胞系统均阳性且较强，加氟化钠抑制；粒细胞系统中原粒细胞阴性或阳性，早幼粒以后细胞均阳性（＋＋～＋＋＋），加氟化钠不抑制；淋巴细胞系统等为阴性或阳性，加氟化钠不抑制。

3）结果报告：阳性率、积分及氟化钠抑制率。抑制率的计算公式为：

$$氟化钠抑制率=\frac{抑制前阳性率或积分-抑制后阳性率或积分}{抑制前阳性率或积分}\times 100\%$$

【临床意义】

主要用于辅助鉴别急性白血病细胞类型。急性单核细胞白血病大多数呈阳性（常较强），阳性反应能被氟化钠抑制；急性粒细胞白血病、急性淋巴细胞白血病呈阴性或阳性，阳性反应不能被氟化钠抑制；急性早幼粒细胞白血病呈强阳性，阳性反应不能被氟化钠抑制或轻度抑制。

【注意事项】

1）重氮盐也可选择坚固蓝RR、坚固黑B。

2）氟化钠抑制试验的基质液中，氟化钠量一般按1ml基质液加氟化钠1.5mg比例。

3）氟化钠抑制试验中一般认为氟化钠抑制率>0.50为抑制。

4）其他见NAP染色注意事项（3）～（7）。

六、醋酸AS-D萘酚酯酶染色

【原理】

血细胞内的醋酸AS-D萘酚醛酶（naphthyolAS-D acetate esterase，NAS-DAE）在中性条件下可使醋酸AS-D萘酚释放出AS-D萘酚，与重氮盐偶联形成不溶性的有色沉淀，定位于细胞质内酶所在部位。它也是一种非特异性的酯酶，通常同时作氟化钠抑制试验。

【试剂】

1）40%甲醛。

2）基质液：①底物：醋酸AS-D萘酚。②丙酮。③丙二醇。④0.067mol/L磷酸盐缓冲液（pH7.0）。⑤重氮盐：坚固蓝BB盐。将①底物5mg溶于0.5ml②液和0.5ml③液中，加到20ml④液中，充分混匀后，再加入⑤20mg，混匀即可。

3）10g/L中性红溶液。

【步骤】

1）将血片或骨髓片用甲醛蒸汽固定5～10min后，流水冲洗，晾干。

2）将已固定的涂片放人基质液中，置37℃中温育1h后，流水冲洗，晾干。

3）10g/L中性红溶液复染1～2min。流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：阳性产物为蓝色颗粒，根据阳性颗粒量分为－、＋、＋＋、＋＋＋、＋＋＋＋（分级标准基本同α-NAE染色）。

2）正常血细胞反应结果：基本同α-NAE 染色。

3）结果报告：阳性率、积分及氟化钠抑制率。

【临床意义】

临床意义基本同α-NAE 染色，用以辅助鉴别急性白血病的细胞类型。

【注意事项】

本试验应同时做氟化钠抑制试验，方法基本同α-NAE 染色；其他同NAP 染色注意事项（4）～（8）。

七、α-丁酸萘酚酯酶染色

【原理】

血细胞内的α-丁酸萘酚酯酶（α-naphythyolbutyrate esterase，α-NBE）在碱性条件下可水解α-丁酸萘酚，释放出α-萘酚，与六偶氮副品红偶联，形成红色沉淀，定位于细胞质内酶所在的部位。此酶主要存在于单核细胞系统，可被氟化钠抑制，故常同时作氟化钠抑制试验。

【试剂】

1）甲醛。

2）基质液：①α-丁酸萘酚。②乙二醇-甲醚溶液。③0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH8.0）。④六偶氮副品红溶液（即40g/L 副品红盐酸液和40g/L 亚硝酸钠液1∶1 充分混匀）。⑤氟化钠。将①50mg 溶解于2.5ml②液中，再将其溶解于47.5ml③液中，最后将0.25ml④液加入其中，充分混匀、过滤后，将过滤液（即基质液）分为两份（各25ml），其中一份基质液中加入氟化钠32.5mg，并做标记。

3）10g/L 甲基绿溶液。

【步骤】

1）将血片或骨髓片用甲醛蒸汽固定5min 后，流水冲洗、晾干。

2）将已固定的涂片分别放入两份基质液中，置37℃中水浴45min 后，流水冲洗。

3）10g/L 甲基绿溶液复染5～10min。流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：阳性产物为红色沉淀。

2）正常血细胞反应结果：①单核细胞系统：除少数原单细胞（指分化差的细胞）呈阴性，其他均呈阳性，阳性反应能被氟化钠抑制。②粒细胞系统：均呈阴性。③淋巴细胞系统：T 淋巴细胞、非T 非B 淋巴细胞可呈阳性，B 淋巴细胞呈阴性。④其他细胞：如巨核细胞、幼红细胞、浆细胞呈阴性或弱阳性；组织细胞也可呈阳性，但不被氟化钠抑制。

3）结果报告：阳性率、积分及氟化钠抑制率。

【临床意义】

主要也用于辅助鉴别白血病细胞类型。临床意义基本同α-NAE 染色，但敏感性不如α-NAE 染色，而特异性较α-NAE 染色高。

急性单核细胞白血病阳性（可被氟化钠抑制）；急性粒－单细胞白血病（M_4）的部分白血病细胞呈阳性，部分白血病细胞呈阴性；急性粒细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病呈阴性；恶性组织细胞病可呈阳性。

【注意事项】

1）由于基质液含酯量高，37 ℃温育后，流水冲洗时间要长些，以保持涂片背景干净。

2）染色时，应选一张成熟单核细胞较多的涂片作阳性对照。

3）其他同NAP 染色（2）～（5）。

八、氯乙酸AS-D 萘酚酯酶染色

【原理】

血细胞内的氯乙酸AS-D 萘酚酯酶（naphthol AS-D chloroacetate esterase，NAS-DCE）水解基质液中的氯乙酸AS-D 萘酚产生AS-D 萘酚，进而与基质液中的重氮盐偶联形成不溶性有色沉淀，定位于细胞质内酶所在部位。NAS-DCE 几乎仅出现在粒细胞，特异性高，因此又称为“粒细胞酯酶”、“特异性能酶”。

【试剂】

1）甲醛－甲醇固定液：甲醛1 份与甲醇9 份混合而成。

2）基质液：①二甲基甲酰胺液。②底物：氯乙酸AS-D 萘酚。③0.067 mol/L（pH7.6）磷酸盐缓冲液。④40g/L 副品红盐酸液：4g 副品红溶于2 mol/L 盐酸100 ml 中。⑤40g/L 亚硝酸钠溶液。用2.5 ml ①液溶解②5 mg 后，加入到47.5 ml ③液中。将0.25 ml 六偶氮副品红溶液（将④液和⑤液等量混合约1 min 后即可）放入上述溶液中即为基质液。

3）10g/L 甲基绿溶液。

【步骤】

1）涂片用10％甲醛－甲醇固定液蒸汽固定5 min 后，流水冲洗，晾干。

2）将涂片放入基质液中，于37 ℃水浴箱中温育30 min 后，流水冲洗。

3）10g/L 甲基绿溶液复染5～10 min 后，流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：阳性产物为鲜红色或深红色颗粒状沉淀，定位于胞质中。根据阳性

颗料状况沉淀有无、多少分为－、＋、＋＋、＋＋＋、＋＋＋＋（分级标准基本同α－NAE 染色）。

（2）正常血细胞反应结果：①粒细胞系统：原粒细胞阴性或阳性，自早幼粒细胞至成熟中性成熟粒细胞均呈阳性反应，但酶活性不随细胞的成熟而增强。②单核细胞系统：多数为阴性反应，少数为弱阳性。③其他细胞：如淋巴细胞、浆细胞、幼红细胞和血小板均阴性。

（3）结果报告：阳性率、积分（或阳性分布情况）。

【临床意义】

主要用于辅助鉴别急性白血病细胞类型。急性粒细胞白血病呈阳性或阴性；急性早幼粒细胞白血病呈强阳性；急性单核细胞白血病几乎均呈阴性，仅个别细胞弱阳性；急性粒单核细胞白血病中原粒细胞、早幼粒细胞呈阳性，原单核细胞及幼单核细胞呈阴性；其他白血病呈阴性。

【注意事项】

（1）用甲醛蒸汽固定5～10min，也可取得良好染色效果。

（2）盐酸副品红与亚硝酸钠溶液六偶氮化时，必须充分混合，待1min 后再加到基质液中。

（3）其他同NAP 染色注意事项（2）～（7）。

九、α－丁酸萘酚酯酶和氯乙酸AS－D 萘酚醛酶双染色

【原理】

α－丁酸萘酚在单核细胞酯酶作用下，产生α－萘酚，再与六偶氮副品红溶液偶联，形成红色颗粒；氯乙酸AS－D 萘酚在氯乙酸AS－D 萘酚酯酶作用下，释放萘酚AS－D，再与坚固蓝B（B 盐）偶联，形成蓝色颗粒，均定位于胞质中。

【试剂】

（1）甲醛－丙酮磷酸盐缓冲液（pH6.6）：磷酸氢二钠100mg，磷酸二氢钾500mg，蒸馏水150ml，丙酮225ml，甲醛125ml，混匀即可。

（2）基质液：①甲液：将氯乙酸AS－D 萘酚4mg 溶于二甲基甲酚胺0.5ml 中，再与0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH8.0）9.5ml、坚固蓝B（B 盐）10mg 溶解混匀后过滤。②乙液：将α－丁酸萘酚10mg 溶于丙酮0.5ml，再与0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH8.0）9.5ml、六偶氮副品红溶液0.1ml 混匀后过滤。

（3）苏木精染液。

【步骤】

（1）新鲜涂片标本在4～10℃甲醛－丙酮磷酸盐缓冲液中冷固定30～60s，流水冲

洗，晾干。

2）浸入甲液中，37℃水浴20～30min 后，流水冲洗，晾干。

3）浸入乙液中，37℃水浴30min 后，流水冲洗，晾干。

4）苏木精溶液复染2min，流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：NAs－DCE 染色阳性产物为蓝色颗粒；α－NBE 染色阳性产物为红色颗粒。

2）正常血细胞反应结果：见NAS－DCE 染色及α－NBE 染色。

3）结果报告：2 项染色的阳性率及积分。

【临床意义】

酯酶双染色主要用于急性粒单核细胞白血病（M_4）鉴别诊断。在M_4中，同一张涂片上分别可见NAS－DCE 及α－NBE 染色阳性反应的细胞，甚至可以单个细胞同时出现NAS－DCE 和α－NBE 染色阳性反应。

【注意事项】

同NAS－DCE 染色及α－NBE 染色。

十、酸性磷酸酶染色

【原理】

血细胞内的酸性磷酸酶（acid phosphatase，ACP）在酸性（pH5.0）条件下水解基质液中的磷酸萘酚AS－BI，释放出萘酚AS－BI，后者与基质液中的重氮盐偶联形成不溶性的有色沉淀，定位于细胞质内酶所在的部位。有的细胞系列中此酶能被左旋酒石酸抑制，所以通常同时作左旋酒石酸抑制试验。

【试剂】

1）甲醇－丙酮缓冲液（pH5.4）：枸橼酸0.63g，蒸馏水30ml，甲醇10ml，丙酮60ml，混匀后用浓氢氧化钠溶液调整pH 至5.4。

2）基质液及酒石酸基质液：①储备液：磷酸萘酚AB－BI100mg 溶解于10mlN－N二甲基甲

酰胺液中。②0.1mol/L 醋酸缓冲液：甲液：醋酸钠8.2g，蒸馏水1000ml。乙液：冰醋酸6.0ml，蒸馏水1000ml。然后用乙液滴定甲液至pH5.2。③0.05mol/L 醋酸酒石酸缓冲液：左旋酒石酸3.75g，0.1mol/L 乙酸缓冲液490ml。用浓氢氧化钠液调整pH 至5.2，再加蒸馏水至500ml。④重氮盐：坚固紫酱GBC。

基质液：②液25ml，加①液0.5ml，再加④12.5mg，溶解，过滤后备用。

酒石酸基质液：③液25ml，加①液0.5ml，再加④12.5mg，溶解，过滤后备用。

3）10g/L 甲基绿溶液。

【步骤】

将血片或骨髓片在4～10℃甲醇－丙酮缓冲液中固定30～60s 后，流水冲洗，晾干。将已固定的涂片分别放入两份基质液中，置37℃中水浴45～60min 后，流水冲洗。10g/L 甲基绿溶液复染5～10min。流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

阳性产物为红色颗粒。应报告阳性率、积分及酒石酸抑制率。

【临床意义】

主要用于辅助诊断毛细胞白血病、鉴别其他疾病等。①诊断毛细胞白血病：毛细胞呈阳性，不被左旋酒石酸抑制。②帮助鉴别戈谢细胞和尼曼－匹克细胞：前者阳性，后者阴性。③帮助鉴别T 淋巴细胞和B 淋巴细胞：前者阳性，后者阴性或弱阳性。

【注意事项】

ACP 染色还可用Gomori 硫化铅法，但此法所需时间长。其他同NAP 染色（3）～（8）。

十一、过碘酸－雪夫反应

【原理】

含有乙二醇基（—CHOH—CHOH）的多糖类物质（如糖原、粘多糖、粘蛋白、糖蛋白及糖酯等）被过碘酸氧化，形成双醛基（—CHO—CHO）。醛基与雪夫试剂中的无色品红结合，使无色品红变成紫红色化合物，定位于含有多糖类的细胞内。过碘酸－雪夫反应（periodic acid—Schiff reaction，PAS）以前又称为糖原染色。

【试剂】

1）95%乙醇。

2）10g/L 过碘酸溶液：用蒸馏水配制，置冰箱中避光可保存3 个月。

3）雪夫（Schiff）液：碱性品红1.0g 溶解于200ml 蒸馏水的煮水中，待冷却至60℃时加入1mol/L 盐酸溶液20ml，再冷却至25℃时再加偏重亚硫酸钠2g，次日加活性碳1～2g，吸附过滤后使成为无色液体。置4℃冰箱中保存。

4）10g/L 甲基绿溶液。

【步骤】

1）在骨髓片上滴加95%乙醇，固定5min 后，流水冲洗，晾干。

2）将10g/L 过碘酸溶液滴加在血膜上室温氧化10min，流水冲洗，晾干。

3）再将Schiff 液滴加在血膜上作用30min，流水冲洗，晾干。

4）用10g/L 甲基绿溶液复染5～10min，流水冲洗，晾干，显微镜下检查。

【结果】

1）结果判断：阳性结果为红色沉淀物，不同细胞系列阳性结果标准不一致。

2）正常血细胞反应结果：①粒细胞系统：原粒细胞阳性或阴性，随着细胞成熟阳性程度增强；嗜酸性颗粒阴性，颗粒间质阳性；嗜碱性颗粒阳性，颗粒间质阴性。②单核细胞系统：呈阳性或阴性。③淋巴细胞系统：正常淋巴细胞阳性率＜0.20。④红细胞系统：均呈阴性。⑤巨核细胞系统：各期巨核细胞和血小板均阳性（呈颗粒状、块状）。⑥其他细胞：巨噬细胞可阳性，浆细胞阴性或阳性。

3）结果报告：阳性率、积分（或阳性的特点）。

【临床意义】

1）红细胞系统疾病：红血病、红白血病、骨髓增生异常综合征中幼红细胞常阳性（呈均匀红色或块状），有的幼红细胞呈强阳性，甚至红细胞也呈阳性。在大多数红系良性疾病中幼红细胞呈阴性。

2）白细胞系统疾病：主要用于辅助鉴别急性白血病的细胞，因不同细胞类型阳性特点不一。如急性粒细胞白血病呈细颗粒状或均匀红色，急性单核细胞白血病呈细颗粒状、弥散分布阳性，急性及慢性淋巴细胞白血病呈粗颗粒状；恶性淋巴瘤呈块状或粗颗粒状。

3）其他细胞：尼曼－匹克细胞呈阴性或弱阳性，戈谢细胞呈强阳性，Reed－Sternberg 细胞阴性或弱阳性，骨髓转移性腺癌细胞常呈强阳性。

【注意事项】

1）通过观察中性成熟粒细胞的阳性情况可得知本次染色是否成功。

2）Schiff 液应置于十分清洁、干燥的棕色瓶内暗处保存，变红即不能再用，以免出现假阳性。

3）固定剂可用乙醇、甲醇及甲醛，但以95％乙醇固定后的糖原颗粒最为明显。

4）PAS 染色所用的骨髓片可以是陈旧涂片。

5）其他同NAP 染色注意事项（4）～（6）。

第六节　造血系统疾病检验

造血系统疾病包括红细胞系统疾病、白细胞系统疾病等，细胞形态学检查是诊断造血系统疾病的主要检查手段之一。形态学的检查需要结合临床表现、病史及其他实验室检查做出综合判断。本节主要介绍造血系统疾病的检验结果，重点介绍形态学检查特点（其中有关异常细胞形态特点详见本章第三节）。

一、缺铁性贫血

临床上铁缺乏症包括贮存铁缺乏期、缺铁性红细胞生成期和缺铁性贫血期，这里介绍缺铁性贫血（iron deficient anemia，IDA）。IDA 是由于机体铁丢失过多、生理需要量增加、铁吸收过少或摄入不足造成机体铁的缺乏，使红细胞内血红蛋白合成障碍的一种小细胞低色素性贫血。它是临床上最为常见的一种贫血，临床主要表现为贫血。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，白细胞数和血小板数常正常，部分患者血小板数增多，少数白细胞数轻度减少，平均红细胞容积（MCV）、平均红细胞血红蛋白量（MCH）及平均血红细胞血红蛋白浓度（MCHC）均下降。血液涂片上红细胞大小不一，以体积小的红细胞为主，红细胞中央淡染区扩大，严重者可见环形红细胞。

【骨髓象】

1）骨髓增生明显活跃，粒红比值下降。

2）红细胞系统增生，以中、晚幼红细胞为多见（其胞质发育落后于胞核），形态特点为胞体小、边缘不整齐、胞质少、胞质偏蓝、染色质致密。成熟红细胞形态基本同血象。

3）粒细胞系统、巨核细胞系统一般正常。

【细胞化学染色】

1）铁染色：细胞外铁阴性，细胞内铁常明显减少（铁粒幼红细胞<0.15）。

2）PAS 染色：幼红细胞呈阴性。

【其他检查】

血清铁蛋白、血清铁、血清转铁蛋白饱和度下降，血清总铁结合力、血清转铁蛋白及红细胞内游离原卟啉增加。

【注意事项】

1）对于原因不明的贫血患者应将铁染色作为常规检查，必要时做PAS、NAP 等染色。

2）怀疑IDA 的患者至少留一张骨髓小粒丰富的骨髓片，用以作铁染色。

3）骨髓片上血膜厚的部位，幼红细胞易出现缺铁样改变；片尾红细胞变大，扩大的淡染区消失。因此观察部位选择不当，易导致误诊或漏诊。

4）IDA 患者骨髓中的中、晚幼红细胞由于其胞体小、胞质量少，易误为淋巴细胞。

5）服用铁剂后的IDA 患者，其骨髓中多染性红细胞增多。

6）单凭骨髓检查不能确诊IDA，需要结合临床及其他检查（如血清铁蛋白、血清

铁等）。

（7）注意与其他原因引起的小细胞低色素性贫血加以鉴别。

二、铁粒幼细胞贫血

铁粒幼细胞贫血（sideroblastic anemia，SA）是由于多种原因导致卟啉合成障碍，使红细胞内血红素合成减少、机体铁贮存过剩所致的一组低色素性贫血。根据病因分为遗传性和获得性，后者分为原发性（现已归入骨髓增生异常综合征）和继发性。临床主要表现为贫血，肝、脾轻至中度肿大。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，常呈低色素性或双相性改变。白细胞及血小板数正常或减少。

【骨髓象】

（1）骨髓增生明显活跃，粒红比值下降。

（2）红细胞系统增生，以中、晚幼红细胞为主，伴缺铁样改变，部分幼红细胞巨幼样变。

（3）粒细胞系统、巨核细胞系统正常或轻度减少。

【细胞化学染色】

（1）铁染色：细胞内铁、细胞外铁均明显增加，环形铁粒幼细胞占有核红细胞0.15以上。

（2）PAS染色：幼红细胞呈阴性。

【其他检查】

血清铁、血清转铁蛋白饱和度及血清铁蛋白增加，血清总铁结合力下降。

【注意事项】

（1）诊断SA最重要的实验室指标之一是铁染色片中出现较多的环形铁粒幼细胞，但目前关于环形铁粒幼细胞量的多少尚无统一标准，多数认为应大于0.15。

（2）继发性SA可继发于药物如异烟肼、氯霉素、氮芥、瘤可宁等，也可继发干某些疾病如恶性肿瘤、自身免疫性疾病、珠蛋白生成障碍性疾病、慢性酒精中毒等。

三、巨幼细胞贫血

巨幼细胞贫血（megaloblastic anemia，MA）是指由于维生素B_{12}、叶酸或内因子缺乏使血细胞DNA合成障碍的一组大细胞正色素性贫血。引起维生素B_{12}、叶酸缺乏的原因有丢失过多、生理需要量增加、吸收过少或摄入不足等。临床主要表现为贫血，维生素B_{12}缺乏者还可出现神经系统症状。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，白细胞和血小板数正常或下降，故可表现为全血细胞数减少。MCV 和MCH 增加，MCHC 正常。血液涂片上红细胞大小不一，易见大红细胞、卵圆形细胞、多染性红细胞、嗜碱性点彩红细胞、豪－乔小体，有时可见有核红细胞、嗜碱性红细胞偶见卡波环。并可见粒细胞分叶过度、巨型杆状核粒细胞及大血小板，偶见幼粒细胞。

【骨髓象】

1）骨髓增生明显活跃，粒红比值下降。

2）红细胞系统增生，巨幼红细胞（其胞核发育落后于胞质，详见本章第三节）增生＞0.10，形态特点为胞体大、胞质量多、核大、染色质疏松，豪－乔小体、核碎裂较易见。成熟红细胞形态基本同血象。

3）粒细胞系统易见巨型晚幼粒细胞、巨型杆状核粒细胞，并可见环形杆状核粒细胞及粒细胞分叶过度。

4）巨核细胞系统可见成熟障碍、核分叶过度、颗粒减少、大血小板等。

【细胞化学染色】

1）铁染色：细胞内铁、细胞外铁均正常。

2）PAS 染色：幼红细胞呈阴性。

【其他检查】

血清维生素B_{12}、叶酸检测：均下降或其中1 项下降。

【注意事项】

1）MA 患者骨髓涂片中巨幼红细胞和正常幼红细胞均有，故骨髓片分类计数时，应将两者分开计数。

2）细胞形态典型者可通过骨髓涂片检查确诊MA，但不能确定病因，故而再作血清维生素B_{12}及叶酸等检测。

3）维生素B_{12}、叶酸缺乏引起血细胞的变化称为巨幼变；其他原因所致的类似巨幼变的改变称为巨幼样变或类巨幼变，巨幼样变可见于骨髓增生异常综合征、红白血病、红血病、化疗后等等；故要注意区分巨幼变和巨幼样变。

4）MA 合并缺铁时，因血红蛋白合成障碍使红细胞巨幼变不明显，故易误诊。

5）当MA 难以诊断时，可采用维生素B_{12}、叶酸作诊断性治疗。治疗后24 ～72h 红细胞系统形态应最先恢复正常，其次是粒细胞系统，最后是巨核细胞系统。

四、再生障碍性贫血

再生障碍性贫血（aplastic anemia，AA），简称为再障，是指由于化学、物理、感染

因素及不明原因使造血干细胞、造血微环境损伤及免疫功能异常，骨髓造血组织明显减少而被脂肪组织替代，导致骨髓造血功能障碍的疾病。再障以青壮年为多见，临床表现为贫血、出血、感染，常无肝、脾和淋巴结肿大。AA 可与阵发性睡眠性血红蛋白尿症（PNH）同时存在或相互转化，称为AA－PNH 综合征。国内学者将AA 分为急性和慢性，西方学者将AA 分为重型和轻型，重型再障（SAA）分Ⅰ和Ⅱ型，SAAI 型相当于我国的急性再障，SAA Ⅱ是指慢性再障病情恶化，其临床表现、血象及骨髓象与急性相似。

【血象】

全血细胞数减少，早期可表现为一系或二系减少。淋巴细胞相对增加，网织红细胞减少（慢性再障常大于0.01，但绝对值小于正常值）。中性粒细胞有时可见毒性改变，其他细胞形态基本正常。

【骨髓象】

1）骨髓增生减低或极度减低。

2）粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统明显减少，以成熟细胞为主，分裂象细胞未见或少见，血细胞形态基本正常。

3）淋巴细胞相对增加。

4）非造血细胞如浆细胞、网状细胞、肥大细胞、成骨细胞、造骨细胞、脂肪细胞等增加。

5）骨髓小粒呈空网状结构，其中有核细胞减少，以非造血细胞（如网状细胞、浆细胞、肥大细胞等）为主（>0.50）。

6）骨髓涂片上油滴明显增加。

【细胞化学染色】

1）NAP 染色：阳性率及积分值增加。

2）铁染色：细胞内铁、细胞外铁增加。

【其他检查】

1）骨髓活检：增生减低，造血细胞减少，脂肪组织、淋巴细胞及非造血细胞增加。

2）造血干/祖细胞培养：细胞集落形成单位（CFU－C）低且无抑制成分者提示干细胞缺陷；CFU－C 不低且无抑制成分者提示造血微环境缺陷；CFU－C 低且有抑制成分者提示免疫缺陷。

3）尿中促红细胞生成素可增加。

【注意事项】

1）怀疑再障的标本染色时间要缩短，因为其有核细胞常明显减少。

2）大多数再障患者骨髓中有核细胞减少，需注意与骨髓部分稀释区别。

3）观察再障骨髓涂片时，要注意骨髓小粒结构、非造血细胞（尤其是肥大细胞）数量及巨核细胞数量。

4）有的慢性再障骨髓涂片有核细胞增生活跃，但巨核细胞明显减少，非造血细胞也增多。

5）通过骨髓检查可以作出提示再障诊断，但通常不能区别急性、慢性再障。

6）PNH 及AA－PNH 综合征也可表现为全血细胞减少、骨髓增生减低，要注意鉴别。

五、纯红细胞再生障碍性贫血

纯红细胞再生障碍性贫血（Pure red cell aplasia，PRCA），简称为纯红再障，是由于单一红细胞系统细胞显著减少或缺如，使红细胞系统生成障碍所导致的贫血。它是再障的一种特殊类型。根据病因分为先天性和获得性，后者分为原发性和继发性，继发性多与自身免疫性疾病及胸腺肿瘤有关。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，网织红细胞明显减少或缺如，白细胞、血小板数正常或轻度减少。

【骨髓象】

1）骨髓增生活跃或减低，粒红比值增加。

2）红细胞系统各阶段明显减少（<0.03～0.05）或缺如，形态基本正常。

3）粒细胞系统、巨核细胞系统正常。

【注意事项】

1）骨髓涂片中幼红细胞明显减少者，要注意可能是取材失败所致。

2）极个别骨髓增生异常综合征患者以纯红再障的形式出现，要注意鉴别。

3）注意与急性造血停滞鉴别。后者除幼红细胞明显减少外，还可见巨大原红细胞。

六、急性造血停滞

急性造血停滞（Acute arrest of hemopoiesis，AAH）又称为急性再生障碍危象，是在原有疾病的基础上、在某些诱因作用下，造血功能紊乱或代偿失调，使血细胞暂时性减少或缺如。原有疾病常为溶血性贫血、缺铁性贫血、恶性淋巴瘤等，诱因常为感染、服用某些药物等。一旦去除诱因，危象即可解除。

【血象】

红细胞数及血红蛋白量减少（较原有疾病严重），网织红细胞减少，粒细胞和血小

板数正常、增多或减少，严重者表现为全血细胞数减少。

【骨髓象】

1）骨髓增生活跃或减低，粒红比值常增加。

2）红细胞系统明显减少，早期只见中、晚幼红细胞，数日后发现巨大原红细胞，其胞体巨大，可达20～50um，胞体圆，胞质丰富且呈深蓝色，核圆形，染色质呈细颗粒状，核仁大而清楚。

3）部分患者粒细胞系统、巨核细胞系统可减少且有成熟障碍。

【注意事项】

怀疑AAH要注意观察有无巨大原红细胞。AAH的诊断一定要密切结合临床表现，并与纯红再障区别。

七、溶血性贫血

溶血性贫血（hemolytic anemia，HA）简称为溶贫，是指由于先天性或后天性因素使血循环中的红细胞破坏增加，超过骨髓代偿能力，导致以贫血、黄疸或伴有脾肿大为主要临床表现的一组疾病的总称。临床上根据溶血部位的不同分为血管内溶血、血管外溶血；根据起病急缓分为急性溶贫、慢性溶贫。临床上引起溶贫的病因有很多，可为红细胞内在异常（如红细胞膜、酶及血红蛋白等异常），也可为红细胞外在异常（如免疫、机械、感染、化学及物理等因素）。此处介绍实验室检查的共同点。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，网织红细胞增加（>0.05～0.25，甚至>0.90）；白细胞和血小板数一般正常，严重溶贫时两者可增加。血液涂片上多染性红细胞易见，并可见破碎红细胞、有核红细胞，有的可见一定数量特殊形态红细胞如球形红细胞、口形红细胞、靶形红细胞、椭圆形红细胞等，少数患者可见幼粒细胞。

【骨髓象】

1）骨髓增生明显活跃，粒红比值明显下降。

2）红细胞系统明显增生，以中、晚幼红细胞为主，形态基本正常，少数可出现巨幼样变，分裂象细胞较易见。成熟红细胞形态基本同血象。

3）粒细胞系统、巨核细胞系统基本正常。

【细胞化学染色】

1）PAS染色：个别幼红细胞呈阳性。

2）铁染色：细胞内铁、细胞外铁一般正常或减少，但珠蛋白生成障碍性贫血可增加，阵发性血红蛋白尿症可呈阴性。

【其他检查】

(1) 血管内溶血：总胆红素、间接胆红素、尿胆原、粪胆原、血浆游离血红蛋白增加，血浆结合珠蛋白减少，血红蛋白尿，尿含铁血黄素试验阳性，网织红细胞>0.05，红细胞寿命缩短等。

(2) 血管外溶血：总胆红素、间接胆红素、尿胆原、粪胆原增加，网织红细胞>0.05，红细胞寿命缩短等，严重者血浆结合珠蛋白也减少。

(3) 溶血病因检查：如红细胞渗透脆性试验、红细胞孵育脆性试验、高铁血红蛋白还原试验、G6PD 活性测定、蔗糖溶血试验、酸溶血试验、变性珠蛋白小体形成试验、异丙醇试验、血红蛋白电泳等 (详见本篇第四章溶血性贫血的检验)。

【注意事项】

(1) 怀疑HA 时，尤其要注意观察成熟红细胞形态及多染性红细胞数量等。

(2) HA 仅凭骨髓象检查不能确诊，需结合临床及其他检查作出提示性、符合性诊断意见。

(3) 阵发性睡眠性血红蛋白尿症所致的HA，可同时伴有缺铁。珠蛋白生成障碍性贫血患者其骨髓中幼红细胞也呈缺铁样改变，但细胞内铁、细胞外铁均增加。

八、急性髓细胞白血病

白血病是造血系统的一种恶性肿瘤，其特点为骨髓中有大量不能控制的白血病细胞增生，广泛浸润其他组织和脏器，并进入外周血中。引起白血病的病因有射线、感染、化学、遗传等。临床上根据起病等情况将白血病分为急性白血病和慢性白血病。急性白血病起病急、病程短，未经治疗其自然病程一般少于6 个月，骨髓中以原始和 (或) 幼稚白血病细胞增生为主；慢性白血病起病缓慢、病程较长，未经治疗其自然病程一般大于1 年，骨髓及外周血中以成熟、较成熟细胞增生为主。急性白血病主要表现为四大症状：①贫血：早期即可出现贫血，随着病情进展贫血加重；②发烧：多数是由于感染所致，严重者可导致败血症；③出血：以皮肤、黏膜为常见，严重者出血部位为颅内、消化道、呼吸道等，出血以急性早幼粒细胞白血病最为严重且易导致弥散性血管内凝血，其次为急性单核细胞白血病和急性粒单核细胞白血病；④浸润：白血病细胞可浸润各组织脏器，故常有肝、脾、淋巴结肿大，还有胸骨压痛、骨痛，并可浸润皮肤、黏膜、神经系统、胃肠系统、泌尿生殖系统等。急性白血病又分为急性髓细胞白血病 (acute meylocytic leukemia，AML) 和急性淋巴细胞白血病 (acute lymphocytic leukemia，ALL)，这里介绍急性髓细胞白血病。

【分型及标准】

目前白血病的分型方法有多种，有形态学分型 (M)、免疫学分型 (I)、细胞遗传学分型 (C) 和分子生物学分型 (M)，将上述四种分型结合应用于临床即称为白血病的

MICM 分型。但在临床上应用最广、最基础的分型是形态学分型（多数采用FAB 分型），其不足之处是分型结果受主观因素影响较多，且重复性不佳。我国急性髓细胞白血病形态学分型是在FAB 分型基础上修改的标准（即1986 年在天津召开的白血病分类分型会议的标准），详见表2－5－13。2001 年国际上又提出了造血组织肿瘤的WHO 分型，其中有关急性髓细胞白血病分型如下：

表2－5－13　急性髓细胞白血病分型标准（1986 年天津会议）

型　　别	骨髓象及血象
M_1（急性粒细胞白血病未分化型）	骨髓中原粒细胞≥0.90（NEC），早幼粒细胞很少，中幼粒以下各阶段细胞不见或罕见
M_2（急性粒细胞白血病部分分化型）	
M_2a	骨髓中原粒细胞≥0.30～<0.90（NEC），早幼粒细胞及其以下各阶段细胞>0.10，单核细胞<0.20
M_2b	骨髓中原粒细胞及早幼粒细胞明显增多，以异常中性中幼粒细胞为主，>0.30，此类细胞核浆发育明显不平衡，其胞核常有核仁
M_3（急性早幼粒细胞白血病）	骨髓中以颗粒异常增多的异常早幼粒细胞增生为主，>0.30（NEC），原粒细胞及中幼粒以下细胞各阶段较少
M_3a（粗颗粒型）	胞质中充满粗大颗粒，且密集融合分布，颗粒也可覆盖在核上
M_3b（细颗粒型）	胞质中颗粒细小而密集
M_4（急性粒单核细胞白血病）	
M_4a	骨髓中以原粒细胞、早幼粒细胞增生为主，原单核细胞、幼单核细胞及单核细胞>0.20（NEC）
M_4b	骨髓中以原单核细胞、幼单核细胞增生为主，原粒细胞、早幼粒细胞>0.20（NEC）
M_4c	骨髓中的原始细胞既具有粒细胞系统特征又具有单核细胞系统特征，此类细胞>0.30（NEC）
M_{4EO}	除上述特点外，嗜酸性粒细胞增加占0.05～0.30（NEC），其嗜酸颗粒粗大而圆，还有着色较深的嗜碱颗粒
M_5（急性单核细胞白血病）	
M_5a（急性单核细胞白血病未分化型）	骨髓中原单核细胞≥0.80（NEC）
M_5b（急性单核细胞白血病部分分化型）	骨髓中原单核细胞和幼单核细胞≥0.30（NEC），其中原单核细胞<0.80

续表

型　别	骨髓象及血象
M_6（红白血病）	骨髓中红细胞系统>0.50，且有形态异常，原粒细胞（或原单核细胞＋幼单核细胞）>0.30（NEC）；若血液涂片中原粒细胞（或原单核细胞）>0.05，骨髓中原粒细胞（或原单核细胞＋幼单核细胞）>0.20（NEC）
M_8（急性巨核细胞白血病）	外周血中有原巨核（小巨核）细胞；骨髓中原巨核细胞≥0.30；原巨核细胞有电镜或单克隆抗体证实；骨髓细胞少，往往干抽，活检有原巨核细胞增多，网状纤维增加

注：以上所指的原始细胞包括Ⅰ型和Ⅱ型（Ⅰ型是指典型的原始细胞，胞质中无颗料；Ⅱ型是指有原始细胞的特性，胞质量较少，有少量的细小颗粒。NEC（非红系细胞计数）是指不包括有核红细胞、淋巴细胞、浆细胞、肥大细胞、巨噬细胞的有核细胞计数

1．伴有重现性遗传学异常的急性髓细胞白血病（AML）

1）AML伴t（8；1）（q2；q22）；（AML1－ETO）。

2）AML伴有骨髓异常嗜酸性粒细胞增生：inv（16）（p13；q22）或t（16；16）（p13；q22）；（CBFβ－MYH11）。

3）急性早幼粒细胞白血病（APL）：AML伴有t（15；17）（q22；q11－12）；PML／RARα及其变异易位。

4）AML伴11q223（MLL）异常。

2．伴有多系增生异常的AML

1）有骨髓增生异常综合征（MDS）或MDS／骨髓增生性疾病（MPD）病史；

2）无MDS病史。

3．治疗相关性AML和MDS

1）烷化剂相关的AML和MDS。

2）拓扑异构酶Ⅱ抑制剂相关的AML。

3）其他类型。

4．不能按上述分类的AML

1）AML微分化型；

2）AML未成熟型；

3）AML部分成熟型；

4）急性粒单核细胞白血病；

5）急性单核细胞白血病；

6）急性红白血病；

7）急性巨核细胞白血病；

8）急性嗜碱性粒细胞白血病；

9）急性全髓细胞白血病伴有骨髓纤维化；

5．急性双表型白血病

【血象】

红细胞数和血红蛋白量常明显减少，血小板数也常减少。多数患者白细胞数升高（如M_1、M_2a），有的患者白细胞数减少（如M_3、M_2b）。血液涂片分类可见数量不等的原始细胞、幼稚细胞，有的可出现“裂孔现象”（即血液涂片中仅见原始及成熟细胞而缺乏中间阶段细胞）。有时可见棒状小体、幼红细胞及柴捆细胞（后者见于M_3）。

【骨髓象】

1）骨髓增生极度活跃或明显活跃。

2）髓细胞系统的白血病细胞异常增生≥0.30。各型白血病所占的比例多少均不相同，详见急性髓细胞白血病分型及标准。白血病细胞如异常早幼粒细胞、异常中幼粒细胞、柴捆细胞、棒状小体等形态的特点见本章第三节，各种原始细胞的形态特点见本章第二节表2－5－10。有的白血病细胞可见棒状小体，M_3常可见柴捆细胞。

3）其他细胞系统常明显抑制，有的可见病态巨核细胞。

【细胞化学染色】

各种急性髓细胞白血病细胞化学染色结果见表2－5－14。

表2－5－14　各种常见急性白血病细胞化学染色结果

染色	急性早幼粒细胞白血病	急性粒细胞白血病	急性单核细胞白血病	急性粒单细胞白血病	急性淋巴细胞白血病
POX 染色	强阳性	阳性或阴性	阴性或弱阳性	阴性至阳性	阴性
SB 染色	强阳性	阳性或阴性	阴性或弱阳性	阴性至阳性	阴性
NAS－DAE 染色	强阳性	阳性	阳性或强阳性	阳性至强阳性	阳性
NAS－DAE 染色＋氟化钠抑制试验	不抑制	不抑制	抑制	部分抑制	不抑制
α—NBE 染色	阴性	阴性	阳性	阴性至阳性	阴性
NAS—DCE 染色	强阳性	阳性或阴性	阴性或弱阳性	阴性至阳性	阴性
PAS 染色	阳性	阳性 呈均匀红色	阳性 呈细颗粒状	阳性，呈均匀 红色或细颗粒状	阳性 呈粗颗粒状

【其他检查】

细胞免疫学检查：结果详见表2－5－15。染色体和分子生物学检查：多数白血病患者有异常，以非特异性异常占多数，仅少数患者为特异性异常，详见表2－5－16。

表2－5－15　AML的FAB分型与细胞免疫学标志

亚型	典型的免疫学标志
M_1	MPO、CD34、CD33、CDl3
M_2	MPO、CD33、CDl3、CDl5
M_3*	MPO、CD33、CDl3
M_4	MPO、CD33、CDl3、CDl4、CDl5
M_5	MPO、CD33、CDl3、CDl4
M_6	CD33、血型糖蛋白A
M_7	CD33、CD41、CD42b、CD61

注：*M_3亚型HLA－DR、CD34常阴性

表2－5－16　几种较特异的急性髓细胞白血病细胞染色体和分子生物学特点

FAB分型	核　型	分子标志
M_3	t（15；17）（q22q11－12）	PML—RARα
	c（1l；17）（q23；q21）	PLZF—RARα
M_2b	t（8；21）（q22；q22）	AMLl—ETO
M_4EO	inv/del（16）（p13；q22）	CBFβ—MYHll
M_5	t/del（1l）（q23）	MLL

【缓解及复发标准】

现采用1987年全国白血病化学治疗讨论会的标准，这里介绍骨髓象标准。

（1）完全缓解骨髓象：原粒细胞Ⅰ型＋Ⅱ型（原单核细胞＋幼单核细胞或原淋巴细胞＋幼淋巴细胞）≤0.05，红细胞及巨核细胞系统正常。

M_2b型：原粒细胞Ⅰ型＋Ⅱ型≤0.05，中性中幼粒细胞比例在正常范围。

M_3型：原粒细胞＋早幼粒细胞≤0.05。

M_4型：原粒细胞Ⅰ、Ⅱ型＋原单核细胞及幼单核细胞≤0.05。

M_5型：原单核细胞Ⅰ、Ⅱ型＋幼单核细胞≤0.05。

M_6型：原粒细胞Ⅰ、Ⅱ型≤0.05，原红细胞及幼红细胞比例基本正常。

M_7型：粒细胞、红细胞二系比例正常，原巨核细胞＋幼巨核细胞基本消失。

（2）部分缓解骨髓象：原粒细胞Ⅰ型＋Ⅱ型（原单核细胞＋幼单核细胞或原淋巴细胞＋幼淋巴细胞）＞0.05≤0.20。

（3）复发骨髓象：原粒细胞Ⅰ型＋Ⅱ型（原单核细胞＋幼单核细胞或原淋巴细胞＋幼淋巴细胞）＞0.0。

【注意事项】

1）选择细胞结构清楚的涂片部位进行观察，片子偏厚的部位其细胞胞体常较小、细胞结构不清楚，影响正确判断。

2）有的骨髓涂片中的白血病细胞形态不典型，影响正确判断，如副型原粒细胞增生为主者易误认为急性单核细胞白血病；以小型原粒细胞增生为主者易误认为急性淋巴细胞白血病；M_3 变异型（即 M_3v）极易误认为急性单核细胞白血病；急性巨核细胞白血病易误认为急性淋巴细胞白血病等等。故有条件的单位应采用MICM 分型。

3）有些白血病患者血象虽表现为全血细胞数减少（如 M_3），但血液涂片分类时几乎均可见白血病细胞，因此全血细胞数减少患者标本要注意辨认各种细胞。

4）判断急性白血病细胞类型一定要结合细胞化学染色，如过氧化物酶染色、特异性能酶、非特异性酯酶、过碘酸－雪夫反应等染色；并要结合血液涂片及骨髓涂片中的其他细胞成分。

5）急性白血病一般均能确诊，同时要判断白血病细胞类型。对于细胞类型不肯定者可做出“急性白血病”或“急性髓细胞白血病”的诊断意见，同时提示急性白血病分型意见，并建议结合其他检查。

6）急性白血病标本最好计数500 个有核细胞，以减少误差，而且应在细胞化学染色后计数为宜。

7）骨髓中原始细胞采用何种方法计算其百分比，是诊断为急性髓细胞白血病（AML）或骨髓增生异常综合征（MDS）的关键。FAB 协作组为了区分MDS 与AML，提出了建议，详见图2－5－2。

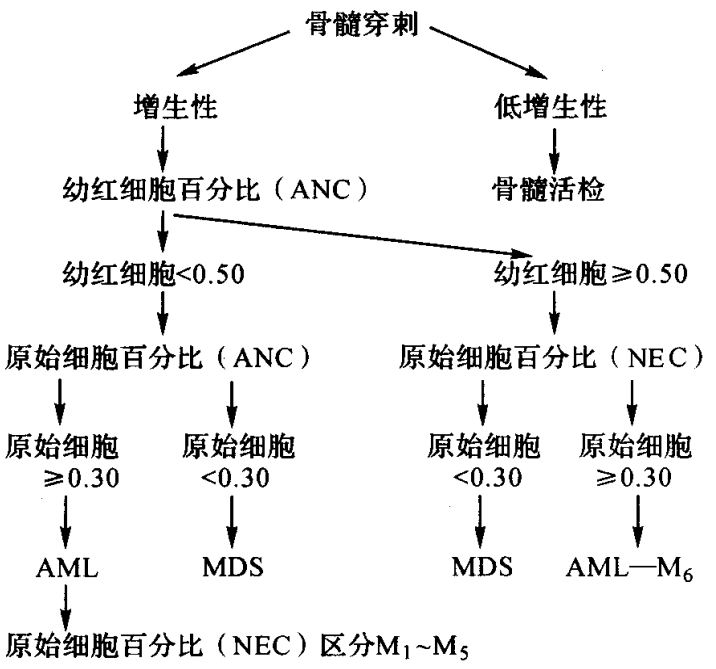


图2－5－2　区分AML 与MDS 原始细胞非分比标准（FAB）

(8) 复查的标本应与上次骨髓涂片进行比较，作出完全缓解骨髓象、部分缓解骨髓象、改善骨髓象、退步骨髓象、复发骨髓象等诊断。

(9) WHO 分型对急性白血病骨髓中原始细胞数作了调整，定为≥0.20；如有特异性髓细胞系统肿瘤染色体异常，即使原始细胞未达到0.20 时，也应诊断为急性白血病。

(10) M_2h 中的异常中性中幼粒细胞也可见于慢性粒细胞白血病及骨髓增生异常综合征等，故诊断 M_2h 要注意与其他疾病鉴别。

(11) M_5 的骨髓片中有时浆细胞较易见。

(12) 典型的 M_6 临床上依次经过以下3 个阶段：①红血病期：骨髓中红细胞系统异常增生为主；②红白血病期：红细胞系统和白细胞系统异常增生；③白血病期：多数转变为急性粒细胞白血病，极少数转变为急性单核细胞白血病、急性粒单核细胞白血病。

(13) M_6 中的红细胞系统形态常异常，包括巨幼样变、双核、多核、核碎裂、嗜碱性点彩、豪－乔小体、大红细胞等。红细胞系统巨幼样变除见于 M_6 还可见于骨髓增生异常综合征、其他白血病等，故要加以鉴别。

九、急性淋巴细胞白血病

急性淋巴细胞白血病（acute lymphocytoc leukemia，ALL），简称为急淋，是一种常见急性白血病，在所有白血病中发病率占第二位，在儿童白血病中占首位。除临床表现为四大症状外，还有以下特点：①多见于儿童及青壮年；②淋巴结常肿大；③易侵犯脑膜导致脑膜白血病。

【分型及标准】

目前国内采用FAB 分型。FAB 根据急性淋巴细胞白血病细胞形态特点分为3 型，详见表2－5－17。

表2－5－17　急性淋巴细胞白血病FAB 分型（1976 年）

亚型	细胞大小	核染色质	核形	核仁	胞质量	胞质嗜碱性	能质空泡
ALL_1	小细胞为主，大小较一致	较粗，结构较一致	规则，偶有凹陷、折叠	小而不清楚，少或不见	少	轻或中度	不定
ALL_2	大细胞为主，大小不一	较疏松，结构不一致	不规则，常见凹陷、折叠	清楚，1 个或多个	不一定，常较多	不一定，有些较深蓝	不定
ALL_3	大细胞为主，大小较一致	细点状，结构一致	较规则	明显，1 个或多个，小泡状	较多	深蓝色	常明显，呈蜂窝状

注：大细胞指直径>12um 的原淋巴细胞，小细胞是指直径≤12um 的原淋巴细胞

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数常减少，白细胞数常明显增多（>50 ×10^9/L），有时白细胞数也减少。血液涂片分类时常以原淋巴细胞、幼淋巴细胞为主（>0.70）。涂抹细胞易见。

【骨髓象】

1）骨髓增生极度活跃。

2）淋巴细胞系统极度增生，原淋巴细胞、幼淋巴细胞>0.50，多数占0.80～0.90以上。涂抹细胞易见。

3）其他细胞系统增生明显受抑制或缺如。

【细胞化学染色】

详见表2－5－14 各种急性白血病细胞化学染色结果。

【其他检查】

1）细胞免疫学检查：急性淋巴细胞白血病的免疫分型方法有多种，一般分两大类即非T 淋巴细胞型和T 淋巴细胞型，详见表2－5－18、表2－5－19。

表2－5－18　非T 淋巴细胞白血病细胞免疫分型

免疫亚型	HLA－DR	CD10	CD19	CD20	CD22	CytgM	Smlg
无标志型	＋	－	－/＋	－	－	－	－
普通型	＋	＋	＋	－/＋	－/＋	－	－
前B 细胞型	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
B 细胞型	＋	－/＋	＋	＋	＋	－/＋	＋

注：－为阴性，＋为阳性，－/＋为弱阳性

表2－5－19　T 淋巴细胞白血病细胞免疫分型

免疫分型	CD7	CD5	CD2	CDla	CyCD3	SmCD3	CD4	CD8
幼稚胸腺细胞型	＋	－/＋	－/＋	－	－/＋	－	－	－
普通胸腺细胞型	＋	＋	＋	＋	＋	－/＋	＋	＋
成熟胸腺细胞型	＋	＋	＋	－	－/＋	＋	－/＋	－/＋

注：－为阴性，＋为阳性，－/＋为弱阳性

2）细胞遗传学、分子生物学检查：多数有异常，但特异性不高。

【注意事项】

1）选择涂片较薄、细胞结构清楚的部位进行观察，涂片偏厚易将急性淋巴细胞白

血病（尤其是ALL_1）误认为是慢性淋巴细胞白血病。

12）ALL_1和ALL_2有时较难区分，FAB 推荐使用积分系统（即根据细胞大小、核浆比、核形、核仁计算积分）。

13）ALL 有时易与M_1、M_7、M_0等相混淆。

14）急性淋巴细胞白血病骨髓完全缓解标准为原淋巴细胞＋幼淋巴细胞≤0.05，部分缓解标准为原淋巴细胞＋幼淋巴细胞＞0.05 而≤0.20，复发标准为原淋巴细胞＋幼淋巴细胞＞0.20。

15）其他同急性髓细胞白血病的注意事项（5）～（9）。

十、慢性髓细胞白血病

慢性髓细胞白血病（chronic myeloid leukemia，CML）的命名较紊乱。长期以来将慢性髓细胞白血病等同于慢性粒细胞白血病。国内多数学者认为CML 包括典型慢性粒细胞白血病（chronic granulocytic 1eukemia，CGL）、不典型慢性粒细胞白血病（atypical chronic myeloidleukemia，aCML）、慢性粒单核细胞白血病（chronic myelo－monocytic leukemia，CMML）、幼儿型慢性粒细胞白血病（juvenile chronic myeloid leukemia，jCML）、慢性中性粒细胞白血病（chronic neutrophilic leukemia，CNL）。这里介绍CGL。

慢性粒细胞白血病（简称慢粒）是起源于造血干细胞的骨髓增生性疾病，在我国慢性白血病中占首位。慢粒可发病于各种年龄，但以中年人为多见，临床表现为疲乏、低热、头晕及体重减轻等，主要体征为脾脏明显肿大，半数患者同时有肝脏肿大。慢粒临床分为三期即慢性期、加速期及急变期。1～4 年内约70％的慢性期患者可转变为加速期、急变期。慢性粒细胞白血病可急变为各种类型急性白血病，如急性粒细胞白血病、急性单核细胞白血病、急性粒单核细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性巨核细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、嗜碱性粒细胞白血病、嗜酸性粒细胞白血病等。

【血象】

1）慢性期：红细胞数、血红蛋白量早期正常甚至增加，随着病情进展而明显下降，血涂片中有时可见幼红细胞。

白细胞数常明显增加，一般为（100～600）$\times10^9$/L，最高达1000 $\times10^9$/L。血涂片中以中性中、晚、杆状核、分叶核粒细胞为主（新的标准为幼粒细胞＞0.10），嗜酸性及嗜碱性粒细胞较易见。各期粒细胞形态基本正常，弗拉他细胞较易见。

血小板数早期可正常或增加，高者可达800 $\times10^9$/L，随着病情进展而明显下降，血涂片中有时可见小巨核细胞。

2）加速期：嗜碱性粒细胞＞0.20，原始细胞＞0.10。

3）急变期：原粒细胞Ⅰ型＋Ⅱ型（或原单核细胞＋幼单核细胞或原淋巴细胞＋幼

淋巴细胞）＞0.20，或原粒细胞＋早幼粒细胞＞0.30。

【骨髓象】

1）慢性期：①有核细胞增生极度活跃，粒红比值明显升高。②粒细胞系统极度增生，以中性中幼以下粒细胞为主，嗜酸性及嗜碱性粒细胞较易见，原始细胞≤0.10。粒细胞形态基本正常或少数粒细胞有巨幼样变。③红细胞系统早期增生，晚期常常明显受抑制，形态无明显异常。④巨核细胞系统早期增生，晚期抑制。部分病例可见病态巨核细胞如淋巴样小巨核细胞、小巨核细胞、大单圆核巨核细胞、多圆核巨核细胞等（形态特点详见本章第二节）。弗拉他细胞较易见，有时可见戈谢样、海蓝样或尼曼匹克样吞噬细胞。

2）加速期：原始细胞＞0.10。

3）急变期：原粒细胞Ⅰ型＋Ⅱ型（或原单核细胞＋幼单核细胞或原淋巴细胞＋幼淋巴细胞）＞0.20，或原粒细胞＋早幼粒细胞＞0.50。

【细胞化学染色】

NAP 染色：慢性期积分及阳性率明显下降或为零，合并感染、妊娠或慢粒急变时积分可增加。

【其他检查】

1）染色体检查：绝大多数患者可检测到t（9；22）（q34；q11），这种长臂缺失的22 号染色体称为费城染色体（ph'）。

2）分子生物学检查：典型慢粒患者均可检测到特异性BCR／ABL 融合基因。

【注意事项】

1）慢粒通过骨髓细胞学检查，并结合血象、AP 染色一般可确诊。有条件者应结合费城染色体检查、BCR／ABL 融合基因等检测。

2）有时慢粒可表现为一系或两系增生为主，要注意与原发性血小板增多症、真性红细胞增多症、慢性中性粒细胞白血病、类白血病反应、骨髓纤维化等鉴别，费城染色体及BCR／ABL 融合基因检测是可靠的鉴别指标。

3）慢粒急变的患者应作细胞化学染色等检查，以确定急变细胞类型。

4）急性白血病患者如果嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞较易见，应排除慢性粒细胞白血病急变的可能。

十一、慢性淋巴细胞白血病

慢性淋巴细胞白血病（chronic lymphocytic leukemia，CLL），简称“慢淋”，主要由B淋巴细胞恶性增生所致，发病率在欧美各国慢性白血病中占首位，在我国较少。多见于50～60 岁以上老年人，其主要临床表现为淋巴结肿大，也可有肝、脾肿大，病程较慢

性粒细胞白血病长，很少发生急变。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数在疾病早期正常，后期下降；白细胞数常增多，达（10～100）×10^9/L。血液涂片分类以成熟淋巴细胞为主，≥0.50，绝对值>5×10^9/L，形态基本正常，原淋巴细胞及幼淋巴细胞少见，涂抹细胞多见。

【骨髓象】

1）骨髓增生明显活跃或极度活跃。

2）淋巴细胞明显增生（≥0.40），以成熟淋巴细胞为主，原淋巴细胞及幼淋巴细胞较少见（<0.10），涂抹细胞易见。

3）粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统常减少。

【细胞化学染色】

1）PAS 染色：阳性率常增加，典型者呈粗颗粒状。

2）NAP 染色：阳性率及积分常增加。

【其他检查】

1）细胞免疫学检查：以B 淋巴细胞型为多见，约占0.90～0.95。

2）染色体及分子生物学检查：半数患者有异常但多无特异性。

【注意事项】

1）通过骨髓检查，结合临床、血象确诊慢性淋巴细胞白血病一般不困难，最好应同时作PAS 染色、NAP 染色等。

2）在慢性淋巴细胞白血病涂片中，要注意原淋巴细胞、幼淋巴细胞和成熟淋巴细胞的区分。

3）慢性淋巴细胞白血病要注意与分化较好淋巴瘤白血病、淋巴细胞型类白血病反应（为T 细胞型）等其他淋巴细胞增多的疾病加以区分。

十二、少见白血病

（一）多毛细胞白血病

多毛细胞白血病（hairy cell leukemia，HCL）是一种慢性淋巴细胞增生的慢性白血病，目前认为多毛细胞来源于B 细胞系。多见于中老年人，主要临床表现为明显脾肿大、贫血、反复感染等。

【血象】

多数全血细胞数减少，白细胞数也可增多或正常。血液涂片分类可见一定数量的多毛细胞，其胞体约10～25um，周边不规则，呈锯齿状或伪足状突起，有时为细长的毛

发状；胞质量中等，天蓝色，无颗粒；核呈圆形、椭圆形、肾形等，核染色质较粗，偶见核仁。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，红细胞系统、粒细胞系统及巨核细胞系统常减少，可见一定数量的多毛细胞，占0.07～0.90。

【细胞化学染色】

1）ACP 染色：阳性，不被左旋酒石酸抑制。

2）PAS 染色：半数病例阳性。

3）α－NAE 染色：阴性或阳性，氟化钠不抑制。

【其他检查】

1）免疫表型：多数表现B 淋巴细胞的表型，SmIg$^+$、CD19$^+$、CD20$^+$、CD22$^+$、CD11c$^+$、CD25$^+$、CD103$^+$、CD21－；少数病例具有T 淋巴细胞的特性。

2）咐醇酯（TPA）反应：在体外培养下，对小剂量筒A 反应极为迅速，24h 内细胞可完全贴壁，并伴有长枝状突起。

3）骨髓活检：增生活跃或减低，多毛细胞呈散在或簇状分布，网状纤维很少。毛细胞胞质丰富、透明，胞核间距宽呈蜂窝状，染色质细呈毛玻璃状。

4）电镜检查：多毛细胞有长短不一、粗细不一的毛发状胞质突起，延伸的毛有交叉现象。透射电镜可见胞质中有核糖体－板层复合物。

5）细胞遗传学检查：无特异性的克隆异常，但以14q$^+$为最常见的异常。

【注意事项】

1）根据典型的多毛细胞形态及ACP 染色等，诊断多毛细胞白血病一般不难。但对变异型多毛细胞白血病和外周血伴有绒毛淋巴细胞的脾淋巴瘤，仅靠形态难以诊断。鉴别诊断应结合骨髓活检、细胞免疫学等检查。

2）HCL 的免疫分型中以CD22 最敏感但缺少特异性，如CD22$^+$同时CD11c$^+$较具诊断价值。

3）少数正常成熟淋巴细胞也可见较短的毛突起。

4）多毛细胞白血病患者，做骨髓穿刺检查时常出现干抽现象。

（二）幼淋巴细胞白血病

幼淋巴细胞白血病（prolymphocytic leukemia，PLL）是一种慢性淋巴细胞白血病的变异型，多见于老年人，起病缓慢，常有明显脾肿大，可伴有肝肿大，淋巴结肿大较少见。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数常减少。白细胞数常增多（>100 ×10^9/L）。血液涂片分类时多数可见大量的幼淋巴细胞，其胞体较大，圆形或类圆形；胞质量较丰富，淡蓝色或蓝色，少数有嗜天青颗粒；核圆形、椭圆形，染色质块状（尤其在核膜周边），核仁常见1 个、大而明显。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，以淋巴细胞系统增生为主，幼淋巴细胞占0.17～0.80。粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统常减少。

【细胞化学染色】

（1）PAS 染色：阴性或阳性。

（2）POX、SSB、NAS－CE、NAS－AE、α－NAE 染色：阴性。

【其他检查】

细胞免疫学检查：多为B 淋巴细胞型，表现为CD19$^+$、CD20$^+$、CD22$^+$、SmIg$^+$等；少数为T 淋巴细胞型，表现为CD2$^+$、CD5$^{+/-}$、CD19$^-$等。

【注意事项】

在成熟淋巴细胞中有时也可见假核仁，所以要注意与慢性淋巴细胞白血病、淋巴瘤白血病鉴别。

㈢ 大颗粒淋巴细胞白血病

大颗粒淋巴细胞白血病（large granular lymphocytic leukemia，LGL）是一种进展缓慢的淋巴系统肿瘤。多见于老年人，临床表现为反复感染、脾脏轻度肿大。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数常减少，白细胞数中度增多，中性粒细胞明显减少，淋巴细胞>5 ×10^9/L，其中大颗粒淋巴细胞占0.50～0.90，持续3 个月以上。

【骨髓象】

骨髓增生活跃，可见一定数量的大颗粒淋巴细胞。其胞质丰富、淡蓝色，含有数个粗或细的嗜天青颗粒；核圆形或椭圆形，染色质块状，核仁未见。

【细胞化学染色】

（1）ACP 染色：阳性，可被左旋酒石酸抑制。

（2）α－NAE 染色：弱阳性或阴性。

【其他检查】

细胞免疫学检查：①T 细胞型：CD3$^+$、CD8$^+$、CD16$^+$、TCRαβ 阳性、CD4$^-$、CD5$^-$、CD7$^-$、CD25、CD56$^-$。②NK 细胞型：CD16$^+$、CD56$^+$、CD8$^{+/-}$、CD3$^-$、TCRαβ阴性。

【注意事项】

1）通过骨髓细胞学检查，结合临床、血象及细胞免疫学检查可诊断本病。

2）有人将本病归入T 淋巴细胞型慢性淋巴细胞白血病，但两者在某些方面有明显不同，要注意鉴别。LGL 患者淋巴结、肝、脾肿大不明显，皮肤黏膜无浸润，淋巴细胞中有大颗粒，免疫分型特点为CD5、CD16$^+$或CD56$^+$；T 淋巴细胞型慢性淋巴细胞白血病患者皮肤黏膜浸润发生率极高，免疫分型特点为CD5$^+$、CD16$^-$或CD56。

(四) 成人T 细胞白血病

成人T 细胞白血病（adult T-cell leukemia，ATL）是一种与人类T 细胞白血病病毒Ⅰ型（HTLV-Ⅰ）感染有关的白血病。多见于成年人，发病有明显的地区性和流行性，临床表现为全身淋巴结肿大及脾肿大，半数患者有皮肤病变（如全身性皮疹、红皮病或皮肤结节等）。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数正常或减少，白细胞数常增多。血液涂片分类中，淋巴细胞常增多，其中多形核淋巴细胞（即花细胞）>0.10。花细胞的胞体大小不一，胞质蓝色，可见空泡，胞核明显不规则，呈扭曲、畸形、分叶状、折叠，核染色质呈块状，核仁可见。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，以淋巴细胞增生为主，花细胞>0.10。粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统常减少。

【细胞化学染色】

1）POX 染色：阴性。

2）PAS、ACP、NAS-AE 染色：阳性。

【其他检查】

1）细胞免疫学检查：为成熟T 淋巴细胞，表现为CD2$^+$、CD3$^+$、CD4$^+$、CD5$^+$，还不同程度表达T 细胞激活标志CD25$^+$、CD7$^-$、CD8$^-$。

2）病毒学检查：血清抗HTLV-Ⅰ抗体阳性。

3）分子生物学检测：可检出TCRβ基因重排、整合的HTLV-Ⅰ病毒基因序列。

【注意事项】

1）此病需要与皮肤T 细胞淋巴瘤、周围T 细胞淋巴瘤等加以鉴别。

2）分子生物学检测是确诊该病的最佳方法。

(五) 浆细胞白血病

浆细胞白血病（plasma cell leukemia，PCL）分为继发性和原发性。前者多见于多发

性骨髓瘤晚期，后者病因不明。临床表现为多发性骨髓瘤或同白血病。原发性PCL 好发于青壮年，肝、脾肿大明显，骨痛及骨质破坏较少见。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数常减少，白细胞数增多。血液涂片分类时浆细胞>0.20 或绝对值≥2.0 $\times10^9$/L。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，原浆细胞和幼浆细胞明显增多，占0.10～0.92，并伴有形态异常。粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统常减少。

【注意事项】

1）外周血浆细胞增多是诊断浆细胞白血病的主要依据之一，但外周血浆细胞多少尚无统一标准，一般采用血液涂片分类时浆细胞>0.20 或绝对值≥2.0 $\times10^9$/L。

2）浆细胞白血病要注意与巨球蛋白血症、淋巴瘤白血病等加以鉴别。

(六) 嗜酸性粒细胞白血病

嗜酸性粒细胞白血病（eosinophilic leukemia）是一种少见的白血病，临床表现同一般白血病，多数患者常有肝、脾、淋巴结肿大，心、肺、神经系统嗜酸性粒细胞浸润较多，而出血、感染较少。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数减少，白细胞数增加，达50 $\times10^9$/L 以上。血液涂片分类时各阶段嗜酸性粒细胞增多（>0.60），嗜酸性粒细胞形态异常，如细胞大小不一、双核、颗粒粗大或稀少或分布不匀，胞质常有空泡等。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，各阶段嗜酸性粒细胞明显增多，形态异常（颗粒异常粗大、分布不均匀、颗粒灰褐色、空泡等），核左移，甚至早幼粒细胞中可见粗大的嗜酸性颗粒，原粒细胞>0.05，有时可见棒状小体。红细胞系统、巨核细胞系统常减少。

【其他检查】

组织活检：肝、脾及淋巴结等有嗜酸性粒细胞浸润。

【注意事项】

1）有人根据嗜酸性粒细胞成熟程度将嗜酸性粒细胞白血病分为急性型和慢性型；根据细胞的形态分为原粒细胞型、幼稚细胞型和成熟细胞型。

2）诊断本病要除外寄生虫病、过敏性紫癜、结缔组织病、高嗜酸性粒细胞综合征、慢性粒细胞白血病、恶性淋巴瘤等所致的嗜酸性粒细胞增多症。

(七) 嗜碱性粒细胞白血病

嗜碱性粒细胞白血病 (basophilic leukemia) 临床表现同一般急性白血病，肝、脾、淋巴结肿大少见，病程短，往往因颅内出血而死亡。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数减少；白细胞数常减少，也可正常或增多。血液涂片分类时各阶段嗜碱性粒细胞常增多，可达0.30～0.60。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，各阶段嗜碱性粒细胞明显增生，可高达0.80，嗜碱性颗粒粗而多，核左移，甚至早幼粒细胞中可见粗大的嗜碱性颗粒，原粒细胞>0.05，有时可见棒状小体。红细胞系统、巨核细胞系统常减少。

【细胞化学染色】

1) 甲苯胺蓝、闪光蓝染色：强阳性。

2) POX、SBB、PAS、ACP 及NAS-DCE 染色：阴性或阳性。

【其他检查】

组织活检：有嗜碱性粒细胞浸润，部分患者费城染色体阳性。

【注意事项】

1) 诊断本病要除外慢性粒细胞白血病、中毒 (铅、汞、铋、锌等)、恶性肿瘤、系统性肥大细胞增多症、色素性荨麻疹等引起的嗜碱性粒细胞增多。

2) 嗜碱性颗粒和中性颗粒的鉴别可用甲苯胺蓝或闪光蓝染色。

3) 嗜碱性粒细胞白血病大多来自慢性粒细胞白血病急变，因此，多数可检测到费城染色体。故有人将嗜碱性粒细胞白血病分为急性型和慢性急变型。

4) 嗜碱性粒细胞要注意与肥大细胞白血病进行鉴别。

(八) 全髓白血病

全髓白血病 (panmyelosis) 是一种骨髓中粒细胞系统 (或加单核细胞系统)、红细胞系统及巨核细胞系统同时恶性增生的极少见的白血病。临床表现为急性白血病的症状，多数患者肝、脾不肿大或轻度肿大，病情进展快、疗效差、预后不良。常继发于放疗后、化疗后及骨髓增生异常综合征。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，血小板数常减少，白细胞数增多、正常或减少。血液涂片分类可见原粒细胞、幼粒细胞、幼红细胞，少数有巨核细胞、巨大血小板及棒状小体。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃或极度活跃，粒、红细胞系统变化同急性红白血病。全片巨核细胞过度增生，可达正常的10 倍或更多，幼稚型巨核细胞占0.10，变异型巨核细胞占0.30。

【细胞化学染色】

1）PAS 染色：幼红细胞、巨核细胞呈阳性。

2）其他染色：因白血病细胞系列不同而异。

【其他检查】

细胞免疫学检查：具有红细胞系统、粒细胞系统及巨核细胞系统的免疫标志。

【注意事项】

1）全髓白血病中的巨核细胞数量及病态巨核细胞数量尚无统一的标准。

2）病态巨核细胞增加也可见于其他类型白血病。

(九) 肥大细胞白血病

肥大细胞白血病 (mast cell leukemia) 是肥大细胞恶性增生的疾病，有原发性和继发性之分，前者较少见，后者多继发于系统性肥大细胞增多症和色素性荨麻疹。临床上除白血病的一般表现外，还有肥大细胞释放的组胺等物质引起的症状，如皮肤潮红、色素性荨麻疹、皮肤瘙痒、发作性支气管痉挛、呼吸困难、心悸、休克等。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数常减少，白细胞数增多往往达30 $\times 10^9/L$ 以上，血液涂片分类时有肥大细胞 (为幼稚型及成熟型)。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，肥大细胞明显增多达0.30 以上，以幼稚型肥大细胞明显增多者更有意义。幼稚型肥大细胞的胞体较成熟型小，核圆形或椭圆形，可有双核、多核，染色质细网状，部分可见核仁，浆中有大量粗大紫红色颗粒，可伴有空泡。其他细胞系统常减少。

【细胞化学染色】

1）甲苯胺蓝、NAS－DCE 及PAS 染色：阳性。

2）SB、POX 染色：阴性。

【其他检查】

组胺检测：血清及尿液中组胺均增加。

【注意事项】

要注意与系统性肥大细胞增生症加以区别。

(十) 低增生性白血病

低增生性白血病（hypocellular leukemia）的发病年龄多为40岁以上，多数起病缓慢，临床表现为贫血，并可有发热、出血，肝、脾、淋巴结一般不肿大。

【血象】

全血细胞数减少，偶见或可见少许原始细胞、幼稚细胞，淋巴细胞比例常增加。

【骨髓象】

两次以上检查不同部位增生均减低，但原始细胞占0.30以上。

【其他检查】

骨髓活检：增生减低，可见散在的白血病细胞增生灶。

【注意事项】

1）低增生性白血病的发病常与某些物质损害骨髓有关，临床上要注意与再生障碍性贫血及骨髓增生异常综合征加以区分。

2）由于白血病患者骨髓穿刺时可出现干抽或骨髓稀释，故诊断低增生性白血病需多部位穿刺及骨髓活检证实。

3）低增生性白血病多为急性粒细胞白血病，所以有人称低增生性白血病为低增生性急性粒细胞白血病。

(十一) 继发性白血病

继发性白血病（secondary leukemia）是指继发于恶性肿瘤化疗、放疗后发生的白血病，称为第二肿瘤。恶性肿瘤为实体瘤或造血系统肿瘤，常见的有子宫颈癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤等，以老年人为多见。

(十二) 急性髓细胞白血病微分化型

急性髓细胞白血病微分化型（M_0）约占急性白血病1.0%～1.5%，形态学无法分型（与急性淋巴细胞白血病有相似之处），其常规细胞化学染色均阴性，无棒状小体，免疫表型分型至少有一个髓细胞系统分化抗原（如CD33$^+$和/或CD13$^+$阳性）而不表达T、B淋巴细胞分化抗原，超微结构髓过氧化物酶（MPO）阳性。

(十三) 急性混合细胞白血病

急性混合细胞白血病（mixed acute leukemia，MAL）指急性白血病中髓细胞系统和淋巴细胞系统细胞同时受累的一组白血病，又称为急性杂交性白血病。分为以下几种：

1）双表型：白血病细胞同时表达髓细胞系统和淋巴细胞系统的免疫表型。

2）双克隆型：部分白血病细胞表达髓细胞系统免疫表型，部分白血病细胞表达淋

巴细胞系统免疫表型，它们分别来自各自多能干细胞。在6 个月内相继发生者也属双克隆型。

3）双系列型：与双克隆型相似，但这两种白血病细胞来自同一多能干细胞。

（十四）急性未分化白血病

急性未分化白血病（acute undifferentiated leukemia，AUL）是指通过形态学、细胞化学染色、细胞免疫学、分子生物学、电镜等检查仍难以将其归属的白血病，统称为未分化白血病，约占急性白血病1％。以前称为干细胞白血病、原血细胞白血病等。

十三、骨髓增生异常综合征

骨髓增生异常综合征（myelodysplastic syndrome，MDS）是一组获得性的造血干细胞恶性疾病，其骨髓中表现为造血细胞病态性造血。临床表现多样化但缺乏特异性，主要表现为贫血，可有发热、出血，有的患者伴有肝、脾、淋巴结肿大。发病年龄多在50岁以上，病程长短不一，多数（50％～72％）病例最终转变为急粒或红白血病等急性白血病（难治性贫血→原始细胞过多难治性贫血→转化中的原始细胞过多难治性贫血→急性白血病），故以前又称为白血病前期。根据病因将MDS 分为原发性和继发性。继发性多与射线、生物因素及化学毒物有关，也称为治疗相关性MDS。

【分型及诊断标准】

1）FAB 分型及标准：1982 年FAB 将原发性MDS 分为5 型，详见表2－5－20。我国学者建议将MDS 分为4 型，将CMML 归入慢性白血病，并用原始细胞加早幼粒细胞比例代替FAB 分型中的原始细胞比例。

表2－5－20　骨髓增生异常综合征的FAB 分型及标准（1982 年）

分型	全名	外周血原始细胞	骨髓原始细胞	其　他
Ⅰ型	难治性贫血（RA）	＜0.01	＜0.05	
Ⅱ型	环形铁粒幼细胞难治性贫血（RAS）	＜0.01	＜0.05	环形铁粒幼细胞≥15％
Ⅲ型	原始细胞过多难治性贫血（RAEB）	＜0.05	0.05～0.20	
Ⅳ型	慢性粒单细胞白血病（CMML）	＜0.05	0.05～0.20	外周血中单核细胞＞1×10^9/L 骨髓中原、幼单核细胞增加
Ⅴ型	转化中的RAEB（RAEB－T）	＞0.05	0.20～0.30	可有棒状小体

注：*为占有核红细胞的百分率；**指见到棒状小体时，即使其他条件不符合也可诊断为RAEB－T

2）WHO 分型：1999 年WHO 将MDS 分为以下5 类：RA （伴环形铁粒幼细胞增多或不伴有环形铁粒幼细胞增多）、RCMD （难治性血细胞减少伴多系病态造血）、RAEB （原始细胞增多难治性贫血）、5q－综合征、未能分类。同时将CMML 归入骨髓异常/骨髓增生性疾病，将RAEB－T 归人急性白血病。

【血象】

常表现为全血细胞数减少，也可表现为两系或一系血细胞减少。血液涂片分类时，红细胞常明显大小不一，可见多色性红细胞、嗜碱性点彩红细胞、有核红细胞、大红细胞、巨大红细胞（直径大于同一涂片正常红细胞直径2 倍以上），还可见卵圆形、靶形、球形、泪滴形、破碎红细胞；中性粒细胞可见颗粒减少、分叶过度或过少，有的可见原粒细胞、幼粒细胞、巨大血小板、颗粒减少血小板等，偶见小巨核细胞。

【骨髓象】

主要表现为三系或两系或一系病态造血（异常骨髓细胞形态特点详见本章第三节）。

1）骨髓增生活跃或明显活跃，少数增生减低。

2）红细胞系统增生（>0.60）或减低（<0.05），原红细胞及早幼红细胞增多，可见幼红细胞巨幼样变、核碎裂、核畸形、双核、多核、豪－乔小体、嗜碱性点彩。成熟红细胞形态改变同血液涂片。

3）粒细胞系统增生或减低，原粒细胞增多，有的伴有成熟障碍。粒细胞表现为巨幼样变、双核、环形核、核分叶过少或过多，颗粒减少或增多等，有时RAEB－T 的原始细胞胞质中可见棒状小体。

4）巨核细胞系统增生或减低，可见病态巨核细胞如淋巴样小巨核细胞、单圆核小巨核细胞、大单圆核巨核细胞、多圆核巨核细胞（详见本章第三节），还可见变性巨核细胞、巨核细胞分叶过度等，血小板改变同血液涂片。以淋巴样小巨核细胞最有诊断意义。

【细胞化学染色】

1）铁染色：细胞外铁及内铁增加，RAS 患者环形铁粒幼细胞≥0.15。

2）PAS 染色：疾病早期幼红细胞多为阴性，随着疾病进展转为阳性（阳性率约在0.20 左右）。

3）NAP 染色：积分常明显下降。

【其他检查】

1）骨髓活检：可见未成熟前体细胞异常定位（ALIP）。

2）染色体检查：约70％～80％患者有异常，如+8、iso17q、－5/5q－、－7/7q－、20q－、－y 等。

3）细胞培养：多种造血细胞集落形成单位，如CFU－MIX、CFU－GM、CFU－E、

CFU－Meg 形成减少或无形成。

【注意事项】

1）MDS 患者骨髓表现为三系、两系或一系病态造血，所以要注意各系原始、幼稚及成熟细胞的形态特点。

2）FAB 协作组为了区分MDS 与急性髓细胞白血病（AML），提出了建议，详见图2－5－2。

3）RA 诊断要慎重，要注意与巨幼细胞贫血、铁粒幼细胞贫血等区别。

4）怀疑MDS 的患者，建议将铁染色、PAS 染色、NAP 染色作为常规细胞染色检测项目。

十四、多发性骨髓瘤

多发性骨髓瘤（multiple myeloma，MM）是骨髓中单克隆浆细胞（即骨髓瘤细胞）异常增生的一种恶性肿瘤，同时分泌异常免疫球蛋白（M 蛋白）或肽链。发病年龄多在40 岁以上，临床表现为骨痛、骨骼破坏、骨髓造血功能抑制、副蛋白血症、肾功能异常等。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，白细胞和血小板数正常或减少。血液涂片分类时，少数可出现少许骨髓瘤细胞（多为0.02～0.03）、幼红细胞和幼粒细胞，红细胞呈串钱状排列。

【骨髓象】

1）骨髓增生活跃或明显活跃。

2）骨髓瘤细胞明显增生（>0.15）。根据分化程度和形态，将骨髓瘤细胞分为小浆细胞型、幼浆细胞型、原浆细胞型和网状细胞型。分化好者与正常浆细胞相似；分化不良者，骨髓瘤细胞形态呈多样性。有时可见火焰细胞、ussel 小体、Mott 细胞（详见本章第三节）。

3）粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统增生常受抑制，红细胞呈串钱状排列。

【其他检查】

1）血沉：明显增加。

2）X 线检查：表现为骨质疏松、溶骨性破坏、病理性骨折。

3）免疫球蛋白电泳：可见一异常球蛋白峰。根据M 蛋白的成分不同分为IgG 型、IgA 型、IgD 型、IgE 型、IgM 型、轻链型、双克隆型、多克隆型，极少数为不分泌型，其中以IgG 型最常见。

4）尿液检验：本周蛋白阳性，k 轻链、γ 轻链常增加。

【注意事项】

1）骨髓中骨髓瘤细胞＞0.15，且形态明显异常或者以原始、幼稚细胞为主者，通过骨髓检查常可确诊。而对于以成熟细胞为主者且比例增加不明显者，诊断要慎重，应排除反应性浆细胞增多的可能性。

2）MM 病灶一般呈弥漫性分布，故仅一次成功的骨髓穿刺即能得到良好的标本。但临床上怀疑MM 而骨髓涂片检查未能检出者，不能排除MM 的可能性。

3）MM 患者如血象中骨髓瘤细胞分类＞0.20 或绝对值在2 ×10^9/L 以上，为继发性浆细胞白血病。

十五、恶性淋巴瘤

恶性淋巴瘤（malignant lymphoma，ML）是原发于淋巴结或淋巴组织（如胃肠道、鼻咽部、脾、骨等）的一种恶性肿瘤，临床表现为浅表和深部淋巴结无痛性、进行性肿大，且常有肝肿大、脾肿大、发热、皮肤病变、黄疸（多见于晚期）等。病理学检查根据是否有R－S 细胞分为霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤。近几年发病率有上升趋势，发病年龄趋向年轻化。恶性淋巴瘤早期病灶局限在淋巴结、淋巴组织，晚期可侵犯骨髓，以非霍奇金淋巴瘤为多见。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量正常或减少，白细胞及血小板数常正常，嗜酸性粒细胞可增加。当骨髓受侵犯时，可表现为全血细胞数减少或白细胞数增加；血液涂片分类时，有的可见数量不等的淋巴瘤细胞。血沉常增加。

【骨髓象】

1）淋巴瘤细胞未侵犯骨髓：常无特异性改变，粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统基本正常。

2）淋巴瘤细胞侵犯骨髓：粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统正常或减少。淋巴瘤细胞数量多少不一，常有明显多态性，淋巴瘤细胞的形态取决于恶性淋巴瘤的病理类型。常见有以下3 种情况：①以原淋巴细胞增生为主；②以成熟淋巴细胞增生为主；③以组织细胞型的淋巴瘤细胞增生为主（详见本章第三节）。

【细胞化学染色】

1）PAS 染色：阳性率常增加，典型者呈粗颗粒或块状阳性。

2）NAP 染色：阳性率及积分值常增加。

【其他检查】

1）组织活检或涂片：可见淋巴瘤细胞，是确诊淋巴瘤的检查方法。霍奇金病中可

见R－S 细胞。

2）细胞免疫学检查：霍奇金病中的R－S 细胞有些具有T 细胞标记，有的具有B 细胞标记，有的同时具有T 细胞和B 细胞标记。NHL 免疫表型较复杂，以CD20、CD43、CD45RO 为组合，$CD20^+$、$CD45RO^-$、$CD43^+$或$CD43^-$提示淋巴瘤细胞来源于B 细胞，$CD20^-$、$CD43^-$、$CD45RO^+$提示淋巴瘤细胞来源于T 细胞，而$CD56^+$是NK 细胞淋巴瘤的特点。

【注意事项】

1）淋巴瘤的诊断主要依靠淋巴结等病理活检。骨髓检查对已确诊淋巴瘤的患者来说，可确定骨髓是否受侵犯；对于未确诊者来说，可辅助诊断淋巴瘤。

2）骨髓中淋巴瘤细胞，如以胞体较小的原始淋巴瘤细胞增生为主者，要注意与急性淋巴细胞白血病鉴别；如以成熟淋巴细胞增生为主者，要注意与慢性淋巴细胞白血病鉴别；如以组织型淋巴瘤细胞增生为主者，要注意与恶性组织细胞病鉴别；个别淋巴瘤病例的细胞中颗粒多，极易与幼粒细胞混淆，故要注意与髓细胞白血病鉴别。

3）恶性淋巴瘤侵犯骨髓时，其淋巴瘤细胞多少不一，如＞0.30 即为淋巴瘤白血病，有的淋巴瘤细胞成堆存在。区分淋巴瘤和白血病，仅靠骨髓细胞形态学检查常常难以确定，需要结合临床表现及其他检查。

4）骨髓中淋巴瘤细胞少者，要尽量观察所有送检的骨髓片，尤其是血膜边缘部位。

5）外周血伴有绒毛淋巴细胞的脾淋巴瘤需与多毛细胞白血病鉴别。

十六、恶性组织细胞病

恶性组织细胞病（malignant histiocytosis，MH），简称恶组，是单核－巨噬细胞系统中组织细胞异常增生的恶性疾病。临床表现为持续高热，肝、脾及淋巴结肿大，并可有黄疸、出血、皮肤损害、浆膜腔积液、全血细胞数进行性下降及全身进行性衰竭。以青壮年为多见，起病急，病程短，预后差（多在半年内死亡）。

【血象】

早期即有红细胞数和血红蛋白量减少，多数全血细胞数呈进行性减少。有的患者血液涂片中可见少许异常组织细胞。

【骨髓象】

1）骨髓增生活跃或增生减低。

2）骨髓中可见数量不等的恶性组织细胞，少者0.02～0.03，多者可达0.90。根据其形态特点分为5 种。详见本章第三节。

3）粒细胞系统、红细胞系统、巨核细胞系统增生或减少。

【细胞化学染色】

1）NAP 染色：阳性率及积分明显下降。

2）POX 染色：阴性。ACP、NAS－DCE、NAS－DAE 染色：阳性。

【其他检查】

1）细胞免疫学检查：与巨噬细胞相关单克隆抗体如CD11c、CD14c、CD68 阳性。

2）组织活检：肝、脾、淋巴结及其他受累组织中可见异常组织细胞浸润。

【注意事项】

1）恶组患者骨髓中的恶组细胞数量多少不等，故要注意观察每一张片子，尤其是血膜的边缘。

2）外周血中若找到异常组织细胞对诊断本病有重要意义，但检出率不高。用浓缩外周血涂片找异常组织细胞可提高检出率。

3）5 种恶组细胞中以异常组织细胞、多核巨组织细胞对诊断恶组最有意义。但后者在骨髓涂片中很少见到，而多在病理组织切片中见到。

4）临床上怀疑恶组者，如一次骨穿骨髓检查未发现恶组细胞，不能排除恶组的可能性，应进行多部位、多次骨髓穿刺。

5）恶组需与组织细胞型淋巴瘤鉴别，对诊断恶组必须慎重，除非有免疫组织化学的检测结果支持，否则还是先考虑组织细胞型淋巴瘤细胞为妥。因为临床上真正起源于组织细胞的恶组极少见。

6）恶组需要与反应性组织细胞增多症鉴别。

十七、脾功能亢进

脾功能亢进（hypersplenism）是各种不同病因使脾脏肿大和血细胞减少的综合征，根据病因分为原发性和继发性，后者继发于慢性感染、门脉高压、造血系统疾病、类脂质沉积病等。临床表现因原发病不同而不同，脾肿大中度至重度，并可有贫血、感染和出血。

【血象】

全血细胞数减少，或两系、一系减少，血细胞形态常无明显异常。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，粒细胞系统、红细胞系统、巨核细胞系统均增生，可伴有粒细胞系统、巨核细胞系统轻度成熟障碍。各种血细胞形态常无明显异常。

【注意事项】

1）临床上诊断为脾功能亢进而骨髓涂片也具有上述特点者，可做出符合性诊断意见。

(2) 脾功能亢进如同时伴有消化道出血者，红细胞系统可伴有缺铁改变。

(3) 脾功能亢进患者骨髓中粒细胞系统、巨核细胞系统轻度成熟障碍（即成熟阶段细胞减少），往往系过度释放导致的假性成熟障碍。

十八、类白血病反应

类白血病反应（leukemoid reaction），简称类白，是指机体受某些疾病或因素如严重感染、中毒、恶性肿瘤等刺激后，造血组织出现的一种异常反应，其血象出现类似白血病的变化，当病因去除后血象恢复正常。临床表现因原发病不同而不同。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量正常，血小板数正常或增多，白细胞数增多（但＜00 ×10^9／L）。根据增多的细胞分为粒细胞型、淋巴细胞型、单核细胞型、嗜酸性粒细胞型等。临床上以粒细胞型最为常见，其外周血以中性成熟粒细胞为主，并可出现幼粒细胞（＜0.10），中性成熟粒细胞常有明显中毒颗粒、空泡及Dohle 小体。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，粒细胞系统增生伴左移，粒细胞常有明显毒性改变。红细胞系统及巨核细胞系统常无明显改变。

【细胞化学染色】

NAP 染色：细菌性感染引起的类白血病反应，其阳性率及积分明显增加。

【注意事项】

(1) 要注意观察血液涂片及骨髓中粒细胞的毒性改变，且要结合临床表现。

(2) 要注意排除慢性中性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病等疾病的可能。

十九、噬血细胞综合征

噬血细胞综合征（hemophagocytic syndrome，HS），又称为反应性组织细胞增生症，是指单核－巨噬细胞系统的良性反应性组织细胞增生症，以噬血细胞增生为细胞学特点，常与病毒、细菌感染、免疫抑制有关。临床表现与恶组有相似之处，表现为发热、肝肿大、脾肿大、淋巴结肿大，部分患者有黄疸、皮疹等，大多数有自限性。

【血象】

多数患者全血细胞数减少，部分患者白细胞数增多，少数患者外周血液涂片可见到吞噬血细胞的组织细胞和（或）不典型的单核细胞。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，最主要特点是形态较正常、成熟的组织细胞增多，并吞噬多少不一的各种血细胞包括血小板、成熟红细胞、幼红细胞、粒细胞、淋巴细胞等，

常具有伤寒细胞样的形态特征。粒细胞系统、红细胞系统可减少，而巨核细胞系统不减少，浆细胞增多。

【细胞化学染色】

1）NAP 染色：阳性率及积分常正常。

2）ACP 染色：阳性，可被左旋酒石酸抑制。

3）α—NAE、NAS—AE 染色：阳性，可被氟化钠抑制。

【其他检查】

1）病原学检查：常阳性。

2）淋巴结活检：淋巴结包膜完整，淋巴细胞减少，吞噬性组织细胞增多，生发中心区域消失。

3）止凝血检查：凝血酶原时间（PT）延长，纤维蛋白（原）降解产物（FDP）增加。

【注意事项】

1）如果吞噬细胞所吞噬的细胞较多，有时吞噬细胞本身的核或胞浆不易辨认而似成堆细胞，故要注意观察。

2）本病通过骨髓检查通常只能作出提示性、可疑性诊断意见。

3）要注意与恶组鉴别。

二十、白细胞减少症、粒细胞减少症、粒细胞缺乏症

白细胞减少症（leukopenia）指外周血白细胞数（成人）$<4\times10^9/L$。当外周血中性粒细胞绝对值$<2\times10^9/L$时称为粒细胞减少症（granulocytopenia），当外周血中性粒细胞绝对值$<0.5\times10^9/L$称为粒细胞缺乏症（agranulocytosis）。引起白细胞减少的因素有化学药物、射线、病毒感染、免疫性疾病等。白细胞减少主要表现为头晕、乏力。粒细胞缺乏症起病急，突发高热，常伴有感染。

【血象】

白细胞数、中性粒细胞数减少，红细胞数、血小板数一般无明显变化。血液涂片分类时常可见粒细胞毒性改变。

【骨髓象】

白细胞减少不明显者：骨髓变化常不大。其骨髓增生活跃至明显活跃，粒细胞系统正常、增多或减少，有的伴有核左移、成熟障碍及毒性改变，红细胞系统、巨核细胞系统一般正常。

粒细胞缺乏者：骨髓增生活跃至明显活跃，粒红比值明显下降，粒细胞系统呈成熟障碍或生成障碍，前者表现为早幼粒细胞明显增多或早幼粒细胞、中性中幼粒细胞、中

性晚幼粒细胞明显增多而成熟粒细胞明显减少；后者表现为粒细胞系统各阶段细胞明显减少。粒细胞常有明显毒性改变，红细胞系统、巨核细胞系统一般正常。

【细胞化学染色】

NAP 染色：阳性率及积分增加（以粒细胞缺乏症为明显）。

【注意事项】

1）通过骨髓细胞学检查，结合临床及血象检验通常可确诊粒细胞缺乏症；

2）患者骨髓早幼粒细胞、中性中幼粒细胞可较明显增加，需防止误认为是 M_3 或 M_{2b}。

二十一、嗜酸性粒细胞增多症

嗜酸性粒细胞增多症（eosinophilia）是指外周血嗜酸性粒细胞百分比>0.04 或绝对值>0.45 $\times10^9$/L（直接计数法）。临床上引起嗜酸性粒细胞增多的原因有很多，如血液病、变态反应性疾病、感染性疾病、药物过敏、风湿性疾病、转移癌、皮肤病、垂体前叶功能减退症、肾上腺皮质功能减退症、射线、嗜酸性粒细胞心内膜炎、家族性嗜酸性粒细胞增多症等。临床表现因病因不同而不同。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数正常，白细胞数常增多（多在10 $\times10^9$～30 $\times10^9$/L）。根据嗜酸性粒细胞增加的程度分为3 级：①轻度：嗜酸性粒细胞分类占0.04～0.15，直接计数0.45 $\times10^9$～1.50 $\times10^9$/L；②中度：嗜酸性粒细胞分类占0.15～0.50，直接计数1.50 $\times10^9$～500 $\times10^9$/L；③重度：嗜酸性粒细胞分类占0.50～0.90，直接计数>10 $\times10^9$/L。增多的嗜酸性粒细胞多为成熟的嗜酸性粒细胞，少数可见幼稚嗜酸性粒细胞，嗜酸性粒细胞形态正常。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，嗜酸性粒细胞明显增多（以成熟阶段为主，嗜酸性中、晚幼粒细胞也增多），形态正常。其他细胞系统常正常。

【注意事项】

1）血象中嗜酸性粒细胞明显增多者，骨髓中嗜酸性粒细胞也常明显增多。

2）观察骨髓涂片时要注意观察嗜酸性粒细胞的形态、原始细胞、嗜酸性早幼粒细胞、棒状小体，以排除嗜酸性粒细胞白血病的可能。

3）通过骨髓检查只能做出嗜酸性粒细胞增多症的诊断，其病因要根据临床表现及其他检查结果确定。

二十二、传染性单核细胞增多症

传染性单核细胞增多症（infectious mononucleosis，IM），简称传单，是感染EB 病毒

引起的淋巴细胞良性增生性传染病，多见于儿童、青少年，经唾液飞沫传播。临床表现为发热、咽颊炎、淋巴结肿大、肝肿大、脾肿大、皮疹等。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数常正常，白细胞数增多（但＜20 ×10^9/L）、正常或减少。淋巴细胞百分比增加，异型淋巴细胞百分比＞0.10。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，可见少许异型淋巴细胞，淋巴细胞比例正常或稍偏高，组织细胞可增多。其他细胞系统常无明显变化。

【其他检查】

1）嗜异性凝集试验：阳性，嗜异性凝集抗体可被牛红细胞吸附但不被豚鼠肾吸附。

2）抗EB 病毒抗体检测：阳性。

【注意事项】

1）除本症外，有许多其他疾病或因素可引起异型淋巴细胞增多，如巨细胞病毒、人类免疫缺陷病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、腺病毒、肝炎病毒及某些细菌、原虫感染，也可见于服用某些药物、免疫性疾病、发热等，但嗜异性凝集试验一般阴性。

2）本症的细胞形态学改变主要在血象，而骨髓象常无明显变化，因此血液涂片检查比骨髓涂片更重要。

二十三、传染性淋巴细胞增多症

传染性淋巴细胞增多症（infectious lymphocytosis，IL）是一种感染病毒、经唾液飞沫传播的传染病，多见于10 岁以下儿童。临床表现轻度上呼吸道感染和胃肠道症状，可伴有乏力、发热，但也可以无症状。通常无淋巴结、脾、肝肿大。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数正常，白细胞数增多（多在20 ×10^9/L ～30 ×10^9/L），淋巴细胞百分比增加，约占0.60 ～0.97，并可见少许异型淋巴细胞。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃，淋巴细胞增生，大多为成熟淋巴细胞，可见少量异型淋巴细胞。其他细胞系统常无明显变化。

【细胞化学染色】

1）PAS 染色：阳性率正常。

2）NAP 染色：阳性率及积分正常。

【其他检查】

嗜异性凝集试验：阴性。

【注意事项】

1）IL 患者血液涂片中淋巴细胞比例增加，也可见少许异型淋巴细胞，故要注意与传染性单核细胞增多症鉴别。

2）伤寒、结核、百日咳及布氏杆菌等感染时，外周血淋巴细胞比例也增加，但不如IL 患者明显。

二十四、类脂质沉积病

是一组较为罕见的疾病，较常见的有戈谢病、尼曼－匹克病，为常染色体隐性遗传。

(一) 戈谢病

戈谢病 (Gaucher disease) 是由于β－葡糖脑苷脂酶缺乏导致葡糖脑苷脂贮积在肝、脾、骨髓的单核－巨噬细胞中，形成特异性的戈谢细胞，故又称为葡糖脑苷脂病。此病分为3 型：成年型 (慢性型)、婴儿型 (急性型) 及幼年型 (亚急性型)。临床表现为贫血，脾、肝肿大，有的可见皮肤色素沉着、结膜黄斑、骨痛、神经系统症状等。

【血象】

全血细胞数减少，淋巴细胞相对增多。血液涂片中偶见戈谢细胞。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，主要特征是找到数量不等的戈谢细胞，其形态特点详见本章第三节。其他细胞系统常无明显改变。

【细胞化学染色】

1）PAS、ACP 染色：强阳性。

2）POX 染色：阴性。

【其他检查】

1）组织活检：骨髓、肝、脾、淋巴结可找到戈谢细胞。

2）β－葡糖脑苷脂酶活性测定：酶活性下降。

3）X 线检查：骨质疏松、骨质破坏等。

【注意事项】

1）典型患者通过骨髓检查，找到戈谢细胞，并结合临床可诊断为本病。有条件者还应检测葡糖脑苷脂酶活性。

2）诊断本病要排除假性戈谢细胞增多的可能性。假性增多见于白血病、多发性骨髓瘤、珠蛋白生成障碍性贫血等。

(二) 尼曼－匹克病

尼曼－匹克病 (Niemann－Pick disease) 是由于神经鞘磷脂酶缺乏导致神经鞘磷脂贮积在肝、脾、骨髓中的单核－巨噬细胞中，形成特异性的尼曼－匹克细胞，故又称为神经鞘磷脂病。此病多见于婴幼儿，临床表现为贫血、脾及肝肿大，发育迟缓、耳聋、失明、肌无力或痉挛、眼底黄斑区可见樱桃红色斑等。临床上主要有3 型：急性神经型、慢性非神经型及慢性神经型。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量正常或轻度减少，伴脾功能亢进者全血细胞数减少。单核细胞和淋巴细胞胞质中常有特征性空泡。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，主要特征是找到数量不等的尼曼－匹克细胞，其形态特点详见本章第三节。其他细胞系统常无明显改变。

【细胞化学染色】

1) PAS 染色：空泡呈阴性，泡壁呈阳性。

2) ACP、POX 染色：阴性。

3) SBB 染色：阳性。

【其他检查】

1) 组织活检：骨髓、肝、脾、淋巴结活检可找到尼曼－匹克细胞。

2) 神经鞘磷脂酶活性检测：下降或正常。

【注意事项】

1) 典型患者通过骨髓检查，找到尼曼－匹克细胞并结合临床可诊断本病。有条件者还应检测神经鞘磷脂酶活性。

2) 诊断本病要排除假性尼曼－匹克细胞增多的可能性。

二十五、骨髓增生性疾病

骨髓增生性疾病 (myeloid proliferation disorders，MPD) 是一组获得性的干细胞异常性疾病。WHO 分型中的MPD 包括慢性中性粒细胞白血病、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、慢性原发性骨髓纤维化、慢性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病、高嗜酸性粒细胞综合征和不能分类型。慢性粒细胞白血病见慢性髓细胞白血病，这里介绍前四者，其共同特点为：发病年龄多在40 岁以上，脾肿大，外周血中全血细胞数增多甚至出现幼粒细胞、幼红细胞。

(一) 慢性中性粒细胞白血病

慢性中性粒细胞白血病（chronic neutrophilic leukemia，CNL）是以粒细胞系统异常增生为主的骨髓增生性疾病。临床表现似慢性粒细胞白血病，起病缓慢，多见于老年人，脾肿大明显，部分伴有肝肿大，少数患者伴有淋巴结肿大。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及血小板数正常或增多，白细胞数增多（>30 $\times10^9$/L）。血液涂片分类时以中性成熟粒细胞为主，幼粒细胞偶见或无，嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞少见或不见，粒细胞中有时可见颗粒粗似中毒颗粒，部分有空泡。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃或极度活跃，粒红比值增加。粒系明显增生，以中性中幼以下粒细胞为主，嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞少见或不见；红细胞系统减少；巨核细胞系统正常或增多。

【细胞化学染色】

NAP 染色：阳性率增加（>0.95）；积分明显增加（>300 分）。

【其他检查】

血清维生素B_2浓度增加，血清尿酸浓度增加，费城染色体阴性，骨髓活检多无纤维化等。

【注意事项】

(1) 典型的CNL 骨髓象、血象，加上NAP 积分明显增加，再结合临床表现常可确诊。

(2) 要注意CNL 与慢性粒细胞白血病、粒细胞型类白血病反应的区别，可通过费城染色体检查及BCR/ABL、维生素B_{12}、NAP 染色等检查结果鉴别。

(二) 真性红细胞增多症

真性红细胞增多症（polycythemia vera，PV），简称真红，是以红细胞系统异常增生为主的骨髓增生性疾病。临床上以血粘度增加、皮肤红紫、脾肿大、高血压、出血及血栓形成为主要表现，好发于中老年人。

【血象】

红细胞数男性>6.5 $\times10^{12}$/L，女性>6.0 $\times10^{12}$/L；血红蛋白男性>180g/L，女性>170g/L；血细胞比容男性>0.54，女性>0.50。白细胞和血小板数也常增多。血液涂片分类时多色性、红细胞多见，偶见幼红细胞、幼粒细胞。

【骨髓象】

骨髓增生活跃或明显活跃，粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统增生，以红细胞系统增生为主，各系细胞形态基本正常，涂片上红细胞分布密集。

【细胞化学染色】

1）NAP 染色：阳性率及积分常增加。

2）铁染色：细胞内铁、细胞外铁减少或缺乏。

【其他检查】

1）血沉检测：降低。

2）血清维生素B_{12}检测：增加。

【注意事项】

1）PV 患者骨髓象无明显的特征性表现，故通过骨髓象检查不能确诊，仅可作出符合性诊断。但要注意排除继发性、相对性红细胞增多症及其他骨髓增生性疾病。

2）怀疑骨髓增生性疾病均要作NAP 染色检查。

3）PV 与其他骨髓增生性疾病可相互转化，亦可转变为白血病。

㈢ 原发性血小板增多症

原发性血小板增多症（essential thrombocythemia，ET）是一种原因不明的血小板持续增多的骨髓增生性疾病，其起病缓慢，发病年龄多在40 岁以上，临床表现为出血、血栓形成、肢体麻木及脾肿大等。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量正常或轻度增加；血小板数明显增多（>1000 ×10^9/L），平均血小板体积增大；白细胞数增加（>10 ×10^9/L），血液涂片分类时可见幼粒细胞。

【骨髓象】

骨髓增生明显活跃或增生活跃；巨核细胞系统增生或正常，巨核细胞可有形态异常如胞体体积巨大、核浆发育不平衡、颗粒减少、核分叶过度等；血小板极易见，呈大堆、大片存在，可见巨大血小板；粒细胞系统、红细胞系统增生，形态无明显异常。

【细胞化学染色】

NAP 染色：大多数患者阳性率及积分增加。

【注意事项】

1）ET 患者骨髓象无明显特异性表现，故通过骨髓象检查不能确诊，但结合临床表现及其他检查可做出符合性、提示性诊断。

2）诊断ET 必须要排除继发性血小板增多症及其他骨髓增生性疾病。

3）ET 与其他骨髓增生性疾病可相互转化，亦可转变为白血病。

㈣ 慢性原发性骨髓纤维化

慢性原发性骨髓纤维化（Myelofibrosis，MF），简称骨纤，是由于骨髓造血组织被纤维组织代替所致。根据病因分为继发性和原发性。其他骨髓增生性疾病也可合并MF。这里介绍原发性MF。其临床特征为脾肿大，其次为肝、淋巴结肿大，贫血。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量减少，异形红细胞增多（如泪滴形、椭圆形、畸形红细胞等），嗜碱性点彩红细胞、多色性红细胞可见，网织红细胞占0.02～0.05。红细胞大小不一，多数可见幼红细胞（以晚幼红为主）。

白细胞数常增多（很少超过50×10^9/L），部分正常，少数减低。多数可见幼粒细胞，百分比最高可达0.20（多数为中、晚幼粒，有的甚至出现原粒细胞及早幼粒细胞），嗜酸、嗜碱性粒细胞也增多。

血小板数早期增多，晚期减少，可见大而畸形血小板。

【骨髓象】

早期骨髓增生活跃或明显活跃，粒细胞系统、红细胞系统及巨核细胞系统增生，尤其是巨核细胞系统。晚期常骨髓干抽，增生减低，造血细胞减少，含有大量的纤维组织和凝集的血小板。

【细胞化学染色】

NAP染色：2/3患者NAP积分升高，少数正常，个别减低。

【其他检查】

1）骨髓活检：主要变化为骨髓纤维化，大量纤维组织增生，肝、脾、淋巴结髓样化生。由于骨髓原纤维细胞和成骨细胞增生，导致胶原纤维组织沉淀。根据骨髓病变的严重程度可分为早期、中期和晚期。

2）X线检查：约30%～70%患者有骨质硬化特征。典型表现为骨质密度增加，不均匀似毛玻璃，骨髓腔变窄。

【注意事项】

1）血液涂片中泪滴形红细胞增多是MF的重要特征，可出现在每个油镜视野中。且多数血液涂片中可见幼粒、幼红细胞，这也是MF的特征之一。

2）MF骨髓穿刺检查时常多次出现干抽、增生减少。

3）MF骨髓细胞学检查可作出提示性、疑似性诊断，确诊需骨髓活检。

二十六、特发性血小板减少性紫癜

特发性血小板减少性紫癜（Idiopathic thrombocytopenic purpura，ITP）是一种常见的自

身免疫性疾病，由于存在抗血小板抗体导致血小板破坏增加所致。其临床特征为皮肤、黏膜出血，脾不肿大或轻度肿大。根据起病情况及病程长短分为急性和慢性ITP。急性多见于婴幼儿，慢性多见于青壮年，以女性为多见。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量及白细胞数一般正常，严重出血或慢性反复出血者其红细胞及血红蛋白量可减低。血小板数持续下降或明显下降，急性ITP在$20\times10^9/L$以下，慢性ITP为（30～80）$\times10^9/L$。血液涂片上可见大而畸形的血小板。

【骨髓象】

骨髓增生活跃至增生明显活跃，巨核细胞系统增生或明显增生伴成熟障碍（即以颗粒型巨核细胞、幼巨核细胞为主，而产血小板型巨核细胞及血小板明显减少），有时巨核细胞可见颗粒减少、空泡形成及胞质、胞核变性改变。在无明显出血者，粒细胞系统、红细胞系统一般无明显异常。

【其他检查】

1）血小板表面相关抗体、补体检测：90％以上患者为阳性，多数属IgG型。

2）血小板寿命检测：缩短。

【注意事项】

1）注意观察全片巨核细胞总数，并要分类一定数量（至少计数100个）巨核细胞，同时注意血小板的数量及存在方式。

2）骨髓涂片中血小板减少者要排除标本凝固的可能性。

3）出血明显者，可伴有缺铁性贫血。

4）巨核细胞系统增生或明显增生伴成熟障碍，在临床上不仅见于ITP，还可见于其他原因引起的血小板减少，故骨髓细胞学检查不能确诊ITP。

二十七、骨髓转移癌（瘤）

骨髓转移癌（metastic carcinoma of bone marrow）指髓外组织或器官中的恶性肿瘤转移到骨髓内，其常见的原发肿瘤为乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、食管癌等，儿童以神经母细胞瘤为多见。临床表现为骨痛、发烧、消瘦、贫血、出血等。

【血象】

红细胞数和血红蛋白量常减少，血小板数正常或减少，白细胞数减少、正常或增多。血液涂片分类时可见粒细胞核左移，有时可见幼红细胞。

【骨髓象】

骨髓增生减低，也可明显活跃或活跃，可见数量不等、成堆的转移癌细胞，少数呈散在存在，转移癌细胞有明显多态性，其形态特点见详见本章第三节。其他系统细胞常

减少。

【其他检查】

1）POX 染色：阴性。

2）PAS、ACP 染色：可阳性。

【注意事项】

1） 骨髓中找到转移癌细胞即可确诊，但通过骨髓细胞学检查不能确定癌细胞的原发灶。

2） 骨髓转移癌细胞形态特点取决于原发灶病理类型。

3） 怀疑骨髓转移癌的标本要观察所有送检的涂片，尤其是血膜的边缘部位。

4） 恶性肿瘤骨髓转移者，做骨髓穿刺时常有干抽现象。

二十八、骨髓坏死

骨髓坏死（bone marrow necrosis，BMN）指造血的骨髓组织和基质大面积坏死。它是一组临床综合征而非独立的疾病。见于骨髓转移癌、急性白血病、恶性组织细胞病、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、感染性疾病、弥散性血管内凝血、肾功能衰竭或药物不良反应所致等。临床主要表现为骨痛，发热，出血，肝、脾、淋巴结可肿大。

【血象】

红细胞数、血红蛋白量和血小板数减少，白细胞数减少或增多，血液涂片分类时常可见幼粒及幼红细胞。

【骨髓象】

涂片中有核细胞几乎全部结构不清，胞膜及胞核呈崩解状或溶解状，严重时仅见模糊不清的细胞及大量颗粒状物质沉淀。若能见到形态较完整的细胞多数为中性成熟粒细胞和中幼红细胞，并可见粒细胞毒性改变。

【注意事项】

1）BMN 常有干抽现象，骨髓液常为黄色或果酱色或粉红色的粘性液体。

2） 多部位穿刺常可见一定数量的正常细胞，骨髓转移者有时可见肿瘤细胞。

附录：淋巴结细针针吸细胞诊断技术

淋巴结细针针吸细胞诊断技术采用普通采血针（细针）取代传统粗针穿刺淋巴结或肿块。当细针进入淋巴结后，在较高的针筒内负压作用下，淋巴结内有少量的细胞外液能带动周围细胞进入针芯，针芯内少量的穿刺液足够能制成多张涂片。涂片染色后，在

显微镜下分析。

淋巴结细针针吸细胞诊断技术可诊断下列疾病①慢性淋巴结炎：以成熟淋巴细胞增生为主，成熟淋巴细胞比例最高。②急性淋巴结炎：以中性粒细胞增生为主。③结核性淋巴结炎：涂片可见较多类上皮细胞、朗罕细胞及干酪样坏死。④恶性淋巴瘤：可见较多幼稚淋巴细胞或霍奇金细胞、—S 细胞。⑤转移性肿瘤细胞：可找到典型的成堆或散在的大小不一、形态各异的肿瘤细胞及嗜酸性坏死成分。⑥坏死性淋巴结炎：可见较多成熟淋巴细胞、组织细胞和较多的坏死成分。

淋巴结细针针吸细胞诊断技术具有以下优点：操作简便；检测快速，20㎜in 可有结果；成功率高；费用低，损伤小；可在一个部位重复穿刺或多部位穿刺；标本涂片形态直观，同时可进行组织化学染色检查。

第六章　人类染色体检验

第一节　人类染色体的基本知识

一、染色体的数目和形态

染色体是遗传物质——基因的载体，是细胞在分裂过程中遗传物质特有的形式。染色体在细胞分裂中期时，其形态结构最为典型，所以观察、分析分裂中期细胞的染色体，可以诊断染色体病。

正常人体细胞有46 条染色体，其中44 条为常染色体，另两条与性别有关，为性染色体，男性为XY，女性为XX，称为二倍体。生殖细胞中精子和卵子各有23 条染色体，分别为22 +Y 和22 +X，称为单倍体。

每一条染色体都由两条染色单体构成，它们各含一条DNA 双螺旋链。两条染色单体仅在着丝粒处互相连接，该处为染色体的缩窄区，称为主缢痕。以着丝粒为界将染色体分为两个臂：较长的称为长臂（q），较短的称为短臂（p）。有些染色体的长臂或短臂上有一段浅染区，称为副缢痕。根据着丝粒的位置，人类染色体可分为3 种：近中着丝粒染色体（着丝粒位于或靠近染色体中央）、亚中着丝粒染色体（着丝粒偏于一端）、端着丝粒染色体（着丝粒靠近染色体一端）。在端着丝粒染色体的短臂常常可以看到有一个借助副缢痕与之相连的球形小体，称为随体。近端着丝粒染色体的随体间容易发生连结，称为随体联合。随体联合可能是造成近端着丝粒染色体不分离和易位而诱发染色体畸变的原因之一。

二、染色体的核型和分组

【核型】

将一个中期细胞的染色体按照一定的顺序排列起来所构成的图像称为染色体核型。

【分组】

根据染色体的长度和着丝粒的位置，将44 条常染色体顺次由1 到22 编号，并分为A、B、C、D、E、F、G7 组。将X 和Y 染色体分别归入C 组和G 组，但两者通常另分

一组，以便与常染色体区别。

1.A 组（1～3 号）

包含最大的3 对染色体，相互间可以区别。

1 号最长，具有中着丝粒。在长臂近着丝粒处可见次缢痕。

2 号长度次于1 号，接近亚中着丝粒。

3 号长度次于2 号，为中着丝粒。

2.B 组（4～5 号）

包含两对长度略次于3 号的亚中着丝粒染色体，相互之间难以区别。

3.C 组（6～12 号、X 染色体）

包含中等大小的亚中着丝粒染色体。X 染色体按其大小分在本组（相当于6 号），故女性本组有16 条，男性本组只有15 条。各对之间如仅根据长短较难区别。一般根据长度再结合着丝粒位置加以区分。6、7、8、11 号和X 染色体着丝粒较接近中部，而9、10、12 号染色体着丝粒则偏离中部。但有时区别困难。第9 号染色体的长臂近着丝粒区可能见到一个次缢痕。

4.D 组（13～15 号）

包含3 对中等大小、具有近端着丝粒的染色体，常可见到随体，相互之间很难区分。

5.E 组（16～18 号）

包含3 对较短小的亚中着丝粒染色体，各对之间可以区别。

16 号着丝粒较接近中部，容易辨认，可见到次缢痕。

17 号为亚中着丝粒染色体，长度次于16 号。

18 号长度次于17 号，短臂常较17 号短。

6.F 组（19、0 号）

包含两对中着丝粒的小染色体，形如字母X，较易与其他组区分，但19 号与20 号之间则难以区别。

7.G 组（21、22 号，Y 染色体）

包含最小的近端着丝粒染色体。21、22 号短臂可见到随体，相互之间较难区分，21 号通常较22 号稍小。Y 染色体按其大小、形态属于本组。故男性本组为5 条，女性本组为4 条。Y 染色体一般稍大，其长臂的末端可能较模糊，且比较靠拢，无随体。

三、人类染色体显带和命名

【显带】

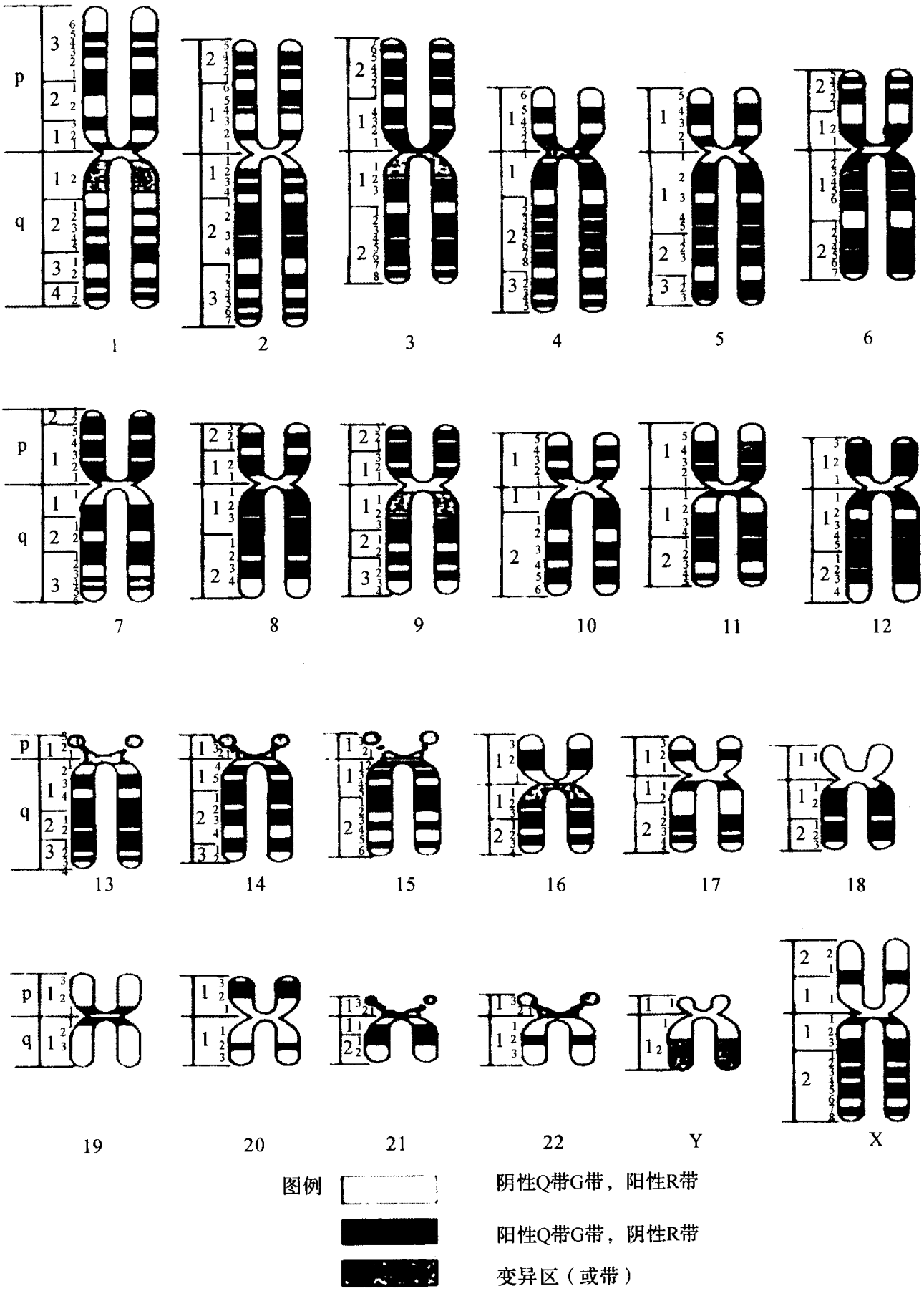


图2 -6 -1　正常人体细胞染色体带型模式图

染色体经过特殊的处理和染色之后，可显出深浅不同的条纹，称为“带”。1968 年

瑞典细胞化学家Caspersson 首先应用荧光染料喹丫因氮芥处理染色体标本，在荧光显微镜下每条染色体出现了宽窄、亮度不同的荧光带纹，他把这种带纹称为Q 带。通过Q 带可以准确地辨认各条染色体，既能判断染色体数目异常又能显示染色体结构异常。将染色体标本用胰蛋白酶处理，再用吉姆萨染液染色，也可显示与Q 带类似的带纹，称为G 带。而用另一些方法还可得到与G 带明暗相反的R 带、专门显示着丝粒异染色质的C 带，以及显示核仁组织区的N 带等各种带型（见图2 —6 —1）。显带技术不仅解决了染色体的识别问题，还为深入研究染色体的异常和人类基因定位创造了条件。

【命名】

1971 年的巴黎会议制定了一幅显带染色体模式图并对其命名作了详细的规定。在此模式图的基础上又制订了以人类细胞遗传学命名的国际体制（ISCN，1978）。随后由于细胞同步化方法的应用和显带技术的改进，人们已能得到更长和带纹更加丰富的染色体，这种染色体称为高分辨显带染色体。据此对ISCN1978 作了必要的修改，详细地画出了在中期染色体标本上可见的400 条带的编号，以及进一步再分化为500 条带和850 条带的编号，形成了ISCN1981、1985 和后来的ISCN1995。以人类细胞遗传学命名的国际体制是细胞遗传学工作者描述染色体结构异常时必须遵守的国际准则。常用符号和术语如下。

[核型分析中常用符号和术语]

ace	无着丝粒片断		
b	断裂	－	丢失
c	结构异构	mn	众数
cen	着丝粒	mos	嵌合体
chi	异源嵌合体（chimera）	p	染色体短臂
chr	染色体	［］	其内为结构起了变化的染色体和断裂点
：	断裂	pat	来自父亲
：：	断裂与重接	ph	费城染色体
cx	复杂的染色单体内互换	＋	获得
del	缺失	psu	假
der	衍生染色体	q	染色体长臂
dic	双着丝粒体	qr	四射体
dir	正位	？	表示对染色体及其结构的描述有疑问
dis	远侧端	r	环状染色体
dmin	双微体	rcp	相互易位
dup	重复	rea	重排

e	互换	rec	重组染色体
end	核内复制	rob	罗伯逊易位
＝	交叉总数	；	在涉及一个以上染色体的结构重排中，使染色体区分开
fem	女性		
g	裂隙	t	易位
h	异染色质次缢痕	tan	串联易位
i	等臂染色体	ter	末端（染色体端部）
ins	插入	tr	三射体
inv	倒位	trc	三着丝粒染色体
mal	男性	v	变异或可变区
mar	标记染色体	→	从→到（用于繁式命名体系）
mat	来自母方	(=)	用于区别同源染色体
med	中央		
min	微小近中着丝粒片断		

【举例】

46，XX：46 条染色体，性染色体为XX，正常女性。

46，XY：46 条染色体，性染色体为XY，正常男性。

45，X：45 条染色体，一条X 染色体。

47，XXY：47 条染色体，性染色体为XXY。

47，XYY：47 条染色体，性染色体为XYY。

47，XY，+21：47 条染色体，性染色体为XY，但多一条21 号染色体。

47，XXY／46，XY：为两个细胞系的嵌合体，性染色体为XXY 和XY。

46，X／46，XY：具有不同性染色体细胞系的嵌合体，两种性染色体为XX 和XY。

45，X／46，XY：为两种细胞系的嵌合体，一种细胞系为45 条染色体，性染色体只有一条X，而另一细胞系为46 条染色体，性染色体为XY。

45，X／47，XXX／46，XX：为三个细胞系的嵌合体。性染色体分别为X，XXX 和XX。

末端缺失：46，XX，del（1）（q21）或46，XX，del（1）（pter→q21）。

断裂发生在1q21 带上，远离它的长臂段缺失了。

染色体片段的重复，用符号dup 表示。符号dup 前加上dir 或inv 表示这种重复是正向的或反向的：46，XX，inv dup（2）（p23p14）或46，XX，inv dup（2）（pter→p23：p14→p23：：P23→qter）。

断裂和重接发生在第2 号染色体的2p23 带，片段p23→p14 颠倒且重复了。

臂间倒位：46，XY，inv（2）（p21q31）；46，XY，inv（2）（pter→p21::q31→p21::q31→qter）。

断裂和重接发生在第2 号染色体短臂的2p21 和长臂2q31 带。位于这些之间的片段颠倒了。

等臂染色体：46，X，i（X）（q10）；46，X，i（X）（qter→cen→qter）。

环状染色体：46，XY，r（15）（p11.2q6.1）或46，XY，r（15）（::p→q::）。

断裂发生在第15 号染色体短臂的p11.2 带及长臂的q26.1 带，这些带的远侧片段缺失了，断端相接形成一个环状染色体。

断裂和重接发生在于13 号和14 号染色体：着丝粒C13q10 和21q10 在第13 号染色体短臂的13p11 带和第14 号染色体长臂的14q11 带，第14 号染色体的14q11 带的远侧片段易位到第13 号染色体的13p11 处。第14 号染色体的其余部分连同其着丝粒一道丢失了。第13 号染色体的13pter→13p11 也均已丢失。

相互易位：46，XY，t（1；4）（p31；q35）或46，XY，t（1；4）（qter→1P31::4q35→4qter；4pter→4q35::1p31→1pter）。

断裂和重接分别发生在第1 号和第4 号染色体的1p31 和4q35 带，这些带的远侧片段在这两个染色体之间发生了互换。先写染色体号数最小的衍生染色体，后写染色体号数大的衍生染色体。当易位发生在常染色体与性染色体之间时，应先写常染色体。如：46，，t（Y；15）表示Y 染色体和15 号染色体发生了相互易位。

罗伯逊易位：45，XX，der（13；14）（q10；q10）或45，XX，der（13；14）（13qter→13q10::14q10→14qter）。

第二节　细胞培养和染色体标本制备

一、全血淋巴细胞培养及染色体标本制备

【原理】

外周血中的T 淋巴细胞在体外培养液中经植物血凝素（PHA）刺激转化为幼稚淋巴细胞，进行有丝分裂。经一定时间培养后加入秋水仙素，以抑制纺锤体的形成，使细胞控制于分裂中期。细胞收获后用低渗氯化钠溶液处理，使细胞膨胀、染色体分散铺展，再经过甲醇－冰醋酸固定、制片、显带处理、吉姆萨染色，显微镜下观察、分析，或作显微摄影，相片放大后进行核型分析。

【试剂】

1）肝素（500U/ml）：静脉注射用肝素12500U，加注射用9.0g/L氯化钠溶液25ml，分装于无菌小瓶内，每瓶5ml，保存于-20℃冰箱。100U（0.2ml）肝素可抗凝5ml血液。肝素有抑制细胞分裂的作用，浓度与用量要准确。

2）秋水仙素应用液：秋水仙素10mg，加注射用9.0g/L氯化钠溶液10ml溶解，即为1000μg/ml秋水仙素原液。取此原液0.1ml，加注射用9.0g/L氯化钠溶液9.9ml，即成10μg/ml的应用液。置-20℃保存。

3）PHA溶液：市售成品每支为10mg，使用时加注射用9.0g/L氯化钠溶液1ml溶解。

4）抗生素溶液：常用的抗生素有青霉素和链霉素。青霉素的最终浓度为100U/ml，链霉素的最终浓度为100μg/ml。如单用硫酸庆大霉素，则最终浓度为50μg/ml。卡那霉素最终浓度为100U/ml。抗生素要求临用前新鲜配制。

5）胎牛（小牛）血清：注意选购质量好且无微生物污染的胎牛血清。购得后应置56℃水浴灭活30min，-20℃冷藏备用。

6）RPMI1640培养液：无论是购买成品或者自行制备，批次间均存在差异，需经预试鉴定其质量后使用。自制方法如下：按使用说明书称取RPMI 164010.4g，溶于1L双蒸水（电阻>30万Ω），加碳酸氢钠1～2g，搅拌溶解，调节pH至7.2，用G6玻璃抽滤器抽滤除菌，加入适量抗生素溶液，无菌条件下分装于100ml小瓶中或直接分装于培养瓶，每瓶4ml。-20℃冰箱备用。

7）0.07mol/L氯化钾溶液。

8）甲醇－冰醋酸固定液：甲醇3份、冰醋酸1份混合即成。临用前新鲜配制。

【操作】

1）接种：以无菌操作采集静脉血或胎儿脐带血用肝素抗凝。将血液标本在超净工作台或无菌操作箱内接种于RPMI 1640培养液，每瓶0.2～0.3ml，加入小牛血清1ml及PHA溶液0.2ml。一般一个样品至少接种2瓶。如用手指、足跟或耳血则行床边接种，吸取血液80～100μl于1ml培养液内，小牛血清和PHA溶液酌减。注意无菌操作。

2）培养：置37℃恒温培养箱内培养68～72h。每天轻轻摇动1次，以防止红细胞凝集。如用二氧化碳培养箱，二氧化碳浓度应为5%，拧松瓶盖，或插一无菌针头。

3）秋水仙素处理：终止培养前2～4h，加入秋水仙素应用液，使最终浓度为0.04～0.08μg/ml，摇匀，以积累中期分裂细胞。

4）收获：当细胞培养至72h，将培养物混匀，移入10ml刻度离心管内，1000r/min离心10min，弃去上清液。

5）低渗处理：加入预温至37℃的0.075mol/L氯化钾溶液10ml，用滴管吹打均匀，置37℃孵箱或水浴箱低渗处理30min。

6）预固定：每管加入新鲜配制的甲醇－冰醋酸固定液3～5 滴，吹打均匀。1000r/min 离心10min，弃去上清液。

7）固定，每管加入固定液8ml，用滴管吹打均匀，室温固定30min。1000r/min，离心10min，弃去上清液。如此连续固定2 次，置4℃冰箱过夜，以利于染色体分散。次日1000r/min 离心10min，弃上清液，再加新鲜固定液8ml 固定1 次，即可制片。

8）制片：将离心管内沉淀后的细胞加入少许新配制的固定液，用滴管轻轻吹打均匀，制成细胞悬液。吸取细胞悬液2～3 滴于沾有冰水的洁净玻片的一端，随即用口吹向另一端并迅速在酒精灯火焰上来回移动2～3 次，使细胞和染色体均匀分散于载玻片上。此即所谓“气干法”制片。制片后将标本置37℃孵箱72h 或放入65℃烤箱3～4h，自然冷却后行显带和染色。

【注意事项】

制片亦可采用细胞悬液滴片吹散后立即置于开水杯上，利用杯内热气分散染色体的方法。

二、羊水细胞培养及染色体标本制备

羊水细胞是胎儿皮肤、消化道、呼吸道和泌尿生殖道脱落的细胞。通过羊水细胞的染色体分析能正确地判断胎儿的情况。因此，羊水细胞培养是产前诊断的重要手段。

【试剂】

1）Ham F10 或F12 培养液：按说明书配制。加入20%～30%胎牛血清，抗生素含量如同RPMI 1640 培养液。如用二氧化碳培养箱，培养液用碳酸氢钠调节pH 至7.0～7.4。如密闭培养，pH 调节至6.8。过碱时，可通人二氧化碳。临用前加入L－谷氨酰胺使成2mmol/L 浓度。

2）EDTA 胰酶应用液：EDTA 二钠0.2g，氯化钠8.0g，氯化钾0.4g，碳酸氢钠0.5g，葡萄糖1.0g，胰酶0.5g，依次溶于双蒸水中，并加到100ml，此为贮存液。使用时用双蒸水稀释10 倍，100ml 中加4g/L 酚红溶液0.1ml，为应用液。

【操作】

1）接种：于妊娠16～20 周抽取羊水10～15ml，于2 支10ml 无菌离心管中，800～1000r/min，离心5min。将沉淀于管底的细胞充分混匀后接种到2 只含有3～4ml 培养液的培养瓶中。

2）培养：置5%二氧化碳37℃恒温培养箱或普通培养箱培养5～7d。于倒置显微镜下观察细胞生长情况，在细胞贴壁生长的部位作标记。至第7d，以无菌操作吸出培养瓶中的培养液，加入新鲜的培养液3ml，继续培养3～d。每天镜检1 次。一般培养4～5d 后细胞能贴壁生长，7d 后细胞能长成一个个小集落，第9～14d 可以收获。

3）收获及制片：收获前3～4h，培养瓶内加入秋水仙素，使其最终浓度为0.05～0.07μg/ml。然后将培养瓶内的培养液倒人一支离心管中，加入预温37℃的EDTA胰酶液1ml，摇动使之与贴壁细胞充分接触。置37℃孵箱5min，促使贴壁细胞消化脱落。可用自制带弯头的玻璃滴管冲洗，以充分洗下贴壁细胞，并将此细胞悬液移人上述离心管中。再用少量注射用9.0g/L氯化钠溶液冲洗培养瓶，一并移入离心管中。以800～1000r/min离心5min，吸弃上清液。加入预温至37℃的0.075mol/L氯化钾溶液4～5ml，轻轻吹吸，混匀细胞。置37℃孵箱，低渗处理30min。预固定、固定、制片同外周血。

【注意事项】

原位收获及制片法：收获前加秋水仙素，预固定、固定均在培养瓶内进行。先加入固定液1ml，混匀后吸出1ml，再加入1ml固定液，再吸出1ml混合液，如此重复3～5次，吸出全部混合液，加入固定液2～3ml，静置30min，如此重复固定2～3次。用剪刀或钳子剪去培养瓶无用部分，底部即为一标本片，烘烤后显带。此法的优点是不会丢失分裂相。

三、绒毛细胞染色体标本制备

绒毛滋养层细胞是受精卵有丝分裂的衍生物，可准确反映胎儿的遗传特性。因而可用妊娠6～7周的绒毛为材料，制成染色体标本进行早期产前诊断。绒毛细胞染色体标本制备有直接制片法和培养法。本节仅介绍直接制片法。

1）吸取绒毛约10mg，置5cm洁净平皿内，挑选树枝状初级绒毛，剔除蜕膜。用9.0g/L氯化钠溶液洗涤3次，用眼科剪刀剪碎。

2）加RPMI 1640培养液5ml，移入离心管中。

3）加秋水仙素，使其最终浓度为0.4μg/ml，37℃作用1h。

4）1000r/min离心8min，弃去上清液。

5）加入1%枸橼酸钠溶液6～8ml，37℃低渗30min。

6）1000r/min离心8min，弃去上清液。

7）加5ml甲醇－冰醋酸固定液，反复固定3次，每次15min。离心，弃去上清液。

8）加60%冰醋酸数滴悬浮细胞，气干法制片。

四、胸腹水标本染色体直接制片法

1）取新鲜胸水或腹水20ml，分放于2支离心管内立即用109mmol/L枸橼酸钠溶液抗凝。

2）加入秋水仙素溶液，使最终浓度为1μg/ml。

3）置37℃1～2h，800r/min离心10min，吸弃上清液。

4）将沉淀的细胞用0.075mol/L 氯化钾溶液低渗处理。固定、制片等同外周血。

五、骨髓标本染色体直接制片法

1）在10ml 离心管中加入RPMI 1640 溶液或9.0g/L 氯化钠溶液10ml，50U 肝素溶液，0.8μg/ml 秋水仙素。

2）床边加入骨髓穿刺液2～3 滴，立即吹吸均匀。

3）置37℃孵箱1h。800r/min 离心10min，吸弃上清液。

4）将沉淀的细胞用0.075mol/L 氯化钾溶液低渗处理。预固定、固定、制片等同外周血。

第三节　染色体标本的染色和显带技术

一、常规（不分带）染色法

【试剂】

1）pH7.4 磷酸盐缓冲液。

2）吉姆萨（Giemsa）原液：吉姆萨染粉0.5g，甘油33ml，甲醇33ml。先加几滴甘油研磨吉姆萨染粉，后将甘油全部加入，在56℃水浴处理90min，冷却后加入甲醇33ml，搅拌均匀，过滤备用。此为原液。临用时以pH6.8 磷酸盐缓冲液稀释10 倍。

【操作】

在干燥或在65℃经2～4h 烘烤过的染色体标本片上滴加吉姆萨染色液。室温下染色20～30min。蒸馏水冲洗，自然干燥，镜检。

二、显带染色法

（一）荧光显带（Q 显带）

Q 带形成的机制尚未完全明了。Q 带特异性强，带型恒定，标本不受时间限制，片龄从1 周至半年均可。

【试剂】

1）50mg/L 芥子奎丫因（QM）溶液：QM1mg 溶于20ml 蒸馏水，4～8℃避光保存。可保存1 个月。

2）pH6.8 磷酸盐缓冲液。

【操作】

1）常规染色体制片，65 ℃烘烤2h。

2）用QM 染色，置室温30min，自来水冲洗，再用pH6.8 磷酸盐缓冲液洗3 次。

3）滴数滴缓冲液于标本上，覆以盖玻片。

4）荧光显微镜下观察、分析并摄影。

【注意事项】

1）如无QM，也可用二盐酸奎丫因（QD）代替。

2）摄影技术是Q 显带的关键。应选用高速高反差的胶卷，如Kodak2415。

（二）G 显带

经胰酶处理过的染色体用吉姆萨染色出现与Q 带类似的深浅不同的带纹，称为G 带。此法简单易行，标本可长期保存，是一般实验室最常用的方法。

【试剂】

1）30g/L 三羟甲基氨基甲烷（tris）溶液。

2）4g/L 酚红液。

3）0.25g/L 胰酶溶液：称取胰酶12.5mg 于染色缸内，加9.0g/L 氯化钠溶液50ml，搅拌溶解，用30g/L Tris 溶液调节pH 至7.2～7.4，置37 ℃水浴预温30min。

4）pH6.8 磷酸盐缓冲液。

5）吉姆萨染色液：吉姆萨原液1 份，加pH6.8 磷酸盐缓冲液20 份混合。现配现用。

【操作】

1）消化：将经37 ℃放置72h 或65 ℃烘烤3～4h 的染色体标本片放入胰酶溶液内，轻轻摆动，消化10～15s。

2）漂洗：置pH6.8 磷酸盐缓冲液内漂洗。

3）染色：立即滴加吉姆萨染色液染色15～20min。流水冲洗，自然干燥，镜检分析。

【注意事项】

1）因厂牌、批号、存放时间不同，胰酶活性相差较大，故而其用量及消化时间均应作预试。胰酶浓度高则消化时间短，反之则长。消化时间掌握在10～15s 为好。

2）片龄对消化影响大，片龄长，消化时间要长，或需增加胰酶的浓度。片龄＞6 个月，G 显带效果不佳。一般制片后，当日烘烤当日显带。

（三）C 显带

染色体标本先经盐酸处理，后经碱（如氢氧化钡）处理，再用吉姆萨染色，即为C

显带。

【试剂】

1）0.1mol/L 盐酸溶液。

2）50g/L 氢氧化钡溶液。

3）2 ×SSC （氯化钠－枸橼酸钠） 溶液：氯化钠17.54g，枸橼酸钠8.82g，加蒸馏水至1L，完全溶解。

【操作】

1） 按G 带法制片及烤片。

2） 冷却后的片子浸于0.1mol/L 盐酸溶液处理1h，充分水洗。

3） 放入预温（50 ～60 ℃） 的50g/L 氢氧化钡溶液中10min，取出后立即流水冲洗。

4） 浸入已预温至60 ～65 ℃2 ×SSC 溶液内90min，水洗。

5） 用吉姆萨染液（1 ∶20） 染色10 ～15min，水洗，干燥镜检。

（四） R 显带

R 显带法产生的带纹与G 显带相反，对检查末端缺失或涉及染色体末端部分的相互易位十分有用。在G 显带淡染的染色体末端部分，R 显带则为深染。故R 显带技术与G 或Q 显带技术配合可相辅相成。

【试剂】

1） pH6.5 磷酸盐缓冲液。

2） 吉姆萨染色液。

【操作】

将标本放在87 ℃、pH6.5 磷酸盐缓冲液中温育10 ～12min。自来水冲洗数秒钟。吉姆萨染液染色10min。蒸馏水冲洗，自然干燥。镜检分析。

第四节　人类高分辨染色体的制备

1976 年Yunis 等采用甲氨喋呤同步培养淋巴细胞的方法，成功地制备出有丝分裂早期的染色体标本，获得较常规制片更丰富、更精细的染色体带纹，这就是高分辨染色体制备技术。应用高分辨技术，一般可在每个细胞的单套染色体上获得500 ～800 条带，提高了检测染色体结构异常的能力。本节介绍经典的Yunis 细胞同步化法。

【试剂】

1）10μg/ml 甲氨喋呤溶液：甲氨喋呤粉剂0.01mg，溶于100ml9.0g/L 氯化钠溶液，

过滤除菌。

（2）1.0mmol/L 胸腺嘧啶核苷：胸腺嘧啶核苷24.2mg，溶于100ml 9.0g/L 氯化钠溶液，过滤除菌。

【操作】

（1）用含20%小牛血清的RPMI 1640 培养液按常规方法培养人外周血淋巴细胞，72h 后每5ml 培养物加甲氨喋呤溶液25μl，其最终浓度为0.05μg/ml。继续培养17h，使细胞同步于细胞分裂前期（G1）与细胞分裂期（S）之间。

（2）在室温下用不含小牛血清的RPMI 1640 培养液洗涤细胞2～3 次，每5ml 全培养液加胸腺嘧啶核苷50μl，其最终浓度0.01mmol/L，37℃继续培养5～6h。

（3）加入秋水仙素，最终浓度为0.08～0.1μg/ml，作用10～20min。

（4）收获细胞，常规制片。

（5）胰酶－吉姆萨显带、染色。

第五节　人类染色体的识别

一、常规（不显带）染色体的识别

见本章第一节中“染色体的分组”。

二、显带染色体的识别

（一）染色体的界标、带和区

1．染色体的界标、带和区

每个染色体都被认为是由一系列连续的带所构成，期间没有非带区。根据深（正）染和浅（负）染，能清楚地相互区分各个带，即深和浅都作为不同的带。染色体的带位于两个臂的不同区域，有特殊的界标将其分开。作为界标的有染色体两臂的末端、着丝粒和某些染色体带。区是指两个界标之间的染色体区域。1 个区可含若干个带。带的标示是从着丝粒开始向外依次编号的（图2－6－2）。

2．区和带的标示方法

染色体的两个臂靠近着丝粒的两个区均标记为1，接着较远的区就标记为2，3，…等等。作为界标的带，被认为属于界标（距着丝粒）较远的那个区，并且作为那个远端区的第1 带。

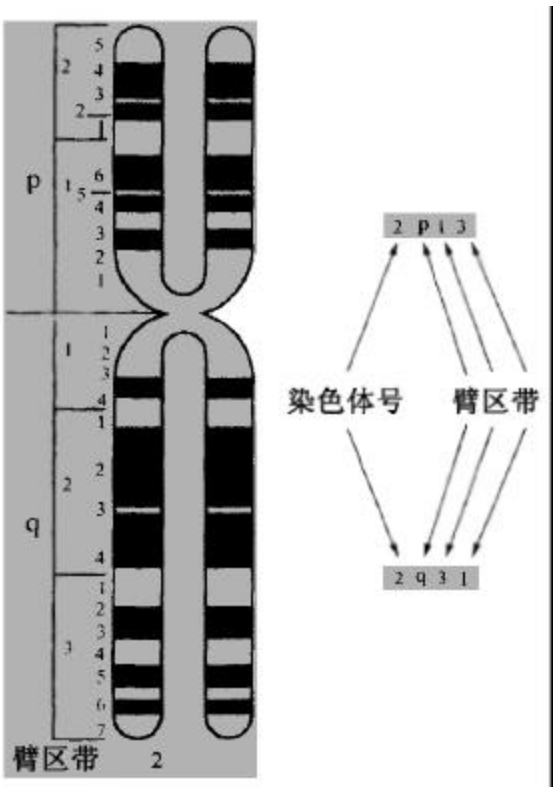


图2 -6 -2　显带染色体的界标、区和带的示意图

在给1 个染色体带定名时，需要4 种符号，分别是染色体号、臂的符号、区号、在该区的带号。这4 种符号和数字依次排列，不需间隔和标点。例如，1 号染色体短臂的3 区3 带，即写成1p33 ，余类推。每条带都是标在中点而不在边缘上。有些带用更精细的方法还可以进一步分成若干亚带，则在原来的符号的基础上加1 个小数点，后面再写亚带，仍由近到远依次编号。例如原带1p33 ，可再分3 个亚带，则写为1p33.1 、1p33.2 和1p33.3 ，其中1p33.1 距着丝粒最近，而1p33.3 距着丝粒较远。如亚带后再分亚带就不必加标点。例如1p33.1 又可分为1p33.11 、1p33.12 等等。

(二) G 带的识别

1.G 带关于“带”的描述

(1) 深带 (阳性带) 是指被吉姆萨着色者，浅带 (阴性带) 是指不着色者或基本不着色者。

(2) 为了说明着色强度则用“浓”、“淡”等词表达。

(3) 常用近端、远端，近段、中段、远段等词来指示带的位置。所谓远、近、中皆指距着丝粒而言。

2.G 带的识别

1 号染色体：短臂近端1/2 有两条宽阔和浓染的深带，远侧有3 ～4 条较窄、较淡的

带。长臂有5 条深带，中央的一条最宽最深。长臂的次缢痕深染。

2 号染色体：短臂有间隔较均匀的4 条深带，中间的两条稍靠近。着丝粒染色很浅。长臂根据标本质量可见6 ～8 条深带。

3 号染色体：短臂和长臂中部色浅是3 号染色体的特点。短臂近着丝粒区域通常有两条深带，远侧则可见3 条深带。中间的1 条最宽最浓。长臂近侧可见两条深带，中间有一条明显的浅带，远段则有4 ～5 条深带。

4 号染色体：短臂有1 ～2 条深带。长臂有均匀分布的4 条深带，在较好的标本还可分出更多的带纹。

5 号染色体：短臂中央有1 ～2 条深带。长臂中段有3 条深带（有时为1 条），远端有1 ～2 条深带。

6 号染色体：短臂中段为一明显宽阔的浅带，这是6 号染色体的特征。远侧和近侧各有1 条深带，后者紧邻着丝粒。在质量较好的标本还可细分，长臂有6 条深带。

7 号染色体：短臂上有3 条深带，末端一条较宽且色深，有如“瓶盖”。长臂有3 条明显的深带，远侧一条较浅，且可分为2 条。

8 号染色体：短臂的两条深带被一条浅带隔开，这是8 号染色体短臂的特征，有助于识别。长臂3 ～5 条带，近侧段的带和末端较浅的一条窄带常不明显。

9 号染色体：短臂有3 条深带，远侧的2 条深带有时融合为一条。长臂有2 条较亮的间隔均匀的深带，远侧的一条有时一分为二。次溢痕不着色，长度变异大，但可用C 显带选择性地染色。

10 号染色体：短臂中段有1 ～2 条深带。长臂有间隔基本均匀的3 条深带，远侧2 条相距稍近。近侧的一条着色最深。

11 号染色体：短臂中央有一宽阔的深带，有时再分出较窄的一条。着丝粒可能着色。长臂近着丝粒有一深带，中部有2 条紧邻的宽阔的深带，后者显色常融汇为一，即其间的很窄的一条浅带不显色。在远端有一条较窄的着色较淡的深带。

12 号染色体：短臂中部为一条深带。长臂贴近着丝粒有一深带，中段有一宽阔的深带，这二者之间有一明显的浅带。在较好的标本上中段宽阔的深带可分为3 条，中间一条较宽，着色较浓。此外在末端处还可见另一条较窄的深带。

11 号与12 号染色体带型相似，但可根据臂率（11 号短臂较长）和长臂中段深带的位置（即11 号的深带稍偏远端）等特点来加以区别。

13 号染色体：随体和短臂深染。长臂上可见4 条深带，第1 条和第4 条带较窄，色也较浅。第2 条和第3 条带较宽，色也较深。

14 号染色体：短臂和随体深染。长臂近侧有2 条深带，中段有一条较浅且窄的深带，而远端有一条明显的深带，后者常有助于区别14 号与其他D 组染色体。

15 号染色体：长臂的近侧有1 ～2 条浅染的深带，中段有一较深较宽的深带。远侧段浅染，有时可见2 条浅染的深带。

16 号染色体：短臂通常浅染，但有时可见1 ～2 条浅染的深带。长臂次溢痕深染，长度变异大，为一遗传性的异态特征。此外尚有2 条深带，远侧的一条有时较浅或不明显。

17 号染色体：短臂有一深带。长臂近着丝粒处有一窄的深带，远侧有2 条深带。

18 号染色体：短臂上有一条窄的深带。长臂的近侧和远侧各有一条明显的深带，近侧者要宽一些和浓染一些。

19 号染色体：着丝粒两侧为深带，其余均为浅带。但在较好的标本上，短臂可见一条深带，长臂有两条深带。

20 号染色体：短臂上有一明显的深带。长臂上有2 条深带，但染色较浅。

21 号染色体：最小的近端着丝粒染色体。长臂近侧有一宽阔浓染的深带。

22 号染色体：小的近端着丝粒染色体，比21 号稍长。着丝粒两侧深染，长臂中部有一条窄的深带。

X 染色体：亚中着丝粒染色体，长度常在7 号和8 号染色体之间。短臂中央有一条明显深带，宛如“竹节状”。在较好的标本，短臂的近侧和远侧还可见一窄带。长臂上可见4 条深带，近侧的一条最明显。

Y 染色体：按大小可归入G 组，但其变异甚大。短臂末端有一窄的深带。长臂的远侧深染，有时可见2 条深带。较好的标本中，Y 的长臂可区别4 条深带。

3.C 带的识别

（1）C 带显示的是紧邻着丝粒的异染色质区，在人类染色体C 带标本中深染的包括绝大多数染色体的着丝粒区、第1、9 和16 号染色体的次缢痕、Y 染色体的远侧。

（2）巴黎会议（1971）对各条染色体的C 带描述如下：1 号大，从着丝粒扩展到q；2 号小；3 ～8 号中等；9 号大，从着丝粒扩展到q；10 号中等；11 号中等，但比10 或12 号大些；12 号中等；3 号中等，有时分为二节；4、15 号中等；16 号大，从着丝粒向q 扩展；7 号中等；8 号中等，但比17 号大；19 ～22 号中等；X 中等；Y 在着丝粒处有一条非常窄的带，q 的末端有一宽带；1、9、16 号及Yq 上的宽阔的远侧带常有明显的形态变异即异态性。

三、人类染色体的异态性

1．染色体异态性的概念

在正常人群中，经常可以见到各种染色体形态的微小变异，诸如结构和带纹着色强

度的差异等。这种微小的变异称为染色体的多态性或异态性。

2．染色体异态性的一般特征

1）按照孟德尔方式遗传，染色体在一个个体中是恒定的，但在群体中是变异的。

2）异态性集中地表现在某些染色体的一定部位。这些部位都是含有高度重复DNA结构的异染色质所在之处。

3）异态性通常不具有明显的表型或病理学意义，否则即称为染色体异常，以区别于染色体的变异。

3．异态性的常见部位和形式

1）近端着丝粒（即D组和G组）之短臂和随体区。表现为短臂和随体区（实际上为短臂的次缢痕）的增长或缩短。随体之有无、增大或重复（双随体）以及这些结构的荧光强度和着色性能等的变异。

2）1、9和16号染色体次缢痕区表现为次缢痕之有无或增长、着色性能之变异，易脆性和臂间倒位等。

3）一些常染色体着丝粒异染色质的大小和荧光强度的变异。

4）Y染色体长臂远侧2/3的长度和着色性的变异。

第六节　染色体分析方法

染色体标本的核型分析有3种方法，即显微镜下核型分析、显微相片核型分析与自动核型分析。

一、显微镜下核型分析

显微镜下核型分析是一种被广泛应用的染色体分析之法，因为显微镜下肉眼直接分析核型，所看到的染色体要比相片真实、准确。一般需先计数30～50个分裂中期细胞，而后分析3～5个清晰而完整的分裂中期细胞。如果发现有两种以上细胞系，则需增加分析的细胞数。

二、显微相片核型分析

这是核型分析较常用的方法。它的优点是资料可以永久性保存。显微摄影前同样要先计数30～50个分裂中期细胞。计数时应记录患者姓名、片号与分裂相坐标。选择2～4个分散优良、分带好、染色佳的分裂相摄影。同一个分裂中期细胞相片需要一式两份。如果染色体之间有重叠则需要的份数更多。然后将其中的一张照片的染色体一个一

个地剪下来，按人类遗传学命名的国际体制（ISCN，1995）排列编号，着丝粒排在同一直线上，短臂向上。同时每个核型应有一个它所由来的分裂中期细胞照片，这样才能显示出细胞的质量、铺展度以及各个染色体的位置、染色的均一性、背景等。制作核型的相片总共需放大2500～3000倍，如果是高分辨染色体则宜更大些。当看到照片上有少数细节有疑问时，应该在显微镜下对照这一细胞，才能把核型分析做得更客观、更准确。对于初学者，显微相片核型分析尤其重要。

三、自动核型分析

随着细胞遗传学的发展，染色体分析技术在临床和研究领域的广泛应用，染色体自动化分析程序也在不断改进和提高。染色体自动分析包括以下几个步骤：①自动寻找分裂相；②选择适合分析的分裂相；③扫描分裂相并将得到的数字资料输入电脑；④数据处理，包括从分裂相中分出和鉴别每条染色体，然后组构成核型图。

第七节　荧光原位杂交技术诊断染色体畸变

传统的染色体显带技术存在检测时间长和难以确定较小或复杂畸变等缺点。荧光原位杂交（fluorescence in sito hybridization，FISH）技术是近年发展起来的一种分子细胞遗传学分析技术。FISH技术弥补了经典显带技术的不足，具有快速、灵敏、可靠的特点，可较精确地反映各种染色体数量和结构的畸变。FISH技术系将标记的探针和待测序列杂交，根据杂交信号的有无及类型，达到诊断染色体病变的目的。

用于杂交的探针包括以下3类。

1）染色体计数探针：主要指来自染色体着丝粒部位的特殊序列，如α卫星DNA或染色体的特异片段、Y染色体长臂的异染质区；

2）染色体单一序列的探针：指针对某一染色体上单一DNA序列的探针，例如诊断Y染色体性别决定区（sex determination region of Y chromosome，SRY）基因的探针，可用来诊断染色体有无缺失、重复，或诊断染色体微小缺失综合征；

3）全染色体涂抹探针：这类探针特异地覆盖特定的靶染色体，可用来诊断染色体的结构异常，如缺失、插入、易位等。

根据临床需要，可选用不同的特异探针进行特异诊断。

根据检测方法的差别，可将FISH分为直接法及间接法。直接法用荧光素直接标记特殊的探针，经变性、杂交、漂洗后，可直接在荧光显微镜下检测染色体结构。直接法具有直接、特异性高、快速的特点。间接法则在杂交、漂洗之后，根据抗原抗体反应的

原理，荧光素与探针结合同时又与其特异的抗体结合，使待测信号放大，从而检测特异的靶序列。间接法放大作用强，对单一序列诊断的敏感性较高。

FISH 不仅用于外周血染色体分析，还可以检测外周血、羊水等标本的间期细胞、生殖细胞和胚胎组织等的染色体畸变以及基因组图谱的绘制等。

第八节　人类染色体异常

一、染色体数目异常

㈠ 常染色体数目异常

染色体的数目多于46 条称为超二倍体，少于46 条称为亚二倍体。体细胞的染色体不是2n =46 ，而是3n =69 或4n =92 时，这些细胞称为多倍体细胞。多倍体在流产儿中十分常见，是自发流产的原因之一。癌细胞的染色体往往是多倍体，故分析胸、腹水的染色体，观察多倍体的比例在癌症诊断中有一定意义。临床常见的常染色体数目异常综合征有以下几种：

1.21 三体综合征（Down 综合征，先天愚型）

为人类最常见的常染色体病，在活产婴中的发生率为1/1000 ～1/500 。有3 种染色体核型，即三体型、易位型和嵌合型。①三体型约占90 %以上。患者多了1 条21 号染色体，核型为47 ，XY （XX），+21 。患者有眼裂小，眼间距宽，鼻梁低，耳位低，伸舌流涎等特殊面容及双手通贯，小指发育不良，草鞋足等多发畸形，约50 %的患儿有先天性心脏病。21 三体产生的原因是生殖细胞在减数分裂时发生了第21 号染色体不分离的现象，结果形成多1 条21 号染色体的配子，受精后就产生47 ，+21 综合征患儿。其发生率随着孕妇年龄的增高而增高。②易位型约占6 %。常见核型有13/21 、14/21 、21/21 等罗伯逊易位。一般认为其中一半为亲代遗传所致，通常其母亲为平衡易位携带者，另一半为新发生的畸变。易位型的临床表现同21 三体型。③嵌合型正常细胞株与异常细胞株同时存在于一个个体内，约占2 %左右。一般认为是受精卵在有丝分裂中，一部分细胞的21 号染色体发生了不分离，在一个个体中出现了21 三体的细胞和正常的细胞。在不同的嵌合型个体中，其临床表现和智能方面可有极大的差别，其程度取决于21 三体细胞数量的多寡及其两种细胞株对机体的综合作用。

2.13 三体综合征（Patau 综合征）

发生率约0.4/10000 ，有多种畸形。多见于流产、早产儿或产后不久即死亡的新生

儿。核型为47，XY　(XX)，+13。

3.18 三体综合征　(Edward 综合征)

发生率约1/4500，多见于流产、早产儿或产后不久即死亡的新生儿。核型为47，XY　(XX)，十18。

(二) 性染色体数目异常

1．先天性睾丸发育不全综合征　(Klinefelter 综合征)

又称小睾丸症，染色体核型为47，XXY。为性染色体数目异常最常见的综合征，发病率约占男性的1/800。患者在儿童期无任何表现，青春期后出现临床症状。身高常在176cm 以上，胡须、阴毛稀少，喉结不明显，约1/4 患者有男性乳房发育。睾丸小，质较硬，细精管玻璃样变性，无或极少精子发生，不育。约有1/3 的患者核型为46，XY／47，XXY 嵌合型，这样的患者一侧睾丸可正常并有生育能力。也有部分患者为48，XXXY 或49，XXXXY。X 染色体越多，其临床表现越明显，智力影响也越大。

2．先天性卵巢发育不全综合征　(Turner 综合征)

染色体核型主要为45，X，发病率约占女性的1/3500。患者体矮，一般低于140cm。后发际低，约50％的患者有蹼颈，肘外翻，第4、5 掌骨短小，原发闭经，性腺条索状，其中有卵巢基质而无滤泡，外阴呈婴儿型。部分患者核型为45，X/46，XX。这样的患者体征可以不典型，常常只有体矮，原发性闭经和条索状性腺。

3.XYY 综合征

约占男性的1/1500～1/150，核型为47，XYY。患者大多身材高大，可有行为异常、智力较差及精神性疾病，也有无临床表现者。

4.XXX 综合征

又称X 三体症或超雌症，发病率在女性中约占1/1000。核型为47，XXX。患者无明显临床表现，可有继发性闭经、不育，但也有能生育的患者。

5．两性畸形

(1) 男性假两性畸形：患者有睾丸，内生殖器和/或外生殖器有两性的特征，副性征常发育不良或呈女性状态。核型为46，XY。如睾丸女性化。

(2) 女性假两性畸形：患者卵巢，输卵管和子宫多发育不良，外阴为女性而阴蒂肥大，有时如男性阴茎且有尿道下裂。副性征呈女性而有不同程度的男性化。核型为46，XX。如先天性肾上腺皮质增生症。

(3) 真两性畸形：约40％的患者性腺一侧为卵巢、另一侧为睾丸。约40％一侧为卵巢或睾丸，另一侧为卵睾。约20％两侧均为卵睾。内外生殖器均有两性的特征，副

性征可为不典型的男性或女性。核型有以下几种：①46，XX 型；②46，XX/47，XXY 型；③45，X/46，XY 型；④46，XY 型。

二、染色体结构异常

(一) 常染色体结构异常

1．缺失 (del)

由于染色体断裂引起的染色体部分丢失，有末端缺失和中间缺失两类。临床上最常见的为5p－综合征，患儿由于喉肌发育不良致哭声似猫叫，故又名猫叫综合征，并有特殊面容 (满月脸) 和智力低下。核型为46，XY (XX)，del (5) (p15.1)。发生率约1/5000。

2．倒位 (inv)

一条染色体内发生两次断裂，形成3 个节段，中段顺序颠倒，再连接，称为倒位。倒位有臂内倒位和臂间倒位两种，如inv7。患者表型、智力一般正常，但可引起习惯性流产。

3．易位 (t)

某个染色体断片从原来位置转移到另一染色体的新位置上。常见有以下几种类型：

(1) 平衡易位：一般认为染色体发生平衡易位时，其遗传物质没有增加或减少，但易致自发流产或不良生育。如我们发现1 例t (5;20) 平衡易位的女性携带者生产的新生儿为5p－综合征。

(2) 罗伯逊易位 (rob)：由13～15 和22～22 号染色体 (近端着丝粒染色体) 的长臂通过着丝粒融合产生的特殊类型的易位。如45，XX (或XY)，－14，－21，+t (14q;21q)，这类患者在生殖细胞形成时，经减数分裂可以产生4 种类型配子。故与正常个体婚配后，理论上将产生6 种类型的个体：①核型为46 的正常个体；②核型为45，XX (或XY)，－21 的个体，因少了一条第21 号染色体而流产；③核型为45，X (或XY)，－14 的个体，因少了一条第14 号染色体而流产；④核型为46，XX (或XY)，－14，+t (14q;21q) 的个体，实际上是多了一条第21 号染色体的14/21 易位型的先天愚型患者；⑤核型为46，XX (或XY)，－21，+t (14q;21q) 的个体，实际上是多了一条第14 号染色体而流产；⑥核型为45，XX (或XY)，－14，－21，+t (14q;21q) 的14/21 染色体平衡易位携带者。由此可见，这类患者虽然外表正常，但结婚怀孕后，常有自然流产史或死胎，所生的子女中，约有1/3 为易位型先天愚型，1/3 为平衡易位携带者。

（3）ph 染色体：这是一个长臂缺失的22 号染色体，一般为t（9；22）（q24；q11）。它的发现首次证明了一种染色体畸变（22q－）与一种肿瘤（慢性粒细胞白血病）之间的联系。ph 染色体的发现大大地促进了肿瘤细胞遗传学研究的进展。除此以外，目前已经发现的重要特异标记染色体还有急性早幼粒细胞白血病的t（15；7）（q22；q21），Burkitt 淋巴瘤的t（8；14）（q24；q32）等。

4．环状染色体（r）

一条染色体的两端附近各发生1 次断裂，有着丝粒节段的两端借断面彼此连接形成的染色体。这在癌性胸腹水及辐射损伤时较为常见。

（二）性染色体结构异常

性染色体结构异常较常见的有i（Xq），临床表现同Turner 综合征。此外有X 染色体与常染色体相互易位。

（三）脆性X 染色体fra（X）

fra（X）是指在Xq27 和Xq28 之间的染色体呈细丝样，而致其相连的末端呈随体样结构。由于这一细丝样部位容易发生断裂丢失，故称脆性部位。fra（X）的检出依赖缺乏叶酸和胸苷的培养条件或在低叶酸加诱导剂（如地塞米松等）的情况下才能表达。患者的主要临床表现为智力低下；语言障碍；长脸、方额，大下颌，大耳朵，大睾丸。核型为46，Y，fra（X）。

第七章　血液流变学检验

血液流变学是研究血液在血管内流动变化特性的科学，它涉及到血液的理化性质、血液的流体力学、血管壁的结构特性3 个方面，是血液学与流体力学交叉的学科。其研究范围十分广泛，常用的临床血液流变学指标如下：

1） 全血类指标，如血液高切黏度、中切黏度、低切黏度、还原黏度、血细胞比容等。

2） 红细胞类指标，如红细胞聚集指数、红细胞变形指数、红细胞沉降率、红细胞电泳时间等。

3） 血小板指标，如血小板聚集性和黏附性、体外血栓形成与测定。

4） 血浆类指标，如血浆黏度、血浆白蛋白和球蛋白浓度、血浆纤维蛋白原浓度、血糖浓度、血脂浓度等等。

这些血液流变学指标的检验已广泛用于心脑血管病、糖尿病、血液病等疾病的诊断、防治及病因学研究。

第一节　血液流变动力学

一、液体的流度、黏度

在一定外力作用下所有液体都可流动，即具有流动性，用“流度”来表示。液体流度的大小是由其内部对流动起着阻抗作用的内摩擦力决定的。液体的内摩擦力又称液体的“黏度”。

二、牛顿液体和牛顿黏度

在外力作用下，液体在管中作稳定流动时液流可分为许多平行于管壁的液层，但每层的流速不同，呈抛物线分布。液体在管中心的流速最大，距管中心越远，流速越小；在管壁处，由于液层附于管壁上，故流速为零。流速大的液层给流速小的液层以拉力，流速小的液层则给流速大的液层以阻力，结果在流速不同的两层液体的接触面上产生一对相互作用的力，称为内摩擦力。

在一切流体中，切变应力（τ或F/A）、切变速度（γ）与黏度（η）三者之间的关系。可用牛顿黏度定律表示如下：

$$\tau = \eta \cdot \gamma$$

液体的黏度是一个恒定常数，不随着切变速度的变化而变化，这种液体称为牛顿液体，这种液体的黏度称为牛顿黏度。如果液体的黏度与切变应力或切变速度有关，液体的黏度随切变速度的变化而变化，其黏度不是一个恒定常数，则这种液体称为非牛顿液体，这种液体的黏度称为非牛顿黏度。

三、血液的黏度

血液是一种由红细胞、白细胞、血小板、水和各种蛋白质、脂质等高分子化合物组成的复杂液体。实验证明，血液属于非牛顿液体，具有非牛顿黏度。血液黏度随其切变速度的改变而改变。在低切变速度下，全血黏度高；在高切变速度下，全血黏度低。血流量的大小主要与心脏、血管和血液三者有关。血液在管道内流动，其流量（Q）与管道两端的压力差（$p_2 - p_1$）、管道半径（R）成正比，与管道的长度（L）和液体的黏度（η）成反比，可用下列公式表示：

$$Q = (\pi R^4 / 8\eta) \cdot (p_2 - p_1 / L)$$

四、血液的流变特性

血液是一种悬浮体系，有形成分中大部分是红细胞，此外还有白细胞及血小板等，这些成分共同悬浮在血浆中。血液具有以下流变特性：

1）全血是非牛顿流体，血浆是牛顿流体。

2）全血具有屈服应力，只有当所受的外部切应力超过此值时，血液才开始流动。

3）红细胞浓度愈高，全血黏度愈高。

4）切变速率足够大时（$>100s^{-1}$），全血的流变特性趋于牛顿流体。因此，在大血管中全血可看作是牛顿流体。

5）血液流动随着切变率的增高，全血黏度逐渐降低并趋于一个渐近值。

6）在相当宽的切变速率范围内，全血的流动曲线可用卡松方程描述：

$$\tau = k \times \gamma + \tau_y$$

式中τ_y称为卡松屈服应力；k称为卡松黏度。

7）血浆黏度主要决定于纤维蛋白原浓度。

8）影响血液流变特性的因素有很多，主要有红细胞聚集性、变形性、血液pH值、渗透浓度等。

9）温度对全血及血浆黏度均有很大影响，温度越低，黏度越高。

第二节　血液细胞流变性检测

一、红细胞流变性检测

红细胞流变性检测包括红细胞聚集性、变形性、红细胞电泳等检测。可以通过全血黏度、血液沉降率、血细胞比容等的测定来推算，也可通过相应方法直接测出。

㈠ 红细胞聚集性检测

1．黏度检测法

在低切变率下，细胞因大分子血浆蛋白的桥联作用形成缗钱状的聚集体，进而形成三维的立体网状结构，使血液流动阻力增大。红细胞聚集性愈强，形成的聚集性愈大，血液黏度升高愈显著。随着切变率的升高，这种立体结构逐渐被破坏，血液表观黏度随之降低。因此，可通过测量血液黏度来估计红细胞的聚集性。

2．红细胞沉降及K 值计算法

红细胞沉降率（ESR）在一定程度上反映红细胞的聚集性，利用血沉K 方程可排除血细胞比容、血浆黏度、红细胞表面电荷、温度等因素的影响。其计算方法是先用温氏法测血沉，再通过离心法测血细胞比容，然后通过下列公式计算：

$$ESR = K\ [-\ (1-H+\ln H)]$$

式中H 为血细胞比容，ESR 为红细胞沉降率，K 为常数。由R ＝－（1－H ＋lnH），则

$$K = ESR / R$$

K 值比ESR 更能客观反映红细胞聚集性变化。

㈡ 红细胞变形性检测

1．黏性检测法

血液的表观黏度随切变率升高而降低。高切变率下血液的表观黏度主要由红细胞的变形性决定，通过测量血液在高切变率下的表观黏度及相应的血浆黏度和比容值可间接估计红细胞的平均变形值。

$$TK = (\eta_V^{0.4} - 1) / \eta_V^{0.4} \cdot C$$

式中 η_V 为相对黏度，是全血黏度与血浆黏度的比值；T 为Taylo 因子，K 为红细胞群集指数，C 为红细胞浓度，常以血细胞比容代替。

2．微孔滤膜滤过法

【原理】

在一定的负压下，一定浓度的红细胞悬液在通过一定直径的微孔滤膜所需的时间可反映红细胞变形性，一般用红细胞滤过指数（F）表示。先用缓冲液将受检血液配成10％红细胞悬液，再测定红细胞悬液通过5μm 直径微孔膜所需时间，与空白液比较，计算出IF。IF 愈大，红细胞变形性愈差。

$$IF = (t_s - t_0) / t_0$$ 血细胞比容值

【试剂和仪器】

（1）滤过器。

（2）滤膜：孔径5μm，孔分布密度4×10^7 目/cm^3，重孔率低于30％，膜的厚度约13μm。

（3）悬浮介质：采用等渗PBS 或Tris－盐酸缓冲液（pH7.4）均可，使用前以G2 滤过器过滤，除去微粒。

【操作】

（1）将EDTA 抗凝血样以2000r/min 离心10min，弃去血浆及血浆黄层，以悬浮介质洗涤，洗后以2000r/min 离心5min，弃去上清液。重复3 次。

（2）取压紧的红细胞1∶9 加到悬浮介质中配成红细胞悬液备用。

（3）加样前使储气瓶内保持1kPa 或2kPa 负压，分别吸取悬浮介质和红细胞悬液加入到带刻度的样品池内，测量其流过滤膜的时间t_0 和t_s，按上述公式计算出IF 值。

【参考值】

0.29 ±0.10。

3．激光衍射法

红细胞在切变场中按流动方向取向，形成一致排列。通过激光束照射红细胞悬浮的流场，可以得到红细胞的衍射图像。红细胞在切变场中会被拉伸成椭圆形，通过衍射图像的长轴、短轴和切变率可以计算出红细胞流动变形指数。此法只能得到红细胞群体的变形情况，无法了解单个红细胞的变形性。

4．微管吮吸法

用一根内径小于红细胞直径的微管，一端连接负压，一端吸吮红细胞，根据一定管径下红细胞吸人的长度与负压之间的关系，可以计算出单个红细胞的变形指数。

（三）红细胞电泳检测

【原理】

红细胞表面带负电荷，在电场中可向正极移动，此即红细胞电泳。

【器材和试剂】

1）电泳小室：采用长7～8cm，内径1mm 均匀的方形毛细管。

2）电极：采用银－氯化银电极。

3）琼脂导管：2～3cm 长、内径略大于方形毛细管的硬塑料管，注入10g/L 琼脂溶液（其中含100g/L 氯化钠溶液），冷却备用。

4）红细胞悬液的制备：取静脉血，用肝素抗凝，2000r/min，离心10min，取出血浆置小试管内，加入1 滴血（使红细胞含量为10^7/L 左右）备用。

【操作】

将红细胞悬液装人方形玻璃管，两端套好琼脂管，装在电泳管架上，固定于显微镜台。接通电源，分别测量细胞泳动测微器上一定距离（s）经历的时间（t）。记录20 个细胞求均值E，计算电泳速度（v）。

$$v = s / (Et)$$

【参考值】

红细胞自身电泳时间为（16.5 ±0.85）s。

二、白细胞流变性检测

白细胞流变性主要包括变形性（又分为主动变形和被动变形）和粘附性。白细胞的防御功能与其流变性有密切关系。白细胞伸出伪足，在趋化因子的作用下穿过血管壁进入组织间隙，对入侵者行使吞噬和杀灭作用，为白细胞的主动变形；而在外力作用下的变形为被动变形。由于白细胞内黏度比红细胞高3 个数量级，故白细胞变形性比红细胞小得多。因此，白细胞在毛细血管人口处通过时阻力较大，常引起毛细血管中间隙流，甚至完全阻塞。白细胞趋壁和黏附效应可造成管道变窄，血流阻力增加。在正常状态下，血液中白细胞数量较少，对微循环中的血流影响不大，但如果白细胞浓度增加（如白血病患者），将导致血流表观黏度明显增加。与相同体积的红细胞增多相比，白细胞增加对血液流变特性的影响更为显著。

（一）白细胞变形性检测

1．微孔滤膜滤过法

由于白细胞较红细胞大而硬，因此，滤膜孔径应选择6～8μm，其测量原理和装置与红细胞滤过试验相同。白细胞的分离方法如下：取新鲜EDTA 抗凝血，在室温下自然沉降5～40min，上层为富含各种白细胞、血小板及少量红细胞的血浆，取此血浆用预先滤过的悬浮介质作不同比例稀释后备用。

2．微管吮吸法

采用微管吮吸法装置。稀释的白细胞悬液（约50 ×10^9/L）放入倒置显微镜台上的样品池内。微吸管内充满悬浮介质，将其装在液压微操纵器上，粗的一端与压力调节系统相连，应用显微镜摄像系统记录白细胞被吮吸变形的动态过程。直径大于5 μm 的吸管用于研究单个细胞的变形，直径1 ～2 μm 的吸管用于白细胞的微观力学分析。

（二）白细胞粘附性检测

白细胞粘附于血管壁上对血管内血流有很大影响。体内白细胞与血管壁间的相互作用主要决定于白细胞与血管内皮之间的粘附力、白细胞与血管壁接触的概率和时间、血管内壁切应力等因素之间的平衡。在正常生理状态下，微循环内的壁切应力足以完全破坏白细胞对血管内皮的粘附，因此，白细胞对其血流状态影响不大。但是当出现低流动状态、壁切应力降低时，白细胞的粘附增强，血流缓慢，从而更加重微循环中血液灌注不足。测量白细胞粘附性主要采用流动腔和流变镜两种方法。

1．流动腔法

测定白细胞粘附的流动腔的长度为4.98cm，宽0.9cm，高0.025cm。微管吮吸实验装置如图2 -7 -1。

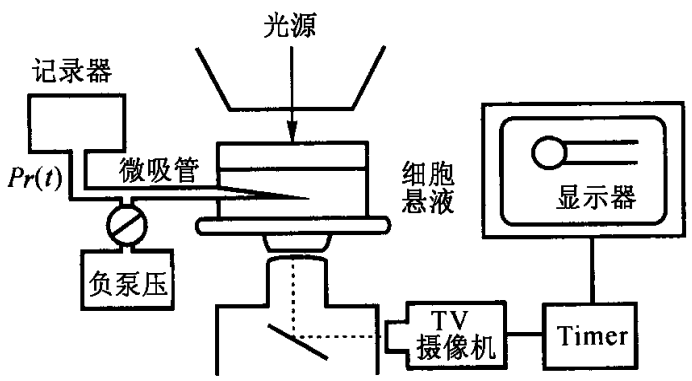


图2 -7 -1　微管吮吸实验装置

上层的盖玻片上有培养的单层内皮细胞，底座、垫片和盖玻片组装在一起（注意防漏）。利用蠕动泵将配制好的白细胞悬液注入流动腔，静置10 min 后将无细胞的介质注入流动腔，同时用显微摄像系统记录粘附于内皮细胞层上的白细胞在流动场作用下脱离的过程，从而分析白细胞与内皮细胞之间粘附力的大小。按下式计算流动腔中壁切应力 τ_ω：

$$\tau_\omega\ (Pa) = 0.6\eta Q / a^2 b$$

式中Q 为流速（ml/s），η为介质黏度，a 为流动腔有效高度，b 为宽度。

本试验中所用白细胞悬浮介质和白细胞分离方法与白细胞变形性检测相同。

2．流变镜法

流变镜是将锥板式流变仪与倒置显微镜结合在一起构成的。其圆锥和平板均由透明材料制造。当锥体旋转时在锥板的间隙中产生均匀切变流场。可利用此装置观察血细胞的变形、聚集、粘附和定向等多种细胞流变行为，因此，流变镜是一种多功能的设备。

由于白细胞与界面间的粘附作用有时间依赖性，故在作白细胞粘附检测时，除了应控制流场切应力，还应注意控制白细胞与界面作用及切应力作用的时间。

白细胞和内皮细胞之间的联接的理化分析尚有许多未知领域。在循环系统和组织中，粘附对白细胞运动的影响及白细胞粘附的分子基础尚待进一步研究，故有关白细胞流变性的临床意义还有待探讨。

三、血小板流变性检测

血小板是最小的血细胞，其流变特性的体外研究较困难，但血小板的粘附、聚集、释放对血液流变学有直接的影响。其具体的测定方法和临床意义见本篇第二章止凝血和抗凝血检验。

第三节　血液黏度计的原理和测定方法

血液黏度是血液流变学最主要的基本参数。测定血液黏度的仪器称为黏度计。黏度计的种类很多，目前国内常用的血液黏度计分为两大类：毛细管式黏度计和旋转式黏度计。

一、毛细管式黏度计测定法

【原理】

不同黏度的流体流过相同的管道时所用的时间是不一样的，流体的黏度越大，所用的时间就越长。根据Poiseuill 定律，在相同的体积、压差、管径和管长条件下，流体的黏度与流过一定管长所用的时间成正比。测量时，让水（或9g/L 氯化钠溶液）和血液通过同一根管子，分别测量它们所用的时间T_w 和T_b。已知水的黏度μ_w，则血液黏度μ_b可按下式计算出来：

$$\mu_b = T_b \times \mu_w / T_w$$

毛细管式黏度计的工作原理见图2－7－2。

【操作】

1）静脉取血，以10～20U/ml 肝素或3.4～4.8mmol/L EDTA 二钠抗凝。

2）将试样置于水浴中，恒温5min，混匀后加入贮液池，同时按下测定按钮，仪器自动记录样品流经的时间。

3）同样测定9g/L 氯化钠溶液流过时间。

4）根据公式计算每个平均切变率下的血液表观黏度。

【注意事项】

1）对比液体最好用蒸馏水或9g/L 氯化钠溶液，并要严格控制温度。

2）上一个样品的残留物对下一个样品测量结果有影响，因此，需用待测样品冲洗毛细管并吹干。

3）毛细管式黏度计易受表面张力的影响。血液在毛细管内流动过程中，前面的凸液面和后面的凹液面均会由于表面张力的作用而产生一个与运动方向相反的阻力，这种阻力会影响黏度测定的结果。

4）毛细管式黏度计对测定血浆等牛顿流体的黏度值精确度较好，但测定全血的黏度有如下缺点：①毛细管的轴心处切变率近似0，管壁处切变率最大，因此，测定全血黏度值的误差较大。②在低切变率范围内，由于血细胞自动沉降，影响测定精确性。③在高切变率范围内，一部分驱动力以动能形式存在于液体中，而不是完全被粘性摩擦所消耗，这也会导致测定误差。

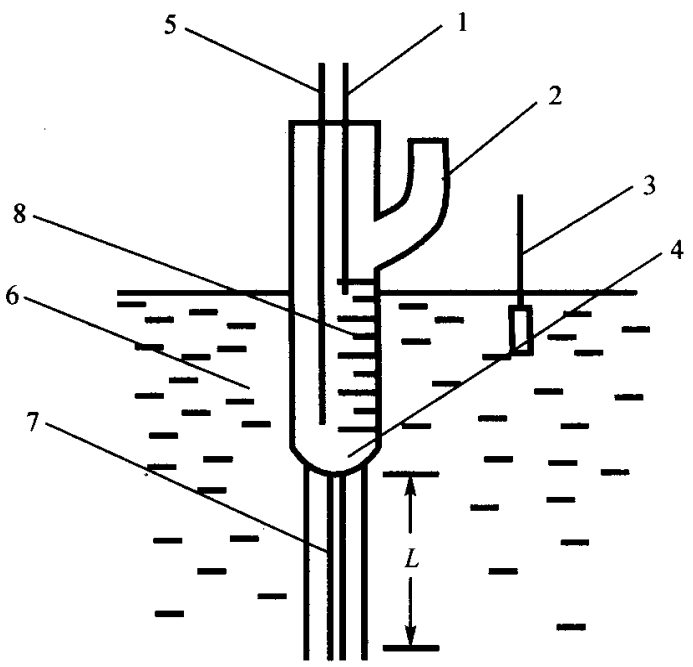


图2－7－2　毛细管式黏度计的工作原理

1．开门电极2．液体注入管3．接地电极

4．与接地电极连接的白金丝5．关门电极

6．保温水浴7．玻璃毛细管8．贮液池

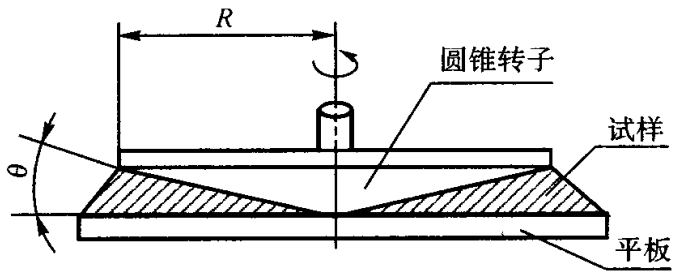


图2－7－3　锥板式黏度计的工作原理

二、旋转式黏度计测定法

【原理】

在半径为R 的圆形平板上设置一个大角度的圆锥，将血液置于圆锥与平板的空隙，当圆锥以一定角速度旋转时，血液由于黏性而产生阻力。根据牛顿黏性定律，一个已知切变率的切变场中，可测定剪切率，所产生的切应力T 大小，然后按下式计算血液的表观黏度 μ：

$$\mu = \tau / \dot{\gamma}$$

旋转式黏度计中目前常用的是锥板式黏度计。锥板式黏度计的工作原理见图2－7－3。

【操作】

1）静脉血4ml，以肝素或EDTA 抗凝，加盖颠倒充分混匀。

2）打开仪器预温，使恒温系统达到测试温度。

3）将试样在测试温度下恒温5min 后，充分混匀后加入试样杯。

4）选定剪切速率，按照仪器操作步骤进行自动测试。

【注意事项】

1）样品采集：采血时最好用7 号以上的针头。

2）样品抗凝：使用肝素抗凝时，建议将肝素37℃烘干后使用。放入血液后要摇匀。如使用液态抗凝剂枸橼酸钠、EDTA 等，则应考虑其对血液的稀释作用。使用EDTA 抗凝剂，最好用饱和溶液。

3）样品保存：血液标本应随采随测。如需存放，应在室温下密封保存，不宜放入冰箱。存放时间以不超过4h 为宜。

4）血浆制备：一般以3000r/min 离心30min 后，提取上层血浆测量血浆黏度。

5）测量温度：血液一般在37℃以下测量。温度高时应考虑测量时间的增加、流体蒸发等因素对其流变特性的影响。

6）锥板间隙：锥板间隙应严格按操作规程调试，并用标准油校正。

7）样品用量：样品用量由标定时的标准油用量而定，并应严格控制样品计量精度。样品量过多或过少均将对测量结果产生较大影响。

8）样品移入：样品移入时避免产生气泡。

第四节　血液流变学的临床应用

血液的流动性和黏滞性是保证组织和器官得到足够血流量，执行其正常生理功能的重要因素。如果发生异常，便可导致全身或局部血液循环障碍，组织缺血、缺氧以及一系列的病理变化，因此，血液流变学检验对于某些疾病的诊断、防治、病因学研究等具有重要意义。

一、诊断疾病

1．血液黏度增加

1）血浆蛋白异常：许多血浆蛋白异常的疾病都可以表现出明显的高黏滞性，如巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤等。由于血浆中蛋白异常升高，使血浆黏度明显增加，进而使血液黏度升高。另外，血浆蛋白的增加也可以导致红细胞的聚集，特别在低切变率时更为明显，从而进一步导致全血黏度的升高。

2）红细胞数量增多：原发性或继发性真性红细胞增多症、肺源性心脏病、烧伤、严重脱水、高原环境、长期缺氧等均可造成红细胞数量明显增多，从而导致血液黏度升高。

3）血液病：如镰状细胞贫血、异常血红蛋白症、球形细胞增多症等，常可导致红细胞流变特性的变化。

4）综合因素：很多疾病的血液黏度改变是由多种原因造成的，如心、脑血管疾病的红细胞浓度、全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集性、血小板聚集性升高，红细胞变形性下降；糖尿病、外周动脉性疾病、高脂血症、肿瘤等也有各种血液流变学指标的变化。

2．红细胞变形性异常

1）血液病红细胞变形能力的降低在一些溶血性贫血的发生、发展过程中占有重要地位，也是造成红细胞寿命缩短的重要原因。①红细胞内黏度异常：常见于镰状细胞贫血、β－珠蛋白生成障碍贫血等。②红细胞膜结构及形态异常：如球形、椭圆形红细胞增多症、免疫性溶血性贫血等，其红细胞形状明显不同于正常红细胞，细胞膜的稳定性下降，在流动中容易被破坏，造成红细胞破碎、溶血。

(2) 其他疾病：心肌梗死、脑血栓形成、冠心病、糖尿病、肝脏疾病、呼吸系统疾病、硬皮病、高脂血症、雷诺综合征等，均伴有不同程度的血液黏度、红细胞变形性、红细胞内黏度等流变学指标的变化。

二、诊治恶性肿瘤

恶性肿瘤患者血浆黏度、血液黏度及红细胞聚集程度常增高。改善血液流变特性，避免血液淤滞和二次流的出现，保证充足的血流，可能有利于防止肿瘤细胞的转移和留宿。

三、治疗和监测疾病

1．疗效观察

血液流变学各项指标是高黏滞血症和低黏滞血症患者临床观察的重要指标；血细胞比容和血液黏度是判断真性红细胞增多症患者临床疗效的指标。

2．疾病监测

血液流变学指标的改变可早期预示某些疾病的发生，如脑梗死、心血管疾病等。若及时改善机体的失衡状态，有助于防止疾病的发生发展。

【注意事项】

(1) 血液流变学指标参考值在不同种族、地区（主要是高原与平原间）、性别、年龄的人群中有差异。

(2) 由于各厂家生产的仪器原理、设置的切变率范围不同，各实验室的参考范围和测定结果亦缺乏可比性。

(3) 目前血液流变学指标测定尚无统一的标准品和质控品，因此难以评价各实验室的测定结果。

第八章　血液学检验质量控制

第一节　分析前的质量管理

一、标本采集的质量保证

1．正确开列检验申请单

要求临床医生根据患者病情正确选择检验项目，应填写姓名、性别、年龄、科别、床号、病案号、临床诊断等项目，以便检验人员分析检测结果。

2．患者准备

医护人员应了解在标本采集前影响结果的非病理性因素（药物、饮食、运动、治疗、生理变化、标本采集时间），正确指导患者，采取切实措施，保证采集的标本符合疾病的实际情况。

3．标本采集

（1）标本采集前，认真核对患者、标本容器和检验单是否一致，严防标记错误。患者应尽量保持平静。

（2）静脉血采集：①采血用具：使用一次性塑料注射器。凝血功能检测时，采血针头长短、内径大小应标准化，推荐使用21G1.5或20G1.5号针头。塑料（或硅化玻璃）试管刻度的可能误差控制在既定体积的10％以内。提倡使用真空采血系统。②抗凝剂的选择：血细胞计数分析使用EDTA二钾抗凝剂。抗凝剂终浓度为（1.85±0.35）mg／ml全血。凝血检测用109mmol／L枸橼酸钠抗凝，血与抗凝剂比例为9∶1，当血细胞比容小于0.20或大于0.55时，必须用Mac Gann公式推算抗凝剂的用量。公式如下：抗凝剂用量（ml）＝0.00185×全血量（ml）×（1－血细胞比容值）。③采血技术：选择较粗的肘静脉并尽量避开炎症、冻伤等部位，采血要求十分顺利。止血带压迫时间不能过长（尤其凝血检测标本不得超过5min）、结扎不能过紧，不允许从输液管放血。标本采集后拔掉针头，将血液沿试管壁缓缓注入抗凝试管中，轻摇混匀，并注明采样时间。

（3）末梢血采集：①采血用具：血红蛋白吸管容量或一次性毛细吸管必须经过鉴定

（误差≤±1 %）。②采血技术：穿刺须达到足够深度，避免挤压，血液充入管内的速度不宜过快，应避免出现气泡，管外血液宜用软吸水纸擦去。

血细胞计数仪要求使用抗凝静脉血，末梢血仅限于大面积烧伤、婴幼儿、血液病等不易静脉采血的患者。

二、标本的传送与贮存

1．标本的传送

取血后加盖尽快送检，运送过程中要避免剧烈震动、日光直射。特殊标本要根据其存放条件、温度、时间等分别对待，如凝血因子Ⅱ、Ⅴ等需4 ℃下运送，以防降解。

2．标本的贮存

接到标本后应及时检测，其中末梢血稀释后做血细胞分析要在1h 内完成，EDTA 二钾抗凝静脉血中白细胞、红细胞、血小板可稳定24h，但粒细胞形态2h 后即有变化，需镜检分类者，应及早推制血片。虽然4 ℃条件下可延长血液贮存时间，但血小板不宜在低温下贮存，否则会影响血小板计数和血小板平均体积值，若不能及时检验，应加盖室温保存。凝血功能检验标，本采集后，宜在2h 内检测，最好在1h 内分离血浆，不能及时测定，必须立即加塞将血浆置－20 ～－80 ℃冷冻贮存，不宜置4 ℃冰箱保存，否则凝血因子易被冷激活。检验前将血浆于37 ℃水浴中快速融化。复融过的标本不能再次冷冻。

第二节　分析中的质量控制

一、血液细胞分析仪的质量控制

㈠ 操作人员培训

血液细胞分析仪操作人员上岗前应接受良好的培训，充分了解仪器的原理、操作规程、使用注意事项、细胞直方图的意义、异常报警的分析、引起实验误差的因素和仪器维护等知识，掌握用ICSH 推荐的标准方法校正仪器的每一个参数以及室内质控的操作与应用。

㈡ 仪器的安装与鉴定

1．仪器安装

血细胞分析仪系精密仪器，由于测量电压低，易受各种因素干扰，因此，必须安装

在远离电磁源、热源的位置，操作台要稳固，工作环境要清洁、干燥、通风，并防日光直射，室内温度应保持在15～25 ℃之间。

2．仪器鉴定

仪器安装或维修后应经鉴定合格方能使用，其鉴定内容包括仪器的精密度、携带污染率、总重复性、线性范围、可比性等项目。

3．仪器校准

为保证检测结果的准确性，仪器必须进行校准。

（1）校准方法：校准方法有两种，一是用仪器生产厂商提供的校准品对仪器按标准方法校准；二是取一份新鲜血标本，经ICSH 推荐的方法定值后，再校准仪器。

（2）校准时间：分析仪投入使用前；更换部件进行维修后，可能对检测结果的准确性有影响时；室内质控显示系统的检测结果有漂移时（排除仪器故障、试剂及人为因素的影响）；开展常规检测的实验室，每年至少进行2 次校准。

4．试剂

①提倡使用配套试剂，对其他非专用试剂，应事先与配套试剂对比，结果一致者方能采用。②检测时试剂温度应控制在18～22 ℃，低于15 ℃、高于30 ℃均会影响测定结果。③溶血剂的用量与溶血时间：全自动仪器能在机内自动添加溶血剂并定时检测。但使用半自动仪器进行血细胞计数时，血液在预稀释后加入溶血剂，溶血后再进行白细胞计数和分类，如果加入溶血剂的量不足或加后放置时间过短，可致溶血不完全；放置时间过长，白细胞会过度皱缩，导致计数误差甚至仪器不能进行分群计数，因此，测定时必须严格控制溶血剂的用量和溶血时间。

5．空白测试

开机后均应进行空白测试，结果应在允许范围内。

6．室内质控的建立和操作

为保证实验室工作的精密度以及当天结果的可靠性，每一台血细胞分析仪都必须建立室内质控。常用的质控方法有L－J 质控图与浮动均值质控图。其中L－J 质控图方法简单，是衡量测定结果准确性、精密度的好方法，其评价方法和规则同生化检验。要求每天使用合格的质控物进行质量控制，当各项指标均在给定范围内时，再对标本进行检测。每8h 工作中应测定两个不同水平的质控物，发现失控及时查找原因，纠正后再次测定，并将此登记在册。

7．标本

标本要符合实验要求，检测前充分混匀。

8．仪器的堵孔现象

仪器的堵孔通常分为完全堵孔和不完全堵孔。完全堵孔时，血细胞不能通过微孔计数，也不显示结果，因此，完全堵孔较易判断。不完全堵孔主要通过下列方法判断①观察计数时间；②看示波器波形；③看计数指示灯闪动，如闪动无规律是不完全堵孔的表现，常导致计数结果偏低，应及时对仪器进行清洗，消除堵孔现象。

9．分析直方图和参数变化

检验结果各参数间的关系以及与临床资料进行相关分析确定是否需要标本复查、涂片镜检。浙江省临床检验中心《使用血液分析仪、尿分析仪检测结果应予复查和镜检的要求》规定如下：

1）有下列情况之一时，应进行镜下血细胞计数及血细胞形态观察：①白细胞计数成人<4．×10^9/L 或>10 ×10^9/L，儿童<5.0 ×10^9/L 或>12 ×10^9L，新生儿<15 ×10^9/L 或>20 ×10^9/L，化疗、放疗后患者<3.0 ×10^9/L；②仪器测定结果提示复查，或白细胞、红细胞、血小板直方图有异常的标本；③疑似或确诊为血液病患者，血液白细胞总数>100 ×10^9/L 时，应将患者的血标本增大稀释倍数后重新检测；④血红蛋白<70g/L、血小板计数<60 ×10^9/L，直方图提示有小红细胞干扰，疑有有核红细胞或巨大血小板者。

2）使用各类血液细胞分析仪时血涂片镜检要求如下：二分群仪器要求100％镜检复查；三分群仪器要求40％镜检复查；用五分类仪器，有以下情况时应作血涂片染色镜检分类：①白细胞、红细胞、血小板3 项中有1 项直方图出现异常，以及仪器上显示警告信号；②单核细胞>13％或嗜酸性粒细胞>8％或嗜碱性粒细胞>2％；③血液病血标本或临床医师指定要求涂片镜检分类计数者。

3）红细胞计数及血红蛋白测定有下列情况之一者应予复查：①红细胞总数<2.0 ×10^{12}/L 或>6.0 ×10^{12}/L，血红蛋白<70g/L 或>180g/L（新生儿低于70g/L 或高于200g/L）；②伴冷凝集素综合征（如支原体肺炎、肝硬化等）患者，检测时可造成红细胞总数降低及红细胞平均容积（MCV）增大的假象，应将标本在37℃水浴加温10min 后再测定；③细胞直方图异常或红细胞总数与血红蛋白含量明显不成比例者；④高脂血症和高胆红素血症患者标本，除仪器复查外，必要时向临床医师说明情况。

4）血小板计数有下列情况之一者，应进行镜检计数或复查：①血标本采集后1.5h 内测定时总数<60 ×10^9L 或>300 ×10^9/L；②血小板直方图异常、无拟合曲线的标本，疑有红细胞碎片或小红细胞的干扰，或有巨大血小板时；③其他特殊情况或临床要求镜检计数者。

二、显微镜细胞计数的质量控制

1．细胞计数池、盖玻片的质量要求

细胞计数池深度可用千分卡尺法测定，误差应＜±2％，计数室面积可用测微计测定，每大格边长误差应＜±1％。盖玻片应用血细胞计数专用盖玻片（24mm×20mm×0.6mm），误差≤±1％。高倍镜检查无裂隙，两面光学平面误差应＜±0.002mm。

2．标本检测时影响因素的控制

①标本稀释：准确稀释，充分混匀并放置15min后进行充液计数。②充液：WHO推荐采用“推式”盖片法以保证计数板与盖片之间空隙为0.1mm，然后用低倍镜检查计数池的清洁度。使用滴棒充人混合均匀的样品时，应一次完成，量不可过多或过少，要使其充分沉淀再计数，白细胞和红细胞计数一般需沉淀2～5min，血小板计数应沉淀10～15min，室温高时应注意保持计数池周围的湿度（置湿盒中），以免水分蒸发影响计数结果。③计数：对压线细胞，按数上不数下、数左不数右的原则，避免重复计数。

3．可信限的估计

细胞计数标准差s及细胞计数的变异系数CV（%）的计算公式分别为：

$$s=n^{1/2},\ CV\ (\%)=\frac{n^{1/2}}{n}\times 100\%,\ 95\%\text{的可信限}=\text{计数值}\pm 2s$$

式中n为计数区域内所有细胞数的总和。

三、血红蛋白测定的质量控制

血红蛋白测定参考方法为氰化高铁血红蛋白（HiCN）法，其试剂和操作步骤有严格的规定，具体参阅本篇第一章。为使其规范化和标准化，所用仪器等均应进行质量控制。

1．量器的质量要求

5ml吸管允许误差≤±2.5％，微量吸管允许误差≤±1％。

2．分光光度计质量控制

（1）波长校准：HiCN最大吸收峰是540nm，可用于仪器的波长校正。方法：将HiCN标准液放人待测光度计中，从500～580nm分几个波段测其吸光度值。如最大吸收峰在540nm，证明仪器波长准确，否则调试仪器的有关部分。

（2）线性测定：用浓度分别为50、100、150、200g/L的HiCN标准液进行测定，在200g/L范围内，仪器应能保持良好的线性，重复性试验CV应不超过2％。

（3）杂光测定：HiCN最大吸收峰是540nm，而吸收光谱的波谷是504nm，这是血红蛋白测定在一定范围内灵敏度最低的波长，人为地调整比色计的杂光，可使HiCN吸收

光谱的Q 值减低，反之观察HiCN 在待检仪器的Q 值，可了解仪器杂光程度。方法：将HiCN 标准液放入待测光度计中，读取540nm 波长与504nm 波长时的吸光度值，计算Q 值（Q =540nm 处吸光度值/504nm 处吸光度值）。仪器允许的Q 值变动范围为1.59 ～1.63 。

4）灵敏度测定：HiCN 法测定仪器要求灵敏度较高，并非所有仪器均能达到，因此，使用的分光光度计必须经过“浓度换算”求出校正系数（K 值），用K 值乘以被测标本吸光度值即可直接得出血红蛋白含量。方法：将HiCN 校准液（分50g/L 、100g/L 、150g/L 、200g/L 4 种浓度）分别在待测仪器上比色，然后根据下式计算K 值。

$$K=\frac{\Sigma \text{HiCN 校准液浓度}}{\Sigma \text{吸光度值（测定值）}}=\frac{50+100+150+200}{\text{4 种浓度（HiCN 校准液）吸光度值之和}}$$

5）比色杯：比色杯厚度为1cm ，误差应＜0.005cm 。不符合标准的比色杯应予淘汰。方法：将2mg/L 伊文蓝水溶液放人所有待测比色杯内，用一比色杯作标准，将仪器读数准确调到50 %T （透光度），当其他比色杯逐一与标准杯比较读数时，应反复交替测定标准杯与待测杯的透光度，尽量减少仪器漂移的影响，透光度在（50 %±0.5 %）T 以内为合格。

3．操作时质量控制

标本稀释时血液与试剂要混匀，转化时间要充分，标准曲线要定期绘制。

4．室内质控

每天做室内质控并标人质控图，发现问题及时查找原因，采取相应对策，以保证测定的准确性。

四、血液（或骨髓）涂片分类计数的质量控制

1）一般选血膜体尾交界染色好、细胞丰富而无重叠的区域，用油镜计数100 ～200 个白细胞。

2）分类计数时应注意白细胞、红细胞、血小板的形态是否异常，特别注意片尾及两侧有无其他异常细胞和血液寄生虫，必要时根据临床要求，作形态学描述或诊断。

3）细胞分类计数可信限：在白细胞分类中，中性粒细胞和淋巴细胞所占比例较大，呈正态分布。白细胞分类的可信限取分类值±2s ，其中

$$s=[Q(1-Q)/n]^{1/2}$$

式中Q 为白细胞分类百分比，n 为分类所计数的细胞数（一般为100）。

从上式可见，分类计数细胞越多，结果的精确性越高。此公式也可用于计算网织红细胞计数的95 %可信限。

五、止凝血功能检测的质量控制

1．方法学

2000 年卫生部文件规定：停止使用Duke 法作出血时间测定，停止使用玻片法和毛细吸管法作凝血时间测定，并规定了替代项目，具体见本篇第三章。

2．试剂

1） 提倡使用与仪器配套的试剂，非配套试剂须与配套试剂检测结果一致方能采用。凝血酶原时间测定试剂必须标有ISI 值，同时，应区别适用于仪器或手工操作，不同仪器和不同ISI 值的试剂不能混用。

2） 冻干试剂复溶液应按说明书要求或使用pH7.2～7.3 的无氨去离子水。

3） 试剂调换批号时应作对照试验，检测合格后方能使用。

4） 为使检测结果具可比性，要求使用标准品或参比血浆。

3．仪器与容器

1） 仪器安装或维修后须经校正、鉴定合格后方能使用。

2） 提倡使用一次性塑料与玻璃制品。手工法凝血酶原时间测定采用8mm 口径玻璃试管，普通试管法全血凝固时间测定时，采用8mm 口径玻璃试管。

3） 手工法操作要求水浴箱温度保持在（37±1）℃，试管浸入水中的长度不能少于3cm。

4．实验操作的质量控制

1） 室内质量控制：每日工作前用质控物进行检测，测定值在允许范围方可开始工作，超出允许范围时可采取更换质控品—更换试剂—厂商维修等一系列措施。仪器法每8h 工作或改变试剂时，都应同时用正常和异常对照血浆（质控品）进行核对，手工法在作患者标本检测以及更换试剂前也应同时用正常和异常对照血浆检查有无失控，每日质控结果标人L—J 质控图，CV 应小于5%。

2） 建议对脂浊、溶血及高胆红素标本采用手工法或机械式凝血仪进行检测。

3） 仪器法检测时，应按仪器、试剂说明书要求操作；手工法凝血酶原时间测定和试管法全血凝固时间测定观察结果时，倾斜试管动作要轻，角度要小。凝血酶原时间测定标本置于37℃水浴箱中不能超过10min。每一标本应做双管，两管结果误差＜5%，超出时应做第3 管。每批实验必须有正常对照。

5．报告方式的标准化

1） 凝血酶原时间测定结果以秒（s）报告，同时以凝血酶原时间比值（PTR）报告国际标准化比值（INR）。

(4) 活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间测定结果也以秒 (s) 报告，同时报告与正常标本测定结果的比值。

第三节　分析后的质量控制

标本检测后，应认真审查检验报告单 (姓名、床号、检验项目、编号是否一致、计算有否错误等)，查看各项参数与临床诊断是否相符，有怀疑时复查标本，审查者签字后再发送。同时将复查结果登记在册。各种测定结果均应采用国家规定的法定计量单位。要定期听取临床反馈意见，及时纠正引起实验偏差的潜在因素。

第四节　实验室间质量评价

一、方法

(一) 血液学检验室间质评

各级组织对室间质评的方法有所不同，大致可分为偏差指数法、改良偏差指数法和偏差%法等，其中WHO和ICSH采用偏差指数法，目前我国卫生部临床检验中心采用偏差%法。计算公式如下：

$$\text{偏差 (\%)} = \frac{(X-T)}{T} \times 100\%$$

式中X为参加室间质评单位测定值，T为靶值 (参加实验室加权均值)。

此公式也适用于凝血检验室间质评。

允许范围：白细胞：靶值±15%，红细胞：靶值±6%，血红蛋白：靶值±7%，血细胞比容：靶值±6%，血小板：靶值±25%，平均红细胞体积：靶值±7%，平均红细胞血红蛋白含量：靶值±7%，平均红细胞血红蛋白浓度：靶值±7%。

每一项目每一批号测定结果在允许范围内时，测定结果合格，得分为100%；超出允许范围为不合格，得分为0。

(二) 细胞形态学检验室间质评

1．卫生部临床检验中心组织的细胞形态学检验室间质评

用已确诊的血液或骨髓细胞彩图以识别单个细胞为主要内容进行室间质评，反馈结

果时告知参考答案及中靶与否，要求参加者核对和校正自己的实验结果，进一步提高诊断水平。

2．浙江省临床检验中心组织的骨髓涂片检验室间质评

用已确诊的骨髓涂片，附简单的临床资料、实验室检查结果，个别难度较大的附细胞化学染色，要求参控实验室作出以下判断：①有核细胞增生程度、粒红比值；②细胞形态学分类；③主要类型或特征性细胞描述；④结合病史、体征等提出综合性诊断意见。浙江省临床检验中心根据各实验室报告结果与确诊结果对照评价。采用百分制评价法，具体方法如下。

涂片室间质评内容和所占分值：

1）有核细胞增生程度、粒红比值：2 分。

2）细胞形态学分类，包括粒细胞系、红细胞系与淋巴细胞系等细胞的百分比，巨核细胞数量、各期细胞所占比例，产血小板功能：10 分。

3）细胞形态学描述：8 分。

4）综合性诊断意见：80 分。

具体得分标准：

1）有核细胞增生程度、粒红比值：基本符合得2 分，否则酌情扣分；

2）各系统各阶段细胞所占百分比：根据参考实验室和回报结果中诊断完全符合的报告统计出主要类型细胞比例及允许范围，看报告单诊断意见和有关比值与国内外诊断标准是否相符，巨核细胞数量与所占比例、功能报告是否基本符合。报告基本符合者得10 分，否则酌情扣分。

3）细胞形态学描述：尤其对特征细胞如白血病细胞、恶性组织细胞、骨髓转移癌和骨髓增生异常综合征（MDS）时的细胞形态学异常改变或贫血时红细胞形态等描述大致符合时得8 分，否则酌情扣分。

4）综合性诊断意见应为：①诊断意见完全符合者得80 分；②白血病骨髓象仅报急性淋巴细胞白血病或急性非淋巴细胞白血病、未分型（仅报白血病），急性淋巴细胞白血病误报急性非淋巴细胞性白血病得60 分；③急性白血病报慢性白血病得50 分；④M_3 报M_5 得70 分，M_1、M_2 报M_4 得75 分；⑤贫血一定范围正确，如报增生性贫血（含溶血性贫血、缺铁性贫血）等得60 分；⑥少见类型白血病或病变累及骨髓的恶性病误报良性或漏检者不得分；⑦MDS：亚型不符，与靶值相差一档（如RA 误报RAEB）得75 分，与靶值相差二档（如RA 误报RAEB－T）得70 分；MDS 误报其他贫血得40 分，MDS 误报正常骨髓象不得分（或为失控）。

㈢ 凝血检验室间质评

国家卫生部临床检验中心与浙江省临床检验中心组织的凝血检验室间质评采用偏差%法，公式见血液学检验检验偏差%法。

允许范围：凝血酶原时间（PT）：靶值±15%，国际标准化比值（INR）：靶值±20%；活化部分凝血活酶时间（APTT）：靶值±15%，纤维蛋白原：靶值±20%。

二、注意事项

1）目前血细胞质控品的稳定性不够理想，接到标本后应在规定时限内完成检测。测定前将标本从4℃冰箱取出，恢复至室温后充分混匀再检测。

2）所用仪器、试剂及其他器皿、操作人员均应保持在最佳工作状态。

3）每个样品可测3～5次，所得结果经统计学处理后，舍去±2s以外数值，再作统计，取平均值报告。

4）填写质控回报字迹须工整，小数点应清晰，采用法定计量单位，同时填写资料要全面。由检验科主任审核签名后及时将结果回报检验中心。当评价结果返回实验室后，应仔细核对与参考值之间的差异。差异较大时，应查找原因，及时纠正。

第三篇

体液、排泄物及脱落细胞学检验

第一章　尿液检验

第一节　标本采集及一般性状检查

一、尿液的形成

泌尿系统包括肾脏、输尿管、膀胱和尿道。肾脏是尿液形成的器官，其余部分则是排尿的通道，俗称尿路。

尿液的形成有赖于肾脏的基本功能单位即肾单位，包括肾小球和肾小管。血液流经肾小动脉时，其中的细胞、大分子蛋白质和脂质等胶体被截留，水和低分子溶解物从肾小球滤出，称原尿。原尿经过肾小管重吸收后，绝大部分的水、电解质和葡萄糖等物质又被重新吸收回血循环，同时肾小管分泌一些物质加入其中，形成终尿。终尿通过尿路排出体外，即为尿液。

正常尿液含水分约96％～97％，固体物仅占3％～4％。每天从尿中排出的总固体约60g，其中无机盐约25g，有机物约35g。有机物中主要是尿素，其次是少量的糖类、蛋白质以及种类繁多的代谢产物。

尿液是人体的主要排泄物之一，尿中排出的代谢产物及异常物质不仅可作为泌尿系统本身疾患的指标，而且是间接了解其他脏器功能状况的指标。另外，还用于安全用药的监控以及职业病的辅助诊断。因此，尿液检验对某些疾病的诊断、治疗、预后判断具有重要意义。

二、标本采集

为了获得准确、客观的尿液检验结果，标本的采集必须规范。尿液常规检验通常以新鲜晨尿为宜，但门诊患者可以随机留尿；尿胆原检测以14：00～16：00时间段内留取的尿液为好。尿液定量检查需要留取12h或24h的混合尿液，留取时应将规定时间内排出之尿液装人含有合适防腐剂的洁净容器内，混匀后记录总量，取100～200ml送检。

常用的防腐剂有甲醛（0.2～0.5ml/100ml尿液）、甲苯（0.5～2.0ml/100ml尿液）

和麝香草酚（0.1g/100ml 尿液）。甲醛防腐有利于细胞、管型等有形成分的保存，但对蛋白、糖等化学成分的测定有干扰；甲苯虽有利于化学成分的测定，但防腐能力较弱；麝香草酚可防止尿液有形成分的分解，用于检查尿中化学成分及镜检细菌的防腐。

冰箱保存是较好的尿液保存方法之一，对于不能立即检查的尿液标本，在冰箱内一般可保存6～8h。但应注意，有些成分如尿酸盐在低温时会沉淀析出，影响其化学成分的测定；同时，碱性尿液中的红细胞以及细胞管型即使在冰箱中也会破坏。因此，要根据检测项目的需要，选择不同的防腐及保存方法。

尿液标本采集应使用洁净带盖的一次性容器，避免经血、白带、精液、粪便混入。标本留取后应及时送检，以免细菌繁殖和细胞溶解。

各种尿液标本的特点及适用范围如下：

（1）晨尿：通常是指采集的标本为清晨第1 次尿液。因机体处于夜间睡眠状态时，尿液倾向于浓缩和酸化，不受运动及进餐等影响。适用于尿蛋白、尿沉渣、尿亚硝酸盐检验及尿液细菌培养。

（2）随机尿：适用于门、急诊患者，但尿液可能被稀释或受进餐、药物以及新陈代谢等影响，尿中成分检出情况不尽相同。餐后尿检测易出现糖尿。

（3）清洁尿（即中段尿、导尿或膀胱穿刺尿）：按无菌要求采集的尿液，适用于细菌培养。

（4）12h 尿：适用于Addis 计数。试验当日清晨起，除正常饮食外，不得再饮水，以利尿液浓缩。于晚上留尿开始时，嘱咐患者排尽尿液并弃去，收集此后12h 内的全部尿液。

（5）24h 尿：适用于代谢产物24h 定量测定或24h 尿沉渣抗酸杆菌检查。留取要求同12h 尿。

三、一般性状检查

尿液一般性状包括颜色、透明度和尿量。

1．颜色

尿液颜色取决于尿色素如尿黄素、尿红素以及尿胆原、卟啉等的含量。尿色素由肾脏产生，且排泄量恒定，所以尿液颜色深浅基本上与尿液比重平行。

正常尿液为淡黄色。大量饮水后尿量增多时，由于尿液稀释，其颜色偏淡或趋于无色；少尿或尿液浓缩时，则可呈深黄色或浓茶色，但某些药物及食物可影响尿液颜色。如果尿量偏少而颜色很淡，常提示肾脏功能不良。

病理状况下，尿液颜色可呈褐黄色、红色、乳白色等改变。尿色淡如水者见于稀释尿或尿崩症、肾萎缩、多囊肾和糖尿病；尿色深黄而带绿褐色者见于胆红素尿；淡红、

红褐色且浑者见于血尿；酱油色而透明者见于血红蛋白尿、肌红蛋白尿和卟啉尿；乳白色见于乳糜尿、脓尿、脂肪尿及大量盐类（如磷酸盐、尿酸盐、碳酸盐等）结晶尿。

2．透明度

尿液透明度一般分为透明、微浊、浑浊、明显浑浊和乳糜状等。

正常尿液清晰、透明，放置后可见云雾状浑浊或微量絮状沉淀，女性尿液更为明显。尿液中含有较多无机盐类结晶、药物、红细胞、白细胞、脓细胞、管型、脂肪等时，尿液浊度可发生改变。

浑浊尿液经加温变透明者为尿酸盐结晶引起；一般盐类引起浑浊者经过滤可滤去，不能滤去者可能为细菌尿、脂肪尿或乳糜尿；浑浊尿加3％醋酸溶液而变清者为磷酸盐结晶，如同时发生大量气泡，则为碳酸盐结晶；浑浊尿加10％盐酸溶液可使磷酸盐及草酸盐溶解，从而尿液变澄清；浑浊尿加10％氢氧化钠溶液后，尿液呈凝胶状者为脓尿；乳白色浑浊尿液加乙醇、乙醚，经振荡混合，离心沉淀，尿液呈透明者为脂肪尿或乳糜尿。

3．尿量

尿量的多少取决于机体摄人水量及其他途径排出水量。但就肾脏而言，尿量的多少取决于肾小球的滤过率及肾小管的重吸收能力。

健康成人每日尿液排出量约为1.0～1.5L（小儿按3～4ml·h^{-1}·kg^{-1}体重计算），如果每日尿液排出量多于2.5L 视为多尿，而少于0.4L 则视为少尿。如果每日尿液排出量少于0.1L 时称为无尿或尿闭。

病理性多尿常见于精神神经疾患、内分泌和代谢性疾病、肾脏疾病等。病理性少尿常见于肾前性、肾性或肾后性疾病等。病理性尿闭常见于尿路梗阻、极严重的坏死性肾乳头炎、失代偿期肾脏病变、急性肾炎、急性肾功能衰竭、急性血管内溶血。

四、渗透浓度测定

尿液渗透浓度是反映尿中具有渗透活性粒子数量的一种指标，与粒子大小及电荷无关，受分子量大的蛋白质影响小，因此是评价肾脏浓缩功能较理想的指标。

溶液中有效粒子的数量用溶液沸点上升或冰点下降的温度变化（△T）来表示。在理想条件下，1mol 的不离解溶质（如蔗糖）溶于1L 纯水中，产生一个重量摩尔浓度，含有6.023×10^{23}粒子数。与纯水相比，此溶液的沸点上升0.520℃，冰点下降1.858℃。也就是说，1 个渗透重量摩尔浓度溶质可使1L 水的冰点下降1.858℃。

尿液渗透浓度检查通常采用冰点渗透压计，其工作原理是根据溶液的结冰曲线，通过比例运算放大直接显示渗透浓度的数据。由于体液中的渗透浓度较低，一般用毫渗透浓度（mmol/L）表示。

测定尿液渗透浓度时一般同时测定血浆渗透浓度，测定血浆渗透浓度必须用肝素抗凝。正常人禁水12h 后尿液渗透浓度＞800mmol/L，若低于此值时，表示肾脏浓缩功能不全。正常人禁水12h 后，尿液渗透浓度与血浆渗透浓度之比＞3。

急性肾小管功能障碍时，尿液渗透浓度与血浆渗透浓度之比＜1.2，且尿液钠离子浓度＞20mmol/L。

第二节　干式化学分析

尿液干式化学（或称干化学）分析是将尿液标本直接加到干燥试剂垫上，以标本中水为反应介质，引起特定化学反应的方法。尿液干化学分析是尿液检验自动化进程的重要部分。其操作简单、快速，是目前国内普及的尿液分析过筛手段。

尿液干化学分析仪采用反射光度法原理，在微电脑控制下，利用球面积分仪检测双波长条件下试带上的颜色变化。试带上含有数个检测各种项目的试剂垫，各自与尿液中相对应的成分反应，显示不同的颜色，在光源照射下，其反射光被球面积分仪接收。当球面积分仪光电管被反射的双波长光照射时，光信号转化为电讯号，电讯号传送至模拟数字转换器被转换成数字信号，经微处理器处理而显示结果。各波长的比例由检测项目决定。尿液中某种成分含量越高，其相应试剂垫的反射光越弱；否则越强。反射率的计算公式如下：

$$R\ (\%) = T_m \cdot C_s / (T_s \cdot C_m) \times 100\%$$

式中R（%）为反射率；T_m 为试剂垫对测定波长的反射强度；C_8 为标准垫对参考波长的反射强度；T_8 为试剂垫对参考波长的反射强度；C_m 为标准垫对测定波长的反射强度。

尿液干化学分析项目包括葡萄糖、胆红素、酮体、pH 值、相对密度、蛋白质、尿胆原、亚硝酸盐、红细胞、白细胞和维生素C。

一、葡萄糖

【原理】

采用葡萄糖氧化酶法原理。在有氧条件下，葡萄糖被葡萄糖氧化酶氧化成葡萄糖醛酸和过氧化氢，后者在过氧化物酶的催化下释放出初生态氧，使色原邻甲联苯胺（或碘化钾）呈现不同的颜色变化，其颜色深浅与尿液中葡萄糖含量有关。

本法检测范围为微量（±）约5.6mmol/L；弱阳性（+）约13.8mmol/L；阳性（++）约27.8mmol/L；强阳性（+++）约55.5mmol/L；最强阳性（++++）约111mmol/L。

【注意事项】

1）尿液干化学分析检测葡萄糖有氧化酶法和铜还原法两种。前者为葡萄糖特异性试验，检测敏感度在4～7mmol/L；后者尚受其他还原物质的影响，其敏感性也较低，约为11mmol/L。

2）维生素C能干扰低浓度（4mmol/L）的尿液葡萄糖测定，使检测结果呈假阴性。可将尿液煮沸数分钟以排除维生素C的干扰。其他药物如阿司匹林、左旋多巴等也可导致假阴性的检测结果。酮体能降低葡萄糖检测的敏感度或使检测结果呈假阴性。另外，相对密度高、低PH值的尿液标本也可呈假阴性结果。

3）干化学葡萄糖氧化酶法和班氏法对尿液葡萄糖检测的灵敏度和特异性有所不同，检测结果的报告方式也不同，两者都仅是一般的半定量过筛试验。因此，对于糖尿病患者最好采用葡萄糖定量试验。

【参考值】

正常人肾糖阈为9～10mmol/L，一般情况下血糖浓度比较恒定，空腹时为4.44～6.00mmol/L，进食后为8.88～9.99mmol/L。经肾小球滤过的葡萄糖几乎全部由肾小管重吸收，仅有极其微量的葡萄糖随尿液排出，一般定性试验为阴性。

【临床意义】

尿中是否会出现葡萄糖取决于血糖浓度和肾糖阈。因此，尿糖检查不仅是诊断糖尿病的重要依据，也是指导临床胰岛素用量的依据之一。但如果并发肾小球硬化症，则肾小球滤过减少，肾糖阈升高，此时血糖虽超过一般的肾糖阈值，但尿糖却表现为阴性，应予注意。

1．生理性糖尿

生理性糖尿包括饮食性糖尿、应激性糖尿和妊娠性糖尿，呈一过性，当去除生理因素后即可恢复正常。

2．病理性糖尿

病理性糖尿分原发性真性糖尿和继发性高血糖性糖尿。前者如糖尿病、肾性糖尿病；后者如甲状腺功能亢进、垂体功能亢进、嗜铬细胞瘤、胰岛α细胞瘤、库欣综合征、胰腺疾病、严重肝功能衰竭等。

二、胆红素

胆红素主要来源于衰老红细胞中血红蛋白的分解产物，人血液后结合在血浆白蛋白上运输，称间接胆红素，由于其为脂溶性，难溶于水而不能从肾脏排出。间接胆红素进入肝脏后，与葡萄糖醛酸结合成脂型葡萄糖醛酸苷，称直接胆红素。直接胆红素可溶于水，能从肾脏排出。因此，尿液胆红素检测仅反映直接胆红素水平，而与间接胆红素无

关。

【原理】

多数采用重氮反应法原理。在强酸介质中，胆红素与重氮化的双氯苯胺偶联，形成紫红色的重氮色素，其颜色深浅与尿中胆红素浓度有关。本法检测范围为弱阳性（+）约8.6 μmol/L；阳性（++）约17.1 μmol/L；强阳性（+++）约51.3 μmol/L。

【注意事项】

1）尿液胆红素检查有重氮法和氧化法两类。前者通常用于干化学分析，检测敏感度在7～14 μmol/L，低于三氯化铁氧化法（Harrison 法），并易受色素尿的干扰。

2）重氮试剂有2，4－二氯苯胺重氮盐和2，6－二氯苯重氮－四氟化硼酸盐。

3）尿液标本宜新鲜，避免阳光直射而使胆红素转变成胆绿素导致检测结果呈假阴性。

4）高浓度维生素C 和亚硝酸盐可抑制偶氮反应，导致胆红素检测结果假阴性。吡啶、吲哚酸在低pH 值条件下可导致假阳性反应。水杨酸盐、阿司匹林也可使本试验结果呈假阳性。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液胆红素阳性见于阻塞性黄疸、肝细胞性黄疸、病毒性（或中毒性）肝炎、肝硬化以及其他肝病。

三、酮体

酮体是脂肪酸分解代谢过程中的产物，包括乙酰乙酸、丙酮和β－羟丁酸。脂肪酸经过一系列β氧化后产生乙酰辅酶A，在肝脏内两分子乙酰辅酶A 可缩合成乙酸乙酸，后者可以被还原成β－羟丁酸或脱羧成丙酮。

【原理】

在碱性条件下，亚硝基铁氰化钠与尿液中乙酰乙酸作用，产生紫色反应，其颜色深浅与酮体含量有关。本法检测范围为微量（±）约0.9 mmol/L；弱阳性（+）约1.7 mmol/L；阳性（++）约8.6 mmol/L；强阳性（+++）约17.2 mmol/L。

【注意事项】

1）本法仅检测尿液中的乙酰乙酸，不与丙酮或β－羟丁酸反应，故与传统的化学法结果略有差异。检测敏感度为0.5～1.0 mmol/L。

2）不同病因引起的酮症，其酮体成分有所不同。在糖尿病酮症酸中毒早期患者中，主要酮体形式是β－羟丁酸，乙酰乙酸很少或缺乏。因此，干化学分析可出现假阴

性结果或对总酮体量的估计不足。相反，在糖尿病酮症酸中毒症状缓解之后，乙酰乙酸含量反而比初始急性期增高。

3）乙酰乙酸受热易分解成丙酮，故尿液标本宜及时送检。

4）尿液含有大量色素或大量左旋多巴代谢产物时，可导致假阳性结果。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿酮体阳性见于糖尿病酮症酸中毒、饥饿、剧烈运动、营养不良等。

四、相对密度

【原理】

高分子电解质共聚体的解离常数（pKa）随尿液离子浓度而变化，离子浓度越高，其酸性基团（H^+）解离越多，H^+可与酸碱指示剂反应，通过溴麝香草酚蓝的颜色改变，显示尿液的相对密度值。尿液中离子浓度较低时，呈蓝绿色，离子浓度升高则转向黄绿色。

【注意事项】

1）电解质共聚体有多聚甲乙烯酸马来酐和甲氧乙烯顺丁烯二酸两种，后者更为常用。本法检测范围从1.005 开始，每隔0.005 递增，至1.030 止，低于前者或超过后者，报告“≤1.005”或“≥1.030”。

2）干化学分析测定尿液相对密度不受葡萄糖含量的影响，但对尿中蛋白质较敏感。尿中蛋白质含量每增加1％，则尿液相对密度增加0.003。另外，X 线造影剂可使含防腐剂的尿液相对密度增加到1.050。

3）本法受尿液pH 值的影响较大，当pH ≥6.5 时，应在测定结果上增加0.005 作为因尿液pH 值影响的补偿。

4）干化学分析尿液相对密度检测范围为1.005～1.030，新生儿尿液相对密度在1.002～1.04 之间。

5）由于本法检测结果的数据间隔较大，对尿液相对密度过高或过低的标本检测不够敏感，因此，仅限于筛选试验。本法的参比方法为折射仪法。

【参考值】

正常人尿液相对密度主要受尿液中所含氯化钠和尿素的影响。通常饮食条件下，尿液相对密度波动在1.015～1.025 之间。

【临床意义】

病理状态下，尿液相对密度随尿液中所含的溶质成分而改变。因此，尿液相对密度

检测是了解肾脏浓缩功能的一项简易指标。

尿液相对密度增高见于急性肾炎、糖尿病、蛋白尿、高热等。尿液相对密度降低见于慢性肾炎、尿崩症、原发性醛固酮增多症及肾功能不全多尿期。慢性尿崩症时，由于尿量极大，尿液外观如水，相对密度极低，几乎等于1。

尿液相对密度连续测定较一次测定更有价值，慢性肾功能不全患者可呈现持续性低相对密度尿。

五、pH 值

【原理】

将甲基红（pH4.6～6.2）和溴麝香草酚蓝（pH6.0～7.6）适量配合，组成复合型指示剂，呈色范围为pH4.5～9.0（橘黄色～蓝色），其颜色变化与尿液pH 值有关。本法检测范围限于pH5～9，每隔0.5 单位递增。

【注意事项】

1）尿液pH 值主要取决于尿中磷酸氢二钠和磷酸二氢钠的相对含量，并因饮食情况而异。每当进食后，由于胃黏膜分泌大量盐酸以助消化，此时尿液pH 值显一过性增高。夜间入睡后，由于呼吸变慢呈轻微的酸中毒，故尿液pH 值较低。

2）标本不宜久置，以免细菌分解尿液成分，使pH 值发生改变。

3）试带浸蘸尿液时间不宜过长，上机检测前应将残留尿液吸净，以免邻近试剂垫酸碱缓冲液渗入到pH 反应区而影响pH 值的检测。

4）可利用尿液pH 值测定，对尿蛋白、尿相对密度等易受pH 值影响的干化学分析加以监控。

【参考值】

4.6～7.4。进食肉类及蛋白质多者呈弱酸性，进食植物性食物多者呈碱性。

【临床意义】

酸性尿见于尿路结核、代谢性酸中毒、糖尿病酮症酸中毒和服用氯化铵、氯化钙、稀盐酸及体内蛋白质分解增加（如饥饿）、痛风等。

碱性尿见于剧烈呕吐、碱中毒、肾功能不全、原发性醛固酮增多症、肾小管性酸中毒、尿路感染及服用碱性药物（如碳酸氢钠）等情况。

另外，尿液pH 值变化与尿结石的形成关系密切，应用尿液pH 值测定监测肾结石患者的尿液酸碱度变化可以指导临床用药。如尿酸和胱氨酸结石在酸性条件下容易形成，而磷酸钙结石在碱性条件下容易形成。

六、蛋白质

【原理】

根据pH 指示剂蛋白质误差原理而设计。尿液中蛋白质阳离子基团（白蛋白）与指示剂四溴酚蓝（或四氯酚四溴酚酞）阴离子基团结合，导致指示剂进一步电离，从而产生颜色变化，其颜色变化与尿液蛋白质含量有关。

本法检测范围为弱阳性（+）约0.3g/L；阳性（++）约1.0g/L；强阳性（+++）约3.0g/L；最强阳性（++++）约10.0g/L。

【注意事项】

1）干化学分析检测尿蛋白有3 类不同的方法，除指示剂蛋白质误差法外，还有Urine－TP 和Micral－Test 法。前者为类似考马斯亮蓝法，能同时检测白蛋白、球蛋白及本－周蛋白；后者虽采用层析扩散和免疫技术，也只能检测白蛋白。

2）本法检测球蛋白的敏感性仅为白蛋白的1/100～1/50，而磺基水杨酸法对白蛋白和球蛋白的敏感性基本一致。因此，NCCLS 推荐磺基水杨酸法作为干化学分析的参比方法。但必须注意，磺基水杨酸法易受尿中存在的某些盐类结晶的干扰。

3）干化学分析及其他化学法检测尿蛋白由于试剂组成不同，其检测敏感度也有较大差异。四溴酚蓝法为150～300mg/L，与加热乙酸法相当，但低于磺基水杨酸法（50～100mg/L），而四氯酚四溴酚酞法为60mg/L。干化学分析均不能检出本－周蛋白。

4）尿液pH 值变化对检测结果影响较大，特别是服用奎宁、奎尼丁和嘧啶等药物者的强碱性尿液会出现假阳性反应。此外，阿司匹林、青霉素、庆大霉素、氯丙嗪、灰黄霉素、干扰素、利福平、磺胺类、泼尼松、非激素消炎剂、造影剂等均可导致假阳性反应。

5）尿液标本如含有其他分泌物或较多细胞成分也可出现假阳性反应。

【参考值】

正常人终尿蛋白质含量很少，用于化学分析检测为阴性。

【临床意义】

正常人血浆内分子量＞69000u 的蛋白质极少从肾小球滤过，＜15000u 的蛋白质虽可自由地从肾小球滤过，但95％～96％被肾小管重吸收，故终尿中的蛋白质含量很少，仅为20～80mg/24h。

正常人尿液微量蛋白质依其相对分子质量的大小可分为3 类，即大分子量蛋白质（分子量＞90000u）、中分子量蛋白质（分子量40000～90000u）和小分子量蛋白质（分子量＜40000u）。大分子量蛋白质含量极微，包括从肾小管来的分泌型IgA 和Tamm－Horsfall 糖蛋白；中分子量蛋白质以白蛋白为主；小分子量蛋白质则包括免疫球蛋白的Fc 片段、微球蛋白、酶、激素和多肽。

1．生理性蛋白尿

生理性蛋白尿又称功能性蛋白尿，指泌尿系统并无器质性病变，尿液中暂时出现蛋

白质。由于剧烈运动、长时间直立、高温和受寒等因素，引起肾血管痉挛或充血，导致肾小球通透性增加而致。此种蛋白尿多为一过性。

2．病理性蛋白尿

病理性蛋白尿系指器质性病变导致尿液中持续出现蛋白质。可分为肾小球性蛋白尿、肾小管性蛋白尿、混合性蛋白尿和溢出性蛋白尿。

1）肾小球性蛋白尿：因炎症等因素导致肾小球毛细血管通透性增加，血浆蛋白大量滤出，超过肾小管重吸收能力引起蛋白尿。见于原发性与继发性肾小球疾病如肾淀粉样变、糖尿病肾病，急、慢性肾炎，肾病综合征等。

2）肾小管性蛋白尿：因炎症或中毒引起肾近曲小管对低分子量蛋白质的重吸收障碍，导致尿中出现蛋白质。见于间质性肾炎、肾盂肾炎、范可尼综合征、中毒性肾病及肾移植后的排异反应等。

3）混合性蛋白尿：肾脏病变同时累及肾小球和肾小管，使蛋白质滤出增加且重吸收减少引起蛋白尿。见于慢性肾炎、慢性肾功能不全、狼疮性肾炎、多发性骨髓瘤、糖尿病肾病等。

4）溢出性蛋白尿：肾脏正常，肾外疾病导致血循环中低分子量的蛋白质增多，使肾小球滤出增多，超出肾小管重吸收能力引起的蛋白尿。见于多发性骨髓瘤、原发性巨球蛋白血症、急性血管内溶血及单核细胞白血病等。

七、尿胆原

【原理】

采用Ehrlich 醛反应原理。尿胆原在酸性环境中与对二甲氨基苯甲醛反应，形成红色化合物，其颜色深浅与尿胆原含量有关。

【注意事项】

1）本法检测敏感度为3.0 μmol／L。除Ehrlich 醛法外，还可采用重氮法检测尿胆原：利用尿胆原在酸性环境中与4－甲氧基苯－重氮－四氟化硼酸盐反应，形成重氮色素，其颜色深浅与尿胆原含量有关。重氮法的敏感度为4 mg／L （约7 μmol／L）。

2）正常人每天尿胆原排出量波动较大，夜间和上午较少，午后14 :00 ～16 :00 时达最高峰，并与尿液pH 值成正比。

3）尿液标本宜新鲜，避免阳光照射使尿胆原氧化成尿胆素而呈假阴性反应。

4）磺胺类药物对本法有干扰，尿中含有甲醛可使结果呈假阴性反应。

【参考值】

尿胆原主要来自胆红素的分解。生理情况下经肠道细菌分解形成的胆素原族化合物，绝大部分随粪便排出，约有10 %～20 %进入肠肝循环，其中仅有极少部分进入体

循环后，随尿排出。故正常尿液中只含少量尿胆原（8～16 μmol/L）。

【临床意义】

尿胆原浓度增高见于溶血性及肝细胞性黄疸。阻塞性黄疸患者尿胆原试验呈阴性。

八、亚硝酸盐

【原理】

某些革兰阴性杆菌能将尿液中硝酸盐还原为亚硝酸盐，后者在酸性条件下与对氨基苯砷酸（或对氨基苯磺酰胺）结合，形成重氮化合物，重氮化合物与萘基乙二胺（或1，2，3，4－四氢苯喹啉－3－酚）偶联，产生粉红色重氮色素，其颜色变化与细菌数量无关，但阳性结果表明菌落计数>10^5/ml。

【注意事项】

1）本法仅可检出硝酸盐还原酶阳性的细菌，敏感度为0.6～1.0 mg/L 亚硝酸盐，检出率约80％。但尿液在膀胱内储留时间不足4h 或饮食中缺乏硝酸盐时，尽管尿液中存在硝酸盐还原酶阳性菌，检测结果仍可为阴性。

2）不同试剂组成，其检测敏感度也不相同，如对氨基苯磺酰胺和1，2，3，4－四氢苯喹啉－3－酚敏感度为5 mg/L 亚硝酸盐。

3）含维生素C 或相对密度高的尿液可呈假阴性。含色素尿检测结果可呈假阳性。

4）本法阴性不能排除硝酸盐还原酶阴性的其他细菌感染。但阳性结果则肯定是尿路感染，应进一步作细菌培养和药敏试验，以便确定有效的抗生素治疗。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液亚硝酸盐阳性见于肠杆菌科细菌引起的尿路感染如膀胱炎、肾盂肾炎等。

九、红细胞

【原理】

红细胞内血红蛋白含有亚铁血红素基团，具有过氧化物酶样活性，可催化过氧化氢释放初生态氧，使色原邻甲联苯胺（或四甲基联苯胺）呈蓝色反应，其颜色深浅与血红蛋白含量有关。

本法检测范围为弱阳性（+）5～10 个红细胞/μl；阳性（++）50 个红细胞/μl；强阳性（+++）250 个红细胞/μl。

【注意事项】

1）本法既可测定完整红细胞内的血红蛋白，又可测定破碎红细胞释放的游离血红

蛋白。因此，检测结果与镜检法可不一致，应综合分析判断。

(2) 不同试剂组成，其检测敏感度也不相同。四甲基联苯胺－二异丙苯－二氢过氧化酶检测敏感度为0.15～0.62mg/L 血红蛋白，相当于5～15 个完整红细胞/μl。四甲基联苯胺—2，5－二甲基—2，5－二氢过氧化乙烷检测敏感度为5 个红细胞/μl 或来自10 个红细胞/μl 的血红蛋白。

(3) 尿液中含有易热酶时可致假阳性结果，因此需将尿液煮沸后再进行检测。

(4) 尿液中含有大量维生素C 时，可出现假阴性反应。蛋白尿、相对密度高的尿液及亚硝酸盐均可导致假阳性结果。

(5) 本法与红细胞镜检法不完全相关，但当检测结果少于10 个红细胞/μl 时，可以省去显微镜检查。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

检测结果阳性具有两种含义，即血尿和血红蛋白尿。

血尿：见于肾结石、肾小球肾炎、肾结核、肾盂肾炎、膀胱炎、肿瘤、创伤、化学或药物中毒、剧烈运动。

血红蛋白尿：见于输血反应、溶血性贫血、严重烧伤、阵发性睡眠性血红蛋白尿(详见本章第三节尿液传统化学分析)。

十、白细胞

【原理】

采用粒细胞酯酶反应原理。尿中粒细胞特异性酯酶能水解吲哚酚酯，并与重氮盐偶联形成紫色缩合物，其颜色深浅与粒细胞数量有关。

【注意事项】

(1) 中性粒细胞内含有特异性能酶，而淋巴细胞、单核细胞无此酶。因此，尿中以淋巴细胞为主时的肾移植排异反应患者，可出现假阴性结果。

(2) 不同试剂组成，其检测敏感度和检出范围也不相同。如萘酚AS －D 氧化乙酸、重氮盐法和吡咯氨基酸酯、重氮盐法的检测范围为微量 (±) 约15 个白细胞/μl；弱阳性 (+) 约70 个白细胞/μl；阳性 (++) 约125 个白细胞/μl；强阳性 (+++) 约500 个白细胞/μl。而吲哚酚羧基酚酯、重氮盐法检测范围如下：弱阳性 (+) 约25 个白细胞/μl；阳性 (++) 约100 个白细胞/μl；强阳性 (+++) 约500 个白细胞/μl。萘酚AS －D 氧化乙酸、2－氯—4－苯甲酰胺—5－甲基、苯基氯化重氮苯法检测范围为弱阳性 (+) 约25 个白细胞/ul；阳性 (++) 约75 个白细胞/μl；强阳性 (+++)

约500 个白细胞/μl。

3） 使用甲醛、呋喃可致假阳性反应，使用庆大霉素、先锋霉素V 可致假阴性反应。

4） 蛋白尿、糖尿、高相对密度尿均可导致假阴性反应或使阳性结果减弱。

【参考值】

正常人尿液通常为阴性。测定结果为“±”时其临床意义有时可疑，但多次出现“±”结果则提示可能有问题。阳性结果偶见于一些被阴道分泌物污染的随机尿标本。

【临床意义】

尿液白细胞阳性见于尿路感染如尿道炎、膀胱炎、肾盂肾炎以及肾结核、肾肿瘤并发感染等。

十一、维生素C

【原理】

维生素C （即抗坏血酸）具有1，2－烯二醇还原性基团，在酸性条件下能将2，6－二氯靛酚还原成为2，6－二氯二对酚胺，颜色由粉红色转变成无色，其颜色变化与维生素C 含量有关。

本法检测范围为弱阳性（+）0.56mmol/L（100mg/L）；阳性（++）1.40mmol/L（250mg/L）；强阳性（+++）2.80mmol/L（500mg/L）。

【注意事项】

1） 本法只能测定尿中还原型抗坏血酸，而不能测定氧化型抗坏血酸，其检测敏感度为0.6mmol/L（100mg/L）。

2） 由于干化学分析测定葡萄糖、胆红素、红细胞均受尿中维生素C 含量的影响，因此，通过尿液维生素C 含量的检测，可以估计其对以上试验的影响程度，有利于质量控制。

3） 影响干化学分析各项目检测的维生素C 含量临界值：胆红素测定为250mg/L，红细胞测定为400mg/L，葡萄糖测定为500mg/L。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

正常人尿液维生素C 排出量约为进食量的1/2（13.6～170.4μmol/L）。维生素C 排出量增高见于食用富含维生素C 的食物或使用维生素C 后。因此，尿液干化学分析检查前3天最好禁用维生素C 药物。

第三节　传统化学分析

一、糖类测定

(一) 葡萄糖定性试验 (班氏法)

[原理]

葡萄糖醛基在碱性环境中加热能使二价硫酸铜还原为一价氧化亚铜，出现黄至砖红色沉淀物。

[试剂]

取硫酸铜17.3g，于200ml 蒸馏水中研磨助溶；另取热蒸馏水700ml，加枸橼酸钠170g、无水碳酸钠100g，用玻棒搅拌溶解，待冷却后将硫酸铜溶液慢慢加入，随加随搅，最后用蒸馏水稀释至1L。

[操作]

取试剂1ml 于试管中加热至沸，若不变色，则可加入尿液0.1ml，继续煮沸1～2min，冷却后观察结果。

[结果判断]

阴性 (-)：试剂不变色；微量 (±)：冷却后呈绿色，但无沉淀，含糖量小于6mmol/L；弱阳性 (+)：呈黄绿色浑浊，含糖量约6～28mmol/L；阳性 (++)：煮沸1min 即呈黄绿色沉淀，含糖约28～55mmol/L；强阳性 (+++)：煮沸15s 即呈土黄色沉淀，含糖约55～110mmol/L；最强阳性 (++++)：煮沸时即呈多量砖红色，浑浊并迅速沉淀，含糖量大于110mmol/L。

[注意事项]

1) 配制试剂时硫酸铜应避免与碳酸钠一起溶解。而且应该将硫酸铜溶液慢慢加入已冷却的碳酸钠与枸橼酸钠混合溶液中，不能相反。

2) 加热煮沸时，管口应向外，以免试剂煮沸溢出伤人。

3) 尿中含有盐类结晶时，可干扰尿糖试验。如尿酸盐具有微弱的还原作用，含量大时，应将尿液置于冰箱，待盐类析出后取上清液再测。

4) 尿中含有大量的铵盐会妨碍硫酸铜沉淀发生，应预先加过量的碱并煮沸数分钟，以逸出其中的氨。

5) 使用链霉素、维生素C、水合氯醛、葡萄糖醛酸化合物等还原性药物时，检测结

果可呈假阳性反应，使用大黄、黄连、黄芩等中药时检测结果可呈假阴性反应。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

同尿液干化学分析。

(二) 葡萄糖定量试验

参见第四篇生物化学检验第一章糖类测定。

(三) 粘多糖定性试验 (甲苯胺蓝法)

【原理】

在酸性条件下，粘多糖分子的酸性基团吸引甲苯胺蓝，使后者发生聚合，导致吸收光谱转移，产生异染现象而出现紫色反应。

【试剂】

1) pH2.0 醋酸钠－盐酸缓冲液：1mol/L 醋酸钠溶液200ml，1mol/L 盐酸溶液210ml，加蒸馏水至1L。

2) 0.4g/L 甲苯胺蓝溶液：甲苯胺蓝40mg，溶于100ml 醋酸钠－盐酸缓冲液中。

3) 0.1g/L 硫酸软骨素标准液。

【操作】

分别将5μl、10μl、25μl 尿液及5μl 硫酸软骨素标准液加入同一滤纸的不同区域，待干，浸入甲苯胺蓝溶液中染色1min，然后在95%乙醇中漂洗。

【结果判断】

如在加样处出现紫色斑点为阳性。

【注意事项】

1) 在加入10μl、25μl 尿量时，应分次滴加，每次5μl，待加入尿液干后再加下次。

2) 粘多糖包括透明质酸、硫酸软骨素、硫酸角质、肝素、血型物质等。因此，试验时常以硫酸软骨素作为阳性对照。

【参考值】

正常人尿液粘多糖含量极微，定性试验结果多呈阴性。但约有0.2%的正常婴儿尿液标本量增加至50μl 时可出现弱阳性。

【临床意义】

尿中粘多糖排出量增多偶见于结缔组织疾病和肾炎等，无特异性。强阳性对于脂肪软骨营养不良症等粘多糖代谢障碍疾病具有一定诊断价值。

㈣　果糖定性试验

【原理】

采用Selivanoff 法。尿液果糖在强酸作用下脱水，生成5－羟甲基糠醛。后者与间苯二酚共热，产生深红色沉淀。

【试剂】

0.5g/L 间苯二酚溶液：间苯二酚50mg，用33ml 浓盐酸溶解后，加水至100ml。

【操作】

于试管中加入5ml 间苯二酚溶液后，再加0.5ml 尿液，加热煮沸。

【结果判断】

30s 内出现红色并产生深红色沉淀者为阳性。

【注意事项】

糖尿病患者尿液果糖常与葡萄糖共存，可在尿中加入新鲜酵母保温发酵除去葡萄糖后再作试验。

【参考值】

阴性。进食大量水果后可呈阳性。

【临床意义】

尿液果糖定性试验结果阳性见于先天性1，6－二磷酸酶缺乏症、严重肝功能衰竭、糖尿病。

㈤　半乳糖定性试验

【原理】

采用脎结晶法。尿液半乳糖上的醛基与苯肼共热后脱水，形成糖苯踪后进一步与苯肼脱氨，在第二位碳原子上形成酮基结构后与苯肼再次脱水，形成糖脎结晶。

【试剂】

130g/L 苯肼醋酸溶液：盐酸苯肼1.3g，醋酸钠3.0g （或无水醋酸钠1.8g），溶于适量水后，再加水至10ml。

【操作】

于5ml 试管中加入待检尿液5 滴、苯肼醋酸溶液10 滴，置沸水浴中加热并观察结果。

【结果判断】

30min 内出现黄色沉淀，冷却后有结晶析出者为阳性。

【注意事项】

苯肼醋酸溶液宜新鲜配制。本试验受高浓度葡萄糖影响，因此，尿中如含有大量葡

葡糖时，最好加新鲜酵母保温发酵除去葡萄糖后再作试验。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液半乳糖定性试验阳性见于1－磷酸半乳糖尿苷转移酶缺乏症、严重肝病、先天性半乳糖血症。

(六) 戊糖定性试验

【原理】

采用二羟基甲苯法。戊糖与盐酸共热形成麸醛后再与二羟基甲苯作用，形成绿色化合物。当戊糖含量高时可产生绿色沉淀。

【试剂】

1％二羟基甲苯盐酸氯化铁溶液：3，5－二羟基甲苯1.0g，溶于30％盐酸溶液500ml中，加三氯化铁液体25滴。

【操作】

于试管中加入5ml二羟基甲苯盐酸氯化铁溶液，加热至沸，离开火焰后慢慢滴加尿液，最多至20滴。

【结果判断】

溶液呈绿色并有绿色沉淀析出者为阳性。

【注意事项】

同尿液半乳糖定性试验。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液戊糖定性试验阳性见于先天性戊糖尿症。

二、蛋白质测定

(一) 蛋白定性试验 (加热醋酸法)

【原理】

加热可使蛋白质变性凝固，加酸可使蛋白质接近等电点，促使蛋白沉淀；同时，加酸还可溶解碱性盐类沉淀物。

【试剂】

5％醋酸溶液、50％醋酸溶液、饱和氯化钠溶液。

【操作】

取尿液5ml 于试管中，倾斜加热试管上部尿液，沸腾后滴加5％醋酸溶液3～4 滴，再煮沸并立即观察结果。

【结果判断】

阴性（－）：不显浑浊；微量（±）：在黑色背景下呈轻微浑浊，振摇后消散；弱阳性（+）：呈明显的白雾状，含蛋白质约0.1～0.5g/L；阳性（++）：呈颗粒浓白雾状，含蛋白质约0.5～2.0g/L；强阳性（+++）：浑浊，并呈絮片状沉淀，含蛋白质约2.0～5.0g/L；最强阳性（++++）：块状沉淀，甚至全部凝固，含蛋白质约5.0g/L 以上。

【注意事项】

1）低盐饮食患者尿液煮沸加酸后蛋白质沉淀不明显，或呈假阴性。试验时可先加1～2 滴饱和氯化钠溶液，再行测定。

2）尿液加热后出现浑浊可能是蛋白质，也可能是磷酸盐结晶析出，故一定要加酸后再煮沸。但必须注意加酸不宜过量，否则远离蛋白等电点使蛋白质微粒获得电荷增加，结果可呈假阴性。

3）本法检出敏感度为0.15g/L。但如有粘蛋白存在时可能干扰试验结果，排除方法如下：在5ml 尿液中加入50％醋酸溶液1ml 及饱和氯化钠溶液3ml，以防止粘蛋白沉淀。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

同尿液干化学分析。

（二）蛋白定量试验

参见第四篇生物化学检验第二章蛋白质测定。

（三）本－周蛋白定性试验（热沉淀法）

【原理】

本－周（Bence－Jones）蛋白又称凝溶蛋白，是一种免疫球蛋白的轻链或其聚合体，在一定pH 条件下加热至40～60℃时出现沉淀，温度升高至100℃时沉淀消失，冷却后又可重现沉淀。

【试剂】

1）200g/L 磺基水杨酸溶液。

2）2mol/L 醋酸盐缓冲液：醋酸钠175g，溶于41ml 冰醋酸中，加蒸馏水至1L，调整DH 至4.9。

【操作】

取磺基水杨酸法阳性尿液4ml 于试管中，加醋酸盐缓冲液1ml，混匀置56℃水浴15min，出现浑浊或沉淀时，将试管移至沸水中煮沸3min，观察试管中浑浊或沉淀的变化。

【结果判断】

如煮沸后浑浊变清、浑浊减弱或沉淀减少均提示阳性。

【注意事项】

1）尿液标本宜新鲜，浑浊尿液应离心取上清液作试验。

2）过多的本－周蛋白在90℃以上不易完全溶解，应稀释后再测。

3）本－周蛋白还可用轻链－白蛋白－戊二醛交联免疫电泳法检测，其阳性检出率100%。具体方法是：取尿液5ml，加2.0g/L 牛血清白蛋白溶液0.25ml、0.5%戊二醛溶液0.25ml，混匀置室温交联30min 后，按常法与抗κ、λ轻链血清进行对流免疫电泳，出现白色沉淀线为阳性。

4）尿液κ轻链、λ轻链亦可在特定蛋白仪上定量检测，具体方法见第五篇第三章。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液本－周蛋白定性试验阳性见于多发性骨髓瘤及巨球蛋白血症、肾淀粉样变、慢性肾盂肾炎及恶性淋巴瘤。

(四) 血红蛋白定性试验

【原理】

血红蛋白中的血红素基团具有过氧化物酶样活性，能催化过氧化氢而氧化邻甲联苯胺呈现蓝色变化。

【试剂】

1）10g/L 邻甲联苯胺溶液：在100ml 等量混合的冰醋酸无水乙醇溶液中加入邻甲联苯胺1.0g 即可。

2）过氧化氢醋酸溶液：将2 倍体积的3%过氧化氢溶液与冰醋酸混合即可。

【操作】

取尿液4 滴于试管中，加10g/L 邻甲联苯胺溶液2 ～3 滴混匀，再加过氧化氢醋酸溶液1 ～2 滴，混合后观察结果。

【结果判断】

阴性 （－）：3min 后无颜色变化；弱阳性 （+）：30 ～60s 内呈蓝绿色；阳性 （++）：即时呈蓝色；强阳性 （+++）：即时呈深蓝色。

【注意事项】

1）10g/L 邻甲联苯胺溶液宜置棕色瓶中冰箱保存，若溶液变暗色，应重新配制。

2） 肌红蛋白尿也可呈阳性反应。如遇干扰因素，可用单克隆抗体金标法鉴定。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

当体内大量溶血，尤其是血管内溶血时，血液中游离血红蛋白大量增加。当血液游离血红蛋白超过1.00 ～1.35g/L 时，即出现血红蛋白尿，为透明鲜红色或暗红色，离心后颜色不改变。

尿液血红蛋白定性试验阳性见于阵发性睡眠性血红蛋白尿症、寒冷性血红蛋白尿症、急性溶血性疾病、血型不合输血及大面积烧伤等引起的大量红细胞破坏。

（五） 肌红蛋白定性试验

【原理】

肌红蛋白和血红蛋白一样含有血红素基团，具有过氧化物酶样活性，能催化过氧化氢而氧化邻甲联苯胺呈蓝色变化。可用80 %饱和度的硫酸铵溶液提取肌红蛋白测定。

【试剂】

10g/L 邻甲联苯胺溶液 （同尿液血红蛋白定性试验）、过氧化氢醋酸溶液 （同尿液血红蛋白定性试验）、硫酸铵粉末。

【操作】

取尿液5ml 于试管中，加硫酸铵粉末2.8g 使之溶解混合，静置5min 后过滤。取滤液4 滴于试管中，加10g/L 邻甲联苯胺溶液2 ～3 滴混匀，再加过氧化氢醋酸溶液1 ～2 滴混合后观察结果。

【结果判断】

阴性 （－）：3min 后无颜色变化；弱阳性 （+）：30 ～60s 内呈蓝绿色；阳性 （++）：即时呈蓝色；强阳性 （+++）：即时呈深蓝色。

【注意事项】

本法为过筛试验，在少部分正常人尿液中可出现假阳性，应进一步用超滤法、电泳

法或免疫化学法加以鉴别。标本宜新鲜，避免剧烈搅拌。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

各种原因引起肌肉组织损伤均可产生大量肌红蛋白，且伴有红细胞的破坏。因此，肌红蛋白尿多伴有血红蛋白尿。

肌红蛋白是一种小分子量蛋白质，易被肾小球滤过。尿液肌红蛋白定性试验阳性见于遗传性肌红蛋白尿、散发性肌红蛋白尿以及心肌梗死、严重外伤等。

(六) 含铁血黄素定性试验 (Rous 法)

【原理】

含铁血黄素中的高铁 (Fe^{3+}) 离子与亚铁氰化物在酸性环境中形成蓝色的亚铁氰化铁而沉淀，此反应称普鲁士蓝反应。

【试剂】

20g/L 亚铁氰化钾溶液、3%盐酸溶液。

【操作】

取尿液15ml，2000r/min 离心5min，弃上清液，加入20g/L 亚铁氰化钾溶液及3%盐酸溶液各2ml，充分混匀，室温静置10min，离心取沉淀物涂片，加盖片用高倍镜 (或油镜) 观察。

【结果判断】

呈分散或成堆蓝色闪光颗粒者为阳性。

【注意事项】

20g/L 亚铁氰化钾溶液必须临用时配制。服用铁剂或试验用具污染铁质后均可呈蓝色反应，但此情况离心后沉淀物无折光性。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

含铁血黄素是一种不稳定的铁蛋白聚合体，来自肾小管上皮细胞对血管内溶血产生的部分血红蛋白的重吸收与降解。如含铁血黄素生成过量，超过肾上皮细胞转运能力时，则在上皮细胞内沉积，细胞脱落随尿排出，形成含铁血黄素尿。有时尿中血红蛋白量少，隐血试验阴性而本试验呈阳性。但在溶血初期，虽然有血红蛋白尿，由于血红蛋白尚未被肾上皮细胞所摄取，因而未能形成含铁血黄素，故可呈阴性。

尿液含铁血黄素定性试验阳性见于阵发性睡眠性血红蛋白尿症和其他血管内溶血。

(七) 微量蛋白检验

尿液微量蛋白包括纤维蛋白降解产物、尿 α_1 微球蛋白、尿 β_2 微球蛋白、视黄醇结合蛋白 (RBP)、微量白蛋白及T-H 蛋白等。具体检测方法参见第五篇第三章和第四篇第十章。

1. 纤维蛋白降解产物 (fibrinogen degradation products，FDP)

正常人尿液无FDP。当肾脏及尿路局部炎症时，其渗出的少量纤维蛋白经纤维蛋白溶解酶降解，产生FDP。另外，当肾小球病变至肾小球滤过膜通透性增高时，FDP 碎片排于尿中。此外，血液FDP 增高时，尿液FDP 排泄也增多。

2. α_1-微球蛋白 (α_1-microglobulin，α_1-M)

α_1-M 是一种小分子量糖蛋白，由肝脏与淋巴细胞合成，广泛存在于体液及淋巴细胞膜表面。血液中存在两种形式的 α_1-M，一种为游离形式，另一种为与IgA 结合形式。前者易被肾小球滤过，几乎全部被肾小管重吸收和代谢。单纯尿 α_1-M 增加见于早期肾小管损害；血与尿中 α_1-M 均增高多见于肾小管与肾小球功能障碍如慢性肾功能衰竭。尿中出现结合型 α_1-M 提示肾小球滤过膜受损。

3. β_2-微球蛋白 (β_2-microglobulin，β_2-M)

β_2-M 是一种小分子量单链多肽，是人类白细胞抗原Ⅰ类抗原的轻链，经肾小球完全滤过，由肾近曲小管以胞饮方式摄取并降解为氨基酸，不返流入血液，因此，正常人尿液 β_2-M 含量少 (<0.2mg/L)。当肾小球滤过率下降或肾近曲小管损害时，血中 β_2-M 增高；超过正常3 倍时，尿中 β_2-M 也增高。

4. 视黄醇结合蛋白 (retinol binding protein，RBP)

RBP 是一种低分子量蛋白质，正常人血液RBP 一经肾小球滤过后，即在肾近曲小管重吸收。因此，正常人尿液RBP 排出量极少。尿液RBP 排出量升高能敏感地反映肾近曲小管的损害程度。

5. 微量白蛋白 (microalbumin，M-alb)

M-alb 尿是肾病的早期征兆，是反映肾小球毛细血管壁通透性的指标。当尿液白蛋白浓度在300～300mg/24h (或20～200mg/L) 时，用常规方法检测尿液蛋白仍为阴性。当尿常规试条检测蛋白为阳性时，此时白蛋白浓度已大于200mg/L，称为大量白蛋白尿。早期检测M-alb 是监测肾脏病变的有效方法，尤其对糖尿病肾病的早期诊断具有重要价值。当白蛋白>300mg/24h 时，糖尿病肾病的预后较差。另外，对于高血压患者，可以预示高血压病的发病率及死亡率。

6.T－H 蛋白（Tamm－Horsfall protein，THP）

THP 是一种大分子量糖蛋白，合成于肾小管髓襻升支粗段上皮细胞的高尔基小体，可作为这一段肾小管的抗体标志。THP 聚合可形成凝胶覆盖在肾小管上皮细胞膜上，阻止水分的通透，参与肾逆流倍增系统中浓度梯度的形成及起到保护尿道黏膜免受细菌及病毒损伤的作用。THP 主要存在尿液中，参考值为（36.86±7.08）mg/24h 尿或（41.58±3.16）μg/mg 肌酐。尿中THP 增高见于肾病综合征、镉中毒肾病；尿中THP 减少见于多种慢性肾病引起的肾功能减退。肾功能越差，尿中THP 含量越少。

三、脂肪及其代谢产物测定

（一）脂肪试验

【原理】

采用脂溶剂乙醚抽提脂肪，并用脂溶性染料苏丹III染色脂肪小滴进行鉴别。

【试剂】

乙醚；苏丹III染液：将95％乙醇溶液10ml 与冰醋酸溶液90ml 混合后，加入苏丹III粉末1 药匙，使其充分溶解。

【操作】

取尿液5ml 于试管中，加乙醚2ml 振摇混匀，使脂肪溶于乙醚。静置片刻后离心5min，取乙醚与尿液交界面层涂片，加苏丹III染液1 滴，镜检观察结果。

【结果判断】

显微镜下见到红色小滴为脂肪试验阳性。

【注意事项】

脂肪滴可从脂肪变性的肾小管上皮细胞及脂肪管型退变而来。进食过量脂肪或鱼肝油也可呈阳性。尿中脂肪可用乙醚提取后进行定量测定。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

当肾小球病变伴高脂血症或乳糜尿时，尿中可出现脂肪。尿液脂肪试验阳性见于各种原因所致的肾病综合征、糖尿病肾病、狼疮性肾炎等。

（二）乳糜试验

【原理】

乳糜微粒与蛋白质混合于尿中而呈现乳化状浑浊，称乳糜尿。采用脂溶剂乙醚将其

抽提，并用脂溶性染料苏丹Ⅲ染色脂肪小滴进行鉴别。

【试剂】

乙醚、苏丹Ⅲ染液（同尿液脂肪试验）。

【操作】

同尿液脂肪试验。

【结果判断】

显微镜下见到红色脂肪小滴为乳糜试验阳性。

【注意事项】

（1）乳糜尿呈乳白色或色泽稍浑浊，若混有血液呈粉红色，称乳糜血尿；混有脓液称乳糜脓尿。乳糜尿静置后可分为三层，上层是脂肪；中层是乳白色或色泽较清的液体；下层是红色或粉红色沉淀物，含有红细胞、白细胞、上皮细胞、微丝蚴、结晶等。但必须注意，乳白色尿不一定是乳糜尿，若尿中含有大量非晶型磷酸盐或尿酸盐时，在寒冷的冬季也可呈乳白色，可将尿液加热或加酸进行鉴别，如果乳白色消失即为盐类结晶尿。

（2）氢氧化钠有助于乙醚对脂肪的澄清作用。

（3）也可将乙醚层隔水蒸干，滴加苏丹Ⅲ染液镜检观察。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液乳糜试验阳性见于丝虫病、腹腔内结核、肿瘤、胸腹部创伤、手术或其他原因造成淋巴管阻塞致尿路淋巴管破裂而形成的乳糜尿。

（三）酮体试验（Lange 法）

【原理】

含有酮体的尿液加入亚硝基铁氰化钠后，与浓氨水接触时出现紫色环。

【试剂】

亚硝基铁氰化钠、冰醋酸溶液、浓氨水。

【操作】

取新鲜尿液5ml 于试管内，加亚硝基铁氰化钠结晶粉末约250mg，加冰醋酸溶液数滴混匀后，再沿管壁加浓氨水1～2ml，10min 内观察尿液与氨水交接面的颜色变化。

【结果判断】

阴性（－）：10min 后不显紫色环；弱阳性（+）：10min 后方显淡薄紫色环；阳性（++）：立即显紫色环；强阳性（+++）：立即显深厚的紫色环。

【注意事项】

1）本法检测丙酮的灵敏度为1000mg/L；对乙酰醋酸的灵敏度为80mg/L。

2）加入少量冰醋酸溶液可防止过量肌酐引起的假阳性反应。

3）氨水易挥发，浓度过低会影响呈色反应，加入氨水时，应沿管壁缓慢进行，使氨水与尿液面分为两层，便于结果观察。

4）尿液中的非结晶型尿酸盐可呈棕黄色环，应注意鉴别。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

同尿液干化学分析。

四、胆色素测定

（一）胆红素定性试验（Harrison 法）

【原理】

尿中胆红素被氯化钡吸附后，加入三氯化铁试剂，可将胆红素氧化成胆绿素而呈绿色反应。

【试剂】

1）100g/L 氯化钡溶液。

2）100g/L 氢氧化钠溶液。

3）Fouchet 试剂：三氯醋酸25.0g，加水少许溶解，再加三氯化铁0.9g，溶解后加水至100ml。

【操作】

于5ml 尿液中加入3～5 滴氯化钡溶液，再加氢氧化钠溶液2 滴混匀离心，弃上清液，于沉淀物中滴加数滴Fouchet 试剂，并观察沉淀物的颜色变化。

【结果判断】

沉淀物周边出现蓝绿色环者为阳性。

【注意事项】

1）胆红素在阳光照射下极易分解，故尿液标本宜新鲜。

2）尿液如呈碱性，会影响反应结果，应滴加5%冰醋酸溶液酸化后再作试验。

3）Fouchet 试剂加入量不宜过多，以免出现假阴性。

4）水杨酸、阿司匹林可与Fouchet 试剂呈假阳性反应。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

同尿液干化学分析。

㈡ 尿胆原定性试验（Ehrlich 法）

【原理】

同尿液干化学分析。

【试剂】

100g/L 氯化钡溶液。Ehrlich 试剂：对－二甲氨基苯甲醛2.0g，溶于80ml 蒸馏水中，再缓缓滴加浓盐酸20ml。

【操作】

取新鲜无胆红素尿液5ml 于试管中，加Ehrlich 试剂0.5ml，静置10min，观察结果。

【结果判断】

阴性（－）：在白色背景下，从管口直视管底，不呈红色，经加温后仍不显红色；弱阳性（+）：放置10min 后呈微红色；阳性（++）：放置10min 后呈樱红色；强阳性（+++）：立即呈深红色。

【注意事项】

1）尿液标本宜新鲜，避免阳光直射引起尿胆原的氧化。

2）尿液中如有胆红素，应先用100g/L 氯化钡溶液与尿液1∶4 混合，离心去除胆红素后，取上清液测定。

3）检测结果阳性（++以上）时，应将尿液标本1∶10、1∶20、1∶40 系列稀释，以呈阳性的最高稀释度报告。

4）使用抗生素可抑制肠道菌群，使尿胆原减少或缺乏。

【参考值】

1∶20 以下。

【临床意义】

同尿液干化学分析。

㈢ 尿胆色素原定性试验

【原理】

胆色素原能与对－二甲氨基苯甲醛在酸性溶液中形成红色缩合物。

【试剂】

1）饱和醋酸钠溶液：醋酸钠65.0g，溶于53ml 热蒸馏水中，冷却即有结晶析出。

⑵ 对－二甲氨基苯甲醛溶液：对－二甲氨基苯甲醛0.7g，溶于100ml 蒸馏水中，再缓缓加入150ml 浓盐酸。

⑶ 氯仿。

【操作】

取新鲜尿液2ml 于试管中，加入对－二甲氨基苯甲醛溶液2ml 混匀，静置2～3min，加入饱和醋酸钠溶液4ml 混匀，观察结果。

【结果判断】

尿液不显红色者为尿胆色素原定性试验阴性；如显红色，加氯仿3～5ml，充分颠倒混匀，静置10min 待分层，如氯仿层不显红色者为尿胆色素原定性试验阳性。

【注意事项】

⑴ 尿液中胆色素原和尿胆原均能产生红色反应，但前者不溶于氯仿。因此，氯仿抽提后不显红色者为尿胆色素原阳性。

⑵ 醋酸钠溶液必须饱和，否则不能使尿胆原形成的红色醛化物全部抽提至氯仿层。

⑶ 胆色素原不稳定，尿液久置后会转变为红黑色的胆色素，使检测结果偏低。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿胆色素原阳性见于肝性卟啉病及急性间歇性卟啉病。

㈣ 尿卟啉定性试验

【原理】

采用荧光法。用正丁醇－醋酸乙酯抽提粪卟啉与尿卟啉后，再分别经氢氧化钠和乙醚抽提，进行荧光测定。

【试剂】

⑴ 乙醚。

⑵ 冰醋酸。

⑶ 100g／L 氢氧化钠溶液。

⑷ 饱和醋酸钠溶液 (同尿液胆色素原定性试验)。

⑸ 正丁醇－醋酸乙酯混合液：将正丁醇与醋酸乙酯1∶1 混合。

【操作】

在25ml 尿液中加冰醋酸适量，使其酸化至pH3.0～3.5，移入250ml 分液漏斗中，加辛醇1 滴，用60ml 正丁醇－醋酸乙酯混合液分两次提取尿卟啉后，用70ml 蒸馏水洗

涤两次，弃去水层，然后用100g/L 氢氧化钠溶液12ml 分3 次抽提正丁醇－醋酸乙酯混合液中的卟啉，合并后加盐酸酸化，在紫外光下测试。如有荧光，再移人分液漏斗中，加冰醋酸8ml 及饱和醋酸钠溶液2ml，用100ml 乙醚分两次抽提粪卟啉后，放出水层在紫外光下测试。

【结果判断】

如发红色荧光为尿卟啉阳性。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿卟啉阳性见于卟啉病。

1）红细胞生成性叶啉病：由于患者尿卟啉原III合成受阻，使尿卟啉（原）I 积聚，后者进一步变为粪卟啉（原）I，故体内粪卟啉大量增加。另一种是由于患者铁螯合酶缺陷，导致体内原卟啉大量堆积。

2）急性间歇性卟啉病：由于先天性尿卟啉原合成酶缺陷，导致肝内胆色素原（即卟啉原）转化为尿卟啉原III减少，引起δ－氨基－γ－酮戊酸（ALA）合成酶作用增强，合成大量ALA 和胆色素原并从尿中排出。

五、氨基酸及其代谢产物测定

（一）氨基酸测定（甲醛滴定法）

【原理】

氨基酸是带有氨基与羧基的两性化合物，在溶液中以两性离子状态存在。一般条件下碱不能直接滴定其氨基上的氢离子。但用甲醛处理后，其中甲醛与氨基相结合形成酸性氨基酸亚甲蓝衍生物，从而使氢离子游离，可用标准碱滴定，计算出氨基酸氮含量。

【试剂】

1）氯化钡。

2）饱和氢氧化钡溶液。

3）1.0g/L 酚酞指示剂：酚酞100mg，加95％乙醇100ml。

4）1.0g/L 中性红指示剂：中性红50mg，加50％乙醇溶解并稀释至20ml。

5）中性甲醛溶液：甲醛50ml，加1.0g/L 酚酞指示剂1ml，用1mol/L 氢氧化钠溶液滴定至微红色。

6）0.1mol/L 盐酸溶液。

7）0.01mol/L 氢氧化钠溶液。

【操作】

取尿液25ml，加氯化钡1g 使溶解，加饱和氢氧化钡溶液使石蕊试纸呈碱性后再续加2.5ml，并加水至50ml，放置10min 后过滤，取滤液2ml 及1.0g/L 中性红指示剂1 滴，用0.01mol/L 盐酸溶液调pH 至7.0 （呈橙色），再加中性甲醛溶液0.4ml 及1.0g/L 酚酞指示剂3 滴，用0.01mol/L 氢氧化钠溶液滴定pH 至9.0 （呈红色不再变深为止）。记录0.01mol/L 氢氧化钠溶液的消耗量。另以水作空白滴定1 次。

【计算】

氨基酸氮含量（mg/L）＝（测定管氢氧化钠溶液消耗量－空白管氢氧化钠溶液消耗量）×0.14 ×1 ×1000

式中0.01mol/L 氢氧化钠溶液1ml 相当于0.14mg 氨基酸氮，2ml 尿滤液相当于1ml 尿液。

【注意事项】

1） 尿液如有蛋白质，应加10％醋酸溶液0.5ml，并加热煮沸5～10min。

2） 本法尿滤液未行去氨，故应将尿液另作氨氮分析后扣除。

3） 脯氨酸可与甲醛作用生成不稳定化合物，致使测定结果偏低。酪氨酸的酚基结构又可使测定结果偏高。

【参考值】

50～200mg/24h。

【临床意义】

进食肉类过多、饥饿、注射水解蛋白、孕妇、新生儿等可出现生理性尿氨基酸增高。氨基酸代谢异常、血氨基酸增高超过肾阈可呈溢出性氨基酸尿。血氨基酸正常而肾阈值降低可呈肾性氨基酸尿。

1） 溢出性氨基酸尿：主要见于肝脏疾病如晚期肝硬化、肝组织大量坏死。

2） 肾性氨基酸尿：主要见于严重肝病和肝功能减退、肾小管损伤、严重烧伤、恶性营养不良。

（二） 胱氨酸定性试验

【原理】

采用亚硝基铁氰化钠法。尿液中胱氨酸被氰化钠还原成半胱氨酸后，与亚硝基铁氰化钠反应，形成紫红色化合物。

【试剂】

50g/L 氰化钠溶液、50g/L 亚硝基铁氰化钠溶液。

【操作】

取尿液5ml 于试管中，加入50g/L 氰化钠溶液2ml 混匀，静置10min 后，逐滴加入

(边加边摇) 50g/L 亚硝基铁氰化钠溶液10～20 滴，立即观察结果。

【结果判断】

亚硝基铁氰化钠加入后出现红色反应者为阳性。

【注意事项】

本试验易受酮体干扰。氰化钠剧毒，应注意防范措施。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿液胱氨酸定性试验阳性见于胱氨酸尿症患者。胱氨酸尿症是一种先天性代谢疾病，尿中出现胱氨酸结晶，可引起尿路复发性胱氨酸结石。

(三) 苯丙酮酸定性试验

【原理】

采用三氯化铁法。苯丙酮酸在酸性条件下与三氯化铁生成苯丙酮酸烯醇基和高铁(Fe^{3+}) 的蓝绿色螯合物，其颜色深浅与尿液中苯丙酮酸含量有关。

【试剂】

1) 浓盐酸。

2) 100g/L 三氯化铁溶液。

3) 磷酸盐沉淀剂：氯化镁2.2g，氯化铵1.4g，浓氨水2ml，加水至100ml。

【操作】

取尿液4ml 于试管中，加磷酸盐沉淀剂1ml 混匀，静置3min 后离心或过滤，取上清液加浓盐酸和100g/L 三氯化铁溶液各2～3 滴，立即观察结果。

【结果判断】

出现蓝绿色并保持2～4min 不褪色者为阳性。

【注意事项】

1) 本法灵敏度约100mg/L，阳性标本可做系列稀释进行粗略定量，但新生儿在出生后的6 周内不易查出，故于出生6 周后检查为宜。

2) 尿液要新鲜，尿中含有水杨酸制剂、氯丙嗪及胆红素时，可呈假阳性。

3) 用2，4－二硝基苯肼盐酸盐与尿液等量混合，也可检测苯丙酮酸。阳性者呈黄色浑浊反应。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

苯丙酮酸是苯丙氨酸的代谢产物。当L－苯丙氨酸羟化酶缺乏时，血液中的苯丙氨酸因不能转变为酪氨酸而堆积，只有小部分随尿液排出，大部分则通过转氨基作用形成苯丙酮酸后再由肾脏排出。

尿液苯丙酮酸定性试验阳性见于苯丙酮尿症患者，但阴性不能排除苯丙酮尿症。此外，酪氨酸血症、新生儿苯丙氨酸血症等也可出现苯丙酮酸尿。

㈣ 羟脯氨酸测定

【原理】

采用氯胺T 氧化法。尿液羟脯氨酸经氯胺T 氧化后，用热甲苯抽提并加对－二甲氨基苯甲醛显色，反应液在560nm 波长下的吸光度与羟脯氨酸含量呈正相关。

【试剂】

1） 甲苯。

2） 12mol/L 氢氧化钾溶液：氢氧化钾67.2g，用蒸馏水溶解并稀释至100ml。

3） 硫代硫酸钠溶液：硫代硫酸钠89.3g，用蒸馏水溶解并稀释至100ml。

4） 氯胺T 溶液：氯胺T1.4g，溶于不含过氧化物的甲基溶纤剂（methyl cellosolve）25ml 中。

5） 对－二甲氨基苯甲醛溶液：对－二甲氨基苯甲醛120.0g，溶于400ml 无水乙醇中，37℃水浴助溶，再缓缓加入浓硫酸27.4ml。

6） 羟脯氨酸标准液（0.036g/L）：用0.2ml 浓盐酸溶解18mg 羟脯氨酸后，再用蒸馏水移入50ml 容量瓶中，并加水至刻度。临用时10 倍稀释即可。

【操作】

取尿液和标准液各1ml，分别加入浓盐酸1ml，置100℃烘箱水解过夜。取出冷却后，用12mol/L 氢氧化钾溶液1ml 中和，并加氯胺T 溶液1ml，置室温氧化25min，加硫代硫酸钠溶液3ml 及甲苯5ml，用力振摇5min，离心，弃上层甲苯液后煮沸30min，再加甲苯5ml，用力振摇5min 后离心，取上层甲苯液2.5ml，加对－二甲氨基苯甲醛溶液1ml 混匀，室温放置30min 后，用分光光度计在560nm 波长比色，以甲苯调零，分别读取测定管和标准管吸光度值。

【计算】

$$\text{羟脯氨酸含量（mg/24h）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{标准管吸光度值}} \times 0.036 \times 24\text{h 尿量（ml）}$$

【注意事项】

1） 氯胺T 溶液应新鲜配制，如有大量泡沫表示甲基溶纤剂不纯。

2） 食物中胶原蛋白的摄入会影响尿中羟脯氨酸的排泄，因此，试验前及当天应限

制高胶原饮食，如动物皮肤、肌腱、软骨及维生素C 等。

【参考值】

25 ～77㎎/24h 。

【临床意义】

羟脯氨酸是人体胶原蛋白的主要成分，尿中羟脯氨酸50 %来自骨骼，由胶原中脯氨酸羟化而来，占总氨基酸量13 %。尿中排出羟脯氨酸基本上能反映骨吸收和骨转换程度，但缺乏特异性。

尿液羟脯氨酸增高见于各种骨代谢疾病如骨软化症、骨肿瘤等。另外，也可见于内分泌系统疾病如甲状旁腺激素、甲状腺素、生长素等增多的疾病和羟脯氨酸血症。

(五) 尿黑酸定性试验

【原理】

采用氧化法。尿中尿黑酸经氯化铁氧化后，可生成蓝绿色的苯醌醋酸。

【试剂】

10g/L 三氯化铁溶液。

【操作】

取尿液5㎖ 于试管中，滴加10g/L 三氯化铁溶液2 ～3 滴，立即观察结果。

【结果判断】

出现蓝色或蓝绿色反应后随之尿液变为浑浊者为阳性。

【注意事项】

(1) 尿黑酸被氯化铁氧化后，色泽较不稳定，应立即观察结果，否则色泽消失。

(2) 除氧化法外，尚可用硝酸银还原法检测尿黑酸，具体方法是：尿液与硝酸银溶液各0.5㎖ 混合，加10 %氢氧化钠溶液2 ～3 滴，出现黑色反应即为阳性。但尿酸等物质可还原硝酸银，干扰实验结果。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

尿黑酸试验阳性见于尿黑酸症。

(六) 5 羟吲哚醋酸定性试验

【原理】

采用偶氮反应原理。5 －羟吲哚醋酸与1 －亚硝基－2 －萘酚和亚硝酸偶联显紫色，用二氯乙烯或醋酸乙酯提取。其颜色深浅与尿中5 －羟吲哚醋酸含量有关。

【试剂】

1）1mol/L 硫酸溶液。

2）1g/L1 －亚硝基－2 －萘酚乙醇。

3）25g/L 亚硝酸钠溶液。

4） 亚硝酸试剂：25g/L 亚硝酸钠溶液0.2ml，加1mol/L 硫酸溶液5ml。

5） 二氯乙烯 (或醋酸乙酯) 。

【操作】

取尿液0.2ml，加水0.8ml 和1 －亚硝基－2 －萘酚乙醇溶液0.5ml，混匀。加入新鲜配制的亚硝酸试剂0.5ml，静置10min 后加入二氯乙烯或醋酸乙酯5ml，充分混匀，离心观察结果。

【结果判断】

上层液呈紫色反应者为阳性。

【注意事项】

1 －亚硝基－2 －萘酚用95 %乙醇溶液溶解配制。亚硝酸试剂需临用时配制。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

5 －羟吲哚醋酸是5 －羟色胺的代谢产物。5 －羟色胺是一种强有力的血管收缩剂和平滑肌兴奋剂，形成于胃肠道的肠嗜铬细胞，由于其无生物学活性，故较难测定，通常以5 －羟吲哚醋酸测定代之。

5 －羟吲哚醋酸增高见于肠类癌、支气管腺瘤等。

第四节　酶类测定

一、β－N －乙酰氨基葡萄糖苷酶测定

【原理】

尿液β－N －乙酰氨基葡萄糖苷酶 (β－N －acetyl －D －glucosaminidase，NAG) 在酸性环境中水解对硝基酚－N －乙酰氨基葡萄糖苷，释放出游离的对硝基酚，加入碱性溶液终止酶反应并使对硝基酚显色，在400nm 波长条件下测定吸光度。

【试剂】

1） 枸橼酸盐缓冲液：枸橼酸5.4g，枸橼酸三钠10.0g，用蒸馏水溶解并稀释至

1L。

(2) 基质液：对硝基酚－N －乙酰氨基葡萄糖苷171.2mg，用枸橼酸盐缓冲液溶解并稀释至100ml，冰箱保存。

(3) 硼砂－氢氧化钠缓冲液：硼砂4.77g，用适量蒸馏水溶解后，加0.2mol/L 氢氧化钠溶液170ml，再用蒸馏水稀释至1L。

【操作】

取尿液0.1ml，加基质液0.5ml，37℃水浴30min 后，加硼砂－氢氧化钠缓冲液2ml混匀，在分光光度计上以空白管调零，读取400nm 波长1cm 光径的吸光度值。

【计算】

尿NAG 活性 (U/L) ＝吸光度值×46.92

【注意事项】

尿液NAG 活性通常以与肌酐含量的比值 (单位U/gCr) 方式报告，其结果不受尿液浓缩或稀释的影响。因此，需准确测定尿肌酐含量。

【参考值】

小于16.10U/gCr。

【临床意义】

NAG 是一种溶菌体酶，分子量130000～140000u，肾小球不能滤过，在肾小管及尿路上皮细胞内含量丰富。当肾脏病变时，该酶释放于尿中。

尿液NAG 活性增高是肾小管损害的敏感指标，如急、慢性肾炎和休克引起的肾功能衰竭、肾病综合征、流行性出血热、中毒性肾病、肾癌、膀胱癌以及肾移植排异反应的早期诊断等。

二、溶菌酶测定

【原理】

采用比浊法测定。以一种细菌悬液为基质，加入含溶菌酶的样品后保温一定时间，则基质菌被溶解，菌液浊度下降或变清。其浊度变化与溶菌酶含量有关。

【试剂】

50 亿/ml 菌悬液、40mg/L 溶菌酶标准液。

【操作】

于1cm 光径比色杯内加菌悬液3ml，再加尿液0.3ml，立即混匀并计时，在30s 和3min 时，用分光光度计600nm 波长比浊，以水作空白，并计算出两次读数之差。

【结果判断】

查标准曲线即得尿液溶菌酶含量。

【注意事项】

1）菌悬液通常采用腐生球菌，对人无致病性。将其24h 培养物用60 倍体积的蒸馏水洗涤，制成50 亿/ml 菌悬液，或离心后用5 倍体积丙酮洗涤3 次，乙醚洗涤2 次后，制成干燥菌粉备用。

2）标准曲线的绘制：取试管6 支，分别加入40mg/L 溶菌酶标准液0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50ml，并用水补至1.00ml，使每管溶菌酶含量依次为2、4、8、12、16、20mg/L。然后分别取以上溶菌酶标准液0.3ml 代替样品，读取各管30s 和3min 时的浊度之差，绘制标准曲线。

【参考值】

0～2mg/L。

【临床意义】

溶菌酶是一种小分子量能溶解某些细菌的碱性蛋白水解酶，可自由地通过肾小球。90%以上由肾小管细胞重吸收并降解，尿中较少或无。当肾组织破坏时，肾小管功能障碍，尿中溶菌酶增多。

尿液溶菌酶含量增高见于肾小管疾病，如重金属和抗生素中毒所致的肾小管坏死、急性肾小管坏死、先天性肾小管发育不全、范科尼综合征、慢性萎缩性肾小管病变、慢性肾小球肾炎伴肾小管受损、肾移植排异反应、肾盂肾炎、慢性肾功能衰竭、肾小管酸中毒等。

三、淀粉酶测定

【原理】

淀粉在淀粉酶的催化下水解，加入碘液后，与未水解的淀粉结合形成蓝色复合物，其颜色深浅与未被水解的淀粉含量有关，并与淀粉酶活性呈负相关。

【试剂】

1）0.4g/L 淀粉溶液：于500ml 蒸馏水中溶解9.0g 氯化钠、56.9g 磷酸氢二钠（或22.6g 无水磷酸氢二钠）和12.5g 无水磷酸二氢钾，加热至沸；另取10ml 蒸馏水将0.4g 可溶性淀粉调成糊状，加入上述沸液中，冷至室温后加37%甲醛溶液5ml，并用蒸馏水稀释至1L。

2）0.01mol/L 碘液：于400ml 蒸馏水中溶解1.8g 碘酸钾及22.5g 碘化钾，缓慢加入4.5ml 浓盐酸混匀，贮棕色瓶冰箱保存，临用时10 倍稀释。

【操作】

取15mm×150mm 试管2 支，分别编上测定管（U）和空白管（B），并各加淀粉溶液1.0ml，置37℃水浴预温5min 后，于测定管中加入1∶20 稀释尿液0.2ml 或原尿20μl，

混匀，继续保温7.5min 后，各加碘液1.0ml，蒸馏水6.0ml，混匀，用660nm 波长，1cm 光径，以蒸馏水调零，读取各管吸光度值。

【计算】

$$\text{尿淀粉酶活性（U/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值} - \text{空白管吸光度值}}{\text{空白管吸光度值}} \times 16000$$

【注意事项】

0.4g/L 淀粉溶液应置冰箱保存，若出现浑浊或絮状沉淀，应重新配制。0.01mol/L 碘液应临用时配制。

【参考值】

1000～12000U/L。

【临床意义】

尿液淀粉酶增高见于急性胰腺炎、胰腺癌、胆石症、肠梗阻、溃疡病穿孔等。

急性胰腺炎时，尿淀粉酶活性约于起病后12～24h 开始增高。由于尿淀粉酶活性增高迟于血清淀粉酶活性增高，并受尿液浓缩或稀释的影响，因此，用于早期诊断急性胰腺炎受到一定的限制。

四、其他酶类测定

正常尿液含酶量极少，肾脏疾患时血液中以及肾组织中的某些酶可在尿中出现，如β－葡萄糖苷酸酶、丙氨酸氨基肽酶、亮氨酸氨基肽酶、γ－谷氨酰转移酶、碱性磷酸酶以及酸性磷酸酶等。具体检测方法参见第四篇第四章和第十章。

1．β－葡萄糖苷酸酶（β-glucuronidase，β-glu）

该酶是一种水解酶。肾小管上皮细胞尤其是近端肾小管及膀胱上皮细胞含量丰富。肾小管受损时，尿中该酶活性增高。肾小管坏死和活动性肾盂肾炎、肾结核、狼疮性肾炎、急性肾炎、肾癌、膀胱癌以及肾移植排异反应等均可增高。

2．丙氨酸氨基肽酶（alanine aminopeptidase，AAP）

当肾小管损伤时，尿中此酶活性增高。尿液AAP 活性通常以“AAPU/gCr”方式报告，因此，需准确测定尿液肌酐含量。正常人尿液AAP 活性参考值为2.5～6.1U/gCr。尿液AAP 增高见于肾小管损伤、急性肾小球肾炎、急性肾盂肾炎、肾癌、肾缺血以及肾外因素如胰头癌、女性生殖道恶性肿瘤、多胎妊娠。

3．亮氨酸氨基肽酶（leucine aminopeptidas，LAP）

该酶在肾脏含量丰富，尤其是近端肾小管含量最多，而肾小球含量低。正常人尿液中LAP 来源于肾脏，当肾小管上皮细胞损害时，尿中LAP 增高。正常人尿液LAP 含量为（4.24±1.62）U/gCr。尿中LAP 增高见于急性肾小球肾炎、急性肾盂肾炎，但病情

稳定后此酶正常。肾癌、肾缺血以及肾外因素如肝癌、胰腺癌、女性生殖器肿瘤也可增高。

4. γ－谷氨酰转移酶（γ－glutamyl transferase，γ－GT）

人体许多器官含有此酶，肾脏中以近端肾小管刷状缘与亨利袢含量最丰富。该酶分子量大，不能由肾小球滤过，肾小球病变时才漏入尿中。正常人尿液中该酶主要来自肾脏，当肾小管受损时，尿液中该酶活性增加。正常人尿液γ－GT 参考值为（5.2 ±7.5）U/gCr。尿液γ－GT 增高见于缺氧、中毒、炎症所致的肾小管损害。慢性肾病、肾实质恶性肿瘤及老年人尿中γ－CT 活性减低。

5. 碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）

肾小管上皮细胞（尤其近端肾小管刷状缘）含有丰富的ALP。正常人尿液中该酶主要来自肾脏（66%），肾实质坏死、肾小球通透性增高、肾小管上皮细胞坏死脱落，尿中该酶活性增高。正常男性尿液ALP 参考值为6000U/d；女性为7500U/d。尿液ALP 活性增高见于肾脏疾病如急性肾炎、急进性肾炎、狼疮性肾炎、糖尿病肾小球毛细血管间质硬化症、急性肾小管坏死、肾梗死、肾盂肾炎、肾癌及肾移植术后急性排异反应等。

6. 酸性磷酸酶（acid phosphatase，ACP）

尿液ACP 在女性来自肾脏，男性来自前列腺。因此，肾脏病变或前列腺肿瘤时，尿液ACP 增高。正常男性尿液ACP 参考值为1462U/d；女性为217U/d。尿液ACP 增高见于肾脏病变、前列腺肿瘤。

第五节　沉渣分析

一、沉渣显微镜检查

尿液干化学分析由于受试带质量、操作方法等诸因素的影响而仅限于过筛试验。对于肾脏疾病患者，必须进行规范的尿液沉渣显微镜检查。尿液沉渣的显微镜检查主要是观察细胞、管型、结晶等，借以发现其有病理意义的改变。

（一）直接显微镜检查法

【操作】

（1）取待检混匀尿液10ml 于刻度离心管中，1500r/min 离心5min，弃上清液，保留0.2ml 残留液备用。

（2）将沉淀物混匀后，取50μl 滴人载玻片上，用18mm ×18mm（或22mm ×22mm）盖玻片覆盖后镜检。先用低倍镜（10 ×10）观察20 个低倍视野（LP）的管型数。再用高倍镜（10 ×40）计数10 个高倍视野（HP）的细胞数。

【报告形式】

细胞：以10 个视野中的最少数到最多数 （××～××个细胞/HP） 报告。

管型：以20 个视野的平均数 （××个/LP） 报告。

结晶：以每一高倍视野＋、＋＋、＋＋＋、＋＋＋＋等的半定量方式报告。

【注意事项】

1） 美国NCCLS 文件推荐使用一次性尿沉渣专用检测板，并以“××/μl”形式报告。有条件的实验室应逐步实行尿沉渣专用检测板计数，并以“××/μl”的形式报告。

2） 无一次性尿沉渣专用检测板的实验室，可将显微镜检查结果换算为“××/μl”形式报告，其换算公式为：××/μl＝××个/LP ×1350 （或2016）。

（二） 染色检查法

【试剂】

1） 30g/L 结晶紫溶液：结晶紫3.0g，溶于20ml 95％乙醇中，加草酸铵0.8g，蒸馏水80ml，混匀后贮存于棕色瓶中。

2） 10g/L 沙黄溶液：沙黄0.25g，溶于95％乙醇10ml 中，加水90ml。

3） S－M 应用液：取 1） 液3 份与 2） 液97 份混匀，过滤后贮存于棕色瓶中，可用3 个月。

【操作】

1） 取待检混匀尿液10ml 于刻度离心管中，1500r/min 离心5minn，弃上清液，保留0.2ml 残留液，加S－M 应用液1 滴混合，染色3min。

2） 将沉淀物混匀后，取50μl 滴人载玻片上，用18mm ×18mm （或22mm ×22mm）盖玻片覆盖后镜检。方法同直接显微镜检查。

【报告方式】

同直接显微镜检查。

【注意事项】

1） 该染色法不仅能分类白细胞，而且还可区分死的白细胞与活的白细胞，较适合尿路感染标本的检查，但染色液不能长期保存。

2） 除S－M 染色法外，还有Sternheimer 染色法、Berhe－Muhlberg 染色法、May－Giemsa 染色法和苏丹III染色法等。

（三） 尿液沉渣有形成分形态学特点及其临床意义

1．细胞

能在尿液中检测到的细胞有红细胞、白细胞、上皮细胞和精子等，正常尿液中除了

上皮细胞之外只能检到少许白细胞，而尿中细胞数量不同程度增加均有其相应的临床意义。

1）红细胞：高倍镜下红细胞为淡黄色，呈中央凹陷的盘片状。红细胞随尿液渗透浓度的改变而变形，低渗透浓度时细胞形态不一；高渗透浓度时细胞皱缩成锯齿形。另外，红细胞的来源不同，其形态也不同，非肾性血尿中红细胞呈均一性且大多形态正常；而肾性血尿中则出现非均一性的变形细胞；两者兼有者称为混合性血尿（详见本章第六节尿红细胞形态检验）。

正常尿液仅在高倍镜下偶见红细胞（尿液离心后约0～3/HP），尿中红细胞增多称为血尿，可分为镜下血尿和肉眼血尿。泌尿系统各部位的炎症，急、慢性肾小球肾炎，肿瘤，结石，结核，创伤，先天畸形及肾移植后排异反应均可导致不同程度的血尿。某些全身性疾病如血小板减少性紫癜、血友病、弥散性血管内凝血、红斑狼疮等均可发生血尿。前列腺炎、精囊炎、盆腔炎也可引起血尿。

2）白细胞：正常尿液经离心后白细胞男性0～3/HP，女性0～5/HP，除肾移植后排异反应及淋巴细胞白血病可见淋巴细胞外，一般均为中性粒细胞。尿液中白细胞比红细胞体积大，有核，但不一定能看清楚，炎症时白细胞发生变性或死亡，或为不规则、结构不清、成堆、含颗粒较多的脓细胞，其意义与白细胞相同。白细胞增多是泌尿系统炎症的重要指标，细胞数量与炎症程度相关，尤其是细菌性感染。如急、慢性尿路感染，前列腺炎，结核，结石，肿瘤并发感染。女性阴道炎、宫颈炎、附件炎时分泌物进入尿中，也可导致尿白细胞增多。

3）上皮细胞：由泌尿道各段上皮脱落混入尿中，这些部位病变时，尿液中上皮细胞增多。①鳞状上皮细胞：大而扁平，呈多角形，有小而明显的核。女性尿中可成片出现，无临床意义；如同时伴有大量的白细胞，则可能为泌尿生殖道炎症。②移行上皮细胞：随脱落部位不同，有多种形态，如尾状上皮，含一个圆形或椭圆形的核，肾盂、输尿管炎症时可脱落。③肾小管上皮细胞：来自肾小管，比中性粒细胞大1.5～2.0倍，含一个较大的圆形核，胞质中有小空泡、颗粒或脂肪小滴，正常人尿液中少见，肾炎或先天性肾炎时可出现。

4）肿瘤细胞：泌尿系统肿瘤（主要是膀胱肿瘤）患者出现血尿的同时尿中会检查到脱落的肿瘤细胞。其形态不同于上皮细胞和白细胞。为了提高肿瘤细胞检出率，可用甲醛作防腐剂，留取24h尿沉渣浓集后检查。

2．管型

由尿液蛋白在肾小管、集合管沉淀凝固而致，呈圆柱状结构。根据其形状和内含物不同又可分成透明管型、颗粒管型、细胞管型和蜡样管型。尿液中管型的出现具有重要

的临床意义。

1）透明管型：呈柱状体，无色、半透明、两端钝圆，也可以内含或外附少量颗粒或细胞。正常人尿液中偶见，全身或肾脏受刺激后可以增加。大量出现见于急、慢性肾小球肾炎和其他肾病。可以和其他管型同时出现在尿液中。

2）细胞管型：管型内含有较多细胞即为细胞管型，如红细胞管型、白细胞管型等。①红细胞管型：多见于肾单位内出血，如急性肾小球肾炎、慢性肾炎急性发作。也可见于血型不合引起的输血反应及急性肾小管坏死、肾出血、肾移植排异反应。在红斑狼疮和其他胶原性疾病、肾梗死、肾静脉栓塞形成等情况下，红细胞管型是其特征性表现。②白细胞管型：由变性坏死的白细胞聚集而成，过氧化物酶染色呈阳性。白细胞管型的出现表示肾实质有细菌性感染存在，常见于肾盂肾炎、间质性肾炎等。狼疮性肾炎时也可见到。③肾上皮细胞管型：管型内含有肾小管上皮细胞，过氧化物酶染色呈阴性，可与白细胞管型鉴别。常见于肾小管病变如急性肾小管坏死、子痫、中毒、肾移植后排异反应等。

3）颗粒管型：管型内含大小不同颗粒占1/3 以上，是尿沉渣中最常见又最有意义的病理学改变。颗粒可以来自变性细胞残渣，也可以由蛋白变性形成。根据其颗粒大小又可分为粗颗粒管型和细颗粒管型。可见于肾实质性病变如急、慢性肾小球肾炎，肾病，肾动脉硬化等。

4）蜡样管型：不含颗粒，其质地和颜色像蜡一样呈淡黄色或灰色，质地厚，有切痕，由颗粒管型或细胞管型等长期滞留于肾小管中演变而来。蜡样管型的出现提示肾小管有严重病变，预后差。

5）其他管型：尿液中还能检测到的其他管型如宽大管型（亦称肾功能衰竭管型）、混合管型、脂肪管型和细菌管型等。这些管型的检出均有临床意义。但结晶管型与类管型应和上述病理性管型相区别：结晶管型粗大不一，结构粗糙、断裂，其与该类结晶的临床意义相同。一些圆柱体、黏液质、纤维等形成的类管型与上述真管型不同，必要时可用染色法来鉴别。

3．结晶

尿液中有无结晶析出取决于该物质在尿液中的溶解度、浓度，尿液的pH 值、温度及胶体状况等因素。尿液中大多结晶属代谢性，来自饮食，一般无重要临床意义。

1）磷酸盐结晶：包括无定形磷酸盐、三联磷酸盐、磷酸镁铵、磷酸钙等，见于碱性尿中，一般属正常代谢产物。如患者尿中长期出现磷酸盐结晶，应注意磷酸盐结石的可能，也有磷酸钙与草酸钙混合的结石。

2）草酸钙结晶：为无色发光方形八面体，有两条对角线互相交叉，有时为较小颗

粒呈哑铃状或饼状，需与红细胞区别。少量草酸钙属正常尿液代谢排泄物，但又是尿路结石的主要成分之一，尿中出现较多草酸钙结晶且伴有血尿和肾绞痛者，应注意有结石的可能。

3）尿酸盐结晶：尿酸为机体核蛋白中嘌呤代谢的终产物，以尿酸盐的形式排出。多食含嘌呤的动物食品会导致尿中尿酸盐结晶增加；急性痛风患者肾小管对尿酸的重吸收障碍，也可导致高尿酸盐尿。

4）氨基酸结晶：主要有胱氨酸结晶，它由蛋白质分解而来，多由某些代谢性遗传病引起，长期胱氨酸尿可引起结石；尿液中的亮氨酸与酪氨酸结晶也是蛋白质分解产物，正常尿液中不易见到，它的出现可见于大量的组织坏死性疾病如急性肝坏死、急性磷中毒、糖尿病酮症酸中毒昏迷等情况。

5）胆固醇结晶：在尿液中呈方形薄片状，在尿沉渣中很少见到，可见于乳糜尿中。

6）磺胺类药物结晶：某些磺胺类药物在尿中析出结晶引起血尿或肾损伤。不同的磺胺类药物在尿中结晶形态不同，除了在显微镜下识别之外，磺胺还可溶于丙酮溶液。如在尿中查到大量的磺胺类药物结晶，同时有红细胞和管型存在，则表示药物对肾脏已有损害，应立即停药，并大量饮水、服用碱性药物使尿液碱化，可减轻肾损害。

4．尿液中的其他有形成分

1）寄生虫：尿液中的寄生虫主要是阴道毛滴虫，形态略大于白细胞，呈倒置梨状、有鞭毛，在新鲜尿液中会运动，一般伴有红细胞渗出。滴虫可引起外阴部瘙痒、刺激、灼痛，部分患者可以累及尿道、膀胱以及男性前列腺。

2）精子：在性交后或遗精者尿中可见，除鉴别作用外，一般无意义。

3）细菌：大量细菌和白细胞同时出现提示泌尿系统感染，但尿液中的细菌应通过培养确认是否为致病菌。普通尿沉渣检查不适合细菌鉴别。泌尿系统器官患结核时，结核杆菌可随尿液排出。需做此项检查时可留取24h 尿液，以甲醛防腐，用沉淀浓集或有机溶剂（汽油）漂浮的方法，浓集漂浮后作抗酸染色。要注意与尿液中常见的耻垢杆菌相区别。

4）霉菌：某些长期应用抗生素治疗或器官移植后应用免疫抑制剂患者，新鲜尿中可检到霉菌的芽孢或菌丝，提示有霉菌生长。

二、Diasys 尿沉渣分析系统

在尿液沉渣自动化分析仪普及应用之前，尿液有形成分分析标准化是当前各实验室迫切需要解决的问题。虽然尿沉渣检测板提供了一个相对标准化的结果和定量的概念，但检测板本身的标准化问题和一次性应用未能很好解决，且手工操作较繁琐、费时，目

前还没有在各实验室普及。Diasys 尿沉渣分析系统及工作站则提供了一个尿沉渣检验相对标准化和定量化的结果，并能与干化学分析仪联机实现网络化管理。

【原理】

Diasys 尿沉渣分析系统的核心是流动计数池，它是由高清晰度的光学玻璃与合金钢板组成，计数池高度0.127mm，每视野小格体积为0.01μl。当沉渣悬液吸人工作站，计数池中的沉渣成分通过带摄像装置的显微镜传输到电脑显示屏上，操作人员可在屏幕上清晰地识别、计数各有形成分，也可以在显微镜下计数。数值输入电脑即可直接推算出1μl 尿中的有形成分数。由于工作站与尿液干化学分析仪联机，尿液沉渣分析和干化学分析结果一起在尿液分析报告单中打印出来，并存储或传送到医院计算机网络。

【操作】

1）开机：开启电源，按仪器操作说明进入尿液分析系统程序。

2）标本处理：在专用刻度离心管内倒人混匀的尿液10ml，进行干化学分析后，1500r/min 水平离心5min，弃去上清液，在缩窄的底部留尿沉渣液0.2ml。

3）进样与计数：混匀浓缩的沉渣液，插入吸样针，按“Sample”键，吸样于计数池中，液流稳定后即可在屏幕上观察计数。

4）报告：点击计算机输入窗口的尿沉渣各成分，输入观察到的数目与稀释倍数，计算机自动以“××/μl”的形式报告。

【注意事项】

1）此尿沉渣分析系统得出是一个相对定量结果，应严格按操作说明书操作。

2）沉渣计数池是该工作站的核心部件，需妥善保养，遇有酸、碱性结晶沉积，要用相对应的碱、酸溶液浸泡后用蒸馏水洗涤；如遇霉菌沉积则可用次氯酸钠洗液浸泡、洗涤。

三、尿沉渣自动化分析

随着计算机技术的发展及流式细胞术的开发应用，尿沉渣自动化分析技术不断成熟。以下以UF—100 型尿分析仪为例介绍。

【原理】

应用流式细胞术和电阻抗法相结合的原理，当染色标本在鞘流作用下通过流动池激光束的照射时，发出不同强度的荧光（Fe）和散射光（仪器测定的是前向散射光强度Fsc）。前者反映细胞的定量特性，如细胞膜、核膜、线粒体和核酸的量；后者反映细胞的大小，加上这些有形成分的电阻抗信号，经计算机综合分析后，产生每个尿液标本直方图。通过分析每个有形成分在直方图上的不同位置和数量，即可进行尿液沉渣的定量分析。

【操作】

在15mm ×100mm 试管中，倒人已混匀的尿液至4/5 体积（自动进样标本不少于4ml），按10 个1 组依次置于样品架上机检测，仪器自动混匀标本后，吸取0.8ml 进行分析。

【注意事项】

（1） 尿液标本必须新鲜，否则会引起红细胞形态改变甚至溶解。

（2） 尿液pH 值和渗透浓度对红细胞有影响，当检测结果与临床不符时，要考虑上述因素。

（3） 标本放置不宜过久，因细菌繁殖等小颗粒物质会影响红细胞计数和形态分类。

【临床意义】

凡能在显微镜下看到的尿沉渣均能被分析仪检出，其细胞、管型、结晶均与镜检意义一致。但用两种以上染料染色，经流式细胞原理分析的结果能进一步反映细胞化学特性。

1．红细胞

尿液中红细胞直径6～8μm。由于红细胞没有细胞核和线粒体，因此，其荧光很弱。另外，红细胞体积较小、大小不一，前向散射光（fsc）弱，在散射图上位于左边，从上到下呈一狭长带型。仪器除了能报告每微升尿的红细胞数量与相当于高倍镜下每视野红细胞数外，还可以报告红细胞其他参数，如均一性（isomorphic）红细胞的百分比和非均一性（dysmorphic）红细胞的百分比。前者红细胞形态正常、一致，为非肾性血尿；后者为肾性血尿，红细胞形态大小不一，变形红细胞占多数。UF －100 型尿分析仪根据Hyodo 标准可判断红细胞形态，一般肾性血尿其红细胞－P70Fsc ＜100ch（ch 荧光信号强度单位）。

2．白细胞

尿液中的白细胞略大于红细胞，仪器检测到的Fsc 比红细胞强；因白细胞有核，因此，具有高强度的前向荧光，此两点即能将白细胞与红细胞明显区别开来并准确地计数。白细胞存活时，前向散射光强，前向荧光弱；当白细胞受损或死亡时，则相反。因此，自动尿沉渣分析仪不仅能报告每微升高倍镜视野的白细胞数量，而且能报告存活白细胞的百分比，临床以此来推断急性感染、慢性感染或感染恢复期。

3．上皮细胞

上皮细胞由于胞体比较大，有核，在自动沉渣分析仪上显示的散射光与荧光强度都比较强，除了能给出上皮细胞的定量参数以外，仪器还标出小圆上皮细胞的数量，但仪器尚不能明确区分肾小管上皮细胞、中层或底层移行上皮细胞，如果上皮细胞数量较

多，还需通过镜检确认。

4．管型

由于管型有特殊的结构与形态，仪器可以报告每微升或每低倍镜视野的管型数，标出管型或病理性管型，但要确认哪一类管型，仍需离心后镜检。

5．细菌

细菌由于体积小，所以前向散射光比红细胞、白细胞更弱；但因含有一定量的DNA 和RNA，其荧光强度介于红细胞与白细胞之间，故细菌分布在第一个散射图的红细胞与白细胞之间的下方区域。细菌达到一定的数量，对泌尿系统细菌感染的诊断有一定意义。

6．其他

全自动尿液沉渣分析仪还能报告酵母细胞、精子、结晶，其临床意义见“尿液沉渣显微镜检查”。此外，仪器还报告尿液的导电率（conductivity），可反映尿液溶解物质带电荷的量，对糖尿病、尿崩症的鉴别诊断，监控结石的发生均有一定意义。

第六节　其他检验

一、妊娠试验

妊娠开始，受精卵子移行到子宫腔内着床，胚胎形成。胎盘滋养层细胞即产生大量的人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，HCG），HCG 可通过孕妇血液循环而在尿液中排出。妊娠1～2 周时，血清与尿中的HCG 水平即可迅速升高，第8 孕周左右达到高峰，随后逐渐下降，并一直维持到妊娠末期，因此，测定尿液中的HCG 即可诊断是否早期妊娠。

HCG 是胎盘绒毛膜滋养叶细胞产生的一种多肽类激素，属于糖蛋白。早年曾用生物学方法（如家兔或雄蟾试验）测定，现在普遍采用免疫学方法来测定，并可以进行精确定量。其中适合于常规操作，简便、易行的定性试验有金免疫标记技术和乳胶凝集抑制试验等。

（一）金免疫标记法早早孕试验

【原理】

常用的金免疫标记法有斑点免疫渗滤试验和斑点免疫层析试验。以斑点免疫渗滤试验为例：在硝酸纤维素膜的膜片中央滴加纯化的HCG 抗体，可被膜吸附。当尿液渗滤

过膜时，标本中的HCG 被膜上抗体捕获，其他无关蛋白则滤出膜片。其后加入的胶体金标记抗体在渗滤中与已结合在膜上的抗原结合，因胶体金本身呈红色，出现红色斑点即为阳性反应。

【试剂】

HCG 胶体金反应板、金免疫标记物 (胶体金－抗β－HCG)、洗涤液、阴性对照、阳性对照。

【操作】

1) 于反应板滤器小孔中滴加新鲜尿液5 滴，待尿液完全渗入后去除滤器。

2) 立即滴加金免疫标记物3 滴。

3) 待液体完全渗入膜下，滴加洗液1～2 滴。

4) 待洗液完全渗入膜下后观察结果。

【结果判断】

在小孔膜中央出现红色圆点者为阳性，其色泽深浅与尿中HCG 浓度呈正相关。无斑点出现为阴性。

【注意事项】

1) 不同厂家的试剂操作方法略有不同，需严格按说明书操作。

2) 吸取尿液时，用一次性滴管。

3) 试剂应保存在4℃冰箱，临用时温度需平衡至室温。

4) 应在强光线下观察结果，若出现很弱斑点时，应建议2d 后留尿复查。

5) 本法灵敏、特异，操作简便，是目前常用的方法。

(二) 胶乳凝集抑制试验

【原理】

将待检尿液先与抗HCG 抗血清混合，若尿液中含有HCG，则尿中HCG 与抗体结合而中和之，再加入HCG 致敏胶乳时，不发生凝集。反之，非妊娠尿中不含HCG，则抗血清与HCG 致敏胶乳结合，产生凝集，此即为凝集抑制试验。

【试剂】

抗HCG 抗血清 (若为抗HCGβ亚基单克隆抗体则更好)、HCG 致敏胶乳、黑底反应瓷板 (可分成若干方格)。

【操作】

尿液离心后，取上清液1 滴于反应板上，加抗HCG 抗血清1 滴，混合轻摇1min，再加胶乳抗原1 滴，连续摇动2min，观察结果。

【结果判断】

胶乳凝集成颗粒状为阴性；胶乳仍为均匀乳状，则为阳性。

【注意事项】

用于妊娠试验的免疫学方法除了金标记法和胶乳凝集抑制试验以外，还有用于定量测定的放射免疫法、酶联免疫吸附试验及免疫发光技术，各实验室可根据自己的条件与要求选择测定方法。

【临床意义】

上述两个试验是定性试验，主要用于妊娠诊断，也可用于与妊娠相关疾病和肿瘤的诊断及鉴别诊断。过期流产或不完全流产，子宫内有活胎盘组织残留，本试验均可呈阳性。宫外孕时，HCG 水平虽低于正常妊娠，但亦可呈阳性，有助于与其他急腹症鉴别。葡萄胎、恶性葡萄胎、绒毛膜上皮癌及男性睾丸畸胎瘤等恶性肿瘤，HCG 水平异常升高，需做稀释试验，或用其他免疫学方法行HCG 定量测定。这些疾病的疗效观察和随访亦必须定期进行HCG 测定。

二、红细胞形态检查

血尿分肉眼血尿和镜下血尿，根据病因又分生理性血尿和病理性血尿。病理性血尿根据出血部位不同，又分肾小球性血尿和非肾小球性血尿。目前鉴别方法有显微镜法、血液细胞分析仪法、尿沉渣自动分析仪法和扫描电镜法。

㈠ 显微镜玻片过筛法

取中段尿（或清晨第二次尿）10ml，倒入锥形一次性刻度离心管中，1500r/min 水平离心10min，弃上清液，留取0.25ml 尿沉渣，混匀后取1 滴于载玻片上，用18mm × 18mm 盖玻片覆盖，于高倍镜下观察红细胞形态。

㈡ 相差显微镜分析法

⑴ 取中段尿（或清晨第二次尿）10ml，倒入锥形一次性刻度离心管中，1500r/min 水平离心10min，弃上清液，留取0.25ml 尿沉渣备用。

⑵ 取1 滴混匀的尿沉渣于载玻片上，用18mm ×18mm 盖玻片覆盖，并在相差显微镜下，用高倍镜观察红细胞形态，要求分类200 个以上红细胞。相差显微镜下尿液红细胞形态如下：①芽孢状（亦称棘形）红细胞：血红蛋白凸出或内陷于膜内，似芽孢状。②环状（面包圈形）红细胞：血红蛋白分布于边缘，细胞膜呈致密双圈形平坦状，红细胞中央空洞状或中央暗淡区很大。③靶形红细胞：中央有一致密的血红蛋白点状区（一发光点），四周血红蛋白似目靶状环行分布。④淡影红细胞：细胞膜极薄，胞内血红蛋白含量少，整个细胞只有边界有一光环，中央暗区极大。⑤锯齿形红细胞：细胞表面有

短的突起，但大小高低基本一致，血红蛋白含量丰富。⑥裂片形红细胞：半圆盘状，带2～3个尖端突起，呈极小不规则碎片。

【注意事项】

1）标本应在2h内完成检测，尿渗透浓度＜700mmol/L或PH＞7.0时，红细胞形态会发生改变。

2）离心速度不宜过高或过低，否则易使红细胞破碎或使红细胞收集不全，导致隐匿性肾性血尿的漏检。

3）镜检时，红细胞应与脂肪滴、草酸钙结晶、真菌孢子及酵母菌相区别。

㈢ 血液细胞分析仪法

【原理】

按照血液细胞分析仪检测原理，红细胞直方图体积分布显示范围24～360fl，大于36fl的颗粒计数为红细胞，小细胞群约分布在30～85fl区域，红细胞体积的大小在红细胞分布宽度曲线上反映出来。

【操作】

1）取新鲜中段尿（或清晨第二次尿）10ml倒入锥形一次性刻度离心管中，1500r/min水平离心10min，弃去上清液9.5ml，将沉淀物混匀后置高倍镜下观察。若白细胞少于5个/HP，红细胞大于30个/HP者，作为实验样品上机分析。

2）吸取以上沉渣液适量（根据红细胞定量检测结果），加稀释液上机测定（同血液细胞的自动化分析）。

【注意事项】

1）尿液标本必须新鲜，否则会引起红细胞形态改变甚至溶解。

2）尿液pH值和渗透浓度对红细胞有影响，因此，尿液需用稀释液适量稀释、平衡后上机测定。

3）标本放置不宜过久，因细菌繁殖等小颗粒物质会影响红细胞计数。

4）标本中白细胞及上皮细胞均应少于5个/HP，否则易干扰红细胞体积分析。

5）留样前适当饮水以排除各种盐类结晶的干扰。

【临床意义】

1.MCV测定结果

如果分别以MCV≤60fl、≤65fl、≤72fl、≤80fl作为诊断肾小球源性血尿指标，其诊断价值见表3－1－1。

表3－1－1　不同MCV 值诊断肾小球源性血尿价值

MCV（fl）	灵敏度	特异度	假阳性	假阴性	粗一致性	调整一致性	约登指数
≤60	65.9	94.9	5.1	34.1	79.5	81.5	0.61
≤65	77.3	89.2	12.8	22.7	82.0	82.0	0.64
≤72	84.1	84.6	15.4	15.9	84.3	84.3	0.69
≤80	88.6	79.5	20.5	11.4	84.3	84.3	0.68

2．红细胞分布曲线

正常尿液曲线在20～30fl 形成一小峰。100％肾小球源性血尿红细胞体积分布曲线在50fl 以内有一个明显的峰，呈不规则、不对称分布。而混合性血尿则在25～35fl 和85～110fl 范围内有2 个峰。100％非肾小球源性血尿在50～150fl 内有一个宽大平滑对称的峰，同时90％的标本在30～35fl 之间亦有一小峰。

3．红细胞体积分布宽度（RDW）

由于血液细胞分析仪检测范围有限，RDW 过高或过低时，仪器均不能显示结果。70％肾小球源性血尿RDW 超过正常范围。

4．血尿来源鉴别

见表3－1－2（仅供参考）。

表3－1－2　血尿来源的鉴别要点

项目	肾小球源性血尿	混合性血尿	非肾小球源性血尿
形态及异形率	异形红细胞≥3 种，异形率≥70％；或芽孢状、靶状、环状≥30％	异形＞2 种，异形率20％～70％	异形红细胞≤3 种或异形红细胞≥3 种但异形率＜20％
沉渣红细胞定量	不定	不定	不定
MCV 曲线	左移、MCV ＜70fl	MCV70～90fl	右移、MCV ＞90FL
病因	肾小球肾炎、ISA 肾病、狼疮肾炎、肾病综合征、肾衰竭、尿毒症、局灶性肾动脉硬化、肾淀粉样变	结合临床	膀胱炎、泌尿系肿瘤、结核、结石、急性肾挫伤等多为均一性血尿

㈣　尿沉渣自动分析仪法

用流式细胞术分析原理进行尿沉渣红细胞形态检测，方法参见本章第五节尿液沉渣

分析。

【临床意义】

尿红细胞数量和形态检查有助于鉴别血尿来源，鉴别诊断与血尿有关的疾病如肾炎、膀胱炎、肾结石、肾结核等，并通过动态观察了解疗效。

三、浓缩稀释试验

【原理】

正常肾脏对体内水平衡有调节能力。在正常膳食中给予一定水分，观察日间各次尿液及夜间尿液的量和相对密度的变化，以检测肾功能是否减退。

【操作】

1）受试者按平时习惯进食，不再另外饮水。晨8：00 排尿弃去，自10：00 起至20：00 止，每隔2h 收集尿液1 次，此后至次日晨8：00 合并留1 次，共7 次尿液。

2）测量并记录每次尿量和相对密度。

【临床意义】

1）正常人夜间尿量不超过全日尿量的1/3；夜间尿液的相对密度明显高于日间尿液，可达1.020 或更高；日间尿液的相对密度随饮食中含水量而有所变动，约1.005～1.020，其差异不小于0.008～0.009。

2）若出现下列情况，则为肾浓缩功能减退：夜间尿量＞750ml；尿液最高相对密度＜1.018；相对密度之差减少，相对密度固定在1.010 左右。

四、酚红排泄试验

【原理】

酚红（酚磺肽，PSP）是一种对人体无害的指示剂，注入人体后小部分滞留于肝脏，其余经肾小球滤过，大部分经肾小管分泌排出，当肾小管有病变时排出量减少。酚红在碱性溶液中显红色，因此，酚红排出量可通过尿中加碱予以测定。

【试剂】

6mg/ml 酚红注射液、50g/L 氢氧化钠溶液、100g/L 氢氧化钠溶液。

酚红标准管：6mg/ml 酚红注射液1ml，加100g/L 氢氧化钠溶液10ml，并加蒸馏水至1L，此为100%的酚红标准液。取管径相同的10ml 试管11 支，按表3－1－3 稀释分装。

配好的标准比色管封口，贮于阴暗处，注明配制时间，并定期重配。

表3－1－3　酚红标准管的制备

试剂	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
标准液（ml）	7	6	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5
50g/L 氢氧化钠溶液（ml）	3	4	5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5
PSP 浓度（%）	70	60	50	40	35	30	25	20	15	10	5

【操作】

1）试验前2h 禁止喝水。

2）试验前20min 饮水300～500ml，以利排尿。

3）20min 后排尿弃去，用干燥无菌注射器静脉准确注射1ml 酚红注射液，并准确记录时间。

4）注射后15、30、60、120min 分别收集尿液，每次均排空膀胱。

5）记录每次的尿量，并分别倒入1000ml 量筒中，混匀后取10ml 加入与标准比色管管径相同的试管中，加100g/L 氢氧化钠溶液2 滴，显红色后与标准管比色。

6）报告每次酚红排泄率（%）及4 次相加的总排泄率（%）。

【参考值】

静脉注射后15min 的酚红排泄率>25%，2h 总排泄率55%～80%。

【注意事项】

1）酚红排泄试验亦可采用光电比色法，根据上述标准管在560nm 波长测定的吸光度值绘制成标准曲线，按实际测定的吸光度值在曲线上查得酚红排泄率（%），其他步骤同目视比色法。

2）1ml 酚红注射液是否全部注入静脉十分重要，注射时要见到明显“回血”才能缓缓推进静脉，推毕还要抽回少量血液“洗”针筒1 次，以确保酚红全部进入静脉。

3）标准管之间及标准管与测定管管径应一致。标准比色管要防止水分蒸发，用蜡封口或分装在同内径的安瓿中封口。阴暗处贮存，并定期重配。

【临床意义】

本试验主要用于检测肾小管的排泄功能。不同程度的肾小管功能损害会引起相应的酚红排泄率减低。1h 排泄量减少，2h 排出量反而增高，总排出量在参考范围以外视为异常。急性肾小球肾炎时，由于病变在肾小球，故酚红排泄率可正常。

一些偶见的情况酚红排泄率可以增加，如甲状腺功能亢进、早期高血压、阻塞性肝病等。

五、三杯试验

本试验主要用于男性泌尿系统感染患者，借以了解和区别炎症所在部位。由于该法特异性不强，尿液留取难以掌握，结果仅供参考。

【操作】

取尿杯3 个，分别标明1、2、3。第2 杯大些，嘱患者连续排尿，分别收集于3 个杯中。第1、第3 杯各留尿10ml，其余大部分留于第2 杯中。标本留取后立即送检，分别观察3 杯尿液的外观，并进行显微镜检查。

【注意事项】

收集尿液时要连续排尿，中间不可间断。

【临床意义】

根据尿3 杯试验结果作出初步诊断，见表3—1—4。

表3—1—4　尿3 杯试验结果的鉴别

初步诊断	第1 杯	第2 杯	第3 杯
急性尿道炎（前尿道）	有弥散脓液存在	清晰	清晰
亚急性或慢性尿道炎	有脓液存在	清晰	清晰
尿道以上的泌尿系统感染	有弥散脓液存在	同第1 杯	同第1 杯
前列腺炎、精囊炎	清晰	清晰	有弥散脓液存在
尿道炎和前列腺炎	有脓液存在	清晰	有弥散脓液存在

六、12h 尿沉渣计数（Addis 计数）

【标本收集】

试验当日，除正常饮食外不再饮水，以利尿液浓缩（因低渗会导致部分红细胞与管型溶解）。19∶00 时，嘱患者排尿液弃去后，准确留取至次日晨7∶00（共12h）的全部尿液。女性留尿前要清洗外阴。夏天则要先加甲醛1ml 防腐。

【操作】

（1）测量12h 尿量并记录。

（2）取混匀尿液10ml 于刻度离心管中（如有结晶则微加热或加弱酸除之），低速离心10min，弃上清液，留取1ml 尿液。

（3）将沉淀物混匀，充入血细胞计数池内，计数10 个大方格内的红细胞、白细胞（包括小圆上皮细胞）和管型数。

【计算】

$$N = (100 \times C \times V) / 10$$

式中N 为12h 尿液细胞数或管型数，V 为12h 尿量，C 为10 个大方格的细胞或管型数。

【参考值】

正常人12h 尿液红细胞＜50 万，白细胞（包括小圆上皮细胞）＜100 万，管型＜5000 个。

【注意事项】

此法费时且误差大（因计数误差及高稀释倍数导致），目前已基本被1h 尿沉渣计数所取代，方法雷同。

【临床意义】

各类肾小球肾炎患者尿中细胞和管型可轻度增高或显著增高；肾盂肾炎与其他尿路感染者细胞数明显增高。

第七节　尿液分析的质量控制

一、标本采集、运送和保存

1）实验室工作人员、医生、护士必须对患者留尿方法进行指导。

2）容器：采用清洁、干燥、有盖、体积＞50㎖、直径＞4㎝ 圆形开口的一次性塑料容器，应用时贴上检验单联号，便于查对。

3）标本采集：根据不同检验目的，留取晨尿和餐后2h 尿、12h 尿、24h 尿及随机尿。尿量应不少于50㎖。女性患者应冲洗外阴后留取中段尿，新生儿采集尿液时，应冲洗外阴部或用特殊方式留尿。

4）标本运送和保存：标本留取后应立即送检，并在2h 内完成检测。如不能及时送检或分析，可冷藏（不得超过6h）或根据检验目的，加入适量相应的防腐剂。

5）实验室标本验收：检验申请单（化验单）应填写患者姓名、性别、年龄、科别、床号、病案号、标本类型、临床诊断、应用的主要药物、采集标本的时间、实验室接收标本的时间以及申请检验的项目。尿液标本容器的标签填写应与检验申请单内容一致。尿液标本的种类、尿量应符合所申请检验项目的要求。尿液应及时送检，并实施正确的防腐措施。收集尿标本的容器及过程均应符合实验要求。

二、尿液干化学分析仪的质量控制

1）新购仪器必须进行全面鉴定合格后方能使用。使用中应严格按操作说明书进

行，并建立完整的管理制度。

2）尿试带必须质量可靠，并按说明书进行保存。使用时必须注意不同厂家、不同批号试带的敏感性以及划分半定量等级标准及有效期等。

3）对使用中的仪器，要根据厂家对仪器的要求和操作需要进行校正。

4）室内质控：每日工作前将正常、异常两种浓度的质控物置室温，使其与室温一致后进行检测，检测结果符合要求时再进行尿标本检测。若质控物的检测结果失控，须查找原因纠正后方能进行标本检测。每天最好使用同一批号质控标本，并将检查结果标入质控图，从中观察质控物每日的变化。

5）干化学分析仅起筛选作用，尿液分析仪不能完全替代尿液传统的化学分析与显微镜检查，要结合临床综合分析，以选择尿液传统化学分析或显微镜检查进行复查。2001 年浙江省临检中心发文规定下列情况必须镜检：①使用各种型号的尿分析仪，对患者的尿液均应离心沉淀后镜检；②健康体检者尿液除了被检标本的白细胞、红细胞、尿蛋白、亚硝酸盐4 项检测结果均为阴性时，可不作镜检，其余均应作镜检；③医师指定要求做沉渣镜检的标本。

三、尿液沉渣显微镜检验的质量控制

1）离心管：尿液沉渣显微镜检验所用离心管形状不同，可引起尿沉渣有形成分数量的变动，故尿液离心管应具备以下条件：清洁、透明、带刻度，刻度至少应标明10㎖、1㎖、0.2㎖，容积>12㎖，试管底部呈锥形或缩窄形。最好使用一次性塑料或玻璃离心管。

2）离心速度：用回转半径15c㎝ 水平式离心机，相对离心力为400g，离心时间5㎜in。离心机转速与相对离心力的换算公式如下：

相对离心率（g）=1.118 ×10^{-5} ×N ×R 式中N 为每分钟转数（r/㎜in）；R 为半径，指从离心机轴中央到离心管底部的距离。

3）尿量及尿沉渣残留量的留取方式：留总尿量10㎖，吸引排出上清液，尿沉渣残留量应为0.2㎖。轻摇混匀。

4）尿沉渣镜检标本制备：取尿沉渣1 滴于载玻片上，用18㎜ ×18㎜ 盖玻片覆盖尿沉渣。由于此法不能达到标准化的要求，故建议使用标准化的尿沉渣计数板。

5）尿沉渣镜检：①用标准化的尿沉渣计数板计数，按说明书要求操作。②盖片法直接计数要求目镜10 倍、物镜10 倍和40 倍；观察有形成分及管型用10 ×10 镜；鉴定细胞成分和计数用10 ×40 镜。观察尿细胞10 个以上视野所见的最低和最高值，记录结果。管型用高倍镜鉴定，但计数量按低倍镜观察20 个视野算出1 个视野的平均值，记录结果。

6）报告形式：①尿液细胞和管型以××/μl 报告。②尿液细胞以××/HP 报告，尿液管型用每低倍视野平均值报告，尿液结晶和盐类以每一高倍视野＋、＋＋、＋＋＋、＋＋＋＋报告。

7）提倡使用尿沉渣染色检查，以便于识别各种有形成分，提高鉴别能力。

8）有条件的实验室可使用各类自动、半自动尿沉渣分析仪，但仪器必须经权威机构认可。

四、实验室间质量评价

1．方法

卫生部临床检验中心和浙江省临床检验中心组织的室间质量评价均按仪器、试带分组进行比较、评价，方法基本相同。

1）评价方法：在允许范围内得分为100％，超出允许范围得分为0。

2）允许范围：pH 值、相对密度为靶值±3s；亚硝酸盐、白细胞为靶值（以阴性或阳性报告）；隐血（或红细胞）、蛋白、葡萄糖、酮体、胆红素、尿胆原为靶值±1 个量级。

3）靶值设定：参照质控物供应商提供数据，以本组回报单位最多的量级为靶值。

2．注意事项

1）收到标本后若不立即测定应放人4℃冰箱保存。测定时从冰箱中取出，使温度升至室温后按规定的容量复溶，轻轻混匀，使干粉完全溶解，但不能产生气泡，并放置室温30min。然后用尿液化学分析试带在仪器上按照常规方法测定，按要求报告结果。

2）为便于数据统计并进行比较，结果要求换算成国际单位或报表中给出的单位。

3）认真填写回报表中各项内容，字迹须工整，不得遗漏，以免内容不完整无法进行分组统计。测定结果须经检验科主任审核签名后及时回报。由于目前发放的质控物只适用于尿液干化学分析，若测定中有些项目不用试带分析，则不要将用其他方法测定的结果填写在回报表中。当评价结果返回实验室后，应仔细核对与参考值间的差异。差异较大时，应查找原因，及时纠正，以最大限度地提高实验的准确性。

第二章　粪便检验

粪便主要由消化后未被吸收的食物残渣、消化道分泌物、大量细菌和无机盐及水等组成。粪便检查的目的是了解消化道有无炎症、出血、寄生虫感染、恶性肿瘤及有无致病菌等以协助诊断。

第一节　标本的采集及处理

粪便标本的采集方法直接影响检验结果的准确性，通常采用自然排出的粪便，且视检查目的的不同而异。

1）做常规检查应取新鲜的标本，盛于洁净的不渗水容器内（如塑料杯），选取含有黏液、脓血等病变成分的粪便。

2）查痢疾阿米巴滋养体时应于排便后立即检查。从脓血和稀软部分取样，冬季取样时应注意保温。

3）检查血吸虫卵时应取黏液、脓血部分，如需孵化毛蚴应留取30g 粪便尽快处理。

4）检查蛲虫卵须用透明薄膜纸于24 :00 左右或清晨排便前由肛门口周围拭取立即镜检。

5）找寄生虫虫体或虫卵计数时应采集24h 粪便进行检查。

6）做化学法隐血试验时，应尽量于检查前3d 内禁食肉类及含动物血的食物，并禁服铁剂和维生素C 。

7）无法排便而又必须检查时，可经肛门用肛拭子采便。

8）标本的处理：粪便检验后应将容器焚烧，所用载玻片需用5 %煤酚皂液浸泡消毒。

第二节　一般性状检查

一、颜色

正常人粪便为黄褐色成形便，质软；婴儿粪便可呈黄色糊状；病理情况下可出现灰白色、绿色、红色、柏油样、酱色及米泔水样。

二、性状

粪便性状视其情况可报告为软、硬、糊、泡沫样、黏液样、冻状、脓血样、稀糊状、米泔样及乳凝块等。不同的粪便性状可反映不同的生理状况和病理改变。

1）黏液便：正常粪便中的少量黏液因与粪便混合不易看见，若有肉眼可见的黏液，说明其量增多。见于各类肠炎、细菌性痢疾、阿米巴痢疾、急性血吸虫病。

2）溏便：便呈粥状且内容粗糙，见于消化不良、慢性胃炎等。

3）脓状便：肠易激综合征患者常于腹绞痛后排出黏脓状、膜状或纽带状物，部分慢性细菌性痢疾患者也可排出类似粪便。

4）脓性或脓血便：说明肠道下段有病变。常见于痢疾、溃疡性结肠炎。

5）鲜血便：见于直肠息肉、结肠癌、肛裂及痔疮等。

6）柏油样黑便：上消化道出血时，红细胞被胃肠液消化破坏，释放血红蛋白并进一步降解为血红素、卟啉和铁等产物，使粪便变黑。上消化道出血量约50～75ml时，即可出现柏油样便。

7）泔样便：呈白色淘米水样，内含黏液片块，量大，见于霍乱或副霍乱患者。

8）白陶土样便：由于各种原因引起胆管梗阻，进入肠内的胆汁减少或缺乏以致粪胆素生成相应减少，使粪便呈灰白色。主要见于阻塞性黄疸。

三、寄生虫体检查

蛔虫、蛲虫、绦虫等较大虫体或其片段肉眼即可分辨，钩虫体须将粪便冲洗过筛后方可看到。

第三节　显微镜检查

一、直接涂片法

【操作】

1）以竹签挑取含黏液脓血部分。若为成形便则自粪便表面、深处及粪端多处取样，混悬于有1滴9g/L氯化钠溶液的洁净玻片上制成薄片，厚度以能透视纸上字迹为宜。

2）先用低倍镜观察全片有无虫卵、原虫、包囊、寄生虫及血细胞等。粪便中常见有蛔虫卵、钩虫卵、鞭虫卵、蛲虫卵、华支睾吸虫卵、血吸虫卵、姜片虫卵、绦虫卵等。在识别虫卵时应注意虫卵大小、色泽、形状、卵壳的厚薄、内部结构等特点，认真

观察加以鉴别。

3）再用高倍镜详细检查病理成分的形态和结构（主要为红细胞、白细胞、巨噬细胞、肠黏膜上皮细胞、肿瘤细胞）及各类结晶。

4）结果报告：通常要观察10个低倍视野，以低倍视野所见虫卵的最低数和最高数报告。再观察10个高倍视野，然后描述所见各类细胞和结晶及其数量，具体参照尿沉渣检查报告格式。

二、饱和盐水漂浮法

此法适用于检查钩虫卵、蛔虫卵及鞭虫卵。

【试剂】

饱和盐水：食盐400g 加水1L 煮沸冷却。

【操作】

1）取蚕豆大小粪便置于青霉素药瓶内，加入少量饱和盐水。

2）将粪便充分混匀，再加入饱和盐水至瓶口。

3）可用竹签挑去较大粪块，瓶口加载玻片恰好与液面接触。

4）静置15min，提起玻片迅速反转镜检。

5）结果以“未找到虫卵”和“找到××虫卵”报告。

三、清水沉淀法

【操作】

1）粪便约20g 置小杯中加入少许水，用竹签捣碎，使成糊状，用纱布过滤除去粪渣，再加水500ml 静置20～30min。

2）小心倾去上面4/5 液体，再加清水500ml，静置约30min 再倾去上清液，留下底部沉渣混匀后，用吸管吸取，置玻片镜检。

3）结果报告同上。

四、原虫及包囊检查法

肠寄生原虫包括阿米巴原虫、隐孢子虫、鞭毛虫、纤毛虫和人芽囊原虫。注意它们的形态学检查和鉴别要点。

【试剂】

Denaldson 碘染液：碘化钾5g，碘4g，加9g/L 氯化钠溶液100ml。

【操作】

1）取粪便少许，涂于滴有9g/L 氯化钠溶液的玻片上，及时镜检各类原虫。

2）包囊可用9g/L 氯化钠溶液检查，也可用碘染液检查。包囊染色后，包囊壁、

包囊体及细胞核均清晰可见。

⑶ 结果以“找到××原虫或包囊”报告。

五、血吸虫卵沉淀孵化法

【操作】

⑴ 取新鲜标本约30g，放人广口容器内，加入少量清水调匀成糊状。

⑵ 用金属纱网或纱布滤去粪渣，将滤液放入500ml 三角烧瓶内，加水至瓶口，静置20～30min。

⑶ 如此操作3 次，待上层液体澄清即可。

⑷ 放人25～30℃孵箱或温室中，孵化4～6h，观察有无作一定方向运动的毛蚴。

⑸ 结果以“毛蚴孵化阳性”或“毛蚴孵化阴性”报告。

第四节　化学检查

一、隐血试验

【原理】

隐血试验目前主要采用化学法，如邻联甲苯胺法、联苯胺法、愈创木酯法等。这些方法基本原理相同，均基于血红蛋白中的血红素可促使过氧化氢分解释放新生氧，后者使各种色原物质氧化而显色。

㈠ 邻联甲苯胺法

【试剂】

10g/L 邻联甲苯胺冰醋酸溶液、3％过氧化氢溶液。

【操作】

⑴ 用竹签挑取粪便于滤纸上。

⑵ 滴加邻联甲苯胺冰醋酸溶液2～3 滴于粪便上。

⑶ 加3％过氧化氢溶液2～3 滴，立即观察结果。

【结果判断】

强阳性：立即显深蓝绿色；阳性：立即显蓝绿色；弱阳性：1min 内显蓝色；阴性：3min 内不显蓝色。

㈡ 试纸法

【试剂】

商品化隐血试验试剂盒。

【操作】

1）取试纸片1 张，用竹签挑取粪便1 块分别涂于试纸的A 窗和B 窗上。

2）加1～2 滴过氧化氢溶液于A 窗、B 窗的粪便上。

3）置反面观察显色情况。

【结果判断】

同邻联甲苯胺法。

㈢ 愈创木酯法

【试剂】

1）愈创木酯饱和液：取愈创木酯粉末2g，溶于95％乙醇100ml 内。

2）3％过氧化氢溶液。

【操作】

1）取粪便一小块，涂于白瓷板或滤纸上。

2）加愈创木酯饱和液1 滴，然后加过氧化氢溶液1 滴，30s 内观察颜色变化。

【结果判断】

30s 内显蓝色或蓝绿色为阳性，1min 后显色或无色为阴性。

【注意事项】

1）上述3 种方法特异性和准确度均较低，所用试剂不稳定且有毒性，外源性动物食品如血红蛋白、肌红蛋白等均可致检查结果呈假阳性，应特别注意。

2）为提高隐血试验的特异性并鉴别消化道出血部位，可采用免疫学检测方法，如单向扩散试验、对流免疫电泳、胶体金标记夹心技术等。此类方法具有很高的特异性、较好的灵敏度，一般血红蛋白含量0～2mg/L 或0.03mg/g 粪便即可检出，且不易受各种动物血红蛋白及食物干扰。另外，这类检测方法快速、方便，目前认为是普查大肠癌最适方法。缺点是价格昂贵，不适于常规检查。

㈣ 免疫学检测

【原理】

采用抗人血红蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体，特异地针对粪便中人血红蛋白的夹心式酶联免疫测定。

【操作】

1）取1 支试管或特制小塑料杯加入1ml 蒸馏水，挑取粪便少许，调成混悬液。

2）取隐血试条1 支，按操作说明将试条的反应端浸入混悬液中。

3）5min 内观察结果。

【结果判断】

若反应线和质控线同时呈蓝色即为阳性，若只有质控线呈蓝色为阴性，若两条线均不显色为试验无效。

【临床意义】

粪便隐血检查对消化道出血及肿瘤的诊断有重要价值。消化道溃疡、药物致胃黏膜损伤、肠结核、结肠息肉、钩虫病及消化道肿瘤时，粪便隐血试验常为阳性。消化道溃疡患者，隐血试验阳性率为40％～70％，呈间断阳性，消化道癌症患者，隐血试验阳性率可达95％，呈持续阳性。此外，流行性出血热患者的粪便隐血试验也有84％的阳性率。

二、粪胆色素检查

（一）粪胆素检查

【原理】

粪便中的粪胆素可与汞结合形成红色化合物。

【试剂】

氯化高汞液：氯化高汞5g，氯化钠0.5g，加蒸馏水100ml。

【操作】

1）于小试管内加入氯化高汞液3～4ml。

2）加少许粪便调匀，加热煮沸3min，立即观察结果。

【结果判断】

阴性：煮沸的粪渣不显色；弱阳性：煮沸的粪渣呈粉红色；阳性：煮沸的粪渣呈深红色。

【临床意义】

粪胆素是由粪胆原在肠道中停留进一步氧化而成。粪便中由于粪胆素存在而呈棕黄色，当总胆管有结石、肿瘤而完全阻塞时，粪便中因无粪胆素而呈白陶土色，本试验结果呈阴性。

（二）粪胆原检查

【原理】

无论定性或定量均采用 Ehrlich 法。反应后生成红色化合物，呈色深浅与粪胆原含量成正比。

【试剂】

1）饱和醋酸锌乙醇溶液：醋酸锌10g 加入95％乙醇100ml，用力振荡至饱和。

2）饱和醋酸钠溶液：醋酸钠140g 加入100ml 蒸馏水中加热至60℃冷却。

3）Ehrlich 醛试剂：将0.7g 对－二甲氨基苯甲醛溶于150ml 浓盐酸中，再将其缓慢倒入100ml 蒸馏水中，充分混匀置棕色瓶中。

【操作】

1）加10ml 饱和醋酸锌乙醇溶液于一试管中，再加入约2g 粪便，充分混匀过滤。

2）取滤液2.5ml 于一试管中加入Ehrlich 醛试剂2.5ml，15min 后加入5ml 饱和醋酸钠溶液，充分混匀观察结果。

【结果判断】

以白色为背景，从上到下观察，试管中出现粉红色者为阳性。

【参考值】

阴性。每100g 粪便中粪胆原量为75～350mg。

【临床意义】

低于或高于参考值可鉴别梗阻性黄疸或溶血性黄疸。

第三章　脑脊液检验

脑脊液是存在于脑室及蛛网膜下腔内的一种无色透明液体，主要由脑室脉络丛主动分泌和超滤作用产生，在脑内静脉系统不断地进行交换和吸收，维持神经系统内环境的相对稳定。脑脊液检验结果可反映出中枢神经系统的病理变化，如炎症、肿瘤、外伤、水肿、阻塞、缺血等，对神经系统疾病的诊断和治疗具有重要意义。

第一节　一般性状检验及化学检验

一、标本采集和处理

1）脑脊液标本由临床医生通过腰椎穿刺采集，必要时可从小脑延脑池或侧脑室穿刺获得。穿刺应顺利，避免将血液混入标本。

2）标本一般收集3 管，每管1～2ml。第1 管做细菌学检验，第2 管做化学或免疫学检验，第3 管做常规及细胞学检验。

3）标本应及时送检、及时检验，一般在1h 内完成检验，防止因细胞破坏、变性、自溶，糖分解及细菌溶解等影响检验结果。

4）为避免高蛋白标本凝固，必要时细胞计数管可加适量100g/L 的EDTA 盐抗凝。

二、一般性状检验

1．颜色

正常脑脊液为无色，但无色的脑脊液并不能排除神经系统疾病，如结核性脑膜炎、病毒性脑膜炎等脑脊液常呈无色透明外观。检验报告中的颜色以无色、微黄、黄色、红色、白色等描述。

1）红色：常因出血所致。应鉴别新鲜出血与陈旧出血，可通过3 管试验、离心试验、隐血试验来区别。前者离心后上清液无色、清晰，隐血试验阴性。新鲜出血一般为穿刺损伤所致，陈旧出血一般为蛛网膜下腔出血所致。

2）黄色：见于陈旧性出血，椎管梗阻、淤滞，黄疸等。

3）白色或灰白色：多见于化脓性脑膜炎，因白细胞增多所致。

4）绿色：见于铜绿假单胞菌、肺炎双球菌等所致的脑膜炎。

5）褐色或黑色：见于脑膜黑色素瘤等。

2．透明度

正常脑脊液清晰、透明。透明度以清晰、微混、混浊等描述。病理性微混或混浊多因细胞数增多（细胞数超过300 $\times10^6$/L）、蛋白质增加、细菌生长、异物等所致。结核性脑膜炎患者脑脊液可呈毛玻璃状，穿刺出血也可引起脑脊液轻度混浊。

3．凝固性

正常脑脊液放置24h，无薄膜形成，无凝块。凝固性以无凝固、有凝固、有凝块、有薄膜形成等描述。当脑脊液中蛋白质增多时（>10g/L），即出现凝固。各种脑膜炎，标本凝固的时间和性状是不同的。化脓性脑膜炎患者脑脊液可在采集后1～2h出现凝固（其中纤维蛋白原及细胞增多）；结核性脑膜炎患者脑脊液静置12～24h后，可形成薄膜，此膜涂片镜检结核菌阳性率较高。

三、化学检验

（一）蛋白质定性检验

正常脑脊液蛋白质含量明显低于血浆，仅200～400mg/L，不同部位的脑脊液蛋白含量有所不同（脑室50～150mg/L，脑池100～250mg/L，蛛网膜下腔150～400mg/L），一般以白蛋白为主，球蛋白微量（低于50mg/L），无优球蛋白和纤维蛋白原。

【原理】

脑脊液中的蛋白质遇饱和苯酚溶液，生成不溶性蛋白盐而形成混浊或沉淀。

【试剂】

饱和苯酚溶液：取苯酚（分析纯）10ml（有结晶时，先放入56℃水浴箱中加热融化），加蒸馏水至100ml，充分混匀，置入37℃温箱中数小时，见底层有苯酚析出，上层即为饱和苯酚溶液。避光保存。

【操作】

取饱和苯酚溶液约2ml于小试管内，加入离心后的脑脊液1～2滴，混匀，在黑色背景下观察有无混浊。

【结果判断】

－：无混浊，清晰；±：稍呈白雾状，对光不易看到，黑色背景下才能看到；＋：呈灰白色云雾状；＋＋：呈白色薄云状混浊；＋＋＋：呈白色絮状沉淀或白色浓云块状；＋＋＋＋：立即形成白色凝块。

【注意事项】

1）本法仅对脑脊液中的球蛋白起反应，但一部分正常人若脑脊液中白蛋白含量超过0.25g/L 时也呈弱阳性反应。

2）脑脊液最好离心后取上清液检测。

3）所有试管和滴管须十分清洁，以免检测结果呈假阳性。

4）检验最好在37 ℃水浴中进行，室温过低和苯酚饱和度低，均易致假阴性结果。

【参考值】

正常脑脊液蛋白定性检验呈阴性或极弱阳性。

【临床意义】

阳性常见于中枢神经系统的各种炎症，也可见于脑部肿瘤、脑和蛛网膜下腔出血、椎管内梗阻等。

（二）蛋白质定量检验

脑脊液蛋白定性试验阳性标本需进行蛋白质定量检验。检验方法参阅第四篇生物化学检验第二章蛋白质测定。

【参考值】

腰椎穿刺脑脊液：0.20～0.40g/L；脑池穿刺脑脊液：0.10～0.25g/L；侧脑室穿刺脑脊液：0.5～0.15g/L。

儿童脑脊液中蛋白质含量低于中青年，老年人蛋白质含量又高于中青年。

【临床意义】

脑脊液蛋白质含量增多，为血脑屏障破坏的标志，常见于中枢神经系统的各种炎症，也可见于脑部肿瘤、脑和蛛网膜下腔出血、脊髓压迫症、退行性变、药物（乙醇、苯妥英钠）中毒、多发性硬化等。脑脊液蛋白质含量减低少见，可见于硬脑膜创伤造成的脑脊液漏、气脑造影、甲状腺功能亢进等。

（三）葡萄糖定量检验

脑脊液葡萄糖定量检验方法与血液葡萄糖定量检验方法相同。由于脑脊液葡萄糖浓度仅为血糖的3/5，故为了提高测定的灵敏度，可将标本量加倍，最后结果除以2 即可。

【参考值】

成人：2.5～4.5mmol/L；儿童：3.1～4.4mmol/L。

【临床意义】

脑脊液葡萄糖浓度降低见于下列情况：脑部细菌性或霉菌性感染；脑膜肿瘤；神经梅毒；脑寄生虫病；低血糖；其他如标本未加盖，暴露时间长，致杂菌分解葡萄糖。

脑脊液葡萄糖增多见于早产儿及新生儿；血性脑脊液；饱餐或静脉注射葡萄糖后；影响到脑干的急性外伤或中毒；糖尿病患者（应注意因血液中葡萄糖含量增多而掩盖脑脊液中糖下降的现象）。

（四）氯化物定量检验

脑脊液中的氯化物测定方法同血液氯化物的测定，操作参阅第四篇生物化学检验第五章无机离子测定。

【参考值】

成人：120～130mmol/L；儿童：111～123mmol/L。

【临床意义】

脑脊液中的氯化物浓度高于血液（约1.2～1.3倍），这对维持脑脊液渗透压的平衡有较大的作用，但其易受血液氯化物浓度、脑脊液酸碱度、脑膜炎症渗出和粘连、垂体－间脑病变等因素的影响。脑脊液中氯化物减低常见于脑部细菌性或霉菌性感染，也见于因严重呕吐、肾病等所致的低氯血症等。病毒感染及尿毒症、肾小球肾炎、心力衰竭所致的高氯血症可使脑脊液中氯化物增高。

第二节　显微镜检验

一、细胞计数

（一）细胞总数计数

【操作】

1）直接计数法：将混匀脑脊液直接滴入计数池，静置2～3min，计数一定范围内的细胞数，换算为每升脑脊液中的细胞数。

2）稀释计数法：如标本中细胞数过多，可用9g/L氯化钠溶液稀释一定倍数，再按以上方法计数，计数结果应乘以稀释倍数。

（二）白细胞计数

【操作】

1）直接计数法：将标本混匀充池根据形态计数白细胞。对红细胞多的标本，可用吸管吸取少量冰醋酸，使管内壁湿润冰醋酸后将多余液体随空气吹出，然后吸取混匀的脑脊液，数分钟后其中红细胞可完全溶解，再充入计数池，按上法计数。

2）稀释计数法：如白细胞数过多，用白细胞稀释液将标本稀释一定倍数，按上法计数，计数结果应乘以稀释倍数。

【注意事项】

所有有核细胞（包括内皮细胞）均计在内。也可将细胞总数减去红细胞数得白细胞数。

㈢ 红细胞计数

【操作】

1）直接计数法：将标本混匀充池，根据形态计数红细胞。方法同上。

2）计算法：将细胞总数减去白细胞数即得红细胞数。

㈣ 白细胞分类计数

【操作】

1）直接分类计数法：白细胞直接计数后，在计数池中用高倍镜根据白细胞形态，计数100 个细胞，按单个核细胞和多个核细胞所占的百分比报告。如细胞数不到100个，可直接写出具体数字。单个核细胞多为淋巴细胞、单核细胞或内皮细胞；多个核细胞以中性粒细胞为主。

2）染色分类法：在细胞较多且无法识别时，将脑脊液标本离心，取沉淀物涂片，制成均匀薄膜，干燥后用瑞特染色，油镜下进行分类计数。报告方式同外周血白细胞分类计数，如有内皮细胞或其他细胞，应另行描述报告。

【注意事项】 1）采集脑脊液后应在1h 内完成细胞计数，否则细胞易退化变形、溶解。2）腰穿时局部损伤出血患者的脑脊液标本作细胞总数计数已无意义，白细胞计数应校正。校正后脑脊液白细胞数＝未校正脑脊液白细胞数－脑脊液红细胞数×外周血白细胞数／外周血红细胞数

3）如发现较多红细胞形态异常如皱缩或肿胀者要予以报告，以区别新鲜出血与陈旧出血。

4）应区别红细胞或淋巴细胞与新型隐球菌。后者有荚膜及出芽现象（墨汁染色可见），加酸不溶解。淋巴细胞加酸后其核更清楚。

5）细胞涂片固定时间不能太久，以免细胞皱缩；标本不能高温固定。

【参考值】

正常人脑脊液中一般无红细胞。白细胞数极少，成人为（0～5）×10^6／L，儿童为（0～15）×10^6／L，主要是淋巴细胞，偶见内皮细胞，无中性粒细胞。

【临床意义】

脑脊液中白细胞数超过10 ×10^6/L，是中枢神经系统炎症或受刺激所致，其增多的程度和细胞种类与疾病性质、病程有关。

1）中性粒细胞增多：主要见于感染性疾病，如细菌性感染明显增多，结核杆菌感染早期中度增多，病毒感染早期轻度增多；也可见于非感染性疾病，如出血、脑外伤、多次穿刺、转移性肿瘤、脑膜白血病以及脑血管栓塞等。

2）淋巴细胞增多：见于病毒感染、细菌感染的恢复期、梅毒性脑膜炎、钩端螺旋体脑膜炎、寄生虫感染等；也见于非感染性的多发性硬化、多发性神经炎等。

3）嗜酸粒细胞增多：少见，如脑部寄生虫（脑囊虫病）、霉菌感染等。

4）嗜碱粒细胞增多：极少见，如脑膜白血病、寄生虫感染、异物反应等。

5）单核细胞增多：见于病毒或细菌感染、中枢神经系统变性疾病以及异物刺激等。

6）浆细胞增多：出现浆细胞见于神经系统病毒感染、结核、寄生虫病、神经根炎、出血、早期恶性肿瘤等。脑脊液中的浆细胞形态与血液中浆细胞相似，圆形或椭圆形，核明显偏位，染色质呈紫红色，粗颗粒状，有时呈典型的车轮状，核仁为1 个，胞浆丰富呈灰蓝色，浆内可出现空泡。

7）巨噬细胞：出现于中枢神经系统的炎症、出血、外伤等疾病的中、后期。该细胞是单核样细胞进一步激活而来，形态不一，浆内含有各种吞噬物（细胞、细菌、脂肪等），胞浆丰富，边缘不清，呈淡蓝或灰蓝色，核圆形或椭圆形，有时分叶状，居中或偏于一侧，染色质颗粒状，有1 ～2 个核仁，常单个或成簇出现。

8）白血病细胞：可见于脑膜白血病患者的脑脊液中。形态与血或骨髓中的白血病细胞相似。

9）肿瘤细胞：见于中枢神经系统肿瘤以及脑转移肿瘤的脑脊液中。需进一步检验确定细胞的性质，对疾病的诊断有重要意义。

10）红细胞增多：见于脑出血、脑外伤、穿刺损伤等。

二、病原体涂片检验

（一）细菌

脑脊液怀疑有细菌感染的，可对标本进行离心，沉淀物涂片，作革兰染色或抗酸染色等。根据染色性质及其形态特征，加以描述报告，一般只报告“检出革兰阳性菌或革兰阴性菌”、“检出抗酸杆菌”。如要明确细菌种类，则需作细菌培养。

（二）新型隐球菌

对疑有新型隐球菌性脑膜炎的脑脊液标本，进行离心，沉淀物涂片，加优质墨汁染

色先在低倍镜下观察，如发现黑色背景中有圆形透光小点，中间有一细胞大小圆形物质，即转高倍镜仔细检查其结构。新型隐球菌有明显的荚膜，周围有较宽阔的折光，并有出芽的球形孢子，直径5～20 μm，菌体内有一个较大的或多个较小的反光颗粒。发现上述特征者，可报告“检出隐球菌”，然后进一步作真菌培养。

㈢ 寄生虫

如怀疑脑寄生虫病时，应对其脑脊液进行离心，沉淀物涂片，在低倍镜下检查可发现血吸虫卵、肺吸虫卵、弓形体、阿米巴等，形态特征详见临床寄生虫学检验。

第三节　特殊检验

一、蛋白电泳

由于脑脊液中蛋白含量甚微，故作蛋白电泳时需将标本浓缩（100～200倍）。具体方法见第四篇生物化学检验第二章蛋白质测定。

【参考值】

前白蛋白：0.02～0.06（2%～6%）；白蛋白：0.44～0.62（44%～62%）；α_1球蛋白：0.04～0.08（4%～8%）；α_2球蛋白：0.05～0.11（5%～11%）；β球蛋白：0.13～0.26（13%～26%）；γ球蛋白：0.06～0.13（6%～13%）。

【临床意义】

1）前白蛋白增多：见于脑积水、脑萎缩及中枢神经系统变性疾病。

2）α球蛋白增多：多见于急性细菌性脑膜炎、结核性脑膜炎急性期、脊髓灰质炎等；也见于脑膜白血病、脑转移瘤等。

3）β球蛋白增多：见于小脑萎缩、退行性病变（肌萎缩、多发性硬化、手足搐动等）、脂肪代谢障碍（动脉粥样硬化和脑血栓形成）等。

4）γ球蛋白增多：最常见于脱髓鞘病，尤其是多发性硬化、视神经脊髓炎等；也见于中枢神经系统感染、脑瘤、结节病等。

5）白蛋白增多：见于椎管梗阻、脑瘤、脑部血流淤滞所致脑血管通透性增加。

另外，可计算蛋白商（蛋白商＝球蛋白／白蛋白，正常值0.4～0.8），蛋白商增高提示球蛋白增多，见于神经系统感染梅毒、多发性硬化等；蛋白商降低提示白蛋白增高，见于炎症早期、脑瘤、脊髓压迫症等。

二、免疫球蛋白测定

采用免疫学方法检测，详见第五篇免疫学检验第三章人体特定蛋白的免疫学测定。

【参考值】

正常脑脊液免疫球蛋白含量极少，以IgG 为主，约10～40mg/L，无IgM。

【临床意义】

脑脊液中IgM 增多，常提示中枢神经系统感染。化脓性脑膜炎明显增多，病毒性脑膜炎轻度增多，多发性硬化、肿瘤、锥虫病等也可增多；脑脊液IgG 增多见于多发性硬化、亚急性硬化性脑膜炎等；脑脊液IgG 减少见于癫痫、线照射等；脑脊液IgA 增多见于结核性脑膜炎、化脓性脑膜炎、病毒性脑膜炎等；脑脊液IgE 增多见于脑瘤等。

三、乳酸脱氢酶测定

测定方法见第四篇生物化学检验第四章酶类测定。

【参考值】

8～32U（相当于血清的1/10）。

【临床意义】

凡有脑组织坏死时，脑脊液中乳酸脱氢酶增多，如细菌性脑膜炎、脑血管病、脑瘤、脱髓鞘病等。也可以脑脊液乳酸脱氢酶/血清乳酸脱氢酶之值（<0.1）为判断标准。

四、髓鞘碱性蛋白测定

髓鞘碱性蛋白是神经组织独有的蛋白质，占髓鞘蛋白总量的30%，在神经冲动的快速传导、绝缘、保护神经轴突方面起重要作用。髓鞘碱性蛋白测定常采用免疫学方法。参见第五篇免疫学检验。

【参考值】

<4μg/L。

【临床意义】

髓鞘碱性蛋白是脑实质性损伤的特异标记，其含量的多少还可以反映损伤的范围及其严重程度。增多最多见于多发性硬化，也见于神经系统梅毒、脑血管意外等。

五、乳酸测定

脑脊液中乳酸定量测定的方法见第四篇生物化学检验第一章糖类测定。

【参考值】

1.0～2.8mmol/L。

【临床意义】

脑脊液乳酸含量增多，见于细菌性脑膜炎、结核性脑膜炎等，而病毒性脑炎则正

常。

六、肌酸激酶测定

检测方法详见第四篇生物化学检验第四章酶类测定。

【参考值】

0.9～1.19U/L。

【临床意义】

脑脊液肌酸激酶增多见于进行性脑积水、继发性癫痫、脱髓鞘疾病、脑梗死、化脓性及结核性脑膜炎等脑缺氧所致的疾病。

七、C 反应蛋白测定

采用免疫学方法检测。详见第五篇免疫学检验第三章人体特定蛋白测定。

【参考值】

正常脑脊液中不存在C 反应蛋白。

【临床意义】

C 反应蛋白是一种急性时相蛋白，与血脑屏障状况有关。在炎症或组织破坏时增多，至恢复期又消失。

八、β_2－微球蛋白测定

用免疫学方法检测。详见第五篇免疫学检验第三章人体特定蛋白测定。

【参考值】

1.3～1.8μg/L。

【临床意义】

增多见于急性白血病伴颅内浸润、淋巴瘤转移、细菌性脑膜炎等。

第四章　浆膜腔积液检验

人体的浆膜腔包括胸膜腔、腹膜腔、心包腔等，在正常情况下浆膜腔内只有少量液体（胸膜液＜20ml、腹膜液＜50ml、心包液10～50ml），起润滑保护作用。在病理情况下，多量液体在浆膜腔内潴留，即形成浆膜腔积液（胸水、腹水、心包积液等）。根据浆膜腔积液的产生原因及其性质，分为滤出液和渗出液。血管内的水分伴营养物通过毛细血管滤出，并在组织间隙或体腔内积聚的非炎症性积液称为滤出液（漏出液）；由于炎症所致的血管内的液体成分和细胞成分通过血管壁渗出并进入组织或体腔的炎症性积液称为渗出液。检验浆膜腔积液的目的是鉴别积液的性质以及寻找病因。滤出液常见于肾病、肝硬化、充血性心力衰竭、肿瘤压迫、静脉血栓等。渗出液常见于炎症、出血、结核、肿瘤、损伤等。

第一节　一般性状检查

一、标本采集和处理

标本一般由临床医生在无菌条件下行胸腔穿刺术、腹腔穿刺术或心包穿刺术获得。根据送检的目的，常规检验往往取10ml，生化检验取10ml，细胞学检验取10ml，细菌学检验用无菌管采集10ml。为防止细胞变性、凝块发生或细菌溶解，应及时送检及检验。如不能及时送检，可加适量的抗凝剂（109mmol/L 枸橼酸钠、EDTA 盐）。用于细胞学检验的标本，应加适量的抗凝剂（EDTA 盐），如要观察标本有无凝固现象，则不能加抗凝剂。

二、一般性状检验

（1）量：由临床医生或送检验科后用量筒测定。

（2）颜色：用肉眼观察送检标本，及时记录，以“黄色”、“红色”、“乳白色”等描述报告。

滤出液一般为淡黄色、黄色；渗出液可因病因不同呈现不同的颜色，如深黄色、红色、乳白色等。

3）透明度：用肉眼观察送检标本，及时记录，以“清晰”、“微浊”、“混浊”等描述报告，滤出液多清晰或微浊；渗出液因含有大量的细胞、蛋白以及细菌等多混浊。

4）凝固性：用肉眼观察送检标本，及时记录，以“无凝固”、“凝固”或“有凝块”等描述报告。滤出液一般不会凝固；渗出液因含有大量的蛋白质（纤维蛋白原）以及细胞和组织碎解物可有凝固。但如果渗出液中含有纤维蛋白溶解酶时可将已形成的纤维蛋白溶解，则可呈无凝固或凝块。

5）相对密度：方法同尿相对密度测定。

【参考值】

滤出液＜1.015；渗出液＞1.018。

第二节　化学检查

一、PH 值测定

用血气分析方法检验。

滤出液pH 为7.45～7.46；渗出液一般pH 值偏低，在7.35～7.45 之间，也可更低。

二、浆液粘蛋白定性试验

【原理】

浆膜上皮细胞在炎性反应的刺激下分泌大量的浆液粘蛋白，这种浆液粘蛋白是一种酸性糖蛋白，等电点为pH3～5，在大量稀醋酸中可出现白色沉淀。此试验即利凡他试验（Rivaltatest）。

【试剂】

冰醋酸。

【操作】

取100ml 量筒1 只，先加入冰醋酸2 滴，再加入蒸馏水100ml，混匀后，加待检标本1～2 滴，在黑色背景下观察白色云雾状沉淀的发生及其下降速度。

【结果判断】

以不出现白色云雾状沉淀或白色云雾状沉淀半途即消失者为阴性；以白色云雾状沉淀下降超过一半以上者为阳性，可根据混浊的程度及下降的速度报告＋～＋＋＋＋。－：清晰不呈云雾状；±：渐呈白雾状；＋：呈白雾状；＋＋：白薄云状；＋＋＋：白浓云状；＋＋＋＋：白色块状沉淀。

【临床意义】

滤出液为阴性；渗出液为阳性。但滤出液长期吸收蛋白浓缩后，有时也呈阳性，故在实际工作中不能单凭本试验反映蛋白质情况，目前提倡用蛋白质定量测定。

三、蛋白质定量测定

【方法】

同第四篇生物化学检验第二章蛋白质测定。

【临床意义】

滤出液<25g/L；渗出液>30g/L。蛋白质若介于25～30g/L之间的“中间型积液”，需经浆膜腔积液的进一步特殊检验，才能鉴别其性质。

第三节　显微镜检查

一、细胞计数

细胞计数包括红细胞计数和白细胞计数，方法同脑脊液的细胞计数，所有的有核细胞（包括间皮细胞）均计在白细胞计数内。

【注意事项】

接到标本应立即计数，以免标本凝固或细胞溶解影响计数结果。如果已有部分凝固，则不能再作计数。

【临床意义】

滤出液中有核细胞数在100×10^6/L以下；渗出液中有核细胞数较多，在500×10^6/L以上，但两者并无绝对界限。

二、细胞分类计数

将标本离心，沉淀物涂片，瑞特染色后进行分类。与外周血涂片相似，根据细胞形态，计数100个细胞，以百分比报告。

【临床意义】

1．滤出液

滤出液中细胞数较少，以淋巴细胞为主，并有少量间皮细胞。

2．渗出液

渗出液中细胞数较多，各种细胞增多意义如下：

（1）红细胞增多：见于恶性肿瘤、结核或穿刺出血。

（2）中性粒细胞增多：常见于化脓性感染和早期浆膜结核。

3）淋巴细胞增多：提示慢性感染、病毒和结核杆菌感染或结缔组织病所致的渗出液。

4）嗜酸性粒细胞增多：见于变态反应、寄生虫感染、多次穿刺刺激等所致的渗出液。

5）间皮细胞增多：提示浆膜受损或受刺激。间皮细胞直径约15～30 μm，圆形或椭圆形，胞浆丰富，呈淡蓝色，含有少数空泡，核大，位于中心或偏位，核仁有1～3个，为紫色。在渗出液中可因各种原因呈现异形变或退行性变，形态很不规则。

6）组织细胞：在大量中性粒细胞出现的同时，常伴有组织细胞的出现，它较白细胞大，直径一般不超过16 μm，细胞染色较淡，核呈肾形或不规则形，偏位，核致密，胞浆多呈泡沫状。

7）浆细胞：少量出现没有重要临床意义；若在胸水中见到较多的浆细胞，可能是增生性骨髓瘤。

8）狼疮细胞：偶见于系统性红斑狼疮患者的浆膜液中。

9）如有多量形态不规则、体积大、核大并可见核仁、胞浆染色深、单个或多个成堆细胞出现，应注意观察是否为肿瘤细胞，需作进一步的细胞学检查。

三、病原体涂片检验

1．细菌学检验

如怀疑细菌感染，有必要将标本离心，沉渣涂片，作革兰染色或抗酸染色，以“找到革兰阳性或阴性菌（或抗酸杆菌）”报告；真菌引起的可查到菌丝或芽孢。并需进一步作细菌培养、药敏试验等，以明确诊断。

2．寄生虫检验

乳糜液离心，沉淀物涂片找微丝蚴；阿米巴胸水可经碘染色找阿米巴滋养体。

第四节　特殊检查

一、葡萄糖测定

浆膜腔积液葡萄糖浓度测定的方法与血液葡萄糖定量方法相同。

滤出液葡萄糖浓度与血糖相近；渗出液因受细菌或炎症细胞的酵解以及从血循环转移到浆膜腔的影响，糖浓度下降或积液中浓度与血中糖浓度的比值＜0.5；化脓性积液、风湿性积液糖浓度下降较明显，甚至测不出。

二、乳酸脱氢酶测定

浆膜腔积液乳酸脱氢酶（LDH）检测的方法同血液LDH的检测。

LDH主要用于鉴别渗出液与滤出液、恶性与非恶性积液。LDH活性＞200U/L、积液LDH活性/血清LDH活性比值＞0.6者以渗出液为主，反之以滤出液为主。积液LDH活性升高，且高于血清LDH活性者，可能对浆膜恶性肿瘤诊断以及肿瘤转移的判断有帮助。

三、腺苷脱氨酶测定

浆膜腔积液腺苷脱氨酶（ADA）活性检测方法有比色法和紫外分光光度法等。详见第四篇第四章。

ADA活性增高，高于外周血中的ADA活性，多见于结核性、风湿性以及脓性的积液，按其中ADA活性高低顺序依次为：结核性积液＞癌性积液＞非炎症性积液。ADA活性测定对结核性积液的诊断有重要参考价值。

四、淀粉酶测定

浆膜腔积液淀粉酶活性测定的方法同血清或尿液淀粉酶活性测定。详见第四篇第四章。

积液中的淀粉酶活性升高一般指高于血清中的活性（即积液淀粉酶活性/血清淀粉酶活性比值＞1.0），若腹水可能为胰腺炎所致；而胸水，除了胰腺炎所致外，也可能是食管破裂、穿孔所致；另外，转移性癌性积液、异位妊娠破裂积液中淀粉酶活性也可升高。

五、癌胚抗原测定

浆膜腔积液中癌胚抗原含量采用免疫学方法检测。详见第五篇免疫学检验第八章肿瘤标志物测定。癌胚抗原是一种酸性糖蛋白，是浆膜渗出液中的一种肿瘤标志物。免疫学方法检测结果，特别是动态检测结果，结合血清癌胚抗原含量测定结果，对恶性肿瘤和转移癌的诊断有一定的价值。

六、脂类测定

浆膜腔积液脂类含量检测的方法同血浆脂类检测。详见第四篇生物化学检验第三章脂类测定。

标本离心后仍呈乳状者需进行甘油三酯检验，甘油三酯含量明显增高（＞1.241mg/L）者为乳糜液；胆固醇含量明显增高见于胆固醇性浆膜积液；陈旧性积液中胆固醇含

量也增高。

七、铁蛋白测定

浆膜腔积液铁蛋白含量采用免疫学方法检测。详见第五篇免疫学检验第三章人体特定蛋白测定。

胸腔积液中的铁蛋白含量检测可作为肿瘤性积液与结核性积液的鉴别依据，积液中铁蛋白含量＞1500 μg／L 则为肿瘤性积液。

八、免疫球蛋白测定

浆膜腔积液免疫球蛋白含量采用免疫学方法检测。详见第五篇免疫学检验第三章人体特定蛋白测定。

浆膜腔积液IgG （gA）／血清IgG （gA） 比值对鉴别渗出液与滤出液有重要意义，比值＞0.5 为渗出液，比值＜0.5 为滤出液。

九、流式细胞仪的应用

流式细胞仪是采用流式细胞术对细胞或颗粒悬液进行快速分析的自动分析仪器。具体操作见第五篇免疫学检验第一章。流式细胞仪用于浆膜腔积液检查主要进行DNA 含量分析、肿瘤细胞抗原的测定、淋巴细胞的免疫表型分析，这些对恶性肿瘤的诊断以及评价治疗效果有一定的临床意义。

通过浆膜腔积液的各项检验，可进行滤出液与渗出液的鉴别，见表3 －4 －1 。

表3 －4 －1　滤出液与渗出液的鉴别

鉴别要点	漏出液	渗出液
形成机制	毛细血管静水压增高，血管内血浆胶体渗透压下降，淋巴液回流受阻，水、钠潴留	血管通透性增加
原因	非炎症	炎症
外观	淡黄、浆液性	黄色、血色、脓性等或不定
浑浊度	透明或微混浊	大多混浊
相对密度	＜1.018	＞1.018
凝固性	不自凝	能自凝
浆液粘蛋白定性试验	阴性	阳性
蛋白总量	＜25g／L	＞30g／L

续表

鉴别要点	漏出液	渗出液
蛋白电泳	以白蛋白为主，白、球蛋白比例低于血浆	电泳谱与血浆相似
积液蛋白含量/血浆蛋白含量	<0.5	>0.5
积液LDH 活性/血清LDH 活性	<0.6	>0.6
有核细胞计数	$<0.1\times10^9$/L	$>0.5\times10^9$/L
有核细胞分类	以淋巴细胞、间皮细胞为主	因病因的不同而异。急性感染以中性粒细胞为主，慢性感染以淋巴细胞为主
细菌检查	无病原菌	可找到病原菌

第五章　胃与十二指肠液检验

第一节　胃液检验

一、标本采集

先将晨间空腹残余胃液抽空弃去。然后在1h 内连续抽取胃液放入同一瓶内，此瓶为基础胃液。接着按6 μg/kg 体重给患者肌肉注射五肽胃泌素，注射后每隔15 min 抽1 次胃液，共抽4 次，分装4 瓶，连同基础胃液共5 瓶送检。

二、一般性状检查

1) 量：空腹胃液约30～50 ml，偶尔达100 ml。胃分泌功能亢进及胃蠕动力降低时胃液量增加。

2) 颜色：正常胃液无色，含黏液多时呈白色，有胆汁反流时呈绿色，含少量血液时呈棕褐色，血量过多时呈咖啡色，鲜红色表示近期出血。

3) 气味：正常胃液无气味，胃肠瘘时有恶臭。

4) 黏液：正常胃液黏液少，慢性胃炎时黏液多。

5) 酸碱度：正常胃液pH 值1.3～1.8，若pH 值<1.3 时胃酸过高，若pH 值在7.0 以上，常表示混有唾液、胆汁及十二指肠液。

6) 食物残渣：正常胃液应无食物残渣，如有食物残渣表示胃蠕动能力不足，见于胃扩张、胃下垂、幽门梗阻等。

三、化学检查

(一) 胃液酸度测定

【原理】

用0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定胃液标本，以酚红为指示剂，根据滴定时消耗氢氧化钠溶液的量，计算出胃液中酸的浓度。

【试剂】

1）0.1mol/L 氢氧化钠溶液。

2）0.2g/L 酚红液：酚红100mg 加0.1mol/L 氢氧化钠液28.2ml，溶解后加水至500ml。

【操作】

分别取以上5 瓶胃液各5ml，逐个加酚红指示剂2 滴，黄色表示有胃酸存在。用0.1mol/L 氢氧化钠溶液滴定至出现粉红色为终点，记下耗去氢氧化钠溶液的毫升数，计算胃酸浓度。

【计算】

1）胃酸浓度（mmol/L）＝所耗氢氧化钠溶液毫升数×0.1（mol/L）×1000/5（ml）。

2）基础胃酸分泌量（BAO）＝基础胃液（注射胃泌素前1h 抽取的胃液）量乘以胃酸浓度。例如1h 的胃液为50ml，胃酸浓度60mmol/L，则BAO =50 ×60/1000 =3mmol/h。

3）最大胃酸分泌量（MAO）：注射五肽胃泌素后的4 次标本，分别记录胃液量及测定胃酸浓度，计算胃酸分泌量之和即为MAO，4 次标本中最高1 次胃酸分泌量与次高两次分泌量之和乘2 即为高峰酸分泌量（PAO）。

【参考值】

BAO：3.0 ±1.98）mmol/h，很少超过5mmol/h；MAO：15 ～20mmol/L；PAO：10 ～30mmol/L。

【临床意义】

1）胃酸分泌增多：见于十二指肠溃疡、胃泌素瘤、幽门梗阻及慢性胆囊炎等。胃泌素瘤患者BAO >20mmol/h，PAO >60mmol/h。十二指肠溃疡患者BAO 为5 ～15mmol/h。

2）胃酸分泌减少：与胃黏膜受损部位、程度有关。见于胃溃疡、胃癌、胃炎、恶性贫血等。

（二）乳酸测定

【原理】

乳酸是一种弱有机酸。在酸度正常的胃液中不能游离，也不与加入的试剂反应；当胃酸减少而乳酸含量增加时，游离的乳酸能与高价铁离子结合形成乳酸高铁，而使胃液呈亮黄色。

【试剂】

100g/L 三氯化铁溶液、20g/L 苯酚溶液。

【操作】

在试管中加三氯化铁溶液10ml，再加入苯酚溶液2 滴，混匀，加入过滤胃液6 ～7

滴，混匀。

【结果判断】

若出现亮黄色即为阳性。

【临床意义】

阳性见于幽门梗阻、萎缩性胃炎、慢性胃扩张。胃癌时则呈强阳性反应。

㈢ 隐血试验

1．试带法

【原理】

试带上含有过氧化物及邻甲苯胺。血红蛋白有类过氧化物酶样作用，它能使过氧化物释放新生氧，将邻甲苯胺氧化成蓝绿色化合物。

【操作】

将试带的反应部分浸入胃液中30～60s 后取出，与标准比色表比较并判断结果。

2．邻甲苯胺法

【原理】 同上。

【操作】

方法 1） 取胃液2ml 于试管中加冰醋酸2 滴，再加乙醚1ml，用力振摇，取乙醚层参照大便隐血试验进行检验。

方法 2） 取胃液2ml 于试管中煮沸 （破坏其他氧化酶），冷却后加入10g/L 联苯胺冰醋酸溶液1ml，再加入3％过氧化氢溶液约1ml，混合后观察颜色变化。

【结果判断】

出现绿色为阳性，深蓝色为强阳性。

【临床意义】

隐血试验阳性见于急性胃炎、消化性溃疡、胃癌。

四、显微镜检查

取胃液可疑部分 （如血色部分、块状物或黏液样物） 置于载玻片上，镜检。

㈠ 细胞

1） 红细胞：正常胃液无红细胞。标本中若见大量红细胞，提示胃溃疡、骨黏膜糜烂及恶性肿瘤等。

2） 白细胞：正常胃液少见。若见有大量白细胞，提示胃黏膜有炎症存在。

3） 上皮细胞：正常胃液有少数来自口腔、咽部和食管的扁平上皮细胞。胃炎时可

见大量柱状上皮细胞。

4）癌细胞：镜检时发现大量成堆的大小不匀、形态不规则、核大、多核、染色质粗糙、可见核仁的细胞时，应高度怀疑癌细胞。常用染色法有巴氏染色。亦可用7690－XU 荧光染色液染色进行快速检测。

㈡ 细菌

八叠球菌（Sarcina）：是一种大的革兰阳性球菌。一般由8 个球菌相叠成立方形，有时聚集成堆。用碘液可染成棕黄色。多见于消化性溃疡及幽门梗阻。

博－奥（Boasoppler）杆菌：是一种较大的革兰阳性嗜乳酸杆菌。长5～10 μm，两端钝圆，无芽孢，稍有动力，常排列呈筷状或短链状。能被碘液染成黄色或棕色。正常胃液中可存在少量。较多出现见于晚期胃癌。

酵母菌：用卢戈碘液可将其染成黄色。直接涂片观察呈圆形，有光泽。大量出现于胃液中时，其临床意义同八叠球菌。

化脓球菌：若大量出现革兰阳性球菌同时伴有胃黏膜柱状上皮细胞时，提示胃黏膜有化脓性感染。

抗酸杆菌：多为肺结核患者将含有结核杆菌的痰液咽人胃内所致，尤多见于不会咳痰的幼儿患者。

幽门螺杆菌：革兰阴性杆菌，典型者呈S 型、海鸥状弯曲，非典型的可呈球形体、短杆菌或巨球体。胃溃疡时多见。

第二节　十二指肠引流液检查

一、标本采集

4 瓶胆汁标本由临床医生采集，分别标明A、B、C、D。“A”来自胆总管，“B”来自胆囊，“C”来自肝胆管，“D”来自十二指肠。

标本采集后，应迅速送检，并尽快检查完毕，以免有形成分破坏。

二、一般性状检查

颜色：“A”呈金黄色，“B”呈深褐色，“C”呈柠檬黄色，“D”呈灰白色或浅黄色。

透明度：正常情况下均为透明而无沉渣；如果有胃液混入可显浑浊；细胞成分增多时胆汁也显浑浊。

稠度：正常情况下，各份标本均可见少量黏液，在十二指肠炎和胆道感染时，黏稠

度可明显增加。

酸碱度：一般为中性或弱碱性。

三、显微镜检查

镜检细胞时，标本不能久置，以新鲜标本直接涂片，离心沉淀法易破坏细胞，一般不宜采用。

1．细胞

(1) 上皮细胞：正常情况下可有少量十二指肠上皮细胞和胆道上皮细胞，多属柱状上皮细胞。

(2) 白细胞：正常时偶见1～2/HP。一般<20/HP，多为中性粒细胞。在十二指肠炎和胆道感染时大量出现。慢性或病毒性肝炎患者，其胆汁可见小淋巴细胞和浆细胞。胆囊炎、胆结石及急性肝炎等，胆汁中均可见白细胞增多。

(3) 红细胞：正常引流液中不见红细胞。胆石症及十二指肠、肝、胆、胰等出血性炎症时红细胞增多。若胆汁中混有陈旧血块，且高度浑浊时，应考虑胆囊癌或疑为胃、十二指肠、肝、胆道等部位的肿瘤。血性胆汁见于特发性胆道出血、出血性胆囊炎等。

2．结晶

(1) 胆固醇结晶：在胆酸缺乏时析出，无色透明，缺角长方形。胆石症时常大量出现，尤以“B”胆汁多见。

(2) 胆红素结晶：为棕黄色、棕色或黑色的非晶形物体。胆红素钙为金黄色或橘红色细小或较粗的颗粒状结晶。前者可溶于氯仿，并与偶氮试剂呈阳性反应。若见灰黑色的细颗粒状无定形结晶，可滴加100g/L 氢氧化钠溶液数滴鉴别。如全部溶解，则为胆盐结晶。

3．寄生虫

“B”胆汁中易检到寄生虫虫体及虫卵，如蓝氏贾第鞭毛虫卵、蛔虫卵、钩虫卵、华支睾吸虫卵等。肝血吸虫病患者在胆汁中查出虫卵机会远较粪便为高。

四、微生物学检查

白细胞增多的标本，应作革兰染色。有时可找到革兰阳性球菌或革兰阴性杆菌。必要时作细菌培养。

1．增菌培养

胆汁本身有抑菌作用，接种普通肉汤后，胆盐得到稀释，可降低抑菌作用，胆汁的接种量为肉汤的1/20。增菌3d 未见细菌生长则报告阴性。

2．分离培养

感染的细菌可为单一或混合厌氧菌和兼性厌氧菌。分离时，应用血平板、中国蓝或

麦康凯平板及厌氧平板，采用分区划线接种。分别置普通和厌氧环境下35 ℃孵育。胆汁细菌培养还可用于检测伤寒沙门菌、副伤寒沙门菌等的排菌者和带菌者。

第三节　胃脱落细胞学检查

一、标本采集

1）纤维镜直视下冲洗摩擦或刷洗、吸引采样。此法盲目性小，阳性率较高。

2）非直视下冲洗与摩擦取样。

二、正常涂片细胞学检查

㈠ 胃正常上皮细胞

胃黏膜被覆上皮细胞：呈高柱状，锥形或卵圆形，成团脱落的上皮细胞，中央呈蜂窝状，边缘的细胞可呈平头的柱状、锥状。胞浆丰富，内含多量黏液，故染色淡，呈透明样。核位于底部，圆形或卵圆形，核膜清楚。染色质呈细网状，分布均匀，核内可见数个较大质点，有时可见核仁。

胃底腺主细胞：大小与胃黏膜被覆上皮细胞相似，常三五成群，呈高柱状，细胞界限不清楚，核较大常偏位，胞浆中有嗜碱粗颗粒或小空泡。

壁细胞：比胃黏膜被覆上皮细胞大，常成群，圆形、卵圆形或多边形，界限清楚，胞浆丰富，核圆而小，略偏中心。常有多核，核仁明显，胞浆中有多量嗜酸颗粒。

幽门腺细胞：大小同被覆上皮细胞，形态亦相似，仅细胞核稍大而细胞界限不清。

㈡ 胃外来源的上皮细胞

鳞状上皮细胞：由唾液、痰液混入或在插胃管、胃镜时被带人胃内。

纤毛柱状上皮细胞和杯状细胞：由痰液混入或胃管通过鼻腔时被带人胃内。

㈢ 涂片的非上皮成分

非上皮细胞：如红细胞、白细胞等。

食物残渣：各种动、植物细胞，如肌纤维素。

细菌、寄生虫卵和原虫。

三、胃良性疾病细胞学检查

㈠ 慢性胃溃疡

上皮细胞可见异形性改变。细胞体积增大，核大小形态不一致，细胞体积比正常上

皮细胞大0.5～1 倍，核仁多个，清晰可见，核膜光滑，染色质呈颗粒状均匀分布。细胞可成团分布，同时可见中性粒细胞。

㈡ 慢性胃炎

核肥大型：核增大明显，为正常的1 倍左右，而且核内有较大核仁，直径达2 μm，但是细胞核无畸形或仅有轻度畸形，而且染色质颗粒很细，分布均匀，故着色很淡。这类细胞虽然胞浆很少，但仍保持一定的核浆比例。

核固缩型：核的大小与正常相似或略小，畸形不明显，但是核的染色质很深而且均匀一致，细胞内有中等量的胞浆，且有少量黏液空泡。

中间型：核的大小介于前两者之间。染色质较多，颗粒亦较粗，着色情况亦介于前两者之间，此类细胞核可以呈轻至中度畸形。

四、胃肿瘤细胞学检查

㈠ 腺癌

分化较好的腺癌细胞：常成群，排列成腺腔样或不规则形的细胞团；细胞体积大，圆形、卵圆形，胞浆染色淡，呈透明样状，含有大小不等的黏液空泡，也可见到胞浆中有中性粒细胞等包涵物，有时细胞内较大黏液空泡将核挤向一侧，呈印戒样细胞。

分化差的腺癌细胞：常三五成群，排列成不完整的腺管、腺泡，亦可见桑椹状及分枝状；癌细胞较小，胞浆较少，染成暗紫红色；核偏于细胞一侧，核有畸形表现，如不规则凹陷或突起等可出现双核，核仁大，多个；部分细胞浆中可出现小空泡。

黏液型腺癌细胞：呈印戒样，胞浆清晰，内有一黏液空泡。核呈新月样、三角形，有时似黑点状，被挤于细胞一端。染色质增多，深染。

㈡ 未分化癌

癌细胞中等大小，呈圆形或不规则形。胞浆较少，内无空泡，胞核大小不一，高度畸形；核染色质颗粒粗大，染色深浅不一，核居细胞中央。

第六章　痰液和支气管肺泡灌洗液检查

第一节　痰液检查

一、标本采集

留取痰标本的方法有自然咯痰、气管穿刺吸取、经支气管镜抽取等，以自然咯痰为主，标本要求新鲜。应嘱患者用力咳出气管深处真正的呼吸道分泌物，而勿混入唾液及鼻咽部分泌物。如用于漂浮法或沉淀浓集法查结核菌时需留12～24h 痰液。

二、一般性状检查

(1) 量：健康人一般无痰，患者的排痰量依病种和病情而异。急性呼吸系统感染比慢性呼吸系统感染者痰少；细菌感染较病毒感染痰多；慢性支气管炎、支气管扩张、空洞型肺结核和肺水肿患者痰量可显著增多，甚至超过100㎖/24h。

(2) 颜色及性状：正常人偶有少量白色或灰白色黏液痰。

黄色脓性痰：其主要成分为脓细胞，提示呼吸道有化脓性感染，见于化脓性支气管炎、金黄色葡萄球菌肺炎、支气管扩张、肺脓疡等。肺脓疡时可出现浆液脓性痰，放置后可分为4 层：上层为泡沫和黏液，中层为浆液，下层为脓细胞，底层为暗色组织碎片等。铜绿假单胞菌感染者可有绿色脓痰。

红色或棕红色痰：系因呼吸道有出血，痰中含血液成分所致，可见于肺癌、肺结核、支气管扩张等疾病。

铁锈色痰：乃因痰中所含血红蛋白变性所致，可见于大叶性肺炎、肺梗死等。

粉红色浆液泡沫痰：是由于肺淤血，局部毛细血管通透性增加所致，见于左心功能不全肺水肿患者。

烂桃样痰：见于肺吸虫病引起肺组织坏死分解时。

棕褐色痰：见于阿米巴性肺脓疡。

灰黑色痰见于大量吸人煤炭粉尘或长期吸烟者。

(3) 气味：正常人新咳出的少量痰液无气味。血性痰可带血腥气味；肺脓肿、支气

管扩张合并感染患者的痰液常有恶臭；晚期肺癌患者的痰液可有特殊臭味；膈下脓肿与肺相通时患者的痰液可有粪臭味。

4）痰中其他物质：

支气管管型：是纤维蛋白、黏液和白细胞等在支气管内凝聚而成的树枝状物，呈灰白色或棕红色（含血红蛋白）。其直径与形成部位的支气管内径相关，一般较短，亦有长达15cm 的。见于纤维蛋白性支气管炎、肺炎，链球菌性肺炎和累及支气管的白喉患者。

干酪样小块：是肺组织坏死的崩解产物，形似干酪或豆腐渣样。多见于肺结核患者。

硫磺样颗粒：是放线菌的菌丝团，淡黄色、黄色或灰白色，形似硫磺颗粒，约粟粒大小。将其压片镜检可见密集的菌丝呈放射状排列，状若菊花。革兰染色呈阳性，须进一步培养鉴定。

肺石：为淡黄色或白色的碳酸钙或磷酸钙结石小块，表面不规则，呈丘状突起，可能为肺结核干酪样物质的钙化产物，亦可由侵入肺内的异物钙化而成。

柯什曼螺旋体（Curschmann spiral）：为淡黄色或灰白色富有弹性的丝状物，常卷曲成团，展开后呈螺旋状。该螺旋状物系小支气管分泌的黏液，因呼吸困难患者肺内二氧化碳张力增高而凝固，再在喘息气流的间歇吹动下旋转滚动而成。见于支气管哮喘和某些慢性支气管炎（哮喘型）患者的痰中。

寄生虫：有时于痰内可检出寄生虫，如卫氏并殖吸虫、蛔虫和钩虫等。

三、显微镜检查

（一）非染色标本

1．红细胞

正常人的痰涂片中查不到红细胞。脓性痰中可见少量红细胞。红细胞破坏或不典型时可通过痰液隐血试验证实。血性痰中可见大量红细胞。

2．白细胞

正常人的痰涂片中可查到少量白细胞（中性粒细胞）。呼吸系统有细菌感染时痰中白细胞数显著增加，常成堆存在，多为脓细胞。过敏性支气管炎、肺吸虫病、热带嗜酸性粒细胞增多症患者痰中嗜酸性粒细胞增多。

3．上皮细胞

1）鳞状上皮细胞：多为口腔、咽喉部脱落的复层鳞状上皮的表层细胞，在急性喉

炎和咽炎患者数量增加。

(2) 柱状上皮细胞：来自气管和支气管，包括纤毛柱状上皮和黏液柱状上皮。正常人极少见，在气管和支气管黏膜发炎或癌变时增多。

(3) 肺泡壁上皮细胞：由单层上皮构成，含Ⅰ型肺泡细胞和Ⅱ型肺泡细胞。前者在光镜下不易与鳞状上皮细胞区别；后者呈圆形或立方形，两者需经染色涂片区别。正常人痰中一般查不到肺泡壁上皮细胞，当肺组织遭到严重破坏时可出现。

4．肺泡巨噬细胞

存在于肺泡隔中，又称隔细胞（septal cell），是一种较大的圆形或卵圆形细胞，较红细胞大3～6倍，含1～2个圆形细胞核，可通过肺泡壁进入肺泡腔，吞噬烟尘颗粒和其他异物，形成尘细胞或含炭细胞等。最常见于炭末沉着症患者痰中。若肺泡巨噬细胞吞噬了红细胞，可将其破坏使血红蛋白降解，分解出血红素，再转变为含铁血黄素，则称之为含铁血黄素细胞，又称心功能不全细胞，可用普鲁士蓝反应鉴别。含铁血黄素细胞见于肺淤血、肺梗死和肺出血患者的痰中，尤多见于慢性肺出血（如特发性肺含铁血黄素沉着症）患者。

5．癌细胞

若在非染色痰涂片中见到形态异常、难以鉴别的细胞，应进行染色并注意寻找癌细胞。

6．弹性纤维

为粗细均匀、细长、弯曲、折光性强、轮廓清晰的丝条状物，无色或呈微黄色，由小支气管壁、肺泡壁或血管等坏死组织脱落所形成，见于肺脓肿、肺癌等患者痰中。

7．Chaarcot－Leydon 结晶

是两端锐利的无色菱形结晶，折光性强，大小不一，常与嗜酸性粒细胞及柯什曼螺旋体共存，在嗜酸性粒细胞堆中易找见。新咳出的痰中往往查不到，但稍放置后可大量出现，可能是由嗜酸性粒细胞崩解而来。见于支气管哮喘和肺吸虫病患者痰中。

8．脂肪滴和髓磷脂小体

两者形态相似，呈油滴状，但较大的髓磷脂小体常含有同心性或不规则的螺旋条纹。偶见于健康人清晨痰中，而慢性支气管炎患者痰中易见。

9．寄生虫和虫卵

(1) 阿米巴：于阿米巴性肺脓肿或与肺贯通的阿米巴性肝脓肿患者痰中，可查到溶组织阿米巴滋养体。

(2) 卡氏肺孢子虫：见于肺孢子虫病患者痰中，但阳性率不高。

(3) 细粒棘球蚴和多房棘球蚴：当肺内寄生的棘球蚴囊壁破裂时，患者痰中可检出

原头蚴和囊壁碎片。

4）卫氏并殖吸虫卵：肺吸虫病患者痰中，尤其是有脓血性痰时，多能查到该虫虫卵。也可用浓集法查虫卵。

（二）染色标本

痰涂片染色临床应用价值较大。用HE 或巴氏染色可查癌细胞，用瑞特染色可查白细胞，用革兰染色或抗酸染色则可查细菌等。

四、免疫学检查

痰中的分泌型IgA 为呼吸道上皮组织所分泌，具有防御病原微生物侵袭的作用。正常人痰液中分泌型IgA 含量为（1.03 ±0.21）mg/L，分泌型IgA 含量减少时，黏膜抵抗力下降，易患呼吸道感染；经有效治疗后，免疫功能改善，痰中分泌型IgA 含量可回升。支气管哮喘和过敏性肺炎患者，痰中分泌型IgE 含量可增加。

五、微生物学检查

痰中大部分是上呼吸道正常菌群。当支气管和肺部有感染时，可于痰中出现相应的病原菌，如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯杆菌、结核分枝杆菌等。可取痰作涂片染色检查，最常用的是革兰染色；也可进行培养，当有致病菌生长时需作药物敏感试验，有助于选择敏感的抗菌药物。当怀疑结核菌感染时可采用抗酸染色、金胺O 染色、结核分枝杆菌浓集试验。如怀疑为支原体肺炎时，可用痰涂片进行直接或间接荧光抗体染色检查，有助于明确诊断。

第二节　支气管肺泡灌洗液检查

支气管肺泡灌洗术是在纤维支气管镜基础上发展起来的一项新技术。利用支气管肺泡灌洗液进行细胞学、生物化学、微生物学、寄生虫学和免疫学等方面的各项检验，可为一些下呼吸道疾病的诊断、病情观察和预后判断开辟一条新途径。

一、标本采集和处理

标本采集一般由临床医生完成，检验人员收到标本后，首先用单层纱布过滤以除去黏液，将滤液离心（800r/min，10min）后分离上清液供生化检验和免疫学检验，沉淀物作细胞学检查。微生物学检查的标本采集须严格遵守无菌操作规则。合格的标本应符合以下要求：①达到规定的回收比例；②不混有血液，红细胞数占10％以下：③不混有

多量的上皮细胞（占3％以下）。

二、细胞学检查

1．有核细胞计数和分类计数

计数除上皮细胞及红细胞以外的所有细胞，以每升回收液的细胞总数表示。正常人的灌洗液含有核细胞为：（5～10）×10^6/L。

2．淋巴细胞亚群分析

灌洗液中淋巴细胞增多时，可用单克隆抗体进行淋巴细胞亚群分析，例如$CD3^+$、$CD4^+$、$CD8^+$等。

3．癌细胞

支气管肺癌患者的灌洗液沉淀物检出癌细胞，有助于肺癌诊断。

三、免疫学检查

灌洗液离心后的上清液中含有复杂的可溶性成分，例如各种蛋白质、酶类、脂类等。这些成分的来源如下：①被动漏出（如白蛋白、血清类粘蛋白）；②主动转运（如IgA、IgM）；③局部产生（分泌物）。

这些物质反映肺泡表面衬液成分，其测定为了解某些肺部疾病的病变特征，研究发病机制提供重要手段。

四、微生物学检查

1．涂片检查

取灌洗液沉淀物进行革兰染色与抗酸染色检查，对结核分枝杆菌的检查有较大意义。

2．细菌培养

无菌操作采集的灌洗液进行增菌培养或取其沉淀物直接分离培养，是检查支气管和肺部感染的重要方法。不仅适用于细菌和真菌等检查，也适用于支原体培养和病毒分离。当培养的细菌数为10^5cfu/ml时即有诊断意义。

五、寄生虫学检查

1．卡氏肺孢子虫

人类感染后多无明显症状。但若患者的免疫功能低下，特别是艾滋病患者和大量使用免疫抑制剂的患者可引起严重的间质性肺炎。这些患者痰中不易查到寄生虫，而在灌

洗液沉淀物中检出的阳性率较高。

2．卫氏并殖吸虫卵

患者痰中可能查不到虫卵，但可从灌洗液沉淀物中查到。

除以上各项检查外，若在灌洗液沉淀物中查到石棉小体，有助于石棉肺的诊断。

六、临床应用

由于灌洗液能获取肺泡表面衬液，因此，对其内容物的检查有助于肺部疾病的诊断、疗效评价、预后判断及发病机制研究等。

1．肺部感染的病原学诊断

支气管肺泡灌洗术在下呼吸道感染的检查中占有重要地位。支气管肺泡灌洗术可以收集较大范围肺实质（约100 万个肺泡）的肺泡表面衬液标本，可进行原虫、病毒及细菌学等检查。对于普通细菌感染者，肺泡灌洗液细菌培养结果达10^5cfu／ml 时为确定感染的阈值。但对某些特殊细菌，如在灌洗液中分离出结核分枝杆菌、军团菌即可作出相应诊断。灌洗液对艾滋病合并肺感染的诊断也很有帮助。

2．呼吸道原发性或继发性恶性肿瘤诊断

周围性肺癌、弥漫性肺恶性肿瘤（如支气管肺泡癌）、小细胞肺癌等可通过灌洗液检查诊断。但灌洗液检查结果因癌的类型而异，以腺癌和肺泡癌检出阳性率最高。

3．间质性肺疾病的诊断、疗效评价及预后判断

（1）外源性变应性肺泡炎：在急性期灌洗液中细胞总数增加，急性期早期肥大细胞增多（>1％），恢复后降至正常：淋巴细胞亦明显增多，其亚群以$CD8^+$增多为主，$CD4^+$／$CD8^+$比值降低，$CD57^+$和$CD16^+$也增加。目前认为支气管肺泡灌洗液检查是外源性变应性肺泡炎最敏感的检测手段，优于胸片及肺功能检查。

（2）结节病：灌洗液中细胞总数增多，主要为T 细胞增多，以$CD4^+$为主，$CD4^+$／$CD8^+$比值明显增高（>3.5），这些变化有重要的诊断意义。中性粒细胞和肥大细胞的增多预示病变有可能发展为纤维化。

（3）特发性肺间质纤维化：灌洗液中主要为中性粒细胞增多，嗜酸性粒细胞也可能增加，据此与以淋巴细胞增多为主的其他肉芽肿性肺疾病鉴别。

第七章　精液和前列腺通常规检验

第一节　精液标本采集

精液标本采集和送检是精液检查的一个重要环节。采集的时间和方法各家报道不一，但对检验结果影响不大，而送检的时间则对检验结果影响较大，必须引起重视。

(1) 采集方法：采集精液最好的方法是让患者手淫采集。采集室最好在实验室附近，室温应控制在20～35 ℃，采集前必须禁欲3～5d。如有困难则可用取精器（电按摩法）采集。

(2) 标本送检：精液标本留取后，应立即送检。送检过程或在实验室存放时温度应保持在25～35 ℃，冬天送检标本最好放在内衣口袋里。

(3) 标本采集次数：精子生成的日间变化较大，因此，对于少精症患者不能仅凭1次检查结果诊断。一般应间隔1～2 周再检查1 次，连续检查2～3 次后再作判断。

第二节　精液一般性状检查

1．精液量

通常有生育能力的男性一次排精量约为2～6ml。一次射精量与射精频度呈负相关。禁欲1 周后，精液量少于1.5ml，可视为精液减少，常见于精囊腺和前列腺病变；若不射精，称为无精液症。

2．颜色和透明度

正常精液呈灰白色或乳白色；放置一段时间后自行液化的精液则呈半透明乳白色。

3．液化时间

刚射出的精液呈稠厚的胶冻状，在25～35 ℃环境下放置5～20min 以后开始液化，20～40min 完全呈液化状态。

第三节　精液显微镜检查

一、精子活力分析

精子活力包括精子活动率和精子活动力。精子活动率是指活精子的数目，而精子活动力是指精子的质量，是测定精子活动能力的定性方法。

1．操作方法

取1 滴液化混匀精液滴于载玻片上，加盖玻片。先在低倍镜下了解总体精子活力，然后在高倍镜下观察精子的活动率及活动力。

2．精子活动率分析

在高倍镜下，随机观察10 个不同视野，计数活动及不活动精子数，算出活动精子百分比，即为精子活动率（活率）。

3．精子活动力分析

高倍镜下观察10 个视野，观察精子活动状态。

WHO 将精子活动力分为如下4 级。

0 级：不活动，无向前运动。

Ⅰ级：活动不良，向前运动微弱（或原地打转）。

Ⅱ级：活动一般，有中等向前运动。

Ⅲ级：活动良好，向前运动活跃。

第2 版《全国临床检验操作规程》（中华人民共和国卫生部医政司编）将精子活动力分为如下5 级。

0 级：死精子，无活动力，加温后仍不活动。

Ⅰ级：不良，精子原地旋转摆动或抖动，运动迟缓。

Ⅱ级：较好，运动方向不明确，不呈直线运动，也不活泼。

Ⅲ级：为中速运动，但波形运动的较多。

Ⅳ级：良好，为快速的直线运动，很快超过1 个视野。运动活泼。

二、精子形态分析

精子形态分析是了解正常精子在生理及病理范围内变异精子所占的比例，是反映男性生育能力的一项重要指标。通常形态学检查方法有两种，一种是制成新鲜湿片，用普通显微镜观察：另一种是将精子固定，染色后用亮视野光学显微镜观察。

1．正常精子形态

正常精子可分为头、体、尾3 部分。头部呈椭圆形或卵圆形，不存在颈、中段或尾部的缺陷（见下述）。细胞质微粒不大于正常头部的1/3。在正常精液中正常形态的精子平均占80 %。

2．畸形精子形态

（1）头部形状、大小异常：包括头部过大过小，锥形头，犁形头，空泡样头，双头等。

（2）体部异常：包括精子体部粗大，折裂，不完整，不规则，弯曲，异常薄的体部。

（3）尾部异常：包括短尾，多尾，缺尾，断尾，宽度不规则，卷尾等。

【参考值】

正常精液中的异常精子应在20 %以下。

三、精子计数

【试剂】

精子稀释液：碳酸氢钠5g，40 %甲醛溶液1ml，加蒸馏水至100ml。

【操作】

于小试管内加精子稀释液0.38ml，吸取完全液化精液20μl，充分混匀，滴入细胞计数池内，1～2min 后进行计数。用高倍镜计数中央大方格内5 个中方格精子数。

【计算】

$$精子数 = 5\ 个中方格精子计数值 \times 10^9/L$$

【参考值】

正常人精子计数存在明显个体差异，同一个人在不同时间内差异也较大。正常精子计数值为（50～150）$\times 10^9/L$（WHO 规定参考值为20 $\times 10^9/L$ 以上）。

四、精液pH 值测定

正常人精液pH 为7.2～8.0。

五、精子质量检测系统的应用

精液常规分析在男性不育症的诊断治疗中是一项基本检查，是了解和评估男性生育能力的重要依据。目前临床实验室普遍使用经典的人工分析方法，由于检测手段不同，实验条件、检验人员水平及经验不同，造成检测结果的差异，降低了报告的客观性和可比性。近年，各地相继推出了电脑精子质量检测系统并试应用于临床。

精子质量检测系统将精液标本通过显微镜进行放大，图像被摄像头采集，一路被送入图像采集卡进行动态分析处理，它能自动测定精子密度、活动力、活动率，还可以对精子的运动轨迹特征进行分析和分类。该系统自身的重复性及不同放大倍数的一致性良好，且与手工法相比具有良好的相关性和准确性，为临床精液常规分析的科学化、规范化和标准化创造了条件。但由于该系统尚处临床应用初期和相关论证阶段，选择使用时应当慎重，必须做好充分的评估工作。其临床应用意义如下：

1）评价男性生育能力，为男性不育症的诊断治疗提供依据。

2）辅助男性生殖系统疾病的诊断。

3）为人工授精和精子库筛选提供优质精子。

4）为法医学鉴定提供佐证。

第四节　前列腺液检查

一、标本采集

临床医师作前列腺按摩术后，采集标本于清洁玻片上，立即送检。

二、一般性状检查

正常前列腺液每天分泌量0.5～2.0ml，稀薄，呈淡乳白色，有蛋白光泽。如发现黄而稠的前列腺液，提示前列腺液有严重感染或脓肿。

三、显微镜检查

1．血细胞

正常前列腺液内红细胞极少，当炎症和脓肿时红细胞增加，按摩过重时红细胞也增多。正常前列腺液内少见白细胞（<10/HP）。若白细胞数>10～15/HP 可诊断为前列腺炎。

2．卵磷脂小体

卵磷脂小体为淡黄色，圆球状，与脂滴相似，发亮，折光性强，分布均匀。其大小不等，可略小于红细胞，也可小至红细胞的1/4。正常前列腺液中含有许多卵磷脂小体，镜下几乎满视野。前列腺脓肿时，卵磷脂小体明显减少，且分布不均匀；前列腺炎症时，卵磷脂小体减少或消失，这是由于炎症时大多数脂类被巨噬细胞吞噬所致。

3．淀粉颗粒

淀粉颗粒系大小不一、层状构造的嗜酸小体，圆或卵圆形，微黄或微褐色。中央部

分常含小粒，系碳酸钙淀粉物质。淀粉颗粒随年龄增长而增加，与疾病无明显关系。

4．其他

还可见到结石、精子、颗粒细胞及滴虫。

【注意事项】

取样后应立即送检，以免干涸。接收样本后马上用显微镜进行检查，以高倍视野观察样本结果并报告。

第八章　阴道分泌物和阴道脱落细胞学检查

第一节　阴道分泌物检查

阴道分泌物主要由阴道分泌，部分由子宫内膜、输卵管等分泌，总称为阴道分泌物，其中混杂着阴道寄生菌群。阴道菌群非常复杂，乳酸杆菌是健康阴道中的主要菌种，一般不致病，处于微生态平衡状态。如果这种平衡被破坏，互相制约作用消失，氢离子浓度下降，乳酸杆菌失去优势，致病菌得以繁殖，则产生相应的炎症或临床症候群，此时阴道分泌物的性状、pH 值、内容、菌群均发生病理性改变。因此，可通过阴道分泌物涂片检查对阴道清洁度、念珠菌阴道炎、滴虫性阴道炎以及细菌性阴道病作出实验室诊断。此外，尚有阴道分泌物涂片染色法、培养法、测定唾液酸酶法、阴道加德纳菌致病菌株的基因诊断法等，可用于阴道炎症性疾病的诊断，但这些检测需时较长，门诊较少采用，仅作为鉴定菌种、测试耐药性、观察药物疗效和流行病学调查

【原理】

用显微镜观察阴道分泌物涂片，根据多视野观察到的白细胞（或脓细胞）、上皮细胞、乳酸杆菌、杂菌的多少，将阴道清洁度分成Ⅰ～Ⅳ度，以反映阴道自洁程度。

【操作】

1）取阴道分泌物，用精密pH 试纸（pH3.8～5.4）测试比对。

2）在涂片上滴加9g/L 氯化钠溶液1～2 滴，低倍镜下检查线索细胞。阴道鳞状上皮细胞上覆盖了许多短杆菌和球菌，以至细胞边缘模糊不清，呈点彩状、条纹或颗粒状，细胞边缘晦黯，呈锯齿形，胞浆呈毛玻璃样即为线索细胞。同时镜下可见少量白细胞或脓细胞，阴道乳酸杆菌缺少，见于细菌性阴道病变。此法对于细菌性阴道病变的诊断相当敏感和特异，但检验者需要具备一定的实践经验。

3）在此涂片上检查真菌，先在低倍镜下多视野观察滴虫虫体，然后转高倍镜检查。

4）高倍镜下检查，多视野观察白细胞（或脓细胞）、上皮细胞、乳酸杆菌、杂菌的多少，判断阴道自洁程度。

5）在涂片上滴加100g/L 氢氧化钾溶液1～2 滴混匀，观察有无氨味释放，此为胺

试验。低倍镜多视野观察菌丝后，转高倍镜检查孢子和菌丝。假菌丝和成群的卵圆形芽孢在镜下观察略带淡绿色折光，假菌丝的菌丝节间有明显的狭窄部，芽孢往往集中于菌丝分隔处，偶可见到分隔的真菌丝，必要时另作革兰染色，油镜检查。

【注意事项】

滴虫在25～2 ℃温度下可活动，因此，寒冷季节，标本要采取保温措施，并用温的9g/L 氯化钠溶液作涂片。

【结果报告】

1）阴道清洁度：分Ⅰ～Ⅳ级，判断标准见表3－8－1。

表3－8－1　阴道清洁度判断

清洁度	上皮细胞	白细胞或脓细胞	阴道乳酸杆菌	杂菌
Ⅰ	＋＋＋	0～5/HP	＋＋＋	无或少许
Ⅱ	＋	6～15/HP	＋＋	＋
Ⅲ	＋	16～30/HP	＋	＋＋
Ⅳ	少许	>30/HP	无或少许	＋＋＋

2）阴道念珠菌：报告“未检出念珠菌”或“检出念珠菌”。有时仅有芽生袍子而无假菌丝，此时报告为“芽生孢子阳性”。

3）阴道滴虫：报告“未检出阴道滴虫”或“检出阴道滴虫”。

4）细菌性阴道病：pH 值以实测值报告；有氨味报告胺试验阳性，否则为阴性；报告“检出线索细胞”或“未检出线索细胞”。

【临床意义】

1）阴道清洁度Ⅰ～Ⅱ度为正常，Ⅲ～Ⅳ度为异常。异常多见于阴道炎，同时可见致病菌、霉菌、滴虫等病原体；如为单一的清洁度异常，可见于非特异性阴道炎。

2）找到滴虫为滴虫性阴道炎、滴虫性尿道炎等。

3）念珠菌芽生孢子和假菌丝同时检出，多为念珠菌阴道炎；有时仅有芽生孢子而无假菌丝，此时报告为芽生孢子阳性，可供临床医生参考。由于部分正常女性的阴道分泌物也可培养出念珠菌，因此，无症状者检出念珠菌，必须结合临床表现。

4）找到线索细胞对于细菌性阴道病的诊断相当敏感和特异。但有5％的非细菌性阴道病妇女也能查到此细胞。若镜下线索细胞占阴道复层鳞状上皮细胞的比例≥20％，则更具有诊断价值。

诊断细菌性阴道病时下列4 个特征中至少应具备3 个：①阴道壁上附有稀薄而均质

的白色分泌物；②阴道分泌物pH 值大于4.6 ；③分泌物加100g/L 氢氧化钾溶液后释放鱼腥样氨味；④分泌物涂片镜检查到线索细胞。

第二节　阴道及宫颈细胞学检查

阴道上皮细胞受卵巢分泌激素的影响而具有周期性变化。检查阴道上皮细胞可反映体内雌激素水平，但一次涂片只能反映当时的卵巢功能，因此，需定期连续观察才能正确掌握卵巢功能的动态变化。常用的方法是阴道上皮细胞涂片检查。阴道脱落细胞主要来自于阴道上段和宫颈阴道部，也可来源于宫腔、输卵管、卵巢及腹腔上皮。通过检查来自不同部位的阴道脱落细胞，可发现不同部位的肿瘤。常用的方法是宫颈刮片，这是筛查早期宫颈癌的重要方法。此外尚有宫颈管吸片以了解宫颈管内情况；宫腔吸片术用于怀疑宫腔内有恶性病变时；对外阴及阴道的可疑病灶也可局部印片，即用清洁玻片直接贴按病灶处作印片，经固定、染色、镜检。所用细胞学染色方法有多种，常用巴氏（Papanicolaou） 染色法，既可用于了解雌激素水平，也可用于查找癌细胞。

一、阴道上皮细胞涂片检查

【原理】

阴道上皮细胞的成熟程度与体内雌激素水平成正比。雌激素水平越高，阴道上皮细胞分化越成熟。因此，适量刮取阴道壁上皮细胞，观察阴道上皮细胞各层细胞的比例，可反映体内雌激素水平，了解卵巢或胎盘功能。

【材料】

清洁载玻片、95 %乙醇、染色液、女用拭子等。

【操作】

已婚者在窥器下轻轻刮取阴道侧壁上1/3 处分泌物及细胞；未婚者用无菌女用拭子经9g/L 氯化钠溶液浸湿后，伸入阴道侧壁上1/3 处涂抹。取出拭子，横放玻片上向一个方向滚涂，均匀涂成薄片后，置于乙醇中固定40 min ，染色，镜检细胞形态特征及染色情况。

【正常阴道脱落细胞的镜下形态特征】

阴道及宫颈阴道部上皮细胞为鳞状上皮细胞，分为表层、中层及底层，其生长和成熟受卵巢分泌的雌激素影响。细胞由底层向表层逐渐成熟。鳞状细胞的成熟过程是：细胞由小逐渐变大；细胞形态由圆形变为舟形、多边形；胞质染色由蓝染变为红染；胞质由厚变薄；胞核由大变小，染色质由疏松变为致密。

1）底层细胞：分为内底层细胞和外底层细胞。内底层细胞呈圆形，体积为中性多核白细胞的4～5倍，圆形核，巴氏染色胞质蓝染；外底层细胞呈圆形，比内底层细胞大，约为中性多核白细胞的8～10倍，巴氏染色胞质淡蓝。核为圆形或椭圆形，染色质细而疏松。卵巢功能正常时，涂片中很少出现底层细胞。

2）中层细胞：接近底层者细胞呈舟状，接近表层者细胞大小与形状接近表层细胞。胞质巴氏染色淡蓝；核呈圆形或卵圆形，染色质疏松为网状。

3）表层细胞：细胞大，为多边形，胞质薄，透明；胞质粉蓝或淡蓝色，核小、固缩。核固缩是鳞状上皮细胞成熟的最后阶段。

【临床意义】

阴道细胞学卵巢功能检查最常用的是成熟指数（maturation index，MI）：低倍镜观察200个细胞，按底层/中层/表层顺序标明3层细胞百分比值。如底层0，中层60，表层40，则写为0/60/40（卵泡中期）。排卵期，雌激素水平高，主要为表层细胞，MI为0/40/60（雌激素水平高，表层细胞百分比值大，称MI右移）；绝经初期，雌激素水平下降，主要细胞成分为中层细胞，MI为0/90/10（中层细胞百分比值大，称MI居中）；绝经晚期，雌激素水平很低，主要细胞成分为底层细胞，MI为100/0/0（雌激素水平低，底层细胞百分比值大，称MI左移）。3层细胞百分比相似时称展开（也称分散型）。一般卵巢功能正常者基本上无底层细胞，在卵巢功能低下时则出现底层细胞，轻度低下者底层细胞<20%；中度低下者底层细胞占20%～40%；高度低下者底层细胞>40%。

二、宫颈刮片检查

【原理】

刮取宫颈外口鳞状上皮与柱状上皮交接处适量细胞，涂抹成均匀薄片，经乙醇固定后染色，镜检细胞形态特征及染色情况，以此筛查宫颈癌及其早期病变。

【材料】

小脚刮板、清洁载玻片、乙醇、染色液。

【操作】

轻轻擦净宫颈黏液，在宫颈外口鳞状上皮与柱状上皮交接处，以宫颈外口为圆心，用木质小脚刮板轻轻刮取标本，涂抹在玻片上。近年来使用宫颈双取器可同时采取宫颈鳞状上皮与柱状上皮交接处及宫颈管上皮两处的标本。

【附注】

涂片不宜太厚，也不要来回涂抹，以防破坏细胞。

【结果报告】

阴道细胞学诊断的报告形式主要为分级诊断及描述性诊断两种。目前我国多数医院

仍采用分级诊断。

1．巴氏5 级分类法

1） 巴氏Ⅰ级：正常。为正常阴道细胞涂片。

2） 巴氏Ⅱ级：炎症。一般属良性改变或炎症。细胞核增大，淡染或有双核，也可见核周晕或胞质内空泡。临床分为ⅡA 及ⅡB。ⅡB 是指个别细胞核异质明显，但又不同于恶性病变，其余为ⅡA。

3） 巴氏Ⅲ级：可疑癌。主要是核异常，表现为核大深染，核形不规则或双核。对不典型者，性质尚难肯定。

4） 巴氏Ⅳ级：高度可疑癌。细胞有恶性病变特征，但在涂片中恶性细胞较少。

5） 巴氏Ⅴ 级：癌。具有典型的多量癌细胞。

2.TBS 分类法及其描述性诊断

为了使宫颈、阴道细胞学的诊断报告与组织病理学术语一致，1988 年美国制定阴道细胞TBS （The Behtesda System） 命名系统。国际癌症协会于1991 年对宫颈、阴道细胞学的诊断报告正式采用了TBS 分类法。近年，我国也逐步推广TBS 分类法。TBS 描述性诊断的细胞病理学诊断报告中包括为临床医师提供有关标本 （涂片） 质量的信息、病变的描述、细胞病理学诊断及对症处理的建议。

附录：宫颈阴道细胞学TBS 报告系统

（Bethesda，Maryland 1988）

一、取样涂片形容的恰当语句

·满意、较好、不满意

对于较好／不满意的说明：

细胞缺乏

固定和保存不良

外来物的存在 （如润滑剂等）

部分或全部为不清楚的炎性物

部分或全部为模糊的血液

过多的细胞溶解物或其他自溶物

在绝经前妇女 （未切除宫颈者） 涂片上没有宫颈管内膜成分

涂片内容没有反映解剖部位的特征

其他

二、编目总则

·在正常的界限内

·其他

见下述诊断描述

推荐的进一步诊断性工作

三、诊断描述

1．感染

·真菌

符合念珠菌形态

其他

·细菌

符合加德纳（Gardnerella）菌的形态

符合放线菌的形态

衣原体感染由感染细胞形态变化提示（必须经确证研究）

其他细菌感染

·原虫

阴道毛滴虫

其他原虫感染

·病毒

伴有感染细胞变化的巨细胞病毒

伴有感染细胞变化的单纯性疱疹病毒

〔注：人类乳头状病毒（HPV）感染将在鳞状上皮细胞异常中介绍〕

2．组织反应和修复的变化

·炎症

伴细胞变化

滤泡性宫颈炎

·其他方面

治疗反应

电离放射

化学治疗剂

手工操作器械的影响

非类固醇类激素所引发性效应（如已烯雌酚）

其他

3．上皮异常

鳞状上皮细胞

·无决定意义的非典型性鳞状上皮细胞（建议观察后进一步研究）

·鳞状上皮内损伤（SIL）（如发现有HPV感染后细胞变化的证据，应加以评注）

低度SIL

符合HPV感染的细胞学图像

轻度结构不良/宫颈上皮内新生物形成（CIN$_1$）

高度SIL

中度结构不良/CIN$_2$

重度结构不良/CIN$_3$

·鳞状上皮细胞癌

腺上皮细胞

·子宫内膜细胞的存在

在行经妇女的不同时期

绝经后妇女

没有月经史可查

·无决定意义的非典型性腺上皮细胞（建议观察和进一步研究）

宫颈内膜

子宫内膜

无另外说明

·腺癌

详细说明来源的可能部位：宫颈内膜、子宫内膜、子宫外

无另外说明

·其他上皮恶性新生物（详细说明）

4．非上皮来源的恶性新生物

5．激素水平评价（仅适用于阴道涂片）

·激素水平与年龄及月经史相适应

·激素水平与年龄及月经史不相适应（应详细说明）

·激素水平不能评价

宫颈涂片

炎症

不适当的病史

6．其他

【摘自 Clinics in Laboratory Medicine，1991，11（1）：271】

第九章　羊水检验

妇女妊娠期间充满羊膜腔的液体称羊水（amniotic fluid）。妊娠早期的羊水，主要是由母亲血浆通过胎膜进入羊膜腔的漏出液，亦有少量由胎儿皮肤透析而来。妊娠16 周起，胎儿尿液可能成为羊水的重要来源。妊娠18 周时胎儿24h 尿量约7～17ml，足月时的尿量大约43ml/h。由于大量低渗尿液进入羊水，使其渗透浓度降低，主要是钠浓度的降低，而肌酐、尿素、尿酸浓度上升。胎儿呼吸道分泌物亦能进入羊水，并将肺表面活性物质带入羊水中。羊水量在妊娠3～8 周后随胎龄而增加，但个体差异很大。妊娠8 周时羊水量为5～10ml，12 周约50ml，16 周为150～250ml，20 周为300～400ml，36～38 周达高峰约800～1200ml。以后逐渐减少，足月时羊水量约为500～800ml。在过期妊娠时，羊水量显著减少。

羊水中98%～99%是水，1%～2%是溶质。溶质的一半是有机物，一半是无机盐。其中有机物成分包括葡萄糖、脂肪、蛋白质及衍生物、代谢产物、激素等，无机成分包括电解质、气体等。羊水中还含有少量细胞。

羊水检验对于预测胎儿状况有多方面的应用价值。在了解胎儿成熟度、辨别胎儿性别、判断某些先天性缺陷或遗传疾病时，羊水检验均可提供参考依据，甚至可用于确诊。

第一节　胎儿成熟度检查

借助羊水中某些物质的消失来了解胎儿脏器功能，判断脏器成熟度，对于处在高危妊娠期的孕妇很重要，有助于在引产或剖宫产前，判断胎儿是否足够成熟，能否独立生存。

一、肺成熟度检查

（一）羊水中卵磷脂/鞘磷脂比值测定

【原理】

抽提羊水中的磷脂，用硅胶薄层层析法分离其中的卵磷脂（L）和鞘磷脂（S），显色后计算L 和S 的面积及其比值（L/S）。

【试剂和材料】

甲醇（分析纯），氯仿，丙酮（分析纯），尼罗蓝氯仿液：在2ml 氯仿中加入硫酸尼罗蓝粉1mg，硅胶薄层层析板（13cm ×6.5cm 商品层析板）。

【操作】

（1）磷脂抽提：取羊水上清液2.0ml 置25ml 有塞试管中，加甲醇2ml，振荡15s，加氯仿4.0ml，剧烈振荡40s，倒入离心管内，2500r/min 离心10min。用长针头注射器插入底层，吸尽氯仿并注入有塞尖底蒸发管内，置60℃水浴，自顶部吹氮气，于负压下蒸干。加入丙酮0.5ml，摇动蒸发管数次，置4℃冰箱30min，再以2000r/min 离心5min，吸弃丙酮，干后加入尼罗蓝氯仿25μl，使沉淀溶解。

（2）点样：将上清液吸出，在硅胶薄层层析板的一端，距板边缘1.5～2.0cm 处并在同一点上分次点样，边点边用电吹风吹，点样直径不超过0.5cm。在同一薄板上间隔1cm 处，点卵磷脂或鞘磷脂标准品，以作对照。

（3）展开：将已点样的硅胶板斜置于装有展开剂的小标本缸中，点样点应在液面之上，然后加盖，经60～90min，待展开剂前沿至点样点约11cm 时，取出硅胶板，阴干。

（4）显色：将硅胶板放入饱和碘蒸气密闭器中，熏5min 显色。L 及S 斑点吸碘后呈棕黄色，L 斑点在上方，S 斑点在下方。硅胶板熏碘取出后立即在其上面加盖一块同等大小的玻璃板。

（5）计算：用圆规分别测量两斑点的长和宽，再计算L 和S 各自的面积及其比值。

$$L/S = \frac{L\ (\text{斑长} \times \text{宽})}{S\ (\text{斑长} \times \text{宽})}$$

【临床意义】

卵磷脂与鞘磷脂为肺泡表面活性物质的主要成分。当L/S ≥2 时，提示胎儿肺已经成熟；L/S =1.50～1.99 为临界值，L/S ≤1.49 则胎儿肺尚未成熟。

（二）泡沫试验

【原理】

该试验为一种间接估量羊水中磷脂的方法。羊水中表面活性物质磷脂在乙醇中经振荡后形成稳定的泡沫，而羊水中的其他物质如蛋白质、胆盐、醋酸盐及未饱和磷脂形成的泡沫，可被乙醇消除。

【操作】

（1）取口径12～14mm 的有塞尖底试管5 支，按表3－9－1 分别加入不同量的羊水和试剂。

表3－9－1　羊水泡沫试验稀释步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	
羊水	1.0	0.75	0.5	0.25	0.2
9g/L 氯化钠溶液	－	0.25	0.5	0.75	0.8
95％乙醇	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

（2）加试剂完毕后，塞紧试管塞，置试管架上垂直强力振荡15s，静置15min 后，观察各管液体空气界面有无泡沫形成。

【结果判断】

若整圈呈现持久泡沫为阳性（+）；有泡沫，但不成圈的为可疑（±）；无泡沫为阴性（－）。

【注意事项】

（1）羊水标本采集后，应立即进行检测，否则标本须置于4℃下保存。检测既可用混匀的羊水，也可用离心后的羊水上清液。羊水和试剂用量准确是本试验的关键。试管要清洁干燥，内径应保持一致，乙醇浓度要精确。

（2）羊水不宜长时间离心，以免活性物质沉淀，致检测结果呈假阴性。

（3）羊水中不能混有胎粪、血液。

【临床意义】

临床上为了便于操作，通常只作第1 管和第3 管。若两管液面均有完整的泡沫环为阳性，L/S ≥2，提示胎儿肺成熟；若第1 管液面有完整的泡沫环，而第3 管无泡沫环为临界值，即1.5 <L/S <2。若两管均无泡沫环则为阴性，L/S ≤1.49，提示胎儿肺未成熟。

二、皮肤成熟度检查

测定羊水中脂肪细胞出现率是反映胎儿皮肤是否成熟的指标。

【操作】

取羊水离心后的沉淀液滴于载玻片上，加1g/L 硫酸尼罗蓝溶液1 滴混合，1～2min 后加盖玻片，在火焰上缓缓加热（50～60℃），2～3min 后置镜下观察。脂肪细胞呈无核橘黄色细胞。

【临床意义】

脂肪细胞百分率>20％，提示胎儿皮肤成熟；10％～20％，为胎儿皮肤成熟可疑；<10％，为胎儿皮肤未成熟。

三、肝成熟度检查

羊水胆红素测定可反映胎儿肝的成熟度。

【操作】

1）取羊水5～10ml。

2）用滤纸除去上皮细胞及胎脂，取滤液测吸光度值。

3）使用721分光光度计，用蒸馏水调零，使用光径1cm的比色杯，于波长450nm处测定羊水吸光度值。当羊水吸光度值<0.02为胎儿肝未成熟。

四、肾成熟度检查

羊水肌酐来自胎儿尿液，为胎儿代谢产物，其排出量可反映胎儿肾的成熟度。妊娠30周，肌酐含量≤132.5μmol/L；37周时肌酐含量≥176.8μmol/L。因此，132.5μmol/L＜肌酐含量<176.8μmol/L为临界值，≤132.5μmol/L为胎儿肾未成熟。

第二节　羊水细胞培养及检验

在流产儿产前诊断中，染色体异常大约占70%～80%，因此，羊水细胞染色体检查是遗传咨询门诊的主要方法，能诊断先天愚型，X性连锁病及许多易位、倒置，染色体数目和结构异常的先天性遗传病。羊水细胞培养及检验详细内容参阅第二篇血液学检验第六章人类染色体检验技术。

第三节　羊水上清液检验

一、甲胎蛋白测定

【操作】

参阅第五篇免疫学检验第八章肿瘤标志物测定有关内容。

【临床意义】

一般妊娠8～24周时为20～48mg/L，妊娠15周达高峰，以后逐渐下降。羊水中甲胎蛋白含量明显上升是诊断开放性神经管缺陷的重要指标。

二、总胆碱酯酶测定

【操作】

参阅第四篇生物化学检验第四章酶类测定相关内容。

【临床意义】

主要是协助诊断开放性神经管缺陷。

三、血型物质测定

【操作】

参阅第二篇血液学检验第二章血型鉴定、配血与输血。

【临床意义】

测定羊水血型物质可以预测胎儿血型，有助于诊断新生儿溶血症，同时可以提前为新生儿换血治疗做好血源准备。

第十章　尿结石分析

一、一般性状检查

1．外观

1）鹿角形：好发于肾盂。多为磷酸铵镁、磷酸钙结石，外观白色，粗糙，质软。

2）索条形：好发于输尿管。

3）圆形：好发于膀胱内。

4）椭圆形：好发于膀胱内。

5）哑铃形：嵌入膀胱。

6）桑椹样：星状突起，质硬，褐色。多为草酸钙、磷酸钙结石。

7）粗糙形：多为尿酸结石，黄褐色。

8）光滑、黄蜡样：多为胱氨酸结石。

2．硬度

不同成分结石从高硬度到低硬度顺序如下：

磷灰石＞二水草酸钙＞单水草酸钙＞尿酸＞胱氨酸＞磷酸钙和磷酸镁铵

3．密度

密度D 可根据下式计算：

$$D\ (g/cm^3) = \frac{a}{a-b}$$

式中a 为尿石在空气中重量；b 为尿石在水中重量。

二、化学定性分析

【标本处理】

1）洗净血污、残尿，室温下干燥。

2）摄X 线片。

3）X 线显影弱者为尿酸盐结石，显影强者为钙镁盐结石。

4）烧灼区别有机物、无机物。

5）加热后即熔化为煤焦状则为磺胺结石。

【试剂】

1．尿酸试剂

（1）甲液：取浓磷酸25ml 于500ml 三角烧瓶内加水80ml，小火煮沸，徐徐加入钨酸钠50g，瓶口置一小漏斗，再回流微沸1h，必要时补充蒸馏水保持溶液原容量。

（2）乙液：于500ml 烧杯内，加碳酸锂12.5g 及水100ml，小火煮沸，徐徐加入浓磷酸25ml（注意冒泡），同时搅拌至溶液澄清。

待甲、乙两液冷却后，移至500ml 容量瓶内用水充分洗涤容器，并全部倾人瓶内，加水至刻度，混匀转入深色瓶备用。

2．钼酸试剂

配方（1）：3.5g 钼酸铵加75ml 重蒸馏水及25ml 浓硝酸，摇匀。

配方（2）：5mol/L 硫酸溶液加75g/L 钼酸钠溶液等量混合。

3．奈氏试剂

3.5g 碘化钾加76ml 双蒸馏水，再加1.3g 氯化汞溶解，加5mol/L 氢氧化钠溶液25ml 混匀，保存于棕色瓶中。

4.pH5.0 醋酸缓冲液

27.2g 醋酸钠加100ml 蒸馏水，再加3.6g 冰醋酸加水130ml，混匀。

5.1mol/L 亚硫酸钠溶液

亚硫酸钠粉末10.4g 加90ml 蒸馏水和1mol/L 氢氧化钠溶液5ml，再加蒸馏水至100ml 混匀。

6．镁试剂

10mg 对硝基苯偶氮间苯二酚溶于1mol/L 氢氧化钠溶液100ml 混匀。

7.Millon 试剂

1 份汞（重量）加2 份浓硝酸，冷却后以水稀释成2 份。

8．酸性试剂

A 组分：重蒸馏水10ml，醋酸汞80mg，浓硫酸0.8ml。

B 组分：重蒸馏水10ml，钼酸铵300mg，二甲基黄300mg。

使用时，A、B 组分1∶1 混合，离心取上清液备用。

9．碱性试剂

A 组分：重蒸馏水10ml，硫酸锌300mg，氢氧化钠1g。

B 组分：甲基蓝100mg，双蒸馏水12ml，溴化钾1.5g，碘化汞30mg。

A、B 组分1∶1 混合，离心取上清液备用。

10．其他试剂

20g/L 碳酸钠溶液、0.4mol/L 氰化钠溶液、1g/L 亚硝基铁氰化钠溶液、3mol/L 盐酸

溶液、5mol/L 氢氧化钠溶液、2.5mol/L 氢氧化钠溶液、0.28mol/L 草酸溶液、5g/L 亚硝酸钠溶液、5g/L 二甲基－α－奈胺酒精溶液、氨水、氧化锰、氯仿（或乙醚）、醋酸酐、硫酸、硝酸、苏丹III染色液（同血液细胞化学染色）。

【操作】

1．显微镜观察

（1）记录结石外观大体情况（称重、颜色、大小、硬度）。

（2）在两张清洁中性玻片上各放待检结石粉末1～10mg（黄豆大小即可），一玻片上滴1 滴酸性试剂，另一张玻片上滴1 滴碱性试剂，然后均覆盖盖玻片，置低倍镜下观察。

（3）观察颜色变化及玻片上结晶。①草酸盐：在酸性试剂中5min 色泽无明显改变，5～20min 后可在黄色边缘见到针状成簇结晶。在碱性试剂中1min 内颜色由紫色变蓝色，在显微镜下可见玻璃样结晶。②磷酸盐：三联磷酸盐在酸性液中呈洗肉水样而在碱性试剂中迅速转变成深蓝色团块状结晶。③尿酸盐：在酸性试剂中无明显改变，样品呈黑色；在碱性试剂下数秒钟可见棕黄色或呈深蓝色浓的边缘界，而尿酸钠外缘可呈棕、蓝、绿不同颜色。④胱氨酸：在酸性试剂中可见棕黑色结晶；在碱性试剂中迅速溶解成黄色或玫瑰红色，可见胱氨酸结晶。

2．化学分析

将待检结石锯开，如剖面层次清晰应分层取材试验。待检样品放人乳钵中碾碎，选择如下方法进行定性检查。

（1）尿酸及尿酸盐：加20g/L 碳酸钠溶液和尿酸试剂各2 滴，呈蓝色即为阳性。

（2）磷酸盐：加3 滴钼酸试剂，渐呈黄色沉淀为阳性；或加入1mol/L 亚硫酸钠溶液1 滴，呈蓝色为阳性。

（3）铵盐：加奈氏试剂2 滴后呈橘黄色沉淀为阳性。

（4）胱氨酸：加pH5.0 醋酸缓冲液2 滴，1mol/L 亚硫酸钠溶液1 滴及尿酸试剂2 滴，5min 后变蓝色为阳性；或加浓氨水1 滴，0.4mol/L 氰化钠溶液1 滴，5min 后加1g/L 亚硝基铁氰化钠溶液2 滴，呈鲜艳的紫红色为阳性。

（5）碳酸盐：含待检结石粉末试管内沿壁慢慢加入3mmol/L 盐酸溶液约0.5ml，冒泡即为阳性。

（6）草酸盐：仍用上一试管，加入氧化锰粉末，不摇动，自溶液底层冒泡为阳性。

（7）钙：结石粉末加3mol/L 盐酸溶液0.5ml 加热至沸溶解，冷却后加入5mol/L 氢氧化钠溶液呈白色沉淀则结石含有钙、镁。结石粉末加pH5.0 醋酸缓冲液5 滴，0.28mol/L 草酸溶液或其盐溶液2 滴，若产生混浊沉淀，表示有钙存在，反之仅镁存在。

8）镁：待测结石碱化后加入镁试剂2 滴，液面间有蓝色环并随沉淀下沉为阳性。

9）其他：如结石经初步烧灼疑为磺胺结石或有机组分，上述反应为阴性，需做如下试验判断。①磺胺类：待检结石粉少许，加水0.5ml，加新制备的5g/L 亚硝酸钠溶液0.5ml，混匀，放置3min，加5g/L 二甲基－α－萘胺酒精溶液1ml、3mol/L 盐酸溶液2滴，如有红色则为阳性。②靛盐：结石粉末，加入1ml 氯仿或乙醚，加塞振摇放置30min，溶液呈蓝色为阳性。③胆固醇：取上述氯仿溶液，加入醋酸酐1ml 及浓硫酸0.2ml，置暗处10min，如有蓝绿色则为阳性。④尿脂石：取上述氯仿溶液，滴数滴于凹孔玻片上，蒸发使干，苏丹III染色后，于镜下观察，见桔红色小球或十字架结构则为阳性。⑤黄嘌呤：取待检结石粉末于瓷蒸发皿中，加浓硝酸1 滴，小心加热至于，显橙黄色，再加2.5mol/L 氢氧化钠溶液1 滴，呈桔红色则为阳性。⑥纤维蛋白：待检结石粉末加入Millon 试剂1ml，加热后如有红色沉淀为阳性。⑦硅酸盐：结石粉末加入钼酸试剂5 滴，加热呈黄色为阳性。

第四篇
生物化学检验

第一章　糖类测定

第一节　葡萄糖测定

临床上葡萄糖（glucose）测定的标本有血液、尿液和脑脊液。过去测定血糖多采用全血，现多用血清或血浆，葡萄糖全血浓度比血清或血浆约低15%。葡萄糖定量测定的常规方法有氧化还原法、芳香胺缩合法和酶法三大类。氧化还原法原理基于葡萄糖的还原性，因其特异性差已被淘汰；芳香胺缩合法中常用的是邻甲苯胺法，操作时需在100℃煮沸且试剂配制麻烦；葡萄糖氧化酶法特异性较好，试剂也便宜，可代替前者；己糖激酶法特异性更好，是测定葡萄糖的参考方法。

一、葡萄糖氧化酶－过氧化物酶法

【原理】

葡萄糖氧化酶（GOD）利用氧和水将葡萄糖氧化成葡萄糖酸，并产生过氧化氢。过氧化氢在过氧化物酶（POD）作用下，将还原性色素原4－氨基安替比林（4－AAP）和酚去氢氧化，缩合为红色醌类化合物，此即为Trinder反应。红色的深浅与葡萄糖浓度成正比。此法称葡萄糖氧化酶－过氧化物酶法（GOD－POD法）。反应式如下：

$$\text{葡萄糖}+O_2+2H_2O \xrightarrow{GOD} \text{葡萄糖酸}+2H_2O_2 \qquad 2H_2O_2+4\text{－AAP}+\text{酚} \xrightarrow{POD} \text{醌亚胺}+4H_2O$$

【试剂】

1）葡萄糖校准液：浓度5.55mmol/L左右。需使用可溯源的校准液。

2）酶试剂：取GOD1200U，POD1200U，4－氨基安替比林10mg，叠氮钠100mg，加0.1mmol/LL磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.0）80ml左右，调节pH至7.0±0.1，加PBS到100ml，置4℃保存，可稳定4个月。

3）酚溶液：称酚100mg溶于去离子水100ml中，用棕色瓶储存。

4）酶酚混合试剂：酶试剂和酚溶液等量混合，4℃可存放1个月。两者也可分开使用，稳定期更长。

【操作】

1）手工法：按表4－1－1步骤操作。

表4－1－1　葡萄糖测事实上GOD－POD法操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
标本	0.020		
葡萄糖校准液		0.020	
去离子水			0.020
酶酚混合试剂	3.0	3.0	3.0

各管置37℃水浴中，15min后在波长505nm处以空白管调零，读取各管吸光度值。

2）自动分析法：采用终点法，反应时间5～10min，具体按试剂盒说明书要求设置分析参数。根据试剂和仪器不同有单试剂法和双试剂法，有些仪器利用双试剂可设置两点终点法，能有效地扣除标本颜色导致的干扰。

【计算】

$$\text{葡萄糖浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{标准管吸光度值}} \times \text{校准液葡萄糖浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）标本问题：①血液离体后，葡萄糖仍可被血细胞中酶酵解而使血糖下降，因此，应尽快分离出血清或血浆。室温自然凝固的标本，血清葡萄糖浓度每小时下降7%左右。血标本若以氟化钠－草酸钾抗凝，可抑制红细胞酵解葡萄糖并起抗凝作用。②GOD－POD法可用于直接测定脑脊液葡萄糖含量，但不宜直接测定尿液葡萄糖。因为尿液中尿酸等还原性物质浓度过高，干扰POD反应，导致检测结果偏低。在大量应用维生素C时，因脑脊液中葡萄糖含量低，而脑脊液维生素C含量较血浆高，所以亦可使检测结果偏低。

2）POD的特异性较低，一些还原性物质如尿酸、胆红素、维生素C、谷胱甘肽及一些还原性药物，可与色原性物质竞争过氧化氢并消耗之，使测定结果偏低。但标本含有胆红素342μmol/L、尿酸2.95mmol/L（50mg/dl）、半胱氨酸4.13mmol/L（50mg/dl）时，并不影响测定结果。维生素C浓度568μmol/L时，测定结果偏低1.3%～7.6%，超过2840μmol/L时测定结果可为零。氟化钠2g/L以下不干扰测定结果。

3）方法学评价：GOD法线性范围至少可达22.2mmol/L；回收率94%～105%；变异系数批内0.7%～2.0%，批间2%左右，日间2%～3%；操作简便。

4）溶液中的葡萄糖约36%为α型，64%为β型，GOD仅对β－D葡萄糖高度特异，

葡萄糖的完全氧化需要α型到β型的变旋反应。国外某些商品GOD 试剂盒含有葡萄糖变旋酶，可加速这一反应。但采用终点法时，5～10min 的反应时间可达到完全自发变旋。新配制的葡萄糖校准液主要是α型，故须放置2h 以上（最好过夜），待变旋平衡后方可应用。

二、已糖激酶法

【原理】

在己糖激酶（HK）催化下，葡萄糖与三磷酸腺苷（ATP）发生磷酸化反应，生成葡萄糖－6－磷酸（G－6－P）和二磷酸腺苷（ADP）。G－6－P 在葡萄糖－6－磷酸脱氢酶（G6PD）催化下脱氢，生成6－磷酸葡萄糖酸内酯（6－PGA）。反应式如下：

$$\text{葡萄糖}+\text{ATP}\xrightarrow{\text{HK}}\text{G}-6-\text{P}+\text{ADP}$$

$$\text{G}-6-\text{P}+\text{NADP}^{+}\xrightarrow{\text{G6PD}}6-\text{PGA}+\text{NADPH}+\text{H}^{+}$$

反应中还原型辅酶Ⅱ（NADPH）的生成量和生成速率与浓度成正比，在波长340nm 处监测吸光度的升高值（△A），可计算血清中葡萄糖浓度。

【试剂】

1）葡萄糖校准液：同GOD－POD 法。

2）酶混合试剂的成分与浓度如下：三乙醇胺盐酸缓冲液（pH7.5）50mmol/L，硫酸2.0mmol/L，ATP2.0mmol/L，NADP2.0mmol/L，HK ≥1500U/L，G6PD2500U/L。

【操作】

自动分析法多用速率法，具体按试剂盒说明书要求设置分析参数。主要分析参数：样品/试剂体积比一般为1/50，孵育时间30s，监测时间60s。

【计算】

$$\text{葡萄糖浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定}\triangle A/\text{min}-\text{空白}\triangle A/\text{min}}{\text{标准}\triangle A/\text{min}-\text{空白}\triangle A/\text{min}}\times\text{校准液葡萄糖浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）HK 法适合于血、尿和脑脊液葡萄糖浓度测定。此外，测定氧消耗量的葡萄糖氧化酶法（如氧电极法）和邻甲苯胺法亦可测定尿液葡萄糖浓度。尿糖浓度很高时，需适当稀释。

2）HK 和G6PD 是关键的工具酶，必须使用合格产品。HK 最适pH6.0～9.0，Mg^{2+}为激活剂，EDTA 为抑制剂。G6PD 以$NADP^{+}$为辅酶的最适pH 值大于8.5，以NAD^{+}为辅酶的最适pH 为7.8；但来源于酵母和人血细胞的G6PD 只能以$NADP^{+}$为辅酶，而来源于明串珠菌属的G6PD 以$NADP^{+}$或NAD^{+}为辅酶均可。

3）方法学评价：线性范围可达33.3mmol/L；回收率99.4%～101.6%；变异系数

日内0.6％～1.0％，日间1.3％左右：特异性高，干扰少。

4）严重溶血标本（血红蛋白含量200～5.12g/L），因红细胞内有机磷酸酯及一些酶类释放，而消耗$NADP^+$，可导致葡萄糖浓度测定值减小。

【参考值】

空腹血液葡萄糖（简称血糖）：3.89～6.11mmol/L（70～110mg/dl）

脑脊液葡萄糖：成人2.5～4.5mmol/L（45～80mg/dl），儿童2.8～4.5mmol/L（50～80mg/dl）

尿液葡萄糖：0.28～0.83mmol/L（5～15mg/dl），24h 尿糖为0.56～1.67mmol（100～300mg）

【医学决定水平】

血糖浓度6.12～700mmol/L（110～126mg/dl）为空腹血糖受损；＞700mmol/L（126mg/dl）为糖尿病诊断标准。

随机血糖浓度＞33.3mmol/L（600mg/dl）为糖尿病非酮症高渗综合征；＜2.8mmol/L（50mg/dl）考虑低血糖症。

【临床意义】

1．血液葡萄糖

1）生理性高血糖：见于饭后1～2h；摄人高糖食物后；情绪紧张时。

2）病理性高血糖：①各型糖尿病，包括1 型、2 型、妊娠型和特异型糖尿病。②颅内压增高，如颅内出血、颅外伤、脑膜炎等导致颅内压增高，使血糖升高。③脱水。

3）生理性低血糖：见于饥饿和剧烈运动后。

4）病理性低血糖：①胰岛β细胞增生或肿瘤等，使胰岛素分泌过多。②对抗胰岛素的激素分泌不足，如垂体前叶功能减退使生长激素分泌减少、肾上腺皮质功能减退使肾上腺皮质激素分泌不足等。③严重肝病：肝脏储存糖原及颓原异生功能下降，肝脏不能有效地调节血糖。

2．脑脊液葡萄糖

1）降低：化脓性或结核性脑膜炎时，葡萄糖被细菌分解而使脑脊液葡萄糖浓度降低。而病毒感染时正常。

2）升高：糖尿病及某些脑炎患者。

3．尿液葡萄糖

尿糖来源与血糖有关，当血液内葡萄糖超过肾糖阈（8.88mmol/L 即160mg/dl）时，尿液中出现葡萄糖。

1）生理性尿糖：见于进食大量糖及注射葡萄糖后，情绪紧张及注射肾上腺素后。

2）病理性尿糖：见于各型糖尿病。

3）肾性糖尿：血糖正常而尿内有糖。见于某些先天性肾小管疾病，如范科尼综合征。后天获得性肾性糖尿可见于慢性肾小球肾炎和肾病综合征。

第二节　口服葡萄糖耐量试验

葡萄糖耐量试验（glucose tolerance test，GTT）可分为口服和静脉给予葡萄糖两种试验方式。静脉GTT主要有两个缺点：其一这是非生理性应答现象；其二静脉内高浓度的葡萄糖刺激易致血栓性静脉炎。口服途径给药后的血糖浓度与机体葡萄糖吸收速率、分布容积及葡萄糖离开血液的速度有关，后者主要取决于胰岛素的作用。除正规的口服葡萄糖耐量试验（oral glucose tolerance test，OGTT）外，还有一些简单的适应临床需要的耐糖试验，如早晨进食100g馒头后2h血糖测定，一般早餐、午餐、晚餐后一定时间血糖测定等。

【原理】

OGTT是一种口服糖负荷试验。正常机体在一次性大剂量摄入葡萄糖后，在激素、肝脏功能的调节下，血糖只在一定程度内暂时性升高，称为耐糖现象。若服用一定量葡萄糖后，血糖和尿糖超过正常水平，则为糖耐量下降。对于空腹血糖正常或稍高，症状又不明显的糖尿病患者，口服糖耐量试验可提高诊断的灵敏度。

【方法】

1）试验前3d，正常饮食，每天进食碳水化合物不低于250g，同时停服影响试验的药物。受试前1d晚餐后禁食。

2）清晨空腹取静脉血后，将75g葡萄糖（小儿每千克体重1.75g）溶于300ml温开水中，5min内服完。服糖后0.5h、1h、2h及3h各抽血1次。测定每次的血糖浓度。

3）试验期间，每小时收集尿标本1次，用做尿糖定性试验。

4）将各次血糖和尿糖检测结果以数据或曲线形式报告。

【注意事项】

1）不必每次试验均采血5次，根据需要可采2～4次，如空腹+2h、空腹+0.5h（或1h）+2h、空腹+0.5h+1h+2h等。

2）采血做OGTT同时，可测定胰岛素和C肽浓度，以了解胰岛素释放情况。

【参考值】

空腹血糖<6.11mmol/L，服糖后0.5～1.0h血糖浓度达到峰值（<10mmol/L），服糖后2h血糖浓度<7.78mmol/L，每次尿糖定性试验结果均为阴性。

【医学决定水平】

服糖后2h 血糖浓度≥7.78mmol/L 为糖耐量受损，≥11.1mmol/L 为糖尿病；服糖后0.5～1.0h 血糖≥11.1mmol/L 并有糖尿病临床表现者为糖尿病。空腹血糖变化意义同上节。

【临床意义】

1）诊断糖尿病。

2）胃排空延迟，小肠吸收不良，及垂体－肾上腺功能低下时，OGTT 不同时间血糖值均低于正常。

3）胃切除或严重肝病患者，肠道吸收葡萄糖快，或肝脏不能快速转化葡萄糖，OGTT 表现为服糖后血糖急剧升高，峰值出现早且超过10mmol/L，但2h 后则低于空腹血糖水平（由反应性胰岛素增加所致）。

第三节　糖化血红蛋白测定

检测糖化血红蛋白（glycated hemoglobin，GHb），即血红蛋白A_1（HbA_1）必须先将其从总血红蛋白中分离或用特异性抗体检测。主要方法有层析法、电泳法和免疫法。层析法可采用离子交换层析、高效液相色谱和亲和层析；电泳法有醋酸纤维素薄膜电泳、等电聚焦电泳和毛细管电泳；免疫法有胶乳免疫凝集法、放射免疫法和酶免疫法。这些方法中，以离子交换层析较常用，胶乳免疫凝集法则简便、可自动化操作。各种方法可能检测HbA_{1C}或是HbA_1，最好检测HbA_{1C}（参见临床意义）。

专用于测定GHb 的仪器，有利用离子交换层析法、高效液相色谱法、亲和层析法，也有胶乳免疫凝集法。这些仪器操作简单、重复性好、准确度高。例如，利用离子交换层析及梯度洗脱技术的仪器，可分离检测血红蛋白A_{1C}和各种血红蛋白变异体，仪器具有恒温装置、自动洗脱功能，以及由内置比色计检测415nm 处的吸光度并计算结果，打印出各血红蛋白组分的洗脱峰。这种仪器比手工离子交换层析法的精密度和准确度均好。有一种专用的高效液相色谱法血红蛋白分析系统，能自动进样，适合标本量大的检测中心，能检测血红蛋白A_{1C}、血红蛋白F 和各种血红蛋白变异体。在生化分析仪上可进行GHb 胶乳免疫凝集法测定，但精密度较差；专用的胶乳免疫凝集法GHb 测定仪则各种性能均较好。

离子交换微柱层析法

【原理】

用Bio－Rex 阳离子交换树脂层析，可将HbA_1从总血红蛋白中分离出来，然后测定

洗脱液中HbA_1的吸光度，计算其占总血红蛋白的百分率。

【试剂】

所采用的商品试剂盒中应包含如下试剂：

1）缓冲液Ⅰ（pH6.8）：磷酸二氢钠5.18g，磷酸氢二钠1.18g，氯化钾0.65g，溶于去离子水中，并稀释至1L。

2）缓冲液Ⅱ（pH6.4）：磷酸二氢钠14.35g，磷酸氢二钠6.25g，溶于去离子水中，并稀释至1L。

3）溶血剂：皂素0.3g，氰化钾0.5g，溶于缓冲液Ⅰ中，并稀释至1L。

4）离子交换树脂：Bio－Rex70 阳离子交换树脂（200～400 目）100g，加缓冲液Ⅰ500ml，充分搅拌后加磷酸，调pH 至6.7～6.8，再将树脂用缓冲液Ⅰ洗涤2 次，倾去过剩的缓冲液，所得匀浆即可灌柱。

【操作】

具体按试剂盒说明书。一般步骤如下：

1）血红蛋白溶液的制备：将EDTA 抗凝血离心，吸取50μl 沉积红细胞加入溶血剂0.45ml 中混匀，37℃放置10min 后离心，除去不稳定GHb。

2）装柱：将树脂加缓冲液Ⅰ搅匀，用毛细滴管加入塑料微柱内，使树脂床高度达3～4cm。树脂层应均匀，无气泡断层。商品试剂盒中柱已装好，使用前注意先打开上盖，再摘去下帽。

3）上样：吸溶血液0.1ml 加到柱中树脂床表面，待其完全进入树脂床后，将柱移入1.5cm×10.0cm 试管中。

4）洗脱：取缓冲液Ⅰ3ml 缓缓加至树脂床上，注意勿冲动树脂。收集洗脱液，混匀，在415nm 波长处，以去离子水作空白，测定其吸光度值，此为A_{HbA_1}。

5）测定总血红蛋白：取0.1ml 溶血液，加去离子水9ml，混匀，同上比色，此为$A_{总Hb}$。

6）柱的清洗：用过的柱先加缓冲液Ⅱ3ml，使血红蛋白全部洗下，再用缓冲液Ⅰ洗3 次，每次3ml，最后加3ml，盖好上下盖，保存备用。

【计算】

$$HbA_1\ (\%) = \frac{A_{HbA_1} \times 3.1}{A_{总Hb} \times 9.1} \times 100\ \%$$

式中3.1 是上样量和缓冲液Ⅰ之和，9.1 是总血红蛋白测定管中溶液量。

【注意事项】

1）标本置室温下超过24h 可影响检测结果，如贮4℃冰箱可保存5d。

（2）试剂充填、溶液的离子浓度和pH 值等，可影响层析结果，应严格控制这些条件。操作条件要严格规范化和程序化，以提高精密度。层析时环境温度对检测结果有较大影响，一般在28 ℃较为适宜，冬天可将柱置于28 ℃温箱中洗脱。

（3）HbA_1 不能和HbF、HbH 及HbBart’等分离，导致检测结果增高，故有这些异常血红蛋白病者不宜用此法测定。而有HbS_2 和HbC 者检测结果降低。

【参考值】

HbA_1 占总血红蛋白的7.0 %±0.9 %。

不同检测方法参考值不同，HbA_{1C} 与 HbA_1 参考值也不同。可参考仪器或试剂厂家提供的参考值，最好建立本实验室的参考值。

【临床意义】

（1）评价疗效：反映前2～3 个月糖尿病的控制情况，可衡量一段时期的血糖水平。

血液中的蛋白质，包括血浆蛋白和固定于红细胞内的血红蛋白，均可缓慢地与己糖（主要是葡萄糖）结合，发生非酶促糖化。与己糖结合的血红蛋白统称为 HbA_1（人红细胞中主要血红蛋白为占90 %以上的HbA 及 HbA_1、HbA_2 和HbF），HbA_1 又可分为 HbA_{1a1}、HbA_{1a2}、HbA_{1b}、HbA_{1c}，真正与葡萄糖结合的血红蛋白称为 HbA_{1c}。与葡萄糖结合的血清蛋白或白蛋白，称为糖化血清蛋白（GSP）或糖化白蛋白。糖尿病患者 HbA_{1c} 和GSP 均增加，且生成后便不再解离，直至血红蛋白或白蛋白等蛋白分解。故 HbA_{1c} 和GSP 可以反映红细胞和血清蛋白生存寿命期间的平均血糖水平。

（2）协助判断预后：糖尿病合并视网膜病变者，如 HbA_1 占8 %～10 %，提示病变为中等程度，可用激光进行治疗；大于10 %为严重病损，预后较差。妊娠糖尿病患者，GHb 对判断是否致畸、死胎和子痫前期有意义。

第四节　糖化血清蛋白测定

糖化血清蛋白（glycated serum protein，GSP）可用比色法测定，应用较久的是硝基四氮唑蓝（NBT）还原法测定糖化血清蛋白的酮胺结构。目前国内外相继报道酶法检测GSP，其原理基于酮胺氧化酶酶促反应和Trinder 反应。该法有较好的精密度和线性，可自动分析，受干扰物影响小，与高效液相色谱法测定结果有极好的相关性。

一、硝基四氮唑蓝还原法

【原理】

GSP 中的白蛋白和其他蛋白质分子上非离子型的氨基，与葡萄糖上的羧基生成稳定的高分子氨基－1－脱氧－2－酮糖结构。此酮胺结构在碱性环境中能还原NBT 成为有

色的甲臜。以具有同样氨基—1 －脱氧—2 －酮糖结构的1 －脱氧—1 －吗啉果糖（DMF，又称果糖胺）为对照，可通过比色测定。

【试剂】

（1）0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（pH10.8）：无水碳酸钠9.54g，碳酸氢钠0.84g，溶于去离子水并稀释至1L。

（2）0.11mmol/L NBT 试剂：氯化硝基四氮唑蓝100mg，用上述缓冲液配至1L。置冰箱保存，至少可稳定3 个月。

（3）40g/L 牛血清白蛋白溶液。

（4）4mmol/LDMF 校准液：DMF99.6mg，用40g/L 牛血清白蛋白溶液配至100ml。冰箱保存，可稳定4 个月。

【操作】

（1）手工法：按表4 —1 —2 步骤操作。各管混匀，置37 ℃水浴中15min，取出试管在流水中冷却15min（<25 ℃），立即于550nm 波长处读取测定管吸光度值，从校准曲线上查出DMF 浓度。

表4 —1 —2　NBT 法测定GSP 操作步骤

加入物（ml）	空白管	测定管
标本		0.1
去离子水	0.1	
NBT（37 ℃预温）	4.0	4.0

校正曲线制备：取4mmol/LDMF 校准液，用40g/L 牛血清白蛋白溶液稀释成1mmol/L、2mmol/L、3mmol/L、4mmol/L，并以40g/L 牛血清白蛋白溶液为空白，与测定管同样操作，读得各浓度DMF 相应的吸光度值。以DMF 浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，制成校正曲线。在4mmol/L 内GSP 浓度与吸光度值呈线性关系。

（2）自动化分析法：按试剂盒说明书要求设置分析参数，一般用单点校准。有些试剂可设置两点终点法。

【注意事项】

（1）必须严格控制pH 值、反应温度及反应时间。37 ℃水浴时间需准确，浴毕立即冷却，否则生成物颜色将继续加深，影响检测结果。

（2）DMF 不稳定，故应将其溶于白蛋白溶液或混合血清中。

（3）本法非特异干扰较多，准确性较差。

【参考值】

1.65 ～2.15mmol/L。

二、酮化氨基酸氧化酶法

【原理】

GSP 被蛋白酶K 消化，逐步释放糖化蛋白片段，酮化氨基酸氧化酶 （KAO） 能特异性地氧化酮化氨基酸－糖化蛋白片段，产生的过氧化氢在过氧化物酶作用下与4 －氨基安替比林和N －乙基－N 硫代羟丙基－m －甲苯胺 （TOOS） 反应，其色泽深浅反映GSP 的含量。反应式如下：

$$\text{糖化蛋白} \xrightarrow{\text{蛋白酶K}} \text{糖化蛋白片段}$$

$$\text{糖化蛋白片段} \xrightarrow{\text{KAO}} \text{氨基酸} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{显色剂} \xrightarrow{\text{过氧化物酶}} \text{有色产物} + H_2O$$

【试剂】

（1） 试剂盒组成成分及含量如下：

试剂1 包含蛋白酶K786U／ml，过氧化物酶60U／ml，EPPS 缓冲液60mmol／L，乙酸钙5mmol／L，heacyanoferrate －K90μmol／L，乙酸铜30μmol／L，红菲绕啉二硫酸144μmol／L，TOOS2.8mmol／L，胆汁酸18g／L，聚氧化乙烯10 十三烷基醚2.5mg／L。

试剂2 包含酮化氨基酸氧化酶9U／ml，EPPS 缓冲液50mmol／L，稳定剂30g／L，ED－TA50mmol／L，4 －氨基安替比林10.5mmol／L。

（2） 糖化血清蛋白校准液：由试剂盒提供。

【操作】

按表4 －1 －3 步骤操作。

表4 －1 －3　GSP 测定KAO 法操作步骤

加入物 （ml）	空白管	校准管	测定管
标本			0.20
校准液		0.20	
去离子水	0.20		
试剂1	2.5	2.5	2.5
37 ℃水浴3 ～5min，波长550nm 处测定吸光度值A_1			
试剂2	2.5	2.5	2.5
37 ℃水浴3 ～5min，波长550nm 处测定吸光度值A_2			

【计算】

$$GSP\ 浓度\ (\mu mol/L) = \frac{测定管吸光度值\ (A_2) - 测定管吸光度值\ (A_1)}{校准管吸光度值\ (A_2) - 校准管吸光度值\ (A_1)} \times 校准液GSP\ 浓度\ (\mu mol/L)$$

【注意事项】

1）推荐使用血清或EDTA 抗凝血，在3h 内分离出血清或血浆。标本可在2～8℃保存2 周或在－20℃保存5 周。

2）本法在3.5～1734.0μmol/L 范围内呈线性，批内CV ＜0.74％，批间CV ＜1.66％。

3）标本中甘油三酯在8.5mmol/L 以下、胆红素在496μmol/L 以下、血红蛋白在2g/L 以下、葡萄糖在100mmol/L 以下，对本法测定结果没有干扰。

【参考值】

122～236μmol/L。

【临床意义】

GSP 中90％以上为糖化白蛋白。白蛋白的半衰期为17～20d，因此，GSP 可有效反映患者测定前2 周内平均血糖水平，不受不规则服药和餐后血糖浓度波动的影响，是评价糖尿病近期控制情况的良好指标。

第五节　乳酸测定

乳酸（lactic acid，LA）测定方法有化学法、酶法、气相色谱法、电化学法等。酶法的应用最为普遍，有乳酸脱氢酶法和乳酸氧化酶法，前者又分单酶紫外分光光度法、二步酶紫外分光光度法和硝基四氮唑蓝比色法等。由于标本采集和保存要求严格，血液乳酸测定受到一定的限制。

一、全血乳酸乳酸脱氢酶法测定

【原理】

在碱性条件下，乳酸脱氢酶（LDH）催化L－乳酸脱氢生成丙酮酸，同时NAD^+被还原成NADH。加入硫酸苯肼可使反应向有利于丙酮酸生成的方向移动。在340nm 波长下测定NADH 吸光度的增加值可反映血液中乳酸含量。

【试剂】

1）50g/L 偏磷酸溶液：新鲜配制。

2）30g/L 偏磷酸溶液：新鲜配制。

（3）Tris－硫酸肼缓冲液（pH9.6 含Tris79mmol/L、硫酸肼400mmol/L）：1mol/L 氢氧化钠溶液350ml 加入Tris4.79g、硫酸肼26g、EDTA 钠盐0.93g，以1mol/L 氢氧化钠溶液调pH 至9.6，用去离子水稀释到500ml。4℃可保存8d。

（4）27mmol/LNAD$^+$溶液：4℃可稳定48h。

（5）LDH 溶液：取LDH 原液，用9g/L 氯化钠溶液稀释成1500U/ml。

（6）1mmol/L（0.8mg/L）乳酸校准液：L－乳酸锂9.6mg（或DL－乳酸锂19.2mg），以少量去离子水溶解，加25μl 浓硫酸，用去离子水稀释至100ml。4℃可长期保存。

【标本采集和处理】

（1）试管准备：将试管编号并称重（W_1），加50g/L 偏磷酸溶液6ml 后称重（W_2），放人冰浴中备用。

（2）采血：应在空腹及休息状态下抽血。最好不用止血带、不用力握拳，以尽量减少血液淤滞时间。如非用止血带不可，应在采血针头刺入静脉后立即放松，然后等待数分钟再抽血。

（3）样品准备：以肝素化注射器抽血2ml，立即将血样注入上述冰浴试管内，并颠倒混合3 次，动作轻稳，切忌产生气泡。待试管温度升至室温后再称重（W_3），静止15min，离心沉淀15min（4000r/min），取出上清液待测。4℃保存，24h 内乳酸浓度无变化。计算稀释因素D：

$$D=\frac{W_3-W_1}{W_3-W_2}$$

【操作】

按表4－1－4 步骤操作。置室温15min，波长340nm 处以空白管调零读取各管吸光度值。

表4－1－4　LDH 法测定乳酸操作步骤

试剂（ml）	测定管	校准管	空白管
Tris－硫酸肼缓冲液	2.0	2.0	2.0
样品上清液	0.10		
乳酸校准液		0.10	
30g/L 偏磷酸溶液			0.10
LDH 溶液	0.03	0.03	0.03
NAD$^+$溶液	0.20	0.20	0.20

【计算】

乳酸浓度（mmol/L）＝测定管吸光度值/校准管吸光度值×校准液乳酸浓度（mmol/L）×D

【注意事项】

1）血细胞会使葡萄糖代谢生成乳酸，标本若不马上处理，会导致乳酸含量增高。测定乳酸的血标本可用全血、血浆或血清，血清或血浆需离心后分离，而采用全血的优点是能立即加入蛋白沉淀剂，减少乳酸含量的变化。用全血和血浆均需抗凝剂，可选肝素或EDTA，再加入氟化钠（1.5mg/ml 血），可抑制糖酵解。但不能用草酸盐抗凝，因为它会抑制分析中所用的乳酸脱氢酶。推荐使用碘醋酸钠抗酵解，它可使样品中的乳酸在室温稳定2h，尤其适合同时测定丙酮酸时。

2）偏磷酸在水溶液中易形成多聚体【$(HPO_3)X$】，该多聚体又极易水化成正磷酸（H_3PO_4），以致不能沉淀蛋白质。因此，偏磷酸即使在4℃也只能保存1 周。

3）L 型乳酸锂价格昂贵，用DL 型乳酸锂即可。如未注明L 或DL 型者，一般均为DL 型。

二、血浆乳酸乳酸氧化酶法测定

【原理】

乳酸在乳酸氧化酶（LOD）催化下生成过氧化氢和丙酮酸，再用Trinder 反应测定过氧化氢的生成量，以此反映血浆中乳酸浓度。

【试剂】

1）干粉试剂：无水磷酸二氢钾5444g，无水磷酸氢二钠8.519g，N－乙基－N－（2－羟基－3－磺基丙基）－m－苯甲酸（HSPT）1.181g，4－氨基安替比林（4－AAP）0.081g，磨成粉末，分装（每小瓶152mg），室温中可长期保存。

2）工作酶试剂：干粉试剂1 小瓶（152mg），加9.8ml 去离子水溶解，加LOD（20U/ml）100μl，过氧化物酶溶液（30U/ml）100μl，置4℃可保存2 周。

3）2.2mmol/L 乳酸校准液：参见乳酸脱氢酶单酶法测定全血乳酸。

【标本采集和处理】

标本采集同全血乳酸测定。用肝素－氟化钠（1mg 肝素，6mg 氟化钠）抗凝，标本必须置于冰上送检，并在采集后1h 内分离出血浆，置冰箱保存待测。

【操作】

按表4－1－5 步骤操作。37℃水浴10min，波长550nm 处空白管调零，测定各管吸光度值。

表4－1－5　LOD 法测定乳酸操作步骤

加入物（μl）	测定管	校准管	空白管
待测血浆	5		
乳酸校准液		5	
去离于水			5
工作酶试剂	500	500	500

【计算】

$$\text{乳酸浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液乳酸浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）本法线性范围11.0mmol/L，平均回收率99.8％，显色稳定，120min 内吸光度基本不变。

2）在本法条件下，pH7.0 时LOD 活性最大。工作酶试剂中，LOD 在200U/L 以上为好。

【参考值】

在空腹安静状态下，静脉全血乳酸含量为0.5～1.7mmol/L（5～15mg/dl）；血浆乳酸含量小于2.4mmol/L（22.0mg/dl），约比全血中高7％。脑脊液乳酸含量与全血接近。

【临床意义】

乳酸为体内糖酵解的最终产物，高乳酸血症主要由于体内组织缺氧和糖酵解速度加快，使乳酸产量增加；或肝脏对乳酸的转化功能降低，成人每天约有400g 乳酸在肝内进行转化、清除。血乳酸增高使血pH 值降至7.35 以下便出现乳酸酸中毒，同时阴离子隙（AG）＞18mmol/L，乳酸/丙酮酸（L/P）＞15。乳酸升高引起的酸中毒是代谢性酸中毒中最常见的一种。乳酸酸中毒由以下原因引起：

1）L/P 值正常，无酸中毒症状：见于剧烈运动、重症贫血、糖原贮积症、胰岛素治疗等。

2）缺氧，L/P 值增高：见于急性出血、急性充血性心力衰竭、休克、紫绀性心脏病、无效或低效的体外循环等。

3）特发性，L/P 值增高：见于轻度尿毒症、各种感染、严重肝病、白血病、糖尿病、亚急性感染性心内膜炎等。

第六节　丙酮酸测定

丙酮酸（pyruvate）测定方法有二硝基苯腙比色法、酶法、气相色谱法等。目前应用最多的是乳酸脱氢酶法，其操作简单，准确性好，便于自动化分析。

一、全血丙酮酸乳酸脱氢酶法测定

【原理】

无蛋白滤液中，丙酮酸在pH7.5 环境和NADH 存在下，被乳酸脱氢酶（LDH）还原为乳酸，NADH 转变成NAD^+。这一反应为乳酸测定的逆反应，在pH7.5 的条件下，平衡有利于逆反应进行。

【试剂】

1）0.75mol/LTris 缓冲溶液：取三羟甲基氨基甲烷（Tris）45.4g，用去离子水配至500ml。

2）13mmol/LNADH 溶液：取NADH 二钠盐10mg，溶于10g/L 碳酸氢钠溶液1ml中。4℃保存，48h 内使用。

3）50g/L 偏磷酸溶液。

4）30g/L 偏磷酸溶液。

5）LDH 溶液：取LDH 原液用9g/L 氯化钠溶液稀释成1500U/ml。

6）100mmol/L 丙酮酸校准贮存液：丙酮酸钠1.101g，用0.1mol/L 盐酸配至100ml。4℃保存。

7）0.05mmol/L 丙酮酸校准应用液：临用前取校准贮存液0.05ml，用30g/L 偏磷酸溶液定容到100ml。

【样品采集和处理】

同全血乳酸测定。

【操作】

按表4-1-6 步骤操作。置室温2min 后再读取各管吸光度值，以后每隔1min 读1次吸光度值，直至吸光度稳定。

表4-1-6　全血丙酮酸测定LDH 法操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
无蛋白上清液	1.0		
丙酮酸校准应用液		1.0	

续表

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
30g/L 偏磷酸溶液			1.0
Tris 缓冲溶液	0.50	0.50	0.50
还原型辅酶Ⅰ溶液	0.03	0.03	0.03
波长340nm 处以去离子水调零，测定各管吸光度值			
LDH 溶液	0.03	0.03	0.03

【计算】

$$\text{丙酮酸浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管}\triangle A - \text{空白管}\triangle A}{\text{校准管}\triangle A - \text{空白管}\triangle A} \times \text{校准管丙酮酸浓度} \times D$$

式中△A 为吸光度稳定时的吸光度值与未加LDH 溶液时的吸光度值之差；D 为稀释倍数，也可根据NADH 的毫摩尔吸光系数计算，公式如下：

$$\text{丙酮酸浓度（mmol/L）} = （\text{测定管}\triangle A - \text{空白管}\triangle A） \times F$$

$$F = \frac{1.56}{1.0 \times 6.22} \times D$$

式中1.56 为反应的总体积（ml）；100 为样品上清液体积（ml）；6.22 为NADH 的毫摩尔吸光系数；D 为样品稀释倍数。

【注意事项】

1）因丙酮酸会发生聚合，其聚合体的酶促反应速率与非聚合体不同，故丙酮酸校准应用液必须每日新鲜配制。

2）血液中丙酮酸含量极不稳定，血液标本采集后1min 就会减少，要尽可能快速地制备无蛋白血滤液。三氯醋酸、高氯酸和偏磷酸均可作为蛋白沉淀剂，但使用偏磷酸时NADH 较稳定。上清液在室温中可稳定6d，4℃冰箱中可稳定8d，如冰冻可稳定42d。

3）采血时可以使用止血带，因为血液淤滞2min，其中丙酮酸盐浓度不会产生任何变化。如同时检测乳酸，则应符合乳酸检测的标本采集要求。

二、血浆丙酮酸自动分析法测定

【原理】

同全血丙酮酸酶法测定。

【试剂】

1）工作缓冲液：0.1mol/L 磷酸盐缓冲液，pH（7.40 ±0.05）。冰箱中存放可稳定2个月。

2）26mol/L NADH 溶液：NADH20mg，溶于1ml 去离子水中，新鲜配制并在1h 内使用。

3）LDH 溶液（50U/L）：用去离子水稀释10 倍，新鲜配制。

4）工作试剂：工作缓冲液10ml，NADH 溶液400μl 和LDH 溶液40μl。

5）20mmol/L 丙酮酸校准贮存液：参见全血丙酮酸测定。

6）0.5mmol/L 丙酮酸校准应用液：用去离子水将校准贮存液稀释40 倍。新鲜配制。

【标本采集和处理】

血标本采集同上法，采血后加入碘醋酸钠（终浓度为0.5g/L）管中，尽快分离血浆进行测定。

【操作】

反应条件及主要参数：连续监测法，负反应；样品25μl，工作试剂250μl；波长340/380nm；孵育时间30s，监测时间60s。

【计算】

$$\text{丙酮酸浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定管}\triangle A/\text{min}-\text{空白管}\triangle A/\text{min}}{\text{校准管}\triangle A/\text{min}-\text{空白管}\triangle A/\text{min}}\times\text{校准液丙酮酸浓度}$$

式中△/min 为监测时间内的每分钟吸光度变化值。

【注意事项】

1）本法有商品试剂盒供应，按说明书使用即可。不同试剂盒中各试剂浓度有差异。

2）本法线性范围0～1mmol/L。高浓度乳酸（40mmol/L）、胆红素（200mmol/L）、严重溶血（Hb2g/L）、严重脂血标本均不影响测定结果。

【参考值】

空腹休息状态下，静脉血丙酮酸浓度小于0.1mmol/L（0.9mg/dl）。

【临床意义】

1）推测循环衰竭的严重程度：与乳酸同时测定时计算L/P 值，正常为9，组织缺氧时增高，且与组织缺氧程度成比例。

2）用于维生素B_1缺乏症诊断：维生素B_1的焦磷酸酯是丙酮酸在细胞内进一步氧化分解为乙酰辅酶A 时的脱羧酶辅酶。维生素B_1缺乏时，体内丙酮酸氧化发生障碍，导致丙酮酸含量增加。

第二章　蛋白质测定

第一节　血清总蛋白测定

血清总蛋白（total protein）是血清中具有各种功能的许多蛋白质的总和。总蛋白测定原理依据蛋白质的共同特性，方法有折射率测定法、紫外分光光度法、磺基水杨酸比浊法、染料结合法，以及比色法如酚试剂法和双缩脲法等。因为血清总蛋白浓度高，不需要采用灵敏度高的方法，多使用双缩脲法，其有很好的特异性、精密度以及合适的线性范围。

双缩脲法

【原理】

凡分子中含有两个以上甲酰氨基（—$CONH_2$—）的化合物均能与碱性铜溶液作用，形成紫色复合物，这一反应称为双缩脲反应（两个尿素脱胺缩合而成的双缩脲有此反应故称之）。蛋白质分子中的许多肽键（—CONH—）与双缩脲试剂反应，生成物的紫色深浅与样品中蛋白质含量成正比。

【试剂】

1）蛋白质校准液：含蛋白质50～70g/L。定值方法可用双缩脲标化法。

2）6.0mol/L 氢氧化钠溶液：氢氧化钠240g，用去离子水配至1L，存于聚乙烯瓶，盖紧保存。最好用新开瓶的氢氧化钠，可减少碳酸盐的污染。

3）双缩脲试剂（Doumas 配方）：含5 个结晶水的硫酸铜3g 溶于500ml 去离子水中，加酒石酸钾钠9g、碘化钾5g，待完全溶解后加入6.0mol/L 氢氧化钠溶液100ml，用去离子水稀释至1L。存于聚乙烯瓶，盖紧保存。

4）双缩脲空白试剂：除不加硫酸铜外，其余成分同双缩脲试剂。

【操作】

1）手工法按表4—2—1 步骤操作。各管置37℃水浴10min（或25℃30min），波长540nm，以空白管调零，读取各管吸光度值。

溶血、黄疸及含乳糜标本均应测标本空白管吸光度：待测血清0.1ml 加双缩脲空白试剂5ml，以去离子水调零，测定其吸光度。将测定管吸光度值减去标本空白管吸光度

值为校正吸光度值。

(2) 自动化分析法：测定条件与手工法相同。终点法，标本5 μl，试剂250 μl，标本与试剂之比为1∶50，37 ℃，反应时间10 min，波长540nm。这种单试剂法不能排除标本中溶血、黄疸和脂浊对颜色的干扰。

目前有些厂家已提供血清总蛋白双试剂，加第一试剂不显色，因而在一些分析仪上能设置两点终点法，排除以上标本因素造成的干扰。

表4-2-1　双缩脲法测血清总蛋白操作步骤

加入物 (ml)	测定管	校准管	空白管
待测血清	0.1		
蛋白质校准液		0.1	
去离子水			0.1
双缩脲试剂	5.0	5.0	5.0

【计算】

$$\text{血清总蛋白质量浓度 (g/L)} = \frac{\text{测定管吸光度值 (或校正吸光度值)}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液蛋白质量浓度 (g/L)}$$

【注意事项】

(1) 血红蛋白和胆红素可引起干扰，前者1.0g/L可致1.8g/L的正干扰；胆红素524 μmol/L可引起2.0g/L的正干扰。

(2) 右旋糖酐能与试剂中的铜和酒石酸结合形成沉淀，导致检测结果偏高。若将试剂中酒石酸浓度提高到16g/L，能消除右旋糖酐的干扰。

(3) 采用血清总蛋白双试剂，除能设置两点终点法外，因其试剂稳定，故而能使测定结果精密度提高。

(4) 本法也可用于血清总蛋白浓度的标化，操作步骤完全与测定标本时相同 (带标本空白管)，但显色温度须控制在 (25±1) ℃的范围内，以及使用经过校正的高级分光光度计，波长带宽≤2nm，比色杯光径为准确1.0cm，用去离子水调零后进行比色。按下式计算标化结果：

$$\text{血清总蛋白质量浓度 (g/L)} = \frac{\text{测定管吸光度值} - \text{空白管吸光度值} - \text{标本空白管吸光度值}}{0.298} \times \frac{5.1}{0.1}$$

式中0.298为蛋白质双缩脉络合物的吸光系数，即按Doumas双缩脲试剂的标准配方，

在上述规定条件下，双缩脲反应液中蛋白质质量浓度为1.0g/L 时的吸光度值。

【参考值】

早产儿36～60g/L，新生儿46～70g/L，1～2 岁56～75g/L，≥3 岁60～80g/L，成人非卧床64～83g/L、卧床60～78g/L。

【临床意义】

血清总蛋白增高多见于下列疾病：

1）高免疫球蛋白血症：各种单克隆性免疫球蛋白病，如多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、冷沉淀球蛋白血症等；自身免疫性疾病，如系统性红斑狼疮、硬皮病、风湿病、类风湿性关节炎。

2）多种原因引起的明显脱水使血浆浓缩，致总蛋白相对增高，此时白蛋白/球蛋白比值变化不大。

血清总蛋白降低见于下列疾病：

1）白蛋白合成减少或蛋白质丢失过多。

肝脏合成减少，如各种慢性肝病、吸收不良综合征、蛋白质营养缺乏等；蛋白质尤其是白蛋白丢失，如肾病综合征、急性肾小球肾炎和慢性肾小球肾炎，严重烧伤，溃疡性结肠炎等胃肠疾病，大量失血和浆膜腔渗液；蛋白质消耗增加，如严重结核病、甲状腺功能亢进症、恶性肿瘤等。

2）各种原因引起的水钠潴留，或静脉注射过多的低渗溶液使血浆稀释，此时白蛋白/球蛋白比值变化不大。

第二节　血清白蛋白测定

血清白蛋白（albumin）测定方法主要采用溴甲酚绿（BCG）比色法和溴甲酚紫（BCP）比色法，1985 年WHO 将BCG 比色法作为推荐方法。其适用于手工操作、自动化仪器，但必须严格控制反应时间。BCP 法兼有BCG 法的主要优点，但是BCP 法无法使用动物来源的质控血清；测定血液透析治疗和肾移植患者时血清白蛋白偏低，因此应用受限。免疫学测定和电泳法特异性较好，但是成本较高或费时较多。高灵敏度的免疫学方法主要适用于尿液和脑脊液中微量白蛋白的测定。

溴甲酚绿法

【原理】

在pH4.2 的缓冲液中，白蛋白作为一种阳离子，与阴离子染料BCG 结合形成蓝绿色复合物。测定630nm 波长处的吸光度，其与白蛋白含量成正比。

【试剂】

1）白蛋白校准液：白蛋白浓度45g/L 左右，血清型。采用免疫火箭电泳法定值。

2）0.5mol/L 琥珀酸盐缓冲贮存液（pH4.15）：琥珀酸56.0g，叠氮钠1.0g 溶于800ml 去离子水中，用1mol/L 氢氧化钠溶液调pH 至4.15 ±0.05（约需氢氧化钠溶液54ml）左右，加去离子水至1L。

3）BCG 贮存液（10mmol/L）：BCG（相对分子量720.02）1.80g，溶于1mmol/L 氢氧化钠溶液5ml 中，再加去离子水至250ml。

4）300g/L 聚氧化乙烯月桂醚（Brij -35）贮存液：30gBrij -35 溶于80ml 去离子水，加温助溶，然后加去离子水至100ml。

5）BCG 试剂（WHO 配方）：取1L 容量瓶盛去离子水约400ml，加琥珀酸盐缓冲贮存液100ml 和300g/L Brij -35 贮存液2.1ml，用吸管准确加入BCG 贮存液8ml，用去离子水将吸管壁上残留的少量染料冲洗到容量瓶内，用去离子水稀释至刻度，混匀。配好的BCG 试剂pH4.15 ±0.05。

【操作】

1）手工法：按表4 -2 -2 步骤操作。各管混匀，立即（30s 内）在波长630nm 处，以空白管调零，读取各管吸光度值。

表4 -2 -2　BCG 法测定蛋白操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
待测血清	0.02		
白蛋白校准液		0.02	
去离子水			0.02
BCG 试剂	4.0	4.0	4.0

2）自动分析法：测定条件与手工法相似。标本2μl，试剂400μl，室温或37℃，反应时间10～30s，波长630nm 左右测定吸光度值。

要注意一般全自动分析仪用单试剂时，试剂/标本之比若低于200∶1，会降低白蛋白测定的线性上限。要根据仪器情况尽量设置为接近这个比例，或者用去离子水作为试剂1，浓缩的BCG 试剂作为试剂2，加大试剂比例。有些厂家已提供双试剂产品，这使试剂与标本比易达到规定值；且可设置两点终点法，来排除标本颜色造成的干扰。

【计算】

$$\text{白蛋白质量浓度（g/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{标准液白蛋白质量浓度（g/L）}$$

【注意事项】

（1）显色时间对测定值的影响：BCG 与血清白蛋白的反应产物会随着显色时间的延长而色泽加深，因为 α_1、α_2 和 β 球蛋白与 BCG 有非特异的慢反应，所以须在反应后30s内即进行比色，甚至可在10s 内比色。主张用定值参考血清作标准，也是为了校正其他蛋白质的非特异性反应对结果的影响。

（2）BCG 是一种变色阈较狭窄的酸碱指示剂，受酸、碱影响较大，BCG 试剂的pH值须在规定范围内，且误差＜0.1。

（3）高胆红素血症和溶血标本对检测结果不产生干扰。严重高脂血症可使检测结果偏高，应测标本空白管吸光度进行校正：血清20μl 加琥珀酸缓冲液4ml，去离子水调零测得标本空白管吸光度值，再用测定管吸光度值减去标本空白管吸光度值。

【参考值】

35～55g/L。卧床35～50g/L；走动时男性42～55g/L、女性37～53g/L。

【临床意义】

（1）血清白蛋白增高：常见于脱水所致的血液浓缩。

（2）血清白蛋白降低：与总蛋白降低的原因大致相同。急性主要见于大出血和严重烧伤时，慢性见于肝脏合成白蛋白功能障碍、腹水形成和肾病时。白蛋白低于20g/L时，由于胶体渗透压的下降，常可见到水肿等现象。

妊娠晚期，血浆容量增高及机体对蛋白质需求量增加，血清白蛋白可明显下降，但分娩后可迅速恢复正常。

（3）白蛋白/球蛋白（A/G）比值下降：提示有慢性肝实质性损害。动态观察A/G值可提示病情发展趋势和估计预后，病情恶化时白蛋白逐渐减少、A/G 值下降，A/G值持续倒置示预后较差。

关于A/G 值的参考值，一直沿用盐析法测得的1.5∶1～2.5∶1。推荐采用自动生化分析仪测定白蛋白（BCG 法）和总蛋白（双缩脲法），两者之差得到球蛋白浓度，再计算A/G 值，准确性较高。从一些较小规模的参考值调查显示，健康人总蛋白有较明显提高，A/G 比值也相应明显下降；另外，从临床实验室大量数据观察也看出A/G 比值用1.5∶1～2.∶1 作参考值明显偏高。

第三节　血浆纤维蛋白原测定

测定纤维蛋白原（Fibrinogen，Fg）的方法根据原理不同可分为三大类。第一类是根据Fg 生物学特性建立的方法，即在凝血酶作用下，血浆中可溶性Fg 转变为不溶性纤维

蛋白凝块或沉淀，将Fg 与其他血浆蛋白分离，然后用化学的方法进行检测，如双缩脲法等；或利用Fg 在转变为纤维蛋白过程中吸光度的变化经换算求出Fg 含量，这是一些自动血凝仪测定Fg 的方法。第二类是根据Fg 理化特性建立的方法，如Fg 是大分子蛋白质，表面带有负电荷，对热敏感，在某些盐溶液中，或者加热后，Fg 沉淀或增加液相浊度，因此，可通过盐析沉淀法、盐析比浊法及热沉淀比浊法等方法测定。第三类是根据免疫学特性建立的方法。非自动血凝仪测定的方法中，以凝块分离双缩脲比色法和热沉淀比浊法最常用。

一、凝块分离双缩脲比色法

【原理】

于稀释血浆中加入钙离子，使Fg 形成纤维蛋白凝块，取出并洗涤后，用双缩脲法测定纤维蛋白原含量。

【试剂】

1）蛋白校准液：同血清总蛋白双缩脲法测定。

2）25g/L 氯化钙溶液。

3）9g/L 氯化钠溶液。

4）双缩脲试剂：同血清总蛋白双缩脲法测定配制。

【操作】

1）于25～30ml 小烧杯中，加入血浆0.5ml，9g/L 氯化钠溶液10ml，25g/L 氯化钙溶液0.5ml，混匀。置37℃温箱中保温，直至凝块形成，通常约需0.5h。如Fg 含量过少，需延长保温时间，甚至保温过夜。凝血酶含量过低但Fg 含量正常的标本，往往不形成凝块，此时可于0.5ml 血浆中加入凝血酶（500U/ml）0.1ml 和9g/L 氯化钠溶液10ml，则数分钟内出现凝块。有条件者，每份测定均应加凝血酶。

2）用一小玻璃棒将凝块小心卷起，并转动玻璃棒在杯壁挤压，使凝块紧裹在玻璃棒上，取出，用滤纸小心吸干，然后用去离子水小心冲洗数次。

3）于盛有9g/L 氯化钠溶液0.1ml 及双缩脲试剂5ml 的试管（测定管）中，放人裹有凝块的小玻璃棒，置37℃水浴中保温，并搅动，直至纤维蛋白凝块完全溶解。

4）于另一支试管（校准管）中加入用9g/L 氯化钠作1∶10 稀释的蛋白校准液0.1ml，双缩脲试剂5ml。

5）空白管中加去离子水0.1ml，双缩脲试剂5ml，混匀。3 管均在37℃保温10min，以空白管调零，在波长540nm 处读取各管吸光度值。

【计算】

$$\text{Fg 质量浓度（g/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \frac{\text{校准液 Fg 质量浓度（g/L）}}{10} \times \frac{0.1}{0.5}$$

【注意事项】

（1）本法是Fg 测定推荐方法。其关键性操作程序为控制纤维蛋白凝块的完全形成（要求反应温度不低于37 ℃，反应时间不得少于30 min，对Fg 含量低的标本置37 ℃过夜），凝块取出及洗涤的操作要细心，防止Fg 丢失。

（2）标本用量大是本法的缺点。

二、热沉淀比浊法

【原理】

血浆在pH6.3 条件下56 ℃水浴15 min，其中Fg 发生沉淀，而其它蛋白质仍处于溶解状态，于波长405nm 处比浊测定Fg 含量。此法为Fg 的初筛试验。

【试剂】

磷酸二氢钾－氢氧化钠缓冲液（pH6.3）：0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液50 ml 与0.1mol/L 氢氧化钠溶液10.6 ml 混合，并加去离子水至100 ml。

【操作】

按表4－2－3 步骤操作。波长405nm，以空白管调零，读取测定管吸光度值为A_1。置于56 ℃水浴中准确保温15 min，再读取吸光度值为A_2。

表4－2－3　热沉淀比浊法测定Fg 操作步骤

试剂（ml）	空白管	测定管
待测血浆		0.10
去离子水	0.10	
缓冲液	4.0	4.0

校准曲线制作：取新鲜混合血浆1 份，加125g/L 亚硫酸钠溶液19 份，沉淀Fg，反复2 次，最后溶于9g/L 氯化钠溶液（电泳图谱显示单一纤维蛋白原区带），用双缩脲法测定蛋白含量。将此Fg 溶液稀释成1.0、2.0、4.0、6.0、8.0g/L，分置5 管。各管取稀释校准液0.1 ml 与缓冲液4.0 ml 混合。空白管加去离子水0.1 ml 与缓冲液4.0 ml 混合，参照上述方法读取A 和A_2,，并分别计算各管的吸光度值变化（△A），根据相应的Fg 浓度绘制校正曲线，在8g/L 范围内呈曲线线性。

【计算】

按下式查校正曲线得检测结果：

$$\triangle A = A_2 - A_1$$

【注意事项】

1）缓冲液的pH 值以6.30 ±0.05 为最佳；从pH6.3 增减0.2pH 单位，将引入大约7 %的实验误差。

2）保证实验的准确度和重复性，必须严格控制实验温度至56 ℃；在56 ℃的基础上，升高或降低1 ℃可引入±12 %的实验误差。另外在比浊前，与缓冲液要混匀。

3）用721 型分光光度计，1cm 光径比色杯，在波长405nm 处比浊，测定线性范围0 ～9.6g/L 。

4）标本要新鲜，采用草酸盐和EDTA 、肝素抗凝剂均可。脂血、溶血标本检测对结果无影响。

【参考值】

凝块分离双缩脲比色法：2.0 ～4.0g/L ；热沉淀比浊法：2.20 ～4.24g/L 。

【临床意义】

1）Fg 降低见于弥散性血管内凝血，严重的肝实质损害，可见于肺、前列腺手术中，先天性Fg 缺乏症罕见。

2）Fg 增加：Fg 是一种急性时相反应蛋白，其增加往往是机体的一种非特异性反应，见于感染，如肺炎、结核、败血症、胆囊炎、细菌感染及长期的局部炎症，非感染性炎症，如肾病、风湿热、风湿性关节炎、恶性肿瘤、妊娠、月经期、大手术中。

第四节　血清粘蛋白测定

采用磷钨酸沉淀粘蛋白（mucoprotein，mucin）后再以酚试剂测定血清粘蛋白，精密度较难控制。一些具备特定蛋白分析仪的实验室，已在这类仪器上用免疫比浊法测定α1－酸性糖蛋白来代替粘蛋白测定。

磷钨酸沉淀酚试剂法

【原理】

以1.8mol/L 过氯酸沉淀血清中蛋白质，粘蛋白不被沉淀而存留在滤液中，再加磷钨酸使滤液中粘蛋白沉淀，然后以酚试剂测定沉淀中的蛋白质含量。

【试剂】

1）9g/L 氯化钠溶液。

2）1.8mol/L 过氯酸溶液：取含量为70 %～72 %过氯酸28ml，加去离子水稀释至200ml，配制后需用氢氧化钠溶液标定。

3）50g/L 磷钨酸溶液：磷钨酸5g 溶于2mol/L 盐酸中，并配至100ml。

4）酚试剂：于1500ml 球形烧瓶中加入钨酸钠100g，钼酸钠25g，水700ml，浓磷酸50ml，浓盐酸100ml，缓缓回流蒸馏10h。取下冷凝管，加硫酸锂75g，去离子水50ml，并加溴2～3 滴，再煮沸15min，以除去多余的溴，冷却后用等离子水稀释到1L。制成的酚试剂应为鲜明黄色，置棕色瓶保存。用前取出一部分，以等量去离子水稀释之。

5）200g/L 碳酸钠溶液。

6）酪氨酸校准液（50mg/L）：酪氨酸5mg，以0.1mol/L 盐酸溶液溶解并稀释至100ml。

【操作】

在15ml 离心管中加入待测血清0.5ml 和9g/L 氯化钠溶液4.5ml，混匀，加1.8mol/L 过氯酸溶液2.5ml，混合，使血清蛋白沉淀。静止10min 后，用定量滤纸过滤或离心。取滤液或上清液2.5ml 置于另一试管中，加50g/L 磷钨酸0.5ml 混匀，使粘蛋白沉淀。静止10min 后，经3000r/min 离心10min，倾去上清液并沥干，再加磷钨酸溶液2ml，悬浮沉淀物，同样离心后倾去上清液，沥干，以此管为测定管，另标明校准管、空白管，按表4－2－4 步骤操作。

混匀，放置37℃水浴15min，取出后，于650nm 波长处进行比色，以空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－2－4　磷钨酸沉淀酚试剂法测定血清粘蛋白操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
去离子水	1.75	1.75	1.5
酪氨酸校准溶液		0.25	
碳酸钠溶液	0.5	0.5	0.5
酚试剂	0.25	0.25	0.25

【计算】

粘蛋白质量浓度（mg/L，以酪氨酸计）

$$=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液酪氨质量浓度（mg/L）}\times\frac{0.25\times7.5}{0.5\times2.5}$$

$$=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液酪氨质量浓度（mg/L）}\times1.5$$

$$\text{粘蛋白质量浓度（g/L，以蛋白计）}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液酪氨质量浓度（mg/L）}\times1.5\times\frac{100}{4.2\times1000}$$

$$=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{标准液酪氨酸质量浓度（g/L）}\times 0.0357$$

【注意事项】

1）操作中待测血清与9g/L氯化钠溶液的稀释比例必须准确，不可随便更改，否则将影响检测结果。

2）过氯酸沉淀蛋白的过程在30℃以下进行较好，否则影响检测结果。操作中滴加过氯酸溶液时速度宜慢，边加边摇动试管，以30～40s时间内加入2.5ml为宜。速度过快易发生混浊，离心后不易得到清晰的上清液。

3）加过氯酸溶液沉淀蛋白后的滤液（或上清液）加磷钨酸后，需放置10min才可进行过滤或离心。倾去上清液时，须细心操作，不能丢失沉淀物，否则影响检测结果。

4）粘蛋白中酪氨酸含量为4.2%，因此，两种报告方式可互相换算。

5）粘蛋白是氨基己糖含量大于4%的糖蛋白，电泳后位于α_1和α_2球蛋白区带，成分复杂，分类和命名尚未统一。测定血清粘蛋白与测定血清α_1－酸性糖蛋白（α_1－AG）临床意义相似。α_1－AG又称类粘蛋白，也是含氨基己糖大于4%的糖蛋白，电泳位置在α_1球蛋白区带，血清中含量为500～1500mg/L（免疫比浊法），血清粘蛋白含量则为710～870mg/L（磷钨酸沉淀酚试剂法）。因此，这两种蛋白组成成分相似，但因测定方法不同，两者所包括和覆盖的蛋白质种类有所差异。

【参考值】

以酪氨酸计为（3.8±2.7）mg/L，以蛋白计为（0.71～0.87）g/L。

【临床意义】

1）血清粘蛋白浓度增高：常见于结核病、肺炎、风湿热、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肿瘤（尤其是女性生殖器肿瘤）等。连续测定对于判断疾病的转归，即病变扩大或缩小、肿瘤有无转移、肿瘤手术切除或其他治疗效果，有较好的参考价值。

2）血清粘蛋白浓度降低：常见于实质性肝病和肾病综合征。

第五节　尿液总蛋白测定

正常尿液中蛋白质含量甚微，即使病理性增加，一般也大大低于血清总蛋白，因此，要采用高灵敏度的测定方法。磺基水杨酸、三氯乙酸等有机酸沉淀比浊法灵敏度高，但影响因素多，精密度较差；钨酸沉淀后双缩脲比色法准确性好，但操作繁琐，沉淀也容易丢失；染料结合法有许多种，但有些染料与白蛋白、球蛋白结合程度不同，或者染料会附着于比色杯难以清洗，如考马斯亮蓝；较好的染料结合法为邻苯三酚红钼法。目前已有厂家提供用于自动化分析仪的试剂盒。

一、沉淀分离双缩脲比色法

【原理】

以钨酸沉淀尿中的蛋白质，溶解蛋白后用双缩脲法进行定量测定。

【试剂】

1）75mmol/L 硫酸溶液。

2）15g/L 钨酸钠溶液。

3）9g/L 氯化钠溶液。

4）双缩脲试剂：同血清总蛋白双缩脲法测定。

5）尿蛋白校准液：取血清总蛋白测定用的校准液，以3g/L 的苯甲酸溶液作稀释液，稀释50 倍，使其蛋白含量约1g/L。

【操作】

1）留取24h 尿液标本（加5～10ml 甲苯防腐），混和后记总量，取少量尿液离心或滤纸过滤。

2）先作蛋白定性试验并记录阳性程度，若结果阴性，不再作定量试验。

3）沉淀蛋白：如蛋白定性试验结果阳性程度在＋＋以下，取尿液5ml；如在＋＋＋或以上，则取尿液1ml 并加4ml 去离子水。然后加75mmol/L 硫酸溶液2.5ml 混合，再加钨酸钠溶液2.5ml，充分混合，静置10min 后3000r/min 离心5min。倾去上清液，将试管倒置于滤纸上，沥干液体，保留沉淀。加9g/L 氯化钠溶液至1ml 混和，使沉淀的蛋白溶解，作为测定管。

4）按表4－2－5 步骤操作。

各管充分混和，37℃水浴30min，在540nm 波长处进行比色，以空白管调零，读取校准管和测定管吸光度值。

表4－2－5　双缩脲比色法测定尿液总蛋白操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
9g/L 氯化钠溶液			1.0
蛋白校准液		1.0	
溶解沉淀物	1.0		
双缩脲试剂	4.0	4.0	4.0

【计算】

$$\text{尿蛋白质量浓度（g/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液蛋白质量浓度（g/L）}$$

$$\text{24h 尿蛋白质量（g/24h）} = \text{尿蛋白浓度（g/L）} \times \text{24h 尿量（ml）} \div 1000$$

【注意事项】

1）沉淀尿蛋白不仅可浓缩尿液，还可除去尿中药物和色素的干扰作用，使检测结果准确可靠。

2）操作时需经过离心、沉淀物的洗涤、沥干等步骤，繁琐且易致沉淀物损失，因此限制了本法的应用。

二、磺柳酸比浊法

【原理】

尿液中蛋白质与磺柳酸－硫酸钠试剂作用产生沉淀混浊，所形成的浊度与其蛋白浓度成正比。

【试剂】

1）尿蛋白校准液：同沉淀分离后双缩脲比色法。

2）磺柳酸溶液：磺柳酸30g，无水硫酸钠70g，用去离子水溶解至1L。室温下可长期保存。

【操作】

1）尿标本处理方法同沉淀分离双缩脲比色法。

2）按表4－2－6步骤操作。充分混匀，置室温反应10min～15min时，在波长500nm处，以去离子水调零，立即读取各管吸光度值。

表4－2－6　磺柳酸比浊法测定尿蛋白操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
待测尿标本	1.0	1.0	
校准液			1.0
去离子水		4.0	
磺柳酸溶液	4.0		4.0

【计算】

$$\text{尿蛋白质量浓度}\ (g/L) = \frac{\text{测定管吸光度值} - \text{空白管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液蛋白质量浓度}\ (g/L)$$

【注意事项】

1）测定尿液、脑脊液等体液总蛋白的比浊法有磺柳酸（SSA）、三氯乙酸（TCA）和钨酸比浊法等。这些方法灵敏，但浊度的形成受沉淀剂的化学性质、酸浓度、加试剂速度、反应温度、反应时间以及标本中蛋白质种类等因素影响。一些低分子糖蛋白（酸可溶性蛋白）因不被SSA和TCA沉淀而造成漏检。SSA与白蛋白的浊度反应强度比γ－

球蛋白高4 倍。在SSA 中加入硫酸钠，可抑制SSA 与白蛋白过强的反应，缩小白蛋白和球蛋白与试剂浊度反应的差异。

⑵ 本法准确度较差、精密度差（受温度和反应时间影响较大，浊度稳定性差）、易被多种药物干扰，如大剂量青霉素、X 线造影剂、血管扩容剂等可导致假阳性反应。测定管与校准管同时测定，使两者测定条件一致，可提高精密度。本法操作容易、检测快速而灵敏。

⑶ 加磺柳酸试剂后在10min 内浊度进行性增加，10～15min 时达到顶点。每次比色最好在相同反应时间点进行。当标本中蛋白含量超过线性上限（根据校准曲线确定），需按照浊度大小将标本量减至500～50μl，再用去离子水补足至1ml，然后加入试剂重测。

三、邻苯三酚红钼法

【原理】

在酸性介质中，邻苯三酚红－钼（PRM）与尿液中的蛋白质形成复合物，使其最大吸收峰从467nm 转移至594nm，在600nm 处的吸光度尿蛋白浓度成正比。

【试剂】

⑴ 1.5mmol/L 邻苯三酚红溶液：邻苯三酚红60mg 溶于100ml 甲醇中。

⑵ 10mmol/L 钼酸钠溶液：含2 分子结晶水的钼酸钠240mg 溶于100ml 去离子水中。

⑶ PRM 试剂：琥珀酸5.9g、草酸钠0.14g、苯甲酸钠0.5g，溶于900ml 去离子水中，再加入邻苯三酚红溶液40ml、钼酸钠溶液4ml，用0.1mmol/L 盐酸调pH 至2.5，然后加去离子水到1L。

⑷ 尿蛋白校准液：同沉淀后双缩脲法。

【操作】

按表4－2－7 步骤操作。

表4－2－7　PRM 法操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
尿标本	0.050		
尿蛋白校准液		0.050	
去离子水			0.050
PRM 试剂	3.0	3.0	3.0
37℃反应10min，在波长600nm 处，以空白管调零，读取各管吸光度值			

【计算】

$$\text{尿蛋白浓度（g/L）}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液蛋白质量浓度（g/L）}$$

【注意事项】

1）本法灵敏度高，线性上限约2g/L，试剂不吸附比色杯，可用于自动生化分析仪中。

2）本法不足之处仍然是试剂与白蛋白、球蛋白的显色程度不同，后者只有前者的70%。试剂中加入适量的十二烷基磺酸钠，可使PRM与球蛋白反应性升高至白蛋白的89%。

3）本法在37℃、10min时显色达高峰，10～25min吸光度基本稳定，此后开始下降，故需在10min完成比色。

【参考值】

30～150mg/24h。

【医学决定水平】

150mg/24h为异常。

【蛋白尿分度】

>3.5g/24h为重度（大量）蛋白尿，1.0～3.5g/24h为中度蛋白尿，<1.0g/24h为轻度蛋白尿。

【临床意义】

尿蛋白增多见于以下各种情况：

1）肾小球性蛋白尿：如各种肾小球性疾患、糖尿病性肾病变、肾淀粉样变、肾动脉硬化及心力衰竭等。

2）肾小管性蛋白尿：见于肾小管酸中毒、重金属中毒、范科尼综合征、多囊肾、肾移植后等。尿蛋白含量一般<1g/24h。

3）分泌性蛋白尿：在肾小管间质性炎症和肿瘤等时肾小管分泌的蛋白质如Tamm Hors－fall、蛋白SIgA等增多。

4）溢出性蛋白尿：血液中的异常蛋白质，如大量免疫球蛋白轻链出现在尿中称凝溶蛋白或本周蛋白。大量溶血时的血红蛋白尿及骨骼肌、心肌广泛损害时的肌红蛋白尿均属此类。

5）生理性蛋白尿：包括功能性蛋白尿（由剧烈运动、发热、寒冷、精神过度紧张引起，在休息或刺激消失后即可恢复正常），体位性蛋白尿（系直立时前凸的脊柱压迫下腔静脉，使肾静脉淤血所致），摄人性蛋白尿（因输入分子量<7000的蛋白质，或摄人大量蛋白质后，可出现轻度的暂时性蛋白尿）。

第六节　血清蛋白醋酸纤维素薄膜电泳分析

血清中有白蛋白、α_1－酸性糖蛋白、α_1－抗胰蛋白酶、α_1－脂蛋白、α_2－巨球蛋白、α_2－脂蛋白、结合珠蛋白、转铁蛋白、免疫球蛋白等。对这些蛋白组分进行定量测定，对临床诊断和治疗具有重要价值。利用电泳的方法，可将血清中各蛋白组分分开，然后再通过染色进行定量。用于电泳的支持物有醋酸纤维素薄膜（醋纤膜）、琼脂糖、淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶等。各种电泳的分辨率不同，分离得到的蛋白组分数也不同。临床上常用的醋纤膜电泳能将血清蛋白分成5 个组分。

【原理】

血清中主要蛋白质的等电点均低于8.6，这些蛋白质在pH8.6 的缓冲液中均带有负电荷，在电场中可向正极移动。各种血清蛋白质分子大小不同，等电点不同，使其带电荷量也不同，因此，在同一电场中泳动速度不同。带电荷多，分子量小者，泳动较快；反之，则较慢。将血清蛋白质按其泳动速度不同分成5 条主要区带，其成分从正极起依次为白蛋白、α_1 球蛋白、α_2 球蛋白、β球蛋白及γ球蛋白。

以醋纤膜为支持介质，电泳分离后经染色处理，可展示出清晰的蛋白质图谱。由于染料和蛋白质的结合量与蛋白质含量成正比，因此，可将蛋白质区带剪下，分别用一定量的氢氧化钠稀溶液洗脱下来，进行比色测定，从而得出各蛋白区带的百分比。也可用有机溶剂将醋纤膜制成透明膜，再用光密度扫描仪对其中蛋白质进行扫描定量。

【仪器】

1）电泳仪：选用电子管或晶体管整流的稳压直流电源，电压0～600V，电流0～300mA。

2）电泳槽：可选购或自制适合醋纤膜的电泳槽，电泳槽的空间与醋纤膜面积之比应为5cm^3/1cm^2，电极用铂（白金）丝。

3）血清加样器：可用微量吸管（10μl，分度0.5μl）或自制电泳血清加样器。

4）分光光度计。

【试剂】

1）醋纤膜：所选规格多为2cm×8cm，根据所使用的光密度扫描仪或自动电泳仪，可选用其他不同规格。

2）巴比妥－巴比妥钠缓冲液（pH8.6，离子强度0.06）：巴比妥2.21g、巴比妥钠12.36g 加于500ml 去离子水中，加热溶解，待冷却至室温后，再加去离子水至1L。

3）染色液：①丽春红S 染色液：丽春红S0.4g 及三氯醋酸6g，用去离子水溶解，

并稀释至100ml。②氨基黑10B 染色液：氨基黑10B0.1g 溶于20ml 无水乙醇中，加醋酸5ml、甘油0.5ml，使其溶解。另取磺柳酸2.5g，溶于74.5ml 去离子水中。再将两液混合摇匀。

4）漂洗液：①3%醋酸溶液：适用于丽春红S 染色的漂洗。②取甲醇45ml，加冰乙酸5ml、去离子水50ml 混匀。适用于氨基黑10B 染色的漂洗。

5）透明液：含一分子结晶水枸橼酸21g 和N－甲基－吡咯烷酮150g，以去离子水溶解并稀释至500ml。也可用十氢萘或液体石蜡作透明液。

6）洗脱液：①0.1mmol/L 氢氧化钠溶液，适用于丽春红S 染色的洗脱。②0.4mmol/L 氢氧化钠溶液，适用于氨基黑10B 染色的洗脱。

【操作】

1．手工法

1）电泳槽的准备：将巴比妥－巴比妥钠缓冲液加入电泳槽中，调节两侧槽内的缓冲液，使其在同一水平面。

2）醋纤膜准备：距醋纤膜毛面的一端1.5cm 处，用直尺和铅笔轻划一横线（注意与醋纤膜长轴垂直），作点样标记，用铅笔编号后将毛面朝下浸入巴比妥－巴比妥钠缓冲液中，待充分浸透后取出（一般约需20－30min），夹于洁净滤纸中，吸去多余的缓冲液。

3）点样：用血清加样器将3～5μl 无溶血的新鲜待测血清均匀地点在划线处，样品应与膜的边缘保持一定距离，以免电泳图谱中蛋白区带变形。待血清渗入膜后，使毛面向下贴于电泳槽支架的盐桥上并保持平直。双层滤纸或四层纱布作为盐桥将膜的两端与缓冲液连通，平衡5min。

4）电泳：点样侧接负极，另一侧接正极，然后接通电源，调电压至90～150V，电流0.4～0.6A/cm 宽（不同的电泳仪所需电压、电流可能不同，应灵活掌握），待电泳区带展开约25～35mm 后关闭电源（夏季通电约45min，冬季通电约60min）。

5）染色：通电完毕，立即取出薄膜直接浸于丽春红S 或氨基黑10B 染色液中，染色5～10min，然后在漂洗液中漂去剩余染料，直至背景无色为止。

6）定量：①洗脱比色法：将漂洗干净的醋纤膜吸干，剪下染色的蛋白区带及1 条与白蛋白区带同宽的空白膜条放人相应的试管内，在白蛋白区带管内加氢氧化钠溶液6ml（计算时吸光度值乘2），其余各管加氢氧化钠溶液3ml（丽春红S 染料用0.1mol/L 氢氧化钠溶液，氨基黑10B 染料用0.4mol/L 氢氧化钠溶液），振摇数次，置37℃保温20min，使染料浸出。用丽春红S 染色者，需在染料浸出后向白蛋白管中加入40%醋酸0.6ml，其余各管加醋酸0.3ml，以中和部分氢氧化钠，使染料浸出液色泽加深。丽春红

S 染色在520nm 波长处，氨基黑10B 染色则在600～620nm 波长处，空白管调零，读取各管吸光度值，然后计算出各区带的相对比。②光密度计扫描法：透明：吸去薄膜上的漂洗液，浸入透明液中2～3min。然后取出薄膜平贴于洁净无划痕的载玻片上（勿产生气泡），将此玻片竖立片刻，除去一定量透明液后，于90～100℃烘烤10～15min，取出冷却至室温。若用十氢萘或液体石蜡透明，应将漂洗过的薄膜烘干后进行透明。扫描：将已透明的薄膜放入光密度计的暗箱内进行扫描分析。

2．自动化分析法

采用半自动或全自动电泳仪。浸膜缸、染色缸、3 个漂洗缸和透明缸往往组合在一起，放在仪器内；在仪器内的一定位置上可摆放微型电泳槽。有一机械臂可模仿手工操作步骤，完成从浸膜、点样、将醋纤膜置于电泳槽上电泳，到醋纤膜染色、漂洗、透明，直至将薄膜放人仪器内置的光密度计暗箱中扫描比色。

【计算】

$$\text{各组分蛋白百分比}\ (\%) = \frac{\text{各组分蛋白的吸光度值}}{\text{各组分吸光度值之和}} \times 100\ \%$$

各组分蛋白质量浓度（g/L）＝各组分蛋白百分比×血清总蛋白质量浓度（g/L）

白蛋白的吸光度值应乘2。

【注意事项】

1）每次电泳时，应交换电极，可使两侧电泳槽内缓冲液的正、负离子相互交换，以维持缓冲液pH 值在一定水平。电泳槽缓冲液一般使用10 次后，应弃去，更换新鲜缓冲液。夏天缓冲液易变质，应保存在4℃冰箱内。

2）电泳槽缓冲液的液面要保持一定的高度。同时电泳槽两侧的液面应保持在同一水平，以免通过薄膜产生虹吸现象。

3）电泳效果欠佳的常见原因如下：①电泳图谱不整齐。见于点样不均匀；薄膜未完全浸透或温度过高致膜面局部干燥；缓冲液变质；电泳时薄膜放置不正确，未与电流方向平行；薄膜与盐桥间没有完全贴紧，造成局部接触不良。②蛋白各组分分离不佳。见于点样过多：电流过低；薄膜水分供给不足（常见于缓冲液液面过低或用作盐桥的纱布或滤纸过薄）；薄膜结构过分细密，透水性差，导电性差等。③染色后白蛋白中间着色浅。见于染色时间不足或染色液陈旧；标本蛋白含量过高。④薄膜透明不完全。见于透明液陈旧；浸泡时间不够；薄膜未完全干燥就进行透明处理。⑤透明膜上有气泡。玻璃片上有油脂，使薄膜部分脱开；贴膜时滚动不佳。

4）氨基黑10B 染色时，白蛋白染色会过深，且区带中容易出现着色不全的小点，而球蛋白的染色仅为白蛋白的80％。在血清蛋白各组分正常时，丽春红S 能与各蛋白质组分成比例结合，故用丽春红S 染色效果优于氨基黑10B。

【参考值】

由于各实验室采用的电泳条件不同，参考值可能有差异，应根据自己实验室的条件制定参考值，可用各组分蛋白的百分比或实际浓度（绝对值）两种方式报告。各种方法的参考值见表4－2－8、4－2－9、4－2－10。

表4－2－8　光密度计扫描检测血清蛋白组分（丽春红S染色）结果（$\bar{x}\pm s$）

蛋白质组分	含量（g/L）	占总蛋白百分比（%）
白蛋白	35～52	62.5±5.5
α_1球蛋白	1.0～4.0	3.35±2.35
α_2球蛋白	4.0～8.0	8.05±3.15
β球蛋白	5.0～10.0	10.0±3.0
γ球蛋白	6.0～13.0	14.0±4.2

表4－2－9　光密度计扫描检测血清蛋白组分（氮基黑10B染色）结果（$\bar{x}\pm s$）

蛋白质组分	含量（g/L）	占总蛋白百分比（%）
白蛋白	48.8±5.1	66.6±6.6
α_1球蛋白	1.5±1.1	2.0±1.0
α_2球蛋白	3.9±1.4	5.3±2.0
β球蛋白	6.1±2.1	8.3±1.6
γ球蛋白	13.1±5.5	17.7±5.8

【临床意义】

不同个体血清中同种蛋白质浓度差别较大，在许多疾病时也仅表现出轻微变化，往往没有特异的临床诊断价值。表4－2－11所列疾病标本电泳分析结果可有较显著的变化。

表4－2－10　光密度计扫描检测血清蛋白组分（氮基黑10B染色）结果（$\bar{x}\pm s$）

蛋白质组分	占总蛋白百分比（%）
白蛋白	66.2±7.6
α_1球蛋白	4.2±1.7
α_2球蛋白	6.6±2.1
β球蛋白	10.2±3.1
γ球蛋白	17.3±4.2

表4 —2 —11　几种疾病的常见蛋白电泳结果变化

病名	白蛋白	球蛋白			
		α_1	α_2	β	γ
肾病综合征	↓↓		↑↑	↑	
弥漫性肝损害	↓↓	↑	↓	↓	↑
肝硬化	↓↓	↓	↓		↑↑
原发性肝癌	↓↓	AFP			↑
多发性骨髓瘤			在α至γ区带之间出现M蛋白区带		
慢性炎症	↓	↑	↑		↑
妊娠期（生理性）	↓			↑	↓
无丙种球蛋白血症					↓↓
双白蛋白血症	双峰				

注：↑和↑↑分别表示轻度升高和明显升高，↓和↓↓分别表示轻度降低和明显下降

第三章　脂类测定

第一节　血清总胆固醇测定

血清总胆固醇（total cholesterol，TC）测定的常规方法包括化学法和酶法。以前以化学法为主，主要基于醋酸－醋酸酐－硫酸反应（L－B 法）和高铁硫酸反应的原理，但其须用强酸试剂，方法特异性差，干扰因素多，操作较繁，不适于分析大批量标本，亦不适于自动化分析，所以目前几乎已全部被酶法测定所取代。酶法测定特异性好，精密度和灵敏度均能很好地满足临床实验室的要求，既可以手工操作，也适合自动化分析。目前胆固醇氧化酶法（COD－PAP 法）已被中华医学会检验分会推荐为常规测定方法。

TC 测定国外已建立了完整的参考系统，如美国已建立国家参考系统（NRS／胆固醇）。这对于血脂测定的标准化是十分重要的。这个系统中包含了三级测定方法，即决定性方法、参考方法和常规方法，还包含了三级参考物质，即原始（一级）标准、参考血清（二级标准）和标准血清。

TC 测定的决定性方法是“同位素稀释气相色谱－质谱（D－GC－MS）分析法”，其准确性最高，但需要特殊仪器与试剂，技术要求高，只用于发展和评价参考方法及鉴定胆固醇纯度标准物质（一级标准）。

TC 测定的参考方法国际上有美国CDC 改进的Abell 等建立的方法，现称为ALBK 法。我国检验学会推荐的参考方法为高效液相色谱法，由北京卫生部老年医学研究所建立。参考方法的准确性近似于决定性方法，可以在条件优越的实验室采用，主要用于评价常规方法及为参考血清定值，具体内容参见有关文献。本章介绍常规方法。

胆固醇氧化酶法（又称COD－PAP 法）

【原理】

血清中的胆固醇酯（CE）被胆固醇酯水解酶（CEH）水解成游离胆固醇，后者被胆固醇氧化酶（COD）氧化成$\triangle^4$－胆甾烯酮并产生过氧化氢。在过氧化物酶（POD）催化下，过氧化氢与4－氨基安替比林（4－AAP）及酚（三者合称PAP）缩合，生成红色醌亚胺（此过程称为Trinder 反应）。醌亚胺的最大吸收峰在波长500nm 左右，其吸光度与标本中的胆固醇含量成正比。反应式如下：

$$CE + H_2O \xrightarrow{CEH} \text{胆固醇} + \text{游离脂肪酸}$$

$$\text{胆固醇} + O_2 \xrightarrow{COD} \triangle^4\text{-胆甾烯酮} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + 4\text{-AAP} + \text{酚} \xrightarrow{POD} \text{醌亚胺} + 4H_2O$$

【试剂】

1）酶试剂：其中组成因不同商品试剂盒而异，酶用量也由酶制品质量而定。一般包含磷酸盐缓冲液（pH7.7）0.4mmol/L、CEH ≥800U/L、COD ≥400U/L、POD ≥1000U/L、胆酸钠溶液3mmol/L、4-AAP0.5mmol/L、酚3.5mmol/L、聚氧乙烯类表面活性剂3g/L。酶与显色剂可以分别包装以维持稳定性，也可为单一试剂，其剂型可以是水溶液、冻干品或干粉。

磷酸盐缓冲液可用Tris缓冲液（100mmol/L，pH7.7）替代。为提高显色灵敏度，可以用酚的衍生物或其他色原代替酚。

2）TC校准血清：本法测定TC浓度以校准血清为标准，此校准血清应有可溯源的准确定值，胆固醇的含量应在3.8～5.2mmol/L之间。

【操作】

1）手工法：按表4-3-1步骤操作。各管混匀，置37℃水浴10min，于波长505nm处，以空白管调零，读取测定管和校准管的吸光度值。

表4-3-1　TC测定COD-PAP法操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测血清			0.02
校准血清		0.02	
去离子水	0.02		
酶试剂	2.00	2.00	2.00

2）自动分析法：按试剂盒说明书要求设置分析参数。一般为终点法，反应温度为37℃，校准模式线性，一点定标，保温时间5min，测定波长设定在500～520nm之间，标本与试剂体积的比值常为1∶100。也可用速率法测定，但此法要求试剂中酶的用量较大，应根据仪器性能及所用试剂的反应速度设计操作程序。

【计算】

$$\text{血清TC浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液TC浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）标本：采集空腹12h 后静脉血，及时分离血清。

2）干扰：本法具有氧化酶反应途径的共同缺陷，易受一些还原性物质如尿酸、胆红素、维生素C 和谷胱甘肽等的干扰。

3）方法学评价：①精密度：终点法批内CV <1.5％，批间CV ≤2.5％。②准确度：以参考方法（ALBK 法）定值的血清为校准液时，本法测定结果与ALBK 法基本一致。③灵敏度：显色剂用酚时，5.2mmol/LTC 在波长500nm 处的吸光度值约0.30～0.35，故吸光度值为0.005 时的TC 浓度约0.08mmol/L（3mg/dl）。④线性范围：按本法试剂配方，血清标本与酶试剂用量的比例为1∶100，此时测定范围上限达13mmol/L。

4）试剂的质量①酶：两种酶（CHE 和COD）的质量十分重要，CHE 必须能有效地水解CE，COD 对胆固醇氧化必须完全。选用试剂盒时，可以通过测试血清中胆固醇的反应速度判断好坏。好的试剂应能在5min 内反应达到终点，反应不能在10min 内完成的试剂不宜采用。②校准液：纯胆固醇结晶用有机溶剂配制的溶液不能作为TC 酶法分析的校准液，应以准确定值的血清作为校准，此校准液（品）相当于三级标准。校准液定值的准确性由其可溯源性保证，如由参考血清（二级标准）正确转移而来即具可溯源性。商品试剂盒中配备的校准液应能溯源到我国国家血清胆固醇标准物质GBW09138。校准血清一般用混合人血清制备，制备中应尽量少用附加物，力求无明显基质效应，基质效应明显者应作校正。商品试剂盒所备校准液的指示值往往是按配套仪器和试剂作过校正的值，因此要注意这种校准液不能与其他试剂互用。也不能将质控血清作为校准液。③试剂与校准血清的稳定性：未开瓶的试剂4℃存放至少可稳定1 年。复溶后的酶试剂在2～8℃至少稳定1 周，15～25℃稳定3d，如在此期间出现肉眼可辨的粉红色为不合格。

【参考值】

我国血脂异常防治建议提出的合适范围为≤5.20mmol/L（200mg/dl）。

【医学决定水平】

边缘升高：5.23～5.69mmol/L（201～219mg/dl）；升高：≥5.72mmol/L（220mg/dl）。

【临床意义】

TC 是高胆固醇血症的诊断指标，高胆固醇血症对于动脉粥样硬化和冠心病而言，是一个明确的危险因子，与冠心病的发病率呈正相关。

1）高胆固醇血症：原发性高胆固醇血症见于家族性高胆固醇血症、低密度脂蛋白受体缺陷症、多源性（polygenic）高TC、混合性高脂蛋白血症等，继发性高胆固醇血症见于肾病综合征、甲状腺功能减退、糖尿病和妊娠等。

2）低胆固醇血症：原发性如家族性无β或低β脂蛋白血症，继发性如甲状腺功能亢进、营养不良、慢性消耗性疾病等。

第二节　血清甘油三酯测定

血清甘油三酯（triglyceride，TG）测定方法有化学法与酶法两类。化学法一般包含抽提、皂化、氧化和显色四步反应，化学法中比较准确的是变色酸显色法，比较简便的是乙酰丙酮显色法，皆因操作步骤繁多、不能作自动化分析等不适应临床检验的发展而逐渐较少采用。酶法始于20 世纪70 年代初，80 年代开始普及全酶法。曾经应用过偶联丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶的紫外分光光度法、甘油脱氢酶法、甘油氧化酶法、甘油磷酸脱氢酶法等多种酶法，现在普遍应用单一试剂的甘油磷酸氧化酶（GPO）法，指示反应同TC 测定，即Trinder 反应，称为GPO －PAP 法。

TG 测定的决定性方法也是ID －GC －MS 方法，由美国NIST 建立（1995 年）。但迄今尚无公认的参考方法，一般将van Handel 等建立（1957 年）、Carlson 等改进（1963 年）的变色酸显色法作为TG 的参考方法。国内陈文祥等建立了高效液相色谱法分析TG 的参考方法。

由于TG 的脂肪酸组成复杂，而且血中还有游离甘油（FG）与不完全甘油酯，从而使TG 的准确测定要比TC 困难得多。

甘油磷酸氧化酶法（又称GPO －PAP 法）

【原理】

脂蛋白脂酶（LPL）使血清中TG 水解成甘油与脂肪酸，甘油激酶（GK）及三磷酸腺苷（ATP）将甘油磷酸化，以甘油磷酸氧化酶（GPO）氧化3 －磷酸甘油（G －3 －P）产生过氧化氢，最后以Trinder 反应显色，测定波长500nm 处吸光度值，此值与TG 浓度成正比。反应式如下：

$$TG + 3H_2 \xrightarrow{LPL} 甘油 + 3RCOOH$$

$$甘油 + ATP \xrightarrow{GK + Mg^{2+}} G-3-P + ADP$$

$$G-3-P + O_2 \xrightarrow{GPO} 磷酸二羟丙酮 + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4-AAP + 4-氯酚 \xrightarrow{POD} 苯醌亚胺 + H_2O$$

目前国内外多数TG 商品试剂根据上述原理配制，用一步终点法测定。此法的测定结果中包括血清中的游离甘油（FG），若要去除FG 的干扰得到真正的TG 值，可用外空白法或内空白法。外空白法需加做一份不含LPL 的酶试剂测定FG 作为空白值；内空白法又称两步法或双试剂法，将GPO －PAP 试剂分成两部分，与血清分步反应由此除去FG 的干扰。此两步法目前为中华医学会检验分会推荐的方法。

【试剂】

1）用于一步法的单一试剂组成如下：Tris－盐酸缓冲液（pH7.6）150mmol/L、LPL≥3000U/L、GK≥250U/L、ATP≥0.5mmol/L、GPO≥3000U/L、POD≥1000U/L、胆酸钠3.5mmol/L、硫酸镁17.5mmol/L、－AAP 1.0mmol/L、－氯酚3.5mmol/L、Triton X－100 0.1g/L。

2）用于两步法的双试剂组成如下：①试剂Ⅰ：150mmol/L PH7.6 的Tris－盐酸缓冲液每升中含有硫酸镁1mmol，胆酸钠0.35mmol，ATP 0.1mmol，4－氯酚0.25mmol，Triton X－1000.01g，GK1000U，GPO 6000U，POD 2000U。②试剂Ⅱ：150mmol/L pH7.6 的Tris－盐酸缓冲液每升中含有硫酸镁1mmol，胆酸钠0.35mmol，ATP0.1mmol，4－氯酚0.25mmol，Triton X－1000.1g，LPL6000U，4－AAP2mmol。

3）TG 校准液：2mmol/L 三油酸甘油酯水溶液。称取三油酸甘油酯（纯品）177mg（可直接置于100ml 容量瓶中），加TritonX－100 5ml，摇动使成乳浊状，置56℃水浴约10min，澄清后加去离子水90ml，冷却至室温，再加去离子水至刻度，混匀。以2ml 安瓿分装，4℃保存至少稳定2 年，切勿冰冻。

一步法试剂盒亦有以甘油（纯品）水溶液为校准液［甘油208mg/L，相当于TG2.26mmol/L（2000mg/L）］。甘油校准液不适用于两步法。

【操作】

1）一步法按表4－3－2 步骤操作。各管混匀，37℃保温10min 后在波长500nm 处测吸光度值，颜色至少可稳定1h。

表4－3－2　GPO－PAP 一步法测血清TG 操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测血清			0.020
TG 校准液		0.020	
去离子水	0.020		
单一酶试剂	2.0	2.0	2.0

2）两步法按表4－3－3 步骤操作。各管混匀后37℃水浴10min，空白管校零，在波长500nm 处测吸光度。

表4－3－3　GPO－PAP 两步法测血清TG 操作步骤

加入物（μl）	空白管	校准管	测定管
待测血清			0.020
TG 校准液		0.020	
去离子水	0.020		
试剂Ⅰ	1.0	1.0	1.0
	混匀，37 ℃水浴5ndn		
试剂Ⅱ	1.0	1.0	1.0

3）自动分析法按试剂盒说明书要求设置分析参数，一步法和两步法均为终点法测定，反应温度37 ℃，一点定标，测定波长设定500～520nm 之间，标本与试剂体积的比值为1∶100。凡可以分步加试剂的分析仪都可以作两步法测定，但在设定试剂Ⅰ和试剂Ⅱ的加入时间以及第一次、第二次的读数时间等参数时有一定的技巧，须掌握所使用分析仪的运行原理，并在必要时对设定的参数进行验证。

【计算】

$$\text{血清TG 浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准注入吸光度值}} \times \text{校准液TG 浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）标本：采集空腹12h 后静脉血，及时分离血清。标本存放中会有少量TG 水解，释出游离甘油三酯，所以标本在4 ℃存放不宜超过3d。

2）干扰：对Trinder 反应的干扰因素同TC 测定。EDTA 和肝素在抗凝用量时不会产生干扰。TG 测定中也存在基质效应的干扰。

3）方法学评价①精密度：批内CV ≤3％，批间CV ≤5％。②准确性：两步法的检测结果与变色酸显色法基本一致。③灵敏度：2mmol/LTG 在波长500nm 处吸光度值≥0.2。④线性范围：上限可达11.3mmol/L。

4）试剂的质量：①试剂稳定性：应用试剂于20～25 ℃放置应能稳定1d，4 ℃至少可稳定3d 或达1 周，试剂出现红色不能再用。试剂在波长500nm 的吸光度值应≤0.05。②双试剂排除FG 能力：37 ℃4min 能完全排除2mmol/LFG 的影响。③反应到达终点时间：一步法及两步法的第二步孵育时间在37 ℃不超过8min。④显色后稳定＞30min。⑤特异性：LPL 除水解TG 外，还能水解甘油一酯和甘油二酯（血清中后两者约占TG 的3％），故测定结果包括后两者（胰脂肪酶只能使TG 水解成甘油一酯）。

5）现阶段允许一步酶法与两步酶法并存，根据具体情况选用。

6）正常人血清FG 浓度平均约0.11 mmol/L（10mg/dl），对于生物变异较大的TG

来说，影响不大。但在某些情况，如糖尿病患者、情绪应激、服用含甘油的药物、静脉营养、取血样时甘油污染等，FG 浓度可明显增高以致影响对TG 浓度的判断；另外若标本贮存与处理不当也会使TG 水解而产生FG。因此，建议糖尿病患者或某些特殊情况的患者，或TG 浓度>2.3mmol/L 者，测定TG 浓度最好作FG 空白校正，对有些可疑情况，如TG 浓度增加而血清不混浊者应排除高浓度FG 的可能。

【参考值】

我国血脂异常防治建议提出的合适范围为≤1.70mmol/L（150mg/dl）。

【医学决定水平】

升高：>1.70mmol/L（150mg/dl）。

【临床意义】

高TG 血症常伴有低HDL－C 血症，而HDL－C 与动脉粥样硬化呈负相关，因此，高TG 血症与动脉粥样硬化也有一定的相关性。原发性高TG 血症多有遗传因素，包括家族性高TG 血症与家族性混合型高脂（蛋白）血症等。继发性高TG 血症见于糖尿病、糖原贮积症、甲状腺功能减退、肾病综合征、妊娠、口服避孕药、酗酒等。

通常将高脂蛋白血症分为Ⅰ、Ⅱa、Ⅱb、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ等6 型，除Ⅱa 型外各型均伴有高TG 血症，有时TG 浓度可高达11.3mmol/L（1000mg/dl）以上。

第三节　血清高密度脂蛋白胆固醇测定

高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）是血清中一类具有抗动脉粥样硬化作用的脂蛋白，通常以测定其胆固醇含量（HDL－C）代表HDL 水平。以前多用化学沉淀法，使HDL 与低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）和极低密度脂蛋白（very low densitylipoprotein，VLDL）分离，然后用化学法或酶法测定上清液中的HDL－C。这类方法中有代表性的是磷钨酸－镁沉淀法，该法已被中华医学会检验分会推荐为常规测定方法。但因此法包含一个离心分离的操作故不适合作自动化分析。近年来有更方便的直接测定法（又称匀相法），免去了标本预处理（沉淀）步骤，便于自动化操作，检测快速简便，且准确性能满足常规应用的要求，已取代化学沉淀法成为临床实验室的常规方法。

HDL－C 测定的参考方法是美国疾病控制中心（CDC）制定的超速离心结合选择性沉淀方法（亦称β定量法），有关胆固醇测定均采用ALBK 法，其对设备与技术的要求较高。β定量法是目前测定HDL－C 最准确的方法，主要用于校准及检查常规方法的准确性。

一、磷钨酸－镁沉淀法

【原理】

血清HDL 不含载脂蛋白B（apolipoprotein B，apoB），用磷钨酸（PTA）与镁离子作沉淀剂，可沉淀含apoB 的脂蛋白［包括LDL、VLDL 及脂蛋白（a）］。本法上清液中只含HDL，其胆固醇含量用胆固醇氧化酶法测定（同GOD－PAP 法测TC）。本法又称PTA－Mg 法。

【试剂】

（1）沉淀剂：PTA 0.44g 和氯化镁1.10g（均用分析纯）溶于80ml 去离子水中，以1mol/L 氢氧化钠溶液校pH 至6.15，然后以去离子水加至100ml，此试剂至少稳定1 年。

（2）酶试剂：同TC 测定。

（3）校准血清：低胆固醇浓度的校准血清，或将TC 测定用校准血清适当稀释（1∶2 或1∶3）后用。

【操作】

手工法按表4－3－4 步骤操作，第二步酶法测胆固醇操作可作自动化分析，标本和试剂用量应适当减少。

各管混匀，37℃保温5min，测定各管在波长500nm 处吸光度值。

表4－3－4　磷钨酸－镁沉淀法测定HDL 操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测血清			0.2
沉淀剂			0.2
混匀后室温置10min，再3000r/min 离心15min			
上清液			0.050
校准血清		0.025	
去离子水	0.050	0.025	
酶试剂	2.0	2.0	2.0

【计算】

$$\text{HDL－C，浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液胆固醇浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

（1）宜采集空腹12h 后静脉血，当天测定。如需冰冻保存，只能冻1 次，解冻后即测定。

2）最好用低温离心，离心时温度过高会使沉淀不完全。离心后的上清液必须澄清，应及时吸出上清液完成胆固醇测定。

二、直接测定法（匀相法）

HDL直接测定法大致分3类，分别是聚乙二醇/抗体包裹法、酶修饰法和选择性抑制法，后者又称掩蔽法。这类试剂的具体配方均未公开。选择性抑制法是目前国内应用最多的方法，介绍如下。

【原理】

分两步反应，第一试剂有聚阴离子及分散型表面活性剂（即反应抑制剂），后者与LDL、VLDL和乳糜微粒表面的疏水基团有高度亲和力，吸附在这些脂蛋白表面形成掩蔽层，但不发生沉淀，从而抑制这类脂蛋白中的胆固醇与酶试剂起反应；第二试剂含胆固醇测定酶及对HDL表面亲水基团有亲和力的表面活性剂（即反应促进剂），可使胆固醇测定酶与HDL中的胆固醇起反应。

【试剂】

1）第一试剂：聚阴离子及分散型表面活性剂。

2）第二试剂：胆固醇测定酶和表面活性剂。

【操作】

血清3μl，加入第一试剂300μl，37℃保温5min后，加入第二试剂100μl，再于37℃下反应5min，然后以双波长（600/700nm或546/600nm）比色。自动化分析参数根据试剂盒提供的参数设定。

【注意事项】

本法线性范围可达3.9mmol/L，批内及批间CV<3%。国内报道此法检测结果与PTA-Mg法及硫酸葡聚糖-镁沉淀法（DS-Mg法）检测结果基本一致。本法的特异性较好。

【参考值】

我国血脂异常防治建议提出的合适范围为HDL≥1.04mmol/L（40mg/dl）。

【医学决定水平】

降低：<0.91mmol/L（35mg/dl）。

【临床意义】

流行病学与临床研究证明，HDL-C与冠心病发病率呈负相关，HDL-C增高（>1.55mmol/L）是冠心病的“负”危险因素，在此基础上每增高0.03mmol/L，则冠心病危险性降低2%~3%。

HDL-C下降多见于脑血管病、糖尿病、肝炎、肝硬化等患者。高TG血症往往伴

低HDL－C，肥胖者的HDL－C也多偏低。吸烟可使HDL－C下降，适量饮酒、长期体力劳动和运动会使HDL－C升高。

第四节　血清低密度脂蛋白胆固醇测定

低密度脂蛋白（ow density lipoprotein，LDL）浓度通常以其胆固醇浓度（LDL－C）表示。以前因其测定方法较繁，所以多以Friedewald公式计算，但影响结果因素较多。目前较简单的测定方法是选择性沉淀LDL的方法，其中以聚乙烯硫酸（PVS）法最为常用，这是一种间接测定LDL－C方法，为中华医学会检验分会推荐的常规方法，但也不适合自动化分析。另有免疫沉淀法测LDL－C，其测定LDL－C的特异性高，精密度好，但试剂成本较高。

近年出现的直接测定法（匀相法）是适合自动化分析的LDL－C测定法。与直接测定HDL－C相似，不需要标本预处理，适用于大批量标本自动化分析，测定结果能满足临床要求。

LDL－C测定的参考方法亦是β定量法，与HDL－C测定相同，实际上两者往往同时测定。本节介绍适合临床实验室常规测定的PVS法和直接测定法。

一、聚乙烯硫酸盐沉淀法

【原理】

用聚乙烯硫酸（PVS）选择性沉淀血清中LDL，再以血清TC浓度减去上清液（含HDL和VLDL）中胆固醇浓度即得LDL－C浓度。试剂中含EDTA用以去除两价阳离子，辅以聚乙二醇独甲醚（PEGME）加速沉淀，避免与VLDL共同沉淀。胆固醇测定同TC测定。

【试剂】

1）沉淀剂：每100ml中含PVS钾盐70mg，EDTA钠盐186mg及PEGME16ml，可在4℃冰箱存放，至少稳定2个月（PEGME为黏稠性液体，要确保加量准确）。

2）酶试剂：同TC测定。

3）校准液：同TC测定。

【操作】

手工法按表4－3－5步骤操作，第二步酶法测胆固醇可作自动化分析，标本和试剂用量应适当减少。各管混匀，37℃保温5min，测定波长500nm处吸光度值。

表4－3－5　PVS 沉淀法测LDL 操作步骤

加入物（μl）	空白管	校准管	测定管
待测血清			0.2
沉淀剂			0.1
混匀后置室温15min，再3000r/min 离心15min			
上清波			0.030
校准液		0.030	
去离子水	0.030		
酶试剂	2.0	2.0	2.0

【计算】

$$\text{上清液胆固醇浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液胆固醇浓度（mmol/L）}$$

LDL－C 浓度（mmol/L）＝TC 浓度（mmol/L）－上清液胆固醇浓度（mmol/L）×1.5

【注意事项】

1）采集空腹12h 后的静脉血，如在4℃存放不得超过4d。

2）本法检测结果中包括中间密度脂蛋白（IDL）及脂蛋白（a）［Lp（a）］所含的胆固醇。

3）血清VLDL 浓度很高时，部分标本会因LDL 沉淀不完全而使检测结果偏低。故在血清严重混浊时，可将血清稀释1 倍后再测定。

4）显色反应的干扰物同TC 测定。

5）血清与沉淀剂混合后，放置时间不得超过1h。

6）本法精密度好，批内和批间CV ＜2％。

7）Friedewald 公式如下：

LDL－C（mmol/L）＝TC（mmol/L）－HDL－C（mmol/L）－TG（mmol/L）/2.2，或

LDL－C（mg/dl）＝TC（mg/dl）－HDL－C（mg/dl）－TG（mg/dl）/5

以Friedewald 公式计算LDL－C 浓度，得到的是近似结果。因为此公式假设VLDL－C 与TG 之比固定不变，且仅以VLDL－TG 代表TG；公式中3 项脂类的检测结果均是变量，任何一项测定不准确即会影响LDL－C 计算结果。血清TG 浓度如超过4.5mmol/L 则不能应用此公式计算LDL－C 浓度。

二、直接测定法（消除法）

匀相的LDL－C 直接测定法有两类，一类是选择性抑制法，用α－环糊精、硫酸葡

聚糖和聚氧乙烯－聚氧丙烯封闭，共聚多醚（POE－POP）抑制非低密度脂蛋白与胆固醇酯酶和胆固醇氧化酶的反应，从而仅使LDL－C被酶水解并测定；另一类是消除法，以不同表面活性剂的双试剂先使非LDL－C水解消除，第二步再测定LDL－C，这是目前应用较广的直接测定法。

【原理】

根据理化性质不同的各类脂蛋白与表面活性剂反应也不相同的原理，在第一反应中，表面活性剂Ⅰ使非低密度脂蛋白的结构改变，促进这些脂蛋白与胆固醇酯酶（CEH）和胆固醇氧化酶（COD）的反应，使非低密度脂蛋白在第一反应中被消除，而LDL受到表面活性剂Ⅰ的保护，不与CEH和COD反应。第二反应中的表面活性剂Ⅱ促进未被消除的LDL－C与CHE和COD反应，并通过Trinder反应显色而测定。

【试剂】

1）第一试剂：含Goods缓冲液（pH7.0）100mmol/L，HDAOS（色原）0.56mmol/L，CEH800U/L，COD800U/L，过氧化氢酶800U/L及表面活性剂Ⅰ。

2）第二试剂：含Goods缓冲液（pH7.0）100mmol/L，4－AAP4mmol/L，POD800U/L及表面活性剂Ⅱ。

3）校准血清：准确定值的LDL－C校准血清。

【操作】

本法一般做自动化分析。一般参数如下：反应温度37℃，校准模式线性，标本体积3μl，加第一试剂300μl，反应5min，再加第二试剂100μl，反应时间5min，测定波长546nm/660nm（主波长/次波长）。

【计算】

$$\text{血清LDL－C浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液LDL－C浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）本法检测结果与β定量法（参考方法）相关良好，线性范围达10.4mmol/L（400mg/dL），灵敏度为0.258mmol/L，批内和批间CV＜2%。不受抗坏血酸、胆红素、血红蛋白等干扰。TG的干扰有待进一步验证。

2）目前各类方法测定的LDL－C值都包括IDL（中间密度脂蛋白）和Lp（a）中的胆固醇在内，在流行病学与冠心病危险因素研究中所有LDL－C定量均包含IDL－C和Lp（a）－C，沿用多年已成习惯。大多数人的血清中IDL－C很少（约0.05mmol/L，即2mg/dl），但在高TG血症时IDL－C可以增加。一般Lp（a）－C约0.08～0.10mmol/L（3～4mg/dl），如脂蛋白（a）－C较高时，有必要对LDL－C测定值进行校正。校正公式如下：

LDL－C（mg/dl）（校正值）＝LDL－C（mg/dl）（测定值）－（0.3×Lp（a）（mg/dl）]

【参考值】

我国血脂异常防治建议提出的合适范围为LDL－C ≤3.12mmol/L（120mg/dl）。

【医学决定水平】

边缘升高：3.15～3.61mmol/L（121～139mg/dl）；升高：≥3.64mmol/L（140mg/dl）。

【临床意义】

LDL－C 升高是动脉粥样硬化发生发展的主要脂类危险因素。由于TC 水平同时也受HDL－C 水平的影响，所以最好以LDL－C 代替TC 作为冠心病危险因素指标。美国国家胆固醇教育计划成人治疗专业组规定以LDL－C 水平作为高脂蛋白血症的治疗决策及其需要达到的治疗目标。

第五节　血清载脂蛋白测定

血清载脂蛋白（apolipoprotein，apoLp）测定采用免疫化学法，早期的方法有单向免疫扩散（RID）、电泳免疫分析（火箭电泳法）、放射免疫分析（RIA）和酶联免疫吸附试验（ELISA）等，这些无论在方法学性能（精密度、准确度、灵敏度等）和可操作性方面均不适合现代分析要求。目前比较适合临床实验室应用的是免疫比浊法，包括免疫散射比浊法（INA）和免疫透射比浊法（ITA）。两者测定的原理基本相同，区别在于测定的光路，因而对仪器的要求不同。INA 法需要光散射测定仪，一般多以速率法测定；ITA 法可不用专门的仪器，比较精密的光度计或生化自动分析仪即可测定，常以终点法测定。比浊法检测简单快速，可以自动化批量分析，但是对抗血清的质量要求高，且消耗抗血清较多。

apoLp 免疫测定必须有合适的抗血清，目前国内外有多种测定载脂蛋白AI（apoAI）及载脂蛋白B（apoB）的比浊法试剂盒供应，在选择时应注意抗血清的质量。一般对抗血清的要求为特异性好，与其他血清蛋白及其他apoLp 无交叉反应；具有高亲和力和高效价，抗原抗体反应迅速。

apoLp 测定需要有可靠的定值校准血清。因为提纯的抗原不稳定，而且与抗体的反应性不同于以自然状态存在于血清脂蛋白中的apoLp，所以通常以定值人血清作校准品。现在已有WHO 认可的由美国西北脂类研究室根据国际临床化学会的计划研制的apoAI 参考血清（SP1－01）和apoB 参考血清（SP3－07），常规工作用校准血清定值最好能溯源于这两种参考血清。

一、apoA Ⅰ免疫透射比浊法测定

【原理】

特异性抗人apoAI 抗体与血清apoAI 相结合，形成的免疫复合物颗粒可使反应液发生混浊，在波长340nm 处的吸光度大小反映血清apoAI 的浓度。

【试剂】

1）标本稀释剂：含磷酸盐缓冲液（pH7.4）0.1mol/L，氯化钠9g/L，PEG－6000 40g/L 及适量表面活性剂，用G5 玻芯漏斗抽滤后用。

2）抗人apoAI 抗血清：抗体效价以1∶32～1∶64 为宜，临用时作适当稀释。

3）校准血清：准确定值的人血清，最好备有高、中、低浓度的校准血清各1 份，便于制作校准曲线。

【操作】

手工法按表4－3－6 步骤操作，校准管需要3～5 管，分别加入不同浓度的校准血清，以制作校准曲线。为得到较好的反应灵敏度和线性，有时有必要将血清标本作适当稀释。

表4－3－6　apoAⅠ透射比浊终点法操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
1∶100 稀释血清			0.1
1∶100 稀释校准液		0.1	
去离子水	0.1		
稀释抗血清	0.5	0.5	0.5

各管混匀，37℃保温30min，以空白管调零，测定各管在波长340nm 处的吸光度。以各校准管在波长340nm 处的吸光度值对apoAI 标示值作图制成校准曲线，在校准曲线上求出标本的apoAI 含量。用自动分析仪测定时，应根据不同仪器和试剂盒设计参数，合理选择标本与抗体试剂的比例及反应时间，采用多点定标模式，计算采用Logit－Log 模式，一般不要用一点定标的线性模式（见注意事项）。

【注意事项】

1）本法测定时必须十分注意反应体系中抗原不可过量，线性上限不可低于2.5g／L。因此，抗血清用量必须充裕，标本用量也应严格控制，无论手工操作或使用分析仪，不能保证精确的1～2μl 原血清标本体积时均应对血清标本作适当稀释。标本用量少还有利于改善校准曲线的线性。

2）试剂中PEG 有促进抗原抗体反应的作用。血清稀释及表面活性剂有助于HDL 中apoAI 抗原位点的暴露，使之能充分地与特异性抗体起反应，表面活性剂还可减少血清空白浊度。

3）本法批间CV <5％，线性范围0.4～2.5g/L。

4）校准曲线：免疫比浊法中apoAI 浓度与吸光度值不一定成线性关系，尤其当抗血清的效价与亲和力有欠缺时更是这样，因此，要求作多点定标。仅有一份校准血清时将校准血清作4 个不同的稀释度，如有高、中、低浓度的3 份校准血清时，可做三点定标，也可作五点定标（即高、中浓度的血清等量混合，中、低浓度的血清等量混合，分别成为另两份校准血清）。

如用单点校准计算结果偏差会较大，检测结果可能不能准确反映待测标本浓度。仅当所用的抗血清品质优良而且标本用量控制合适，且经验证在一定范围内校准曲线确实符合直线，才可以使用一点定标的线性反应模式。

5）本法主要干扰因素是血清本身的混浊（如高脂血症），所以在测定中必须作标本空白管，自动化分析中可采用两点法除去标本混浊的干扰。

6）抗血清的质量是试剂盒质量的关键。原血清效价应在1∶16 以上，且无杂抗体，选购新批号试剂前最好先作鉴定，校准曲线的形状也能反映抗体的质量。校准血清定值的准确性也应受到重视。

7）散射比浊法也是常用的测定方法，且多用速率法。速率法散射比浊测定的速度很快，一般在1min 内即可完成一个测定。

【参考值】

1.20～1.60g/L，均值1.40～1.45g/L，女性略高于男性。

【临床意义】

HDL 组成中蛋白质占50％，其中主要是apoAⅠ，约占HDL 蛋白质的65％～70％，而其它脂蛋白中apoAI 极少，故apoAI 是HDL 的特征性载脂蛋白，血清apoAI 浓度可反映HDL 浓度，与HDL－C 呈明显的正相关。但HDL 是一系列颗粒大小与组成不均一的脂蛋白，当HDL 亚类与组成有变化时，apoAⅠ不一定相应变化，所以同时测定apoAI 和HDL－C 有助于对病理生理状态的分析。

apoAI 浓度偏低见于冠心病和脑血管病患者；家族性高TG 血症者HDL－C 往往偏低，但apoAI 不一定低；而家族性混合型高脂血症者apoAⅠ与HDL－C 浓度均轻度下降，冠心病危险性较大。在罕见的遗传性疾病Tangier 病、家族性低α脂蛋白血症、鱼眼病等患者血清apoAI 和HDL－C 浓度极低。

二、apoB 免疫透射比浊法测定

原理和试剂基本同apoAI 测定，只是改用抗人apoB 抗血清。高效价的apoB 抗血清一般较易制备，用作比浊法的抗血清效价不应低于1∶128，抗血清应用液浓度随抗血清效价及抗原抗体亲和力而异。试剂中提供的校准血清最好有高、中、低浓度，用作校准曲线制备。

【操作】

基本上与apoAI 测定相同，但血清标本的稀释倍数可以较低或者不稀释，原血清用量3μl（仪器）或5μl（手工）。

apoB 测定同样需要多点定标作校准曲线，在校准曲线上查得标本测定结果。自动分析时应用多点定标的Logit－log 模式。除非经仔细验证反应确实达到良好的线性，否则如采用一点定标，按线性模式测得的结果可能会有较大偏差。

【注意事项】

1）以抗apoB 多克隆抗体测定的结果只宜称apoB，不宜称$apoB_{100}$，除非所用的抗体是与$apoB_{48}$无交叉反应的单克隆抗体。

2）本法批间CV <5%，线性范围0.4～2.0g/L。

3）其它有关事项，请参阅apoAI 测定。

【参考值】

不论男性女性，apoB 水平随年龄增加而上升，70 岁以后不再上升或开始下降。一般中青年的平均水平为0.80～0.90g/L，老年人的平均水平为0.95～1.05g/L。

【临床意义】

血清中的apoB 绝大部分存在于LDL 中，在IDL、VLDL 与脂蛋白（a）中也各含有一分子apoB，所以血清apoB 浓度主要反映LDL 浓度，与LDL－C 呈显著正相关。

流行病学与临床研究结果已确认，高浓度apoB 是冠心病的危险因素，且apoB 是各项血脂指标中较好的动脉粥样硬化标志物。冠心病高apoB 血症的药物干预实验结果表明，降低apoB 水平可以减少冠心病发病及促进粥样斑块的消退。

第六节　血清脂蛋白（a）测定

脂蛋白（a）[Lp（a）]作为冠心病的一个独立危险因素，近年来引起临床重视。但Lp（a）的性质特殊，所含结构蛋白中既有apoB 又有特征性载脂蛋白（a）——apo（a），且apo（a）分子中含有与纤溶酶原同源的抗原决定簇，加之apo（a）的分子量变异较

大，这些均导致测定Lp（a）方法学的复杂性。Lp（a）测定有两类方法，一是根据免疫学原理测定apo（a），结果以g/L表示，也有以mmol/L表示的；另一类方法测定其所含的胆固醇，结果以Lp（a）-C浓度表示。目前大多用免疫学方法测定。

免疫学方法测定Lp（a）时所用的抗体有多克隆抗体（PcAb）与单克隆抗体（McAb），它们必须与纤溶酶原及apoB无交叉反应，常用的有酶联免疫吸附试验（ELISA）及免疫（透射或散射）比浊法。免疫比浊法易受基质效应的干扰，且灵敏度低；ELISA法的主要优点是基质效应不明显，可以选择对apo（a）分子大小不敏感的McAb，也可以用apoBMcAb代替apo（a）McAb作为酶标记（第二）抗体，避免apo（a）分子大小不同对检测结果的影响。

单克隆抗体酶联免疫吸附试验

【原理】

采用双抗体夹心法。以apo（a）McAb为包被抗体，捕获标本中的apo（a），以酶标记的apo（a）McAb或apoB抗体为第二抗体，最后根据标记酶产生的颜色反应确定apo（a）量。

【试剂】

1）包被缓冲液：0.02mol/L碳酸盐缓冲液（pH9.5）。

2）包被抗体：经硫酸铵沉淀法纯化的apo（a）McAb IgG。

3）酶标抗体：交联过氧化物酶的apo（a）McAb IgG，或apoB抗体IgG。

4）稀释/封闭液：0.01mol/L磷酸盐缓冲液（pH7.4），含氯化钠9g/L。临用前取适量缓冲液，加入适量小牛血清及Tween-20。

5）底物溶液：0.1mol/L枸橼酸及0.2mol/L磷酸氢二钠缓冲液（pH5.0）。临用前每100ml缓冲液中加入邻苯二胺0.1g及30%过氧化氢0.1ml。

6）终止液：2mol/L硫酸溶液。

7）洗涤液：9g/L氯化钠溶液，每升含Tween-200.5ml。

8）校准血清。

【操作】

1）包被：聚苯乙烯板，包被抗体用稀释液稀释成10μg/ml浓度，每孔加0.15ml，将反应板置密闭的湿盒内4℃过夜。

2）洗板及封闭：用洗涤液洗板3次，每次5min。再在每孔中加入封闭液0.15ml，37℃放置30min后，再用洗涤液洗3次。

3）稀释：校准血清从1∶200起，用稀释液倍比稀释8次，制作校准曲线用。血清标本1∶500稀释，吸光度过低或过高的标本可稀释成1∶100或1∶2000后复查。

4）加样：小孔中加入稀释后的校准血清或标本各100μl，留一空白孔只加稀释液，

均置湿盒内37 ℃保温1h 后用洗涤液洗3 次。

5） 加酶标抗体：每孔加入100 μl 经适当稀释的酶标抗体，置湿盒内37 ℃保温1h 后用洗涤液洗3 次。

6） 显色：每孔中加底物溶液100 μl，室温（25 ℃） 避光放置15 min。

7） 终止反应：每孔中加入终止液50 μl。

8） 比色：在酶标比色计上以空白孔校零点，波长490nm 处读取各孔吸光度值。

【计算】

以不同稀释度的校准血清Lp（a） 浓度值为X，相应的吸光度值为Y，在半对数坐标纸上作出校准曲线。根据标本的吸光度值在校准曲线上查出Lp（a） 浓度，再乘以标本稀释倍数。

【注意事项】

1） 除稀释和加样操作外，其它各步操作一般都以洗板机和酶标仪完成，也可以采用全自动酶标仪作自动分析。

2） 本法检测结果多以Lp（a） 质量浓度（mg/L） 表示，不单独以apo（a） 计。由于难以获得可靠的参考血清，目前各种试剂盒提供的校准血清也没有可溯源的标示值，因此，Lp（a） 测定标准化尚有很大困难。

3） 本法批内CV <5 %，批间CV <9 %。ELISA 误差来源较多，有板间差、孔间差、稀释及加样误差、试剂质量及各步操作误差等，必须注意严格控制各种误差。

【参考值】

正常人群的Lp（a） 水平呈明显的偏态分布，大多在200 mg/L 以下，平均120 ～180 mg/L，中位数约100 mg/L。

【医学决定水平】

≥300 mg/L 为升高。

【临床意义】

血清Lp（a） 水平与其他脂蛋白之间无直接的关系，主要由遗传决定。个体之间Lp（a） 浓度有很大差异，而环境、饮食、药物等对Lp（a） 的影响不明显，性别和年龄间的差别也不显著。

血清高Lp（a） 水平是发生动脉粥样硬化性疾病的独立危险因素，如Lp（a） 水平高于300 mg/L，冠心病危险性明显增加。虽然Lp（a） 水平与LDL －C 无明显相关，但若高LDL －C 血症同时伴有Lp（a） 升高，患冠心病的危险性就更大。在动脉粥样硬化病变发生发展中，Lp（a） 与apoB 起协同作用。

第四章　酶类测定

第一节　血清氨基转移酶测定

氨基转移酶包括丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotranseferase，ALT）和天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST），两者测定的常用方法都是连续监测法和赖氏终点比色法。目前应用最广的为连续监测法。赖氏终点比色法虽然试剂价格低廉，操作不需特殊仪器，但由于方法自身原理上有一定的缺陷，准确性和重复性较差，线性范围窄，因此，只在少数基层医院使用。近年来国内报道用丙酮酸氧化酶比色法测定ALT活性，具有操作简便、快速、准确性和重复性好的优点，有可能取代赖氏法在基层医院推广。该法以L－丙氨酸和a－酮戊二酸为底物，ALT 酶促反应所产生的丙酮酸被丙酮酸氧化酶（POD）氧化产生过氧化氢，后者通过Trinder 反应，形成红色醌亚胺。

一、连续监测法

（一）单试剂法

【原理】

$$\left\{\begin{array}{l}\text{L－丙氨酸}+\alpha\text{－酮戊二酸}\xrightarrow{ALT}\text{丙酮酸}+\text{L－谷氨酸}\\ \text{丙酮酸}+NADH+H^{+}\xrightarrow{LDH}\text{L－乳酸}+NAD^{+}\end{array}\right.$$

$$\left\{\begin{array}{l}\text{L－门冬氨酸}+\alpha\text{－酮戊二酸}\xrightarrow{AST}\text{草酰乙酸}+\text{L－谷氨酸}\\ \text{草酸乙酸}+NADH+H^{+}\xrightarrow{MDH}\text{L－苹果酸}+NAD^{+}\end{array}\right.$$

上述两组偶联反应中，NADH 的消耗量与标本中酶活性成正比，故可在NADH 特征吸收峰340nm 波长处监测其吸光度下降速率（△A／min），从而计算出ALT 或AST 活性。

【试剂】

1）试剂成分和在反应液中参考浓度（FCC 推荐）：①ALT 测定：Tris 缓冲液（pH7.15）100mmol／L，L－丙氨酸500mmol／L，α－酮戊二酸15mmol／L，NADH0.18mmol／L，乳酸脱氢酶1200U／L，磷酸吡哆醛（P－5′－P）0.1mmol／L。②AST 测定：Tros 缓冲

液（pH7.64）80mmol/L，L－门冬氨酸240mmol/L，α－酮戊二酸12mmol/L，NADH0.18mmol/L，苹果酸脱氢酶（MDH）1600U/L，乳酸脱氢酶2500U/L，磷酸吡哆醛0.1mmol/L。

（2）市售ALT或AST测定试剂盒底物液的复溶及保存可参照盒内说明书。原则上起始吸光度必须大于1.2；试剂空白测定值必须小于5U/L，可以用去离子水代替血清来进行酶活性测定。达不到要求，往往说明工具酶含有杂酶或NADH发生自发氧化，则该试剂不合格，不能再用。注意在报告结果时应扣去试剂空白测定值。

【操作】

根据不同的自动化分析仪品牌、型号及相应操作说明而设定。以下以半自动生化分析仪为例。

（1）血清稀释度：100μl血清，加1000μlALT或AST底物溶液，血清稀释倍数为11，血清占反应液体积分数为0.0909。

（2）主要参数：系数1746；孵育时间90s；连续监测时间60s；比色杯光径1.0cm；波长339nm；吸样量500μl；温度37℃。

【计算】

$$\text{ALT 或 AST 活性（U/L）} = \triangle A/\text{min} \times \frac{10^6}{6.3\times10^3\times1} \times \frac{1.1}{0.1} = \triangle A/\text{min} \times 1746$$

式中6.3×10^3为NADH在波长339nm处的摩尔吸光系数，NADH在340nm处的摩尔吸光系数为6.2×10^3。

（二）双试剂法

【原理】

同上。血清与无α－酮戊二酸的底物液先行混合5min，使样品中所含的α－酮酸（如丙酮酸）引起的干扰反应进行完毕，然后加入α－酮戊二酸启动ALT或AST的催化反应。

【试剂】

试剂成分及其在反应液中的参考浓度：①ALT测定：试剂Ⅰ包含pH7.3 Tris缓冲液100mmol/L，L－丙氨酸500mmol/L，NADH0.18mmol/L，乳酸脱氢酶1200U/L。试剂Ⅱ包含α－酮戊二酸15mmol/L。②AST测定：试剂Ⅰ包含pH7.8 Tris缓冲液80mmol/L，L－门冬氨酸240mmol/L，NADH0.18mmol/L，苹果酸脱氢酶420U/L，乳酸脱氢酶600U几。试剂Ⅱ包含α－酮戊二酸12mmol/L。

【操作】

血清100μl，加试剂Ⅰ1000μl，混匀，37℃温育5min。然后加试剂Ⅱ100μl，混匀，

30s 后在波长339nm 下连续监测吸光度下降速率约60s。比色杯光径1.0cm。具体操作参照不同生化仪。

【计算】

$$\text{ALT 或AST 活性 (U/L)} = \triangle A/\text{min} \times \frac{10^6}{6.3 \times 10^3 \times 1} \times \frac{1.2}{0.1} = \triangle A/\text{min} \times 1905$$

【注意事项】

(1) 血清室温放置48h，2～6℃放置7d，－20℃放置1 个月不影响酶活性。血清不宜反复冻融，以免影响酶活性。标本应避免溶血，否则红细胞内大量酶，尤其AST 释放人血清中，使检测结果偏高。

(2) 磷酸吡哆醛 (P－5′－P) 是氨基转移酶的辅酶，血清中存在的氨基转移酶主要是全酶形式，但少量是脱辅基蛋白，所以在反应底物液中加入P－5′－P 可以提高氨基转移酶的活性，提高程度AST 大于ALT。IFCC 在其参考方法中均主张加入P－5′－P。一般常规测定并不强求，这是由于健康人血清中P－5′－P 含量适中，再在底物中加P－5′－P 对增高酶活性作用并不显著，国内试剂盒中一般不加这一成分。

(3) 由于在磷酸缓冲液中NADH 易分解以及不利于P－5′－P 与脱辅基蛋白的结合，所以目前主张用Tris 缓冲液替代以前使用的磷酸缓冲液。

(4) 血清中存在的α－酮酸 (如丙酮酸) 也能消耗NADH；血清中谷氨酸脱氢酶 (GLDH) 活性较高时在有氨的条件下，可使α－酮戊二酸转化成L－谷氨酸，NADH 也随之发生氧化。这些干扰反应均可导致检测结果偏高。因此，在单试剂法中必须要有足量的LDH (如IFCC 规定1200U/L)，才能保证α－酮酸引起的干扰反应在规定的延迟期进行完毕。双试剂法因孵育时间长，能有效地消除干扰反应，因此，可适当地降低试剂中LDH 用量。由于双试剂法测定结果准确，为目前首选的测定方法。除严重肝病时GLDH 活性增高和血氨增高外，一般血清中氨的含量甚微，干扰不大。目前在苹果酸脱氢酶和LDH 储存液配制中均用甘油代替硫酸铵来进行稀释，目的也是为了排除氨可能引发的干扰反应。

二、赖氏终点比色法

【原理】

下述反应中的3 种酮酸均能与2，4－二硝基苯肼 (DNPH) 作用生成相应的苯腙。在碱性条件下3 种苯腙的吸收光谱曲线有差别，在波长500～520nm 处差异最大，其中丙酮酸苯腙最强，草酰乙酸苯踪次之，α－酮戊二酸苯腙最弱。因此，反应中生成的丙酮酸或草酰乙酸的量可以定量地反映血清中氨基转移酶的活性。

$$\text{L－丙氨酸＋α－酮戊二酸} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{丙酮酸＋L－谷氨酸}$$

L－门冬氨酸＋α－酮戊二酸 $\xrightarrow{AST}$ 草酰乙酸＋L－谷氨酸

【试剂】

1）0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）：含2 分子结晶水磷酸氢二钠11.928g，磷酸二氢钾2.176g，加入少量去离子水溶解并稀释至1L。

2）1mmol/L 2，4－二硝基苯肼溶液：DNPH19.8mg 用10mol/L 盐酸10ml 溶解后，加去离子水至100ml。保存于棕色瓶中备用，此液可保存3 个月。

3）0.4mol/L 氢氧化钠溶液。

4）2mmol/L 丙酮酸校准液：纯丙酮酸钠22.0mg 于100ml 容量瓶中，加0.05mol/L 硫酸溶液至刻度。丙酮酸不稳定，开封后易变质，相互聚合成为多聚丙酮酸。因此，建议使用质量可靠的商品化校准液。

5）底物缓冲液：①ALT 底物缓冲液（DL－丙氨酸200mmol/L，α－酮戊二酸2mmol/L）：DL－丙氨酸1.79g 和α－酮戊二酸29.2mg，先溶于约0.1mmol/L PBS50ml 中，用1mmol/L 氢氧化钠溶液（约0.5ml）调节至pH7.4，再加PBS 至100ml，置冰箱保存。可稳定2 周。加100g/L 麝香草酚乙醇溶液1ml 防腐，放4℃备用，最少可保存1 个月。②AST 底物缓冲液（DL－门冬氨酸200mmol/L，α－酮戊二酸2mmol/L）：DL－门冬氨酸2.66g 和α－酮戊二酸29.2mg 置于小烧杯中，加入1mmol/L 氢氧化钠溶液约1.5ml，溶解后加0.1mmol/L PBS 约80mL，用1mmol/L 氢氧化钠溶液调节至pH7.4，然后将溶液移人100ml 容量瓶中，用PBS 稀释至刻度，放置冰箱保存。

【操作】

1）按当天标本所需用量取测定用试剂（除氢氧化钠）置于37℃水浴预温5min，然后按表4－4－1 步骤操作。

表4－4－1　比色法测定ALT 或AST 操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管
待测血清	0.1	0.1
底物缓冲液	0.5	
混匀后37℃30min（AST 测定为60min）		
DNPH 溶液	0.5	0.5
底物缓冲液		0.5
混匀后37℃20min		
0.4mmol/L 氢氧化钠溶液	5.0	5.0

室温放置5min 比色，波长505nm ，去离子水调零点，读取吸光度，用测定管减去对照管吸光度，查标准曲线求ALT 或AST 的活性单位。

2） 校准曲线绘制：按表4 -4 -2 步骤操作。

表4 -4 -2　绘制ALT 或AST 测定校准曲线操作步骤

加入物 (ml)	对照	1	2	3
0.1mmol/L PBS	0.10	0.10	0.10	0.10
2mmol/L 丙酮酸校准液	0	0.05	0.10	0.15
ALT 或AST 底物缓冲液	0.50	0.45	0.40	0.35

上述各管各做3 份，放37 ℃水浴中5min ，加DNPH 溶液0.5ml ，以下操作与表4 -4 -1 同。从各管3 次吸光度均值减去对照管均值，根据所得差值与对应的酶活性卡门单位绘制曲线。其中对照、1 、2 、3 管的酶活性卡门单位分别为0 、28 、57 、97 (当底物液为ALT 时) 和0 、24 、61 、114 (当底物液为AST 时) 。

【注意事项】

1） 赖氏比色法套用卡门单位。卡门法即早期的酶偶联速率法测定。卡门单位定义如下：血清1ml ，反应液总体积3ml ，反应温度25 ℃，波长339nm ，比色杯光径1.0cm ，每分钟吸光度值下降0.001 为1 卡门单位 (相当于0.1608 μmol NADH 被氧化) 。

2） 两种酶测定除底物缓冲液、作用时间、酶单位不同外，其余均相同。AST 测定原来在酶作用后须加构橼酸苯胺，以使草酰乙酸全部转化为丙酮酸 (草酰乙酸本身在酸性条件下可自行脱羧生成丙酮酸，但并不完全) ，但多被省略，因此，如用草酰乙酸作校准曲线，更符合酶活性测定结果。

3） 基质中α-酮戊二酸也可与2 ，4 -二硝基苯肼作用生成苯腙而显色，为了减少对丙酮酸的干扰，基质中采用较低浓度a -酮戊二酸，因而影响了酶反应的充分进行。同时，为了降低空白管读数，显色剂中DNPH 浓度只有1mmol/L ，而作用物酮酸总和为2mmol/L ，这样，就有半量酮酸未能与DNPH 作用，从而酶活性只有在较小的范围内与丙酮酸的产量呈线性关系。所以当血清标本ALT 超过97 或AST 超过114 卡门单位时，应将血清用9g/L 氯化钠溶液稀释5 倍或10 倍后再进行测定。当酶活性较低时，由于空白管颜色深，测定管与对照管相差无几，测定结果准确性也较差。故测定AST 时反应时间应延长至60min ，以提高其灵敏度。

4） 除有溶血、脂血、黄疸的标本外，一般不需每个标本都作血清对照管，每10 个标本作一个对照即可；另外，每批试剂的空白管吸光度值上下波动不应超过0.015 ，

如超过此范围，应注意试剂及仪器等是否有问题。

5）在操作过程中应严格控制温度及反应时间；在成批测定时，特别要保证每管的酶反应时间。

【参考值】

连续临测法（U/L）：不加P-5′-P，ALT为5～40，AST为8～40；加P-5′-P，ALT为<45，AST为15～50。赖氏比色法（卡门单位）：ALT为5～25，AST为8～28。

【临床意义】

1）肝脏疾病：血清氨基转移酶是急性病毒性肝炎患者黄疸出现前最早出现的异常指标。黄疸型肝炎血清氨基转移酶活性增高阳性率可达100%，无黄疸型肝炎阳性率80%左右。慢性迁延性肝炎和活动性肝炎时，血清氨基转移酶活性轻度或中度升高。此外，血吸虫病、阿米巴肝病、肝癌、脂肪肝、中毒性肝炎、酒精性肝病、药物性肝炎等，均可出现血清氨基转移酶活性增高。

2）胆道梗阻：由于经胆汁排泄的血清氨基转移酶逆流或逆行性肠道感染，引起肝细胞损害，使血清氨基转移酶活性升高，但一般不超过400U/L。

3）其他疾病：能引起血清氨基转移酶增高的还有急性胰腺炎、消化性溃疡、肌肉疾病、肾梗死、影响肝脏的传染病（如疟疾、流行性出血热和钩端螺旋体病等）、全身感染、传染性单核细胞增多症、创伤、严重灼伤、使用某些抗凝药物以及心导管检查后。

4）血清AST/ALT比值对肝病的诊断意义：肝内AST绝对值超过ALT，正常人AST/ALT比值为1.15左右。可逆性肝细胞损伤时，仅从肝细胞浆内释出可溶性酶，若肝细胞严重损害坏死时，线粒体中酶也释放，可使AST/ALT比比值发生变化。急性肝炎早期，大部分ALT和胞浆部分AST被释出，使AST/ALT比值降至0.56左右；肝炎恢复期，比值逐渐上升至正常，但较氨基转移酶绝对值恢复时间要迟。肝硬化时此比值可增高至1.44。慢性活动性肝炎由于肝细胞坏死，此比值常高于正常。大部分肝癌患者临终前AST/ALT比值>1.5。

5）血清AST活性在心肌梗死发病后6～12h显著增高，48h达到高峰，约3～5d恢复正常。

6）一些药物和毒物可引起氨基转移酶活性升高，如氯丙嗪、异烟肼、奎宁、水杨酸制剂及乙醇、铅、汞、四氯化碳或有机磷等。

第二节　血清碱性磷酸酶测定

碱性磷酸酶（alkaline phosphate，ALP）特异性并不严格，其可催化多种磷酸酯水

解。底物不同，测得的各种ALP 的相对活性也有差异，必须注意分析。以下主要介绍目前普遍使用的连续监测法及比色法中最常用的磷酸苯二钠法。

一、连续监测法

【原理】

以对硝基酚磷酸盐（4－NPP）为底物，2－氨基－2－甲基－1－丙醇（AMP）为缓冲液，并且AMP 是磷酸根的受体，可促进酶促反应速率。4－NPP 在碱性溶液中为无色，在ALP 催化下，分裂出磷酸基团后产生游离的对硝基苯酚（4－NP），后者在碱性中转变成醌式结构，呈现较深的黄色。在波长405nm 处监测吸光度增高速率（△A／min），从而计算ALP 活性单位。

【试剂】

（1）1.8mol／L AMP 缓冲液（pH10.3）：AMP160g，加1mol／L 盐酸溶液320ml，混合，加约500ml 新煮沸（去二氧化碳）并已冷却至室温的去离子水，调节pH 至10.30±0.02（30℃），再以上述去离子水稀释至1L，置紧塞瓶中，防止吸收二氧化碳，放冰箱中保存（室温约可稳定2 个月）。

（2）10.5mmol／L 氯化镁储存液：氯化镁0.21g 溶于水中并稀释到100ml，室温稳定1 个月。

（3）31.5mmol／L4－NPP 溶液：磷酸对硝基苯酚二钠盐1.169g 溶于100ml 去离子水中，置棕色瓶内放冰箱保存。

（4）底物缓冲液（含0.84mol／L AMP，15mmol／L 4－NPP，0.5mmol／L 氯化镁，pH10.3）：根据当天测定标本的需要量，取1.8mol／LAMP 缓冲液10 份，31.5 mmol／L 4－Npp 溶液10 份和10.5mmol／L 氯化镁溶液1 份混合，置37℃预温待用。

【操作】

不同分析仪操作不同。以下以半自动分析仪为例作简要介绍。

（1）血清稀释度：血清0.02ml，加37℃预温底物缓冲液1.0ml，立即吸人分析仪。血清稀释倍数为51。

（2）主要参数：系数2756；孵育时间30s；连续监测时间60s；波长405nm；比色杯光径1.0cm；吸样量500μl；温度37℃。

【计算】

$$\text{ALP 活性（U／L）} = \triangle A/\text{min} \times \frac{10^6}{18500 \times 1} \times \frac{1.020}{0.20} = \triangle A/\text{min} \times 2756$$

式中18500 是4－NP 在0.84mol／LAMP 缓冲液（pH10.0，25℃）中的摩尔吸光系数。

【注意事项】

1）AACC 及IFCC 推荐的ALP 测定方法，原理基本与此类同，只是在Mg^{2+}及Zn_{2+}的浓度上利用特有络合物作为金属离子的缓冲剂进行控制，从而达到最适水平；酶促反应温度则设在（30±0.1）℃，因而酶活性的参考范围与本法有一定的差异。

2）ALP 的酶促反应为水解反应，如用某些醇胺类缓冲液，由于其可作为磷酸酰基的接受体，能提高催化速率。ALP 测定常用缓冲液分为惰性型、抑制型及激活型3 类，目前采用后者居多，使用激活型缓冲液的酶促反应速率较使用惰性型者高2～6 倍。

3）作为ALP 酶活性指示物的4－NP，在不同溶质中摩尔吸光系数不同。建议厂家或实验室各自测定其摩尔吸光系数，而文献介绍仅供参考。

4）底物4－NPP 必须达到如下标准：①酶水解转换率（4－NPP→4NP）须达到98％；②4－NPP 的摩尔吸光系数：311nm 波长，10mmol/L 氢氧化钠介质，25℃，ε＝（9867±762）$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$；③游离4－NP＜0.3mmol/mol 4－NPP；④无机磷酸盐＜10mmol/mol 4－NPP。

二、磷酸苯二钠终点法

【原理】

ALP 在碱性环境中作用于磷酸苯二钠，使之水解释放出酚和磷酸。酚在碱性溶液中与4－氨基安替比林（4－AAP）作用，经铁氰化钾氧化而成红色醌的衍生物。根据红色深浅确定ALP 的活性。

【试剂】

1）0.1mol/L 碳酸盐缓冲液（pH10.0）：无水碳酸钠6.36g，碳酸氢钠3.36g，加少量去离子水溶解并稀释至1L；加氯仿数滴防腐。

2）0.01mol/L 磷酸苯二钠底物液：磷酸苯二钠2.18g 溶于1L 去离子水中，此去离子水应迅

速煮沸以消灭微生物，迅速冷却后加氯仿4ml，置冰箱内备用（此液久放，可致空白管吸光度增加，故一次不宜配制过多）。

上述两液临用前等量混合，组成缓冲液－底物溶液，37℃预温3min。

3）酚校准贮存液（1g/L）：商品化校准液。若自行配制，需标化，配法是结晶酚（分析纯）1g 溶于0.1mol/L 盐酸溶液中使成1L 溶液。

4）酚校准应用液（0.1g/L）：根据酚贮存液浓度加去离子水稀释。此液只能保存2～3d。

5）碱性溶液：0.5mol/L 氢氧化钠溶液8ml 及0.5mol/L 碳酸氢钠溶液12ml 混合。

6）6g/L4－AAP 溶液：4－AAP0.6g 加去离子水至100ml，放棕色瓶内置冰箱保存。

7）24g/L 铁氰化钾溶液：取铁氰化钾2.4g，溶于去离子水中，加至100ml，存放

于棕色试剂瓶中。

【操作】

待测标本酶活性测定按表4－4－3步骤操作。混合后，波长500nm，以对照管调零，读取测定管吸光度值，查校准曲线，求得ALP活性金氏单位。

表4－4－3　终点法测定ALP操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管
待测血清	0.1	0.1
缓冲液－底物溶液	2.0	
37℃水浴15rain		
碱性溶液	2.0	2.0
缓冲液－底物溶液	2.0	
4－AAP溶液	1.0	1.0
铁氰化钾溶液	1.0	1.0

金氏单位定义：100ml血清在37℃，与底物作用15min后，产生1mg酚为1个金氏单位。

校准曲线绘制按表4－4－4步骤操作。混匀后，波长520nm，以空白管调零，读取各管吸光度值，并对酶活性单位绘制校准曲线。表中空白、1、2、3、4、5、6各管分别相当于0、5、10、20、0、40、0金氏单位。

表4－4－4　绘制ALP测定校准曲线操作步骤

加入物（ml）	空白管	1	2	3	4	5	6
碳酸盐缓冲液	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
酚校准应用液	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50
去离子水	1.00	0.95	0.90	0.80	0.70	0.60	0.50
			37℃水浴15min				
碱性溶液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
4－AAP溶液	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
铁氰化钾溶液	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

【注意事项】

1）按上述顺序加入各试剂，且每加一种试剂立即混匀后再加下一试剂。

2）常用试剂空白代替血清对照管。用试剂空白管可以检查底物是否分解，当吸光度增高溶液呈红色时，底物就不能使用。当血清有严重溶血或黄疸时，可做一血清对照。

【参考值】

连续监测法（U/L）：男性<12岁：<500，12～15岁：<750，>25岁：40～150；女性<15岁：500，>15岁：40～150。

磷酸苯二钠终点法（金氏单位）：成年人：3～13，儿童：5～28。

【临床意义】

1）黄疸鉴别诊断：阻塞性黄疸时，ALP活性可大幅度升高（常常大于30金氏单位）且先于黄疸出现之前出现。若血清ALP活性持续降低，则阻塞性黄疸的可能性很小。肝细胞性黄疸时，ALP活性常在30金氏单位以下，溶血性黄疸时，ALP活性一般正常或轻度增高。

2）肝癌：原发性肝癌患者血清ALP活性可升高，尤其转移性肝癌患者。

3）骨病：畸形性骨炎、佝偻病、骨软化，甲状旁腺功能亢进、骨质愈合、成骨肉瘤和肿瘤的骨转移等，均可引起血清ALP活性升高。

4）某些药物，如氯丙嗪、砷剂、甲基睾丸酮、口服避孕药和某些抗生素（例如四环素）等可引起肝内胆汁淤积，使血清ALP活性升高。若长期使用这些药物，应定期测定血清ALP，如有升高，应立即停药。

不同ALP活性增高程度见于下列情况：显著增高（达正常5倍以上）见于胆道阻塞（肝内或肝外）、胆汁性肝硬化、变形性骨病（佩吉特病）、成骨肉瘤、甲状旁腺功能亢进症；中度升高（达正常3～5倍）见于肝脏肉芽肿、传染性单核细胞增多症、骨转移瘤、代谢性骨病（如佝偻病、骨软化）；轻度增高（达正常3倍以下）见于病毒性肝炎、肝硬化（经常存在肠型同工酶）、正在愈合的骨折、妊娠（胎盘同工酶为主）、儿童生长期。

第三节　血清酸性磷酸酶测定

酸性磷酸酶（acid phosphatase，ACP）测定方法中，除底物pH值不同外，其它与ALP测定基本相同。以下只介绍对前列腺ACP特异性较高的磷酸麝香草酚酞法。

磷酸麝香草酚酞终点法

【原理】

ACP 在酸性条件下，可使磷酸麝香草酚酞水解成无色的磷酸盐和麝香草酚酞色素，后者加碱后变成蓝色，在一定范围内其色度与酶活性成正比。

【试剂】

1） 底物液：枸橼酸三钠2.94g、磷酸麝香草酚酞铵盐400mg 溶解于去离子水80ml 中，用1mol/L 盐酸溶液校正pH 为6.0，再加入5%Tween -80 溶液2ml，最后以去离子水稀释至100ml，盖紧，置冰箱可保存2 个月。

2） 显色剂：氢氧化钠2g、碳酸钠5.3g 溶解于去离子水中，加入甲醛10ml，用去离子水稀释至1L。

3） 麝香草酚酞储存校准液（10μmol/L）：麝香草酚酞（经100℃烘干2h，置干燥器内保存）430.5mg，用少量无水乙醇溶解并稀释至100ml，混匀。置密封瓶内保存。

4） 麝香草酚酞应用校准液（0.15μmol/L）：麝香草酚酞储存液1.5ml，加入100ml 容量瓶内，用无水乙醇稀释至100ml，置冰箱保存。

【操作】

1） 待测标本酶活性测定按表4-4-5 步骤操作。混匀后在590nm 波长处比色，以空白管校正零点，读取各管吸光度值。

表4-4-5　磷酸麝香草酚酞终点法测定ACP 操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
待测血清	0.2		
麝香苹酚酞应用校准液		0.2	
去离子水			0.2
底物液	0.5	0.5	0.5
	37℃水浴30min		
显色剂	5.0	5.0	5.0

单位定义：1L 血清在37℃与底物作用1min 产生1μmol 麝香草酚酞为1U。

【计算】

$$\text{ACP 活性（U/L）}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times 0.15\times 0.2\times\frac{1000}{0.2}\times\frac{1}{30}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times 5$$

【注意事项】

1） 因红细胞及血小板中富含ACP，故应尽快分离血清，溶血标本不可用。

2） 血清置室温中1～2h，ACP 活性至少降低50%，如不能立即测定，应加入5mol/L 醋酸或枸橼酸溶液（每毫升血清加入约50μl）使pH 值降至近5.4，室温可稳定

数小时，冰箱内可稳定1 周。

【参考值】

0.2 ～0.9U／L。

【临床意义】

1） 前列腺癌变范围超过被膜的1／3 ～1／2 时，患者血清ACP 活性增加，如病变没有超过被膜，则ACP 活性仍可在正常范围。良性前列腺肥大在剧烈按摩后，ACP 活性可呈一过性升高。

2） 畸形性骨炎、粒细胞白血病、真性红细胞增多症和特发性血小板减少性紫癜患者亦可见血清ACP 活性增高。

第四节　血清L －γ－谷氨酰转移酶测定

血清L －γ－谷氨酰转移酶 （L －r －glutamal transferasE，GGT） 活性测定方法以前常用的是1969 年由Szasz 介绍的对硝基苯胺法，由于其底物在水中溶解度较小，限制了它的使用。目前该底物的衍生物 （L －γ－谷氨酰－3 －羧基－4 －硝基苯胺） 分子中具有羧基，溶解度增大，容易配制底物溶液，同时不存在明显的非酶促水解，所测得GGT 活性较高，已逐渐取代了前者。本节在连续监测法中，仅介绍以后者为底物的方法。

一、连续监测法

【原理】

GGT 催化底物液中L －γ－谷氨酰－3 －羧基－对硝基苯胺裂解为2 －硝基－5 －氨基苯甲酸和谷氨酰基，后者为受体甘氨酰甘氨酸 （双甘肽） 所捕获，游离的2 －硝基－5 －氨基苯甲酸呈黄色，可引起波长405 ～410nm 处吸光度的增高。其增高速率 （△A／min） 与GGT 活性成正比。

【试剂】

试剂成分及其在反应液中的参考浓度：Tris －盐酸缓冲液110mmol／L，L －γ－谷氨酰－3 －羧基－对硝基苯胺6mmol／L，双甘肽110mmol／L，pH8.1。

【操作】

不同仪器具体操作不同，以下方法仅供参考。

1） 血清稀释度：血清0.1ml 加37℃预温的底物缓冲液1.0ml，立即吸人半自动分析仪，按已编程序反应。

2） 主要参数：系数1159；孵育时间30s；监测时间60s；比色杯光径1.0cm；波长

405nm ；吸样量500μl ；温度37℃。

【计算】

$$GGT\ 活性\ (U/L) = \triangle A/min \times \frac{10^6}{9490} \times \frac{1.1}{0.1} = \triangle A/min \times 1159$$

式中9490 为2 －硝基－5 －氨基苯甲酸在波长405nm 处的摩尔吸光系数。

【注意事项】

1） 采用含羧基底物比不含羧基底物所测得的结果高。为了使两者所测结果相近，便于比较，有些试剂盒中有意降低含羧基底物的浓度，请注意分析。

2） 由于各仪器的性能与精度有差异，2 －硝基－5 －氨基苯甲酸的摩尔吸光系数亦不同，如试剂盒与仪器不配套使用，建议各实验室自行测定。

二、谷氨酰萘胺终点法

【原理】

GGT 催化γ－谷氨酰－α－萘胺发生转移反应，谷氨酰基为受体双甘肽所捕获，释放出α－萘胺与重氮试剂作用，生成红色的α－萘胺偶氮苯磺酸，其显色程度与酶活性呈正比。

【试剂】

1） 150mmol/L Tris 缓冲液 （pH8.0 ，25℃）：Tris 9.1g ，双甘肽3.96g ，溶于400ml 去离子水中，再加去离子水至500ml ，加少许氯仿防腐，置冰箱保存。

2） 底物缓冲液 （pH7.8 ～7.9 ，37℃）：L －γ－谷氨酰－α－萘胺 （无结晶水，相对分子质量272.3）217mg ，置于小烧杯中，加入1mol/L 盐酸溶液约4ml ，使完全溶解，再加入上述Tris 缓冲液90ml ，于25℃用1mol/L 盐酸溶液调节至pH8.0 ±0.1 ，然后加水至100ml 。此底物含L －γ－谷氨酰－α－萘胺8mmol/L ，双甘肽54mmo/L 。

3） 显色剂：1g/L 亚硝酸钠水溶液4ml ，加2g/L 对氨基苯磺酸乙酸溶液 （含20 % 醋酸） 100ml ，充分混匀，当天配用。

4） 1.5mmol/Lα－萘胺校准液：取α－萘胺214.8mg 溶于50ml 无水乙醇，加去离子水至1L ，置棕色瓶中，冰箱保存。临用前取相应量以底物缓冲液1 ：10 稀释成0.15mmol/L 。

【操作】

1） 待测标本酶活性测定按表4 －4 －6 步骤操作。放置10min ，波长530nm 处以对照管调零，读取测定管吸光度值，查校准曲线求酶活性。

表4－4－6　谷氨酰萘胺终点法测GGT 操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管
待测血清	0.05	
37℃预温底物缓冲液	0.5	0.5
37℃水浴，准确15min		
显色剂	5.0	5.0
血清		0.05

2）校准曲线的绘制按表4－4－7 步骤操作。放置10min，在530nm 波长处以对照管调零点，读取各管吸光度值，绘制成校准曲线。上述1、2、3、4、5、对照各管分别相当于GGT 活性20、40、60、80、100、U/L。

表4－4－7　绘制GGT 测定校准曲线操作步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	5	对照
α－萘胺校准液	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0
底物缓冲液	0.40	0.30	0.20	0.10	0	0.50
去离子水	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
显色剂	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

【注意事项】

1）该法应注意底物溶液中γ－谷氨酰－α－萘胺的水解，不能采用加热溶解。如果对照管吸光度值大于0.08，说明底物已有一定水解，应对其重结晶以除去游离α－萘胺，因为后者对酶活性有抑制作用。

2）缓冲液种类不同，酶反应最适pH 值也不同，已证明用Tris 缓冲液（pH8.0，25℃）时，酶活性最大。在用不同底物缓冲液时，酶活性参考值范围存在着差异，应注意。

【参考值】

连续监测法：男性11～50U/L，女性7～32U/L；谷氨酰萘氨终点法：男性3～17U/L，女性2～13U/L。

【临床意义】

1）GGT 活性改变对于肝胆系统疾病诊断具有一定的价值。在阻塞性黄疸、胰腺疾病和肝癌患者，GGT 活性明显升高。但肝细胞病变时，反映病变的敏感性GGT 不如

AST 和ALT。急性病毒性肝炎患者处于氨基转移酶活性上升高峰期，GGT 活性也可轻度升高；在肝炎恢复期，GGT 是唯一升高的酶，提示肝炎尚未痊愈；慢性活动性肝炎患者的GGT 活性可高于正常1～2 倍。如血清GGT 长期升高，提示有肝坏死倾向。非活动期肝硬化患者的GGT 活性多正常。原发性或继发性胆汁性肝硬化，往往在早期就有GGT 活性升高。酒精性肝病患者的GGT 活性几乎均升高。嗜酒者血清GGT 活性也常常升高，但戒酒2～3 周后可恢复正常。

（2）长期接受某些药物如苯巴比妥、苯妥英钠治疗者，血清GGT 活性也常常升高，口服避孕药会使GGT 活性增高20％。

第五节　血清乳酸脱氢酶测定

乳酸脱氢酶（actate dedrogenase，LD）活性测定常用的有终点法及连续监测法。前者由于测定步骤多、准确性低，已逐渐被后者替代。

一、连续监测法

LD 的正向反应和逆向反应均可用于LD 活性的测定。根据正向反应建立的连续监测法是以L－乳酸盐和NAD 为底物，在波长340nm 处监测吸光度增高速率（△A／min），简称LD－L 法。根据逆向反应所建立的测定是以丙酮酸和NADH 为底物，在波长340nm 处监测吸光度下降速率（△A／min），简称LD－P 法。LD－L 法的主要优点有：①底物抑制较小；②NADH 制品中对LD 的抑制物较多；而NAD 制品中则无；③线性时间长。而LD－P 法的主要优点是所配试剂浓度低，因而费用可减少。目前临床上主要用LD－L 来测LD 活性。

（一）LD－L 法

【原理】

$$\text{L－乳酸}+\text{NAD}^{+}\xrightarrow{\text{LD}}\text{丙酮酸}+\text{NADH}+\text{H}^{+}$$

反应中NAD＋还原为NADH，导致波长340nm 处吸光度增高，增高速率与标本中LD 活性成正比。

【试剂】

试剂成分在反应液中的参考浓度如下：pH（反应混合液37℃）9.3±0.05；N－甲基－D－葡胺325mmol／L；L－乳酸锂50mmol／L；NAD（酵母）10mmol／L。

【操作】

不同仪器操作不同，以下按半自动分析仪设定。

1）血清稀释度：血清0.15ml，加37℃预温底物应用液3.15ml，立即吸入半自动分析仪，按已编程序测定反应速率。

2）主要参数：系数3333；孵育时间30s；连续监测时间60s；比色杯光径1.0cm；波长339nm；吸入反应液0.5ml；温度37℃。

【计算】

$$\text{LD 活性（U/L）} = \triangle A/\text{min} \times \frac{10^6}{6.3 \times 10^3 \times 1} \times \frac{3.15}{0.15} = \triangle A/\text{min} \times 3333$$

【注意事项】

1）血清标本存放在室温下，2～3d 不会出现活性丧失。如果血清标本必须保存较长时间，应加入NAD（10mg/ml）或谷胱甘肽（3.1mg/ml）后保存于4℃，可阻止LD_4和LD_5在冷藏时丧失活性。

2）由于红细胞和白细胞内LD 含量较高，故标本绝对不能溶血。

（二）LD—P 法

$$\text{丙酮酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LD}} \text{L－乳酸} + \text{NAD}^+$$

反应中NADH 的消耗代表酶反应速度，故可通过测定在波长340nm 处吸光度值下降速率反映酶活性。

【试剂】

1）Tris－EDTA 缓冲液（pH7.4，37℃）：Tris 6.8g（56mmol/L）和EDTA 二钠2.1g（5.6mmol/L），溶于900ml 去离子水中，温热至37℃，用1mol/L 盐酸溶液（约47ml）调节pH7.4，再加水至1L。在4℃棕色瓶保存，可稳定6 周。

2）0.2mmOl/LNADH 溶液：NADH14.2mg 溶于Tris－EDTA 缓冲液100ml 中，4℃密封棕色瓶内至少可稳定72h。

3）14mmol/L 丙酮酸溶液：154mg 丙酮酸钠溶于100ml 去离子水中，在密封瓶4℃下保存，可稳定20d。

【操作】

血清50μl 和NADH 溶液2.0ml 混匀，37℃预温5～15min（消除标本中内源性α－酮酸对NADH 消耗的影响）。再加入丙酮酸溶液0.2ml（已预温），混匀，37℃，比色杯光径1.0cm，339nm 波长处连续检测，求得吸光度下降速率。

【计算】

$$\text{LD 活性（U/L）} = \triangle A/\text{min} \times \frac{10^6}{6.3 \times 10^3 \times 1} \times \frac{2.25}{0.05} = \triangle A/\text{min} \times 7143$$

【注意事项】

1）由于LD 催化的逆向反应速度比正向反应速度快，本法参考范围与LD －L 法也有差别，约为其2 倍。

2）本法线性约达3000U／L（37 ℃），如超过此水平，则被测标本需用测定用缓冲液稀释10 倍再进行测定。

3）是否必要以预温来消除内源性酮酸对检测结果的影响，各实验室可根据自己的情况而定。

二、终点法

【原理】

以NAD 作为递氢体，LD 可使乳酸脱氢生成丙酮酸，后者与2，4 －二硝基苯肼（DNPH）作用生成丙酮酸二硝基苯腙，后者在碱性溶液中显棕红色，颜色的深浅与丙酮酸的浓度成正比。由此可以推算出LD 的活性单位。

【试剂】

1）底物缓冲液（含0.3mol／L 乳酸锂，pH8.8）：二乙醇胺2.1g，乳酸锂2.9g，加去离子水约80ml，以1mol／L 盐酸溶液调节至pH8.8，加水至100ml。

2）11.3mmol／LNAD 溶液：NAD15mg，溶于2ml 去离子水中，冰箱保存，可用2 周。

3）1mmol／LDNPH 溶液：DNPH198mg，加10mol／L 盐酸溶液100ml，待溶解后加去离子水至1L。贮于棕色瓶内，放冰箱可用半年。

4）0.4mol／L 氢氧化钠溶液。

5）0.5mmol／L 丙酮酸校准液：取丙酮酸钠11.0mg，置于200ml 容量瓶中，以底物缓冲液溶解并稀释至刻度。应新鲜配制。

【操作】

1）酶活性测定：按表4 －4 －8 步骤操作。室温放置5min，在波长440nm 处以去离子水调零，读取两管吸光度值，以测定管吸光度值减去对照管吸光度值查校准曲线，求LD 活性。

表4 －4 －8　终点法测定LD 操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管
待测血清	0.01	0.01
底物缓冲波	0.5	0.5
	37 ℃水浴5min	
NAD 溶液	0.1	

续表

加入物（ml）	测定管	对照管
	37℃水浴5min	
DNPH 溶液	0.5	0.5
NAD 溶液	0.1	
	37℃水浴5min	
0.4mol/L 氢氧化钠溶液	5.0	5.0

（2）校准曲线绘制：按表4-4-9 步骤操作。波长440nm 处以空白管调零，读取各管吸光度值绘制曲线。其中空白、1、2、3、4、5 各管相当于LD 活性分别为0、125、250、500、750、1000 金氏单位。

表4-4-9　绘制LD 测定校准曲线操作步骤

加入物（ml）	空白管	1	2	3	4	5
丙酮酸校准液	0	0.025	0.05	0.10	0.15	0.20
底物缓冲液	0.5	0.475	0.45	0.40	0.35	0.30
去离子水	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
DNPH 溶液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
37℃水浴15min						
0.4mol/L 氢氧化钠溶液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

（3）金氏单位定义：100ml 血清在37℃作用15min 生成1μmoL 丙酮酸为1 金氏单位。

【注意事项】

（1）比色应在5～15min 内完成，否则吸光度将下降。

（2）溶血标本不能用于测定；测定结果高于2500 金氏单位时，应稀释后再测定。

【参考值】连续监测去：LD-L 法：109～245U/L，LD-P 法：200～380U/L，终点法：190～437 金氏单位。

【临床意义】

（1）诊断心肌梗死：发病12～24h 血中LD 活性即开始上升，48～96h 达到高峰，10～14d 恢复正常，高峰平均值为正常的2～4 倍。对发病已数天，AST 已恢复正常的患者，LD 测定仍有较大意义。

（2）其他疾病：在充血性心力衰竭、巨幼细胞贫血、溶血性贫血、白血病、癌症、

进行性肌营养不良、黏液性水肿、胰腺炎和肺梗死等患者，血清LD 活性均可升高，其中巨幼细胞贫血患者升高尤为明显。

3）肝脏损害：任何原因致使肝细胞损害均可引起血清LD 活性升高。肝癌时血清LD 活性明显升高，通常原发性肝癌多在1000U/L 以内，而转移性肝癌可达1000U/L 以上。

4）鉴别浆膜腔积液性质：同一患者LD 活性在胸腹水与血清中的比值如大于0.6，往往提示为渗出液，小于0.6 则为漏出液。某些肿瘤及类风湿疾病所致胸膜腔积液LD 活性往往升高。

5）脑脊液中LD 活性改变可诊断脑部疾病：蛛网膜下腔出血及脑血管血栓形成并出血患者脑脊液中LD 活性升高。脑或脑膜肿瘤患者LD 活性不升高，而原发于其它部位的肿瘤转移人脑者LD 活性可升高。

第六节　血清乳酸脱氢酶同工酶测定

分离测定LD 同工酶有电泳法、选择性化学抑制法、离子交换层析法、免疫沉淀法等。目前首选的依然是电泳法。选择性化学抑制法是用相应浓度的1，6－己二醇（100mmol/L）、高氯酸钠（25mmol/L）或硫氰酸胍（90mmol/L）选择性抑制除LD_1 外的所有同工酶，然后测定LD_1，其结果与电泳及免疫沉淀法相关性良好。同时由于其检测方法简便、快速，已有取代电泳法的趋势。具体方法可参阅相关试剂说明及参考文献。以下仅介绍目前常用的琼脂糖电泳法。

【原理】

用琼脂糖作为支持物，电泳分离LD 同工酶，用显色剂显色，再用光密度扫描仪测定各LD 组分的百分比及其含量。其反应式如下：

$$\text{乳酸}+NAD^+ \xrightarrow{LD} \text{丙酮酸}+NADH+H^+$$

$$NADH+H^++PMS \longrightarrow NAD^++PMSH_2$$

$$PMSH_2+INT \longrightarrow PMS+INTH_2 \quad (\text{紫红色化合物})$$

式中PMS 为酚嗪二甲酯硫酸盐，INT 为氯化碘代硝基四唑。

【试剂】

1）pH8.6 巴比妥缓冲液（μ=0.075）：巴比妥钠15.458g，巴比妥2.768g，溶于去离子水，加热助溶，冷后去离子水稀释至1L。

2）pH8.2 巴比妥－盐酸缓冲液（0.082mol/L）：巴比妥钠17.0g，溶于去离子水，加1mol/L 盐酸溶液24.6ml，去离子水稀释至1L。

3）10mmol/LEDTA 钠盐溶液 EDTA 钠盐372mg，溶于去离子水中，稀释至100ml。

4）5g/L 琼脂糖凝胶：琼脂糖0.5g，加入50ml 0.082mol/L 巴比妥－盐酸缓冲液，再加入1.2ml 10mmol/L EDTA 钠盐溶液及去离子水48.8ml，隔水煮沸溶解，摇匀，分装于大试管中，待冷后置冰箱备用。

5）8g/L 琼脂糖凝胶：0.8g 琼脂糖加入50ml 0.082mol/L 巴比妥－盐酸缓冲液，再加入10mmol/L EDTA 钠盐溶液2ml 及去离子水48ml。其余配法同上。

6）底物－显色液：①DL－乳酸溶液：85%乳酸2ml，用1mol/L 氢氧化钠溶液（约23.6ml）调至中性。②1g/L 酚嗪二甲酯硫酸盐溶液：50mg 酚嗪二甲酯硫酸盐加去离子水50ml 溶解。③10g/LNAD 溶液：100mg NAD^+溶于10ml 去离子水中。④1g/L 氯化碘代硝基四唑溶液：30mg 氯化碘代硝基四唑，溶于30ml 去离子水中。上述试剂分别贮于密封棕色瓶，4℃保存，除NAD 外，可保存3 个月以上。⑤底物－显色液：将上述试剂取①4.5ml＋②1.2ml＋③4.5ml＋④12.0ml（合计22.2ml），临用前组合混匀。

7）固定洗脱液：按乙醇水醋酸＝14∶5∶1 或95%乙醇醋酸＝98∶2 比例的混合液。

【操作】

1）琼脂糖玻片制备：取已分装5g/L 琼脂糖一管沸水浴加热融化，7.5cm×2.5cm 玻片约需1.2ml 凝胶液，均匀平铺待冷却凝固，然后在凝胶板阴极端约1.0～1.5cm 处挖槽，用滤纸吸去槽中水分。

2）加样：用微量进样器加约40μl 待测血清于槽中。

3）电泳：电压75～100V，电流8～10mA/片，电泳时间30～40min，待血清白蛋白部分泳动3～4cm 即可。

4）显色：电泳结束前5～10min，将底物－显色液与沸水浴融化的8g/L 琼脂糖凝胶按4∶5 比例混合成显色凝胶液。避光在50℃水浴中存放备用。

琼脂糖玻片在电泳结束后置铝盒，立即用滴管吸取显色凝胶液约1.2ml，使其自然铺展覆盖于玻片上。凝固后，加盖避光，37℃水浴中保温1h。为保证盒内温度，须让铝盒浮于水面。

5）固定和洗脱：已显色的琼脂糖玻片浸入固定洗脱液中20～40min，至背景完全脱去黄色为止，去离子水中漂洗多次，每次10～15min。

6）LD 同工酶区带观察和百分定量：①目视观察比较并描述：比较LD 各同工酶区带呈色强度，并作描述。②光密度扫描求百分比：按仪器操作说明在波长570nm 处对琼脂糖玻片进行光密度扫描，求各同工酶所占的百分比。③在无光密度扫描仪条件下，可将各同工酶区带用小刀切开，分别放人试管中，加400g/L 尿素溶液4ml，试管置于沸水中，加温5～10min，取出冷却后，在570nm 波长处以空白凝胶管（取大小相同但无同工酶区带的凝胶用尿素溶解制成）调零后比色，根据各管吸光度值之和，计算各同工酶的

构成比。

【计算】

$$某同工酶构成比=\frac{该同工酶吸光度值}{各管吸光度值之和}$$

【注意事项】

(1) 血清标本在室温条件下，可保存2～3d，低温保存易致LD_4、LD_5失活。溶血标本禁用。

(2) LD_4、LD_5，尤其LD_5对热敏感，酚嗪二甲酯硫酸盐对光敏感，所以底物－显色液不宜超过50℃，并需避光，否则可导致LD_4、LD_5变性失活，或显色后琼脂糖背景加深。

【参考值】

各实验室间参考值差异较大，以下范围仅供参考：LD_2（0.35～0.44）＞LD_1（0.24～0.34）＞LD_3（0.19～0.27）＞LD_4（0.03～0.8）＞LD_5（0～0.5）。

【临床意义】

(1) 诊断心肌梗死：95%的心肌梗死患者LD_1/LD_2超过正常，致使LD同工酶谱呈现$LD_1>LD_2>LD_3>LD_4>LD_5$。因而一些学者主张以$LD_1/LD_2>1$作为诊断急性心肌梗死的特异指标。LD_1升高还可见于急性心肌炎、心包炎、溶血性贫血、白血病和淋巴瘤。值得注意的是，心肌损害发生后LD_1百分比加大可早于血清总的LD活性升高。

(2) 急性肝炎或肝癌时LD_5百分比增高超过LD_4，阻塞性黄疸时LD_4和LD_5百分比均增高，但LD_4更显著。

(3) 充血性心力衰竭失代偿期、肌肉大面积损伤时LD_5百分比增高。

第七节　血清α－羟丁酸脱氢酶测定

LD同工酶中含H亚单位比例较高者，如LD_1及LD_2，其与α－酮丁酸的亲和力比丙酮酸更大，用该底物测定的酶活性特称为α－羟丁酸脱氢酶（α-hydroxybutyrate dehydrogenase，α-HBD）活性，基本代表了LD_1及LD_2的活性。α-HBD主要存在于心肌内，肝细胞内含量很少。当心肌受损时，血清中α-HBD活性升高。

【原理】

α－酮丁酸被α-HBD催化还原成α－羟丁酸，NADH随之也氧化成NAD^+，氧化速率与该酶活性成正比。可通过波长339nm处监测NADH被氧化的速率（10A/min）计算酶活性。

【试剂】

有商品化试剂供应，也可自行配制。

1）67mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.2，30℃）：9.47g 磷酸氢二钠溶于去离子水，稀释至1L；9.08g 磷酸二氢钾以去离子水配制成1L；前液180ml 加后液70ml 混合即成。

2）71mmol/L α-酮丁酸溶液：22mgα-酮丁酸钠盐溶入2.5ml 磷酸盐缓冲液中，在0～4℃条件下可稳定3 个月。

3）220μmol/L NADH 溶液：NADH 钠盐7.6mg，溶于50ml 磷酸盐缓冲液。临用前配制。

【操作】

按不同自动化分析仪操作说明进行。半自动分析仪操作如下：

1）取血清0.05ml，加入NADH 溶液2ml，放入37℃水浴平衡10～15min，完成NADH 的非特异性氧化反应。

2）加入预温至37℃的α-酮丁酸0.1ml，充分混匀后立即倾入37℃恒温比色杯中，进行监测。波长339nm，比色杯光径1.0cm。

【计算】

$$\alpha\text{-HBD 活性（U/L）}=(10A/\text{min})\times\frac{10^6}{6.3\times10^3\times1}\times\frac{2.15}{0.05}=(10A/\text{min})\times6825$$

【注意事项】

1）红细胞中α-HBD 含量高，标本采集后在2h 内分离血清。溶血标本不能用。4℃条件下酶活性稳定不少于7d。

2）如(10A/min)>0.08，用磷酸盐缓冲液稀释血清5～10 倍后重测。

3）本法为1980 年英国临床化学协会推荐的连续监测法。除此以外，以前常用终点法来进行α-HBD 活性的测定。其原理如下：α-酮丁酸经α-HBD 作用后剩余的部分溶液与2，4-二硝基苯肼反应，形成α-酮丁酸苯腙，后者在碱性溶液中呈棕色，其颜色深度或溶液吸光度与酶活性成反比。由于心肌酶谱是急诊测定项目，常用连续监测法在自动生化仪上测定，所以终点法在此不作介绍。

【参考值】

72～182U/L。

【临床意义】

诊断心肌疾病：急性心肌梗死时，HBD 波动幅度与AST 相似，发病2～3d 时活性达到高峰，11～16d 后恢复正常。HBD 有助于心肌梗死的预后估计，血清HBD 超过750U/L 者预后不良。此外，HBD 升高还见于心肌炎患者。肝病患者HBD 不升高，急性心肌梗死患者HBD/LD>0.8，肝病患者HBD/LD<0.6，而正常人约为0.67，故当LD 活

性升高而难以确定为心肌梗死或肝病时，测定HBD 有助于鉴别。但这些数值与HBD 和LD 各自的测定方法或条件有关，各实验室应根据具体的情况加以调整。

第八节　血清肌酸激酶测定

肌酸激酶（creatine kinase，CK）测定方法有终点法、连续监测法、荧光法和生物发光法等，可以测定正向反应物，也可以测定逆向反应物。因逆向反应的速度较快，酶敏感性较高，成为目前国内推荐的主要方法。

一、连续监测法

【原理】

$$\text{磷酸肌酸} + \text{ADP} \xrightarrow{CK} \text{肌酸} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{葡萄糖} \xrightarrow{HK} \text{葡萄糖—6－磷酸} + \text{ADP}$$

$$\text{葡萄糖—6－磷酸} + \text{NADP}^{+} \xrightarrow{G6PD} \text{6－磷酸葡萄糖酸内酯} + \text{NADPH} + \text{H}^{+}$$

上述酶偶联反应中，生成NADPH 在波长339nm 处有特异吸收峰。在该波长处监测其吸光度增加速率即可求得CK 活性。

【试剂】

（1）128mmol/L 咪唑醋酸缓冲贮存液（pH8.0，25℃）：溶解8.27g 咪唑于950ml 去离子水中，然后加0.95gEDTA 钠盐及2.75g 醋酸镁。待完全溶解后，以1mol/L 醋酸溶液调pH 至8.0（25℃），稀释成1L。该液在4℃下可稳定2 个月。

（2）应用试剂I：在90ml 缓冲贮存液中，加98mgADP，211mgAMP，1.1mg 二腺苷五磷酸，414mg 葡萄糖，181mgNADPH 二钠盐及375mg N－乙酰半胱氨酸（NAC），用1mol/L 醋酸溶液调节至pH6.7（30℃）。再加260～290U 的HK 及175U 的G6PD，以去离子水稀释至100ml。此液配制后，在波长340nm 处的吸光度值应小于0.35。该液在6℃可稳定5d，室温稳定30h。其中各种试剂成分最终浓度如下：

咪唑115.0mmol/L；EDTA 二钠2.3mmol/L；醋酸镁11.5mmol/L；NAC23.0mmol/L；ADP2.3mmol/L；AMP5.8mmol/L；二腺苷五磷酸11.5μmol/L；D－葡萄糖23.0mmol/L；NADP2.3mmol/L；HK4000U/L；G6PD2300U/L；pH 在37℃时为6.5，在25℃时为6.7。

（3）应用试剂II（磷酸肌酸溶液345mmol/L）：1.25g 磷酸肌酸二钠盐溶于去离子水并稀释至10ml，此液制备后在波长340nm 处吸光度应小于0.15，贮存于4℃，稳定3 个月。

【操作】

以半自动分析仪为例。

1）取血清0.1ml，加入应用试剂I2ml，混合，放入37℃水浴至少5min。

2）加入预温至37℃应用试剂II0.2ml，充分混匀，立即倾入37℃恒温比色杯（光径1.0cm）。经120s的延迟期后，在波长339nm处连续记录吸光度的改变（ΔA/min），用反应速率线性部分计算CK的活性。

【计算】

$$CK\ 活性\ (U/L) = (\Delta A/min) \times \frac{10^6}{6.3 \times 10^3 \times 1} \times \frac{2.3}{0.1} = (\Delta A/min) \times 3651$$

【注意事项】

1）本法是在Oliver最初建立的方法上经Rosalki及Szase等几位学者发展改良而成。由于测定时存在较多的干扰，所以反应混合液中很多成分是用来消除这些影响的。例如：二腺苷五磷酸和AMP主要用来抑制样品中腺苷酸激酶的活性。后者能催化ADP生成ATP，导致CK活性假性增加。NAC的加入用于激活和稳定CK。EDTA则是为了消除Ca^{2+}对Mg^{2+}的竞争抑制，同时又防止NAC被二价离子催化发生的氧化，有利于试剂的稳定。

2）试剂空白吸光度变化速率（ΔA/min）应小于0.001，即小于3.7U/L。

3）本法线性范围可达3000U/L，如样品活性太高需9g/L氯化钠溶液稀释。稀释2倍可使CK线性范围随之增大10%。这是由于血清中的内源性抑制剂可随稀释而减少的缘故。所以有人主张用已知CK活性正常的血清做稀释剂。

4）测定样品最好用血清，轻度溶血不影响测定。CK活性对温度比较敏感，所以标本采集后应尽快冰箱冷藏。同时由于它易受日光及pH值升高的影响而失活，标本宜避光及密闭保存。

5）本法条件未达到反应最适条件，如达到最适条件，CK活性可增加5%～8%。因误差并不大，所以IFCC决定仍保留目前这个方法。

二、肌酸显色终点法

【原理】

CK在Mg^{2+}和巯基化合物存在下，催化磷酸肌酸与ADP生成ATP和肌酸，肌酸与双乙酰及α－萘酚结合生成红色化合物，在一定范围内红色的深浅与肌酸含量成正比，根据吸光度值推算出酶活性单位。

【试剂】

1）底物管的制备方法：①Tris－镁溶液：Tris1.21g，含7分子结晶水硫酸镁

0.37g，加去离子水90ml，溶解后加1mol/L 盐酸溶液8ml，调节pH 为7.4，此液室温可保存数月。②底物液：EDTA 钠盐38mg，含4 分子结晶水磷酸肌酸钠盐39.3mg，ADP 钠盐19.8mg，巯基乙醇42μl，溶于10mlTris－镁溶液中，调pH 至7.4。分装10mm ×100mm 试管内，每管0.125ml，置玻璃真空干燥器中（内放吸水剂）减压干燥。整个过程应在2h 内完成。将干燥底物管置于有色硅胶的大口瓶中，密封后置冰箱，可保存半年。

2）硫酸锌溶液：含7 分子结晶水的硫酸锌5g，加去离子水至100ml。

3）氢氧化钡溶液：氢氧化钡6g，溶于100ml 热去离子水中，冷后过滤。用酚酞作指示剂，校正浓度至5ml 硫酸锌溶液滴加5 ±0.1ml 氢氧化钡溶液至终点为宜。

4）碱试剂：氢氧化钠30g，碳酸钠40g，去离子水加至500ml。

5）α－萘酚溶液：临用时用碱试剂配成6g/100ml。

6）双乙酰溶液：双乙酰10μl，加水至100ml。

7）肌酸校准液（1.5mmol/L）精确称取无水肌酸22.3mg，加去离子水至100ml，在冰箱保存可用数月。

【操作】

1）酶活性测定：按表4－4－10 步骤操作。各管混匀，37℃水浴15min，其间摇动数次。空白管调零，在540nm 波长处比色。

表4－4－10　肌酸显色终点法测定CK 操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
去离子水	0.5	0.45	0.5
肌酸校准液	0.05		
	37℃水浴5min		
待测血清	0.05		
	37℃水浴5min		
氢氧化钡溶液	0.25	0.25	0.25
硫酸锌溶液	0.25	0.25	0.25
待测血清	0.05	0.05	
充分混匀，2000r/min 离心10 min，另取3 只试管如下进行操作			
上清液	0.5	0.5	0.5
α－萘酚溶液	1.0	1.0	1.0
双乙酰溶液	0.5	0.5	0.5

CK 活性（U/L）＝测定管吸光度值/校准管吸光度值×1.5 ×0.05 ×1000/0.05 ×1/15

＝测定管吸光度值／校准管吸光度值×100

(2) 单位意义：在上述条件下，酶促反应每1000ml 血清每分钟产生1μmol 肌酸为1UCK 活性。

【注意事项】

(1) 血清空白管的吸光度与单纯试剂空白管吸光度基本相似，不同标本的空白管也相差无几，故一般不需要作血清空白对照。

(2) 本法酶活性在200U／L 以下时与吸光度值呈直线关系，超过此值需用已知CK 活性正常的血清稀释后重测。

【参考值】

连续监测法 (U／L)：男性38～174，女性26～140；肌酸显色终点法 (U／L)：男性63.6±24.4，女性45.5±15.5。

血清CK 活性受年龄、性别、人种、肌肉发达程度及身体锻炼状况等众多因素的影响。加上不同检测方法间的差异，所以CK 参考范围有很大变异。在不同医院及实验室间进行测定结果对比时，须特别注意这个问题。

【临床意义】

(1) 诊断心肌梗死：心肌梗死发病后3～4h，血清CK 活性开始上升，24～36h 达高峰，2～4d 恢复正常，高峰平均值可达参考值20 倍。CK 活性升高程度与梗死面积成正比。因CK 在急性心肌梗死后第3 天就可恢复正常，故需注意及时检测。

(2) 其他心脏疾病：冠状动脉功能不全和心力衰竭患者CK 活性不升高，但进行心脏按摩，出现严重心律失常及作心导管检查时，CK 活性有时会升高。

(3) CK 活性各种疾病患者增高程度如下：明显升高 (高于正常5 倍或以上) 见于脊髓病性肌萎缩、多发性肌炎、皮肌炎、急性心肌梗死；轻或中度升高 (高于正常2～4 倍) 见于重负荷锻炼、创伤、外科手术、肌肉注射、心肌梗死等。

第九节　血清肌酸激酶同工酶测定

分析CK 同工酶的方法很多，有电泳法、离子交换层析及多种免疫学方法 (包括免疫沉淀、免疫抑制和测定酶质量的免疫分析)。前两者由于耗时费力，时效性差，难以满足临床急症的需要，实际工作中较少采用。目前最常用的是可用于自动分析仪的免疫抑制法测定CKMB。其原理是通过抗CK－M 血清抑制CKMM 及CKMB 的M 亚基，然后利用测定总CK 同样的原理和方法测定CKMB 的B 亚基活性，由于CKMB 由M 亚基和B 亚基组成，而该法测得的仅为B 亚基活性，因此所测活性乘2 为CKMB 实际活性。免疫

抑制法是在假定不存在CKBB 及其他干扰物质如线粒体CK 及大CK 的情况下建立的，但事实上这些干扰并不总是可以被忽略，所以偶尔可导致CKMB 检测结果假性增高，这时可用电泳法来证实。现在最推崇的是CKMB 的质量分析，它依据酶免疫夹心法原理，特异性及敏感性均超过酶活性分析方法。当要分析CK 的同工酶谱及某些CK 的异常形式如线粒体CK 及大CK，电泳法依然是唯一的常规方法。本节介绍的是琼脂糖凝胶电泳法。

【原理】

各CK 同工酶所带电荷存在差异，故可在一定电泳条件下相互分离，并在各自所在的区带处产生酶促反应，从而被检测出。检测方法可用前述的连续监测法，再将NADPH 的氢通过酚嗪二甲酯硫酸盐（PMS）传递给氯化碘代硝基四唑（NT），使后者还原成紫色；也可在波长365nm 处直接观察NADPH 的荧光或用荧光光密度扫描仪定量各区带构成比。

【试剂】

1）50mmol/L Tris－巴比妥缓冲液（pH8.0）：巴比妥6.716g，Tris 1.905g 溶于去离子水中并稀释至1L，备作电泳。

2）30mmol/L Tris－巴比妥缓冲液（pH8.6）：巴比妥1.21g，Tris 1.15g，以去离子水溶解并稀释至500ml。

3）5g/L 琼脂糖溶液：0.5g 琼脂糖，1.4g 聚乙烯吡咯烷酮（PVP），加30mmol/L Tris－巴比妥缓冲液100ml，隔水煮沸溶解，分装后4℃保存。

4）400mmol/L 2－羟乙基亚氨基羟甲基甲烷（Bis－Tris）缓冲液（pH7.0）：Bis－Tris 8.36g，含两分子结晶水EDTA 钠盐0.149g，加去离子水95ml 溶解，用1mol/L 醋酸溶液调至pH 为7.0 后加入含4 分子结晶水醋酸镁0.429g，用去离子水稀释到100ml。4℃可保存2 个月，－20℃可保存6 个月。

5）辅酶溶液（ADP24mmol/L，AMP10mmol/L，辅酶II4mmol/L，葡萄糖40mmol/L）：ADP17.1mg，AMP6.5mg，NADP29.7mg，葡萄糖72.1mg，加Bis－Tris 缓冲液9ml，平衡至25℃后用1mol/L 醋酸（约用1ml）调pH 至6.4。4℃可保存半个月。

6）底物－显色液甲（按两张载玻片计）：用前于甲管中加辅酶溶液1.5ml，HK10.5U，G6PD6U，混合后置37℃水浴5min，加入PMS0.02mg（2g/LPMS 溶液0.01ml）。PMS 须避光。在加PMS 前的5min 内配好底物－显色液乙，加PMS 后，立即与乙液混合并覆盖于电泳凝胶板上。

7）底物－显色液乙：先配置下列试剂。①450mmol/L 磷酸肌酸溶液：存4℃可用3个月。②5g/L INT 溶液：置棕色瓶密封贮存，4℃可用3 个月。③2.5g/L 琼脂糖溶液：1.25g 琼脂糖，加入100ml 去离子水，隔水煮沸溶解后，再加入氟化钠262.5mg 及

PVP3.5g，溶解后分装，置4℃保存。

用前于乙管中加入磷酸肌酸溶液0.2ml，INT 溶液0.2ml，置37℃水浴2min 后，加入NAC20mg，或还原型谷胱甘肽10mg。用预温至37℃的滴管吸入隔水煮沸融化后温度降至37～43℃的琼脂糖溶液1.2ml，滴管吹吸混匀，使NAC 溶解。

8）混合底物－显示液：当乙液配成后，立即吸甲液人乙液中，混合后立即使用。在水浴箱中操作，防止琼脂糖凝固。

必要时用0.2ml 去离子水代磷酸肌酸溶液制备对照显色液。如按荧光法操作，用不含PMS 及INT 的甲、乙液，用去离子水代INT 溶液。

[操作]

1）隔水煮沸溶解5g/L 琼脂糖溶液，取1.5ml 铺于1.0～1.2mm 厚的载玻片上。于近阴极端并排挖两个槽，作两份标本，或作标本与控制物。

2）加待测样品5μl，80V 电泳50min。

3）合理安排配制混合底物－显色液的时间，使配制完成时电泳结束。

4）将电泳凝胶板置于涂以黑漆的铝盒中，吸底物显色液1.5ml 铺于凝胶板上，加盖，待凝后置37℃水浴1h。

5）置固定液（乙醇醋酸水=150∶10∶40）中2～4h，转入去离子水中数小时，取出观察结果或用光密度扫描仪在500nm 波长下扫描定量。需要时可手推至空白卡片纸上，37℃孵育过夜，干片保存。

6）或用无PMS、INT 的底物显色液，37℃水箱孵育20min，再置60℃干燥箱中20min，在紫外灯（波长365nm）下观察荧光。有条件者用荧光光密度扫描仪定量（激发波长360nm，发射波长460nm）。

[结果观察]

位于阳极侧白蛋白区域者为CKBB，位于α_2 或β球蛋白区域者为CKMB，位于阴极侧γ球蛋白区域者为CKMM。

[注意事项]

1）试剂配置中特别提到的时间顺序、温度控制和混合方法，均是为了保证检测结果的质量，必须严格执行。

2）CK 不稳定，对光、热及高pH 值敏感，最好及时分离血清测定。如标本要保存较长时间，可将及时分离的血清充二氧化碳后塞紧管口，置冰室或－30℃保存，约可稳定半个月。

3）影响CK 同工酶电泳与显色的因素很多，必须同时作质控。质控物制备方法：取小白鼠心、股四头肌、脑，分别在pH7.0 缓冲液（50mmol/L Tris－盐酸，250mmol/L 蔗糖，10mmol/LEDTA，10mmol/L 还原型谷胱甘肽）中匀浆，10000g 离心15min，去上

清液，测CK 活性，再用pH7.2 缓冲液稀释至200U/L 左右，分装后置－30℃保存。用前取出，置室温融化后将3 种组织的质控物等量混合使用（可节省底物）。如冻干，用前以正常人血清稀释重建并混合，结果除CKMM、CKMB 及CKBB 外，在CKMM 与CKMB 之间可出现一条带，是CK 与免疫球蛋白的复合物，称大CKBB。

【参考值】

一般只能检出CKMM 同工酶带，无CKMB 及CKBB 酶带。在免疫抑制法测出CKMB >15.0U/L 时，电泳法即可检出该同工酶带。

【临床意义】

1）诊断心肌梗死：CKMB 几乎只存在于心肌内，与总CK 相比，CKMB 是心肌损伤更为敏感和特异的指标。对疑似急性心肌梗死患者，CKMB 的测定是一种较为精确的酶学指标。急性心肌梗死发生后5h 即出现明显的CKMB 带，36h 后CKMB 出现阳性率可达100％。CKMB 大幅度增加提示了心肌梗死面积大，预后差。一般认为，血清CKMB 活性≥CK 总活性的3％即有心肌梗死存在。若下降后的CKMB 活性再度上升，提示心肌梗死复发。

2）脑部疾病：在脑外伤、脑血管意外和脑手术后，CKBB 活性可增加。

3）肌肉疾病：在多发性肌炎、皮肌炎及其他骨骼肌病变时，CKMM 活性显著增加。

第十节　血清淀粉酶测定

多年来用于测定淀粉酶（amylase）的方法众多，不少于200 种，可分为以下4 类：1）淀粉分解法，使用方便，但准确性较差；2）糖化法，操作复杂费时，制备重现性淀粉溶液困难，标本空白偏高；3）色原底物分解法，方法简便，但分析范围有限；4）酶偶联连续监测法，方法简便，适用于自动分析仪，但成本较高。本节介绍碘－淀粉两点比色法和酶偶联连续监测法。

一、碘－淀粉两点比色法

【原理】

淀粉分子中α－1，4 糖苷键经淀粉酶水解而失去与碘形成蓝色复合物的能力，通过测定酶作用前后淀粉与碘生成的复合物蓝色程度的变化量，来推算酶的活性单位。

【试剂】

1）0.4g/L 淀粉缓冲溶液：将9g 氯化钠、22.6g 无水磷酸氢二钠和12.5g 无水磷酸

二氢钾溶解于约500ml 去离子水中，加热至沸；另取小烧杯，精确称取0.4g 可溶性淀粉，加入约10ml 去离子水，使溶液成糊状后，加入上述沸腾之溶液中，水洗烧杯一并倒入，冷至室温后，加入甲醛5ml，用去离子水稀释至1L，该溶液pH 为7.0 ±0.1，置冰箱保存。

2）0.1mol/L 碘贮存液：溶解1.8735g 碘酸钾（KIO_3）及22.5g 碘化钾（KI）于约400ml 去离子水中，缓慢加入4.5ml 浓盐酸，边加边搅拌，用去离子水稀释至500ml，充分混匀，贮棕色瓶，塞紧，置冰箱保存。

3）0.01mol/L 碘应用液：取碘贮存液，用去离子水稀释10 倍，贮棕色瓶，置冰箱可用1 个月。

【操作】

1）取15mm ×150mm 试管2 支，标明测定管及空白管，各加入经37 ℃预温5min 的淀粉缓冲溶液1.0ml（含0.4mg 淀粉）。

2）放37 ℃水浴内预温5min，测定管中加稀释待测标本0.2ml（血清为10 倍稀释，尿液为20 倍稀释），混匀，再置37 ℃水浴7.5min。

3）取出加0.01mol/L 碘应用液1.0ml，加去离子水于测定管6.0ml、空白管6.2ml。

4）混匀，用660nm 波长，10mm 光径比色杯，去离子水调零，读取各管吸光度。

【计算】

$$\text{淀粉酶活性（U/L）}=\frac{\text{空白管吸光度值}-\text{测定管吸光度值}}{\text{空白管吸光度值}}\times\frac{0.4}{5}\times\frac{15}{7.5}\times\frac{100}{0.02}$$

$$=\frac{\text{空白管吸光度值}-\text{测定管吸光度值}}{\text{空白吸光度值}}\times 800$$

式中0.02 为血清用量，测定尿液时也按其实际用量代入公式计算。

单位定义：100ml 血清中的淀粉酶，在37 ℃时15min 水解5mg 淀粉为1U。

【注意事项】

1）α－淀粉酶水解直链淀粉比支链快，故应注意淀粉的质量（纯度、水分、分子大小、水解方式等）和种类（直链、支链及其比例）。

2）酶活性在400U 以下时，与底物的水解量成线性。如测定管的吸光度值小于空白管的吸光度值一半时，应将血清加大稀释倍数，或减少稀释血清加入量。

3）淀粉溶液出现絮状沉淀或混浊，表示已变质，不能再用。

4）唾液含大量淀粉酶，应防止其污染。

5）测定血液标本最好为血清。抗凝剂除肝素外，其他均对淀粉酶活性有抑制作用。

二、连续监测法

用组成确定的淀粉酶底物及辅助酶与指示酶系统测定淀粉酶，可改进反应的化学计

量关系，有利于实现连续监测及应用国际单位。α－淀粉酶水解小分子寡糖所得产物比水解淀粉更为确定。例如麦芽戊糖及麦芽庚糖是极好的α－淀粉酶底物，试剂稳定，产物恒定，化学计量关系明确。以下列出几个有代表性的这类方法的反应原理，其具体方法、单位定义等可参考有关试剂盒说明书。

1）以麦芽戊糖为底物的反应：

$$\text{麦芽戊糖} \xrightarrow{\alpha\text{－淀粉酶}} \text{麦芽丙糖}+\text{麦芽糖}$$

$$\text{麦芽丙糖}+\text{麦芽糖} \xrightarrow{\alpha\text{－葡萄糖苷酶}} 5\ \text{分子葡萄糖}$$

$$\text{葡萄糖}+\text{ATP} \xrightarrow{\text{己糖激酶}} \text{葡萄糖}-6-\text{磷酸}+\text{ADP}$$

$$\text{葡萄糖}-6-\text{磷酸}+\text{NAD}^{+} \xrightarrow{\text{G6PD}} 6-\text{磷酸葡萄糖酸内酯}+\text{NADH}+\text{H}^{+}$$

反应中淀粉酶催化水解每一个糖键产生5 分子葡萄糖及相应量的NADH，后者在340nm 波长处吸光度上升速率与标本中淀粉酶活性成正比。由于使用试剂盒中的凝胶过滤柱在反应前预先处理标本，除去葡萄糖，所以内源性葡萄糖不会干扰测定结果。

2）以麦芽四糖作底物的反应：

$$\text{麦芽四糖} \xrightarrow{\alpha\text{－淀粉酶}} 2\ \text{分子麦芽糖}$$

$$\text{麦芽糖}+\text{磷酸盐} \xrightarrow{\text{麦芽糖磷酸化酶}} \text{葡萄糖}+\text{葡萄糖}-1-\text{磷酸}$$

$$\text{葡萄糖}-1-\text{磷酸} \xrightarrow{\beta\text{－葡萄糖磷酸变位酶}} \text{葡萄糖}-6-\text{磷酸}$$

$$\text{葡萄糖}-6-\text{磷酸} \xrightarrow{\text{G6PD}} 6-\text{磷酸葡萄糖酸内酯}+\text{NADH}+\text{H}^{+}$$

本法具有高度的特异性，由淀粉酶催化水解一个糖键产生两分子的NADH。后来发现麦芽四糖催化反应的产物中也存在少量麦芽丙糖和葡萄糖，所以用此法所测得的酶活性略偏低。内源性葡萄糖不干扰反应。标本或试剂中若同时存在乳酸脱氢酶及丙酮酸，则可产生负干扰。

3）以4－硝基苯酚（4NP）－葡萄糖苷为底物：以4－硝基苯麦芽庚糖苷（4NP－G7）为底物，经α－淀粉酶催化，水解为游离的寡糖（G5、G4、G3）及葡萄糖单位减少的对硝基寡糖苷（4NP－G2、4NP－G3、4NP－G4）；4NP－G2、4NP－G3 及一部分4NP－G4 受α－葡萄糖苷酶催化，水解为4NP 和葡萄糖。4NP 的生成量在一定范围内与α－淀粉酶活性成正比、但其摩尔数仅为酶解底物（4NP－G7）的1/3，另2/3 结合在4NP－G4 中。反应式如下：

$$4\text{NP}-\text{G7} \xrightarrow{\alpha\text{－淀粉酶}} 4\text{NPG2}+4\text{NP}-\text{G3}+4\text{NP}-\text{G4}+\text{G5}+\text{G4}+\text{G3}$$

$$4\text{NPG2}+4\text{NP}-\text{G3}+4\text{NP}-\text{G4} \xrightarrow{\alpha\text{－葡萄糖苷酶}} \text{葡萄糖}+4\text{NP}+4\text{NP}-\text{G4}$$

【参考值】

	血清	尿液
碘－淀粉两点比色法：	800～1800U／L	1000～12000U／L
麦芽四糖法：	25～125U／L	1～17U／h
4－NP－葡萄糖苷法：	≤220U／L	≤1200U／L

[临床意义]

1）胰腺疾病导致淀粉酶活性增高：急性胰腺炎时，大多数患者起病6～8h 后，血清淀粉酶开始上升，高于正常5 倍具有诊断价值。持续2～3d 后开始下降，重症患者持续时间较长。尿淀粉酶约于起病后12～24h 开始增高，下降也比血清淀粉酶慢，所以在急性胰腺炎后期测定尿淀粉酶活性更有价值。慢性胰腺炎和胰腺肿瘤患者血清淀粉酶活性轻度增高。

2）非胰腺疾病导致血清淀粉酶增高：见于溃疡病穿孔、胰腺癌、肠梗阻、急性阑尾炎及急性腮腺炎等，鸦片类药物如吗啡、可待因等也可引起血清淀粉酶活性升高。

肾衰竭患者淀粉酶活性轻度升高。在少数肠道吸收功能低下及肝脏疾病患者，淀粉酶可与免疫球蛋白结合致使肾脏不能正常清除，血淀粉酶活性可高于正常数倍，尿淀粉酶活性不升高。这种状况称为巨淀粉酶血症，需注意与胰腺疾病引起的淀粉酶活性升高区别。

3）血清淀粉酶减低见于肝炎、肝硬化、妊娠、毒血症、胰腺纤维性变或萎缩、肝癌和酒精中毒。

4）胸膜腔积液淀粉酶活性升高见于急性胰腺炎、胰腺创伤及其他胰腺疾病。

第十一节　血清脂肪酶测定

脂肪酶（lipase）测定方法很多，在临床实验室中应用的有比浊法、分光光度法、干化学法和免疫法。比浊法曾是广泛应用的方法之一，1987 年Tietz 等优化了此法。此法的缺点是底物（三油酸甘油酯）的乳化难以做到每批一致，直接影响测定结果，因此，罗氏试剂盒带有校准物（用参考方法pH－Stat 法定值）。分光光度法包括紫外法和比色法，均为酶偶联速率法，需要用多个工具酶，价格昂贵。Kodak 干化学法原理与比色法类似，缺点是与pH－Stat 法比较有一个较大的负截距（－101U／L）。免疫法有RIA、胶乳法和酶标法等，此类方法费时，不适合急症测定，未能推广。新近合成的脂肪酶测定新底物（色团底物）比色法，检测的方法学性能符合IFCC 酶学委员会推荐方法的各项技术要求，是一个有前途的测定方法。

一、两点比浊法

【原理】

$$\text{三油酸甘油酯}+H_2O \xrightarrow{\text{脂肪酶}} \text{二油酸甘油酯}+\text{油酸}$$

$$\text{二油酸甘油酯}+H_2O \xrightarrow{\text{脂肪酶}} \text{单油酸甘油酯}+\text{油酸}$$

在340nm 或420nm 波长处测定三油酸甘油酯乳浊液在反应前后的浊度降低程度，可计算出脂肪酶活性单位。

【试剂】

1）三油酸甘油酯乙醇溶液（6mmol/L）：高纯度三油酸甘油酯0.531mg，加无水乙醇溶解，然后加无水乙醇至100ml。

2）底物缓冲液：Tris 3.27g，去氧胆酸钠8.65g，氯化钙15.3mg，用800ml 去离子水溶解，用1mol/L 盐酸溶液校准pH 至9.2（37℃），然后加水至1L。

3）底物乳化液（0.3mmol/L）：取底物缓冲液100ml 煮沸。用搅拌器边搅拌边逐滴加入三油酸甘油酯乙醇溶液5ml，继续搅拌至均匀的乳剂，冷却，加辅脂酶3.1mg，溶解，冰箱保存。

【操作】

1）手工法：吸取底物乳化液2.5ml，37℃水浴5min 后加入血清25μl，孵育4min 后用分光光度计在波长340nm 或420nm 处测定吸光度值（A_1），然后再准确孵育5min，测定吸光度值（A_2）。

2）自动化分析方法：速率法；温度：37℃；波长：340nm（主）/700nm（次）；待测标本体积：5μl；试剂体积：250μl；延迟时间：240s；读数时间：300s；输入因素按公式计算或校准（校准血清定值）。

【计算】

$$\text{脂肪酶活性（U/L）}=\frac{A_1-A_2}{5}\times\text{因素}$$

吸取底物乳化液2.5ml，加9g/L 氯化钠溶液25μl，在340nm 或420nm 波长处测定底物吸光度值（相当于0.3mmol/L 底物的吸光度值），按下式计算因素：

$$\text{因素}=\frac{\text{底物浓度（μmol/L）}}{\text{吸光度值}}\times\frac{\text{反应体系总体积}}{\text{待测标本体积}}=\frac{300}{\text{吸光度值}}\times\frac{2525}{25}=\frac{3030}{\text{吸光度值}}$$

【注意事项】

1）脂肪酶测定的基本条件是反应系统中有底物、胆酸盐和辅脂酶、钙离子及最适缓冲系统（包括离子强度和pH 值）。因脂肪酶是一组水解长链脂肪酸甘油三酯的酶，故用高纯度的三油酸甘油酯及其衍生物作为底物较好。如用短链脂肪酸甘油三酯作底

物，能使非脂肪酶（羧酸酯酶、脂蛋白酯酶等）产生非特异反应。脂肪酶仅作用于脂－水界面，除三油酸甘油酯必须充分乳化外还必须有胆酸盐和辅脂酶存在，形成胆酸盐－辅脂酶－脂肪酶聚合物而被固定在底物表面，然后发挥脂肪酶的酯解作用，因此，辅脂酶和胆酸盐缺一不可。由于辅脂酶价格昂贵，国内不少文献都省略了辅脂酶，这是不可取的。Ca^{2+}是脂肪酶的活化剂。

（2）本法的不足之处主要是某些标本如类风湿因子阳性患者的标本早期反应相呈非线性，并限制它的线性范围，因此，应选择反应4min 后测定。标本中甘油三酯浓度＞5.65mmol/L 时可干扰测定结果，血红蛋白浓度＞2g/L 则有负干扰。羧酯酶和脂蛋白脂酶不干扰测定。

（3）本法的线性范围为5～400U/L；自动分析的批内CV ＜5.0%，总CV ＜6.0%，手工操作CV 较上述大。

【参考值】

40～220U/L。

二、色团底物连续监测法

【原理】

本法基于下述反应原理：

1，2－O－二月桂－外消旋－甘油基－3－戊二酸－（6－甲基试卤灵）酯 $\xrightarrow{\text{脂肪酶}}$

1，2－O－二月桂－外消旋－甘油＋戊二酸－（6－甲基试卤灵）脂戊二酸－（6－甲基试卤灵）脂 $\xrightarrow{\text{自然分解}}$ 戊二酸＋甲基试卤灵（红色）

上述红色产物颜色增加的速率与脂肪酶活性成正比。

【试剂】

（1）试剂Ⅰ：N，N－双（2－羟乙基）－甘氨酸缓冲液（pH8.0）50mmol/L；辅脂酶≥1mg/L；去氧胆酸钠1.6mmol/L；氯化钙10mmol/L；去污剂和防腐剂。

（2）试剂Ⅱ：酒石酸缓冲液（pH4.0）10mmol/L；底物0.27mmol/L；牛磺去氧胆酸8.8mmol/L；去污剂和防腐剂。

【操作】

自动分析参数：反应类型：速率法；反应温度：37℃；波长：570nm（主）/700nm（次）；计算因子：2089；待测标本4μl 加试剂Ⅰ250μl，孵育3～5min 后加试剂Ⅱ150μl，延滞时间60s，监测时间90s。

【计算】

$$\text{脂肪酶活性（U/L）}=\frac{(10A/\text{min})\times 10^{6}\times TV}{\varepsilon\times SV\times 1}=(10A/\text{min})\times 2089$$

式中ε为本测定条件下甲基试卤灵的摩尔吸光系数，560nm 时为44480，570nm 时为48350，578nm 时为51490。

【参考值】

2.5％～97.5％范围为12～63U／L。

【注意事项】

1）本法的底物是接有二个长链脂肪酸（月桂酸）和一个带色团（甲基试卤灵）的戊二酸的甘油酯，脂肪酶先水解戊二酸的酯键，然后戊二酸与甲基试卤灵自然分解。

2）甘油三酯、胆固醇（包括HDL－C、LDL－C）试剂中均含有脂肪酶，某些仪器可能引起携带污染，此时可使用仪器的“Special Wash”或“Smart Wash”功能。胆红素含量＜1026μmol／L，血红蛋白含量＜5g／L 和甘油三酯含量＜22.6mmol／L 对检测结果均无显著干扰。

3）本法的线性达到300U／L；批内CV＜2.0％，批间CV＜3.0％；与比浊法有良好相关性（r 为0.64～0.986）。

4）由于原理、试剂不同，测定的结果很悬殊。

【临床意义】

1）急性胰腺炎：急性胰腺炎患者由于胰腺基底细胞通透性增加，脂肪酶大量释放进入循环系统；出血性胰腺炎时，胰腺细胞坏死导致额外的酶释放。这些均导致血清脂肪酶活性增加。其诊断灵敏度为80％～100％，特异性为84％～96％，而血清淀粉酶分别为73％～79％和82％～84％，如两者同时测定，可提高急性胰腺炎的诊断准确性。血清脂肪酶活性升高时间较淀粉酶迟，但持续时间长，可达10～15d。

2）慢性胰腺炎：约有20％慢性胰腺炎患者脂肪酶活性升高，胰腺恶性肿瘤时也常有脂肪酶活性升高。慢性炎症引起纤维化或由于结石、乳头状瘤、水肿等致使胰导管狭窄或阻塞，导管中压力增高，胰腺颈部裂开，脂肪酶进入毛细血管周围空间，进而扩散人血液循环，也可使血清脂肪酶活性增高。

第十二节　血清胆碱酯酶测定

测定血清胆碱酯酶（serum cholinesterase，SChE）的方法很多，有量压法、pH 值电位测量法、pH 指示剂法和分光光度法等。这些方法均以乙酰胆碱作底物，比较适合测红细胞中真性胆碱酯酶（AChE）的活性，而不是SChE 测定的理想底物。本节介绍的连续监测法用酰基硫代胆碱为底物，是目前较好的测定SChE 活性的方法。

【原理】

SChE 催化碘化丙酰硫代胆碱（PTCI）水解，产生丙酸及硫代胆碱，后者与无色的5，5′－二硫代双（2－硝基苯甲酸）（DTNB）反应，形成黄色的5－巯基－2－硝基苯甲酸（5－MNBA）。在波长410nm 处测吸光度，其变化速率（ΔA/min）与SChE 活性成正比。

【试剂】

（1）0.036mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.6）：4.73g 磷酸氢二钠溶于去离子水稀释至1L 为甲液；13.6g 磷酸二氢钾溶于去离子水稀释至1L 为乙液。取甲液950ml 及乙液50ml 混合即成，4～8℃可稳定3 个月。期间每周应检测pH 值及检查有无细菌生长。

（2）10mmol/L PTCI 缓冲液（底物应用液）：PTCI 303mg，用约80ml 去离子水溶解并稀释至100ml，临用前配。

（3）0.423mmol/L DTNB 缓冲液：167mg DTNB，用0.036mol/L 磷酸盐缓冲液溶解并稀释至1L，贮于棕色瓶，4℃保存，可稳定1 年。

（4）14mmol/L 硫酸奎尼丁溶液：硫酸奎尼丁500mg 溶于约90ml 去离子水中并稀释至100ml。室温稳定1 年。

上述各试剂成分在反应液中的终浓度（以mmol/L 计）分别为PTCI 2、TNB 0.253、磷酸盐25。

【操作】

（1）手工法按表4－4－11 步骤操作。

各管混匀，5min 内比色，波长410nm，比色杯光径1.0cm，空白管调零，读取测定管的吸光度值为（ΔA/3min。

表4－4－11　手工法测SChE 操作步骤

加入物（ml）	空白管	测定管
DTNB 缓冲液	3.0	3.0
底物应用液	1.0	1.0
	混匀，37℃水浴5min	
	水浴中加稀释待测血清并立即计时	
稀释待测血清（以水作100 倍稀释）		1.0
	混匀，37℃水浴3min	
硫酸奎尼丁溶液	1.0	1.0
同上稀释待测血清	1.0	

（2）半自动分析法：临测定前将PTCI 溶液和DTNB 溶液按1∶3 混合。取2ml 在37℃

预温3min，加入5μl 待测血清，混匀，延迟时间10s，410nm 波长，1cm 光径，监测时间3min。

【计算】

$$\text{SChE 活性 (U/L)} = (\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{13600 \times 1} \times \frac{6.0}{0.01} = (\Delta A/\text{min}) \times 44117 = (\Delta A/\text{min}) \times 14705$$

式中13600 为5 -MNBA 的摩尔吸光系数。

【注意事项】

1）血清标本不论在室温或冰箱冷藏均可稳定数周。轻中度溶血也不影响测定结果，但必须离心去除红细胞及其影细胞。

2）手工法采用硫酸奎尼丁溶液终止酶反应，但比色操作过程要短，否则被抑制的SChE 会重新活化。

【参考值】

5000～12000U/L。

【临床意义】

1）肝胆疾病：肝硬化、肝炎、长期肝外胆道阻塞、肝转移癌和严重肝细胞性黄疸患者，SChE 活性降低。

2）肝外疾病：营养不良、恶液质、严重贫血、急性感染、癌症和晚期血吸虫病等患者SChE 活性降低。

3）有机磷中毒：有机磷制剂是AChE 及SChE 的强烈抑制剂，中毒后SChE 活性降低较AChE 更早、更快。当出现临床症状时，SChE 活性往往已下降40%。测定SChE 活性与测定全血AChE 活性一样，是判断有机磷中毒患者及预后的重要指标。

第十三节　腺苷脱氨酶测定

腺苷脱氨酶（adenosine deaminase，ADA）常用测定方法有氨显色法和氨偶联酶测定法。本节介绍氨显色法。

【原理】

ADA 催化腺嘌呤核苷脱氨，产生次黄嘌呤核苷和氨，用波氏显色反应测定反应过程中产生的氨量，从而推算标本中ADA 活性。

【试剂】

1）腺苷缓冲液（pH6.8）：在45ml 去氨水中加入1mol/L 氢氧化钠溶液4.8ml，煮沸去氨，加入磷酸二氢钾1.361g，溶解，冷却至70℃左右，加入腺苷133.6mg，然后加去氨水至50ml，加氯仿1ml 防腐，放冰箱保存。

2）酚－亚硝基铁氰化钠溶液：吸取液态酚10ml，加去氨水至500ml，加入亚硝基铁氰化钠40mg，置棕色瓶冰箱保存。如空白管读数增高，应重配。

3）碱性次氯酸钠溶液：氢氧化钠4g，溶于0.01mol/L 次氯酸溶液中并加至500ml，置冰箱可长期保存。

4）氨校准贮存液（1g/L）：硫酸铵1～2g，于100～110℃烘2h，置干燥器中冷却。准确称取硫酸铵0.472g，加去氨蒸馏水溶解，加浓硫酸0.1ml，再加去氨蒸馏水至100ml。

5）氨校准应用液（25μg/ml）：于100ml 容量瓶中，加氨校准贮存液2.5ml，再加去氨蒸馏水至100ml。

【操作】

按表4－4－12 步骤操作。各管混匀，置37℃水浴30min，波长640nm 处以去离子水调零，读取各管吸光度值。

【计算】

$$\text{ADA 活性（U）} = \frac{\text{测定管吸光度值} - \text{对照管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值} - \text{空白管吸光度值}} \times \text{校准液氨浓度（μg/ml）}$$

单位定义：1ml 标本在37℃与底物作用60min 产生1μg 氨氮为1U。

表4－4－12　ADA 测定氨显色法操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管	校准管	空白管
待测血清	0.02	0.02		
氨校准应用液	0.02			
去氨水	0.02			
腺苷缓冲液	0.25	0.25	0.25	
	置37℃水浴，准确60min			
酚－亚硝基铁氰化钠溶液	2.50	2.50	2.50	2.50
腺苷缓冲液	0.25			
碱性次氯酸钠溶液	2.50	2.50	2.50	2.50

【参考值】

0～25U。

【注意事项】

1）市售次氯酸溶液中活性氯含量不准确，可按下法标定：取含活性氯约6％的市售次氯酸钠溶液2ml，加去离子水约20ml、碘化钾3g，溶解后加冰醋酸5ml，以1g/L 可

溶性淀粉溶液为指示剂，用0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液滴定。记录所消耗的硫代硫酸钠溶液的毫升数，按下式计算出该液中活性氯的浓度：

$$\text{活性氯浓度（mol/L）}=\frac{\text{硫代硫酸钠溶液毫升数}}{2}\times 0.1$$

2）全部试剂必须用去氨蒸馏水制备。

3）氯胺T 含有效氯浓度高，可代替次氯酸钠。方法：氢氧化钠0.5g，含12 分子结晶水磷酸氢二钠5.37g，氯胺T100mg，用去氨水溶解，并加去氨蒸馏水至100ml，置密闭棕色瓶可保存1 年。

4）上述单位乘以1.19 可换算成国际单位（U/L）。换算依据：上述单位×1000/（60 ×14）。

【临床意义】

1）结核性渗出液：ADA 在良、恶性难辨的渗出液鉴别诊断上有重要价值。ADA 诊断结核性渗出液的特异性和敏感性优于活组织检查和细菌学方法。结核性胸腹水ADA 活性显著增高，而癌性胸腹水ADA 活性不增高。以1.4 ～8.0U/L 为阳性界限值，ADA 诊断结核性脑膜炎的敏感性和特异性分别达到90 %和92 %以上。

2）肝病：血清ADA 活性能较敏感地反映肝细胞损伤，可作为肝功能常规检查项目之一。与ALT 或GGT 等组成肝酶谱能较全面反映肝病时肝细胞损伤及修复状况。急性肝炎患者ALT 活性明显升高，ADA 活性仅轻、中度升高，且阳性率明显低于AST 和ALT；重症肝炎发生酶胆分离时，尽管ALT 活性不高，但ADA 活性明显升高；急性肝炎后期，ADA 活性升高阳性率高于ALT，其恢复正常时间也较后者为迟，并与组织学指标的恢复相一致。ALT 活性恢复正常而ADA 活性持续升高者，常易复发或迁延为慢性肝炎。反映慢性肝损伤的指标ADA 较ALT 为优，慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌患者血清ADA 活性显著升高，阳性率达85 %～90 %，ADA 活性测定可作为慢性肝病的筛选指标。失代偿期肝硬化患者ADA 活性明显高于代偿期肝硬化患者，由此可判断慢性肝病的程度。

3）获得性免疫缺陷综合征（AIDS）：AIDS 患者红细胞ADA 活性特别高，血清中ADA 活性也较高，HIV 感染者在感染早期血清ADA 活性即增加，且与AIDS 相关逆转录病毒抗体的存在相关。

4）血液病：慢性溶血性疾病患者红细胞ADA 活性显著增高，为正常人的45 ～70 倍，先天性再生障碍性贫血患者红细胞ADA 活性明显高于正常对照。急性淋巴细胞白血病患者的淋巴细胞或血清中ADA 活性明显增高，而急性非淋巴细胞白血病患者ADA 活性增高不显著。

5）其他传染病：伤寒患者血清ADA 活性在发病初期即明显升高，经有效治疗后

降为正常。流行性出血热患者在发热前血清ADA 即已高出正常人2～3 倍。

第十四节　5′－核苷酸酶测定

5′－核苷酸酶（5′－nucleotidase，5′－NT）测定主要用于肝胆疾病的临床诊断，但在国内外应用并不广泛，主要原因在于此酶测定的影响因素较多。主要有以下几种测定方法：

1）定量磷酸释放比色法因操作麻烦，标本需除蛋白，难以自动化，很少使用。

2）偶联腺苷酶通过腺苷释放氨，用Berthelot 反应（酚－次氯酸盐）显色进行测定。手工方法的灵敏度、准确性均好。

3）偶联腺苷酶和谷氨酸脱氢酶紫外分光光度法灵敏度、准确性均好，可在自动化分析仪上做连续监测，应用较多，本节介绍此法。

【原理】

$$5'\text{－磷酸腺苷}+H_2O \xrightarrow{5'\text{－NT}} \text{腺苷}+\text{磷酸}$$

$$\text{腺苷}+H_2O \xrightarrow{\text{腺苷脱氨酶}} \text{次黄嘌呤核苷酸}+\text{铵离子}$$

$$\text{铵离子}+\alpha\text{－酮戊二酸}+NADH \xrightarrow{\text{谷氨酸脱氢酶}} \text{L－谷氨酸}+NAD^{+}+H_2O$$

上述反应体系中，NADH 浓度的下降速率与5′－NT 活性成正比。

【试剂】

1）底物缓冲液：21.82g 三乙醇胺盐酸盐、3.08g L－亮氨酸、987mg α－酮戊二酸钠盐、19.97g 含5 分子结晶水甘油－2－磷酸盐、0.198mg 含1 分子结晶水硫酸锰，溶解于900ml 去离子水中，用0.1mol/L 的盐酸溶液调节pH 至7.6，最后稀释至1L。－20℃保存稳定6～12 个月。

2）NADH 溶液：临用前取134.8mg NADH 二钠盐溶于5ml 去离子水中。

3）腺苷脱氨酶溶液：将酶配于甘油－磷酸钾缓冲液中，50％（V/V）甘油中加入10mmol/L 磷酸钾溶液，酶的浓度为400kU/L。4℃稳定6～12 个月。

4）谷氨酸脱氢酶溶液：以50％（V/V）的甘油为溶剂，酶浓度为1200kU/L。4℃稳定6～12 个月。

5）23mmol/L 磷酸腺苷二钠（5′－AMP）溶液。

6）工作试剂：10ml 底物缓冲液，0.1ml NADH 溶液，0.01ml 腺苷脱氨酶溶液，0.1ml 谷氨酸脱氢酶溶液，混合即成。

【操作】

1）一般采用自动分析仪检测，按试剂盒和仪器说明书要求设置分析参数。不同厂家试剂盒的配方有差异，应严格按照试剂盒说明书设定反应时间和样品体积比。以下参数可供参考：工作试剂与样品的体积比为10∶1，37℃5min，加入5′－AMP 溶液0.1ml，3min 后，在波长340nm 处测定每分钟吸光度值变化（ΔA/min）。

2）若采用手工法，所用分光光度计需配有恒温比色系统及340nm 波长。工作试剂与样品的孵育时间可适当延长，应按试剂盒说明操作。

【计算】

5′－NT 活性（U/L）＝1608×（ΔA/min）。

【参考值】

0～11U/L。

正常成年人不同性别血清5′－NT 活性无区别，但60 岁以上人群5′－NT 活性随年龄的增加而增加，尤其女性增加更为明显。儿童血清5′－NT 活性与成年人基本一致。

【注意事项】

血清铵离子浓度增高、重度溶血、高脂血症等因素可影响测定结果。

【临床意义】

5′－NT 活性增高主要见于肝胆疾病。在多数情况下，5′－NT 活性与碱性磷酸酶的活性相关，但在以下情况则不一定。

1）在肝外胆道梗阻时，5′－NT 活性一般与碱性磷酸酶相平行，但短期梗阻时5′－NT 活性一般不会增高，当较长期的梗阻解除后，5′－NT 活性的下降比碱性磷酸酶快。

2）在胆汁淤积并发胆管炎、原发性和继发性胆汁性肝硬化和慢性肝炎时，5′－NT 活性升高比例大于碱性磷酸酶；肝脏肿瘤和肝肉芽肿时，5′－NT 活性升高甚于碱性磷酸酶；乙醇性肝硬化时，5′－NT 活性一般不升高；肝功能衰竭时5′－NT 活性正常。

3）碱性磷酸酶来源于骨组织时，5′－NT 活性正常而碱性磷酸酶活性升高。

4）儿童和婴儿肝病时5′－NT 活性变化较碱性磷酸酶敏感而具有特异性；新生儿肝炎5′－NT 活性升高多小于2.5 倍；肝外胆管闭锁时5′－NT 活性升高多大于3 倍。

5）妊娠期肝内胆汁淤积时5′－NT 活性变化亦较碱性磷酸酶敏感而特异。

第十五节　血清α－L －岩藻糖苷酶测定

血清α－L －岩藻糖苷酶（α－L －fucosidase，AFU）测定有荧光法和比色法两类。荧光法的底物为4 －甲基伞型酮α－L －岩藻吡喃糖苷，该法灵敏度高，但需专门的仪器，

临床常规应用有困难。比色法常用的底物是对硝基酚α—L－岩藻吡喃糖苷，适用于手工终点法测定，同时应作样品对照以除去胆红素导致的负干扰。将此法改为连续监测法后，检测灵敏度很低，常出现负值。而新底物2－氯—4－硝基酚α—L－岩藻吡喃糖苷，经AFU 水解释放出的2－氯－对硝基酚解离常数（pKa）为5.5，在AFU 的最适pH4.8时有相当高的显色强度，适合速率法测定。

一、终点法

【原理】

对硝基苯酚－α—L－岩藻糖苷（pNPF）在AFU 催化下水解，生成α—L－岩藻糖和对硝基苯酚，后者在碱性溶液中呈黄色。

【试剂】

1）0.1mol/L 醋酸缓冲液：含3 分子结晶水醋酸钠13.61g，氯化钠5.85g，冰醋酸3.0ml，加蒸馏水溶解后在pH 计下用冰醋酸或氢氧化钠溶液调节pH 至5.0，加蒸馏水至1L。冰箱保存。

2）0.2mol/L 甘氨酸缓冲液：甘氨酸15.01g，氯化钠5.85g，1mol/L 氢氧化钠溶液192.2ml，加蒸馏水至1L。在pH 计下用氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节pH 至10.7，冰箱保存。

3）底物溶液（1.5mmol/L）：对硝基苯酚－α—L－岩藻糖苷42.8mg，溶于100ml 0.1mol/L 醋酸缓冲液中，冰箱保存。

【操作】

按表4—4—13 步骤操作。各管置37℃水浴中准确保温60min，立即向各管中加入0.2mol/L 甘氨酸缓冲液2ml，混匀，终止酶促反应并显色。分光光度计401nm，1.0cm光径，空白管调零，分别读取测定管吸光度值和对照管吸光度值。

【计算】

$$\text{AFU 活性（U/L）}=\frac{(\text{测定管吸光度值}-\text{对照管吸光度值})\times 10^{6}}{18600}\times 60\times\frac{3.1}{0.1}$$

$$=(\text{测定管吸光度值}-\text{对照管吸光度值})\times 27.78$$

式中18600 为对硝基苯酚的摩尔吸光系数。

表4—4—13　AFU 测定终点法操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管	空白管
待测血清	0.10	0.10	
蒸馏水	0.10		
醋酸缓冲液	1.0		
底物溶液（37℃）	1.0	1.0	

【参考值】

（6.9 ±3.4）U/L。

【注意事项】

本法线性范围≤48U/L，酶促反应线性时间为60min。批内CV1.41%，批间CV2.20%。

二、连续监测法

【原理】

血清中AFU 催化2－氯－对硝基酚α－L－岩藻吡喃糖苷（CNPF）水解生成2－氯－对硝基酚（CNP），用自动生化分析仪于405nm 或410nm 波长处监测CNP 的生成速率，可推算出AFU 活性。

【试剂】

5mmol/L 底物溶液：160mg CNPF 溶于100ml 100mmol/L pH4.8 的柠檬酸－磷酸氢二钠缓冲液中。

【操作】

自动分析采用速率法，参数包括：温度37℃；波长405nm 或410nm（主）/500nm（次）；样品体积25μl；试剂体积225μl；延迟时间90s；测定时间90s；计算因子2127（405nm）、2044（410nm）。

【计算】

$$\text{AFU 活性（U/L）}=\frac{(10\text{A/min})\times TV\times 10^{6}}{\varepsilon\times SV}=(10\text{A/min})\times 2127\ (405/500\text{nm})$$

$$=(10\text{A/min})\times 2044\ (410/500\text{nm})$$

式中ε为摩尔吸光系数，405nm 时为4700；410nm 时为4516。

【参考值】

（27.1 ±12.8）U/L。

【注意事项】

本法（y）与PNPF 终点法（x）比较有良好相关性：y =3.823x －3.884，r =0.950，n =32。批内CV <2.6%，线性范围为244.5U/L。胆红素427μmol/L、抗坏血酸6g/L 以下对测定结果均无明显干扰。

【临床意义】

1）肝脏疾病：原发性肝癌患者血清AFU 活性不仅高于正常对照，而且也高于转移性肝癌、胆管细胞癌、恶性间皮瘤、恶性血管内皮细胞瘤、肝硬化、先天性肝囊肿和其它良性肝占位性病变患者。一般认为，诊断原发性肝癌AFU 的敏感性高于甲胎蛋白，

特异性则不如甲胎蛋白。AFU 与甲胎蛋白无明显相关，两者联合检测可提高肝癌的检出率，特别是对甲胎蛋白检测阴性和小细胞肝癌患者的诊断价值更大。

慢性肝炎和肝硬化患者血清AFU 活性升高，但一般仅轻度升高，且随疾病的治愈和好转而恢复正常；原发性肝癌患者的血清AFU 活性持续升高，且幅度较大，可资鉴别。

血清AFU 活性与转移性肝癌患者原发病灶是否在消化道、与原发性肝癌患者肿瘤转移与否及分化程度无关。血清AFU 活性还可作为原发性肝癌术后监测较理想的指标，其变化与病情严重程度相平行，且早于临床表现1～2 个月，故可作为原发性肝癌疗效和预后判断的指标。

（2）妊娠：血清AFU 活性随妊娠周数的升高而增加，在自然分娩或人工终止妊娠后，AFU 活性迅速下降，5d 后降至正常。

第十六节　葡萄糖－6－磷酸脱氢酶测定

连续监测法

【原理】

红细胞葡萄糖－6－磷酸脱氢酶（G6PD）催化葡萄糖－6－磷酸（G－6－P）氧化成6－磷酸葡萄糖酸内酯，后者很快氧化成6－磷酸葡萄糖酸（6－PGA），同时NADP 被还原成NADPH。在波长340nm 处测定NADPH 生成量，计算G6PD 的活性。

红细胞内还含有6－磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6－PGAD），催化6－PGA 脱羧，生成核酮糖－5－磷酸，可同时使NADP 还原成NADPH。因此，由（6－PGA＋G－6－P）组成的底物系统测得的活性减去单独6－PGA 底物测得的活性，即为G6PD 的活性。

【试剂】

（1）Tris－盐酸－EDTA 缓冲液（pH8.0）：Tris 30.25g、EDTA 钠盐0.42g，用去离子水溶解，以5mol/L 盐酸溶液调pH 至8.0（25℃），用去离子水稀释至250ml。

（2）0.1mol/L 氯化镁溶液：含6 分子结晶水氯化镁5.08g 溶于去离子水中，稀释至250ml。

（3）2mmol/LNADP 溶液：NADP10mg，加去离子水6.5ml，溶解。

（4）6mmol/LG－6－P 溶液：G－6－P 二钠21.5mg，加去离子水10ml，溶解。

（5）6mmol/L6－PGA 溶液：6－PGA 三钠20.6mg，加去离子水10ml，溶解。

上述试剂在－20℃存放，可稳定数月。

【操作】

按表4－4－14 步骤操作。各管混匀，在37 ℃，波长340nm，以空白管调零，读测定管吸光度值，每隔1min 读取1 次吸光度，共读6 次（由5min 吸光度的变化，求每分钟吸光度增加的平均值(ΔA/min）。

表4－4－14　G－6－PD 测定操作步骤

加入物（ml）	6－PGAD		6－PGAD＋G6PD	
	1（空白管）	2（测定管）	3（空白管）	4（测定管）
Tris－盐酸－EDTA 缓冲液	0.3	0.3	0.3	0.3
氯化镁溶液	0.3	0.3	0.3	0.3
NADP 溶液	0.3	0.3	0.3	0.3
溶血液（见附注）	0.06	0.06	0.06	0.06
去离子水	2.04	1.74	2.04	1.44
混匀，置37 ℃水浴10min				
G－6－P 溶液				0.3
6－PGA 溶液		0.3		0.3

【计算】

$$\text{酶活性（U/L）} = \frac{(\Delta A/\text{min}) \times 1000}{6.22} \times \frac{3.0}{0.06}$$

$$\text{酶活性（U/gHb）} = \frac{(\Delta A/\text{min}) \times 8040}{\text{Hb（g/L）}}$$

式中6.22 为NADPH 的毫摩尔吸光系数，3.0 为反应液总体积，0.06 为溶血液体积。

G6PD 活性＝（6PGAD＋G6PD）活性－6PGAD 活性

【参考值】

6.5～9.3U/gHb（37 ℃）。

【注意事项】

1）溶血液制备：新鲜抗凝血离心去上清液及白细胞层，用9g/L 氯化钠溶液洗涤2次，再加9g/L 氯化钠溶液使红细胞容积约为30％。将此红细胞悬液置冰水备用。用时以去离子水作25 倍稀释，即为溶血液。用氰化血红蛋白法测定溶血液中血红蛋白浓度（g/L）。

2）如每两分钟读数差异过大，应增加比色次数，直至连续5min 间读数接近为止。

【临床意义】

红细胞G6PD 催化反应生成的NADPH 是谷胱甘肽还原酶的辅酶，还原型谷胱甘肽（GSH）是保持血红蛋白稳定性及红细胞膜完整性的必要条件。红细胞G6PD 缺乏者，在服用某些药物（如抗疟药伯氨喹啉、磺胺药等）及食用蚕豆后，机体代谢产生的自由基，或与氧合血红蛋白作用后形成的过氧化氢，使GSH 氧化成氧化型谷胱苷肽

（GSSG）。由于GSH 降低，Hb 的巯基失去保护，被氧化变形形成Heinz 小体。红细胞膜失去巯基保护而功能受损，终致溶血。G6PD 的基因位于X 染色体上，通过女性遗传，患者以男性居多。临床上检查红细胞G6PD 主要用于诊断G6PD 基因缺陷引起的溶血性贫血。

第十七节　N－乙酰β－氨基葡萄糖苷酶测定

对硝基酚终点法

【原理】

N－乙酰β－氨基葡萄糖苷酶（N－acetylβ－aminoglucosidase，NAG）作用于底物对硝基酚－N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷，水解释放出游离对硝基酚。加入碱性溶液停止酶促反应后，在波长405nm 处测吸光度，根据校准曲线或摩尔吸光系数计算酶活性单位。

【试剂】

1）50mmol/L 枸橼酸盐缓冲液（pH4.6）：含1 分子结晶水枸橼酸5.4g，含2 分子结晶水枸橼酸三钠10g，用去离子水溶解并稀释至1L。

2）底物溶液（10mmol/L）：对硝基酚－N－乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷342.3mg，用上述缓冲液稀释至100ml，4℃保存可稳定10d。

3）50mmol/L 碱性缓冲液（pH9.8）：含2 分子结晶水硼砂4.77g，用适量去离子水溶解后，加0.2mol/L 氢氧化钠溶液170ml，再用去离子水溶解并稀释至1L。

4）3mmol/L 对硝基酚校准液：经过测试合乎要求（见附注）的对硝基酚41.7mg，用去离子水溶解并稀释至100ml，置冰箱保存。

【操作】

1）标本测定：按表4－4－15 步骤操作。各管混匀，以去离子水调零，波长405nm，读取吸光度值。测定管吸光度值减去对照管吸光度值查校准曲线。

表4－4－15　NAG 测定对硝基酚终点法操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管
待测血清	0.2	0.2
	37℃水浴3min	
底物溶液	1.0	
	37℃水浴3min	
碱性缓冲液	4.0	4.0
底物溶液	1.0	

1）校准曲线制作：按表4－4－16步骤稀释一系列校准液，然后各吸出0.2ml于另一组试管中，加pH4.6枸橼酸盐缓冲液1ml，混匀，再加碱性缓冲液4ml，混匀后比色如前，但须用试剂空白管调零。1、2、3、4、5、6管NAG活性分别为10、0、0、0、0、0U/L。

表4－4－16　校准液稀释步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	5	6
对硝基酚校准液	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
去离子水	4.75	4.50	4.25	4.00	3.75	3.50

【参考值】

血清NAG活性为15～28U/L；尿NAG活性值呈偏态分布，中位数为9.13U/g肌酐，第95百分位数为16.10U/g肌酐。

应建立各实验室参考范围。

【注意事项】

1）对硝基酚纯度及其摩尔吸光系数的检测：所用对硝基酚应是纯化的，配制前置50℃干燥24h，并用10mmol/L氢氧化钠溶液配成0.04mmol/L浓度；用窄带宽分光光度计扫描吸收曲线，λ_{max}应为401nm；根据IFCC标准，Aλ_{max}=0.7316～0.7388，$\varepsilon\lambda_{max}$=18380±90（25℃）。在本实验条件下（包括缓冲液种类及pH值、温度等）对硝基酚在波长405nm的ε值未见文献报道，各实验室可根据条件自行测定。根据对硝基酚的摩尔吸光系数计算NAG活性单位如下：

$$\text{NAG活性（U/L）}=\text{（测定管吸光度值－对照管吸光度值）}\times\frac{106}{18380}\times\frac{5.2}{0.2}\times\frac{1}{15}$$

2）底物溶解度小，配制底物溶液时，应先用适量pH4.6缓冲液将底物调成糊状，再逐渐加缓冲液到所需量。

3）用窄带宽分光光度计，吸光度在1.0及以下或酶活性在90U/L及以下时呈线性；用非窄带宽分光光度计，吸光度在0.6及以下或酶活性在60U/L及以下时呈线性，超过此限度应稀释后重新检测。

4）尿NAG活性以每克肌酐计算，故不必留24h尿。

【临床意义】

1）肾小管损害：尿NAG活性增高是肾小管损害较敏感的指标，常见于急慢性肾炎、休克引起的肾衰竭、肾病综合征、流行性出血热、中毒性肾病。肾病恢复期或肾实质病变不严重时，增高不明显。下泌尿道感染和尿路结石时，尿NAG活性一般正常。

2）肾移植后排斥反应：尿NAG 活性测定可早期发现肾移植患者排斥反应，一般在临床出现各种指征前1～3d 即有尿NAG 活性增高。

3）其他：肝硬化和慢性活动性肝炎晚期，肝组织有纤维化倾向者，血清NAG 活性升高；中、晚期妊娠，血清中NAG 活性亦升高。

第十八节　血管紧张素转换酶测定

血管紧张素转换酶（angiotensin conver tase，ACE），按系统命名法为肽酰二肽水解酶。血清ACE 测定方法有生物法、分光光度法、放射性同位素法、荧光光度法、高效液相色谱法和免疫学测定法等，目前使用较多的是分光光度法。

一、紫外分光光度法

【原理】

ACE 水解底物马尿酰甘氨酰甘氨酸（HGG），生成甘氨酰甘氨酸和马尿酸，提取马尿酸，测定在波长228nm 处吸光度的变化，其与马尿酸含量及ACE 的活性成正比。

【试剂】

1）底物溶液：Tris 6.32g，马尿酰甘氨酰甘氨酸3.35g，硫酸钠85.2g，氯化钠5.85g，去离子水溶解后用0.5mol/L 硫酸溶液调pH 至7.1，用去离子水稀释至1L。

2）醋酸乙酯。

3）1mol/L 盐酸溶液。

4）1mol/L 氯化钠溶液。

【操作】

按表4－4－17 步骤操作。振摇1min，波长228nm 处空白管调零，读取测定管吸光度值。

表4－4－17　紫外分光光度法测定ACE 操作步骤

加入物（ml）	空白管	测定管
底物溶液	0.1	0.1
1mol/L 盐酸溶液	0.25	
待测血清	0.15	0.15
	混匀，37℃水浴60min	
1mol/L 盐酸溶液	0.25	
	放置5min	
醋酸乙酯	1.5	1.5
振摇1min，1500g 离，10min。各取上清液0.5ml，置120～130℃恒温器蒸发15min		
1mol/L 氯化钠溶液	3.0	3.0

【计算】

ACE 活性（U/L）＝测定管吸光度值×$\frac{TV \times 1000}{SV \times \varepsilon \times X \times t \times P}$＝测定管吸光度值×107.2

式中TV 为反应液总体积（3ml）；SV 为样品体积（0.05ml）；ε为马尿酸毫摩尔吸光系数（0.6）；X 为马尿酸提取率（0.88）；t 为酶促反应时间（60min）；P 为光径（1.0cm）。

【参考值】

22～43U/L。

二、三硝基苯磺酸钠显色法

【原理】

ACE 水解底物马尿酰甘氨酰甘氨酸，生成甘氨酰甘氨酸，后者与三硝基苯磺酸钠（TNBS）作用，生成黄色三硝基苯甘氨酰甘氨酸，其含量与ACE 活性成正比。

【试剂】

1）底物溶液：Tris 6.32g，马尿酰甘氨酰甘氨酸7.18g，硫酸钠56.8g，氯化钠17.55g，去离子水溶解后用0.2mol/L 硫酸溶液调pH 至7.1，去离子水稀释至1L。

2）0.1mol/L 硼酸盐缓冲液（pH9.0）。

3）100g/L 钨酸钠溶液。

4）47g/L 硫酸钠溶液。

5）60mmol/LTNBS 溶液。

6）40mmol/L 甘氨酰甘氨酸溶液。

【操作】

按表4－4－18 步骤操作。各管混匀，37℃15min，波长420nm 处，空白管调零，读取测定管吸光度值。

表4－4－18　TNBS 显色法测定ACE 操作步骤

加入物（ml）	空白管	测定管
待测血清	0.01	0.01
底物溶液	0.1	0.1
钨酸钠溶液	0.1	
硫酸钠溶液	0.1	
	37℃水浴30min	
钨酸钠溶液	0.1	
硫酸钠溶液	0.1	
去离子水	1.0	1.0
	混匀，1500g 离，10min，取上清液0.75ml	
硼酸盐缓冲液	1.0	1.0
TNBS 溶液	0.05	0.05

【计算】

$$\text{ACE 活性（U/L）}=\frac{\text{测定管吸光度值}\times10^{6}\times1.31\times1.8}{17481\times0.5\times30\times0.01\times0.75}=\text{测定管吸光度值}\times1200$$

式中10^{6}为mol 换算为μmol 的系数；1.31 为初次反应体积（ml）；1.8 为比色时体积（ml）；17481 为显色产物三硝基苯甘氨酰甘氨酸摩尔吸光系数，0.5 为比色杯光径（cm），30 为酶促反应时间（min），0.01 为待测血清体积（ml），0.75 为上清液体积（ml）。

【参考值】

140～460U/L。

【临床意义】

大多数结节病活动期患者ACE 活性升高。血中ACE 活性的升高与巨噬细胞增多有关。

在肺部疾患、血液病、甲状腺功能亢进、糖尿病、肾脏病等疾病患者亦存在血清ACE 活性改变。

第五章　元机离子测定

第一节　钾、钠测定

血清或尿液钾、钠测定是评价体内电解质平衡的重要指标。用于钾、钠测定的方法有：原子吸收光谱法、火焰光度法、离子选择电极法、酶法及化学比色法等。原子吸收光谱法具有灵敏度较高，测定原子间光谱干扰较少，测定的精密度和准确度较高等优点，但测定不同元素时，须更换专用空心阴极灯光源，给临床应用带来不便。火焰光度法虽然测定变异系数相对较大，安全性较差，但仍然是钾、钠测定的参考方法。离子选择电极法重复性好、快速、安全，目前在实验室中广泛应用。酶法可以在自动生化分析仪上比色测定，不必增加设备，但要注意交叉污染引起的误差。

一、火焰光度法

【原理】

火焰光度法测定钾、钠是一种原子发射光谱分析技术。待测标本中钾钠原子受火焰热能的激发，从基态变成激发态，当从激发态返回到基态时，可发射出元素特征性光谱，钠为黄光（589nm），钾为红光（767nm），可用火焰光电比色计间接测量其在标本中的浓度。

【试剂】

（1）钾、钠校准贮存液（钾4mmol/L，钠140mmol/L）：称取基准级干燥至恒重的氯化钾298.2mg、氯化钠8.184g，用去离子水溶解至1L（20℃），贮存在塑料瓶中。

（2）钾、钠校准应用液（钾0.04mmol/L，钠1.4mmol/L）：准确吸取钾钠校准贮存液10ml，用去离子水稀释至1L，贮存在塑料瓶中备用。

【仪器】

不同型号的仪器性能略有差异，一般可分为无内标（目前国内常用）和有锂或铯内标的两类仪器，基本部件由以下3 部分组成：

（1）供气装置：由空气压缩泵提供压缩空气作为喷雾气源；燃气常用丙烷，也可用液化石油气代替。

2）喷雾和燃烧装置：压缩空气进入喷雾装置时，同时吸人经稀释的样品液，后者与高压空气相遇发生雾化，与一定比例的燃气混合后，到达燃烧器。燃烧器一般有10～15 个小喷嘴，使产生的火焰束能汇集成均匀的火焰团。

3）光电检测装置：样品喷雾后在火焰激发下产生的元素特征性光谱，通过相应波长的干涉滤光片，被光电池或光电管转变为电信号，经计算电路处理，在表头或显示器上可读出发射光强度。

【操作】

1）样品准备：血清、质控液用去离子水1∶100 稀释；尿液中钾含量较高，可用去离子水1∶500～1∶1000 稀释；尿钠可按1∶100 稀释。

2）仪器准备：由于仪器型号不同，操作方法也不同，使用前应详细阅读有关仪器操作说明，以下操作步骤仅供参考。①检查各管道是否接好，并检查检流计表头是否置于零点，再接通电源。②选定使用的滤光片，钾滤光片为深红色，波长767nm ；钠滤光片为黄色，波长589nm ，镜面对火焰，推入光路。③开启空气压缩机，调节空气流量，维持规定压力；开燃气，调节至规定流量，立即点火，火点燃后，适当调节空气和燃气的比例，使火焰呈现最佳状态，火焰呈现蔚蓝色，无黄光或其他杂光，并有适当的强度。④打开检流计开关，选择读数灵敏度，以校准应用液能调到满刻度为宜。

3）样品测定：①以去离子水为空白，转动调零旋钮使检流计表头恢复至零位。②吸入校准应用液，并转动调标旋钮使表头读数分别代表钾、钠校准液的浓度。③重复调零或调标准，待读数稳定后测定质控液、待测标本，并经常以校准液核对标准读数，防止定标漂移而发生误差。④测定完毕后，用去离子水喷雾3～5min ，以清洁样品通道，然后关闭检流计、燃气，待火焰熄灭后，关空气压缩机，切断电源。

【计算】

按仪器状态不同分别使用两种方法。

1）仪器线性通过零点：

$$\text{钾或钠浓度}\ (\text{mmol/L}) = \frac{\text{测定液光强度}}{\text{校准液光强度}} \times \text{校准液钠或钾浓度}\ (\text{mmol/L})$$

2）仪器线性不良或有较大截距，尤其是钠测定线性范围狭窄，应配制110 、140 、160mmol/L 钠浓度的校准液，内含钾4mmol/L ，按测定方法用140mmol/L 钠校准应用液定标后，测定110 、160mmol/L 钠校准应用液的光强度，以理论浓度值为X ，光强度值为Y ，在座标纸上绘制曲线或进行统计学线性处理，用于结果计算。

【注意事项】

1）红细胞内的钾浓度大约是血清中的20 倍，故标本不能溶血，血细胞分离必须良好，应在标本采集后3h 内完成测定，以防细胞内、外离子交换，对结果造成影响。

(2) 空气压缩机最好选用无油型，并在管道中连接油水分离器和空气滤过装置，防止灰尘或油雾进入火焰燃烧区，影响读数的稳定性。并注意开机时先开压缩空气，后开燃气；关机时先关燃气，后关压缩空气。

(3) 火焰光度法测定中最大弱点是读数漂移较大，因此，应尽量保持气源（压缩空气和燃气）的稳定，并注意压缩空气管道有否积水等。

(4) 稀释校准液、标本和空白对照的水质应一致，以防发生系统偏差，每批测定必须随带质控标本。

(5) 用铯（锂）内标火焰光度法测定钾、钠时，测定结果受燃气、压缩空气和火焰温度的波动影响较小，稳定性较好。

二、离子选择电极法

【原理】

离子选择电极是一种电化学敏感器，它能对特定离子产生响应，通过与参比电极构成的电化学测量回路，可选择性地测定溶液中特定离子的活度。钾电极的离子选择性材料是含缬氨霉素的PVC 膜，钠电极是二氧化硅基质中氧化钠和氧化铝分子构成的玻璃膜。当离子选择电极置于测量溶液中，敏感膜与溶液界面的离子发生交换或扩散而产生膜电位，通过与参比电极相比较测得电极电位。待测标本的离子活度与电极电位关系符合下述Nernst 方程：

$$E = E_0 + \frac{RT}{ZF}\lg a \quad (1)$$

式中E 为测得的电位；E_0 为标准电极电位（常数）；R 为气体常数；T 为绝对温度；F 为法拉第常数；Z 为离子价；a (1) 为离子的活度。

由公式可见，测得的电极电位与离子活度的对数成比例，当活度系数保持恒定时，电极电位与离子浓度的对数也成比例，以此可求出溶液中离子的浓度。

离子选择电极法分为直接法和间接法两种。直接法是指标本（全血、血浆、血清）不经稀释直接上机测定；间接法是指标本（血清或血浆）用一定离子强度与pH 值的稀释液按一定比例稀释后再上机测定。

【试剂】

离子选择电极法测定钾、钠，一般由仪器厂家提供试剂盒，不同仪器试剂组分有些差别，通常包含以下4 种试剂：

(1) 校准液：一般有两个浓度校准液，即高校准和低校准，是一种含有标准钾、钠浓度的缓冲液，pH 值一般在7.4 左右。分析样品前必须用这两种校准液以两点定标的方式建立测定的斜率曲线。

2）饱和氯化钾溶液：用分析纯以上的氯化钾配制（25 ℃）。用作参比电极的电极液。

3）电极液：用于钾、钠测量电极的内填充。

4）电极保养液：一般有两种溶液，一种是去蛋白液，为酸性胃蛋白酶溶液或弱碱性胰蛋白酶溶液，用于除去测定毛细管道中粘附的蛋白质和脂类；另一种是玻璃膜电极的保养剂，常用氟化氢铵配制，对玻璃膜电极有蚀化作用，电极浸泡后可恢复反应敏感性。

【操作】

由于仪器型号不一，使用方法也有所不同，一般包括下列步骤：

1）开机程序：开启电源后，仪器自检，冲洗管道，等候电路稳定。

2）定标：可分为全自动液体循环自动定标和手工提供校准液定标，多数离子选择电极直接法定标为前者，离子选择电极间接法定标为后者。每天开机首次定标一般均需做两点定标，即用高低两种浓度的校准液做线性测定。仪器均有规定的斜率范围，如果超出规定范围为定标失败，说明测量电极响应不佳或校准液浓度与理论值误差较大，或电极需要维护。

3）测定质控液、待测标本。

4）显示或打印结果。

5）关机：每天使用完毕后先清洗管道再关机。

【注意事项】

1）离子选择电极测定用的毛细管通道，容易被血清蛋白、脂质等粘附，必须按仪器的操作规程进行清洗保养。一般样品通道可用酸性胃蛋白酶溶液除去粘附的蛋白；玻璃膜钠电极使用一些时间后会出现反应迟钝，可用氟化氢铵溶液清洗，恢复其反应敏感性。大型生化分析仪中离子选择电极部分，每天使用后必须进行认真的保养。单独的离子选择电极仪器最好不要关机，保持连续运行状态。由于定时不断的自动冲洗，可保持管道清洁，延长电极寿命，并可防止参比电极氯化钾反渗而造成对钾电极的损坏。

2）在证实标本不溶血情况下，离子选择电极直接法可采用全血，与血浆或血清标本测定结果相似。

3）一般离子选择电极直接法比火焰光度法测定结果约高5 %～8 %，为了使这两者相符，仪器多已作系统校正。但在高脂、高蛋白或低蛋白标本，两者结果存在较大差异。间接离子选择电极法与火焰光度法测定结果基本一致。

三、酶法

㈠ 钾酶法测定

【原理】

磷酸烯醇式丙酮酸在钾依赖性丙酮酸激酶的作用下生成丙酮酸，后者在乳酸脱氢酶的催化下生成乳酸，并使NADH 转化为NAD^+，反应液在波长340nm 处吸光度的下降与钾浓度成正比。反应式如下：

$$\text{磷酸烯醇式丙酮酸}+\text{ADP}\xrightarrow{\text{丙酮酸激酶，}K^+}\text{丙酮酸}+\text{ATP}$$

$$\text{丙酮酸}+\text{NADH}+H^+\xrightarrow{\text{乳酸脱氢酶}}\text{乳酸}+\text{NAD}$$

【试剂】

1）试剂Ⅰ（缓冲液/酶/底物）：其中含Tris 缓冲液（pH8.2）250mmol/L，Cryptand（穴状配体）12mmol/L，磷酸烯醇式丙酮酸≥3.3mmol/L，ADP ≥3.15mmol/L，α-酮戊二酸≥1.2mmol/L，NADH ≥0.35mmol/L，谷氨酸脱氢酶≥11U/ml，丙酮酸激酶≥1.2U/ml。

2）试剂Ⅱ（酶/稀释液）：其中含乳酸脱氢酶≥65U/ml。

3）校准液：低值校准液2.50mmol/L，高值校准液8.00mmol/L。

【操作】

自动生化分析仪基本参数：样品（校准液、去离子水、血清）7μl，加试剂Ⅰ250μl，加试剂Ⅱ100μl，37℃孵育5min，主波长340nm、次波长415nm 处测定吸光度。

【注意事项】

1）线性范围：2～10mmol/L。

2）干扰因素：氨浓度≥500μmol/L、甘油三酯浓度≥8mmol/L 时可影响测定结果。

3）自动生化分析仪试剂位置编排时，应注意相邻试剂成分中钾和氨的交叉互染。

（二）钠酶法测定

【原理】

以邻-硝基苯基-β-D-吡喃型半乳糖（ONPG）作为底物，通过依赖钠的β-半乳糖苷酶测定钠浓度。反应产物邻-硝基苯酚在波长405nm 处吸光度值与钠浓度成正比。其反应式如下：

$$\text{ONPG}\xrightarrow{\beta\text{-半乳糖苷酶，}Na^+}\text{邻-硝基苯酚}+\text{半乳糖}$$

【试剂】

1）试剂Ⅰ（缓冲液/酶）：其中含Tris 缓冲液（pH9.0）450mmol/L，Cryptand（穴状配体）5.4mmol/L，β-半乳糖苷酶≥0.8U/ml。

2）试剂Ⅱ（底物）：其中含Tris 缓冲液（pH9.0）10.0mmol/L，ONPG5.5mmol/L。

3）校准液：低值校准液90mmol/L，高值校准液175mmol/L。

【操作】

自动生化分析仪基本参数：样品（校准液、去离子水、血清）10μl，加试剂Ⅰ

250μl，加试剂Ⅱ100μl，37℃孵育5min，主波长415nm、次波长660nm 处测定吸光度。

【注意事项】

1）线性范围：80～180mmol/L

2）自动生化分析仪上试剂位置编排时，应注意相邻试剂成分的交叉互染，钾、钠联合分析时，应将钾编排在钠以前。

【参考值】

血清钠浓度：136～145mmol/L；尿钠排泄量：130～260mmol/24h；血清钾浓度：3.5～5.3mmol/L；尿钾排泄量：25～100mmol/24h。

【临床意义】

1）血清钠浓度降低：血清钠浓度低于135mmol/L 为低钠血症。临床上常见于胃肠道失钠（如幽门梗阻、呕吐、腹泻、胃肠道胆道胰腺手术后造瘘、引流等都可丢失大量消化液而发生缺钠），尿钠排出增多（如严重肾盂肾炎，肾小管严重损害，肾上腺皮质功能不全，糖尿病，应用利尿剂治疗等），皮肤失钠（如大量出汗时，只补充水分而不补充钠）。大面积烧伤、创伤，钠从创口渗出液中大量丢失，亦可引起低血钠。抗利尿激素过多、肾病综合征时低蛋白血症、肝硬化腹水、右心衰竭时可致稀释性低钠血症。

2）血清钠浓度升高：血清钠浓度超过145mmol/L 为高钠血症，临床上较少见。可见于肾上腺皮质功能亢进，如库欣综合征、原发性醛固酮增多症，由于皮质激素的排钾保钠作用，使肾小管对钠的重吸收增加，出现高钠血症；严重脱水，体内失水分大于失钠发生高渗性脱水；中枢性尿崩症时抗利尿激素分泌量减少，尿量大增，若供水不足，血钠即增高。

3）血清钾浓度增高：可见于肾上腺皮质功能减退症、急性或慢性肾功能衰竭、休克、广泛软组织挤压伤、重度溶血、口服或注射钾盐过多等。

4）血清钾浓度降低：常见于严重腹泻、呕吐、肾上腺皮质功能亢进症、服用利尿剂、胰岛素治疗、钡盐与棉籽油中毒等。家族性周期性低钾性麻痹，发作时血清钾浓度可低至2.5mmol/L 左右，但在发作间歇时血清钾浓度正常。

第二节　氯化物测定

氯是细胞外液中主要的阴离子。血清、血浆、脑脊液、尿中的氯测定方法有：硝酸汞滴定法、硫氰酸汞比色法、库仑滴定法、离子选择电极法、酶法、同位素稀释质谱法等。库仑滴定法精密而又不受光学干扰，是氯测定的参考方法。目前实验室中应用最广泛的是离子选择电极法和硫氰酸汞比色法，前者常与钠钾在同一仪器上测定，方法类

似。本节介绍硝酸汞滴定法、硫氰酸汞比色法和库仑滴定法。

一、硝酸汞滴定法

【原理】

样品中氯离子可与硝酸汞溶液生成溶解而难解离的氯化汞。当滴定的硝酸汞过量时，汞离子与二苯卡巴踪络合成淡紫红色产物，根据硝酸汞的用量可计算氯化物的浓度。

【试剂】

1）氯校准液（100mmol/L）：基准级干燥至恒重氯化钠5.845g，溶于1L 去离子水中。

2）硝酸汞溶液（2.5mmol/L）：含1 分子结晶水硝酸汞0.81g，溶于0.3％稀硝酸溶液1L 中，放置数天，用100mmol/L 氯校准液标定，操作与测定方法相同，最后将硝酸汞稀释至2.5mmol/L。

3）稀硝酸溶液（0.05mol/L）。

4）二苯卡巴腙溶液（2g/L）：0.2g 二苯卡巴腙溶于95％乙醇100ml，置棕色瓶冰箱保存。溶液呈现紫红色应重新配制。

5）乙醚。

【操作】

取20mm ×150mm 的大试管3 支，按表4 -5 -1 步骤操作。

表4 -5 -1　硝酸汞滴定法测定氯化物操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测标本	0.1		
氯校准液	0.1		
去离子水	0.1		
稀硝酸溶液	2.0	2.0	2.0
二苯卡巴腙溶液	0.05	0.05	0.05

混匀，滴定前加乙醚2ml，分别用2.5mmol/L 硝酸汞溶液滴定，边滴边摇至乙醚层出现淡紫红色为终点，记录用去硝酸汞溶液的毫升数。

【计算】

$$\text{氯化物浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定管毫升数}-\text{空白管毫升数}}{\text{校准管毫升数}-\text{空白管毫升数}}\times\text{校准液氯化物浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）氯化物滴定时溶液的pH 值对呈色影响较大，宜在弱酸性条件下进行。pH 值偏大，指示剂自身呈紫红色；pH 值过小，终点不明显。

2）硝酸汞溶液经氯校准液标定后，室温存放比较稳定。每天校准液滴定值也应保持稳定。

3）硝酸汞滴定的定量管，最好采用5ml 固定的微量滴定管。滴定时加入乙醚是为了提高滴定终点判断的灵敏度，使产生的颜色抽提在乙醚层。黄疸、溶血标本可影响滴定终点的判断，应根据血清本底的颜色变化决定滴定终点。

二、硫氰酸汞比色法

【原理】

样品中氯离子与硫氰酸汞反应，置换出硫氰酸根，再与铁离子生成橙红色的硫氰酸铁，在一定的浓度范围内反应液色泽与其中氯含量成正比。

【试剂】

1）氯校准液（100mmol/L）：配制同本节硝酸汞滴定法。

2）显色剂：每升含硫氰酸钾1.18mmol，硝酸铁35mmol，硝酸108mmol，硝酸汞0.3mmol，用去离子水配制。

【操作】

按表4－5－2 步骤操作。各管混匀，室温放置5min，波长470～500nm 处空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－5－2　硫氰酸汞比色法测定氯化物操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测标本			0.02
氯校准液		0.02	
去离子水	0.02		
显色剂	4.01	4.0	4.0

【计算】

$$\text{氧化物浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管有误光度值}} \times \text{校准液氯化物浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）配制良好的显色试剂应基本呈无色或微黄色，呈色反应的灵敏度和线性范围可通过加入硝酸汞的量来调整，硝酸汞量增加呈色吸光度减低，反之，则吸光度增高。

2）该法线性范围70～130mmol/L，每次测定最好建立80、100、120mmol/L氯校准点，按曲线回归方程计算结果，在某些自动生化分析仪上可选用曲线回归方法。如果仅做一个校准点，可将100mmol/L氯校准点的显色吸光度调至0.33左右，这时检测结果的计算偏差最小。

3）除氯化物外，氟、溴、碘化合物同样可起呈色反应，正常情况下，这些物质在血清中含量少于1mmol/L，可以忽略不计，但服用溴化或碘化类药物时，这类化合物对检测干扰增大。

三、库仑滴定法

【原理】

在恒定的电流和不断搅拌的条件下，仪器银电极不断生成的银离子与样品中的氯离子作用，生成不溶性的氯化银沉淀。当样品中全部氯离子作用完全时，溶液中出现游离的银离子，此时溶液电导性明显增加，使仪器的传感装置和计时器立即切断电源并自动记录滴定所需的时间。溶液中氯化物浓度用法拉弟常数进行计算（96487库仑/摩尔氯化物），库仑与滴定时间和电流的乘积成正比。但在实际应用时不测电流，只需精确测定扣除空白以后的测定标本所需的时间，与校准液比较，最后由计算机自动换算成氯化物浓度。

【试剂】

1）硝酸－醋酸试剂：冰醋酸100ml，浓硝酸6.4ml，用去离子水配成1L。此溶液室温可稳定6个月。

2）聚乙烯吡咯烷酮（PVP）溶液：1.8gPVP溶于100ml去离子水中，搅拌加热溶解，冷却。立即用于配制酸性PVP溶液。

3）酸性PVP溶液：100mlPVP溶液与900ml硝酸－醋酸试剂混合，室温下至少稳定6个月。

4）氯化物校准液（100mmol/L）：配制方法与上法相同。

【操作】

向小杯中分装4ml酸性PVP溶液，分别吸取0.1ml样品、校准液、质控液、去离子水加入各杯，按仪器操作说明分别测定各杯时间。

【计算】

$$\text{氯化物浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定杯时间}-\text{空白杯时间}}{\text{校准杯时间}-\text{空白杯时间}}\times\text{校准液氯化物浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

库仑滴定法是一个经典的参考方法，由于需要专用设备，操作又不能全自动化，且

与钾、钠测定不在同一系统中，给操作带来不便，因此，不作为常规方法。

【参考值】

血清氯化物：96～106mmol/L；

脑脊液氯化物：120～132mmol/L；

尿液氯化物：150～250mmol/24h。

【临床意义】

1）血清氯化物浓度升高：见于脱水，摄取氯化物过多或不适当的输液，急、慢性肾小球肾炎，肾小管酸中毒引起的肾功能不全，尿崩症及肾上腺皮质功能亢进症。

2）血清氯化物浓度降低：见于剧烈呕吐，高碳酸氢根血症（代谢性碱中毒或呼吸性酸中毒）。

第三节　血清钙测定

目前测定血清总钙的常用方法是络合比色法，包括偶氮胂Ⅲ比色法、邻甲酚酞络合酮比色法和甲基麝香草酚蓝比色法。其中偶氮胂Ⅲ比色法因所用试剂稳定、方法重复性好，目前已普及应用。原子吸收光谱法为参考方法，离子选择电极法则可用来测定游离钙。

一、偶氮胂Ⅲ比色法

【原理】

在碱性条件下，游离的偶氮胂Ⅲ在溶液中呈玫瑰红色，与钙络合后形成紫蓝色偶氮胂Ⅲ－钙复合物，可在650nm 波长处比色测定。

【试剂】

1）硼酸盐缓冲液（50mmol/L，pH9.0）：硼酸24.72g，氯化钾29.84g，加去离子水5L 溶解，用1mol/L 氢氧化钠溶液滴定pH 至9.0（约需1mol/L 氢氧化钠溶液164～170ml），用去离子水加至6L。

2）偶氮砷Ⅲ（Arsenao Ⅲ，分子量776.4u）显色液：硼酸盐缓冲液6L，8－羟基喹啉—5 磺酸6.78g，偶氮砷Ⅲ480mg 加少量缓冲液，用玻棒研磨溶解），加TritonX－1004ml，混匀，室温下可稳定1 年。

3）钙校准液（2.5mmol/L）：干燥恒重的碳酸钙（分析纯）250mg，加去离子水50ml，加浓盐酸1ml，使其溶解，加去离子水至1L。

【操作】

取洁净试管［参见注意事项（1）］，按表4－5－3步骤操作。各管混匀，室温放置2min，650nm波长处以空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－5－3　偶氮胂Ⅲ比色法测定钙操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测标本			0.02
钙校准液		0.02	
去离子水	0.02		
偶氮胂Ⅲ显色液	3.0	3.0	3.0

【计算】

$$\text{钙浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液钙浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

（1）所有玻璃器皿要严格清洗，试管按一般碱法洗涤后，再用3%稀盐酸浸泡数小时（以除去沾附的碳酸钙）后用去离子水冲洗，或用清洁度良好的一次性塑料试管。

（2）偶氮胂Ⅲ用量增加，空白管吸光度增高；用量不足，则测定的线性上限下降。可根据不同批号产品，适当调整用量。

二、甲基麝香草酚蓝比色法

【原理】

血清中钙在碱性溶液中与甲基麝香草酚蓝（MTB）结合，生成一种蓝色的络合物，与同样处理的钙校准液进行比较，求得血清总钙的浓度。同时加入适量的8－羟基喹啉，可消除镁离子对测定结果的干扰。

【试剂】

（1）MTB液：8－羟基喹啉4.0g溶于50ml去离子水中，再加浓硫酸5ml，搅拌促使其溶解，移入1L容量瓶中，加MTB络合剂200mg，聚乙烯吡咯烷酮（PVP）6.0g，最后用去离子水稀释至刻度，储存于棕色瓶中，置冰箱保存。

（2）碱性溶液：取二乙胺溶液35ml于1L容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，在室温保存。

（3）钙校准液（2.5mmol/L）：配制同偶氮胂Ⅲ比色法。

【操作】

取洁净试管，按表4 -5 -4 步骤操作。各管混匀，10min 后在610nm 波长处以空白管调零，读取各管吸光度值。

表4 -5 -4　MTB 比色法测定钙操作步骤

加入物 (ml)	空白管	校准管	测定管
待测标本			0.05
钙校准液		0.05	
去离子水	0.05		
MTB 液	1.0	1.0	1.0
碱性溶液	3.0	3.0	3.0

【计算】

同偶氮肿III比色法。

【注意事项】

(1) 该法灵敏度高，器皿、试剂用水应无任何钙的污染。对玻璃器皿的要求同偶氮肿III法。

(2) 碱性试剂暴露于空气中易吸收二氧化碳，使试剂pH 值下降。MTB 与碱性试剂混合后不稳定，在只能采用单试剂的分析仪上使用时，应临用前按需要量混合。

【参考值】

血清总钙浓度：成人2.08～2.60mmol/L；儿童2.23～2.80mmol/L。

【临床意义】

1．血清钙浓度增高

常见于甲状旁腺功能亢进症患者，维生素D 过多患者，多发性骨髓瘤患者；结节病引起肠道过量吸收钙时亦可使血钙浓度增高。

2．血清钙浓度减低：

(1) 甲状旁腺功能减低症。

(2) 佝偻病与软骨病。

(3) 慢性肾炎、尿毒症：肾排磷障碍使血磷升高，引起血钙下降；又因肾功能不全使维生素D_1 羟化酶缺乏，而致活性维生素D 缺乏性低血钙。

(4) 急性坏死性胰腺炎：脂肪坏死后引起钙沉积。

(5) 其他：低蛋白血症、医源性枸橼酸盐和一些造影剂的应用，高降钙素血症、新生儿低血钙、脂肪痢、钙吸收不良等。

三、离子选择电极法测定离子钙

【原理】

钙离子选择电极膜与钙离子结合，如果钙离子在膜内、外两面分布不匀，将产生一个跨膜电位，因为电极内溶液离子钙浓度是恒定的，所以膜电位的变化与样品中离子钙浓度成正比。

【操作】

由于各种型号的离子钙分析仪结构不同，有的是专用型（只测定离子钙），有的是组合型，可同时测定钾离子、钠离子、氯离子或pH 值，因此，在操作上不尽相同，可参考各型操作说明书。

【参考值】

血清离子钙浓度：成人1.13～1.30mmol/L；儿童1.18～1.35mmol/L。

【注意事项】

1）Mclean 与Hastings 提出一个估算血清离子钙的公式：

$$\text{血清离子钙浓度（mmol/L）}=\frac{6\times Ca-TP/3}{TP+6}$$

式中Ca 为血清总钙质量浓度（mg/dl），TP 为血清总蛋白质量浓度（g/dl）。总钙和离子钙的单位换算均是：1mg/dl=0.25mmol/L。这个公式在血清蛋白、钙浓度严重异常时，对离子钙的估计往往不可靠，故在实际应用中有所限制。

2）测定离子钙最好用血清标本，它的优点是不需要用抗凝剂，稳定性较好，不会导致蛋白质对电极的污染。当急需测定结果时，可用肝素化全血。当抗凝剂枸橼酸盐、草酸盐或EDTA 与钙结合时，可以显著降低离子钙浓度，血浆肝素浓度达到30U/ml 时，能使离子钙浓度降低3%～5%。

3）血标本应密封储存，防止其中二氧化碳丢失致使其pH 值增加，而钙离子浓度下降。标本置4℃可稳定6h，储存时间过长，血内乳酸积聚，一方面乳酸根阴离子与大约相等的钙离子螯合使离子钙浓度下降；另一方面氢离子可使白蛋白释放出钙离子，从而增加钙离子浓度。

【临床意义】

1）低钙血症常发生在外科手术之后，因此，较大的外科手术（如心脏手术、肝移植等）后，需要测定离子钙，以决定是否需要补钙。

2）脓毒血症和肾、心、肺衰竭及烧伤患者，由于血清蛋白丧失和酸碱失衡，测定总钙已无意义，必须进行离子钙浓度的测定。

3）肾移植后或血液透析患者，钙代谢经常改变，而且有时变化很剧烈，因此，需

要经常监测离子钙水平，以保持良好的心脏功能。

4）甲状旁腺功能亢进时，离子钙浓度变化往往比总钙浓度变化更灵敏。严重的胰腺炎可出现持续的离子减少。

第四节　血清无机磷测定

由于人体中的磷元素还不能测定，目前测定的是磷酸盐中的磷。血清中一价和二价磷酸盐在不同pH 值条件下，快速地相互转换，因此，不能分别测定不同无机“磷酸盐”的分子形式，检测结果以毫摩尔报告比较确切。无机磷测定方法有磷钼酸直接比色法、磷钼酸蓝比色法、酶法等，前两法较常用。

一、对苯二酚－亚硫酸钠磷钼酸蓝比色法

【原理】

无机磷在酸性溶液中与钼酸铵生成磷钼酸复合物，后者可被对苯二酚－亚硫酸钠还原生成钼蓝，呈蓝色，在660nm 波长处比色测定。

【试剂】

1）200g/L 三氯醋酸溶液。

2）磷校准储存液（2.25mmol/L）：无水磷酸二氢钾4.39g，用去离子水溶解至1L。

3）磷校准应用液（1.29mmol/L）。

4）钼酸试剂：钼酸铵25g 加去离子水400ml 溶解，缓缓加入浓硫酸75ml，最后用去离子水加至500ml。

5）对苯二酚溶液：对苯二酚0.5g 溶于100ml 去离子水中，再加浓硫酸1 滴，置棕色瓶室温可保存1 个月。

6）亚硫酸钠溶液：亚硫酸钠20g 溶于去离子水中并定容至100ml，置棕色瓶室温保存，可使用两周。

【操作】

取血清0.5ml 加去离子水3.5ml 混匀后，边加边摇加入三氯醋酸溶液1ml，室温静止10min 后，过滤或离心沉淀，上清液按表4－5－5 步骤操作。各管混匀，25℃水浴30min，波长660nm 处以空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－5－5　磷钼酸蓝比色法操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测上清液			2.5
磷校准应用液		0.25	
去离子水	2.0	1.75	
三氯醋酸溶液	0.5	0.5	
钼酸试剂	0.5	0.5	0.5
亚硫酸钠溶液	0.5	0.5	0.5
对苯二酚溶液	0.5	0.5	0.5

【计算】

$$\text{血清无机磷浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准应用液磷浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）在测定管中加入三氯醋酸时，速度要慢，必须边滴边混匀，使蛋白沉淀物细致均匀，以防止出现粗大凝块包裹磷，使测定结果偏低。

2）红细胞内磷浓度是血清磷浓度的7倍，故溶血标本可使测定结果偏高。

3）对苯二酚溶液和亚硫酸钠溶液应定时新鲜配制，以防止失效。

二、铝酸铵直接比色法

【原理】

样品中磷酸盐在酸性溶液下与钼酸铵形成淡黄色难溶性磷铝酸复合物，后者与血清蛋白或Triton X－100形成可溶性复合物，增加显色灵敏度，可直接在340nm波长处比色测定。

【试剂】

1）磷校准应用液（1.29mmol/L）。

2）显色剂：每升含钼酸铵0.28mmol，硫酸130mmol，TritonX－1003ml。

3）空白试剂：每升含硫酸130mmol，Triton X－1003ml。

【操作】

按表4－5－6步骤操作。各管混匀，37℃水浴5min，波长340nm处空白管调零，读取各管吸光度值。本法适合自动化分析，基本参数为样品5μl，显色剂400μl，37℃保温

min，340nm 波长，终点法比色测定。建议设样品对照或用双波长比色。

表4－5－6　磷钼酸直接比色法操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管	对照管
待测血清			0.05	0.05
磷校准应用液			0.05	
去离子水	0.05			
显色剂	4.0	4.0	4.0	
空白试剂				4.0

【计算】

$$\text{血清磷浓度（mmol/L）}=\frac{\text{测定吸光度值}-\text{对照管吸光度值}}{\text{校准管有吸光度值}}\times\text{校准应用磷浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）该法不需除蛋白，反应快速，灵敏度也高，呈色非常稳定，不受血清中还原性物质干扰，适合自动化分析。

2）产物吸收峰在325nm 波长处，因此，比色波长可选择325～340nm，但随着波长加大，比色的灵敏度也下降。

3）校准材料以使用含蛋白的次级校准或定值血清为佳，若使用水溶性校准液，则反应物的吸光度比蛋白介质的校准液吸光度大约低5％，因此，采用水溶性校准液，测定结果会偏高。

【参考值】

成人0.96～1.62mmol/L；儿童1.45～2.10mmol/L。

【临床意义】

1）血清无机磷浓度增高：见于甲状旁腺功能减退症、慢性肾炎晚期、维生素D过多和多发性骨髓瘤及骨折愈合期。

2）血清无机磷浓度减低：见于甲状旁腺功能亢进、佝偻病或软骨病。连续静脉注入葡萄糖并同时注入胰岛素，胰腺瘤伴有胰岛素过多症患者，糖的利用均增加，这两种情况需要大量无机磷酸盐参加磷酸化作用，而使血磷下降。肾小管病变使肾小管重吸收磷功能发生障碍，血磷偏低，如范科尼综合征。

第五节　血清镁测定

镁测定的常用方法是络合比色法，参考方法是原子吸收光谱法，近年发展了酶学方法。

一、Galmagite 络合指示剂法

【原理】

血清中镁与络合指示剂Calmagite 反应，形成红色Calmagite 镁复合物，此复合物可在波长540nm 处比色测定。试剂中加入乙二醇双（β－氨基乙醚）四乙酸（EGTA）可防止钙的干扰，而氰化钾则防止重金属络合物的形成；表面活性剂防止蛋白质干扰，避免Calmagite 镁复合物吸收峰的偏移。

【试剂】

1）试剂A：每1L 去离子水中含Calmagite60mg，，氯化钾5.74g，聚乙烯吡咯烷酮0.91g。

2）试剂B：每1L 去离子水中含氰化钾1.0g，氢氧化钾15.8g，EGTA45mg。

3）镁校准贮存液（20mmol/L）：金属镁（除去表面氧化层）243.2mg 加去离子水约50ml，加浓硫酸2mL，完全溶解后加去离子水至500ml。

4）镁校准应用液（1mmol/L）：镁校准贮存液5ml，用去离子水稀释至100ml。

5）显色应用液：试剂A 与试剂B 等量混合。

【操作】

按表4－5－7 步骤操作。将各管混匀，置室温5min，波长540mm 处空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－5－7　Calmagite 法测定镁操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管	对照管
待测血清			0.05	0.05
镁校准应用液		0.05		
去离子水	0.05			
显色应用液	4.0	4.0	4.0	

【计算】

$$\text{血清镁浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准应用液镁浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

本法试剂A、试剂B混合后容器应密封，混合后的显色应用液稳定性欠佳，一般随时间延长显色吸光度呈下降趋势，在自动化分析中特别要注意。

二、甲基麝香草酚蓝比色法

【原理】

样品中镁、钙离子可在碱性溶液中与MTB络合呈现蓝紫色，可在600nm波长处比色测定。加入EGTA掩蔽钙离子的干扰。

【试剂】

（1）MTB显色剂：MTB36mg，聚乙烯吡咯烷酮（PVP）1.2g，1mol/L盐酸溶液20ml，加去离子水溶解并稀释至200ml，置冰箱保存。

（2）碱性缓冲液：亚硫酸钠4.8g，叠氮钠0.2g，甘氨酸1.5g，EGTA190mg，1mol/L氢氧化钠溶液47mL，加去离子水溶解并稀释至200ml，置冰箱保存。

（3）镁校准应用液（1mmol/L）：配制同前。

【操作】

按表4-5-8步骤操作。各管混匀，置室温10min，波长600nm处空白管调零，读取各管吸光度值。

表4-5-8　MTB法测定镁操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测标本			0.1
镁校准应用液		0.1	
去离子水	0.1		
MTB显色剂	2.0	2.0	2.0
碱性缓冲液	2.0	2.0	2.0

【计算】

$$\text{血清镁浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准应用液镁浓度（mmol/L）}$$

【注意事项】

1）镁离子浓度在红细胞内比血清中大约高3 倍，故采血和分离血清应避免溶血，并应及时测定以防止细胞内镁外逸使检测结果增高。草酸盐、枸橼酸盐或EDTA 可整合镁离子，因此不用这类抗凝剂抗凝的血标本。

2）试剂中随着MTB 用量增加，试剂吸光度也相应增高，可适当调整，使试剂线性达到2.5mmol/L 以上为宜。

【参考值】

0.67～1.4mmol/L。

【临床意义】

1）血清镁增高：见于急性或慢性肾功能衰竭、尿毒症、甲状腺功能减退症（黏液性水肿），未治疗的糖尿病昏迷，子痫发作时硫酸镁治疗后。血镁浓度达7mmol/L 可出现昏迷。

2）血清镁减低：见于脂肪痢、胰腺纤维囊肿等原因引起肠道丢失镁过多，肾功能衰竭多尿期，甲状腺功能亢进症等。

第六节　血浆碳酸氢根测定

二氧化碳结合力（carbon dioxide combining power，CO_2－CP）是指血浆中以碳酸氢根形式存在的二氧化碳含量。血浆用肺泡气平衡后测得二氧化碳含量，减去已知溶解于血浆中的二氧化碳量（1.2mmol/L）即为CO_2－CP。CO_2－CP 与血气分析中总二氧化碳（tCO_2）和碳酸氢根滴定有所区别。测定血浆碳酸氢根实验室中通常用量积法、酸碱滴定法、电极电位法、酶法。

一、酸碱滴定法

【原理】

血浆（清）中加入过量的标准盐酸溶液，与碳酸氢盐起中和反应，释放出二氧化碳，然后以标准氢氧化钠溶液滴定剩余的盐酸，计算氢氧化钠的消耗量从而推算出血浆结合的碳酸氢根浓度。

【试剂】

1）0.01mol/L 盐酸：精确标定的1mol/L 盐酸溶液5ml，用9g/L 氯化钠溶液稀释至500ml。

2）0.01mol/L 氢氧化钠溶液：精确标定的1mol/L 氢氧化钠溶液5ml，用9g/L 氯化钠溶液稀释至500ml，密闭保存于塑料瓶中，防止吸收空气中二氧化碳，约可用1 周。

3）酚红指示剂：酚红50mg，加0.01mol/L 氢氧化钠溶液14.1ml，用玻璃棒研磨溶解加9g/L 氯化钠溶液至250ml。

4）9g/L 氯化钠溶液。

【操作】

取试管2 支，测定管中加入新鲜血浆（或血清）0.1ml，对照管加入9g/L 氯化钠溶液2.5ml，各加酚红指示剂2 滴。测定管中准确加入0.01mol/L 盐酸0.5ml 振摇1min，使二氧化碳逸出，再加9g/L 氯化钠溶液2ml，混匀，然后用微量滴定管滴加0.01mol/L 氢氧化钠溶液，边滴边摇，滴至与对照管同样颜色为终点。

【计算】

血浆（清）碳酸氢根浓度（mmol/L）＝（0.5 －滴定用去0.01mol/L 氢氧化钠毫升数）×100

【参考值】

成人22 ～30mmol/L；儿童18 ～27mmol/L。

【注意事项】

1）0.01mol/L 盐酸溶液及0.01mol/L 氢氧化钠溶液的校正方法：取中号试管1 支，加入酚红指示剂1 滴，加入0.01mol/L 盐酸溶液1.0ml，9g/L 氯化钠溶液2.0ml，用0.01mol/L 氢氧化钠溶液滴定至微红色（持续15S 不褪）。如果氢氧化钠溶液恰好消耗1.0ml，则表示两溶液摩尔数相等，如不相等，须在计算时乘以校正系数纠正。例如：用去氢氧化钠溶液0.9ml，则校正系数＝10/0.9 ＝1.1。

2）9g/L 氯化钠溶液校正pH 为7。

3）氢氧化钠及中性的9g/L 氯化钠溶液易吸收空气中二氧化碳，使溶液pH 值降低。可采用虹吸滴定装置，在瓶塞上装上钠石灰管以吸收进入瓶中的二氧化碳，保证试剂pH 值在室温中可稳定3 个月。

4）当血浆加入盐酸后，应充分摇匀，以促使血浆中碳酸氢盐与盐酸充分作用，否则检测结果降低。

5）滴定法较量积法检测结果低约3％左右。

二、电极电位法

电极电位法测定血浆中碳酸氢根是在一个封闭的毛细管通道中进行的。血浆中碳酸氢根加入酸试剂后释放的二氧化碳通过二氧化碳电极膜，与膜内碱性电极液作用，改变了溶液的pH 值。通过测量氢离子的浓度改变可求出血浆中碳酸氢根浓度。具体操作见仪器说明书。

三、量积法

【原理】

取血浆用人工肺泡气使二氧化碳饱和，置于范斯莱克量积式气体分析器中，在真空密闭状态下加入乳酸，血浆中的碳酸氢钠被中和而释出二氧化碳。溶解性的二氧化碳也在真空状态下被释出，将释出的二氧化碳体积校正为标准状态下的体积，并减去其它气体如氧、氮、二氧化碳等在实验条件下的物理性溶解量，从而求得由碳酸氢钠分解而释出的二氧化碳量，此即为CO_2－CP 的数值。

【试剂】

辛醇（亦可用戊醇）、10％乳酸溶液。

【操作】

（1）将草酸钾抗凝静脉血液离心分离血浆。

（2）取血浆约2ml，置血浆二氧化碳饱和装置，吹气饱和。

（3）范斯莱克量积气体分析仪排气，核实真空状态，将水银充满活塞通道，使少量水银在仪器顶端的小杯上。

（4）在上部小杯内依次分别加血浆1ml、水1ml、乳酸溶液0.5ml，辛醇3～4 滴，分别依次小心引入测量室，最后，使辛醇少量进入测量室，切勿有空气进入。

（5）下降平衡球，使水银降至测量球下50ml 刻度处，关闭下活塞通道。

（6）振摇20 次，开启下活塞，下降平衡球，使测定液体下降，并关闭在粗侧玻璃管内，转动下活塞，接通细侧玻璃管通道，抬高水银球，使平衡球内水银面与刻度管内水银面在同一水平面上，关闭活塞。

（7）读取反应室上部刻度管径内的气体容积数，并记录当时室温和大气压力。

【计算】

血浆二氧化碳结合力除与体内碱储量直接有关外，试验时气压及温度均可影响测定结果，故欲得到精确的结果，此类影响因素须在计算时予以校正。其计算公式如下：

$$x=\frac{B}{\text{标准大气压}}\times(100.8-0.27T)\times(V+0.002T-0.136)\times 0.4492$$

式中x 为1L 血浆中被结合为碳酸氢盐之二氧化碳毫摩尔数；V 为测气器内气体毫升数；B 为测定时大气压力；T 为测定时的摄氏温度；0.4492 为CO_2－CP 由单位ml/dl 换算成mmol/L 的换算系数。

此式业已校正温度、压力及生理状态溶人之氮等。根据该式可求得不同温度下血浆二氧化碳结合量，据此绘制一表，可直接从表中查得CO_2－CP。

四、酶法

【原理】

磷酸烯醇丙酮酸（PEP）和碳酸氢根在磷酸烯醇丙酮酸羧化酶（PEPC）作用下生成草酰乙酸，草酰乙酸在苹果酸脱氢酶（MDH）的催化下生成苹果酸，同时将NADH转化为NAD＋，在波长340nm处测得下降的吸光度变化与碳酸氢根含量成比例。

【试剂】

1）酶试剂（pH8.±0.15）：Tris50mmol/L，PEP1.8mmol/L，PEPC≥300U/L，MDH≥1250U/L，NADH>0.3mmol/L，硫酸镁10mmol/L，草氨酸钠2.5mmol/L。

2）碳酸氢钠校准液（25mmol/L）。

【操作】

0.01ml样品、校准物、质控液、去离子水各管分别加酶试剂2ml，于37℃保温5min后，波长340mm处读取吸光度值。

【计算】

碳酸氢钠浓度（mmol/L）＝空白管吸光度值－测定管吸光度值－/空白管吸光度值－校准管吸光度值×校准液碳酸气钠浓度（mmol/L）

【注意事项】

本法线性范围0～40mmol/L，回收率99%，与量积法相比相关系数γ=0.991；需每15min测1次空白管吸光度，以消除空气中二氧化碳的影响。空白管吸光度值不能小于1，一些药物会影响血中二氧化碳测定结果。

【临床意义】

1）碳酸氢根浓度减低：代谢性酸中毒如严重腹泻、阿狄森病、肾功能衰竭、糖尿病、服酸性药物过多；呼吸性碱中毒如呼吸增速换气过多、二氧化碳排出过多、高热。

2）碳酸氢根浓度增高：①代谢性碱中毒如幽门梗阻、库欣综合征、缺钾长期滴注葡萄糖9g/L氯化钠溶液、钾摄入不足、服碱性药物过多；②呼吸性酸中毒如呼吸中枢抑制、呼吸肌麻痹（低血钾）、肺气肿、支气管扩张等。

第七节　血清铁和总铁结合力测定

测定血清铁有许多方法，所有比色法的共同原理是：样品中加入强还原剂，将三价铁离子还原为二价铁。这些还原剂有肼、抗坏血酸、巯基醋酸、羟胺等。铁被还原后，再用一种亚铁离子络合发色剂显色。最常用的络合剂有亚铁嗪、深二氮杂菲、三砒啶基

三啉。

一、血清铁亚铁嗪比色法

【原理】

血清中的铁与转铁蛋白结合成复合物，在酸性介质中铁从复合物中解离出来，被还原剂还原成二价铁，再与亚铁嗪直接作用生成紫红色复合物，可在波长560nm 处比色测定。

【试剂】

1）甘氨酸－盐酸缓冲液（0.4mol/L，pH3.1）：甘氨酸15g，溶解于约500ml 去离子水中，在酸度计上用0.1mol/L 盐酸调节pH 至3.1。

2）铁校准贮存液（2.0mmol/L）：含7 分子结晶水的硫酸亚铁556mg，溶于去离子水中，加浓硫酸1ml 转入1L 容量瓶中，加去离子水至刻度。

3）铁校准应用液（40μmol/L）：取上述贮存液2ml 加去离子水至100ml。

4）显色剂：亚铁嗪25mg，抗坏血酸1.0g，TritonX －1003.0g，用甘氨酸－盐酸缓冲液加至100ml，此液贮存于4℃冰箱可稳定1 周。

5）空白试剂：抗坏血酸1.0g，TritonX －1003.0g，用甘氨酸－盐酸缓冲液加至100ml。

【操作】

按表4－5－9 步骤操作。置室温45min，5mm 比色皿，波长560nm 处去离子水调零点，测定各管吸光度值。

表4－5－9　亚铁嗪比色法测定铁操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管	校准管	空白管
待测轿血清	0.6	0.6		
铁校准应用液			0.6	
去离子水				0.6
显色剂	1.6		1.6	1.6
空白试剂		1.6		

【计算】

$$\text{血清铁浓度}(\mu mol) = \frac{\text{测定管吸光度值} - \text{对照管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值} - \text{空白吸光度值}} \times \text{校准应用液铁浓度}(\mu mol/L)$$

【注意事项】

1）标本应新鲜，血清应避免溶血。

2）所用水质必需严格去离子，所用玻璃器材应用稀盐酸浸泡后严格清洗。

3）亚铁嗪化学名为3－（2－吡啶）－5，6－双（4－苯磺酸）－1，2，4－三氮杂

苯二钠。系水溶性，显色敏感性高。

4） 大多数测铁的直接比色法中均用醋酸盐缓冲液，但后者易使测定管发生浑浊是其点。改用甘氨酸缓冲液，既无浑浊发生，又可使脂血症标本透明。

5） 校准液呈色可稳定24h，血清所产生的颜色和浊度可稳定30min，此后它们的颜色和浊度即慢慢增加，大约每小时吸光度增加0.002。因此，应在1h 内比色完毕。

6） 血清铁浓度存在日内变异，其值早上最高，晚上最低。

7） 很少测定尿样中的铁，往往代之以尿的含铁血黄素测定，对确定血色病，溶血性贫血和阵发性睡眠性血红蛋白尿有意义。

二、血清铁深二复杂菲比色法

【原理】

以盐酸和三氯醋酸作为血清铁测定的释放剂和蛋白沉淀剂，以巯基乙酸为还原剂，将无蛋白血滤液中的高铁还原为亚铁离子，然后与深二氮杂菲磺酸盐作用生成红色螯合物，其颜色可在波长535nm 处比色测定。

【试剂】

1） 蛋白沉淀剂：溶解100g 三氯醋酸于700ml 去离子水中，加巯基乙酸30ml，浓盐酸180ml，然后加去离子水至1L，置棕色瓶内可保存2 个月。

2） 醋酸钠溶液（2mol/L）：含3 分子结晶水的醋酸钠272g，溶于约800ml 去离子水中，转入1L 容量瓶，加去离子水至刻度。

3） 显色剂：深二氮杂菲磺酸盐25mg 溶于2mol/L 醋酸钠溶液80ml 中，加去离子水至100ml。

4） 铁校准应用液（40μmol/L）：配制同亚铁嗪比色法。

【操作】

按表4－5－10 步骤操作。各管混匀，室温放置15min 后，波长535nm 处去离子水调零，读取各管吸光度值。

表4－5－10　深二氮杂菲法测定铁操作步骤

加入物（mL）	空白管	校准管	测定管
待测标本			2.0
铁校准应用液		2.0	
去离子水	2.0		
蛋白沉淀剂	2.0	2.0	2.0
	摇匀，测定管于4000r/min 离心10min		
相应的上清液	2.0	2.0	2.0
显色剂	2.0	2.0	2.0

【计算】

$$\text{血清铁浓度}\ (\mu mol/L) = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准应用液铁浓度}\ (\mu mol/L)$$

【注意事项】

1）本法是国际血液学标准化委员会推荐的方法。

2）比色皿光径为1cm 时，空白管吸光度不应超过0.015 。

3）深二氮杂菲英文名为bathophenanthroline，化学名为4，7－二苯基－1，10－菲罗啉，别名为4，7－二苯基邻菲绕啉，或4，7－二苯基－1，10．二氮杂菲，其与铁络合物的摩尔消光系数为22100 。

4）血清铁亦可用原子吸收光谱法测定，吸收谱线为248.3nm 。由于血清铁浓度很低，用直接火焰法测定有一定困难，一般多用无火焰石墨炉法测定。

【参考值】

成年男性11～30 μmol/L ；成年女性9～27 μmol/L 。

【临床意义】

1）血清铁浓度增高：见于溶血性贫血、再生障碍性贫血、巨幼细胞贫血、急性肝细胞损害、坏死性肝炎等。

2）血清铁浓度减低：见于缺铁性贫血和感染、肠胃道慢性失血、尿毒症、恶性肿瘤等。

三、血清总铁结合力测定

【原理】

在待测标本中加入过量的铁，使血清中的转铁蛋白全部与铁结合达到饱和，过剩的铁用轻质碳酸镁吸附除去，然后按测定血清铁同样的方法测定铁的含量，并计算出总铁结合量及未饱和铁量。

【试剂】

1）铁校准应用液（400 μmol/L）：将2.0mmol/L 铁校准液贮存液用去离子水稀释5倍。

2）碳酸镁粉剂（分析纯）：用新牌号前需测定其吸附能力，方法是以标准液代替血浆，测其是否能将铁全部吸附。

3）其余试剂同血清铁测定。

【操作】

1）取1 支中号试管加入血清1ml，再加入400 μmol/L 铁校准应用液0.5ml，充分混匀1min，室温放置5min 。

2）加入碳酸镁粉剂150mg，充分摇匀1min，放置30min，每10min 震摇1 次。

3）离心沉淀10min，取上清液1ml 按上述血清铁测定法操作。

【计算】

总铁结合力（μmol/L）＝血清铁浓度值×1.5

【注意事项】

铁在血浆中可与转铁蛋白结合，但并不是血浆中所有转铁蛋白均与铁结合，只有1/3 的转铁蛋白与铁结合成血清铁，未结合的部分称未饱和铁结合力。所有的转铁蛋白均与铁结合后再测定血浆中铁总量称为总铁结合力，血清铁除以总铁结合力为铁饱和度。

【参考值】

总铁结合力45～77 μmol/L，未饱和铁结合力25～52 μmol/L，铁饱和度35 %。

【临床意义】

1）血清总铁结合力增高：见于缺铁性贫血、急性肝炎。

2）血清总铁结合力减低：见于肝硬化、肾病、尿毒症和原发性含铁血黄素沉着症。

第八节　血清铜测定

人体95 %血浆铜与 α_2－球蛋白结合呈蓝色，故称血浆铜蓝蛋白。体内其他的铜是构成铜蛋白的主要原料，如红细胞铜蛋白、肝铜蛋白和脑铜蛋白，这些蛋白均属于超氧化物歧化酶。实验室铜测定的方法有双环己酮草酰二腙比色法、杂环偶氮化合物比色法和原子吸收光谱法。比色法为常用方法，且近年有所改进，检测中使用非离子型表面活性剂及蛋白变性剂，从而避免了血清除蛋白这一步骤。

一、双环已酮草酰二腙比色法

【原理】

加盐酸于血清中，使血清中与蛋白质结合的铜游离出来，再以三氯醋酸沉淀蛋白质，滤液中的铜离子与双环已酮草酰二腙反应，生成稳定的蓝色化合物，可在波长600～620nm 处比色测定。检测同时加入焦磷酸钠，使铁在氨溶液中成为不溶解的焦磷酸铁铵，加入枸橼酸钠可避免磷酸钙沉淀，并可在足够的铵与枸橼酸离子存在时，使铁成为不解离的枸橼酸铁铵以排除干扰。

【试剂】

1）三氯醋酸溶液（200g/L）。

2）稀盐酸溶液（2mol/L）。

3）缓冲液：饱和焦磷酸钠溶液35.7ml，饱和枸橼酸钠溶液35.7ml，浓氢氧化铵溶液80.3ml，加去离子水至1L。

4）铜校准贮存液（1mmol/L）：含5 分子结晶水的硫酸铜249.7mg，加去离子水溶解，并稀释至1L。

5）铜校准应用液（20μmol/L）：上述铜校准贮存液2ml 加去离子水稀释至100ml 即可。

6）显色剂：双环己酮草酰二腙0.5g，加50％乙醇至100ml。

【操作】

按表4－5－11 步骤操作。各管混匀，在室温静置20min，波长620nm 处，以空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－5－11　双环已酮草酰二腙法测定铜操作步骤

加入物（mL）	空白管	校准管	测气管
血清			1.0
铜校准应用液		1.0	
去离子水	1.0		
稀盐酸溶液	0.7	0.7	0.7
充分混匀，室温静置10min			
三氯醋酸溶液	1.0	1.0	1.0
旋涡混匀，在室温静置10min，离心10min			
相应上清液	2.0	2.0	2.0
缓冲液	2.8	2.8	2.8
显色剂	0.2	0.2	0.2

【计算】

$$\text{血清铜浓度（μmol/L）}=\frac{\text{测定管吸光值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准信用液铜浓度（μmol/L）}$$

【注意事项】

1）新生儿的血清铜浓度平均为1.1μmol/L，是成人血铜的1/5 左右，3～6 个月后上升至成人水平。

2）本法十分灵敏，所有试剂要求高纯度，实验中所用仪器、试管及一切玻璃器皿

均应避免铜的污染。

3）双环己酮草酰二腙别名Cuprizone，它与铜反应生成的有色络合物在水溶液中的摩尔吸光系数为16000，线性范围可达63.0μmol/L。

4）本法显色稳定，有色络合物可稳定60min。铜离子外的其它金属离子，即使其浓度远高于生物样品，也不能与本法试剂形成有色络合物。

二、杂环偶氮化合物比色法

【原理】

在TritonX－100存在下，血清铜与2－（2－噻唑偶氮基）－4－5－甲硫基安息香酸作用形成稳定的紫红色络合物。

【试剂】

1）显色剂贮存液：2－（2－噻唑偶氮基）－4－5－甲硫基安息香酸15mg溶于去离子水中使成500ml，置4℃时可保存1年。

2）显色剂应用液：1.9mol/L醋酸溶液（内含Trito X－1000.5ml）100ml，加入显色剂贮存液20ml，混匀，置室温中可稳定1周。

3）EDTA二钠溶液（10mmol/L）。

4）铜校准应用液（20μmol/L）：配制见双环己酮草酰二腙比色法。

【操作】

按表4－5－12步骤操作。各管混匀，放置室温中5min，波长585nm处。空白管调零，读取各管吸光度值1，然后加入10mmol/LEDTA二钠溶液50μl，放置5min后再测各管吸光度值2。

表4－5－12　杂环偶氮化合物比色法测定铜操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
待测血清			0.5
铜校准应用液		0.5	
去离子水	0.5		
显色剂应用液	2.5	2.5	2.5

【计算】

$$\text{血清铜浓度}(\mu mol/L)=\frac{\text{测定管吸光度值1}-\text{测定管吸光度值2}\times 1.017}{\text{校准管吸光度值1}-\text{校准管吸光度值2}\times 1.017}\times \text{校准应用液铜浓度}(\mu mol/L)$$

【注意事项】

1）本法不能采用EDTA 二钠等抗凝剂制备的血浆，否则将会抑制反应。

2）本法线性范围达47.1 μmol/L，回收率为99.3％～99.8％，铁、锌、镁、铬、镉、铅、钾、钙等均无干扰。

【参考值】

成年男性11～22 μmol/L；成年女性13～24 μmol/L。

【临床意义】

1）血清铜与血清铁的比值变化可以鉴别黄疸性疾病。铁/铜比值大于1 者多为传染性肝炎，小于1 者多为阻塞性黄疸。恶性肿瘤患者的血清铜浓度增高，故铁/铜比值小于1。如血清铜浓度很高时要考虑有无癌性阻塞。感染性疾病时血清铜浓度也增高。甲状腺功能亢进时，血清铜浓度升高，患者经过治疗后血清铜浓度则下降，而血清铁浓度始终不变。

2）肝豆状核变性主要由铜代谢障碍引起，患者血清铜蓝蛋白多数降低，血清铜浓度亦降低，尿铜排出量增加。但少数患者血浆铜蓝蛋白及血清铜不降低。

第九节　血清锌测定

锌测定的方法有络合滴定法、络合比色法、原子吸收光谱法、阳极溶出伏安法等，以络合比色法常用。探索高灵敏的显色剂是锌测定方法学研究的重点。

一、Br—PADAP 比色法

【原理】

血清中的高价铁及铜离子被维生素C 还原成二价，和其他金属离子一起与氰化物生成稳定的复合物而被掩蔽，而水合氯醛能选择性地使复合物中的锌释放，锌与2－[5－溴－2 吡啶）－偶氮－5－二乙氨基苯酚（Br—PADAP）反应生成红色复合物，可在555nm 波长处比色测定。

【试剂】

1）锌校准贮存液（15.3mmol/L）：纯锌124.5mg 溶于10ml 去离子水中，加浓硝酸0.1ml，然后加去离子水稀释至100ml。

2）锌校准应用液（15.3 μmol/L）：校准贮存液1ml 加去离子水稀释至1L。

3）十二烷基硫酸钠（SDS）溶液（150g/L）。

4）三氯醋酸溶液（100g/L）。

5）SDS—Tris 缓冲液：三羟甲基氨基甲烷（Tris）2.4g，维生素C250mg，氰化钠

75mg，150g/LSDS 溶液40ml，调节pH 至8.0，加去离子水至50ml。

6）水合氯醛溶液：水合氯醛8g，加去离子水10ml。

7）显色剂：Br－PADAP8mg，加N，N－二甲基甲酰胺（或二甲亚砜）1ml，加150g/LSDS 液至251ml。

【操作】

按表4－5－13 步骤操作。各管混匀，静置3min，波长555nm 处空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－5－13　Br－PADAP 比色法测定锌操作步骤

加入物（ml）	空白管	标准管	测定管
待测血清			0.50
锌校准应液		0.50	
去离子水	0.50		
三氯醋酸溶液	0.50	0.50	0.50
	混匀，置室温10min 后，离心沉淀		
相应上清液	0.50	0.50	0.50
SDS－Tris 缓冲液	1.25	1.25	1.25
显色剂	1.25	1.25	1.25
水合氯醛溶液	0.10	0.10	0.10

【计算】

$$\text{血清锌浓度（}\mu\text{mol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准应用液锌浓度（}\mu\text{mol/L）}$$

【注意事项】

1）显色剂英文名为：2－［5－bromo－2－pyridyl）azo］－diethylaminophenol，缩写为Br－PADAP，分子量349.23u，与锌显色后的摩尔消光系数为120000。

2）加暴露剂水合氯醛后，锌离子释出才与5－r－PADAP 起显色反应。

3）不可用EDTA 钠盐抗凝血浆，因为其可完全抑制反应。

4）从标本收集到分析过程中每一件物品均要防止锌的污染，所有使用的玻璃器材、塑料管、注射器等必须浸泡在10%的硝酸溶液内过夜，然后用去离子水彻底冲洗。

5）橡胶制品含锌量高，故标本瓶不可用橡皮塞，容量瓶塞不可用橡皮筋栓系，去离子水不可用橡皮管引流，如用橡皮吸球取试剂时，吸管口要塞以棉花，临床广泛使用的胶布含氧化锌，亦要严防接触。

6）测定锌的血标本最好用空腹血。由于红细胞含锌比血浆高8 倍，因此，肉眼可见的溶血标本不能用于分析。

二、吡啶偶氮间苯二酚比色法

【原理】

用盐酸胍处理血清，分裂蛋白质的三级结构，使与蛋白质结合的锌释放出来，在碱性和还原剂存在的条件下，砒啶偶氮间苯二酚（PAR）与锌作用可生成红色复合物。PAR 与其它金属离子的呈色反应可用氰化物抑制，而水合氯醛可促进锌的呈色，增加对锌反应的特异性。

【试剂】

1）胍贮存液（6mol/L）：盐酸胍286g、三羟甲基氨基甲烷12.1g 加于去离子水至500ml。

2）胍应用液：氰化钠75g、抗坏血酸0.25g 溶于50ml 胍贮存液中。

3）显色剂（5mmol/LPAR 溶液）：吡啶偶氮间苯二酚0.5g 加去离子水至500ml，置棕色瓶中冰箱保存。

4）水合氯醛溶液（3.6mol/L）：水合氯醛300g 加去离子水至500ml。

5）锌校准应用液（15.3μmol/L）：同Br—PADAP 比色法配制。

【操作】

按表4—5—14 步骤操作。各管混匀，放置5min，波长500nm 处空白管调零，读取各管吸光度值。

表4—5—14　PAR 比色法测定锌操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管	校准管	空白管
待测血清	0.2	0.2		
锌校准应用液	0.2			
去离子水	0.2			
胍应用液	1.0	1.0	1.0	1.0
显色剂	0.10	0.10	0.10	
水合氯醛溶液	0.05	0.05	0.05	0.05

【计算】

$$\text{血清锌}\ (\mu mol/L) = \frac{\text{测定管吸光度值} - \text{空白管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准应用液锌浓度}\ (\mu mol/L)$$

【参考值】

7.5～22.5 μmol/L。

【临床意义】

1）血清锌浓度降低：常见于酒精中毒性肝硬化、肺癌、心肌梗死、慢性感染、胃肠道吸收障碍、肾病综合征及部分慢性肾功能衰竭患者。儿童缺锌可出现食欲不振、嗜睡、发育停滞和性成熟延缓等现象。

2）血清锌浓度增高：见于工业污染引起的急性锌中毒。

第十节　血清理测定

健康人血清中用常规方法不能测出锂，临床上血清锂测定主要用于精神病患者锂盐治疗中血锂浓度的监控，以防止出现中毒反应和保持有效的治疗浓度。血锂测定有原子吸收光谱法、火焰光度法、离子选择电极法等。目前使用广泛的是火焰光度法、干化学法和离子选择电极法。

一、火焰光度法

【原理】

样品中的锂原子受火焰热能的激发，从基态到激发态，而激发态原子不稳定，又可返回到基态，同时发出锂元素特征性光谱（607.8nm）。发射光的强度与锂浓度成正比。

【试剂】

1）血清稀释液（1.5mmol/L 氯化钾溶液）：干燥恒重氯化钾112mg 溶于800ml 去离子水中，再加入TritonX－1001ml，加去离子水至1L。

2）空白试剂（钠/钾＝140/5mmol/L）：干燥恒重的氯化钠8.184g，氯化钾0.373g，用去离子水溶解至1L。

3）锂校准贮存液（20mmol/L）：干燥恒重氯化锂424mg，用空白试剂溶解至500ml。

4）锂校准应用液（1.0mmol/L）：贮存液10ml，用空白试剂稀释至100ml。

【操作】

1）样品准备：分别吸取血清、校准应用液、质控液、空白试剂0.1ml 于各管中，加5.0ml 血清稀释液混匀备用。

2）仪器准备：参考钾、钠火焰光度法测定章节或按厂家制定的专门方法调节仪器。

3）测定样品：用稀释空白试剂调节仪器零点，用稀释的锂校准应用液调节到相应的读数值，测定样品和质控物。在每个未知样品分析之后，要核查空白和校准，以防读数漂移造成误差。

二、干化学法

【原理】

样品中锂经分离层进入试剂层与冠醚偶氮染料结合，使染料发生吸收峰的迁移，结果可在600nm 波长处用反射式光度计测定。

【仪器和试剂】

干化学分析仪，锂测定用干试剂片。

【操作】

按仪器操作说明进行。

【注意事项】

1）本法锂测定线性范围0.2～4.0mmol/L。

2）若用血浆作样品，推荐使用肝素钠和EDTA 抗凝，不能用氟化钠、草酸钾或肝素锂抗凝。

3）冠醚偶氮染料英文名为：6－dodecyl－6－［2’－hydroxy－5’－［2”－4”－dinitrophenylazo］benzyl］－13.13－dimethyl－1，4，8，11－tetraoxacyclotetradecane.

【参考值】

<0.2mmol/L。

【医学决定水平】

治疗浓度为0.5～1.5mmol/L，维持浓度为0.5～1.2mmol/L。若超出1.6mmol/L，应引起注意，达2mmol/L 时会出现中毒症状。

第六章　血气分析

一般而言，血气是指血液中所含的氧气（O_2）和二氧化碳气体（CO_2）。但临床上血液酸碱度和气体分析，习惯上统称血气分析。血气分析是评价患者体内酸碱平衡和呼吸功能状态的必要指标。它包括pH值、氧分压（PO_2）、二氧化碳分压（PCO_2）3个实测指标，以及总二氧化碳（TCO_2）、实际碳酸氢根（AB）、标准碳酸氢根（SB）、碱剩余（BE）、氧饱和度（$SatO_2$）等计算指标。随着血气分析仪的更新换代，血气分析测定方法更加简便快速，结果更加准确可靠。血气分析结果对重危患者的抢救意义重大，因此是临床必需的检测指标。

第一节　标本采集和保存

血气分析标本以动脉血或动脉化毛细血管血为主。只有动脉血才能真实反映体内代谢氧化作用和酸碱平衡的状态。因此必须采集进入细胞组织之前的动脉血，也就是血液从肺部运氧到组织之间的动脉血。动脉血液的气体含量从主动脉到末梢循环都是均一的。

血气分析标本的采集极为重要，若处理不当，将会产生很大的误差。标本采集通常分注射器采血法和毛细管采血法。

一、注射器采血法

采血部位可选择股动脉、桡动脉或肱动脉。用2ml或5ml消毒玻璃注射器，按无菌操作抽取抗凝剂肝素钠溶液0.5ml（每毫升含肝素钠1000单位，9g/L氯化钠溶液配制）。然后，来回拉动针栓，使肝素钠溶液湿润针管，并将空气和多余肝素钠溶液全部排出。注射器死腔内残留的肝素钠溶液约0.2ml，足可抗凝3～4ml血液。

消毒皮肤，选择股动脉、肱动脉或桡动脉合适部位穿刺，取2ml血，不能有气泡，血抽出后针头刺入橡皮或软木塞，封闭针头隔绝空气。将注射器放在手中来回搓动数次，使抗凝剂与血液混匀，立即送检。

填写送检申请单，要求写出诊断、用药情况、抽血时的体温、是否吸氧及流量，以便分析结果。

在实际操作中，用注射器抽血时较易混入气泡，应在抽血后立即排出气泡。空气混入气泡会使血气分析PCO_2下降，POO_2升高。抽血的注射器中肝素残留过多或抽血量过少，也会使血气分析结果PCO_2下降，PO_2升高，以及pH 值改变。

二、毛细管采血法

毛细管采血法必须使毛细血管动脉化。采血部位可选择指尖、耳垂或足跟 (婴幼儿常用)。采血前先用45～50℃热水热敷10min 左右，施行皮肤局部消毒后针刺，其深度以血滴快速自然流出为度，弃去第1 滴血，然后让血液尽快地自然流进用肝素处理的毛细玻璃管内，毛细管顶端直接与血液流出口接触，操作要求迅速，防止气泡进入。毛细管充满血液后，放人一根特制小钢针，毛细管两端用橡皮泥封口。然后用磁铁沿毛细管外壁纵向移动。当毛细管内小钢针被磁力吸引移动时，血液与肝素可充分混匀。及时送检。

毛细玻璃管肝素化处理：毛细管的用血量约130μl，用每毫升50 单位的肝素钠溶液充满，于60～70℃干燥后，密封保存备用。

三、样品保存

血液离体后，如在室温下存放，由于血细胞的代谢耗氧，PO_2可下降、PCO_2可升高、PH 值可减小，这种改变在白细胞增多的患者标本中尤为明显。一般在抽血后20min 内应予测定。如果不能及时送检或仪器故障不能及时分析，样品应放人碎冰块中或置0～4℃冰箱内，以延缓血细胞的代谢速度，同时样本应在2h 内分析完毕。

第二节　血气分析仪及其操作方法

一、仪器与电极

血气分析仪的种类很多，基本测量部件由3 组电极组成，即pH 电极和pH 参比电极、二氧化碳电极、氧电极。通过这3 组电极可测得pH、PO_2、$PCO_2$3 个基本参数，其余参数则通过计算得到。

1.pH 电极和测定原理

采用电极电位法测定血液PH 值。由氢离子敏感的玻璃电极、甘汞参比电极和两个电极间的液体介质构成测量回路。

血样中的氢离子与玻璃电极表面的金属离子交换，形成的跨膜电位与血样中的氢离子浓度成正比。通过与甘汞参比电极相比较测得玻璃电极产生的跨膜电位。

与电位计相连的甘汞参比电极的作用是维持一个恒定的参比电位。它是一根装在玻璃管中的铂丝，伸入汞、氯化汞糊中，玻璃管中的一端有一个棉塞，以维持甘汞糊与铂丝接触，电极浸泡在浓度恒定的饱和氯化钾溶液中，与样品的液面接触，其间有一层渗透膜分隔。电极中的氯化钾溶液通过渗透膜逸出，与样本接触。因为氯化钾浓度很高，所以样品中的离子组成差异不会改变参比电极的恒定电位。pH 测量系统中唯一的电位变化存在于被测血样与玻璃电极的界面。因此，电位计上测得的任何电位变化，都缘于样品中的氢离子浓度。

2.PCO_2 电极和测定原理

PCO_2 测量电极是一组特殊类型的pH 电极。pH 玻璃电极浸泡在电极外套的碳酸氢盐溶液中，顶端覆盖着只允许CO_2 气体通过的硅橡胶膜，在pH 玻璃电极和硅橡胶膜间夹着一层网纱，以保持一薄层电极液 (碳酸氢盐溶液) 。当样品中CO_2：扩散通过硅橡胶膜时，迅速改变碳酸氢盐溶液pH 值，使反应达到新的平衡，其反应式如下：

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

PCO_2 电极内有一个银/氯化银参比电极，通过与参比电极比较而测量pH 玻璃电极上的电位变化。因PCO_2 电极的气体通透膜能排斥溶液中H^+的通过，所以样品的pH 值不会直接影响PCO_2 电极内部pH 值变化，而这种pH 值变化仅是样品中CO_2 向电极扩散所导致的。根据重排的Henderson－Hasselbalch 方程式，碳酸氢盐溶液的pH 值为$lgPCO_2$ 的线性函数 (PCO_2 在10～90mmHg 或1.3～12kPa 范围内)：

$$pH\ 值 = -S \cdot lgPCO_2 - lg\alpha = PK' + lg\ (HCO_3^-)$$

式中S 为电极的相对敏感性，通常为0.95～1.00；α为CO_2 在碳酸氢盐溶液中的溶解度系数；PK'为碳酸的一级离解常数。

3.PO_2，电极和测定原理

PO_2 电极也称Clark 电极，属极谱电极，由铂阴极与银/氯化银阳极组成，铂阴极密封在玻璃柱中，其末端暴露，在表面覆盖着一层可透过氧气的聚丙烯膜。玻璃柱末端是一个粗糙面，其与聚丙烯膜之间有一层氯化钾的磷酸盐缓冲液，借此与银/氯化银阳极沟通电流。聚丙烯膜外为样品池，样品中的氧气可以透过聚丙烯膜进入缓冲液，到达铂阴极表面。

PO_2 的测定依据氧的电化学原理。阴极对于阳极保持一个固定的极化直流电压 (－0.65V)，当氧通过聚丙烯膜扩散进入电极时，即在阴极表面还原。反应式如下：

$$O_2 + 2H^+ + 4e \longrightarrow H_2O_2 + 2e + OH^-$$

由于氧在阴极的还原作用导致阳极与阴极间的电流，这个电流变化与样品中扩散到电极的氧量成正比。

$$I = S \cdot PO_2 + I_0$$

式中S 为电极灵敏度；I_0 为$PO_2 = 0$ 时的电流，仪器将I_0 调作零点，故一般只用一点法定标氧电极。

二、试剂

不同血气分析仪厂家的试剂种类和成分各有差异。大致包括pH 校准缓冲液、校准气体、冲洗液和电极液等。

1.pH 校准缓冲液

这是准确测定pH 值的前提，用于仪器pH 定标。一般商品试剂提供pH6.841 和7.383 两种磷酸盐缓冲液。配制校准液的磷酸二氢钾和磷酸氢二钠纯度要求高，多数需要纯化处理，一般于干燥后用无氨和无二氧化碳的去离子水配制，配制的缓冲液PHH 实际值与理论值之差不应超过±0.005。其基本配方及不同温度的pH 值见表4 -6 -1 和表4 -6 -2。

表4 -6 -1　pH 测定用校准缓冲液的配方

缓冲液	pH 值（37℃）	磷酸二氢钾（g/L）	磷酸氢二钠（g/L）
等摩尔磷酸盐缓冲液	6.841	3.388	3.533
生理缓冲液	7.383	1.814	7.571

注：等摩尔磷酸盐缓冲液即溶液中磷酸二氢钾与磷酸氢二钠的摩尔浓度相等

表4 -6 -2　校准缓冲液不同温度下的pH 值

温度（℃）	生理缓冲液	等摩尔磷酸缓冲液
0	7.531	6.984
5	7.497	6.951
10	7.469	6.923
15	7.445	6.900
20	7.426	6.881
25	7.4102	6.865
30	7.397	6.853
35	7.386	6.844
37	7.383	6.841
38	7.381	6.840
40	7.377	6.838
45	7.370	6.834
50	7.363	6.833

2．校准气体

用于PCO_2和PO_2电极测定的定标。校准气体的钢瓶在配制气体前均需进行真空处理，然后按照仪器所要求的氧气、二氧化碳浓度用氮气准确配制，充分混匀后才能使用。一般血气分析仪有两种浓度的校准气体，如高标气用10 %CO_2（不含O_2）经氮平衡的混合气；低标气用5 %CO_2和20 %O_2经氮平衡的混合气。有的血气分析仪配有自动气体混合装置，只需纯CO_2气体，其自动与空气按一定比例混合，可供仪器使用。校准气体在作定标前，通过37 ℃水湿化。校准气体的分压计算如下：

$$PCO_2\text{或}PO_2\ (mmHg)=\frac{CO_2\ (\%)\ \text{或}\ O_2\ (\%)\times(P_B-PH_2O)}{100}$$

式中P_B为当时大气压，在海平面约为760 mmHg（101.3kPa）；PH_2O为水蒸气分压，37 ℃的PH_2O为47 mmHg（6.26KPa），可视为常数。

例如：校准气体含20 %O_2的分压为：

$$PO_2=\frac{20\times(760-47)}{100}=142.6\ (mmHg)$$

3.PCO_2电极液

基本组成如下：每1L去离子水中含氯化钠5.85g，碳酸氢钠1.68g，氯化银0.03g，麝香草酚0.04g。

4.PO_2电极液

基本组成如下：每1L去离子水中含磷酸氢二钠53.1g，磷酸二氢钾26g，氯化钾7.45g，氯化银0.03g，麝香草酚0.04g。

5．清洗液

用于冲洗、清洁样品测定管道的清洗液配方很多，可用9g/L氯化钠溶液加适量非离子型去垢剂代用，配制的溶液应呈中性。

6．电极保养液

有两种试剂，一种是2 %酸性胃蛋白酶溶液，用于毛细管测量通道去蛋白；另一种是0.1mol/L氟化氢铵，用于活化玻璃电极。

三、操作

目前使用的血气分析仪多数是由微处理机控制的全自动仪器，实际分析的血样量少，而且可以同时测定pH值、PCO_2、PO_2和电解质，测定参数和计算参数都可自动显示或打印；通过微处理机还可监测和诊断所有故障，设备的维护工作大为简化。与早期的血气分析仪相比较，电极的基本工作原理没有改变，所有仪器仍用同样的电极，但是电极的构造形式和样品测定通道在不同类型的仪器之间却有很大差别。血气分析仪从关

机状态到进入血样分析，均需经过以下3 个基本步骤：

1．开机等待

按照仪器要求分别接通主机及辅助设备的电源，开启校准气体钢瓶，使流量和压力达到额定要求。分别检查校准缓冲液、冲洗液等是否按要求装备。从关机状态启动后，仪器需要有一段时间预温等待，使工作电路稳定，同时使测量室温度达到平衡，一般需要20～0min。在电压稳定的实验室，建议24h 不停机使用。

2．定标

仪器定标分两种形式，即一点定标和两点定标。整个检测系统从关机到启动使用前，必须进行两点定标，建立pH 值、PCO_2、PO_2 测定的斜率曲线，以测试电极响应程度和斜率是否在可接受的允许范围内。pH 电极通过对pH6.841 和7.383 两个精确的缓冲液电位测定完成定标：PCO_2 和PO_2 电极通过对高标气和低标气测定完成定标。两点定标一般对每个校准点均需重复测量，以检测电极反应的重现性或飘移程度是否在可接受的限度内。两点定标通过后方可做血样测定。一点定标是指对近生理状况校准点的定标。一点和两点定标的间隔时间可以在仪器的参数中选定。

3．样品测定

(1) 毛细管样品测定：测定前用磁铁沿毛细管外壁轻轻来回移动，使毛细管内小钢针移动，充分混匀血样，然后用砂轮在封口端划痕，折断管子，连接毛细管接合器。选用毛细管进样方式，启动测定程序，进样测定后，等待结果显示或打印。

(2) 注射器样品测定：将注射器血样在两掌中来回转动10 余次以混匀样品，除去针头并排出几滴血，以确证血液有否凝块存在。选择进样方式，多数仪器可选择注射进样和自动吸人进样。启动测定程序，自动完成测定并显示打印结果。

(3) 气体样品测定：用人工呼吸球囊采集的气体样品，与进样针连接，启动气体测定程序，自动或手动进样测定和显示结果。

每个样品测量结束，仪器自动进行冲洗，并返回待测状态。

四、仪器的维护保养

血气分析的重要部件是测量单元，包括电极、样品通道和气体湿化室，是平时维护的重要部分。一般维护保养事项如下：

(1) pH 参比电极的电极液应维持氯化钾饱和状态。

(2) 气体湿化室的蒸馏水应保持标记的液平面。

(3) 电极电解液和电极膜按时调换；有时PCO_2 和PO_2 电极出现不稳定情况，可能系电极内顶部附有气泡之故，可取出电极，除去气泡重新安置。这种情况在调换电极液

后容易发生。多由室温存放的电极液因温度升高后空气逸出所致。

4）PO_2 电极反应迟钝而不稳定，通过取出电极除去外套，电极顶端用细砂纸旋转摩擦约20S，可恢复反应敏感性。

5）样品通道和电极头部，因多次测定后，血浆蛋白质和脂质容易粘附，应按常规清洗仪器。血气分析以24h 不停机使用为好，这样样品通道经常地处于自动冲洗状态，更有利于仪器的正常工作。

6）pH7.383 的校准缓冲液启封后，容易吸收空气中CO_2，导致pH 值改变。因此，除密封防止暴露于空气外，每4 周应调换新鲜缓冲液。

7）样品测量通道蛋白和脂质粘附过多，会增加测定的交叉互染和增强电极的记忆效应。可启用仪器维护程序，用酸性胃蛋白酶溶液去蛋白，然后用氟化氢铵活化pH 电极。维护程序中上述两者次序不能颠倒。根据测定样品数量的多少，一般每1～2 周维护1 次。

目前，一些血气分析仪的电极已经不需更换电极液，所谓免维护电极，使日常维护工作更简便。但是对毛细管通道中电极的去蛋白和活化电极保养仍要定期进行。

五、血气分析的质量控制

影响血气分析结果的因素主要有：血样中抗凝剂比例不合适或混有气泡或标本没有及时送检；质控材料不稳定；pH 校准缓冲液和校准气体缺乏标准化；仪器缺乏良好的维护，以致运行不良。

1．质控材料

目前使用的血气分析质控物，有水剂缓冲液、人造血等。水剂缓冲液具有价廉、使用方便等优点，但启封后仅稳定1min。人造血质控物是氟碳化合物，有与血液相似的黏稠度，克服了因水力学误差所引起的变化，氧的结合也明显优于水剂质控物，保存期较长。其按常规使用方法，振摇后质控液表面产生一层泡沫可防止空气接触，因此，在启封后5min 内基本稳定，是较理想的血气分析用质控材料。

2．质控方法

由于血气分析基本上是自动分析过程，质控的主要目的是检测仪器的工作状态是否正常，血气试剂和标准气体是否合格。因此，每次仪器维修、电极维护后、血气分析用气体和试剂批号调换后，均应立即分析血气质量保证系统的3 个水平的质控品，并记录在质控图上，注意分析失控的原因。

质控材料从冰箱取出后，应使其恢复到室温后再应用。使用时两手指握住安瓿上端，振摇数十次，使气液成分达到平衡，开启安瓿后立即测定。注意振摇时不能握于手心中，防止手心温度对测定结果的影响。

在质控材料不易获得时，可用待测标本作双份测定，观察其分析精密度。在临床样品多的单位，也可用患者资料pH 值、PCO_2、PO_2 统计，以观察仪器分析的稳定性的变化。每天的样品数应>20 ，并除去极值后统计。

第三节　血液酸碱度和气体分析参数及参考值

血气分析的直接测定参数是pH 值、PCO_2、PO_2，以这3 个参数为基础推算出pH_{NR}、HCO_3^-、SB 、CO_2、BE 、$SatO_2$、P_{50}等其他参数。

一、酸碱度

维持血液pH 值恒定主要取决于$\frac{HCO_3^-}{H_2CO_3}$缓冲系统，其比值为20 ，根据Henderson －Hasselbalch 方程 (即H －H 方程)：

$$pH = pKa + \lg\frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} \quad pH = 6.1 + \lg\frac{24}{1.2} = 6.1 + \lg 20 = 6.1 + 1.307 = 7.401$$

式中pKa 为碳酸解离常数，在37 ℃时为6.1 。

由此方程可见，碳酸氢盐与碳酸的比值是决定血液pH 值的主要因素，两者任何一方改变均能影响pH 值，而且互相间可发生代偿性增高或减低。如同时按比例增高或下降，其pH 值不变。pH 值是判断酸碱中毒的重要指标，但它不能鉴别呼吸性酸碱中毒还是代谢性酸碱中毒。

PH 参考值：7.35 ～7.45 ，极值<6.8 或>7.8 ，pH >7.45 为碱血症，pH <7.35 为酸血症。

pH 在参考值范围内，不能肯定没有酸碱平衡紊乱，因为代偿性酸碱中毒、双重或三重酸碱失衡时，pH 值可在参考值范围内。

二、无呼吸影响的酸碱度

无呼吸影响的酸碱度 (pH_{NR}) 为设定血样PCO_2 为40 mmHg (5.32Kpa) 时之pH 值。此项指标排除了呼吸因素的干扰，因此，pH_{NR}是更能反映代谢性酸碱平衡的一个指标。在正常情况下，pH_{NR}与血液pH 值应基本一致。

PH 值大于或小于PH_{NR}，说明有呼吸因素介入，考虑存在呼吸性酸中毒或呼吸性碱中毒。当PCO_2 恢复至40 mmHg 时，其pH_{NR}值等于pH 值。

三、二氧化碳分压

二氧化碳分压 (PCO_2) 是指血浆中溶解的CO_2 所产生的压力。PCO_2 高低与血浆中

溶解CO_2的量度成正比，它是判断呼吸性酸碱平衡具有决定性的重要指标。代谢性酸碱中毒时PCO_2变化不明显，可由于机体的代偿作用而分别低于或高于参考值。根据Henry定律，血浆中的CO_2浓度与PCO_2的关系式为：血浆CO_2浓度（mmol/L）$=\alpha \cdot PCO_2$式中α表示CO_2的溶解系数，为0.0301mmol/L/pH或0.231mmol/LkPa（当37℃时）。

由于CO_2分子具有较强的弥散能力，故动脉血PCO_2基本上反映了肺泡PCO_2的平均值，两者数值基本一致。PCO_2代表了呼吸因素，在H－H方程中，它的改变可直接影响pH值的改变。PCO_2升高提示体内CO_2滞留，存在着肺泡通气不足，它可以是原发性的，也可以是继发性的或代偿性的。PCO_2降低提示体内CO_2排出过多，存在肺泡换气过度，同样有原发和继发两种。在机械通气和自主呼吸时，PCO_2是衡量肺泡通气量适当与否的一个客观指标。

血浆CO_2浓度轻度升高，可刺激呼吸中枢使呼吸加深加快：当PCO_2达到55mmHg时，即有抑制呼吸中枢致使呼吸衰竭的危险；PCO_2更高时出现CO_2麻醉，患者昏迷，甚至有生命危险。

动脉血PCO_2参考范围：35～45mmHg（4.65～5.98kPa）。＜35mmHg（4.65kPa）为低碳酸血症，极值＜10mmHg（1.33kPa）。＞45mmHg（5.98kPa）为高碳酸血症，极值＞130mmHg（17.29kPa）。

四、氧分压

氧分压（PO_2）是指溶解于血浆中的氧所产生的压力。氧在血液中的溶解量与吸入气体PO_2呈正比。大气中氧含量为20.95%，当大气压为760mmHg（101.3kPa），体温37℃时，吸入气体的PO_2为：

（760－47）×0.2095＝149.mmHg（19.kPa）

（水蒸气压37℃时为47mmHg，可视为常数）

100ml血液中每毫米汞柱PO_2时溶解氧为0.03ml，但在血液中由于血红蛋白与氧结合，因此，血液氧含量（$C-O_2$）是物理溶解氧和血红蛋白结合氧的总和：

$$C-O_2=\alpha \cdot PO_2+SatO_2 \times Hb \times 1.39$$

式中α为血液中（不是血浆）氧的溶解系数：$SatO_2$为氧饱和度；1.39为能与1g血红蛋白结合氧的量（理论推算值）。通过实验直接测得每克血红蛋白结合氧的能力为1.34ml。

氧气从肺泡进入血液后，除一部分呈物理状态溶解于血液外，绝大部分进入红细胞与血红蛋白结合，形成HbO_2。HbO_2的化学结合是一种可逆结合，当血液中PO_2升高时，血红蛋白与氧结合形成HbO_2；PO_2降低时，HbO_2离解形成血红蛋白和氧。因此，血液中PO_2越高，则HbO_2的百分比越高。

动脉血PO_2参考范围：80～100mmHg（10.64～13.3kPa）。低于55mmHg（7.31kPa）

即存在呼吸衰竭。PO_2 低，脑血管扩张，脑血流量增加，以减轻脑组织缺氧。PO_2 低于30mmHg（4kPa）以下即有生命危险。

五、总二氧化碳

总二氧化碳（TCO_2）是指存在于血液中一切形式的二氧化碳总量。包括：碳酸氢根（HCO_3^-），约占95%；CO_2 物理溶解形式，约占5%；碳酸（H_2CO_3）形式以及与血红蛋白结合形成的氨基甲酸血红蛋白，含量很少。如忽略后者，TCO_2 则代表 CO_2 与 HCO_3^- 之和，可以根据测定的pH 值和 PCO_2 值推算。TCO_2 在体内受呼吸及代谢两方面因素的影响，但主要还是代谢因素的影响，其实际计算公式：

$$TCO_3 = [HCO_3^-] + PCO_2 \times 0.03 mmol/L$$

动脉血 TCO_2 参考范围：24～32mmol/L。

在此，TCO_2 应与二氧化碳结合力（CO_2-CP）有所区分，CO_2-CP 是指血浆中以 HCO_3 形式存在的 CO_2 量。

六、实际碳酸氢根和标准碳酸氢根

实际碳酸氢根（AB）是指血浆中 HCO_3^- 的实际含量，受呼吸因素影响，通常根据pH 值和 PCO_2 测定结果而推算。

标准碳酸氢根（SB）是指完全氧合的血液，用 PCO_2 40mmHg（5.3kpA）的气体平衡后测得的血浆［HCO_3^-］，此结果实际上是计算出来的，由于排除了呼吸因素的影响，因此，是判断代谢性酸碱紊乱的良好指标。

HCO_3^- 主要是由碳酸氢盐解离而来，当其它阴离子缺乏时，［HCO_3^-］增加，代替其它阴离子而与阳离子保持平衡。因此，HCO_3^- 测定具有重要意义。AB 的增减可直接影响PH 值的稳定，当发生代谢性酸碱失衡时，由于缓冲作用体内较多的固定酸或固定碱可使 HCO_3^- 浓度随之改变，如代谢性酸中毒时血中［HCO_3］下降；代谢性碱中毒时血中［HCO_3^-］增加。因此，AB 是体内代谢性酸碱失衡的一个重要指标。

由于［HCO_3^-］可因原发性代谢性酸碱紊乱而改变，也可因呼吸性酸碱紊乱而继发于 PCO_2 变化。SB 除去呼吸因素的影响，可准确反映代谢性变化，SB 减少为代谢性酸中毒，SB 增高为代谢性碱中毒。SB 是代谢性酸碱变化的较好指标，但不能反映体内［HCO_3^-］实际量。通常将AB 与SB 这两个指标结合起来分析体内酸碱失衡状态。

AB 和SB 皆正常，为酸碱平衡正常。AB 和SB 均低于正常，为代谢性酸中毒（未代偿）。AB 和SB 均高于正常，为代谢性碱中毒（未代偿）。AB ＞SB 为呼吸性酸中毒。AB ＜SB 为呼吸性碱中毒。动脉血AB 参考值：21.4～27.3mmol/L。动脉血SB 参考值：

21.3～24.8mmol/L。

七、缓冲碱

缓冲碱（BB）是全血中具有缓冲作用的阴离子总和。BB有以下几种形式：

1）血浆BB（BBp）：是由血浆中HCO_3^-和蛋白阴离子（Pr⁻）组成。

2）全血BB（BBb）：是由血浆中HCO_3^-和Pr－加上血红蛋白组成。

3）细胞外液BB（BBecf）：是由血浆中HCO_3^-和Pr⁻及相当于5g血红蛋白时的BB（BB_{Hb5}）组成。

4）正常BB（NBB）：是指在一个标准大气压下，37℃时，血样在PCO_2为40mmHg（5.3kPa）中平衡，血红蛋白充分氧合，调整PH至7.40，测得血样的BB值为NBB。NBB与实际BB比较的差值即为△BB。

BBp＝HCO_3^-和Pr⁻或BEp＋41.7，参考值为为41～42mmol/L。

BBb＝HCO_3^-＋Pr－血红蛋白×0.42或BEb＋48，参考值为48mmol/L。

BB_{Hb5}＝HCO_3^-＋Pr⁻＋5（或1/3实测血红蛋白）×0.42或BE_{Hb5}＋43.8，参考值为43.8mmol/L。

NBB是正常缓冲碱，NBBP和BBp在正常情况下应相等；如BBP＞NBBp，表明代谢碱过多；相反，如BBp＜NBBp，表明有代谢性酸中毒。

由于BB指标不仅受血浆蛋白和血红蛋白浓度的影响，而且还受呼吸因素及电解质影响，因此，目前认为它不能确切反映代谢性酸碱平衡情况。

八、碱剩余

碱剩余（BE）是指在标准状况下（37℃，PCO_2为40mmHg或5.3kPa，100%血红蛋白氧合），用酸或碱滴定全血或血浆至pH7.40时所消耗的酸或碱量，即△BB，用mmol/L表示。用酸滴定表示碱剩余，△BB为正值，用碱滴定表示碱不足，△BB为负值。

BE受血红蛋白浓度的影响，一般采用全血BE（BEb），即实际血红蛋白浓度时的BE：也可以用血浆BE（BEp）表示，即血红蛋白为0时的BE；或用细胞外液BE（BEecf）表示。因为包括血液在内的细胞外液中，血红蛋白浓度可按50～60g/L计，故目前将血红蛋白60g/L时的BE称为BEecf. 当BE为正值时，说明缓冲碱增加；BE为负值时，说明缓冲碱减少。因此，BE是酸碱平衡中反映代谢性因素的一个客观指标，血红蛋白完全氧合时的BE值与患者血红蛋白实际氧合时的BE值可以进行校正，但由于影响极小，可忽略不计。

BE参考值；－3～＋3mm.

九、氧饱和度和P_{50}

氧饱和度（$SatO_2$）是指结合了氧的血红蛋白占总血红蛋白的百分数，可以在标准氧解离曲线基础上，由Po_2和pH值计算出来。P_{50}是指在标准条件下（37℃，PH7.4）$SatO_2$为50%时的PO_2。血$SatO_2$取决于PO_2，但两者并不呈直线关系，而呈“S”形曲线关系，称为氧的解离曲线。样品PO_2由100mmHg（13.3kPa）逐渐下降至60mmHg（7.98kPa），其$SatO_2$变化不大。但PO_2在60mmHg（7.98kPa）以下时，正处在曲线陡直位置，PO_2稍有下降，可导致$SatO_2$急剧下降，此时可以发生严重缺氧状态。

氧解离曲线在各种因素的影响下，可发生左移或右移的改变，反映曲线左移或右移的指标为P_{50}。P_{50}可反映血液输氧能力以及血红蛋白与氧的亲和力。P_{50}增加，提示氧离解曲线右移，氧与血红蛋白亲合力降低，血红蛋白易释放氧：P_{50}降低，提示氧离解曲线左移，氧与血红蛋白亲和力增强，血红蛋白易结合氧，但不易释放氧。因此，P_{50}降低时，尽管$SatO_2$较高，而实际上组织同样缺氧。

影响P_{50}的因素很多，凡能影响氧与血红蛋白结合的因素均可影响P_{50}，主要影响因素如下：

温度：体温升高P_{50}右移，体温降低P_{50}左移。

PCO_2：PCO_2增高P_{50}右移，PCO_2降低P_{50}左移。

p值：值增高P_{50}左移，H值降低P_{50}右移。

红细胞内2，3－二磷酸甘油酸增高P_{50}右移，减少P_{50}左移。

$SatO_2$参考值：91.9%～99.0%。

P_{50}参考值：26.6mmHg（3.5kPa）。

十、阴离子隙

阴离子隙（AG）是评价体液酸碱状况的一项重要指标，它可鉴别不同类型的代谢性酸中毒，并为诊断许多潜在的疾病提供重要线索。

AG是指血清中所测定阳离子总数与阴离子总数之差。现多采用以下简化公式表示：

$$AG\ (mmol/L) = Na - (Cl^{+} + HCO_3^{-})$$

AG是早期发现代谢性酸中毒合并代谢性碱中毒、慢性呼吸性酸中毒合并代谢性酸中毒、呼吸性碱中毒合并代谢性酸中毒、混合性代谢性酸中毒及三重酸碱失衡的有用指标。判断AG时，应注意精确地测定血清电解质，以排除实验误差对AG的影响。

AG参考范围：8～16mmol/L。

AG也用作电解质测定综合评估质量指标。每天测定的阳离子总数与阴离子总数之差应当控制在一定范围内。

第四节　血气分析和酸碱失衡的判断

血气分析结果的判断应当注意实验室检查与临床检查结合，血气分析与电解质检查结合。

一、血气分析判断原则

1．分清原发和继发（代偿）变化

在分析具体数据前，首先对临床情况应有初步印象。了解患者的病因病史，按一般规律该病如发生酸碱失衡将是什么性质：是呼吸性还是代谢性；是急性还是慢性；是否有代偿；有无缺氧；并应了解电解质，肾功能和心肺功能等情况进行综合分析。根据代偿规律，一般地说，单纯性酸碱失衡pH 值是由原发失衡所决定的，如pH ＜7.40，提示原发失衡可能为酸中毒；pH ＞7.4 原发失衡可能为碱中毒。但是pH 值正常也同样可能存在酸碱失衡，此点不可忽视。常见酸碱失衡类型各指标变化见表6 －4 －1。

表6 －4 －1　常见酸碱失衡类型各指标变化

类型	pH 值	[HCO_3^-]	PCO_2
代谢性酸中毒	↓	↓↓	
呼吸性碱中毒	↑	↓	
呼吸性酸中毒	↓	↑	↑↑
代谢性碱中毒	↑	↑↑	
呼吸性酸中毒并代谢性酸中毒	↓	↓N ↑	↓N ↑
呼吸性碱中毒并代谢性碱中毒	↑	↓N ↑	↓N ↑
呼吸性酸中毒并代谢性碱中毒	↑N ↓	↑	
呼吸性碱中毒并代谢性酸中毒	↑N ↓	↓	

注：↑高于正常均值；↓低于正常均值；N 正常值范围内

2．分清单纯性或混合性酸碱失衡

PCO_2 与HCO_3 的反相变化肯定有混合性酸碱失衡，如PCO_2 升高的同时伴HCO_3 下降，肯定为呼吸性酸中毒合并代谢性酸中毒；PCO_2 下降的同时若伴HCO_3^-升高，肯定为呼吸性碱中毒合并代谢性碱中毒；PCO_2 和HCO_3^-异常的同时若伴pH 值正常，应考虑有混合性酸碱失衡的可能，进一步确诊可用酸碱失衡诊断图或单纯性酸碱失衡预计代偿公式分析，见表6 －4 －2。若代偿反应的指标超出预计代偿公式，则可判断为混合性酸

碱失衡。

表6－4－2　常用单纯性酸碱失衡的预计代偿公式

原发失衡	原发化学变化	代偿反应	预计代偿公式	代偿时限	代偿极限
代谢性酸中毒	$[HCO_3^-]$ ↓	PCO_2 ↓	$PCO_2=1.5\times[HCO_3^-]+8\pm2$	12～24h	10mmHg
代谢性碱中毒	$[HCO_3^-]$ ↑	PCO_2 ↑	$\triangle PCO_2=0.9\times\triangle[HCO_3^-]\pm5$	12～24h	55mmHg
呼吸性酸中毒	PCO_2 ↑	$[HCO_3^-]$	急性：$[HCO_3^-]$ 升高3～4mmol/L	几分钟	30mmol/L
			慢性：$\triangle[HCO_3^-]=0.35\times\triangle PCO_2\pm5.58$	3～5d	42～45mmol/L
呼吸性碱中毒	PCO_2 ↓	$[HCO_3^-]$	急性：$\triangle[HCO_3^-]=0.2\times\triangle PCO_2\pm2.5$	几分钟	18mmol/L
			慢性：$\triangle[HCO_3^-]=0.5\times\triangle PCO_2\pm2.5$	3～5d	12～15mmol/L

注：①有△者为变化值，无△者为绝对值；该变化值可正可负；②代偿极限，指单纯性酸碱失衡代偿所能达到的最小值

或最大值：③代偿时限，指体内达到最大代偿反应所需的时间

3．动态观察和综合分析

有时对酸碱失衡的诊断靠一次检测还不够，必须多次复查或动态观察才能作出可靠诊断，以及发现新的异常。例如：pH 值下降，PCO_2 升高和BE 增高，这可能是慢性呼吸性酸中毒，当第二次复查发现PCO_2 改变不大，BE 在原增高的基础上比第一次检测时下降，此时应考虑到呼吸性酸中毒的同时又合并了代谢性酸中毒。因此，不能单凭BE 增高就判断是“碱”，BE 降低就判断是“酸”。在混合性酸碱失衡中，有时BE 增高也可诊断为并存代谢性酸中毒。同理，PCO_2 低于正常范围，有时也可考虑存在相对的通气不足，是呼吸性酸中毒的表现。

4．熟悉肺功能和肾功能的代偿机制及代偿所需时间

掌握代偿时间对分析酸碱失衡是急性还是慢性，是部分代偿还是最大代偿，是单纯性还是混合性失衡有所帮助。一般来说，代谢性酸中毒的呼吸代偿即刻发生，24h 内就可达最大代偿；代谢性碱中毒呼吸代偿要1d 后才开始，需3～5d 才达最大代偿和稳定，这种代偿不如代谢性酸中毒完全；呼吸性酸中毒的代谢代偿要1d 后开始，5～7d 才达最大代偿；呼吸性碱中毒的代谢代偿6～18h 才开始，3d 可达最大代偿。对于代偿时间还不到而达到代偿或超过代偿范围，或代偿时间已超过而未达到代偿或超过代偿范围的，在分析时，应考虑混合性酸碱失衡，根据代偿的预计公式诊断混合性酸碱失衡。

5．动脉PO_2 和PCO_2 是血气分析的主要指标

动脉PO_2 是缺氧的敏感指标，当动脉PO_2 低于正常的最低限时，就应考虑有缺氧的可能，当动脉PO_2 为60mmHg 时，已存在低氧血症。

动脉PO_2 测定值只表示当时患者血液的氧合情况，并不代表肺的摄氧功能。动脉PO_2 正常，甚至高于正常，同样可能有摄氧障碍，要进一步了解吸人氧浓度及肺泡动脉

氧分压差（$A-aDO_2$），才能真实反映肺换气功能状况。$A-aDO_2$ 增加，尽管患者在吸氧后动脉PO_2 正常，仍提示有病变。动脉PCO_2 升高是通气不足；动脉PCO_2 降低是通气过度。

二、各型酸碱失衡的诊断

（一）用Siggaard-Anderson 酸碱图诊断酸碱紊乱

该图是在直角坐标图基础上衍生的图，纵坐标为动脉血pH 值或氢离子浓度，横坐标为PCO_2，图中部相当于PCO_2 40mmHg（5.3kPa）的垂直标尺为 $[HCO_3^-]$ mmol/L。$[HCO_3^-]$ 标尺所作的45°角斜分划线的斜率为1。右上部为细胞外液可滴定H^+浓度（BEecf 或BDecf）尺，其射线为45°角的斜线，图中标明有酸碱状态正常范围及酸碱紊乱的区域，共8 个区域，根据pH 值及PCO_2 两个参数即可诊断。先根据测得血pH 值及PCO_2 值在图中分别找出pH 轴及PCO_2 轴上相应点，就表明属某酸碱紊乱；若交点落在两区之间，就指示有混合型的酸碱紊乱，或是急性酸碱紊乱的过渡阶段。

（二）用预计代偿公式诊断酸碱失衡

1．急、慢性呼吸性酸中毒

原发的PCO_2 升高，称为呼吸性酸中毒。

（1）急性呼吸性酸中毒时，肾脏几乎不参与代偿，机体主要通过血液缓冲系统，使 $[HCO_3^-]$ 代偿尝增加，即使PCO_2 升高至80～90mmHg（10.7～12kPa），此种代偿也仅能使 $[HCO_3^-]$ 增加3～4mmol/L，因此，急性呼吸性酸中毒一旦出现 $[HCO_3^-]$ >30mmol/L，即可诊断为急性呼吸性酸中毒合并代谢性碱中毒；$[HCO_3^-]$ <22mmol/L，即可诊断为呼吸性酸中毒合并代谢性酸中毒。

（2）慢性呼吸性酸中毒时，由于肾脏参与代偿，血浆 $[HCO_3^-]$ 进一步增加，肾脏达最大代偿时间为3～5d，代偿极限为 $[HCO_3^-]$ 42～45mmol/L。

预计代偿公式：

$$\triangle [HCO_3^-] = 0.35 \times \triangle PCO_2 \pm 5.58$$

凡实测 $[HCO_3^-]$ 落在正常 $[HCO_3^-]$（24mmol/L ± △ $[HCO_3^-]$）代偿范围内者，可诊断为慢性呼吸性酸中毒；当实测 $[HCO_3^-]$ >24 +0.35 × $\triangle PCO_2$ +5.58，可诊断为慢性呼吸性酸中毒合并代谢性碱中毒；当实测 $[HCO_3^-]$ <24 +0.35 × $\triangle PCO_2$ −5.58，可诊断为慢性呼吸性酸中毒合并代谢性酸中毒。

举例：慢性支气管炎患者，血气分析结果为pH7.34，$PCO_2$60mmHg（8kPa），

$[HCO_3^-]$ 31mmol/L。代入预计代偿公式：

$$\triangle [HCO_3^-] = 0.35 \times (60 - 40) \pm 5.58 = 7 \pm 5.58 \text{ mmol/L}$$

$[HCO_3^-]$ ＝正常 $[HCO_3^-]$ ＋△ $[HCO_3^-]$ ＝24＋7±5.58＝25.42～36.58mmol/L

实测 $[HCO_3^-]$ 为31mmol/L 落在预计范围内（25.42～36.58mmol/L），结合病史可诊断为慢性呼吸性酸中毒。

2．急、慢性呼吸性碱中毒

原发的PCO_2 减少，称为呼吸性碱中毒，机体的代偿机制可以使 $[HCO_3^-]$ 降低。

（1）急性呼吸性碱中毒：代偿时限仅几分钟，肾脏几乎不参与代偿，主要靠血液缓冲系统和细胞内、外离子交换代偿。代偿极限为 $[HCO_3^-]$ ＞18mmol/L。根据预计公式：

$$\triangle [HCO_3^-] = 0.2 \times \triangle PCO_2 \times 2.5$$

当实测 $[HCO_3^-]$ 落在正常 $[HCO_3^-]$（24mmol/L）＋△ $[HCO_3^-]$ 范围内，可诊断为急性呼吸性碱中毒；实测的 $[HCO_3^-]$ ＞正常 $[HCO_3^-]$ ＋0.2×$\triangle PCO_2$ ＋2.5，可诊断为急性呼吸性碱中毒合并代谢性碱中毒；实测的 $[HCO_3^-]$ ＜正常 $[HCO_3^-]$ ＋0.2×$\triangle PCO_2$ －2.5，可诊断为急性呼吸性碱中毒合并代谢性酸中毒。

举例：急性过敏性哮喘患者血气分析结果为pH7.48，PCO_2 29mmHg，$[HCO_3^-]$ 23mmol/L。代入预计代偿公式得：

$$\triangle [HCO_3^-] = 0.2 \times (29 - 40) \pm 2.5 = -2.2 \pm 2.5 \text{ (mmol/L)}$$

预计范围：

$[HCO_3^-]$ ＝正常 $[HCO_3^-]$ ＋△ $[HCO_3^-]$ ＝24－2.2±2.5＝21.8±2.5＝19.3～24.3（mmol/L）

实测 $[HCO_3^-]$ 为23mmol/L，落在此范围内。结合病史可诊断为急性呼吸性碱中毒。

（2）慢性呼吸性碱中毒：各种原因引起的慢性肺过度换气所致，代偿极限为 $[HCO_3^-]$ 12～15mmol/L，预计代偿公式：

$$\triangle [HCO_3^-] = 0.5 \times \triangle PCO_2 \sim 2.5$$

凡实测 $[HCO_3^-]$ 在正常 $[HCO_3^-]$（24mmol/L）＋△ $[HCO_3^-]$ 范围内，可诊断为慢性呼吸性碱中毒；当实测 $[HCO_3^-]$ ＞正常 $[HCO_3^-]$ ＋0.5×$\triangle PCO_2$ ＋2.5，可诊断为慢性呼吸性碱中毒合并代谢性碱中毒或未代偿慢性呼吸性碱中毒；当实测 $[HCO_3^-]$ ＜正常 $[HCO_3^-]$ ＋0.5×$\triangle PEO_2$ －2.5，可诊断为慢性呼吸性碱中毒合并代谢性酸中毒。

举例：患者脑外伤后昏迷，应用人工呼吸机数天，测得pH7.42，PCO_2 29mmHg，$[HCO_3^-]$ 19mmol/L。代入预计代偿公式：

△ $[HCO_3^-]$ =0.5 ×APCO ±2.5 =0.5 × (49 -40) ±2.5 = -5.5 ±2.5 (mmol/L)

预计范围：

$[HCO_3^-]$ = 正常 $[HCO_3^-]$ + △ $[HCO_3^-]$ =24 -5.5 ±2.5 =18.5 ±2.5 =16 ~21 (mmol/L)

实测 $[HCO_3^-]$ 为19mmol/L，落在16 ~21mmol/L 范围内。结合病史可诊断为慢性呼吸性碱中毒。

3．代谢性酸中毒

血浆中原发的 $[HCO_3^-]$ 减少，称代谢性酸中毒，发挥最大的代偿时限为12 ~24h，代偿极限为$PCO_2$10 mmHg (1.3kPa)。临床上根据阴离子隙 (AG)，将代谢性酸中毒分为高AG 型和正常AG 型。

$$AG = Na^+ - (Cl^- + HCO_3^-)$$

其参考值为8 ~16mmol/L。

高AG 代谢性酸中毒，以“产生过多的酸”为特征，常见于乳酸中毒、尿毒症和酮症酸中毒，有人称此型为正常血氯型代谢性酸中毒。

正常AG 代谢性酸中毒，称为高氯型代谢型酸中毒，可由 $[HCO_3^-]$ 减少 (如腹泻)、酸排泄衰竭 (如肾小管性酸中毒或过多使用含氯的酸) 等引起。

结合临床和电解质分析，根据代谢性酸中毒预计代偿公式：

$$PCO_2 = 1.5 \times [HCO_3^-] + 8 \pm 2$$

凡实测PCO_2 落在1.5 × $[HCO_3^-]$ +8 ±2 范围内，可诊断为代谢性酸中毒；凡实测PCO_2 >1.5 × $[HCO_3^-]$ +8 ±2 可诊断为代谢性酸中毒合并呼吸性酸中毒；凡实测PCO_2 <1.5 × $[HCO_3^-]$ +8 ±2，可诊断为代谢性酸中毒合并呼吸性碱中毒。

举例：腹部外科大手术后发热患者血气分析结果为pH7.32，PCO_2 30mmHg，$[HCO_3^-]$ 15mmol/L。

分析：$[HCO_3^-]$ 15 <24mmol/L，pH7.32 <7.40，可初步确定为代谢性酸中毒。为了排除可能存在的混合性酸碱失衡，代人代谢性酸中毒预计代偿公式：

$$PCO_2 = 1.5 \times 15 + 8 \pm 2 = 30.5 \pm 2 mmHg$$

实测PCO_2 为30mmHg，在预计范围内，可诊断为单纯性代谢性酸中毒。

4．代谢性碱中毒

血浆原发 $[HCO_3^-]$ 升高，称为代谢性碱中毒，代偿时限为12 ~24h，代偿极限为$PCO_2$55mmHg (7.3kPa)。根据预计代偿公式：△PCO_2 =0.9 × △ $[HCO_3^-]$ ±5，凡实测PCO_2 落在正常PCO_2 (40mmHg) + △PCO_2 范围内，可诊断为代谢性碱中毒；实测PCO_2

>0.9×△ [HCO_3^-] +5，可诊断为代谢性碱中毒合并呼吸性酸中毒；实测PCO_2<0.9×△ [HCO_3^-] −5，可诊断为代谢性碱中毒合并呼吸性碱中毒。

举例：某幽门梗阻患者血气分析结果为pH7.49，$PCO_2$48mmHg，[HCO_3^-] 36mmol/L。

分析：pH7.49 >7.40，[HCO_3^-] 36 >24mmol/L，由于幽门梗阻呕吐引起大量胃酸丢失，可初步诊断为代谢性碱中毒，为了排除可能存在的混合性酸碱平衡，代人预计代偿公式：

$$\triangle PCO_2 = 0.9 \times (36 - 24) \pm 5 = 10.8 \pm 5\ mmHg$$

预计PCO_2范围为40 +10.8 ±5 =50.8 ±5 (mmHg)，实测PCO_2为48mmHg，落在此范围内，可诊断为单纯性代谢性碱中毒。

5．混合性酸碱失衡

两种或3 种单纯性酸碱失衡同时存在时，称为混合性酸碱失衡。根据单纯性酸碱失衡预计代偿公式计算，超出预计范围，结合临床可分别诊断为：呼吸性酸中毒并代谢性酸中毒；呼吸性酸中毒并代谢性碱中毒；呼吸性碱中毒并代谢性酸中毒；呼吸性碱中毒并代谢性碱中毒；代谢性酸中毒并呼吸性碱中毒；代谢性酸中毒并呼吸性酸中毒；代谢性碱中毒并呼吸性酸中毒；代谢性碱中毒并呼吸性碱中毒。

三重酸碱失衡是一种呼吸性酸中毒或呼吸性碱中毒合并代谢性酸中毒加代谢性碱中毒。其中，呼吸性碱中毒并代谢性碱中毒加代谢性酸中毒，可见于呼吸性碱中毒伴代谢性碱中毒基础上，再合并高AG 代谢性酸中毒；也可见于呼吸性碱中毒伴高AG 代谢性酸中毒基础上，由于补碱过多再合并代谢性碱中毒。其酸碱指标特点为：AG 升高，PCO_2下降，以及 [HCO_3^-] 变化与AG 升高不成对等比例，pH 值取决于3 种失衡的相对严重程度。由于此型失衡是两种碱化和1 种酸化过程叠加，因此，pH 值往往偏大。呼吸性酸中毒加代谢性酸中毒再加代谢性碱中毒，多见于较为严重的肺源性心脏病呼吸衰竭时，其酸碱指标特点为：AG 升高，PCO_2升高，[HCO_3^-] 变化与AG 升高不成对等比例，而pH 值偏碱、正常、偏酸均有可能，关键取决于3 种失衡的相对严重程度。值得注意的是，三重酸碱失衡的判断和AG 指标，在某种程度上依赖于电解质分析的准确度和建立有效的AG 质控。

第七章　非蛋白含氮化合物及总胆汁酸测定

非蛋白含氮化合物包括除蛋白以外的尿素、肌酐、肌酸、尿酸、氨基酸、核苷酸、嘌呤、谷胱甘肽等多种有机物。临床上应用较多的主要有尿素、肌酐、尿酸和肌酸及它们的最终代谢产物氨，另外还有含血红素蛋白（如血红蛋白、肌红蛋白、过氧化氢酶、细胞色素等）的代谢产物胆红素。

胆汁酸由胆固醇转变而成，在肝脏合成、胆道排泄，血胆汁酸可反映肝胆功能。

第一节　尿素测定

检测尿素的方法很多，如经脲酶处理后直接或间接测定尿素转变成的氨，其中氨离子选择性电极法可用于科研；指示染料与氨反应的方法很特异，应用于干试剂方法；电导法也是一种很特异、快速的动力学方法，具有很高的应用价值。目前应用较多的为酶偶联连续监测法和脲酶－波氏比色法。

一、酶偶联连续监测法

【原理】

反应原理如下：

$$\text{尿素}+H_2O \xrightarrow{\text{尿素酶}} 2NH_3+CO_2$$

$$NH_3+\alpha\text{－酮戊二酸}+NADH+H^+ \xrightarrow{\text{谷氨酸脱氢酶}} \text{谷氨酸}+NAD^++H_2O$$

NADH 在340nm 波长处有吸收峰，其吸光度下降的速率（ΔA/min）与待测样品中尿素的含量成正比。

【试剂】

1）试剂成分和在反应液中的参考浓度Tris－琥珀酸缓冲液（pH8.0）150mmol/L，尿素酶8000U/L，谷氨酸脱氢酶700U/L，NADH0.3mmol/L，α－酮戊二酸15mmol/L，ADP1.5mmol/L。

2）尿素校准液（约50mmol/L）。

目前较多采用双试剂法，尿素酶/NADH 单独分装可延长保存期限。各试剂公司采用不同方法，试剂有效期有所不同。

【操作】

一般采用自动/半自动分析仪连续监测法检测，也有采用终点法检测的。应根据试剂盒说明书设置参数。以下连续监测法参数可供参考：波长340nm，样品/反应液总体积为1∶101，恒温37℃，延迟时间30s，测量时间30s。

【计算】

$$\text{尿素浓度}\ (\mu mol/L) = \frac{\text{测定管}\triangle A/min - \text{空白管}\triangle A/min}{\text{校准管}\ \triangle A/min - \text{空白管}\triangle A/min} \times \text{尿素校准液浓度}\ (\mu mol/L)$$

$$\text{尿素氮质量浓度}\ (mg/dl) = \text{尿素}\ (mol/L) \times 2.8$$

【注意事项】

1）不同厂家试剂盒的试剂Ⅰ和试剂Ⅱ成分可能有差异，不能混用。

2）在340nm 波长处试剂空白对水的吸光度值应大于100，试剂浑浊或其吸光度值低于1.00 的应放弃使用。

3）在测定过程中，各种器材和去离子水均应无氨离子污染，同时防止交叉污染，否则检测结果偏高。

4）含枸橼酸钠和氟化钠的血浆可导致检测结果偏低。

5）血氨升高可使本法检测结果偏高，溶血样品对测定亦有干扰。

二、脲酶－波氏比色法

【原理】

本法测定分两个步骤，首先用脲酶水解尿素，产生二分子氨和一分子二氧化碳。然后，氨在碱性介质中与苯酚及次氯酸反应，生成蓝色的吲哚酚，此过程需用亚硝基铁氰化钠催化反应。蓝色吲哚酚的生成量与尿素含量成正比，在630nm 波长处有吸收峰。

【试剂】

1）酚显色剂：苯酚10g，亚硝基铁氰化钠（含2 分子水）0.05g，溶于1L 去离子水中，存放冰箱中，可保存60d。

2）碱性次氯酸钠溶液：氢氧化钠5g 溶于去离子水中，加1mol/L 次氯酸钠溶液5.42ml，再加去离子水至1L，置棕色瓶内存放冰箱，稳定2 个月。

3）尿素酶贮存液：尿素酶（比活性3000～4000U/g）0.2g 置于20ml50％甘油中，冰箱内可保存6 个月。

4）尿素酶应用液：尿素酶贮存液1ml，加10g/L EDTA 钠盐溶液（pH6.5）至100ml，置冰箱保存可稳定1 个月。

5）尿素校准液：参照酶偶联连续监测法。

【操作】

按表4－7－1 步骤操作。各管混匀，置37 ℃水浴20 min。波长630nm 处空白管调零，读取各管吸光度值。

【计算】

$$\text{尿素浓度（mmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{校准管吸光度}} \times \text{尿素校准液浓度（mmol/L）}$$

表4－7－1　尿素测定腺酶－波氏比色法操作步骤

加入法（ml）	测定管	校准管	空白管
尿素酶应液	1.0	1.0	1.0
待测血清	0.01		
尿素校准液		0.01	
去离子水			0.01
	混匀，37 ℃水浴15min		
酚显色剂	5.0	5.0	5.0
碱性次氯酸纳	5.0	5.0	5.0

【注意事项】

1）本法亦能测定尿液中尿素，但尿中的氨比血清中的氨多1000 多倍，因此需测定经脲酶处理前后的氨含量，再计算尿素浓度。

2）空气中氨气污染试剂或采用玻璃器皿，或使用铵盐抗凝剂可使检测结果偏高。高浓度氟化物可抑制尿素酶，导致检测结果偏低。

3）市售次氯酸钠的有效氯浓度需经过标定，方法参见本篇第四章酶类测定第十三节腺苷脱氨酶测定。

【参考值】

2.86～8.20 mmol/L（以尿素计算）；8.01～22.96 mg/dl（以尿素氮计）。

【临床意义】

血液尿素浓度随饮食中的蛋白质含量成比例改变，且组织分解时蛋白代谢率增加，血尿素增高。在健康人普通饮食条件下，血尿素浓度是检测肾脏滤过功能的敏感指标。肾功能下降时，在肌酐浓度发生明显变化前，血尿素浓度通常已增加。病理性血液尿素增加的原因大致可分为以下3 类：

1）肾前性疾病：最重要的原因是失水，任何原因引起的血液浓缩都将因肾血流量减少，肾小球滤过率减低而使血液尿素浓度增加。

2）肾性疾病：肾小球肾炎、肾病晚期、肾功能衰竭、慢性肾盂肾炎及中毒性肾炎

等影响肾小球滤过的疾病均可使血液中尿素浓度增高。

3）肾后性疾病：所有可能使尿路阻塞的因素均可引起血液中尿素浓度增高。

血尿素浓度降低除婴儿、孕妇以及低蛋白高糖饮食者外，常见于肝功能衰竭患者。

第二节　肌酐测定

肌酐的检测一直沿用Jaffé反应比色测定及各种改良方法如：漂白土吸附法、动力学法、双pH 法等。其中Jaffé反应连续监测法或两点法最多用。其它如肌酐酰胺水解酶法、肌酐亚氨水解酶法及HPLC 法等在临床上应用较少。

一、除蛋白终点法

【原理】

血液、血浆或血清标本经除蛋白处理后，肌酐与碱性苦味酸产生Jaffé反应，生成桔红色的Janovski 复合物。尿液标本稀释后测定。

【试剂】

1）35mmol/L 钨酸溶液：①100ml 去离子水中，加入1g 聚乙烯醇，加热助溶（勿煮沸），冷却；②300ml 去离子水中，加入11.1g 钨酸钠，使完全溶解；③300ml 去离子水中，慢慢加入2.1ml 浓硫酸，冷却。于1L 容量瓶中，将①液加入②液中，再与③液混匀，加去离子水至刻度，室温稳定1 年。

2）0.04mol/L 苦味酸溶液：苦味酸9.3g，溶于500ml80℃去离子水中，冷却至室温，加去离子水至1L。用0.1mol/L 氢氧化钠溶液滴定，以酚酞作指示剂。0.04mol/L 氢氧化钠溶液1ml 相当于0.4mol/L 苦味酸1ml（9.1644mg）。

3）0.75mol/L 氢氧化钠溶液：氢氧化钠30g，加去离子水使其溶解，冷却后用去离子水稀释至1L。

4）肌酐贮存校准液（10mmol/L）：肌酐（相对分子质量113.12）113mg 用0.1mol/L 盐酸溶解，并移入100ml 容量瓶内，再用0.1mol/L 盐酸稀释至刻度。

5）肌酐应用校准液（100μmol/L）：取1ml 肌酐贮存校准液加入100ml 容量瓶内用0.1mol/L 盐酸稀释至刻度。

【操作】

取血清（血浆）及校准液0.5ml，各加入35mmol/L 钨酸溶液4.5ml，充分混匀，10min 后，离心沉淀，取上清液；若为尿液标本用去离子水作1∶200 稀释。以后均按表4—7—2 步骤操作。

表4－7－2　肌酐测定终点法操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
血无蛋白滤液或稀释尿液	3.0		
肌酐校准液		3.0	
去离子水			3.0
苦味酸溶液	1.0	1.0	1.0
氢氧化钠溶液	1.0	1.0	1.0

室温15min，波长510nm，空白管调零，读取吸光度值。

【计算】

$$\text{血清（浆）肌酐浓度（}\mu\text{mol/L）}=\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{校准管吸光度}}\times\text{肌酐应用校准液浓度（}\mu\text{mol/L）}$$

$$\text{尿液肌酐量（mmol/24h）}=\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{校准管吸光度}}\times\text{肌酐应用校准液浓度（}\mu\text{mol/L）}\times 200\times 24\text{h 尿量（L）}\div 1000$$

【参考值】

血清（浆）：男性44～133μmol/L（0.50～1.50mg/dl）。女性70～106μmol/L（0.80～1.20mg/dl）。尿液：男性7～18mmol/24h，女性5.3～16mmol/24h。

【注意事项】

1）温度升高，碱性苦味酸溶液显色增深，但校准管与测定管不成比例。因此，测定时各管温度均需调整到室温。

2）标本在4℃冰箱保存可稳定3d，于－20℃冰箱可保存较长时间。

3）无蛋白滤液的pH影响肌酐测定回收率，pH在2以下时回收率为100%。

二、连续监测法

【原理】

肌酐的连续监测法测定是根据肌酐与苦味酸反应，生成桔红色的Janovski复合物的拟一级反应动力学原理。在碱性反应环境中，样品中的肌酐或干扰物质和苦味酸的反应速度不同，选择适宜的监测时间，可提高肌酐测定的特异性。

【试剂】

1）0.04mol/L苦味酸溶液。

2）0.32mol/L氢氧化钠溶液。

3）碱性苦味酸溶液：根据用量，将0.04mol/L苦味酸溶液和0.32mol/L氢氧化钠

溶液等体积混合，可加适量表面活性剂如Triton X －100，放置20min 以后即可应用。

4） 肌酐校准液同除蛋白终点法。

【操作】

采用自动/半自动分析仪连续监测法检测，按试剂盒说明书操作，或参照以下参数分析：仪器波长510nm，比色杯光径1.0cm，反应温度37 ℃（30，25）℃，样品反应液体积=1∶11。延迟时间20s，测量时间40s。得到校准管每分钟吸光度值变化（△A/min）和测定管△A/min。

【计算】

$$\text{血清肌酐浓度（μmol/L）} = \frac{\text{测定管}\triangle A/\text{min}}{\text{校准管}\triangle A/\text{min}} \times \text{肌酐校准液浓度（μmol/L）}$$

【参考值】

男性53～97 μmol/L（0.60～1.10mg/dl）；女性44～80 μmol/L（0.50～0.90mg/dl）。

【注意事项】

1） 必须严格控制反应时间，以尽量避免快速或慢速反应假肌酐物质的干扰。

2） 溶血产生的红细胞内非特异性物质将干扰反应。

3） 胆红素可引起负偏差。某些全自动生化分析仪具有空白速率参数，能去除胆红素负干扰。

三、内生肌酐清除值测定

【原理】

通过测定血和尿中肌酐浓度来计算每分钟或24h 有多少毫升（或升）血浆中的肌酐通过肾脏被清除，此值称为内生肌酐清除值。该值与正常人的内生肌酐清除值（一般为128L/24h）相比较，求得的百分率为内生肌酐清除率。后者目前临床上较少采用。主张以校正的内生肌酐清除值报告。

【方法】

试验前3d，嘱受检者禁食肉类，避免饮用咖啡或茶，停用利尿剂，避免剧烈运动。适量饮水，使尿量不少于1ml/min。收集24h 尿液的同时，抽静脉血3ml。同时用碱性苦味酸法或酶法测定血、尿肌酐浓度。

【计算】

$$\text{内生肌酐清除值（L/24h）} = \frac{\text{尿中肌酐浓度（μmol/L）}}{\text{血中肌酐浓度（μmol/L）}} \times \text{24h 尿量（L）}$$

$$\text{内生肌酐清除值（ml/min）} = \text{内生肌酐清除值（L/24h）} \times \frac{1000}{1440}$$

$$\text{校正后内生肌酐清除值} = \text{内生肌酐清除值} \times \frac{1.73}{\text{体表面积（m}^2\text{）}}$$

体表面积可根据身高体重推算，见图4 -7 -1。

【参考值】

男性　(105 ±20) ml/min；女性　(95 ±20) ml/min。即为相应的体表面积内生肌酐清除值与年龄呈负相关，见表4 -7 -3。

表4 -7 -3　不同年龄组内生肌酐清除值　(ml/min，1.73m²)

年龄　(岁)	男性	女性
20 ～	88 ～146	81 ～134
30 ～	82 ～140	75 ～128
40 ～	75 ～133	69 ～122
50 ～	68 ～126	64 ～116
60 ～	61 ～120	58 ～110
70 ～	55 ～113	52 ～105

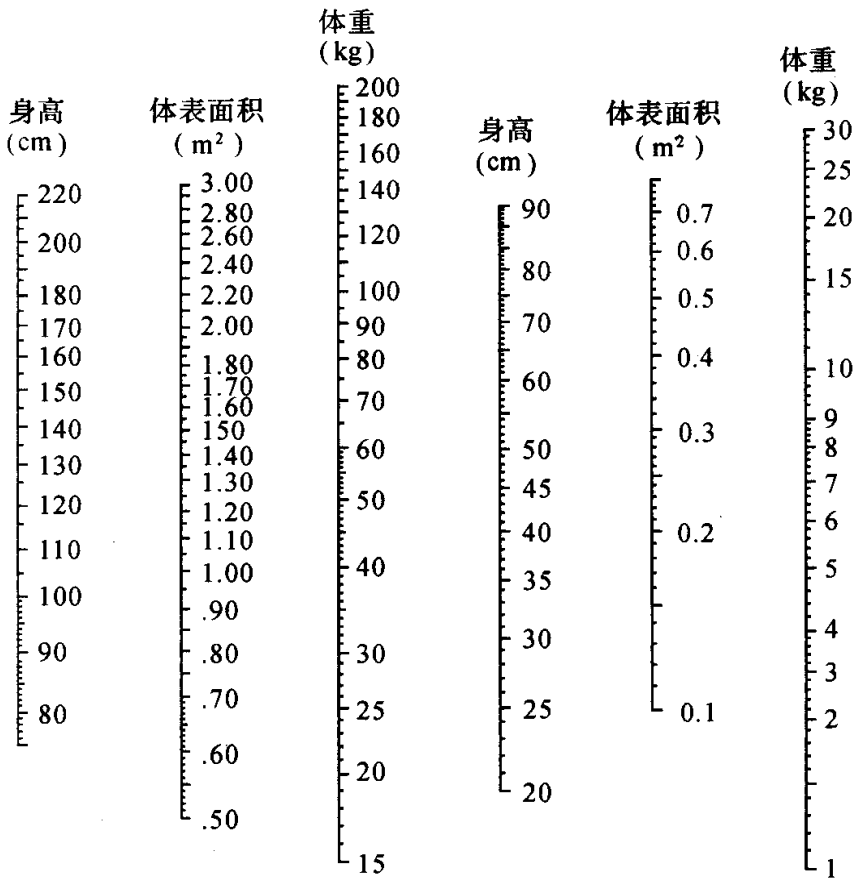


图4 -7 -1　体表面积计算图

注：身高和体重分别对应在标尺的相应位置，将两者之间作一直线，其与体表面积标尺的交点处所显示的数值

【注意事项】

（1）24h 尿需准确留取。

（2）不同体表面积对检测结果影响很大，每个个体都应根据身高体重查图得出体表面积值。

【临床意义】

血浆肌酐浓度（Cr）反映肾小球滤过功能，因受饮食、运动、激素、蛋白质代谢等因素的影响较少，所以比尿素、尿酸检测的特异性好。由于肾脏可通过肾小管排泄少量肌酐，故肾脏疾病早期血浆肌酐浓度通常不高。Cr 测定对诊断晚期肾脏疾病临床意义较大，根据Cr 和肾小球滤过率（GRF）可对慢性肾功能不全进行分期如下：

第一期（肾功能不全代偿期）：SCr133～177 μmol/L；GRF50～80ml/min。

第二期（肾功能不全失代偿期）：SCr 178～442 μmol/L；GRF 50～20ml/min。

第三期（肾功能衰竭期）：SCr 443～707 μmol/L；GRF20～10ml/min。

第四期（尿毒症期）：SCr ≥707 μmol/L；GRF <10ml/min。

同时测定尿素氮和肌酐对临床诊断有更大帮助。若两者单位均以mg/dl 计，正常情况下尿素氮与肌酐比为15～24.1，在肾脏疾病时，血清尿素氮比肌酐增高更明显，由于肾前原因（特别是严重肠道出血）引起尿素氮增高者，尿素氮与肌酐之比可达40∶1，在这些情况下，经常出现肌酐值正常，而尿素氮值明显增高。由于尿道阻塞而使非蛋白含氮化合物滞留，则将出现尿素氮和肌酐成比例增高。在严重肾小管损害时，尿素氮与肌酐之比可降低至10∶1 以下。

肌酐产生量较恒定，当肾功能损伤不严重时，尿中肌酐的排泄较少受尿液浓缩和稀释的影响，故尿中的肌酐浓度测定常作为尿中其它物质浓度排泄的参照物。

第三节　尿酸测定

尿酸测定方法主要有3 类：磷钨酸法、尿酸酶法及色谱分析法。目前应用较多的为尿酸酶－过氧化物酶偶联法，而尿酸酶紫外分光光度法为测定尿酸的参考方法。以下介绍尿酸酶－过氧化物酶偶联法。

尿酸酶－过氧化物酶偶联法

【原理】

尿酸酶氧化尿酸，生成尿囊素和过氧化氢，在过氧化物酶催化下，过氧化氢使3，5 二氯2－羟苯磺酸（DHBS）和4－氨基安替比林（4－AAP）缩合成红色醌类（Trinder 反应），尿酸浓度与波长520nm 处反应液的吸光度成正比。

【试剂】

1）酶混合试剂：含尿酸酶160U/L，过氧化物酶1500U/L，4－AAP0.4mmol/L，DHBS2mmol/L，磷酸盐缓冲液（pH7.7）100mmol/L。

2）尿酸校准应用液（300μmol/L）：60mg 碳酸锂溶于40ml 去离子水中，加热至60℃使其完全溶解，称取尿酸（相对分子量168.11）100.9mg，溶解于热碳酸锂溶液中，冷却至室温，移入100ml 容量瓶中，用去离子水稀释至刻度，此液浓度为6.0mmol/L。使用时取5ml 在100ml 宽容量瓶中加乙二醇33ml，然后以去离子水稀释至刻度。

【操作】

1）手工法：按表4－7－4 步骤操作。各管混匀，置室温10min，波长520nm，空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－7－4　酶偶联法测定尿酸操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
待测血清	0.1		
待测血清		0.1	
去离子水			0.1
酶试剂	1.5	1.5	1.5

2）自动分析法：终点法，反应温度37℃，一点定标，保温时间5min，主波长500～550nm，副波长700nm。标本试剂体积比和试剂混合方式参阅试剂盒说明书。

【计算】

$$\text{血清尿酸浓度（μmol/L）}=\frac{\text{测定管吸光度}}{\text{校准管吸光度}}\times\text{尿酸校准液浓度（μmol/L）}$$

【参考值】

男性149～416μmol/L（2.5～7mg/dl）；女性89～357μmol/L（1.5～6mg/dl）。

【注意事项】

胆红素对本法有明显负干扰，试剂中加入亚铁氰化钾可部分消除这种负干扰。高浓度抗坏血酸可降低测定结果，试剂中加入抗坏血酸氧化酶可防止抗坏血酸的干扰。

【临床意义】

1）血清尿酸测定对痛风诊断最有帮助。有痛风临床表现同时血清中尿酸增高，即可诊断为痛风。

2）核酸代谢增加，血清尿酸也常增高。

3）肾功能减退时，常伴有尿酸增高。

4）尿酸降低多见于黄嘌呤尿和剥脱性皮炎。

第四节　尿液肌酸测定

【原理】

稀释的尿液中肌酸在酸性条件下加热转变成肌酐，用碱性苦味酸法或酶法测定其总肌酐含量，同时测定未经处理标本中的肌酐含量。两者相减即为标本中以肌酐形式存在的肌酸量。若肌酐和肌酸用mg/dl单位报告时，要乘上换算系数1.16（肌酸分子量/肌酐分子量）。

【试剂】

同肌酐测定。

【测定方法】

留取24h尿，用甲苯5ml防腐，记录总量。取尿标本少量用去离子水作50～200倍稀释。取稀释尿样3ml加1mol/L盐酸1ml，沸水浴1h或高压消毒（121℃）15min。冷却后加1mol/LL氢氧化钠溶液1ml中和，并用去离子水稀释至6ml，测定肌酐含量为尿总肌酐。将未经酸处理的同样稀释尿样做肌酐测定为尿原肌酐。

【计算】

尿肌酸含量（μmol/24h）＝［尿总肌酐浓度（μmol/L）－尿原肌酐浓度（μmol/L）］×尿量（L/24h）

【参考值】

女性0～609 μmol/24h；男性0～305 μmol/24h。

【临床意义】

尿液肌酸排泄量反映肌肉损害性疾病如皮肌炎、肌营养不良，以及肌肉分解代谢是否亢进如甲状腺功能亢进症。其意义可用血液醛缩酶和肌酸激酶测定替代，但对尚未开展醛缩酶测定的实验室，尿液肌酸测定仍有一定参考价值。

第五节　血氨测定

氨测定的方法有微量扩散法、离子交换法、酶法和氨电极法。以下介绍目前应用最多的酶法。

【原理】

在过量α－酮戊二酸、NAD（P）H 和足量的谷氨酸脱氢酶条件下，酶促反应的速率，即NAD（P）H 转变成NAD（P）$^+$使波长340nm 处吸光度下降的速率（△A）与反应体系中氨的浓度呈正比。根据△A 的变化，求出标本中氨的浓度。

【试剂】

全部试剂必须用去氨蒸馏水制备。

1）66.7mmol/L 磷酸二氢钾溶液：9.12g 磷酸二氢钾溶人去氨蒸馏水中，定容到1L，4℃保存。

2）66.7mmol/L 磷酸氢二钠溶液：9.51g 磷酸氢二钠溶人去氨蒸馏水中，定容到1L，4℃保存。

3）66.7mmol/L 磷酸盐缓冲液［PBS，pH 8.0 ±0.05)］：取5ml（1）液及95ml（2）液，混合，4℃保存，稳定3 周。

4）310mmol/Lα－酮戊二酸溶液：0.45gα－酮戊二酸，溶于5ml 去氨蒸馏水中，用3mol/L 氢氧化钠溶液调pH 接近5.0 时，改用0.1mol/L 氢氧化钠溶液调pH 至6.80 ±0.01，以去氨蒸馏水稀释到10ml，4℃可稳定10d。

5）NADPH 贮存液：10mgNADPH（－20℃、干燥器保存）溶于1ml PBS 中，取出50μl，以PBS 稀释至5ml 为工作液，以PBS 调零，1cm 光径，340nm 波长读NADPH 工作液的吸光度值，计算NADPH 贮存液中NADPH 的实际浓度：

$$\text{NADPH 浓度（mmol/L）}=\frac{340\text{nm 吸光度值}}{6.22}\times 100$$

式中6.22 为NADPH 的毫摩尔吸光系数，据上式计算结果确定制备谷氨酸脱氢酶工作液中加入NADPH 贮存液的量，使达到149μmol/L。

$$\text{需用NADPH 贮存液毫升数}=\frac{149\ (\mu\text{mol/L})\times\text{需配谷氨酸脱氢酶工作液毫升数}\ (50)}{\text{NADPH 贮存液中NADPH 实际浓度}\ (\text{mmol/L})}\times 100$$

6）谷氨酸脱氢酶工作液：根据谷氨酸脱氢酶酶制品（－20℃、干燥器保存）的比活，称出酶活性为992 单位的相应量，加入ADP（－20℃、干燥器保存）15mg，吸入需用NADPH 贮存液的毫升数，以PBS 稀释到50ml，4℃保存稳定7 天。

7）氨贮存校准液（100mmol/L）：硫酸铵（分析纯）1～2g 于100～110℃烘2h，置干燥器中冷却称取660.7mg，溶于去氨蒸馏水中定容到100ml，4℃保存。

8）氨应用校准液：用去氨水稀释氨贮存校准液成100μmol/L。

【操作】

1）手工法：按表4－7－5 步骤操作。

表4－7－5　酶法血氨测定操作步骤

加入物（ml）	空白管	校准管	测定管
谷氨酸脱氢酶工作液	1.5	1.5	1.5
去氨蒸馏水	0.3		
氨校准应用液		0.3	
血浆/血清			0.3
	37℃水浴10min		
α－酮戊二酸	0.06	0.06	0.06

各管混匀，波长340nm 处，于10s 时读取吸光度值（A_1），再于70s 时读取吸光度值（A_2）；求各管吸光度变化值（$\triangle A = A_1 - A_2$）。

（2）自动分析法：按试剂盒和仪器说明书要求设置分析参数，一般采用双试剂法检测。不同厂家试剂盒的配方有差异，应严格按照试剂盒说明书要求设定反应时间和样品体积比。

【计算】

$$\text{血氨浓度（}\mu\text{mol/L）} = \frac{\text{测定管}\triangle A/\text{min} - \text{空白管}\triangle A/\text{min}}{\text{校准管}\triangle A/\text{min} - \text{空白管}\triangle A/\text{min}} \times \text{氨应用校准液浓度（}\mu\text{mol/L）}$$

【参考值】

18～72 μmol/L（30.7～122.μg/dl）。

【注意事项】

（1）反应体系加入ADP 可稳定谷氨酸脱氢酶活性，加快反应速率。用NADPH 作为辅酶较NADH 可缩短反应时间。

（2）加入α－酮戊二酸前在37℃水浴10min，是为血浆中LDH、AST 等内源性物质消耗NADPH 提供反应时间。

（3）本法线性范围0～150 μmol/L。

（4）防止环境及所用器皿中氨污染。

【临床意义】

重症肝病时氨转变为尿素减少，致血氨浓度增高。血氨测定主要用于肝昏迷（肝性脑病）的诊断以及疗效观察。门脉侧支循环增加、先天性鸟氨酸循环的有关酶缺乏等也可引起血氨浓度增加。

新生儿、静脉营养、尿路感染、休克、白血病、心力衰竭等可致一过性血氨浓度增高。

第六节　血清总胆红素和结合胆红素测定

血清总胆红素及结合胆红素测定方法包括重氮试剂法、胆红素氧化酶法、高效液相色谱法、导数分光光度法、经皮胆红素测定法以及直接分光光度法等。重氮试剂法又包括改良J－G 法和二甲亚砜法等，前者是卫生部临检中心的推荐方法，而后者可自动化。胆红素氧化酶法特异性好，但临床上尚未推广。高效液相色谱法能特异、准确地分离和测定未结合胆红素（Bu）、单葡萄糖醛酸胆红素（MBc）、双葡萄糖醛酸胆红素（DBc）和δ胆红素（δ）4 种组分，有可能成为参考方法，但需昂贵仪器，技术要求高。经皮胆红素测定采用反射式光密度测量原理，通过直接测定新生儿皮肤黄色程度来反应血清总胆红素浓度，操作简便、无损伤，但不能完全代替血清胆红素测定。新生儿血清胆红素大部分为Bu，Bu 在咖啡因试剂中457nm 波长处有吸收峰。采用465nm/528nm 双双波长比色，两者吸光度之差与Bu 浓度成正比。此为直接分光光度法，方法简便，不需样品空白，不受溶血干扰。

一、改良J－G 法

【原理】

血清中结合胆红素可直接与重氮试剂反应，产生偶氮胆红素；同样条件下，未结合胆红素须在加速剂存在时使胆红素氢键破坏后与重氮试剂反应，产生偶氮胆红素。分别检测蓝色的碱性偶氮胆红素导致吸光度改变，求出样品中总胆红素和结合胆红素的浓度。

【试剂】

1）咖啡因－苯甲酸钠试剂：无水醋酸钠41.0g，苯甲酸钠38.0g，EDTA 二钠0.5g，溶于约500ml 去离子水中，再加入咖啡因25.0g，搅拌使溶解（加入咖啡因后不能加热溶解），用去离子水补足至1L，混匀。滤纸过滤，置棕色瓶，室温保存。

2）碱性酒石酸钠溶液：氢氧化钠75.0g，酒石酸钠263.0g，用去离子水溶解并补足至1L，混匀。置塑料瓶中，室温保存。

3）5.0g/L 亚硝酸钠溶液：亚硝酸钠5.0g，用去离子水溶解并稀释至100ml，混匀，置棕色瓶，冰箱保存，稳定不少于3 个月。作10 倍稀释成5.0g/L，贮冰箱，可稳定2 周。

4）5.0g/L 对氨基苯磺酸溶液：对氨基苯磺酸5.0g，溶于800ml 去离子水中，加入浓盐酸15ml，用去离子水补足至1L。

5）重氮试剂：临用前取50g/L 亚硝酸钠溶液0.5ml 和50g/L 对氨基苯磺酸溶液20ml，混合。

6）5.0g/L 叠氮钠溶液。

7）胆红素贮存校准液：称取胆红素10mg，加入1ml 二甲亚砜，用玻棒搅拌，使成混悬液。加入0.05mmol/L 碳酸钠溶液2ml，使胆红素完全溶解后，移人100ml 容量瓶中，缓慢加入0.1mol/L 盐酸2ml，边加边摇（勿用力摇动，以免产生气泡）。最后以稀释用血清补足至100ml。配制过程中应尽量避光，储存容器用黑纸包裹，置4℃冰箱3d内有效。配制后尽快制作校准曲线。

【操作】

按表4－7－6 步骤操作。各管混匀后，波长600mm 处以对照管调零，读取吸光度值，在校准曲线上查出相应的胆红素浓度。

表4－7－6　改良J－G 法测定总胆红素和结合胆红素操作步骤

加入物（ml）	总胆红素管	结合胆红素管	对照管
待测血清	0.2	0.2	0.2
咖啡因－苯甲酸钠试剂		1.6	1.6
对氨基苯磺酸溶液			0.4
重氮试剂	0.4	0.4	
每加一种试剂后混匀，然后总胆红素管置室温10min，结合胆红素管置37℃1min			
叠氮钠溶液		0.05	
咖啡因－苯甲酸钠试剂		1.55	
碱性酒石酸钠溶液	1.2	1.2	1.2

【校准曲线制备】

胆红素校准曲线制备操作步骤见表4－7－7。各管混匀（不可产生气泡），按总胆红素测定法操作。每一浓度作3 个平行管，用各自的校准对照管调零，读取校准管的吸光度值。每管还应减去稀释用血清的总胆红素的吸光度值，然后与相应胆红素浓度绘制校准曲线。1、2、3、4、5 管各相当于胆红素浓度34.2、68.4、103.0、137.0、171.0μmol/L。

表4－7－7　胆红素校准曲线制备操作步骤

加入物（ml）	1	2	3	4	5
胆红素贮存校准液	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
稀释用血清	1.6	1.2	0.8	0.4	0

【参考值】

血清总胆红素：5.1～19.0μmol/L（0.3～1.1mg/dl）；血清结合胆红素：1.7～6.8μmol/L（0.1～0.4mg/dl）。

【注意事项】

1）目前一般用非结合胆红素配制校准液，其稀释剂须含白蛋白，可用牛血清白蛋白或人血清替代。对后者的要求如下：收集无溶血、无黄疸、无脂浊的新鲜血清，混匀，必要时可用滤菌器过滤。取过滤后的血清1ml，加入24ml新鲜9.0g/L氯化钠溶液，混匀。在414nm波长处，1cm光径，以9.0g/L氯化钠溶液调零，其吸光度值应小于0.10；在460nm波长处的吸光度值应小于0.04。

2）配制校准液的胆红素须符合下列标准：纯胆红素的氯仿溶液，在25℃条件下，光径（1.000±0.001）cm，波长453nm，摩尔吸光系数应在60700±1600范围内；改良J－G法偶氮胆红素的摩尔吸光系数应在74380±866。若实际测得的摩尔吸光系数小，可将其与理论摩尔吸光系数的百分比作为该胆红素的纯度。

3）本法测定血清胆红素在10～37℃条件下不受温度变化影响，呈色2h内稳定；轻度溶血对测定结果无干扰，而严重溶血可使测定结果偏低；叠氮钠破坏重氮试剂，用叠氮钠作防腐剂的质控血清，可引起偶氮反应不完全，甚至不呈色；胆红素浓度大于171μmol/L的标本可减少标本用量或用9.0g/L氯化钠溶液稀释血清后重测。

4）本法灵敏度较高，且可避免其它有色物质的干扰，是测定血清总胆红素浓度的参考方法，但不能自动化分析是其缺点。现有些商品试剂盒称咖啡因法或J－G法，但无碱性酒石酸，其检测灵敏度和特异性不如上述方法。

二、总胆红素酶法测定

【原理】

胆红素氧化酶（BOD）催化胆红素氧化，生成胆绿素；后者进一步氧化，生成性质尚不清楚的无色或淡紫色化合物。胆红素在450nm波长附近有最大吸收峰，随胆红素被氧化，其吸光度值下降；下降程度与胆红素浓度成正比。在pH8.0条件下，未结合胆红素与结合胆红素均被氧化，加入十二烷基磺酸钠（SDS）及胆酸钠等表面活性剂可促进其氧化。

【试剂】

1）1mmol/L Tris－盐酸缓冲液（pH8.2）：Tris 1.211g，胆酸钠172.3mg，SDS432.6mg，溶于90ml去离子水中，室温用1mol/L盐酸调pH至8.2，再加去离子水至100ml，置冰箱保存，此液含4mmol/L胆酸钠、15mmol/LSDS。

2）BOD溶液：如系冻干品，按说明书要求复溶，但复溶后冰箱保存时间不宜超过

1 周；如系液体，置冰箱或冰室可保存较长时间，BOD 贮存溶液的活性一般在几千至2万U／L 之间，BOD 工作液中的酶活性按反应液中BOD 终浓度达0.3～1.0U／ml 计算。

3） 胆红素校准液：按J－G 法配制。

【操作】

1） 手工法：按表4－7－8 步骤操作。加入BOD 工作液后立即混匀，置37℃水浴5min，波长450nm 或460nm 处以去离子水调零，读取各管吸光度值。用于对照管的比色杯与非对照管的比色杯不得混用。

表4－7－8　酶法测定总胆红素操作步骤

加入物（ml）	测定管	测定空白管	校准管	校准空白管
待测血添	0.05	0.05		
胆红素校准液			0.05	0.05
Tris－盐酸缓冲液	1.0	1.0	1.0	1.0
去离子水		0.05		0.05
BOD 工作液	0.05		0.05	

2） 自动分析法：按试剂盒和仪器说明书要求设置分析参数，一般采用双试剂法检测。不同厂家试剂盒的配方有差异，应严格按照试剂盒说明书要求设定反应时间和样品体积比等。

【计算】

$$\text{血清总胆红素浓度（}\mu\text{mol／L）} = \frac{\text{测定空白管吸光度值}-\text{测定管吸光度值}}{\text{校准空白管吸光度值}-\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液胆红素浓度（}\mu\text{mol／L）}$$

【参考值】

与改良J－G 法相似。

【注意事项】

1） 选择BOD 浓度可根据所用制品在测定342 μmol／L 校准液时，能否在5min 内反应完全而确定。

2） 样品中血红蛋白超过1.0g／L 可使测定结果降低。

3） 在pH7.3～9.0 时酶活性变化不大，但最适pH 为8.0～8.2。

4） 本法线性不低于420 μmol／L，最高可达600 μmol／L。

三、结合胆红素酶法测定

【原理】

在pH3.7～4.5 缓冲液中，BOD 催化单葡萄糖醛酸胆红素（mBc）、双葡萄糖醛酸胆红素（dBc）及大部分δ－胆红素（δ）氧化，而非结合胆红素（Bu）在此条件下不被氧化。氧化后产物同总胆红素测定。

【试剂】

1）乳酸－枸橼酸钠缓冲液（pH3.7）：含3 分子结晶水枸橼酸钠17.65g/L，乳酸30g/L，TritonX－1001g/L，含2 分子结晶水EDTA 二钠18.6mg/L。

2）BOD 溶液：同总胆红素酶法测定。

3）结合胆红素校准液：将二牛磺酸胆红素（DTB）配于胆红素浓度可忽略不计的人血清中，或用冻干品按说明书要求重建。可先配成高浓度的贮存液，再稀释成各种不同浓度的应用液；或直接配成30～50mg/L 左右的浓度。配制后分装于聚丙烯管，－70℃保存，可稳定6 个月。冻干品未重建前置低温可稳定1 年。贮存液中DTB 的浓度以Bu 表示，用改良J－G 法测定总胆红素；如果DTB 制品中不含Bu，测得的总胆红素即为结合胆红素（相当于游离胆红素的结合胆红素含量，或称Bu 的等价物）；如果含有Bu（采用高效液相色谱法测知），须从测定值中减去Bu 浓度测定值。

【操作】

1）手工法：按表4－7－9 步骤操作。各管立即混匀，37℃水浴15min，波长460nm 处，以水调零，读取吸光度值。

表4－7－9　酶法测定结合胆红素操作步骤

加入物（ml）	测定管	测定空白管	校准管	校准空白管
缓冲液	1.0	1.0	1.0	1.0
待测血清	0.05	0.05		
DTB 校准液			0.05	0.05
去离子水	0.05		0.05	
BOD 溶液		0.05		0.05

2）自动分析法：按试剂盒和仪器说明书要求设置分析参数，一般采用双试剂法检测。不同厂家试剂盒的配方有差异，应严格按照试剂盒说明书要求设定反应时间和样品体积比等。

【计算】

$$\text{血清结合胆红素浓度（μmol/L）} = \frac{\text{测定空白管吸光度值} - \text{测定管吸光度值}}{\text{校准空白管吸光度值} - \text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液 DTB 浓度（μmol/L）}$$

【参考值】

与改良J－G 法相似。

【注意事项】

1） 酶法测定结合胆红素建议使用DTB 作校准品，DTB 和BOD 反应前后的吸光度最大差值也在450～460nm 之间。

2） 缓冲液pH 值：枸橼酸缓冲液较磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和碳酸盐缓冲液好。pH 低于4.0 时血清样品易发生浑浊，严重干扰测定结果；在pH5.0 左右，样品mBc、dBc 及大部分B_{δ}将被氧化。反应混合物的低pH 值可防止因Bu 反应而导致的结合胆红素测定结果假性增高。

3） 由于测定结合胆红素时pH 值偏离BOD 的最适范围，因此，要求反应液中BOD 终浓度不低于0.5U/ml。

四、总胆红素二甲亚砜法测定

【原理】

在加速剂二甲亚砜（DMSO）作用下，胆红素与重氮试剂反应产生偶氮胆红素，560nm 波长处比色，其吸光度与胆红素浓度成正比。

【试剂】

1） 试剂A：去离子水285ml，加入1mol/L 盐酸165ml 混合，加5g 对氨基苯磺酸，溶解后逐渐加入550mlDMSO，混匀，静置过夜，如有浑浊或沉淀，过滤后使用，置棕色瓶，避光保存，变红后弃用。

2） 试剂B：0.5g 亚硝酸钠，用去离子水500ml 溶解，用棕色瓶置冰箱保存。

3） 胆红素校准液：同改良J－G 法。

【操作】

1） 手工法：按表4－7－10 步骤操作。各管混匀，37℃水浴5min，波长560nm 处，空白管调零，读取吸光度值。

表4－7－10　二甲亚砜法测定总胆红素操作步骤

加入物（ml）	测定管	校准管	空白管
待测血清	0.2		
校准液		0.2	
去离子水			0.2
试剂A	3.0	3.0	3.0
试剂B	0.05	0.05	0.05

2）自动分析法：按试剂盒和仪器说明书要求设置分析参数，一般采用双试剂法检测。不同厂家试剂盒的配方有差异，应严格按照试剂盒说明书要求设定反应时间和样品体积比。

【计算】

$$\text{血清总胆红素浓度}\ (\mu mol/L) = \frac{\text{测定空白管吸光度值}}{\text{校准空白管吸光度值}} \times \text{校准液胆红素浓度}\ (\mu mol/L)$$

【注意事项】

1）显色液稳定1h，应及时比色。

2）试剂A、B临用前可按3∶0.05比例混合成单一试剂使用。

【临床意义】

1．血清总胆红素

1）判断有无黄疸及黄疸的程度。

2）判断肝细胞损害程度和预后：严重的肝细胞损害时胆红素浓度明显升高。但如胆汁淤积型肝炎，尽管肝细胞受累较轻，血清胆红素浓度也可升高。

3）判断新生儿溶血性黄疸严重程度。

4）再生障碍性贫血及一些继发性贫血，血清总胆红素浓度减小。

2．血清结合胆红素

血清结合胆红素与总胆红素的比值可用于鉴别黄疸类型，但其间有重叠。

1）比值<20%：溶血性黄疸，阵发性睡眠性血红蛋白尿，恶性贫血，红细胞增多症等。

2）比值40%～60%：肝细胞性黄疸。

3）比值>60%：阻塞性黄疸。

第七节　胆汁酸测定

血清总胆汁酸（total bile acid，TBA）测定有层析法、免疫法和酶法等，酶法中又可分酶荧光法、酶比色法和酶循环法。其中酶比色法可用手工操作，亦可用自动化仪器分析，应用较广。近年发展的酶循环法灵敏度高、特异性好，是一个有前途的方法。

一、酶比色法

【原理】

$$3\alpha\text{-羟基胆酸} + NAD^+ \xrightarrow{3\alpha\text{-HSD}} 3\text{-氧代胆酸} + NADH + H^+$$

$$NADH + H^+ + INT \xrightarrow{\text{黄递酶}} NAD^+ + \text{甲臜（红色）}$$

在500nm 波长处测定吸光度，可反映TBA 浓度。

【试剂】

1）试剂Ⅰ：黄递酶1000U，AD1mmol，碘化硝基四氮唑（NT）0.5mmol，丙酮酸50mmol 溶于1L、pH7.5、0.1mol 的磷酸盐缓冲液中，加表面活性剂适量。

2）试剂Ⅱ：3α－羟类固醇脱氢酶（3α－HSD）2000U 溶于1L、pH7.5、0.1mol 的磷酸盐缓冲液中。

3）终止液：1mol/L 盐酸。

4）校准液（50μmol/L）：24.38mg 甘氨胆酸溶于1L 经透析的混合血清中。

【操作】

1）手工法按表4－7－11 步骤操作。各管混匀，37℃水浴10min，加终止液0.1ml，摇匀，500nm 波长处，以水校零，读取各管吸光度值。

表4－7－11　酶比色法测定TBA 酸操作步骤

加入物（ml）	测定管	测定空白管	校准管	标准空白管
待测血清	0.1	0.1		
校准液			0.1	0.1
试剂Ⅰ	0.3	0.3	0.3	0.3
试剂Ⅱ	0.1		0.1	
去离子水		0.1		0.1

【计算】

$$\text{TBA 浓度（μmol/L）} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值} - \text{校准空白管吸光度值}} \times \text{校准液TBA 浓度（μmol/L）}$$

1）自动分析参数：反应温度：37℃；反应类型：终点法；波长：500nm（主）／700nm（次）；样品25μl；试剂1200μl；第一点读数时间：280s；试剂Ⅱ（300s 时加入）50μl；第二点读数时间：600s。

【参考值】

60 名健康成人的空腹TBA 浓度为（4.9±2.38）μmol/L，范围为0.14～9.66μmol/L。中餐后2hTBA 浓度为（8.2±2.1）μmol/L，范围为2.4～14.0μmol/L。

【注意事项】

1）由于血清中TBA 浓度较低，样品中存在干扰物质对测定结果的影响相对就大，其中主要是乳酸脱氢酶（LDH）。由于LDH 催化生成的NADH 往往比TBA 生成的量要大

得多，因此，测定前除去血清中LDH 的影响至关重要，常用方法有：血清67℃加温30min ；加草氨酸作为LDH 封闭剂；碱或酸处理；用丙酮酸钠抑制LDH 活性，上述5 种方法中以丙酮酸钠处理最好，采用时可免去前处理步骤，直接加入反应体系，不影响体系的pH 值，且对反应无干扰。

2） 血清中还存在其它脱氢酶（有相应底物存在时）和还原性物质，如不除去，导致测定结果偏高。因此，自动分析设计成双试剂二步法，样品先与不加3α－HSD 的体系孵育，使样品中的干扰物质发生反应，然后再加入3α－HSD 。

3） 脂肪酶、胆固醇（包括HDL －C 、LDL －C）和甘油三酯测定试剂中均加有胆酸盐，自动分析时会导致携带污染，必须注意。某些先进的仪器设定“Smart Wash”，对试剂针、样品针和反应杯进行补充清洗，亦可将TBA 编排在上述有污染的项目前测定。采用某些不具备上述功能的仪器，最好将TBA 单批测定。

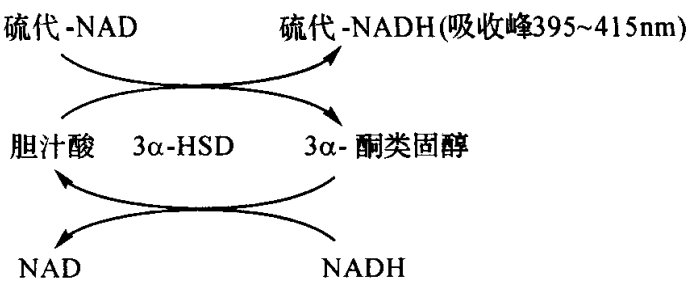
4） 试剂中加适量表面活性剂可防止甲臜沉淀。

5） 本法的灵敏度50μmol／L （标本／试剂比为1 ：10）A_{500nm} （1cm）为0.1 左右；线性为300μmol／L ；手工和自动分析的批内CV 分别为2.71 %和1.16 %，总CV 分别为5.46 %和2.79 %。

二、胆汁酸测定酶循环法

【原理】

本法反应原理如下：



在一定的反应时间内，酶循环产生的硫代－NADH 与样品中胆汁酸浓度呈正比。

【试剂】

1） 试剂I ：硫代－NAD 2mmol／L ，Good ’s 缓冲液200mmol／L ，pH7.0 。

2） 试剂II ：3α－HSD 15kU／L ，NADH 3mmol／L ，Good ’s 缓冲液200mmol／L ，pH8.0 。

3） 校准液：同比色法。

【操作】

自动化分析。反应类型：速率法；反应温度：37℃；波长：405nm（主）/660nm（次）；样品3μl；试剂Ⅰ200μl；3～5min后加试剂Ⅱ50μl，延迟时间1min，读数时间4min。

【计算】

$$\text{TBA 浓度（μmol/L）} = \frac{\text{测定管}\triangle A/\text{min}}{\text{校准管}\triangle A/\text{min}} \times \text{校准液TBA 浓度（μmol/L）}$$

【参考值】

40名健康成人的空腹TBA为（3.71±2.98）μmol/L，范围为0～6.71μmol/L。

【注意事项】

1）血清TBA测定的酶循环法是一种通过脱氢酶－辅酶体系来循环底物的方法，具有以下一些要求：①这种酶对硫代－NAD和NADH均应有高亲和力；②反应体系的pH值和缓冲液应允许正反应（底物氧化）和逆反应（底物还原）都能进行；③硫代－NAD与NADH浓度比例合适。在这些条件下，循环速率相当快（约100次/min），在一定的反应时间内通过胆汁酸的重复反应来增加硫代－NADH的量，提高反应灵敏度。

2）本法干扰试验结果表明胆红素浓度<850μmol/L，血红蛋白质量浓度<5g/L，抗坏血酸浓度<2.84mmol/L，乳酸浓度<24mmol/L，乳酸脱氢酶活性<10000U/L时，偏差均小于5%。如存在仪器的携带污染，可用酶比色法中阐述的方法排除。

3）本法灵敏度：50μmol/L（样品：试剂体积比为1∶83）$A_{410nm\ 1cm}$为0.22左右；线性为180μmol/L；Beckman DU－640分光光度计手工操作的批内CV<2.0%，总CV<4.0%，日立7170自动分析仪的批内CV<1.5%。本法（y）与酶比色法（x）的回归分析结果：$y=0.921x-1.426$（$r=0.982$，$n=64$）。

【临床意义】

1）空腹TBA和餐后TBA对急性肝炎早期诊断的价值与ALT和AST测定相同。TBA持续较高水平的患者往往转为慢性。

2）慢性肝炎患者如空腹TBA>20μmol/L应考虑为活动性。

3）肝硬化患者的空腹TBA和餐后TBA均增高，其异常率高于所有其他肝功能试验。

4）餐后TBA测定对检出轻度肝脏病变的灵敏度优于所有其他肝功能试验。

5）血清TBA测定对检测酒精或工业化学品引起的肝细胞损伤的灵敏度优于其他肝功能试验。

6）血清TBA测定对肝外胆管阻塞和肝内胆汁淤积的诊断有较高的灵敏度。

第八章　激素及其代谢严格测定

第一节　尿17－羟皮质类固醇测定

17－羟皮质类固醇（17－OH－corticosteroid，17－OHCS）指17 位碳原子上有羟基的所有类固醇类物质，是肾上腺皮质分泌的糖皮质激素的主要代谢产物。尿17－OHCS 测定是评价肾上腺皮质功能的常用指标之一。目前测定17－OHCS 的方法以化学显色法为主，显色前先用有机溶剂抽提尿中17－OHCS，也可用商品化色谱柱分离后显色。本节介绍Porter－Silber 显色法。

【原理】

尿中的17－OHCS 在酸性条件下水解，从葡萄糖酸酯等结合型转化为游离型。用氯仿－正丁醇提取后，在提取液中加入盐酸苯肼和硫酸，生成黄色复合物，该反应称为Porter－Silber 显色反应。

【试剂】

（1）正丁醇：市售的正丁醇必须精制后方可应用。精制方法如下：取正丁醇1L 于2L 圆底烧瓶中，分别加65mg 盐酸苯肼和10mol/L 硫酸100ml，置室温或冰箱中存放1 周后，加入500ml 去离子水于烧瓶中，振摇1min，静置分层后弃水层。再加入30g 无水硫酸钠，摇匀片刻，放冰箱过夜，次日进行重蒸馏。蒸馏时需将接口处的橡皮塞、橡皮管用锡箔纸包裹，以避免正丁醇的蒸汽将橡皮塞溶解。收集沸点在116～117℃时的蒸馏液，弃去温度未达116～117℃的蒸馏液和瓶中剩下的20～30ml 溶液。

（2）氯仿：质量较好的氯仿可直接应用，若空白管颜色太深应精制。方法如下：取1L 氯仿于2L 的分液漏斗中，加浓硫酸50ml，充分混匀后静置分层，若硫酸层颜色较深，再用浓硫酸提取1 次。最后用去离子水洗至中性。

（3）盐酸苯肼溶液：精制的硫酸苯肼65mg，氯化钠1g，溶于100ml 的10mol/L 硫酸中。须临用前配制。该试剂用氯仿正丁醇作空白管，在410nm 处吸光度不应超过0.02。盐酸苯肼的精制方法如下：称盐酸苯肼10g，置400ml 无水乙醇中，隔水加热溶解，室温下冷却后置4℃冰箱24h，用布氏漏斗过滤，收集重结晶部分。如此重复2～3 次，至无水乙醇无色为止。精制品保存于干燥处备用。

4）10mol/L 硫酸溶液：浓硫酸280ml，缓缓加入到约200ml 去离子水中，边加边用水冷却，最后加水至500ml。

5） 硫酸铵。

6） 氢化可的松校准液 （0.1mg/ml）：氢化可的松 （相对分子量为362.47）10mg，溶于100ml 无水乙醇中，充分混匀后，分装成每管0.2ml （含氢化可的松0.02mg），置37℃温箱中烘干，加塞后贮干燥处备用。

【操作】

1） 收集用浓盐酸5～10ml 防腐的24h 尿液，留尿前2 天停服中药、维生素B_2 及四环素，记录尿量。

2） 标本前处理：取尿液3ml 置50ml 容量瓶中，加10mol/L 硫酸2 滴，调节尿PH为1，加硫酸铁3g，摇匀3min，使饱和。加入氯仿－正丁醇 （10∶1） 混合液33ml，抽提5min，混合液倒入2 支20ml 的离心管中，1500r/min 离心10min，弃去上层尿液。各取提取液10ml 于2 个15ml 具塞试管中，一管为测定管，另一管为测定空白管，另取校准管2 支和空白管2 支。

3） 按表4－8－1 步骤操作。各管加塞后抽提5min，1500r/min 离心15min，立即吸取上层硫酸约3ml 于另一试管中，注意勿带入下层有机溶媒，并做好标记，放60℃水浴准确保温42min，然后迅速移入冷水浴中冷却。在410nm 波长处，用空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－8－1　Porter－Silber 法测定尿17－OHCS 操作步骤

加入物 (ml)	测定管	测定空白管	校准管	校准空白管	试剂空白管	空白管
提取液	10.0	10.0				
氯仿－正丁醇			10.0	10.0	10.0	10.0
硫酸溶液		3.0		3.0		3.0
盐酸苯肼溶液	3.0		3.0		3.0	

【计算】

$$\text{尿17－OHCS 含量 (mg/24h)} = \frac{\text{测定管吸光度值－测定空白管吸光度值－试剂空白管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值－校准空白管吸光度值－试剂空白管吸光度值}} \times \text{校准管氢化可的松质量浓量 (mg/ml)} \times \frac{33}{10} \times \frac{\text{24h 尿量 (ml)}}{3}$$

或　　尿17－OHCS 含量 (μmol/24h) ＝尿17－OHCS 含量 (mg/24h) ×2.76

【注意事项】

1）盐酸苯肼对可的松和氢化可的松显色强度不同，前者的呈色高于后者，而尿中排泄的以氢化考的松为主，故以此作校准品较好。

2）本试验对试剂纯度要求较高，许多试剂都要求精制，在精制过程中要加强防火措施。

3）提取操作时，最好在通风柜中进行。

4）每次测定时要注意试剂空白管吸光度的变化。如波动较大，应从试剂的纯度及器皿的清洁度方面查找原因。

5）Porter－Silber 反应产物颜色纯黄，显色稳定。但该反应是非特异性的，葡萄糖、果糖、维生素C、尿酸、胆红素、丙酮以及某些药物如磺胺嘧啶、喹宁、肼苯达嗪、司可巴比妥等均可干扰该反应。经氯仿－正丁醇抽提后能有效地消除干扰。值得注意的是抽提后吸取有机溶剂时，要避免将尿液吸入显色管内。

6）尿中17－OHCS 先用硼氢钠还原，再用过碘酸钠氧化，断去支链，生成17－酮皮质类固醇（17－KS），用有机溶媒抽提或经层析吸附分离，最后与间二硝基苯在碱性条件下进行显色反应。此反应即为测定17－KS 的Zimmerman 反应。通过测定尿中经还原再氧化后的17－KS 来计算17－OHCS，故称为17－生酮皮质类固醇。尿中原有的17－KS 已转变为非17－KS，不参与显色反应。由于用盐酸苯肼反应测定尿中17－OHCS 并不包括所有尿中含17－羟基的类固醇，所以尿17－生酮皮质类固醇比17－OHCS 多40％。

【参考值】

成年男性21.28～34.48μmol/24h（7.62～12.54mg/24h）；成年女性19.27～28.21μmol/24h（6.92～10.32mg/24h）。

【临床意义】

1）17－OHCS 增高：主要见于各种原因所致的肾上腺皮质功能亢进，如库欣综合征，肾上腺皮质瘤及双侧增生，肥胖症，甲状腺功能亢进症等。尤以肾上腺皮质肿瘤增高最为显著。鉴别是否由于下丘脑－垂体功能异常所致的17－OHCS 增高，可使用地塞米松抑制试验结果。

2）17－OHCS 降低：主要见于肾上腺皮质功能不全如艾迪生病，垂体前叶功能减退症，睾丸功能减退症，一些慢性疾病如肝病、结核病等。原发性与继发性肾上腺皮质功能不全可用促肾上腺皮质激素释放激素兴奋试验鉴别，未用激素治疗的艾迪生病患者，基础值较低，且对促肾上腺皮质激素释放激素刺激无反应，有时甚至下降。继发性肾上腺皮质功能低下者，基础值亦低，但对促肾上腺皮质激素释放激素可有延迟性反应。

第二节　尿17－酮皮质类固醇测定

17－酮皮质类固醇（17－ketone－corticosteroid，17－KS）是17位碳原子为酮基的所有类固醇类物质。人类尿中排出的内源性17－KS包括雄酮、异雄酮、脱氢表雄酮和原胆烷醇酮等及其代谢产物。此外，有少量皮质醇可在肝脏发生17位碳原子上羟基脱氢氧化成17－KS，由尿中排出。因此，尿液中17－KS是肾上腺皮质激素和雄性激素的代谢产物。测定尿17－KS的方法有化学显色法和气相色谱法。本节介绍应用最多的Zimerman显色法。

【原理】

17－KS在尿中以葡萄糖醛酸酯和硫酸酯及少量游离形式存在。葡萄糖醛酸酯和硫酸酯等经酸水解成游离的类固醇，再用有机溶剂提取，用氢氧化钠洗涤除去酸、酚及某些有机色素后，在碱性条件下可与间二硝基苯反应，生成紫红色化合物。

【试剂】

1）浓盐酸。

2）5mol/L氢氧化钾溶液：用去醛乙醇配制。该试剂不稳定，故不宜多配。

3）1mol/L氢氧化钠溶液。

4）醋酸乙酯。

5）雄酮校准液（0.1mg/ml）：脱氢异雄酮（Dehydroisoandrosterone，相对分子量288.3）10mg，用去醛乙醇少许溶解后移入100ml容量瓶，并加至刻度。此液不能久存，须分装于中号试管中，每管0.2ml（含0.02mg雄酮），置37℃温箱中烘干，盖塞后置暗处干燥保存。

6）75%去醛乙醇。

7）20g/L间二硝基苯乙醇溶液：取无水或精制后的间二硝基苯0.2g，溶于无水去醛乙醇10ml中，置棕色瓶中冰箱保存。

8）去醛乙醇的制备：无水乙醇1L，加4g盐酸间苯二胺，充分混匀后，静置暗处1周，每天摇匀2次，用全玻璃蒸馏器减压蒸馏，去头尾各50ml左右，收集中间部分。

9）间二硝基苯的精制：间二硝基苯20g溶解于95%乙醇75ml中，隔水加热40℃使之溶解。加2mmol/L氢氧化钠溶液100ml，冷却后加入去离子水2.5L混匀。加滤纸在布氏漏斗中过滤，并用较多的去离子水洗涤后吸干。依此法再用无水乙醇120ml及80ml重结晶2次，精制品应洁白无色，融点90～91℃。将精制品置干燥器内保存。

10）4%甲醛溶液：将浓甲醛用去离子水稀释10倍即可。

(1) 乙醚。

【操作】

1) 收集24h 尿，用浓盐酸5～10ml 防腐，并记录尿量。

2) 标本前处理：取尿样5ml 置20mm ×150mm 试管中，加浓盐酸1.5ml，4%甲醛溶液0.2ml，在沸水中煮沸20min，取出后冷水浴中冷却。离心后将冷却尿样移至30ml 分液漏斗中，加乙醚10ml，振摇2min，放置分层后弃下层尿液。分液漏斗乙醚层中加1mol/L 氢氧化钠溶液5ml，轻摇1min，放置分层后弃水层。再用5ml 的去离子水洗两次，将乙醚移人中号试管中，于40～45℃水浴中蒸干，此管即为测定管。

3) 显色：按表4－8－2 步骤操作。

将各管混匀振摇30s，1000r/min 离心2min 后取上层醋酸乙酯，在520nm 波长处，用空白管调零，读取各管吸光度值。

表4－8－2　显色法测定17－KS 操作步骤

加入物 (ml)	测定管	校准管	空白管
去醛无水乙醇	0.2	0.2	0.2
间二硝基苯乙醇溶液	0.2	0.2	0.2
氢氧化钾溶液	0.3	0.3	0.3
振摇混匀后，放入37℃水浴中20min			
75%去醛乙醇	3.0	3.0	3.0
醋酸乙酯	3.0	3.0	3.0

【计算】

$$\text{尿17－KS 含量 (mg/24h)} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准管雄酮质量浓度 (mg/ml)} \times \text{24h 尿量 (ml)} / 5$$

$$\text{尿17－KS 含量 (μmol/24h)} = \text{尿17－KS 含量 (mg/24h)} \times 3.47$$

【注意事项】

1) 本法显色不够稳定，用70%去醛乙醇稀释后，显色进程停止，但此后颜色逐渐褪去，故比色应在10min 内完成，大批标本宜分批显色。

2) 如室温过低，比色液可呈浑浊，可在比色前加饱和氯化钠溶液0.1ml，待浑浊

消失后再比色。

3）测定前2～3d，患者应停服有色素的药物，此外，头孢霉素、红霉素、安定、青霉素、螺内酯、睾酮、安乃近、氯丙嗪及中药均可干扰Zimmerman显色反应，也应予避免。尿液标本置2～8℃保存，可稳定5d。

4）水解过程中，加入甲醛可以抑制非特异性色素的生成，而类固醇化合物的结构和性质均无影响。水解标本最好做双份，以便抽提过程中分液漏斗漏气致重新抽提。水解过程中常有黑色残渣生成，宜离心后再抽提。

5）不同的17－酮类固醇与间二硝基苯的呈色反应强弱不一致，致校准品的选择有一定难度。通常以脱氢异雄酮作为校准品。

6）操作过程中用乙醚抽提，再用碱和去离子水洗，既费时，又难控制检测精密度。可用商品化的层析柱分离提纯。

【参考值】

成年男性28.5～61.8μmol/24h，（8.2～17.8mg/24h）；成年女性20.8～52.1μmol/2.4h，（6.0～15mg/24h）。

【临床意义】

1）尿17－KS增高：主要见于各种原因引起的肾上腺皮质功能亢进如肾上腺皮质癌、肾上腺皮质功能亢进症、巨人症、肢端肥大症、睾丸间质细胞肿瘤等。在诊断肾上腺皮质功能亢进时，由于受睾丸和卵巢内分泌功能的影响，尿17－KS比尿17－OHCS特异性差。

2）尿17－KS减低：主要见于各种原因引起的肾上腺皮质功能减退，如肾上腺皮质功能减退症、垂体前叶功能减退、性功能减退、睾丸切除后，以及某些慢性病如结核、肝病、糖尿病和重度营养不良等。

第三节　血浆、尿儿茶酚胺测定

儿茶酚胺包括肾上腺素（epinephrine，E）、去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）和多巴胺（dopamine，DA），因其结构上均含有儿茶酚，又属于胺类，故而得名。儿茶酚胺的测定方法有荧光比色法，包括三羟基吲哚法和乙烯二胺法。近年来，临床上逐渐采用放射免疫分析、高效液相色谱分离后电化学或荧光等方法检测。本节介绍高效液相色谱（HPLC）法。

【原理】

血浆或尿中的儿茶酚胺经酸性氧化铝吸附分离而达到部分纯化，在C_{18}反相层析柱

上用HPLC 分离并由电化学检测器进行检测。

【试剂】

1）0.1mol/L 高氯酸溶液：浓高氯酸8.6ml，用去离子水稀释至1L。

2）Tris－EDTA 缓冲液：45g Tris，5g EDTA 二钠溶于约200ml 去离子水中，调节pH至8.5 并用去离子水稀释至250ml。

3）酸洗氧化铝。

4）0.15mol/L 一氯醋酸盐缓冲液（pH3.0）：28.3g 一氯醋酸、9.35g 氢氧化钠和2.5gEDTA 二钠，溶于约1.5L 去离子水中，用一氯醋酸或氢氧化钠调节pH 至3.00±0.05，并用去离子水稀释至2L。用0.45μm 滤孔径的滤膜过滤并真空脱气15min，偶尔晃动瓶子。

5）流动相：在1L 一氯醋酸缓冲液中溶解200～210mg1－辛烷磺酸（钠盐）。

6）校准品贮存液：①去甲肾上腺素（50μg/ml）：57.2mg 去甲肾上腺素酒石酸氢盐，溶于500ml 0.1mol/L 高氯酸溶液中。②肾上腺素（500μg/ml）：45.5mg 肾上腺素酒石酸氢盐，溶于500ml0.1mol/L 高氯酸溶液中。③多巴胺（50μg/ml）：称25mg 多巴胺，溶于500ml0.1mol/L 高氯酸溶液中。④3，4－二羟基苄胺（DHBA）溶液：称39.5mgDHBA 溶于25ml0.1mol/L 高氯酸溶液中，用0.1mol/L 高氯酸溶液作1∶100 稀释，DHBA 浓度为10μg/ml，成为中间工作内校准液。再用0.1mol/L 高氯酸溶液将该溶液作1∶100 稀释，作为DHBA 工作液（100ng/ml）。上述所有校准品贮存液在4～8℃可稳定6 个月。

7）混合应用校准液（去甲肾上腺素5ng/mg，肾上腺素2.5ng/ml，多巴胺5ng/ml，二羟基苯胺1.0ng/ml）：在1L 容量瓶中加入去甲肾上腺素贮存液100μl，肾上腺素贮存液50μl，多巴胺贮存液100μl 和DHBA 中间工作校准液100μl，用0.1mol/L 高氯酸溶液稀释至刻度并混匀。该液贮存于4～8℃，可稳定1 个月。

【操作】

1．标本采集

抽血前1d，患者不喝咖啡、不抽烟。抽血时，患者静卧30min，用肝素抗凝。标本采集后，30min 内在4℃下2000r/min 离心5min 分离血浆，在分析前可置－20℃冰冻保存。尿标本收集以24h 尿为宜，为了保证尿中儿茶酚胺的稳定性，在留尿开始时，容器中先加入10～5ml 的6mol/L 盐酸。收集完成后的尿pH 值必须小于3。

2．标本前处理

1）在反应管中加2.0ml 血浆或尿液，10μl DHBA 工作液（100ng/ml）和50mg 酸洗氧化铝，旋涡混合。

2）加入1.0ml 的Tris－EDTA 缓冲液，旋涡混合，并放振荡器上10min。

3）离心沉淀氧化铝，然后吸出上清液。

4）用去离子水洗涤氧化铝2 次，每次要吸干。

5）将氧化铝转移至聚丙烯微柱上，用去离子水洗并吸干。

6）加200μl 的0.1mol/L 高氯酸溶液到氧化铝，旋涡混合，放置5min。

7）5min 后，再旋涡混匀后，将柱放入试管中，收集洗脱液。洗脱液内含样品中的E、NE、DA。

8）进样前高速离心以去除氧化铝。

3.HPLC 检测

取50～100μl 标本洗脱液或100μl 混合校准液进行分析。采用C_{18}反相层析柱和电化学检测器。

【计算】

血浆儿茶酚胺（pg/ml）是在分析100μl 混匀工作校准液的基础上，根据每一样品及校准品中DHBA、NE 和E 的色谱峰高（PH，mm）或峰面积积分值进行计算。

$$\text{DHBA 回收率（\%）}=\frac{PH_{DHBA-Pt}\times(100pg)\times(0.2ml)\times100\%}{PH_{DHBA-Std}\times(V)\times(1000pg)}$$

式中$PH_{DHBA-Pt}$为加入待测标本中的DHBA 的峰高，1000pg 为加入待测标本中的DHBA 的量，$PH_{DHBA-Std}$为校准液中DHBA 的峰高，100pg 为校准进样液中的DHBA 的量，V 为注入经氧化铝吸附、浓度为0.1mol/L 的高氯酸洗脱液量（进样量）。

$$\text{NE 质量浓度（pg/ml）}=\frac{PH_{NE-pt}\times(500pg)\times(0.2ml)\times100\%}{PH_{DHBA-Std}\times(V)\times(100pg)}$$

$$\text{E 质量浓度（pg/ml）}=\frac{PH_{E-Pt}\times(250pg)\times(0.2ml)\times100\%}{PH_{E-Std}\times[\text{提取样品的量（ml）}]\times(V)\times[\text{DHBA 的回收率（100\%）}]}$$

$$\text{DA 质量浓度（pg/ml）}=\frac{PH_{DA-Pt}\times(500pg)\times(0.2ml)\times100\%}{PH_{DA-Std}\times[\text{提取样品的量（ml）}]\times(V)\times[\text{DHBA 的回收率（100\%）}]}$$

式中PH_{NE-Pt}为待测标本的去甲肾上腺素的峰高，PH_{NE-Std}为校准液中去甲肾上腺素的峰高，500pg 为校准进样液中的去甲肾上腺素的量，PHE_{E-pt}为待测标本的肾上腺素的峰高，PH_{E-Std}为校准液中肾上腺素的峰高，250pg 为校准进样液中的肾上腺素的量，PH_{DA-pt}为患者标本的多巴胺的峰高，PH_{DA-Std}为校准液中多巴胺的峰高，500pg 为校准进样液中的多巴胺的量，V 为注入经氧化铝吸附、浓度为0.1mol/L 的高氯酸洗脱液量（进样量）。

【注意事项】

1）采集标本不必空腹，应避免溶血，以血浆标本为宜。

2）HPLC 电化学法检测儿茶酚胺具有许多优点，不需要衍化反应，灵敏度高，E、

NE 及DA 很容易相互分离，而且还可以分离干扰药物如甲基多巴、异丙肾上腺素、奎尼丁和普萘洛尔。

(3) 无HPLC 的实验室，可选用商品化的放射免疫检测试剂盒，既可测定总儿茶酚胺，也可测定儿茶酚胺中的E 、NE 及DA 。

【参考值】

血浆去甲肾上腺素0.177 ～2.36pmol/L ， (30 ～400pg/ml) ；血浆肾上腺素0.164 ～0.546pmol/L ， (30 ～100pg/ml) ；血浆中游离多巴胺几乎测不到。尿去甲肾上腺素89 ～472pmol/24h ， (15 ～80 μg/24h) ；尿肾上腺素0 ～109pmol/24h ， (0 ～20 μg/24h) ；尿多巴胺42 ～2611pmol/24h ， (5 ～400 μg/24h) 。

【临床意义】

循环血液的儿茶酚胺来自肾上腺髓质和外周神经中的嗜铬细胞瘤。肾上腺髓质释放血浆肾上腺素和一小部分去甲肾上腺素，外周神经的肾上腺素能神经突触释放去甲肾上腺素和多巴胺。脑组织合成的儿茶酚胺不能通过血脑屏障。循环血液的儿茶酚胺以硫酸盐或与葡萄糖醛酸结合的形式从尿中排出。

儿茶酚胺的测定主要用于嗜铬细胞瘤的诊断。继发性高血压患者，如果血压波动较大，有典型高血压发作状态，怀疑嗜铬细胞瘤者，可测血、尿儿茶酚胺予以鉴别诊断。

第四节　尿3 －甲氧基－4 －羟基苦杏仁酸测定

3 －甲氧基－4 －羟基苦杏仁酸又叫香草扁桃酸 (vaillylmandeli cacid ，VMA) 。尿VMA 的测定方法有分光光度比色法 (包括直接香草醛比色法、重氮化对硝基苯胺显色法、吲哚缩合法) 、色谱分析法 (包括薄层层析、液相色谱、气相色谱) 和竞争性酶免疫分析法。由于尿中存在众多的代谢产物，其中的酚类、酸性酚、芳香环化合物，均可干扰分光光度比色法和层析法。从分析的灵敏度和特异性来考察，HPLC 和竞争性酶免疫分析法比分光光度法好，但其需专门仪器和试剂，目前使用较多的仍是直接香草醛比色法和重氮化对硝基苯胺显色法。

一、直接香草醛比色法

【原理】

用醋酸乙酯从酸化的尿液中提取VMA 和其他酚酸，然后反提取到碳酸钾水层中，加入高碘酸钠，使VMA 氧化成香草醛 (vanillin) 。用甲苯从含有酚酸杂质的溶液中选择性提取香草醛，再用碳酸钾溶液反提取到水层中，最后用分光光度计在波长360nm 处测

定水层中的香草醛浓度。

【试剂】

1）6mol/L 盐酸溶液。

2） 氯化钠。

3） 醋酸乙酯。

4）1mol/L 碳酸钾溶液：138g 碳酸钾溶于去离子水中并加水至1L，置塑料瓶保存，室温可存放1 个月。

5）200g/L 高碘酸钠溶液：须应用前配制。

6）100g/L 偏重亚硫酸钠溶液：须应用前配制。

7）5mol/L 醋酸溶液：286ml 冰醋酸加去离子水至1L。

8）1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.5）：A 液：268g 含7 分子结晶水磷酸氢二钠，加去离子水至1L，置冰箱保存。B 液：27.22g 磷酸二氢钾，加去离子水至200ml，置冰箱保存。取A 液168.2ml 加B 液31.8ml，调节pH 至7.5，置冰箱保存。

9）0.01mol/L 盐酸溶液。

10） 甲苯。

11）VMA 校准液：VMA 校准贮存液（5.05mmol/L）：100mgVMA（相对分子量198.17）用0.01mol/L 盐酸少许溶解，移至100ml 容量瓶并加至刻度，混匀，置冰箱保存可稳定3 个月。VMA 校准应用液（50.5μmol/L）：取10ml 贮存液，用0.01mol/L 盐酸稀释至100ml，临用前配制。

【操作】

按表4－8－3 步骤操作：取3 支50ml 具塞试管，分别标记测定管、内校准管、空白管，各加入1 份尿液（相当于24h 尿总量的0.2%）。

用力振摇3min，离心5min，吸碳酸钾提取液（下层）至比色杯中，分光光度计波长360nm 处用蒸馏水调零，读取各管吸光度值。

【计算】

$$\text{尿VMA 含量（μmol/24h）}=\frac{\text{测定管吸光度值}-\text{空白管吸光度值}}{\text{内校准管吸光度值}-\text{测}}\times\frac{\text{校准液VMA 浓度（μmol/L）}}{1000}\times\frac{1}{0.2\%\times\text{24h 尿量（ml）}}\times\text{24h 尿量（ml）}$$

$$=\frac{\text{测定管吸光度值}-\text{空白管吸光度值}}{\text{内校准管吸光度值}-\text{测定管吸光度值}}\times\text{校准液VMA 浓度（μmol/L）}\times 0.5$$

表4－8－3　直接香草醛比色法测定VMA 操作步骤

加入物（ml）	测定管	内校准管	空白管
VMA 校准应用液		1.0	
去离子水	5.5	4.5	5.5
1mol/L 盐酸溶液	0.5	0.5	0.5
氮化钠（g）	3	3	3
充分摇匀使过饱和			
醋酸乙酯	30	30	30
用力振摇3min，离心5min 吸取醋酸乙酯液（上层）25ml，至第二批标记的试管中			
1mol/L 碳酸钾溶液	1.5	1.5	1.5
振摇3min，离心5min，弃醋酸乙酯液（上层）并吸取1.0ml 碳酸钾溶液提取液至第三批标记的试管中			
20g/L 高碘酸钠溶液	0.5	0.5	
50 ℃水浴，30min，取出后冷却			
20g/L 高碘典酸钠溶液			0.5
混匀，立即操作下一步			
100g/L 偏重亚硫酸钠溶液	0.1	0.1	0.1
5mol/L 醋酸溶液	0.3	0.3	0.3
混匀后，放置10min			
1mol/L 磷酸盐缓冲液	0.6	0.6	0.6
可加入0.4g/L 甲基红1 滴检查pH。此时溶液必须呈黄色（pH <8.8）			
甲苯	20	20	20

【注意事项】

（1）尿液标本留取前，应嘱患者避免进食香蕉、巧克力、咖啡、柠檬、茶及某些药物如阿司匹林、呋喃嘧啶、2，5－二羟基苯甲酸、2，5－二羟基苯乙酸、某些降压药等。由于这些物质及其代谢产物均含有酚氧酸类，不论是直接香草醛比色法还是重氮化对硝基苯胺显色法，均可使测定结果升高。特别是后者，特异性较差，在采集尿样时，患者禁食上述食物和药物。

（2）本法采用内校准法，校准管测定条件与样品管完全一致，可避免由于反复提取过程中香草醛的丢失和尿中可能存在的某些抑制物对检测结果的影响。

（3）纯的VMA 溶液在室温下较容易被高碘酸盐氧化，但在尿的提取液中被氧化的温度高达50 ℃。有时即使在50 ℃，氧化作用也会被强烈抑制，所以本法要在50 ℃作用

30min。pH 值对氧化反应影响较大：在中性和酸性条件下，氧化产生黄色色素；而在弱碱性时，反应延迟并使香草醛分解。

4） 香草醛的最大光吸收是在波长348nm 处，本法选用360nm 作为比色波长，是为了避免其他物质的光吸收干扰。在360nm 波长下，香草醛的光吸收是峰值的80％，但干扰最小。而在350nm 和380nm 下，香草醛的吸光度显著下降。由于360nm 介于紫外光与可见光之间，因此，要选用较好的分光光度计，且波长须精确。

5） 本法需有机溶剂提取，碳酸钾水溶液反提取操作较繁，导致结果的重现性下降。目前有商品化的直接香草醛法测定尿VMA 的试剂盒，在酸性条件下用离子交换柱分离VMA，纯化液直接氧化后用偏重亚硫酸钠终止反应，即可比色测定。方法简单，而准确性提高。

二、重氮化对硝基苯胺显色法

【原理】

尿液经酸化后，用醋酸乙酯提取VMA，再用碳酸钾水溶液提取醋酸乙酯液中的VMA，并与重氮化对硝基苯胺反应，生成偶氮复合物，再用氯仿抽提，然后用氢氧化钠提取红色的偶氮化合物进行比色测定。

【试剂】

1） 醋酸乙酯。

2） 氯仿。

3） 氯化钠。

4）5mol/L 盐酸溶液。

5）0.2mol/L 盐酸溶液。

6）0.1mol/L 氢氧化钠溶液。

7）1mol/L 碳酸钾溶液。

8）1g/L 对硝基苯胺溶液：对硝基苯胺0.1g 溶于0.2mol/L 盐酸溶液中，并加至100ml，置棕色瓶，放冰箱内保存。

9）5g/L 亚硝酸钠溶液：置棕色瓶，放冰箱保存。

10） 重氮化对硝基苯胺溶液：临用前，视需要量将试剂8 和试剂9 等体积混合。

11）VMA 校准应用液（101μmol/L）：取VMA 校准贮存液（配法见直接香草醛比色法）2.0ml，加0.01mol/L 盐酸稀释至100ml，临用前配制。

【操作】

按表4－8－4 步骤操作。振摇1min，离心5min，取氢氧化钠溶液（上层，呈粉红色）在分光光度计500nm 波长处，用0.1mol/L 氢氧化钠溶液调零，分别读取吸光度值。

【计算】

$$\text{尿VMA 量 (μmol/24h)} = \frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}} \times \text{校准液VMA 浓度 (μmol/L)} \times \text{校准液 VMA 浓度 (μmol/L)} \times 24\text{h 尿量 (L)}$$

表4－8－4　重氮化对硝基苯胺显色法测VMA 操作步骤

加入物 (ml)	测定管	校准管
待测尿液	2.0	
VMA 校准应用液		2.0
5mol/L 盐酸溶液	0.1	0.1
氯化钠 (g)	1.5	1.5
醋酸乙酯	5.0	5.0
用力振摇5min，离心5min。取醋酸乙酯液 (上层) 4.0ml 至已标记好的第二批试管		
碳酸钾溶液	3.0	3.0
用力振摇5min，离心5min，取碳酸钾提取液 (下层) 2.0ml 至已标记好的第三批试管		
重氮化对硝基苯胺溶液	1.0	1.0
混匀，放置5min		
氯仿	4.0	4.0
振摇1min，放置分层或离心。取氯仿提取液3.0ml 至已标记好的第四批试管		
氢氧化钠溶液	4.0	4.0

【注意事项】

(1) 本法的特异性较直接香草醛比色法差，故更应注意尿液标本的留取，详见直接香草醛比色法。本法仅用于过筛试验。

(2) 用氯仿提取偶氮化VMA 复合物时，因对光敏感，故动作要迅速，同时要注意避光。

(3) 在氢氧化钠溶液中色泽稳定，5h 内无显著变化，线性良好。

【参考值】

直接香草醛比色法：0～10d <5 μmol/24h；10d～24 个月<10 μmol/24h；24 月～18 岁<25 μmol/24h；成人10～35 μmol/24h；

重氮化对硝基苯胺显色法：成人17.7～65.6 μmol/24h。

【临床意义】

尿液VMA 排泄量增多主要见于嗜铬细胞瘤。嗜铬细胞瘤起源于肾上腺髓质、交感

神经节或其他部位的嗜铬组织。位于肾上腺髓质者占80％～90％。高血压患者，如果血压波动较大，有典型高血压发作状态，怀疑嗜铬细胞瘤者，除可测血、尿儿茶酚胺浓度外，检测24h 尿VMA 量，最好连续测定3d，有助于临床诊断。在非发作期，尿VMA排泄量可正常或微偏高。

第九章　药物浓度检测

当药物经各种途径进入体内后，血液成为药物在体内运输的枢纽。绝大多数药物借助血液到达不同作用部位或受体部位，当该部位药物达到一定浓度时，即可产生药理效应而发挥治疗作用。药物疗效与靶组织中的药物浓度相关，血药物浓度与靶组织中的药物浓度相平衡，因此，血液是进行治疗药物监测（therapeutic drug monitoring，TDM）最常用的分析样品，唾液其次，有少量药物还可用尿液、脑脊液等样品进行检测。由于唾液、尿液所受到的影响因素多，脑脊液取样不便，这些样品在TDM中的应用受到一定限制。

第一节　药物浓度检测技术

体液中的药物大多在mg/L或μg/L水平，必须选用灵敏度高的检测方法，常用的技术有光谱技术、色谱技术及免疫化学技术等。

一、光谱技术

光谱技术包括紫外可见分光光度法、荧光分光光度法和原子吸收分光光度法等。紫外可见分光光度法灵敏度差，药物在mg/L水平时才可选用。荧光分光光度法灵敏度稍高，但易受其他药物或内源性物质干扰，特异性差，需用有机溶剂提取；虽然通过提取、双波长、示差、导数分光光度法等方法可提高其检测灵敏度和特异性，但仍未能从根本上克服上述缺点。原子吸收分光光度法有较高的精密度和准确度，适合于测定金属元素，在TDM中主要用于测定锂。

二、色谱技术

色谱技术包括薄层层析（TLC）、气相色谱（GC）、高效液相色谱（HPLC）等。TLC灵敏度及重复性差，除用于毒物的检测外，在TDM中较少应用。GC和HPLC由于实现了高效层析分离和检测联机，可用微电脑控制层析条件、程序和数据处理，特异性、灵敏度和重复性均好，并可一次同时完成同一样品中多种药物及其代谢物检测。若采用内标法定量，还可排除部分操作误差，提高检测结果的可靠性。特别是HPLC法，不需对样品高温气化，一般都可不进行衍生化处理，已成为TDM的重要检测技术。HPLC使用

的检测器有紫外检测器、荧光检测器、电化学检测器等。近年来发展起来的气相色谱－质谱、高效液相色谱－质谱联机检测，更极大地提高了这类分析手段的性能。

三、免疫化学技术

此类技术主要有放射免疫分析（RIA）、酶免疫分析（EIA）、荧光免疫分析（FIA）、化学发光免疫分析（CLIA）及免疫比浊法等。这些方法能直接检测血清中的药物，不必将其从血样中分离出来，操作简单，标本用量少，灵敏度高及特异性强。放射免疫分析及酶免疫分析适合批量测定，前者由于同位素标记试剂半衰期短，存在同位素污染等问题，限制了其在TDM 中的广泛应用。近年来，许多本来用放射免疫分析测定的药物都已改用酶免疫分析、荧光免疫分析及化学发光免疫分析等进行检测。

以荧光偏振免疫分析（FPIA）原理设计的药物浓度测定专用的荧光偏振分析仪操作简单，检测迅速，是目前药物检测的常用方法。

第二节　全血环孢素测定

环孢素（cyclosporin A，CsA）为脂溶性环状11 肽化合物。测定方法有高效液相色谱法、放射免疫法、荧光偏振免疫法等。高效液相色谱法准确性好，灵敏度高，影响因素小；荧光偏振免疫法无需对标本进行预处理，操作简单、快速，两者是测定CsA 常用的方法。

一、荧光偏振免疫分析法

【原理】

样品中CsA 和荧光素标记CsA 与抗体发生竞争结合反应，样品中CsA 含量越高，则荧光素标记CsA 和抗体结合量越少，荧光偏振强度越弱。根据CsA 浓度与荧光偏振强度的校准曲线，可得出待测标本中CsA 浓度。

【试剂】

CsA 系列校准液、质控品（包括低值、中值、高值）、荧光素标记CsA、标本稀释缓冲液、蛋白沉淀剂、溶解剂、抗CsA 单克隆抗体。

【操作】

1）测定前将各种试剂的温度恢复至室温。

2）将荧光偏振免疫检测仪接通电源后输入时间参数，进行管路冲洗，输入需要检测的项目。

3）取校准液（各双份）、质控品和样品各150μl 加入1.5ml 离心管中，再加入50μl

溶解剂、300μl 蛋白沉淀剂，振荡10s 后，9500g 离心3min，取上清液。

4） 取上清液150μl 吸入样品杯中，放置于相应样品盘上，进行检测。

5） 仪器将自动报告检测结果。

【注意事项】

1） CsA 与红细胞及血浆蛋白都有很高的结合率，全血与血浆CsA 浓度之比为2∶1，说明与红细胞结合较多。

2） CsA 与红细胞及血浆蛋白的结合受血细胞比容、温度等因素影响。血细胞比容小时，大量CsA 留在血浆中。4℃时CsA 与血浆蛋白的结合率为70%，20℃时为93%，37℃时为90%。因此，测定全血CsA 浓度比测定血浆或血清CsA 浓度容易得到稳定的结果。

3） 常规监测CsA 浓度一般取谷浓度，在清晨服药前或服药12h 以后采血测定。

二、高效液相色谱法

【原理】

以环孢素D （CsD） 为内标，破碎红细胞后用乙醚提取CsA，蒸干提取液，用流动相及正己烷重新溶解后进样，在Spherisorb C_{18} 柱上分离，波长208nm 下检测。

【试剂】

1） CsA 校准贮存液 （1g/L）：CsA0.1g 溶于甲醇使成100ml，放冰箱可稳定9 个月。临用前用无药混合血清稀释成系列血清校准液。

2） 内标贮存液 （1g/L）：CsD01g 溶于甲醇使成100ml。将内标贮存液用甲醇稀释成内标应用液 （100mg/L）。

3） 其他试剂：乙醚、乙腈、甲醇、异丙醇、氟化钠及正己烷。

【色谱条件】

1） 不锈钢色谱柱：Spherisorb C_{18} 4.6mm ×200mm （5μm）。

2） 流动相：乙腈水：甲醇异丙醇按57∶18∶25∶1.5 比例配成。

3） 柱温：65℃。

4） 波长：208nm。

5） 流动相流速：1.4ml/min。

【操作】

1） 取全血或CsA 血清校准液2ml，加入16μlCsD 内标液 （100mg/L） 及1g 氟化钠，旋涡混合30s。

2） 加入乙醚5ml，振荡抽提2.5min，4000r/min 离心10min。

3） 取出有机液层4ml，将残渣在50℃环境中用空气流吹干。

4）于残渣中加入流动相150μl及正己烷400μl，溶解后取20μl进样分析。

【计算】

以校准液CsA与内标CsD的峰面积比为纵坐标，CsA浓度为横坐标，绘制校准曲线，根据待测样品CsA与内标的峰面积比在校准曲线上查出样品中的CsA浓度。

【注意事项】

CsA在40～1200μg/L范围内呈线性关系，最低检出限为20μg/L，回收率为94.7%～103.9%，日内变异系数为2.0%～4.8%，日间变异系数为3.4%～7.8%。

【有效血药浓度】

肾移植术后1个月内为350～450μg/L（249.6～374.4nmol/L），3个月内为200～300μg/L，6个月内为150～250μg/L。

【临床意义】

谷值浓度<50μg/L（41.6nmol/L）时会出现排斥反应，>400μg/L时出现中毒的概率增加。

CsA是一种强有力的免疫抑制剂，临床上主要用于防治异体器官、组织或骨髓移植的排斥反应，常与糖皮质激素等药物合用。每个患者对CsA药效的敏感性与耐受性有很大的个体差异，且血CsA浓度还受生理、病理、合并用药等因素影响。因而CsA有效治疗浓度范围窄，超过此范围可引起许多毒性反应，包括肾功能不全、高血压、神经精神症状、消化道功能紊乱、肝功能损害、高血钾、高尿酸血症和高脂血症、水钠潴留、多毛症等。CsA的血药浓度监测对调整剂量和观察其毒性具有重要意义。

第三节　血清地高辛测定

地高辛（Digoxin）从毛花洋地黄叶中提取，称异羟基洋地黄毒甙。测定方法有色谱分析法和免疫化学法，包括放射免疫分析、酶免疫分析、荧光偏振免疫分析、微粒子化学发光免疫分析等。

一、微粒子化学发光免疫分析法

【原理】

样品中地高辛和碱性磷酸酶标记地高辛与一定量地高辛抗体发生竞争性结合反应，平衡后加入磁颗粒包被抗抗体，在磁场作用下进行分离，洗去未结合碱性磷酸酶标记地高辛。将化学发光底物3－（2’－螺金刚烷）－4－甲氧基－4－（3’－磷酰氧基）－苯基－1，2－环二氧乙烷（AMPPD）加入反应杯中，通过酶促反应发出光量子。根据地

高辛系列校准液浓度与发光强度制作校准曲线，计算出待测标本中地高辛含量。

【仪器】

化学发光分析仪。

【试剂】

1） 地高辛试剂包：R1a 为顺磁性颗粒包被的羊抗兔IgG 抗体；R1b 为地高辛碱性磷酸酶结合物；R1c 为兔抗地高辛抗体。

2） 地高辛系列校准液。

3） 冲洗缓冲液。

4） AMPPD。

5） 质控血清。

【操作】

参照仪器有关操作程序进行操作，大致步骤如下：

1） 吸取样品0.5ml 于样品杯中，放置于样品架上。

2） 从主屏幕进入所需屏幕，为每个样品设置架号、样本信息及输入要检测的项目。

3） 启动分析起始键，分析仪将进行定标并分析。

4） 仪器根据地高辛的校准曲线可得出被分析样品的检测结果。

【注意事项】

1） 试剂在2～10℃保存，使用前应颠倒混匀数次。

2） 无论静脉或口服给药，要完成体内分布过程均需8～2h。若为衡量心脏对药物的反应而监测血药浓度，则至少要在给药8h 以后采血，最好在18h 以后采血。

3） 样品应密封保存，若在8h 之内不能检测，应置于2～8℃冰箱中保存。48h 以后才作分析的标本，应于－20℃保存。

4） 地高辛代谢物、其他强心甙类药物及某些类固醇制剂能与地高辛抗体发生交叉反应，从而干扰地高辛测定。样品中内源性地高辛样免疫反应因子也可与地高辛抗体发生交叉反应而干扰测定结果。

5） 可检测浓度范围0.20～600mg/L（0.3～7.7μmol/L）。若样品浓度＞600mg/L，可用地高辛零定标液稀释后重测，若样品浓度＜0.20mg/L，应报告检测结果＜0.20mg/L。

6） 为确保检测结果的准确性，需测重复管。

二、放射免疫分析法

【原理】

^{125}I－地高辛和样品中的地高辛与抗地高辛抗体发生竞争性结合反应，反应平衡后将结合部分和游离部分进行分离，测定结合部分放射性活度，查校准曲线，求出样品中地高辛含量。

【材料】

^{125}I－地高辛、地高辛校准液、磷酸盐缓冲液，抗地高辛抗体包被的聚苯乙烯管（2～27 ℃，防潮保存）。

【操作】

根据试剂盒说明书操作，一般步骤如下：

（1）按试剂盒说明准备好标本、校准品及质控物。

（2）抗地高辛抗体包被的聚苯乙烯管若干，作好相应标记。加标本或校准品或质控物、磷酸盐缓冲液、^{125}I－地高辛，混匀，37 ℃水浴1h，吸弃所有反应管中的液体并用洗涤液洗2 次。

（3）在γ计数仪上检测各反应管的结合部分（B）放射性活度。

【计算】

以地高辛校准液浓度为横坐标，B／Bo 为纵坐标制作地高辛校准曲线，在此曲线上查出待测标本地高辛浓度。

【注意事项】

（1）试剂应在有效期内使用，加样前，各试剂应混匀。

（2）本试剂盒使用放射性同位素，故一切操作及处理均应按放射免疫操作规程进行。

（3）干扰因素参照微粒子化学发光免疫分析法。

【有效血药浓度】

治疗慢性心力衰竭为1.0～2.6 μmol／L（0.8～2.0 mg／L），治疗心律失常为2.0～2.6 μmol／L（1.5～2.0 mg／L）。儿童为1.1～1.7 mg／L（1.4～2.2 μmol／L）。

【临床意义】

地高辛主治充血性心力衰竭、心房颤动、心房扑动等。其有效血药浓度范围窄，心力衰竭患者治疗时用量不足与中毒时的临床表现又很相似，且个体差异大。不同厂家生产及同一厂家生产的不同批号药物所形成血药浓度也有较大差异。血清地高辛浓度＞2.6 μmol／L（2.0 mg／L），多数患者可出现中毒症状。新生儿和婴儿能耐受较高浓度的地高辛，超过2.6 μmol／L 仍很少引起中毒。中毒症状包括胃肠道反应（如厌食、恶心、呕吐、腹泻）；心脏毒性反应（可出现各种心律失常，多见的是室性期前收缩，其次为房室传导阻滞、房室交界处性心动过速等）。血清地高辛浓度可受多种因素的影响，如年龄、肾功能、酸中毒、低血钾、低氧、合并用药等。

第四节　血清卡马西平测定

卡马西平（carbamazepine，CBZ）又称酰胺咪嗪、卡巴咪嗪、痛惊宁，是亚氨基二苯三环化合物的衍生物，为广谱抗癫痫药。测定方法有紫外分光光度法、高效液相色谱法和免疫化学分析法。紫外分光光度法特异性差；高效液相色谱法准确度高，是检测CBZ 的首选方法；免疫化学分析不需对样品进行抽提，操作简单快速，目前化学发光免疫分析和荧光偏振免疫分析也是测定CBZ 的常用方法。

高效液相色谱法

【原理】

以苯巴比妥（PB）或苯妥英（PT）为内标，以二氯甲烷抽提血清CBZ 等药物，蒸干后用流动相重溶进样，在反相ODS（octasdecylsilane，十八烷基键合硅胶）柱上分离，于波长254nm 下检测。

【试剂】

1）内标及校准贮存液：PB25mg、PT25mg、CBZ25mg 分置于25ml 容量瓶中，用甲醇溶解并定容成PB1.0g/L、PT1.0g/L、CBZ1.0g/L 的校准贮存液，若用PB 或PT 作内标，可将其贮存液用流动相作10 倍稀释，4℃保存。

2）0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.8）。

【色谱条件】

1）色谱柱：HypersilODS，4.6mm×100mm（5μm）。

2）流动相：甲醇水（52∶48），经超声脱气。

3）流动相流速：0.8ml/min。

4）波长：254nm。

【操作】

1）取血清200μl 于具塞试管中，加内标50μl，加入磷酸盐缓冲液250μl，摇匀，加二氯甲烷2.0ml，振摇提取1min，以4000r/min 离心10min。吸弃上层水相，取下层有机相1.5ml 于尖底小试管中，50℃水浴蒸干。残渣用150μl 流动相溶解，取40μl 进样。

2）校准曲线制作：取校准贮存液配制含CBZ 为20、10、5、2.5mg/L 的血清校准液，按样品处理并进行色谱分析。

【计算】

以CBZ 浓度为横轴，CBZ 与内标的峰面积比为纵轴，制作校准曲线，求出标本与

内标的峰面积比，在校准曲线上查出标本CBZ 浓度。

【注意事项】

（1）一般情况下不会同时服用PB、CBZ 和PT。若同时服用CBZ、PB，可以PT 为内标，若同时服用CBZ、PT，可以PB 为内标，用三种校准液互为内标，不必另选其他内标，较方便。内标可消除提取、进样等操作误差，使检测结果准确。

（2）测定CBZ 也可采用本章第六节所选的高效液相色谱检测苯妥英钠的方法。

【有效血药浓度】

存在着较大的个体差异，其抗癫痫作用浓度为2.1～105.0 μmol/L（0.5～25.0 mg/L），常用治疗浓度为16.9～50.7 μmol/L（4～12 mg/L）。

【临床意义】

血药浓度为30.9～33.8 μmol/L（7.3～8.0 mg/L）时即可出现不良反应，达36.0～42.0 μmol/L（8.5～10.0 mg/L）时，约50％患者出现中毒症状。

CBZ 治疗癫痫复杂部分性发作比其他抗癫痫药物效果好，对全身强直性发作效果也较好，也可用于局限性发作及其他类型发作，一般不用于失神发作。与CBZ 浓度相关的不良反应有：共济失调，视力障碍（复视、视力模糊、眼球震颤等），低钠血症，骨软化，胃肠道症状（恶心、呕吐、食欲不振等）。与CBZ 浓度不相关的不良反应为皮疹、粒细胞减少等。

第五节　血清丙戊酸测定

丙戊酸（valproic acid）在临床上常用于抗癫痫治疗。测定方法主要有气相色谱法、免疫分析法。由于丙戊酸在紫外区无特征性吸收，若用液相色谱紫外检测器检测需预先进行衍生化处理。

一、荧光偏振免疫分析法

【原理】

样品中丙戊酸和荧光素标记丙戊酸与抗丙戊酸抗体发生竞争反应，样品中丙戊酸含量越高，则荧光素标记丙戊酸与抗丙戊酸抗体结合量越少，荧光偏振强度越弱。根据丙戊酸系列校准液浓度与荧光偏振强度制成的校准曲线，可得出待测标本中丙戊酸浓度。

【试剂】

抗丙戊酸抗体、荧光素标记丙戊酸、预处理溶液（主要成分有表面活性剂、蛋白稳定剂、叠氮钠等）、丙戊酸系列校准液、质控品。

【操作】

按仪器及试剂说明书操作步骤进行。

【注意事项】

1）血清或血浆标本均可用于丙戊酸检测，因丙戊酸有挥发性，应密封低温保存。

2）血清中胆红素浓度＜85.5μmol/L、血红蛋白质量浓度＜10g/L、甘油三酯浓度＜5.65mmol/L时对测定结果的影响可忽略不计。

3）由于丙戊酸具有长链的脂肪酸结构及本法灵敏度高的特点，一些增塑剂、涂料、油漆的挥发物、脂肪酸能吸附在比色杯上并干扰丙戊酸的测定。为了避免干扰，不可接触这些物质及它们的挥发物。

4）丙戊酸的主要代谢产物3－酮－丙戊酸与丙戊酸抗体有交叉反应，但此代谢物在癫痫患者血浆可达到的高浓度水平（16mg/L），对治疗浓度（50～100mg/L）丙戊酸测定的干扰＜10%。丙戊酸的次要代谢产物如3－羟－丙戊酸、4－羟－丙戊酸对其干扰低于检测灵敏度。

二、气相色谱法

【原理】

以环己烷羧酸为内标，将丙戊酸从酸化水溶液内提取至有机溶液中，再反提取至稀氢氧化钠溶液中，酸化氢氧化钠层后，将其中丙戊酸再抽提至第二有机相内，最后将此有机相在气相色谱柱上进行分析。

【试剂】

1）丙戊酸校准贮存液（1.811g/L或12.6mmol/L）：将0.5ml丙戊酸加入50ml容量瓶中，加无水乙醇至刻度（此时浓度为9.054g/L或62.9mmol/L）；取此液10ml于50ml容量瓶中，加蒸馏水至刻度。

2）丙戊酸校准应用液：用健康人混合无药血清稀释校准贮存液，配制成不同浓度校准应用液（40～120mg/L）。在4℃冰箱内能保存2个月。

3）环己烷羧酸内标应用液（1g/L或7.8mmol/L）：加1滴环己烷羧酸于小烧杯中，并称重。用1ml甲醇溶解，然后加水使总体积的毫升数等于药物的毫克数（例如1滴环己烷羧酸称重为18mg，则用1ml甲醇溶解后加水使总体积为18ml）。

4）抽提剂：异丙醇：二氯甲烷为10∶90。

5）其他试剂：甲醇、氯仿、盐酸、氢氧化钠等。

【色谱条件】

10%Carbowax20MTPA层析柱，火焰离子检测器，进样温度：280℃，柱温：210℃，检测器温度：300℃，氮气流速：60ml/min。

【操作】

1）取血清0.5ml 加入具塞试管内，再加入1.0mol/L 盐酸0.5ml、环己烷羧内标液100μl、抽提剂10ml。

2）振荡3min，离心3min，弃去上层血清，有机溶剂层经滤纸过滤于具塞试管中。

3）滤液中加入0.5mol/L 氢氧化钠溶液2ml，振荡混匀3min，离心。

4）上层液移至试管内，加1.0mol/L 盐酸1ml 并混匀。

5）再加入氯仿0.1ml，振荡混匀1min，离心沉淀3min。

6）弃上层液，取下层氯仿层2μl 进样分析。

校准液的处理与检测同血清标本。

【计算】

以校准液丙戊酸与内标的峰面积比为纵坐标，校准液丙戊酸浓度为横坐标，绘制校准曲线。根据待测样品丙戊酸与内标的峰面积比在校准曲线上查出待测样品丙戊酸浓度。

【注意事项】

1）内标或气相色谱条件改变，需重新绘制校准曲线。

2）1d 内血药浓度波动较大，一般均于服药前测谷浓度，必要时同时测谷浓度和峰浓度，后者于服药后1～3h 采血。患者标本应作双份分析。

3）许多因素可影响血清中游离丙戊酸浓度，测游离丙戊酸更有实用价值。

【有效血药浓度】

347～694μmol/L（50～100mg/L）

【临床意义】

丙戊酸用于控制各型癫痫，对失神小发作、婴儿痉挛症、肌阵挛发作等疗效较好。由于个体对药物剂量与血药浓度关系的差异很大，在长期用药或增减药物剂量时对体内血药浓度进行监测十分必要。

常见的副作用有恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠道症状及头痛、共济失调、嗜睡、震颤等神经系统症状。丙戊酸也可引起急性胰腺炎、胃炎、高血氨血症、白细胞及血小板减少。当血药浓度大于833μmol/L（120mg/L）时，有可能出现震颤。本药能通过血脑屏障与胎盘屏障，胎儿体内血药浓度可超过母体血药浓度，近年来发现丙戊酸有致畸作用。

与苯巴比妥合用时，苯巴比妥能诱导肝脏微粒代谢酶，加速机体对丙戊酸的代谢。同时丙戊酸还可提高苯巴比妥在血浆中的浓度。

第六节　血清苯妥英测定

苯妥英（phenytoin）是常用的抗癫痫药物。测定方法有光谱法、高效液相色谱法及免疫化学法等。分光光度法以衍生化后紫外检测法较成熟，其灵敏度、重复性、线性范围均满足TDM要求，缺点是无法完全排除其代谢物干扰。高效液相色谱法检测灵敏度高、特异性强、重复性好，对合用的抗癫痫药物能同时检测。

一、高效液相色谱法

【原理】

以5－乙基－5甲苯巴比妥酸为内标，用叔丁基甲醚在pH7.6的条件下提取血清标本中的苯妥英等药物。将提取液蒸干后用甲醇溶解，于ODS（参见第四节血清卡马西平测定）柱上进行色谱分析，在波长254nm下进行检测。

【试剂】

1）校准贮存液（1g/L）：用甲醇配制苯妥英、卡马西平、苯巴比妥和乙琥胺的校准贮存液各10ml（g/L），密封，－20℃保存备用。用前务必平衡至室温。

2）血清校准应用液：用无药人血清将校准贮存液稀释成含苯妥英、苯巴比妥、卡马西平、乙琥胺浓度分别为40.0、40.0、20.0、200.0mg/L混合校准应用液。作校准曲线时用无药人血清将其对倍稀释成4个不同浓度。

3）内标贮存液（1g/L）：用甲醇配制5－乙基－5甲苯巴比妥酸，密封在－20℃保存备用。

4）内标应用液（100mg－L）：取内标贮存液用甲醇稀释，密封在4℃下保存。

5）磷酸盐缓冲液（0.1mol/L，pH7.6）。

6）流动相：乙腈：甲醇：水按9∶37∶54比例配制100ml，加入正丁胺和冰醋酸各40μl，混匀后经超声波脱气。

7）叔丁基甲醚。

【色谱条件】

不锈钢色谱柱：ODS150.0×4.6mm（10μm）；流动相流速：1.5ml/min；检测波长：254nm；柱温：室温。

【操作】

1）取所需数量的磨口带塞玻璃试管，于各管中分别加入无药空白血清、校准血清、质控血清和待测血清各200μl。

2）除无药空白血清外，于各管准确加入内标应用液10μl。

3）于各管加磷酸盐缓冲液200μl。

4）加叔丁基甲醚3.0ml为提取液。

5）间断旋涡振荡约10～20s，不要过于剧烈。

6）离心，3000r/min，5min。

7）吸上层有机层2.5ml移入另一尖底玻璃试管，切勿带入水相。40℃水浴中氮气流（或空气流）下吹干。

8）沿管壁四周缓缓加入甲醇60μl，在旋涡振荡器上振荡数秒钟，使残留物充分溶解。

9）用微量进样器取重组液20μl进样，进行色谱分析。

【计算】

以血清校准液中各药物与内标峰高比为纵坐标，其相应的药物浓度为横坐标，分别绘制各药物校准曲线。根据标本中各药物与内标的峰高比在相应的曲线上查得其血药浓度。

空白无药血清无干扰峰。依次出峰的药物为乙琥胺、苯巴比妥、内标、苯妥英、卡马西平。

【注意事项】

1）本法可同时或分别测定苯妥英、卡马西平、苯巴比妥和乙琥胺。苯妥英、卡马西平的最低检出限均为0.5mg/L，线性范围分别为0～80mg/L、～40mg/L。

2）苯妥英在血中达稳态时间具有剂量依赖性。剂量越大，血药浓度越高，达稳态所需时间越长。低浓度时半寿期约24h，经7d左右可达稳态，在口服7～10d后测血药浓度为佳。当剂量加大时，每次改变剂量后需观察2～4周再测血浓度，因为此时达稳态所需时间延长。

3）标本应及时测定，4～10℃保存不超过3d。标本放置过久或放置在较高的室温时，血清标本中苯妥英测定值会明显偏低。标本冰冻保存过久，其检测值也偏低。

4）本法亦可用5－（p－甲苯基）－5－苯基妥英为内标。

5）若用二氯甲烷为提取液，提取效果与叔丁基甲醚相同，只是其比重大于水相，要先吸去上层水相后，才能将下层有机相移入另一尖底试管。吹干二氯甲烷要在50℃水浴中进行，吹干叔丁基甲醚只需40℃水浴。吹干提取液要在通风橱内进行。

6）抽提振摇不要过于剧烈以免产生混浊。

二、紫外分光光度法

【原理】

苯妥英在碱性溶液中经高锰酸钾氧化成二苯酮，在波长247nm 附近，二苯酮有最大吸收峰。此波长下样品吸光度大小与苯妥英含量成正比。

【试剂】

0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH6.8）、二氯甲烷、7mol/L 氢氧化钠溶液、饱和高锰酸钾溶液、环已烷。苯妥英校准贮存液（g/L）：用甲醇配制，密封于20℃保存备用。用前务必平衡至室温。

【操作】

1）校准管加无药混合血清0.5ml，按所需浓度计算后精确加入苯妥英校准贮存液；测定管加待测血清0.5ml；各管均加磷酸盐缓冲液2ml，用二氯甲烷10ml 提取2 次。

2）合并提取液，加7mol/L 氢氧化钠溶液7ml，摇匀，分离出碱层，加热除去残留的二氯甲烷。

3）加入高锰酸钾饱和液2.5ml，混合后，80℃水浴加热15～25min，取出冷却至室温。

4）再加入2.5ml 环己烷提取二苯酮。

5）将提取物于247nm 波长下检测吸光度，以环己烷调零。

【计算】

$$\text{血清苯妥英浓度}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{校准液苯妥英浓度}$$

【注意事项】

1）巴比妥、乙琥胺、扑痫酮、卡马西平、安定等药物对本法无干扰，但本法不能完全排除苯妥英代谢物干扰。

2）苯妥英被氧化成二丙酮的最适条件为7mol/L 氢氧化钠溶液，80℃左右水浴15～25min。加热时间过长，易使二苯酮损失。加热不匀将导致检测结果偏差。

3）用二氯甲烷提取苯妥英比三氯甲烷效果好，二氯甲烷沸点低（40℃），80℃水浴即能使二氯甲烷挥发尽。

4）本法性能：最低检出限0.5mg/L；线性范围1～30mg/L；回收率95.4%～101.2%；CV2.99%。

【有效血药浓度】

10～20mg/L（39.～79.2μmol/L）。

【临床意义】

苯妥英是治疗癫痫单纯部分发作和全身强直－阵挛发作的首选药物之一，对复杂部分发作亦为重要药物，对小发作则无效。但其安全范围窄、毒性大。当剂量增加到一定程度时，若稍有增加，即可引起血药浓度很大的改变，超过20mg/L 可出现中毒症状。

此外肝脏对苯妥英的代谢能力个体差异大，不同人在同一剂量时的血药浓度亦不一致。血药浓度＞20mg/L（79.2μmol/L）可出现眼球震颤，＞30mg/L（118.9μmol/L）出现共济失调、复视，＞40mg/L（158.4μmol/L）可出现困倦、昏睡。苯妥英与血浆白蛋白的结合率高，当血浆白蛋白减少，或者同时服用可与苯妥英竞争白蛋白结合位点的药物如丙戊酸钠、保泰松、水杨酸、磺胺类等，均可使苯妥英蛋白结合率下降，游离血药浓度升高。此外，服用苯妥英期间若同时使用了苯巴比妥、利福平等酶诱导剂，异烟胺、氯霉素等肝酶抑制剂，苯妥英血药浓度可降低或升高。

第七节　血清茶碱测定

茶碱（theophylline）是治疗哮喘的常用药物。测定方法有紫外分光光度法、免疫分析法（放射免疫分析、酶免疫分析、化学发光免疫分析和荧光偏振免疫分析）、色谱法等。曾普遍采用的紫外分光光度法，因标本用量较大，特异性差，目前已少采用。放射免疫法操作简单，检测灵敏而特异，但因放射性物质的储藏与处理问题限制了其应用。气相色谱法由于操作复杂、费时、仪器昂贵，难以广泛应用。目前国内外较多采用均相酶免疫法、荧光偏振免疫分析、化学发光免疫分析法及高效液相色谱法。

一、高效液相色谱法

【原理】

以β羟乙基茶碱为内标，用三氯甲烷异丙醇（95∶5）的混合液提取血清标本中的茶碱，将提取液蒸干后用甲醇复溶，在反相ODS色谱柱上进行分离，于波长254nm下进行检测。

【试剂】

1）茶碱校准贮存液（1g/L）：以甲醇配制。

2）茶碱血清校准应用液：用无药人血清稀释茶碱校准贮存液，成为5.0、10.0、20.0及40.0mg/L校准应用液。

3）内标贮存液（β羟乙基茶碱1g/L）、内标应用液（β羟乙基茶碱0.2g/L）：均由甲醇配制。

4）提取液：氯仿异丙醇为95∶5。

5）流动相：乙腈：水：正丁胺：冰醋酸按2000∶20500∶1∶10的比例配制，循环使用。

【色谱条件】

色谱柱：ODS150mm×5mm（10μm），流动相流速：3ml/min，检测波长：254nm，柱

温：室温。

【操作】

1）取具盖玻璃试管若干支，分别加入无药血清、血清校准应用液、质控血清及待测血清各100μl，于各试管中分别加入内标应用液10μl、提取液2.0ml。

2）间断旋涡振荡30s，3000r/min 离心3min。

3）吸弃上层水相，小心将底层有机相1ml 移入另一尖底试管，切勿带人水相。在通风橱内氮气气流下60℃吹干。

4）用甲醇50μl 重溶残留物，然后用微量进样器吸取10μl 进行分析。

【计算】

以各血清校准应用液中茶碱与内标的峰高比为纵坐标，其相应的茶碱浓度为横坐标，绘制校准曲线。根据待测标本中茶碱与内标的峰高比在校准曲线上查得茶碱浓度。亦可通过求出峰高比与浓度的回归方程，计算标本中茶碱浓度。

【注意事项】

1）静脉给药时为求算个体的表观分布容积，一般于静脉滴注负荷量后15h 采血，计算静脉滴药时个体的维持剂量，采血时间应在维持剂量后4～6h。

2）口服药物通常可于达稳态后清晨服药前采血测谷浓度。

3）在诊断茶碱过量中毒时，可随时采血进行测定。

4）本法若采用乙腈：醋酸缓冲液（10mmol/L，pH4.0）按8∶92 配制的流动相，效果相同，只是每次检测结束后要依次用水和甲醇充分冲洗管道系统及分析柱。

5）本法流动相中水的比例很大，容易发生气泡，流动相用前需脱气，如仍有气泡，可适当增加反压。

6）本法性能：最低检出限0.5mg/L，线性范围0.5～80.0mg/L，CV1.2%。

7）服用扑尔敏、尿酸、肌酐、扑热息痛、黄嘌呤等均不干扰测定结果。

二、双波长紫外分光光度法

【原理】

在酸性条件下用氯仿正丁醇溶液抽提血清中茶碱并沉淀蛋白，在碱性条件下，对氯仿层中茶碱进行回提，茶碱在波长274nm 处有吸收峰，本底在波长274nm 和298nm 处吸光度值相近，采用双波长法可排除本底的干扰，对待测样品及校准品在波长274nm 和298nm 的吸光度差进行比较，可得到血清中茶碱浓度。

【试剂】

1）茶碱校准液（500mg/L）：茶碱50mg，用0.1mol/L 氢氧化钠溶液溶解并配成100ml，冰箱保存。

2）0.1mol/L 盐酸溶液。

3）0.1mol/L 氢氧化钠溶液。

4）0.4mol/L 氢氧化钠溶液。

5） 异丙醇：三氯甲烷抽提液：异丙醇：三氯甲烷为25 ：475。

【操作】

1） 取血清0.5ml，加入0.1mol/L 盐酸溶液0.2ml，异丙醇三氯甲烷抽提液5.0ml，充分振摇提取，2500r/min 离心10min。

2） 取下层有机相4.0ml 置另一试管中，加入0.4mol/L 氢氧化钠溶液4.0ml，再次提取，离心后取上层，以0.1mol/L 氢氧化钠溶液为空白对照，读取波长274nm 和298nm 处吸光度值。

3） 校准曲线制作：取试管5 支，依次加入500mg/L 茶碱校准液4、8、12、16、20μl，各管均加入0.1mol/L 氢氧化钠溶液至4ml （相当于待测血清中茶碱浓度5、10、15、20、25mg/L），以0.1mol/L 氢氧化钠溶液作空白管，测定各管波长274nm 和298nm 处吸光度值。

【计算】

计算在两种波长下的吸光度差值 （△A），以校准液茶碱浓度为横坐标，以△A 为纵坐标绘制校准曲线图。根据待测物的△A 值，查校准曲线或进行计算可求出待测标本中的药物浓度。

【注意事项】

1） 抽提时振荡不能太剧烈，否则可形成乳浊液，难以分离。

2） 本试验结果可受饮用茶、可可碱、咖啡及同时使用保泰松或磺胺类药物的影响。

3） 本法性能：线性范围0～25mg/L，回收率为95％～102％，CV 为4％～7％。

4） 本法只需紫外可见分光光度计，较适合于基层医院。

【有效血药浓度】

成人及儿童10～20mg/L （55.4～111μmol/L）；新生儿5～10mg/L （27.7～55.4μmol/L）

【临床意义】

茶碱是临床药物氨茶碱在体内转变后的活性形式。氨茶碱主要应用于支气管哮喘、哮喘持续状态以及慢性阻塞性肺疾患。还可用于治疗心源性和肾性水肿。氨茶碱在体内释放出茶碱从而发挥其药理作用。茶碱在血中主要与血浆蛋白结合，pH 值改变可影响其结合率，$t_{1/2}$ 为3～9h。不同个体代谢差异较大。潜在中毒浓度：成人及儿童＞20mg/L （111μmol/L）；新生儿＞15mg/L （83.1μmol/）。血药浓度＞30mg/L （166μmol/L） 时，其

消除动力学可由一级向零级转变，此时应及时调整剂量。中毒时可出现激动、不安、行为异常及抽搐等神经系统症状，还可出现恶心、呕吐、心动过速、呼吸频率加快及利尿作用等症状。

第八节　血清乙醇测定

乙醇（ethanol 或alcohol）俗称酒精，为酒的主要成分。全血、血清或血浆、尿液均可作乙醇测定。测定方法有化学比色法、酶试剂分析法、渗透压测定法、放射性能量衰竭（radiativeenergy attenuation，REA）法、呼出气乙醇分析及气相色谱法（GC）等。化学比色法特异性差，因甲醇等可干扰反应而致检测结果假阳性。酶法、渗透压法、气相色谱法在国外较为常用，其中酶法简单，不需特殊仪器；气相色谱法为参考方法；呼出气乙醇分析仪检测乙醇操作简单、快速，在交通执法部门应用较多。本节介绍乙醇氧化酶法。

【原理】

$$\text{乙醇}+\text{氧}\xrightarrow{\text{乙醇氧化酶}}\text{乙醛}+\text{过氧化氢}$$

$$\text{过氧化氢}+4-\text{氨基安替比林}+\text{变色酸二钠}\xrightarrow{\text{乙醇氧化酶}}\text{蓝色化合物}+\text{水}$$

【试剂】

1）试剂Ⅰ：4－氨基安替比林0.7mmol，EDTA50mg，TritonX－100 适量，用0.1mol／L 磷酸盐缓冲液（pH7.5）配成1L，于4℃保存可稳定1 个月以上。

2）酶试剂：1.7mol 变色酸二钠，5kU 乙醇氧化酶，3kU 过氧化物酶，用试剂Ⅰ稀释至1L。4～8℃避光保存可稳定1d。

3）乙醇校准液（150mg／L）：色谱纯无水乙醇189μl 用去离子水稀释成1L。密封保存。

【操作】

10μl 样品加入3ml 酶试剂，于室温放置30min，于波长600nm 测定吸光度，以试剂空白校零。校准管用10μl 校准液代替样品进行测定。

【计算】

$$\text{乙醇质量浓度（mg／L）}=\frac{\text{测定管吸光度值}}{\text{校准管吸光度值}}\times\text{乙醇校准液质量浓度（mg／L）}$$

【注意事项】

1）酶法测定乙醇已有试剂盒供应，具体操作可参照试剂盒的说明书。

2）本法可用于血、尿标本乙醇分析，标本应新鲜。

3）勿用乙醇消毒采血部位，采血后需及时分离血浆或血清。血浆可选用肝素钠抗凝。

4）标本均需加塞或用封口膜密封，并置冰箱保存，以防止样品中乙醇蒸发丢失。4 ℃贮存可稳定14d，未灭菌的标本或打算较长时间保存者，需在标本中加入氟化钠以防发酵而导致乙醇浓度增高。

5）甲醇、正丙醇、正丁醇及正戊醇有少量非特异反应，但在正常体液中，仅偶有少量甲醇存在，对本法的干扰可忽略。

6）乙醇氧化酶专一性较好，对许多初级醇及侧链醇均无反应，仅对甲醇有反应。而乙醇脱氢酶却有较强的非特异反应，干扰大。

7）本法无需对样品进行预处理，为防止乙醇挥发，应在无乙醇蒸发的环境中操作。

【参考值】

不饮酒者血和尿中检测不出乙醇。

【临床意义】

1）诊断急性乙醇中毒：有饮酒史，呼出气中有乙醇，眼球震荡，语言不清，痛觉反应减弱，动作不协调，情绪抑郁，加上血、尿样品中检出高浓度乙醇，即可明确诊断。

2）协助司法鉴定：判断酒后驾车的唯一证据是当事者血中或呼出气中查出超过法定允许的乙醇浓度。

当事者神经病变随血液中乙醇含量的增高而产生，当血液中乙醇含量为0.5～1.0g／L（10.9～21.8mmol／L）时，出现语言不清，走路蹒跚的情况；大于2.5g／L（54.5mmol／L）时对外界反应降低，大于4g／L（87.2mmol／L）时出现昏迷，体温下降以致死亡。

第九节　血清吗啡测定

海洛因、吗啡和可待因等鸦片类毒品是罂粟胶质的提取物或衍生物。海洛因和可待因在体内经过代谢可以转变成吗啡及吗啡代谢物（吗啡葡萄糖－3－醛酸苷、吗啡葡萄糖－6－醛酸苷、6－单乙酰吗啡）。吗啡（morphia）测定方法分两类：一类以免疫分析为基础的分析方法如放射免疫分析、酶免疫分析、荧光偏振免疫分析及各种快速免疫试验；另一类为色谱法，常用的有薄层层析、高效液相色谱、气相色谱及气相色谱／质谱联用法（GS／MS）。快速免疫试验如斑点金免疫层析法由于检测速度快，反应灵敏而被广泛应用于初步筛选检查，GS／MS 联用为吗啡测定参考方法。

一、斑点金免疫层析法

【原理】

吗啡被包被在纤维膜上，当尿液中不含吗啡时，红色的金标抗吗啡抗体随尿液从膜上流过，被包被在膜上的吗啡捕获，以致在检测区形成红色带；当尿液中含有吗啡时，尿液中的吗啡和被包被在膜上的吗啡与金标抗吗啡抗体发生竞争性结合反应；当尿中吗啡含量达到一定浓度时，金标抗吗啡抗体被尿中吗啡完全结合，无法被包被在膜上的吗啡捕获，以致在检测区不能形成红色带。

【试剂】

1）吗啡胶体金检测盒。其中组成如下：胶体金标记的抗吗啡抗体；吗啡；多层吸水填料；硝基纤维薄膜；附有加样孔、测试区、对照区的塑料板。

2）校准品。

【操作】

参照试剂盒说明书操作，一般步骤如下：

1）将待测样品的号码记录在检测盒上。

2）吸取尿液约0.2ml，滴人检测盒的加样孔中。

3）加入尿液后，须在3～8min 内读结果。

【结果判断】

阴性：显示两条红线，T 线为测试线，C 线是对照线；阳性：显示一条对照线，测试线不显示。

【注意事项】

1）检测盒、被测样品或校准品应恢复至室温后才能打开检测盒的密封袋。

2）阳性结果仅提示药物及代谢物的存在，并不表示中毒。

3）非常弱的测试线表示被测样品中吗啡含量接近临界浓度，须复查或用其他方法检测后才能确认为阳性。

4）在纤维膜的对照区，如有红色带形成标志，表示尿液的用量合适，尿液在检测盒中流动正常，否则，该检测盒的检测结果无效。

5）结构上与吗啡有关的化合物达到一定的浓度可使检测结果呈假阳性，如可待因、乙基吗啡、二氢吗啡酮、羟氢可待酮、杜冷丁、吗啡葡萄糖醛酸酐。咖啡因等超过一定浓度也会导致检测结果假阳性。

6）本试验只能作为吗啡初步筛检试验。

二、放射免疫分析法

【原理】

^{125}I－吗啡和样品中吗啡与抗吗啡抗体发生竞争性结合反应。反应平衡后将游离型与结合型^{125}I－吗啡分离，检测各反应管的结合部分（B）放射性活度。查校准曲线，求出样品中吗啡含量。

【试剂】

吗啡校准品、抗吗啡抗体、^{125}I－吗啡、免疫分离剂（PEG＋二抗）。

【操作】

根据试剂盒说明书操作，一般步骤如下：

1）按试剂说明准备待检标本及吗啡校准品。

2）将标本（稀释或不稀释）、^{125}I－吗啡、抗吗啡抗体及PBS加入反应管中，充分混匀，置35～37℃下温浴30min或室温1h。

3）加入免疫分离剂，混匀，室温放置15min，3000r/min离心10min，弃上清液。

4）用γ计数仪检测各反应管的结合部分（B）放射性活度。

【计算】

以校准品吗啡浓度为横坐标，B/B_0为纵坐标，制作校准曲线。在此曲线中查出各待测标本中的吗啡含量。

【注意事项】

1）本法也适用于尿液、毛发中的吗啡测定。尿液标本易得，吗啡及其代谢物含量高，易于检出。由于吗啡类毒品代谢较快，尿、血标本宜尽早采取。

2）毛发标本的制备：剪取根部毛发样品约50mg，用1ml中性洗涤剂洗涤1次，再用蒸馏水冲洗3次。洗净后，烤干，剪碎，加入0.1mol/L氢氧化钠溶液1ml，置于45℃过夜（>18h），然后用1mol/L盐酸0.1ml中和，再加入1mol/L的磷酸盐缓冲液（pH7.5）0.9ml，总体积为2ml。

3）本法检测血清吗啡的灵敏度为0.4μg/L，可测范围0～640μg/L。

【参考值】

健康成人血清吗啡含量为5.2～12.9μg/L（18.2～5.2nmol/L），毛发吗啡含量为0～0.056μg/g（0～0.20nmol/g）。

【临床意义】

吗啡类药物和吗啡类毒品具有止痛、镇静和麻醉作用，有成瘾性，可导致生理上耐受、心理上依赖。超剂量使用将导致呼吸性中毒（延髓呼吸中枢抑制），大剂量使用导致心肺衰竭而死亡。测定血、尿或毛发中吗啡、可待因、6－单乙酰吗啡等含量可用于吸毒者毒瘾严重程度和脱毒疗效评定，或作为确认吸毒嫌疑人吸毒的证据。

第十章　尿液生化定量检测

尿液的生成过程包括肾小球的滤过，肾小管的重吸收和肾小管、集合管的排泌3 个部分。机体新陈代谢过程中产生的代谢终产物，多余的水、无机物及药物、异物经血液循环，主要通过肾脏，从尿中排出。肾脏的基本功能包括四个方面：排泄体内代谢产物如尿素、肌酐、尿酸、肌酸和药物、毒物；重吸收体内所需物质如蛋白质、氨基酸、糖；调节水、电解质、酸碱平衡；分泌某些激素如肾素、促红细胞生成素、羟化的维生物D_3，因而具有内分泌功能。由于从肾脏滤过、重吸收及排泌的物质较多，而且随机体的情况及疾病程度不同而上述物质随之改变。所以尿液生化成分的定量检测，不但对肾脏疾病的诊断，而且对全身其他疾病的诊断和治疗，有着重要的临床应用价值。

第一节　尿电解质测定

一、尿钠及钠排泄分数测定

【测定方法】

详见血清钠测定。

钠排泄分数（FeNaN）是指肾小球滤过的钠经肾小管吸收后由肾脏排出的比例。

$$FeNa = \frac{尿钠/血钠}{尿肌酐/血肌酐} \times 100$$

式中尿钠和血钠的单位为mmol/L，尿肌酐和血肌酐的单位为μmol/L。

【参考值】

尿钠排泄量：130～260mmol/24h；FeNa：无参考值（在不同疾病状况下表现相反）。

【临床意义】

肾脏对钠的重吸收65%位于近曲小管。故尿钠浓度可作为评估肾小管坏死程度的指标。尿钠排泄量与细胞外液的量和肾小管重吸收的能力密切相关。

尿钠排泄增多：急性肾小管坏死时，肾小管功能受损，不能很好地重吸收钠，故尿钠排泄增多。此外，严重肾盂肾炎、肾上腺皮质功能不全、垂体后叶功能减退如尿崩症、糖尿病、应用利尿剂治疗后等尿钠排泄均增多。

尿钠排泄减少：肾前性急性肾功能衰竭，由于血流量灌注不足，肾小管功能未明显受损，故肾小管能最大限度地重吸收钠，以维持血容量，因而尿钠排泄量明显下降。肾上腺皮质功能亢进如库欣综合征、原发性醛固酮增多症，由于皮质激素的保钠排钾作用，导致肾小管对钠的重吸收增加，尿钠排泄减少。

FeNa 在急性肾小管坏死时由于钠重吸收减少，尿钠排泄增加，而尿肌酐排泄减少，血肌酐增加，使FeNa >1。而肾前性急性肾功能衰竭时FeNa <1。故尿钠排泄量测定对鉴别肾性和肾前性急性肾功能衰竭有重要意义。

二、尿钾测定

【测定方法】

详见血清钾测定。

【参考值】

尿钾排泄量：25～100mmol/24h。

【临床意义】

尿钾排泄增加：见于肾上腺皮质功能亢进，特别是醛固酮增多症。使用利尿剂和皮质激素后尿钾排泄增加，碱中毒时尿钾排泄亦明显增多。此外，肾脏疾病如肾小管酸中毒、范可尼综合征、急性肾小管坏死的利尿性恢复期等，尿钾排泄均增加。

尿钾排泄减少：见于肾上腺皮质功能减退和酸中毒。严重急性肾小球肾炎、肾盂肾炎、末期肾硬化、肾外尿毒症等合并尿量减少时尿钾排泄减少。长期腹泻及常服泻剂后尿钾排泄也降低。

三、尿钙、尿磷测定

【测定方法】

尿钙测定详见血钙测定，尿磷测定详见血磷测定。必要时，根据选用方法的线性范围，对标本作适当稀释。

【参考值】

尿钙排泄量：1.0～7.5mmol/24h（40～300mg/24h），随饮食不同变化较大，一般饮食时<6.25mmol/24h（250mg/24h），高钙饮食时可达10mmol/24h（400mg/24h）。

尿磷排泄量：硫酸亚铁还原法测定为16.14～41.98mmol/24h（0.51～1.33g/24h）；硫酸亚铁铵还原法测定为成人12.92～8.43mmol/24h（0.41～1.50g/24h），儿童16.14～27.45mmol/24h（0.50～0.85g/24h）。尿磷的排泄量与饮食中磷的摄入量有关。

【临床意义】

1．尿钙

（1）尿钙增高：见于甲状旁腺功能亢进、癌肿骨转移、维生素D 过多症、大量摄

入氯化钠所致的近曲小管对钙的重吸收减少而使尿钙排泄增加以及代谢性酸中毒、高蛋白、低磷饮食。此外，某些药物如代谢快速的营养素葡萄糖、蔗糖、乙醇可抑制肾小管对钙的重吸收而使尿钙排泄增加。某些利尿剂如呋噻米（速尿）、布美他尼等亦可使尿钙增加。

（2）尿钙降低：见于甲状旁腺功能减退、乳糜泻、佝偻病、尿毒症等；代谢性磷中毒或输注碳酸氢钠或柠檬酸钾时，由于增加了肾远曲小管对钙的重吸收，故尿钙排泄量减少；噻嗪类利尿剂也能增加远曲小管对钙的重吸收，而使尿钙降低。

2．尿磷

（1）尿磷增加：见于甲状旁腺功能亢进症、范可尼综合征、代谢性碱中毒等。

（2）尿磷降低：见于甲状旁腺功能减退症、佝偻病、乳糜泻、肾功能衰竭、伴有酸中毒的肾炎。

第二节　尿葡萄糖和非蛋白含氮化合物测定

一、尿葡萄糖测定

【测定方法】

详见葡萄糖测定。定量测定前最好先做定性试验。估计尿糖浓度及稀释倍数，使其浓度在测定方法的线性范围之内。若尿糖定性为＋的标本可不稀释，＋＋者将尿液用去离子水稀释5 倍，＋＋＋者稀释10 倍，＋＋＋＋者稀释25 倍。

【参考值】

尿糖浓度：＜0.56ｍｍol／Ｌ（10ｍg／dl）；尿糖排泄量：0.56～1.67ｍｍol／24h。

【临床意义】

尿糖排泄量与血糖浓度有关。当血糖浓度超过肾糖阈（一般为8.88ｍｍol／Ｌ，即160ｍg／Ｌ）时，尿液中就会出现葡萄糖。生理性尿糖见于进食大量糖后出现的饮食性糖尿和情绪激动或注射肾上腺素后出现的精神性糖尿。病理性尿糖见于糖尿病和肾糖阈下降所致的肾性糖尿。

二、尿尿酸测定

【测定方法】

详见血尿酸测定。测定前可将尿样用去离子水作1∶10 稀释。用尿酸酶法测定时，尿中如存在高浓度的维生素C 可使检测结果偏低，试剂中含有维生素C 氧化酶则能去

除干扰。

【参考值】

尿尿酸排泄量：1.5～4.4mmol/24h（25.21～73.5mg/4h）

【临床意义】

尿酸是嘌呤类物质的代谢终产物，主要由肾脏排泄，在肾小球滤过后，90％由肾小管重吸收。

1）尿尿酸增高：由核酸分解代谢过盛引起，如慢性白血病、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症及食人过多含核蛋白、核酸的食物后。此时血尿酸增高，但肾功能正常。

2）尿尿酸降低：见于各种慢性肾脏疾病、充血性心功能不全（肾血流量减少，肾小球滤过率降低）、高血压所致的肾小球滤过率下降。此外，应用噻嗪类利尿剂后可抑制肾小管分泌尿酸，使尿尿酸降低。此类患者血尿酸增高。

三、尿尿素和肌酐测定

【测定方法】

1）尿尿素：同血尿素测定，尿标本作适当稀释。用尿素酶水解后氨显色法或再偶联其他的酶，通过测氨的生成量来计算尿素的含量时，要减去尿素酶作用前的尿氨含量。

2）尿肌酐：同血肌酐测定，尿标本作适当稀释。

【参考值】

尿尿素排泄量：720～1080mmol/24h（10.08～15.12g/24h）；尿肌酐排泄量：男性7～18mmol/24h（79.2～203.6mg/24h），女性5.3～16.mmol/L（6.0～181.mg/24h）。

【临床意义】

1）尿尿素：增高常见于高热、甲状腺功能亢进症、大面积烧伤、创伤、上消化道出血、肝脏疾病等；减少见于急性肾功能衰竭。

2）尿肌酐：增高常见于破伤风、伤寒、斑疹伤寒、消耗性疾病、皮肌炎等，其次是甲状腺功能减退、肢端肥大症、巨人症、糖尿病；降低见于肾功能不全、白血病，肌萎缩。尿肌酐常与血肌酐同时测定，用于计算内生肌酐清除率，评价肾小球滤过功能。由于尿中肌酐的排泄量较恒定，当肾功能损伤不严重时，尿中的肌酐排泄量与其他尿中被测物质一样，同时受尿浓缩或稀释影响，故尿中肌酐浓度测定常用作尿中其他物质排泄的参照物。

四、尿肌酸测定

详见本篇第七章第四节尿液肌酸测定。

第三节　尿蛋白测定

一、总蛋白测定

详见本篇第二章第五节尿液总蛋白测定。

二、微量白蛋白测定

详见第五篇免疫学检验第三章人体特定蛋白测定。

第四节　内生肌肝清除值测定

详见本篇第七章内生肌酐清除值测定。

第五节　肾小管功能试验

一、尿渗透浓度测定

【测定方法】

液体中渗透浓度是由溶液中溶质的摩尔浓度决定的，尿液渗透浓度反映尿液中溶质的摩尔数。尿液渗透浓度比尿相对密度更能反映肾脏的浓缩和稀释功能。

尿液渗透浓度测定多采用冰点下降法。溶液的渗透浓度增加，可使其冰点下降。1渗透摩尔浓度溶质可使1L 水的冰点下降1.858 ℃，因此，溶质渗透浓度等于冰点下降数除以1.858 。

【参考值】

600 ～1000 mmol/L 。

【临床意义】

(1) 可灵敏地反映肾脏的浓缩稀释功能。其测定结果不受尿蛋白质和糖的影响，优于尿相对密度测定。

(2) 与同时测定的血浆渗透浓度比较，高于血浆渗透浓度称高渗尿，低于血浆渗透浓度称低渗尿。若与血浆渗透浓度相等，则为等渗尿，反映肾脏浓缩功能严重受损。

二、渗透溶质和自由水清除率测定

【测定方法】

自由水清除率（C_{H_2O}）是指单位时间内尿液达到等渗时，应从尿中减去或加入的纯水量。尿稀释时，排出的尿量等于等渗透尿量加上血浆中清除的纯水量。尿浓缩时，排出的尿量等于等渗透尿量减去被总吸收的纯水量。等渗尿量实际上就是渗透性溶质清除率，又叫渗量清除率（C_{osm}），它表示单位时间内肾脏能将多少毫升血浆中的渗透性溶质清除出去。

$$C_{osm}=\frac{U_{osm}}{P_{osm}}\times V$$

式中U_{osm}为尿渗透浓度；P_{osm}为血浆渗透浓度；V 为单位时间尿量（ml/min）。由于 V = $C_{osm}+C_{H_2O}$，因此

$$C_{H_2O}=\left(1-\frac{U_{osm}}{P_{osm}}\right)\times V$$

式中C_{H_2O}表示自由水清除率，反映肾脏的浓缩稀释功能。

【参考值】

C_{H_2O}：−25～−100ml/h。

【临床意义】

自由水清除率表示肾脏的浓缩稀释功能。当C_{H_2O}等于或接近于0，表示肾功能严重受损。急性肾功能衰竭早期C_{H_2O}趋于0，C_{H_2O}呈现负值大小可反映肾功能恢复程度。

三、酸负荷试验

【原理】

患者口服一定量的酸性药物氯化铵，从而人为地使机体产生酸血症，增加肾脏远曲小管排泌H^+的负荷。通过测定服药前和服药（0.1g/kg 体重氯化氨剂量，60min 内服完）后第1h、2h 尿液的pH 值、碳酸氢根离子浓度、尿液可滴定酸（titratable acidity，TA）浓度和铵离子浓度，同时测定血液标本的pH 值、碳酸氢根离子及氯离子浓度，来判断肾小管的排泌氢离子及铵离子的能力。或嘱患者每天按0.1g/kg 体重的剂量口服氯化铵3～4 次，连服3d 后，分别留取服药前1d 的尿液及服药后3d 的尿液共4 次，测定各次尿液的pH 值、TA 浓度和铵离子浓度。

【测定方法】

尿液可滴定酸测定：先测尿液pH 值，在磁力搅拌器下用自动滴定仪作酸碱滴定，取尿液1.0ml 为测定管，另取1.0ml 不含二氧化碳去离子水作空白管，用0.1mol/L 氢氧

化钠溶液滴定2 管至pH 为7.4，记录所消耗的0.1mol/L 氢氧化钠溶液的毫升数。

TA 浓度（mmol/L）＝（测定管消耗0.1mol/L 氢氧化钠溶液的毫升数－空白管消耗0.1mol/L 氢氧化钠溶液的毫升数）×100 式中100 为换算TA 浓度（mmol/L）的系数。

血浆和尿液pH 值、碳酸氢根离子及氯离子浓度可用血气分析仪和离子选择性电极法进行测定，碳酸氢根离子浓度也可采用酶法用自动生化仪测定。血浆和尿液铵离子浓度可采用酶法或化学比色法测定。

【参考值】

1）短程法：健康人服用氯化铵后，一般2h 尿液pH <5.3，此时可以停止试验。TA 为7～21μmol/min，铵排泄量30～50μmol/min。血浆碳酸氢根离子及氯离子浓度的改变不超过6mmol/L。

2）长程法：服药后尿PH <5.0，铵离子排出量增加，TA 的排泄量应比服药前增加120mmol/24h。

【临床意义】

正常人每天代谢产生的非挥发性酸，通过肾脏对碳酸氢离子的重吸收，产生铵离子排泄氢离子及对肾小管尿缓冲盐的酸化作用，从尿中排出，从而维持体内的酸碱平衡。肾小管酸中毒时，肾脏对尿液的酸化功能障碍。

口服氯化铵时，增加了对肾脏排铵离子泌氢离子的负荷。Ⅰ型肾小管酸中毒时，由于肾小管不能对额外的酸性负荷加以处理，因而血液pH 值下降而尿液pH 值却无相应下降。

Ⅰ型肾小管酸中毒各次尿液pH 均>5.5，血浆碳酸氢根离子浓度<26mmol/L，尿碳酸氢根离子的排泄分数（尿碳酸氢离子/血浆碳酸氢离子浓度）<0.05。

氯化铵负荷试验仅适用于无全身性酸中毒表现的不典型或不完全型Ⅰ型肾小管酸中毒患者。对口服氯化铵不能耐受的患者，如肝病者，可用氯化钙负荷试验。同理，硫酸盐负荷试验或碳酸氢盐负荷试验可鉴别诊断其他类型的肾小管酸中毒。

四、尿β2－微球蛋白测定

β2－微球蛋白（β2－microglobulin，β2－MG）是一种分子量仅为11800u 的小分子量蛋白，作为人类白细胞抗原的轻链成分以共价键形式与重链结合，存在于几乎所有的有核细胞表面。由于β2－MG 分子量较小，可自由通过肾小球滤过膜，并且在近端肾小管几乎被全部重吸收（吸收率达99.2％）。

【测定方法】

测定β2－MG 的方法较多。目前应用较广泛的有放射免疫分析法、酶联免疫吸附试

验、化学发光免疫分析法、免疫散射比浊法及颗粒增强的免疫散射比浊法。此外，还有免疫透射比浊法、时间分辨荧光免疫分析法。环状免疫扩散法由于灵敏度较低已很少应用。在众多的分析方法中，由于检测灵敏度高低不一，有的仅适用于血清测定，不能用于β_2－MG 浓度较低的尿液标本及其他体液标本测定。目前测定尿β_2－MG 常用的方法主要有放射免疫分析法、免疫散射比浊法、化学发光免疫分析法等。

尿液中的β_2－MG 在pH ＜5.5 时很不稳定，可能由于尿中存在酸性蛋白酶，可分解β_2－MG 之故。故尿液标本不能采用清晨第一次尿或24h 尿，因其在膀胱内或体外放置时间过长，β_2－MG 已分解。理想的标本应是患者清晨排尿后，饮300～500ml 水后收集1h 的全部尿液或随意尿。取得尿标本后应立即测试pH 值，如pH ＜6，应加氢氧化钠溶液校正至中性。如确需收集24h 尿，应嘱患者在收集标本前1d 服用碳酸氢钠等碱性药物，使尿pH ＞6。pH 调整后的尿标本在4℃可保存4 周，－70℃可保存2 年，但应避免反复冻融。

作β_2－MG 清除率测定，需同时测定血和尿中的β_2－MG 浓度以及收集的尿量和时间［计算尿液流速（ml－min）］。然后按下列公式计算。

$$\text{尿液}\beta_2\text{－MG 清除率}=\frac{\text{尿液}\beta_2\text{－MG 浓度（mg/L）}}{\text{血液}\beta_2\text{－MG 浓度（mg/L）}}\times\text{尿液流速（ml/min）}$$

【参考值】

尿液β_2－MG 的参考值随检测方法和尿标本留取的方法不同而有很大的波动。成年人尿β_2－MG 的排泄量随年龄增长而增加，可能与肾小管功能的逐渐衰退有关。随意尿（放免法）（0.91 ±0.68）mg/L。

【临床意义】

1）肾小管性蛋白尿的诊断与鉴别诊断：尿液β_2－MG 升高是反映近端肾小管功能受损的非常灵敏和特异的指标。近端肾小管是体内重吸收并进行分解代谢的部位。当肾小管重吸收功能障碍时，尿中β_2－MG 排泄量明显增加，此称为肾小管性蛋白尿。除尿β_2－MG 增加外，常伴随α1 微球蛋白、溶菌酶和视黄醇结合蛋白等小分子量蛋白质排泄增加，尿Tamm－Horsfall 蛋白分泌下降，尿总蛋白在1g/24h 以下。引起肾小管性蛋白尿的疾病有：肾盂肾炎、抗生素肾中毒及其他药物引起的肾小管中毒、范可尼综合征、胱氨酸尿症、肾小管酸中毒、胶原病等。

2）鉴别上、下泌尿道感染：上泌尿道感染患者尿液β_2－MG 明显增多，而下泌尿道感染患者则基本正常。

3）判断肾移植术后的排异反应：在急性排异期或出现排异数天前，尿β_2－MG 明显增多。

4）其他疾病：在恶性肿瘤、自身免疫性疾病及高血压、糖尿病肾病时，尿中的β_2

－MG 可明显增多。

第六节　尿酶检测

【测定方法】

正常人尿液中的酶含量极少。尿液中的酶主要有以下三种来源：

1）血液：血液中存在的低分子量的酶如淀粉酶、溶菌酶，可从肾小球滤过出现于尿液中；

2）肾实质：存在于肾小管刷状缘的酶如γ－谷氨酰转移酶、碱性磷酸酶、丙氨酸氨基肽酶、亮氨酸氨基肽酶、α葡萄糖苷酶；存在于溶酶体的N －乙酰－β－D 氨基葡萄糖苷酶（NAG）、酸性磷酸酶及β葡萄糖醛酸苷酶等；存在于胞浆的乳酸脱氢酶和存在于线粒体的天冬氨酸氨基转移酶；

3）尿路及生殖系统：如前列腺的酸性磷酸酶，精液中的乳酸脱氢酶等。

在目前已知的40 多种尿酶中，对肾脏疾病较有诊断价值的尿酶约有10 多种。主要有乳酸脱氢酶、碱性磷酸酶、亮氨酸氨基肽酶、NAG 、β葡萄糖醛酸苷酶、γ－谷氨酰转移酶、丙氨酸氨基肽酶、溶菌酶等。测定方法详见本篇第四章。由于尿液与血浆标本不同，必要时应对尿液标本作预处理。常用的方法包括：用酸或碱纠正尿液pH 至中性；用透析法、凝胶过滤法和超滤法去除尿液中高浓度的低分子量物质如尿素、尿酸、肌酐、硫酸盐、磷酸盐，以及疾病时出现在尿中的葡萄糖和治疗药物等干扰。

尿酶测定的报告方式：尿标本易受浓缩或稀释的影响，因此，尿酶测定结果常以与尿肌酐的比值表示。但由于尿肌酐的排泄量因不同个体肌酐的产生量及同一个体肾小球滤过量而异，故采用尿酶排泄量的方式报告更具可比性。目前由于标本收集时间长，尿酶活性易受影响，故仍采用与尿肌酐比值的形式报告。

【参考值】

尿丙氨酸氨基肽酶：（1.75 ±4.19）U／g·Cr，尿亮氨酸氨基肽酶：（6.54 ±2.71）U／g·Cr，尿NAG ：（3.86 ±1.65）U／g·Cr，尿γ－谷氨酰转移酶：（15.2 ±7.5）U／g·Cr，尿碱性磷酸酶：（4.24 ±1.62）U／g·Cr。

【临床意义】

1）在各种肾脏疾病如急性肾炎、慢性肾炎、肾盂肾炎、慢性肾功能不全、肾病综合征时尿NAG 、丙氨酸氨基肽酶、碱性磷酸酶和γ－谷氨酰转移酶均可不同程度增多。

2）在糖尿病肾病、高血压肾病、抗生素和其他药物致肾中毒等继发性肾损害时，上述尿酶均可增多。

3）肾移植出现排异时，尿溶菌酶、NAG、γ－谷氨酰转移酶、β葡萄糖醛酸苷酶可明显增多。

第七节　尿液个别蛋白测定

一、尿α1－微球蛋白测定

α1微球蛋白（α1microglobulin，α1－MG）是一种分子量约为26000～33000u的糖蛋白，由肝脏产生。存在于血中的游离型α1－MG能通过肾小球滤过膜，大部分被肾小管重吸收。由于尿中α1－MG不受pH值影响，因此，在肾脏疾病诊断中具有重要临床应用价值。

【测定方法】

尿α1－MG的测定方法较多，较常用的有放射免疫分析法、酶联免疫吸附试验和免疫散射比浊法。详见第五篇第三章α1－MG的测定。α1－MG在pH4～8、4℃时可稳定1周，pH5.0以上的尿液在25℃仍可稳定4d，因此，尿标本可采用24h尿、晨尿或随意尿。

【参考值】

放射免疫分析法：2.8～7.6mg/L；免疫散射比浊法：<12.5mg/L。

【临床意义】

1）肾功能损伤的早期诊断：α1－MG作为低分子量蛋白质，在肾小管性蛋白尿、肾小球性蛋白尿和混合性蛋白尿患者，排泄量均明显增加。故在肾小球肾炎、肾功能不全、高血压、糖尿病和抗生素及其他药物引起的肾脏损害中，尿中α1－MG均可增加。

2）鉴别诊断上泌尿道与下泌尿道感染、肾性与肾后性血尿和蛋白尿：在上泌尿道感染、肾性血尿和蛋白尿时，尿α1－MG均明显增多。反之，下泌尿道感染及肾后性血尿和蛋白尿时，尿中α1－MG无明显增多。

二、尿转铁蛋白测定

【测定方法】

尿转铁蛋白（transferrin，Tf）常用免疫散射比浊法和酶联免疫吸附试验测定。

【参考值】

酶联免疫吸附试验：<1.0mg/L或<0.112mg/mmol·Cr；

免疫散射比浊法：0.01～0.27mg/mmol·Cr。

【临床意义】

Tf 和白蛋白一样，均属于小分子带负电荷蛋白。前者分子量为77000，分子直径为3.8nm，后者分子量为66000，分子直径为3.6nm。虽然Tf 分子量略大于白蛋白，但所带的负电荷明显小于白蛋白。由于漏出肾小球基底膜的蛋白质除了要受基底膜网孔大小屏障的影响外，还要受到电荷屏障的影响。肾小球基底膜上存在大量带负电荷的蛋白，如硫酸肝素糖蛋白、唾液酸等，可阻止带负电荷的循环蛋白从肾小球滤过。糖尿病肾病早期，肾小球基底膜电荷屏障功能减退早于裂孔大小屏障，故带负电荷少的Tf 比白蛋白更容易被肾小球滤过。因此，对糖尿病早期肾病的预测，尿Tf 比微量白蛋白更敏感。在高血压肾病时，尿Tf 也可显著增加。

Tf 作为中分子蛋白，常用作尿蛋白选择指数的计算指标。在急性肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎、慢性肾功能不全等疾病中，尿Tf 可升高。

三、尿液免疫球蛋白G 测定

由于免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）分子量较大，不能自由通过肾小球滤过膜，故尿中IgG 含量很低，几乎检测不到。

【测定方法】

测定尿中IgG 常用的方法有免疫散射比浊法、酶联免疫吸附试验和放射免疫分析法。

根据同时测定的血、尿IgG 和白蛋白或转铁蛋白的数值，可接下式计算尿蛋白的选择指数（selective poteinuria inder，SPI）：

$$SPI=\frac{尿IgG/血IgG}{尿Tf/血Tf}\quad 或\quad SPI=\frac{尿IgG/血IgG}{尿Alb/血Alb}$$

式中Tf 表示转铁蛋白浓度，Alb 表示白蛋白浓度，IgG 表示IgG 浓度。

【参考值】

尿IgG（免疫散射比浊法）：<17.5mg/L，SPI <0.1 为选择性蛋白尿，SPI >0.2 为非选择性蛋白尿。

【临床意义】

尿IgG 升高或SPI >0.2，为非选择性蛋白尿，表明肾小球的滤过功能已明显受损，预后大多不良。尿蛋白的选择性判断有助于肾病综合征的临床分型。I 型肾病综合征的病理类型属轻微病变型，其病理损害程度、治疗效果及预后均比II 型好。I 型肾病综合征多为选择性蛋白尿，而II 型大多为非选择性蛋白尿。

四、尿蛋白电泳

【测定方法】

尿蛋白电泳的测定方法有醋酸纤维薄膜电泳、十二烷基硫酸钠－聚丙烯胺凝胶电泳

SDS－PAGE）、十二烷基硫酸钠－琼脂糖凝胶电泳（SDS－AGE）及二维尿蛋白电泳（ISODalt 电泳）。醋酸纤维薄膜电泳操作方法详见血清蛋白电泳。该法操作简单，但需要将尿液标本作浓缩处理，且不能按照蛋白质的分子量大小进行分离。SDS－PAGE 虽能按蛋白质分子量大小分离，但方法繁琐、费时，不适用于临床实验室广泛开展。ISO－Dalt 电泳是将尿蛋白先进行等电聚焦电泳后，再在同一膜片上以垂直方向进行SDS－PAGE 电泳，利用蛋白质的等电点和分子量不同进行分离，分辨率明显高于单纯的SDS－PAGE 电泳，但操作复杂，临床应用也不广。SDS－PAGE 电泳则按照蛋白质分子量不同予以分离。以尿蛋白最多的成分白蛋白为界限，比白蛋白分子量小的蛋白质如轻链双聚体、α_1 微球蛋白、视黄醇结合蛋白、游离轻链、溶菌酶、β_2 微球蛋白等和比白蛋白分子量大的蛋白质如转铁蛋白、IgG、IgA、结合珠蛋白、α_2 巨球蛋白、IgM 等分别在白蛋白的两侧，可清晰显示低、中、高分子量蛋白质的分离区带。SDS－AGE 法可代替SDS－PAGE，且有自动化电泳仪和相应的商品化试剂盒供应。

【参考值】

SDS－PAGE 电泳：肾小管性或溢出性蛋白尿仅出现低分子量蛋白质分离区带，肾小球性蛋白尿出现比白蛋白分子量更大的蛋白质分离区带，混合性蛋白尿出现低、中、高分子量的蛋白质分离区带。

【临床意义】

有助于肾病综合征的临床分型和蛋白尿的病因诊断；在肾损伤情况下，可为临床判断肾损伤的部位及程度提供依据。

第十一章　临床生化检验的质量控制

有关临床实验室的质量管理总的要求已在第一篇第二章中述及，本章主要论述有关临床化学的室内质量控制，即临床化学分析中统计学质量控制的有关理论基础和操作方法。

第一节　实验室误差和几个有关的概念

一、误差的分类

误差是指被测物的测定值与其真值的不符合性。尽管实验的分析方法相当准确，仪器亦很精密，试剂质量很好，操作者的技术很熟练，但都不能使测定值完全与真值相符，即使对同一标本作多次重复测定，所得的结果也不会完全相同。因此，实验中的误差是客观存在的，但是通过一些措施，可以降低误差的程度。

1．系统误差　(定向误差或恒定误差)

这种误差的表现是一系列测定结果与靶值有同一倾向的偏离，包括恒定误差和比例误差。引起系统误差的原因往往比较固定，可在一定的条件下重复出现，因此，如能找出原因，就比较容易消除。系统误差的原因常见有：

1) 方法学原因：各种测定方法都有其固有的误差。

2) 仪器的原因：波长漂移、温度控制失准、标本或试剂的吸量不准、携带污染等。

3) 试剂的原因：配方不合格、稳定性差、成分不纯、校准品定值失误、参数设定错误等。

4) 个人操作误差：技术水准、视觉误差、任意更改操作条件或参数等。

2．随机误差　(偶然误差)

常以偶然的、不可预料的形式出现，误差大小或正负不固定，无重复性但有正态分布的规律。发生随机误差的原因要比系统误差复杂得多，查找或消除也就较为困难。随机误差的常见原因有：

1) 实验室环境原因：电源或电压波动、分析用水的水质、保温与测定仪器突发故障、室内温度较大改变等。

2) 操作人员原因：频繁换人、改变分析参数、处理标本不当等。

3）仪器和试剂原因：分析仪器的不稳定因素（随机性漂移）、样品针、试剂针与反应杯存在交叉污染，试剂的瓶间差、更换试剂或校准品批号、仪器参数变动、仪器管道有气泡、吸样针的阻塞等。

4）标本原因：患者准备与标本采集不符合要求、标本输送与留置过程偶然失控、溶血或药物的影响等。

二、几个与质量控制有关的术语

1．最佳条件下的变异（optimal conditions variance，OCV）

表明本室在目前条件下该项目检测所能达到的最好精密度水平，是本室工作水平的基础指标。在开展某项目的常规室内质控之前，或检测方法、试剂、仪器等发生重大改变时，有必要进行OCV 的测定。OCV 测定的基本原则是应用实际工作相同的分析方法，包括试剂和仪器，但将各种条件都控制在最好的状态，然后按测定精密度的方法操作，OCV 的计算也与CV 的计算公式相同。

OCV 主要用于以下方面：①对新的测定方法的评价，如OCV 不能达到某种要求，提示该方法的精密度不够。②常规质控有问题时复查OCV 以确定是测定系统的问题还是其他原因。③作为评价RCV 的参照。

2．常规条件下的变异（routine conditions variance，RCV）

表明本室在目前条件下该项目检测在常规工作中的精密度水平。RCV 与室内质控的关系密切，测定方法如同OCV，测定的条件处于日常工作水平。OCV 和RCV 测定的20 个数据不能在一天内完成，而且要求用20 瓶质控血清每瓶测一个数据。

RCV 主要用来为质控图提供基本的参数。

目前由于普遍应用分析仪器作自动分析，试剂多为商品化试剂，所以测定条件已不同于以前以手工方法为主的条件，OCV 与RCV 的分别已不如以前明显。

3．选定的变异系数（chosen coefficient variation，CCV）

CCV 来源于历次评价调查中某项目的最小的室间CV，反映众多的实验室对同一样品检测时的离散度，所以实际上是评价准确度的指标。CCV 由权威机构选定，一旦选定后，就作为常数不得轻易改变。CCV 主要用于目前生化室间质评中变异指数得分（VIS）的计算。另外MONICA 质控规则常以0.8CCV 和1.5CCV 作为告警限和控制限。

三、室内质量控制的质量指标

室内质控是保证检验质量的措施，但是室内质控本身也有一个质量的要求。有两个重要的指标用于评价一个质控方法的质量。

1．误差检出概率

缩写为P_{ed}，是检出方法固有误差之外的其他误差的能力，以概率（小数）或可能性（%）表示。理想值为1.00（或100 %），实际值＞0.90（＞90 %）即是良好的。

2．假失控概率

缩写为P_{fr}，指实际未失控而表现为（或判为）失控的可能性，以概率（小数）或可能性（%）表示。理想值为0.00（或0 %），实际值＜0.05（＜5 %）是可以接受的。

P_{ed}和P_{fr}两者有紧密联系，类似于灵敏度和特异性之间的关系。但是不同质控方法可能有不同的P_{ed}和P_{fr}，可以通过评价与验证，找到符合本实验室某个分析项目最合适的质控方法。

第二节　室内质量控制的统计学基础

临床化学测定一般是定量分析，临床化学的室内质控又称为统计学质控，它是应用统计学方法判断观察数据是否在控的质量控制系统，有别于总体质量控制系统中的其他成分如分析前、分析后的质控以及诸如预防性维护，仪器性能检查，计量仪器的检定，操作人员培训等等。这些不属于统计学质控。

一件工业产品可以用物理的直观的指标去评估质量是否合格，临床实验室的分析项目结果多为数据，谁也无法判定某一个数据是否准确，但是可以根据与这个数据有关的一组数据判断这个数据的质量，这里应用的是统计学原理，主要是正态分布和抽样误差的理论。

一、总体和样本

研究对象的全体成分称为总体，总体的范围可以非常大，实际中往往无法取得，所以是个理论上的概念。与总体相对的是个体即组成总体中的每一个单位，实际工作中只能从某个总体中取得一部分个体，后者称为样本。应用正确的统计学方法可以通过对样本的计算推断总体的情况。

二、均数、标准差与变异系数

1）样本均数：常用$\bar{x}$表示，是最常用的一个统计量，能集中反映一个样本的特性。一般有算术均数和几何均数两种，临床化学中常用的是算术均数，计算公式为：

$$\bar{x}=\frac{\sum_{i=1}^{n}x_i}{n}$$

即将样本中所有个体的值计总和后除以个体数。可以用计算器或电脑很方便地求得。

2）标准差：现以s 表示，也是一个基本的统计量，是表示变异的指标，反映样本中各个个体的离散程度，计算公式为：

$$s = \frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

表示标准差是各变量与均数之差（离均差）的平方和再平均后的平方根，实际操作中一般不用作复杂的手工运算，可以用有统计运算功能的计算器在输入各个变量后方便地得到s 值，或在电脑中应用统计函数求得。

3）变异系数：缩写符号为CV，也是表示变异的指标，在临床化学中十分常用，计算公式为：

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

即变异系数是标准差相对于平均数的大小，临床化学中用作指示不精密度。

4）概率：以符号p 表示，反映某一事物发生的可能性大小的量，必然发生的事件其p 值为1，必然不可能发生的事件其p 值为0，绝大多数情况下p 值介于0 和1 之间，指示可能性的大小。常用的两个判别指标是0.05 和0.01，$p < 0.05$ 一般指示发生的可能性很小，当$p < 0.01$ 时，可以说发生的可能性几乎没有了。在作抽样误差分析时，对应这两种情况的统计学术语是差别有显著性意义和非常显著性意义。

三、正态分布原理

正态分布又称高斯分布，表现为一条呈对称的钟形曲线。当一个样本作重复测定后，所有的数据不会全部是一样的，正常时这样一组数据的分布就呈正态的形状，可以得到一个平均数（$\bar{x}$）和标准差（s），以$\bar{x}$ 为中心，左右一个s（即$\pm 1s$）范围内正态曲线下所包含的面积约为全部面积的68%，也就是$\bar{x} \pm 1s$ 的数据点约占全部数据点的68%。$\bar{x} \pm 2s$ 的范围内包含约95%的数据点，$\bar{x} \pm 3s$ 的范围内包含约99.7%的数据点（图4-11-1）。

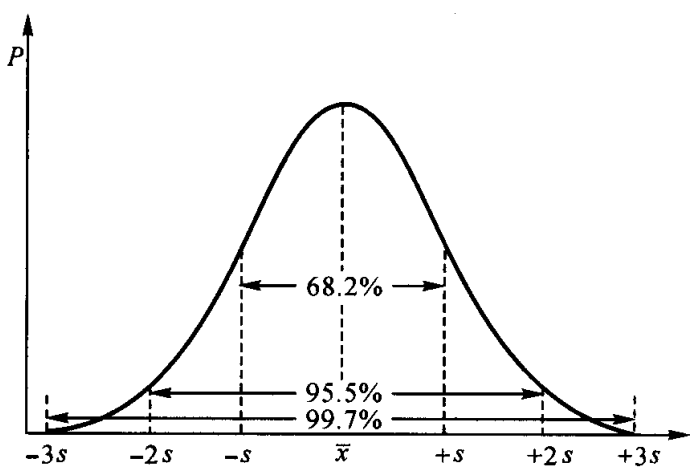


图4-11-1　正态分布曲线图

在这个正态分布曲线图上，均数 $\bar{x}$ 的大小不同，仅影响曲线顶部的高低，而标准差s 的大小仅影响曲线的宽度，所以不同 $\bar{x}$ 和s 形成的正态曲线的陡峭或平坦的程度是不一样的，但是上述的规律却是一定的。

在正常情况下，如果将一个质控品某个测定项目的多次测定值绘制成频数直方图，即以测定值为横坐标，以数据分布的频数为纵坐标，并将直方图的顶点平滑地连起来，所连成的曲线基本上与上图相似，表明质控值的分布符合正态分布的原理。我们正是在这一基础上进行室内质量控制工作的。

四、抽样误差原理

对同一个质控品作多次重复测定所得到的结果肯定不会都相同，也不会一定都与平均值相同，这个不同就是由抽样误差所引起的，即在同一个样本中抽样，会因抽样而致某种误差。抽样误差是事物固有的误差，不是人们可以消除的。所以如果得到一个质控结果与平均值（或靶值）不一致，就要判别所发生的误差是抽样误差还是其他误差，例如系统误差或随机误差。如果是由抽样误差所致，可以将这个结果判为在控，如不是抽样误差所致，就要判为失控。这个判别要由一个“无效假设”来做。就是先假设某一个质控结果与靶值的差异仅是由抽样误差引起的，而不是由其他真正的操作误差所致，但这还仅仅是一个假设。接下来就要根据统计学的原理来判断这个假设是否成立，如果判断“无效假设”成立，那么这个质控结果虽与靶值有差异但还是在控；如果判断引起差异的不是因为抽样误差，则这个“无效假设”不能成立，就要判为失控。如何判断呢？我们看这个质控值与靶值的差异有多大，如果差异＞±1s，但＜±2s，根据正态分布原理，则有约32％的可能性是抽样误差所致，这是一个很大的概率，所以这个无效假设成立，可将这个结果判为在控。如果差异＞±2s 而＜±3s，无效假设成立的可能性大约是5％，这个概率可以说是个临界概率，一般还是将这个差异判为抽样误差所致，否则会有较高的假失控可能性。当一个差异＞±3s 时，抽样误差所致的可能性＜0.3％，这时应该有很大的把握推翻无效假设，判断这个差异不是由于抽样误差所致，而是真正因为其他如系统误差等原因所致，可以判为失控。

第三节　常用质控规则及其质控图

一、均值－标准差质控图

均值－标准差（$\bar{x}$－s）质控图又称Levey－Jennings 质控图（L－J 质控图），是最早应用于临床实验室的质控图，也是应用最普遍的方法。其优点是简便、实用，可以使

用未定值的质控血清，有较为成熟的理论和方法，又是多规则质控图的基础。不足之处是在开始使用之前先要进行OCV 和RCV 的测定，使用不当时有可能达不到理想的p_{ed}，或会有较高的P_{fr}。

【操作方法】

(1) 测定OCV：选择一种合格的质控血清，可以是未定值的或是已定值的，将实验有关的因素如仪器、移液工具、试剂质量、操作人员等都调整在最佳状态下（见本章第一节），在4～5d 内，每天测4～5 瓶质控血清的值，每瓶测1 次，取得20 个数据，计算$\bar{x}$、s 和CV，此CV 值即为OCV。

(2) 测定RCV：与测定OCV 的操作相似，但是不强调在最佳状态下，而是处在与日常工作完全相同的条件下与待测标本一起进行测定，要求每天开1 瓶质控血清，只做1 个数据，连续测定20d，然后根据这20 个数据求得$\bar{x}$、s 和CV，此CV 即为RCV。RCV 应比OCV 大，但一般不超过2 倍。测OCV 和RCV 时得到的两个$\bar{x}$ 应基本一致。

目前临床化学分析广泛应用自动分析仪，自动分析仪一般都具有良好的精密度，因而OCV 与RCV 的区别已经不明显。另外，越是性能良好的自动分析仪其RCV 越小，而过小的RCV 会给L-J 质控带来不便，导致P_{fr} 增大。所以也推荐以美国CLIA'88（Clinical LaboratoryImprovement Amendment88）中的能力比对试验（PT）对分析项目的质量要求（见表4-11-1）作为总允许误差，以其可接受范围的1/4 作为1s，这样就可以不先测定RCV。

表4-11-1　美国CLLA'88 能力比对检验的分析质量要求

分析物或试验	可接受范围
对常规临床化学检测项目	
丙氨酸氨基转移酶	靶值±20%
白蛋白	靶值±10%
碱性磷酸酶	靶值±30%
淀粉酶	靶值±30%
天冬氨酸氨基转移酶	靶值±20%
胆红素	靶值±20%或靶值±6.84mmol/L（取大者）
血气PO_2	靶值±3s
血气PCO_2	靶值±8%或靶值±5mmHg（取大者）
血气pH	靶值±0.04
钙	靶值±0.25mmol/L（1.0mg/dl）

续表

分析物或试验	可接受范围
氯	靶值±5％
胆固醇	靶值±10％
高密度脂蛋白胆固醇	靶值±30％
肌酸激酶	靶值±30％
肌酸激酶同工酶	CK－MB 升高（存在或不存在）或靶值±3s
肌酐	靶值±26.5umol/L（0.3mg/dl）或±15％（取大者）
葡萄糖	靶值±0.33mmol/L（6mg/dl）或±10％（取大者）
铁	靶值±20％
乳酸脱氢酶	靶值±20％
乳酸脱氢酶同工酶	LD_1/LD_2（+或－）或靶值±30％
镁	靶值±25％
钾	靶值±0.5mmol/L
钠	靶值±4mmol/L
总蛋白	靶值±10％
甘油三酯	靶值±25％
尿素氮	靶值±0.71mmol/L 尿素（2mg/dl 尿素氮）或靶值±9％（取大者）
尿酸	靶值±17％

3）RCV 空图：取一张标准的L－J 质控图（图4－11－2），在图上方的各项目中填上单位、日期、试验项目、测定方法等有关内容，仔细填上平均值（或靶值）、标准差和RCV 值，同时在图的纵坐标及$\bar{x}$±1s、2s、3s 等处标上相应具体的数值。如果是以PT 试验的可接受范围代替本室的RCV，也同样根据这个值标上相应的数值。

4）标出告警线和失控线：用蓝笔在$\bar{x}$±2s 处划线，用红笔在$\bar{x}$±3s 处划线。

5）标图：将每天的质控血清测定结果标在图上，在图的下方逐日记录日期、校准液吸光度、质控血清吸光度和操作者标识，如有特殊情况记录在备注栏中。每个项目只做一个数据，并逐日将各个质控点以直线相连，形成质控曲线图。

6）分析与小结：应每天及时将质控数据点到图上，并注意观察有无发生失控的情况。如果质控结果提示有失控的情况，即应进入处理失控的程序，并正确处理临床检测结果报告单的签发。

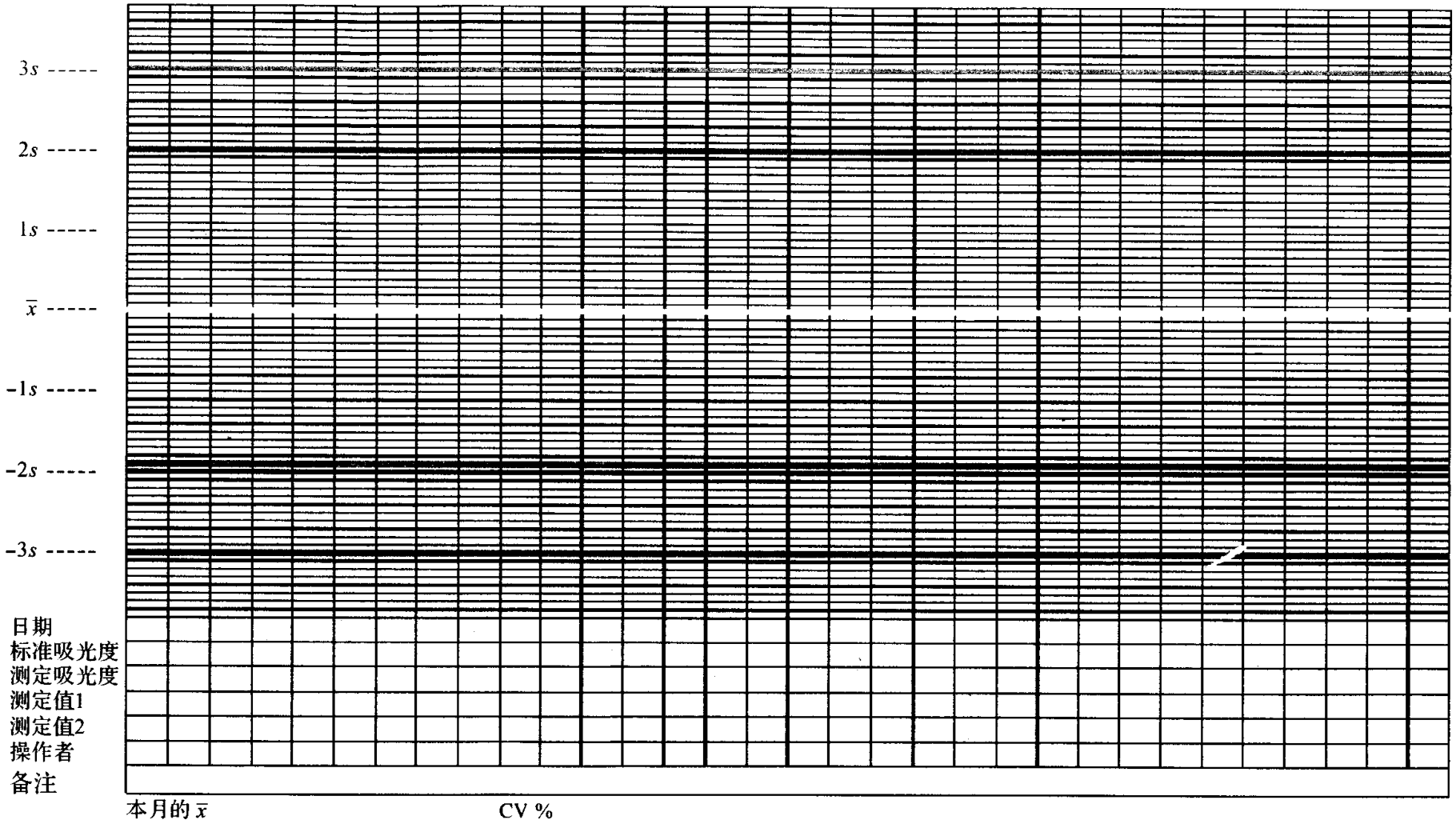
在1 个月末，应及时对本月的质控情况作出小结，统计出当月的$\bar{x}$、s 和CV，如

临床化学质控图

单位：　　起止日期:20　年　月　日　　试剂来源：

试验项目：　　仪器型号：　　方法：　　测定波长：

质控血清来源和批号：　　定值或靶值$\bar{x}$：　　s　　CV：



左图的左侧标尺相应位置注明质控血清定值或本室测定的靶值x，$\pm 2s$及$\pm 3s$的数值。

图4-11-2　$\bar{x}$-s质控图

用的是未定值的质控血清，可以将此$\bar{x}$、s 和CV 作为下月质控的基本数据应用。对本月的质控情况作一简要明确的回顾，分析和记录所有值得重视的情况，对失控及采取的措施、采取措施后的效果等情况也应在小结中记录。

【控制规则】

1）一般将±2s 线作为警告线，±3s 线作为失控线。因为质控测定值的分布是符合正态分布规律的，所以有95％的结果应落在$\bar{x}$ ±2s 范围内，有5％的结果可在$\bar{x}$ ±2s 外，但在$\bar{x}$ ±3s 内，不应有数值落在$\bar{x}$ ±3s 以外。因此，当质控值超过±2s 但不足±3s 时要引起注意，但不作为失控处理。质控值超过土3s 提示失控，暂时不能发出临床检测结果报告，进入失控处理程序。本规则主要是发现随机误差。

2）当质控图形出现某种规律性或趋势性情况时，应分析是否发生了系统误差，因为在正态分布中均值两侧的数据分布几乎相同，不应有连续5 次以上结果在均值的同一侧，或5 次以上数值渐升或渐降，不应有连续2 次结果在$\bar{x}$ ±2s 以外。如质控曲线出现向上或向下的漂移（有明显分界的位移），“漂移”现象提示存在系统误差，准确度发生了突然的向上或向下的改变。出现渐进性的走高或走低（向上或向下的趋向）的趋势性变化，表明检测的准确度发生了逐渐的变化。出现上述情况时，纵使质控值还在$\bar{x}$ ±3s 的范围之内，也应引起注意，分析原因，采取正确的措施，使质控值回复到符合统计原理的随机分布状态。

【注意事项】

1）失控后的处理方法见下一节。

2）L －J 质控图是多规则质控图的基础，现在多主张应用多规则质控。

3）应用L －J 质控如采用以±2s 为失控线，虽然提高了P_{ed}，但P_{fr} 亦较大，需要经过仔细评价。若以±2.5s 为控制线常可获得较好的控制效果。

4）室内质控主要是控制精密度，所以如果采用的是定值质控血清，并且$\bar{x}$ 与该定值（靶值）有较大差异时，可以本室的$\bar{x}$ 标图，对质控效果不会有不良影响。否则可能会出现质控值分布在均值线一边的情况。

二、MONICA 质控图

MONICA（莫尼卡）质控图是另一类常用的质控图，采用定值质控血清和以CCV 为控制线，一般认为可以同时反映精密度和准确度。

【操作方法】

1）采用定值的质控血清，可以是液态的或是冻干的血清。

2）MONICA 质控图形式与L －J 质控图（图4 －11 －3）相似，但纵坐标以靶值和±CCV 表示，在±0.8CCV 处划蓝线作为警告线，在±1.5CCV 处划红线作为失控线，每

一小格代表0.1CCV。各个分析项目的CCV均由卫生部临检中心和WHO推荐（表4—11—2），不能随意更改。

3）每批质控血清插入待测标本中作常规操作，一份质控血清平行作双份测定，将测定值记录在图的下方相应格子内，并在图中点上相应的点，同一批的2个质控值点在同一列。将同一天2点以直线相连，并取中点，逐日将每天的中点相连形成曲线图。

4）在操作者一栏中每天签上操作者的标识。

5）月末计算本月的均值和CV，并作记录。同时作一简要的小结记录在备注栏内。

【控制规则】

1）理想的质控状态是质控血清的2个重复测定结果都落在±0.8CCV以内，出现任何落在±1.5CCV以外的点都提示失控，应进入失控处理程序，消除误差后可以发出临床检测结果报告。

2）各天中点相连形成的质控曲线与L—J质控图相似，所以也适用同样的图形分析规则，例如各种趋向性和规律性的图形也提示存在系统误差。

表4—11—2　临床生化分析项目的CCV

测定项目	CCV（%）
钾	2.9
钠	1.6
氯	2.2
钙	4.0
磷	7.8
铁	15.0
葡萄糖	7.7
尿素	5.7
尿酸	7.7
肌酐	8.9
总蛋白	3.9
白蛋白	7.5
胆红素	19.2
胆固醇	7.6
碱性磷酸酶	19.6

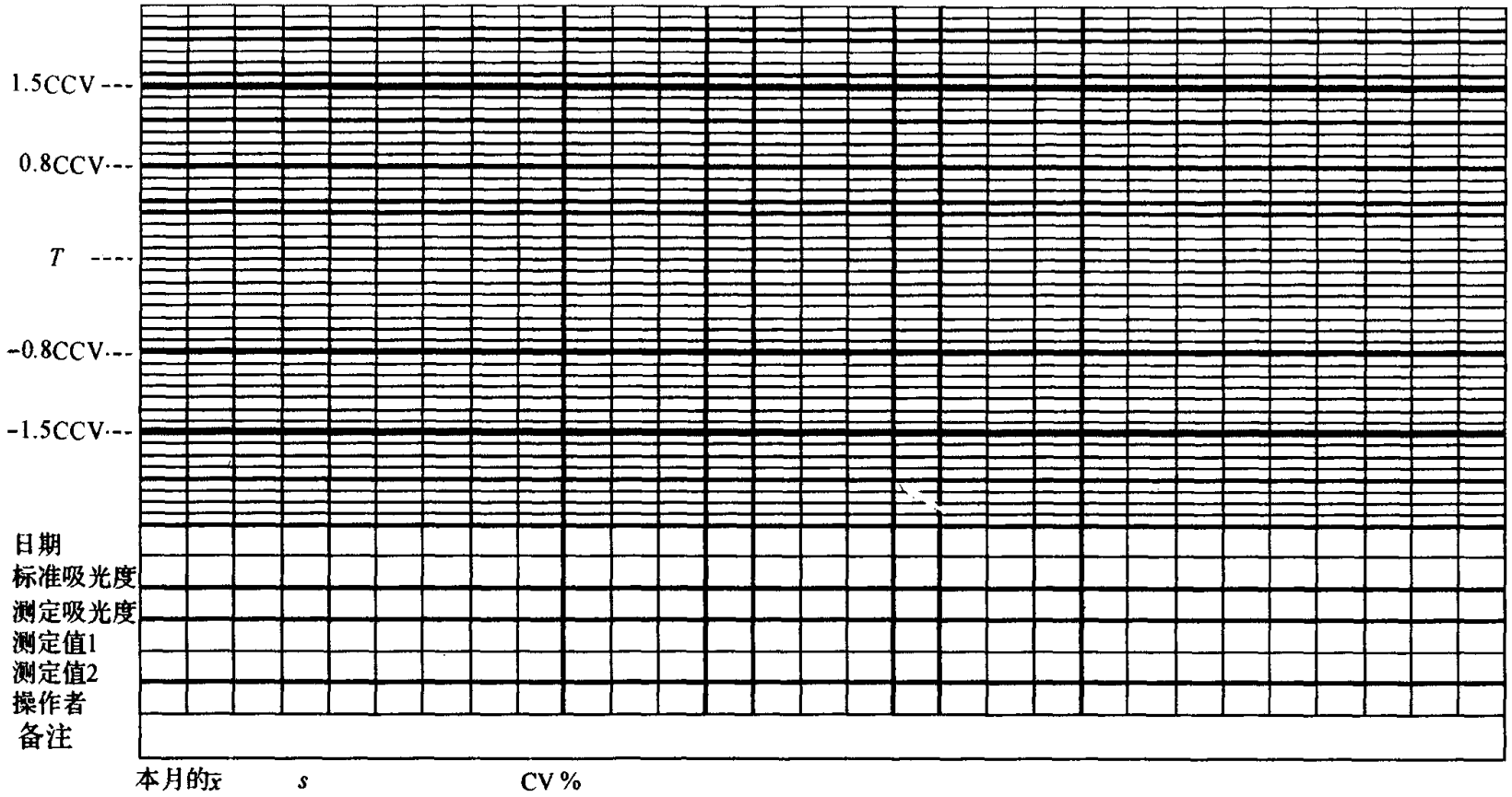
【注意事项】

临床化学质控图

单位：　　起止日期:20　年　月　日　　试剂来源：

试验项目：　　仪器型号：　　方法：　　测定波长：

质控血清来源和批号：　　定值或靶值*T*：　　规定的CCV：　　%



使用说明

1．图中T是定值质控血清的靶值。

2．纵坐标代表T±CCV的值，在T和±0．8CCV与±1．5CCV外标上相应的数值。

3．每一行代表0．1CCV，计算出此值并填在这里_____。

4．图中日期是实际操作日期，未作测定的星期日和节假日不留空格。

5．备注栏内注明失控原因及处理情况和每月的小结。

图4-11-3　MONICA 质控图

1）失控后的处理见下一节。

2）MONICA 质控图制作方便，质控开始前不用先做OCV 和RCV，启用新批号质控血清时可以立即开始质控。

3）平行重复的2 个质控值可以反映操作的精密度，也可以反映不同操作者的操作水平，当然这是指手工操作时。

4）因使用定值质控血清，一般认为MONICA 质控也可反映准确度。

5）原来认为还有另一个优点是本法使用CCV 为控制限．所以可以将室内质控的情况与室间质量评估联系起来。但目前有人基于CCV 的性质是反映离散度与评价准确度的指标的观点，认为不能将CCV 用作室内质控中的允许误差。

三、多规则质控

检验进入自动化阶段后，面对众多控制结果，原先的手工绘图和单规则控制方法显得落后了。Westgrd 于20 世纪70 年代末提出的多规则程序是针对各个控制规则的特性，将它们组合起来，以计算机作逻辑检索，藉此提高控制效率的一种质控方法。

Westgard 多规则控制程序（以下简称多规则）要求受控项目每次使用2 个水平的控制品。1 个水平的控制品亦可以，但观察误差的敏感性较差。手工绘制多规则质控图的基础仍是Levey —Jenings 质控图，只是控制的规则变了。

【检索程序】

多规则质控的误差检索程序如图4 —11 —4 所示。

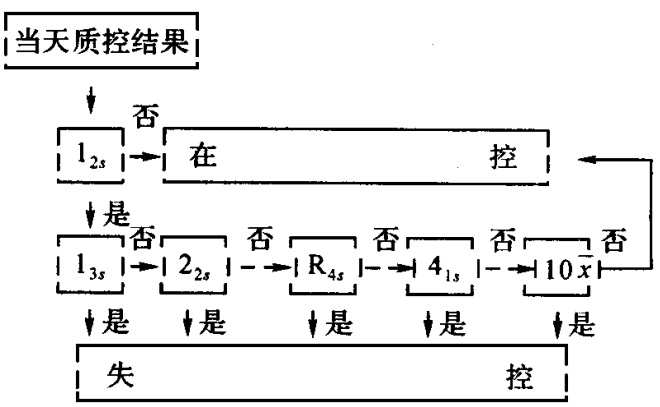


图4 —11 —4　多规则质控索程序图

【规则解释】

1）1_2s：为警告规则，不是失控规则。若本批检验控制结果没有超出±2s 限值线，表示本批结果没有问题，在控，可以发出报告。若本批检验有一个控制结果超出（不包括正好在限值线上的结果）±2s，表示本批结果可能有问题，是一个警告，但不能肯定

是失控，需要作进一步分析，若再符合以下任何一条规则，才能判为失控。

1）$1_{3}s$：如这个控制值不仅超出±2S 限值线，还超出了3s 控制线，判为失控。

3）$2_{2}s$：有两种表现，同批2 个控制品结果同方向超出2s 限值；或同一控制品连续两次控制结果同方向超出±2s 限值。后者要将连续2 次的质控结果结合分析。这一条属系统误差失控。

4）$R_{4}s$：在同一批中两个控制结果极差，超出4s 范围，例如其中有一个超出了+2s 限值，另一个超出了−2s 限值，或一个超出了+2.5s，另一个超出了−1.5s 时，属随机误差过大，失控。

5）$4_{1}s$ 有两种表现：①同一质控品连续前3 次结果和本次结果在同方向超出ls 范围；②2 个质控品的前1 次结果和本次结果均同方向超出+1s 或−1s 范围。属系统误差表现，失控。

6）10 −x̄：本次结果与前4 次结果连续分析，2 个质控品5 次结果连续在平均值的同一侧。属系统误差表现，失控。但是，若出现$1_{2}s$ 警告结果的这个控制品，仅是这一次在均值的某一侧，正好另一个控制品有连续9 次结果在均值的同一侧，这不是10 −x̄ 表现：若出现$1_{2}s$ 警告结果的这个控制品，连续共有9 次在均值的某一侧，另一个控制品这一次也在同一侧，但前一次在另一侧。这亦不是10 −x̄ 表现。

【注意事项】

1） 在用多规则判断质控结果时首先看是否出现了$1_{2}s$ 表现，只有在一个结果出现$1_{2}s$ 警告，才可接下去检索是否有符合其他规则的表现，如有才列为失控，如没有仍应作为在控。没有出现$1_{2}s$ 表现，但控制结果已出现倾向性表现，已有多次结果偏于一侧，甚而偏于+1s 或−1s 以外，这些都不属失控。检验人员看到这样的表现，应主动寻找原因予以纠正，努力减小误差，但不作为失控后的措施。

2） 出现$1_{2}s$ 表现后，经顺序检查，没有出现其他各失控规则的表现，表示这次$1_{2}s$ 出现也许是属正常的波动，不是失控，不要作任何失控处理。可发出临床检验报告。

3）$1_{2}s$ 规则适用手工作图，计算机程序会自动应用规则，所以不需要警告规则。

4） 已判为失控的数据不能再被以后的规则所用。但不能去掉。

5） 多规则质控是一个概念，“Westgard 规则”只是一个如何应用这个概念的例子。还有许多多规则质控方法，如测定3 份质控品，应用的多规则为$1_{3}s$，2of $3_{2}s$，$R_{4}s$，$3_{1}s$，6 −x̄ 或9 −x̄ 等。

第四节　失控后的处理

质控工作的正常方式是：如果质控结果“在控”，接受分析批并发出临床检验结果

报告；如果质控结果“失控”，拒绝分析批，查出失控原因并解决问题后，重测该批质控品，确认回归到控制状态，再与待测标本一起重新测定，发出正确的临床检验报告。对失控情况采取正确的措施也是质控工作的一项重要内容。不管采用的是何种质控方法，报告失控意味着检出了误差，消除误差的原则应是相似的。

1．失控处理程序

基本的流程为：发生失控情况后立即向小组、科室和质量负责人报告，该分析批的结果报告暂时不发，根据失控表现仔细分析种种原因并作纠正和排除，复测质控血清直至回到控制状态，必要时复测部分或全部待测标本，再发出正确的临床检验结果报告。

整个过程应作记录并保存。

失控原因的分析和排除是程序中最关键的，没有固定的模式。但失控后简单地重测质控品或再试一个新的质控品以判断究竟是否失控或失控是否因为质控品的问题，现在认为是不正确的。因为不分析误差的原因就机械地重测质控品，无论测定的结果是在控还是继续失控对失控的判别并无意义，既有可能是因P_{fr} 加大而表现的失控，也有可能因降低P_{ed} 而使得严重的系统误差情况均不能检出，所以不提倡在分析失控原因之前复测质控品，而应先分析失控原因。

2．失控原因分析和处理

失控信号的出现受多种因素的影响，这些因素包括操作上的失误，试剂、校准物、质控品的失效，仪器维护不良以及采用的质控规则、控制限范围、一次测定的质控标本数等等。失控信号一旦出现就意味着同批测定的临床检验结果可能作废，但也可能没有发生真正的误差而仅是一种假失控。因此，首先要尽量查明导致失控的原因，采取适当措施消除后，再随机挑选出一定比例（如5％或10％）的待测标本进行重新测定，最后根据既定标准判断先前测定结果是否可接受，对失控做出恰当的判断。如判断为真失控，应该对相应的所有失控待测标本和质控标本进行重新测定，并且质控标本结果应该在控。如失控信号被判断为假失控时，常规测定报告可以按原先测定结果发出，不必重做。无论是直失控或假失控都应该记录分析原因的全过程。一般可以采用如下步骤寻找原因：

1）检查质控图或控制规则以确定误差类型，区分是随机误差还是系统误差。不同的控制规则有检测不同误差类型的能力（敏感度）。例如1_3s 和R_4s 规则通常指示随机误差 如2_2s，4_1s 和$10\bar{x}$ 规则通常指示系统误差，检查质控图上的质控点的分布情况也可提供类似的信息，质控曲线的突然变化或较大幅度的波动应多考虑随机误差，而趋向性的现象多为系统误差

2）认识与误差类型有关的一些因素。由于随机误差和系统误差有不同的原因，因

此从不同的误差类型较易追查有关误差来源的线索。导致系统误差的因素比引起随机误差的因素多见，一般也较容易解决。引起系统误差常见原因有：试剂批号改变、校准物批号改变、校准物定值错误、不适当配制试剂、试剂变质、校准物变质、试剂或校准物的不适当贮存、由于移液管的误调或未校准引起样本或试剂的体积变化、孵育箱和反应盒的温度变化、分开光度计的光源老化以及操作人员的更换等。

随机误差的常见原因有试剂和试剂通道中的气泡、混合试剂不恰当、温度和孵育不稳定、不稳定的电压以及在吸量、定时方面的个体操作变异等因素。

3）对于手工法操作的项目，应认真回顾操作的全过程，有无换人，有无操作、结果计算上的失误，然后依次确认标准品、试剂、保温反应温度、比色计等是否正常。

4）对于生化自动分析仪测定者，首先应该分析在质控品失控之前言无改变分析系统的状态，如分析仪硬件的更改（包括光路部件的更改），化学反应参数的更改，标准品的更改，试剂的更改，质控品更改等等。对于更改过的部分应仔细确认其更改的正确性。同时区分是个别项目质控品失控还是多数项目失控。个别项目失控，可以基本确定分析仪工作是正常的重点确认该项目的试剂有无受污染、久置变质、位置错位，确认校准品是否正常，确认质控品中该项目是否分解失效，如葡萄糖、某些不稳定的酶、胆红素等。多项目失控，处理问题的步骤首先应针对这些试验的共同因素，如都是一些脱氢酶反应的项目（丙氨酸氨基转移酶、已糖激酶法葡萄糖测定等）失控，共同的特点是都以340nm 为测定波长，就很有可能比色灯泡340nm 光能量明显下降或该波长滤色片损坏：如都是一些氧化酶反应的项目（葡萄糖、甘油三酯、总胆固醇、尿酸等）失控，则最有可能受到维生素C 、胆红素等物质的污染和干扰，或是500nm 光路有异常。找不出明显共同因素的多项目甚至是全部项目的失控，很可能是仪器的故障、质控品变质等所致。

5）分析与新近的改变有关的原因。系统误差大多数常与试剂或校准问题有关。突然漂移通常由更换试剂、一个新批号试剂、更新的校准或校准品批号改变所引起。当查找漂移的原因时，操作者应检查试剂、校准，并且作好记录，以便为解决问题提供线索。

趋向性的问题可能比单纯的漂移难解决，因为趋向性发生和发展的过程较长，常见的原因有试剂逐渐变质、校正值漂移、仪器温度改变、滤光片或灯泡老化等，查找时应逐个分析确认。

查找和解决导致随机误差增加的问题更为困难，因为随机误差不易分析或量化。

如果上述几个步骤均未能得到在控结果，可能是仪器或试剂的内在原因，只有与仪器或试剂厂家联系，请求它技术支援。

6）解决问题并记录处理结果。检查出问题的原因后，针对这个原因采取纠正措

施，这时可以重新测试所有的质控品，一旦在控，应将失控批次的待测标本部分或全部重新测定。另外，应该将失控事件以及具体的处理过程记录下来。

第五节　室内质控数据的管理

室内质控是长期的日常工作，每天累积下来的大量数据，除了在每月结束时作小结和分析外，应该作为实验室重要的资料予以长期妥善的保存。

一、每月室内质控数据统计理

1）每月结束时，应将各个分析项目的质控数据作回顾分析，观察每一张质控图的总体情况是否正常，所有的异常情况尤其是数据连续分布在均值一边、渐进趋向性的现象等是否已作处理等。也要注意质控图的细节，如操作者的标识是否完整，数据点的标记是否规范，所有发生的事件的记录是否完整等。在回顾性分析质控图中发现的问题也应作记录，并告诉有关的人员，或在科室业务讨论中通报，以期不断地提高全科的质控意识和工作质量。

2）统计计算每张质控图的当月$\bar{x}$、s 和CV，并与以前的数据作比较，尤其是与本室的OCV 和RCV 作比较。如整个控制系统没有大的变动，这3 个数据也应呈一定的稳定性，任何一个数据出现明显的波动一定是有原因的，一定要仔细分析。

3）室内质控应用电脑越来越普遍，每月的统计小结可由电脑自动完成，但上述两点中的分析和讨论不能省去。

二、每月室内质控数据的保存

1）每月的室内质控数据和资料，包括质控图、失控情况记录、失控处理措施、每月分析小结等，都应装订成册，加上标识明显的封面，由质控负责人归档保存。

2）应用电脑的实验室，可以将上述室内质控数据和资料以电子档案的形式作出备份，备份可以放在专用电脑的硬盘中，也可以软盘或其他电子存贮介质保存，可以适当加密以保证资料的稳定。

3）可随时将每月的质控资料上报给临检中心。

4）关于质控数据的取舍与修改问题。室内质控是监测日常工作质量的一种手段，出现失控情况完全是正常的，质控图有时不很漂亮也不能据此认为质控做得不好。实验室如果为了追求形式上的效果，将失控的数据不作记录，或将数据进行人为的修饰，拿出无可挑剔的质控图，是毫无意义的。重要的是使质控真正发挥控制的作用，切实起到促进和提高实验室的技术和管理水平的效能。

第六节　用OPSPecs 图评价室内质控的质量

室内质控（QC）不单纯是操作方法，而是质量管理中的一个内容，临床实验室要保证质量，应该实施总体质量管理（TQM）原则。开展室内质控先要有一个质量计划，定出一个试验的质量要求，在确定分析方法的不精密度和不准确度的同时，确定质控方法（规则），以保证达到预期的质量要求。实验室采用何种质控方法不是随意决定的，其方法要使质控有效，真正达到控制的目的，而且是最经济的。

所以不同的分析项目由于其方法的不精密度与不准确度不同，如采用同一种质控规则，所起到的控制作用是不一致的，即所达到的控制质量是不同的。从质量管理要求来说，这个新的观点更加全面，将方法的不精密度和不准确度都与质量控制（Qc）相联系，全面考虑这3 个关键因素的相互关系。

质控方法本身也应有质量指标，评价质控方法质量的指标主要为P_{ed} 和P_{fr}，这也是选择质控方法或规则时的依据，或是预先确定的质量目标。

因此，分析项目选择IQC 方法不要随意决定，要有一定依据，事先应经过仔细的选择，并经常对质控方法作质量评价。每个项目的质控方法或控制规则不一定都是统一的，而应该在简便适用、确保质量的基础上个案化。

OpsPecs 图或功效函数图是用来选择质控方法的良好工具，两者的原理其实是相同的。

一、OPSpecs 图简介

Opspecs 的英文全称是operational process specifications，简称为operating specifications，就是操作规程或操作要求。OPSpecsS 的基本概念是对某项操作不仅应知道做什么，还要知道做得好不好。OPSpecs 图可用于证实当前所用的统计质控方法是否合适，或选择新的控制方法是否能达到分析质量要求。OPSpecs 图于1992 年引入临床实验室。

一张OPSPecs 图包含了质量要求类型、实际质量要求、不同QC 方法所允许的不精密度和不准确度等信息，还包括控制规则及质控测定数目，以及QC 方法的误差检出率和假失控率等信息。见图4－11－5。

1）标题：表明本项目的分析质量要求是：以医学决定水平的10％为TEa（允许的总误差），能达到90％的误差检出率（P_{ed}）作为分析质量保证（AQA）。

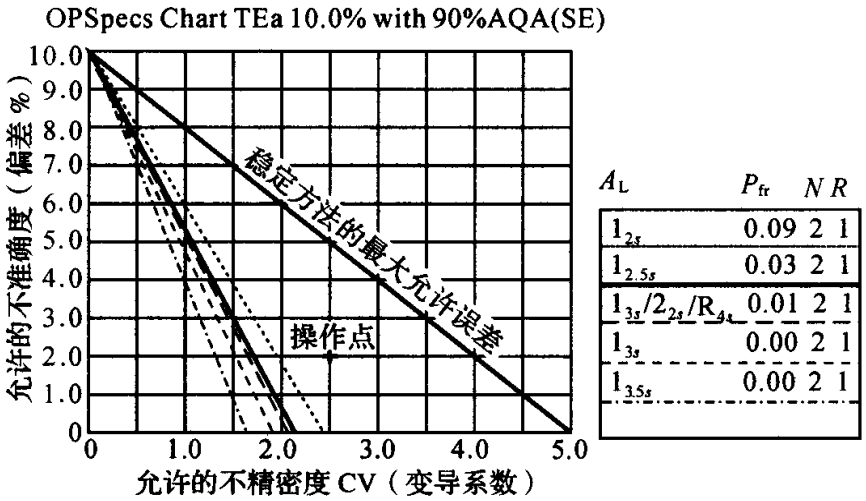


图4－11－5　OPESpecs 图示例

1）坐标轴：Y 轴是允许的不准确度以偏差%表示。X 轴是允许的不精密度以变异系数CV 表示。“操作点”表示一种测定方法的实际操作，根据方法的偏差和CV 定出坐标。

2）控制线：表示不同QC 方法的控制限。图中最高的斜线表示测定方法非常稳定时的控制限，相当于以bias +2s 为总误差，方法的初次评价或确认时常以此作为可接受的标准。其他的线对应一定的控制规则和质控测定的数目。

3）右边方框列出各个QC 方法的细节。方框中的第一列是控制规则，缩写为A_L，A 是规则符号或控制测定的数目，L 是控制限。第二列是假失控概率P_{fr}，这一指标如小于0.05 是理想的，QC 的假报警可降至最小。第三列N 是每一分析批次中质控测定的总数，N =2 可以是1 个质控物测定2 次，也可是2 个不同质控物各测定1 次。第四列R 是应用控制规则的批次的数目，一般是1 批，但在多规则质控中有的规则如4_1s 和10－$\bar{x}$ 分别要在连续几个批次中应用。

二、OPSpecs 图的应用步骤

以胆固醇测定为例。

1）确定分析的质量要求，例如根据CLIA88 PT 的规定，胆固醇的TEa 为10 %。

2）确定质控的质量要求，即误差检出能力，一般选用90 %AQA ；并先要选用N 数较小的QC 方法，这可使QC 的成本较低。

3）根据实际的不精密度和不准确度，在图上标出操作点；即以标准差或CV %为X 坐标，以偏差%为Y 坐标。标准差或CV 的数据可来源于室内质控或RCV ，偏差的数据可来源于室间质评。

4）确定实验室的首选QC 方案，在操作点上方的控制线所代表的QC 方法均可以

采用，选一种最简便有效的。

如果所有的线均在操作点的下方，说明这些质控方案均不能满足质量要求，应该选另外的OPSpecs 图，有较高的N 或较低的误差检出率 [如50 %AQA $E)]，或改用其他精密度和准确度更好的方法，重新定操作点。

如果应用OPSpecs 图软件，上述操作就十分方便，输入有关的数据后，自动生成OPSpecs 图，随意选择质控规则用来观察和比较。

三、OPSpecs 图评估分析质量改进的作用

每当测定方法改变后都应重新检查QC 计划，如果方法改进了，就有可能减少质控测定数目，采用较简便的质控方法，如果方法恶化，就有必要增强质控，或是增加N 数，或是改变质控的规则，采用多规则质控。

在上面的胆固醇测定例子中，如果偏差从2.0 %降低为0.0 %，CV 仍为2.0 %，在OPSpecs 图上画出新的操作点，可以看到由于准确度的提高，可以采用N 数为2 (原来N =4) 的$1_2$5s 单规则质控，或1_3s/2_2s/R_4s 的多规则质控。

如果OPSpecs 图表明现有的质控方法可以达到90 %P_ed，实验室只要严格执行统计学质控，可以保证质控的效率。如现有的方法只能达到50 %P_ed 的目标，则同时还需加强非统计学质控的其他方面工作，包括仪器的维护、操作人员的培训等等，即通过加强全面质量管理，保证检验的质量。

第十二章　自动生化分析仪

自动生化分析仪是将生化分析中的取样、加试剂、混匀、保温反应、检测、结果计算、可靠性判断、显示和打印以及清洗等步骤组合在一起的自动操作仪器。自动生化分析技术提高了临床生化检验的质量和速度，减轻了检验人员的劳动强度，同时也节约了样品和试剂，增加了检验项目，提高了实验的精密度，减少了实验误差，并且有利于临床检验标准化的实现。

自动生化分析仪按其工作方式不同分为连续流动式或管道式、分立式、离心式和干片式。在实验室的常规检测中以分立式应用最为广泛，而干片式由于体积小、操作简便，多为急诊检验所采纳；连续流动式和离心式自动生化分析仪现已很少使用。

第一节　分立式分析仪的基本结构与工作原理

一、基本结构

1．样品盘或样品架

样品盘是放置待测样品的转盘，可放置一定数量的塑料样品杯或一定规格的抽血试管（称原始抽血试管），通过样品盘的转动来控制不同样品的进样。另一种分析仪使用的是样品架，每个样品架可放5 只样品杯或抽血试管，通过样品传送带来移动样品架，以样品架上的条码或编码孔识别样品架号及样品位置号。样品杯或试管可贴有包含样品性质和编号的条形码，分析仪通过识别样品条码，识别不同的样品。

2．试剂室和试剂瓶

试剂室内可装有放置试剂瓶的转盘，通过试剂转盘的转动来决定各种不同试剂的进样。它一般可放置20 种以上规定形状的塑料试剂瓶，大型分析仪可放置30～45 种试剂瓶，试剂瓶容量一般为10～100㎖。试剂室也有按试剂架形式设计，可放置容量为250～500㎖ 的任意形状的试剂瓶。试剂瓶不能转动，但每个试剂瓶可内置一条试剂管路和喷嘴。有些分析仪同时备有第一试剂室与第二试剂室，能在同一时间对不同反应杯加第一试剂和第二试剂。对有条形码装置的仪器可将带条形码的试剂瓶放在试剂室转盘上的任意位置，仪器能自动识别试剂的种类、批号和有效期。试剂室均具有冷藏装置，可将

试剂保存在5 ～2 ℃。

3．反应杯和反应盘

反应杯是样品与试剂进行化学反应的场所，同时用作比色杯。它由透光性好的硬塑料或石英玻璃制成，100 只或更多的反应杯围成一圈组成一个反应盘。在测定过程中，反应盘作恒速的圆周运动，在静止时向反应杯中加入样品、试剂或进行搅拌混匀，在转动经过检测窗口时进行吸光度检测。

4．加样和加试剂装置

由加样针、加样臂、加样管路、加样注射器和阀门组成加样系统，能定量吸取样品并加入到反应杯。不同分析仪的加样容量有不同的范围，一般为2 ～35ul。加样针具有液面感应功能，加样针于标本上方下降时，一旦接触到样品液面即停止下降而开始吸样。这类加样装置适用于多种盛样品的容器，如各种样品杯、多种规格的试管及原始采样管。由于加样针会在各样品间产生携带交叉污染，因此，所有的自动生化分析仪均对其设置了防交叉污染的功能。其中绝大多数采用水洗方式对样品针接触样品的内外壁进行冲洗，也有采用化学惰性液的方式。

加试剂装置用于定量吸取试剂加入反应杯，可加容量一般为180 ～380ul （也有少至150ul 甚至120ul）。加试剂装置有两种类型，一种类型的组成部件与加样装置类似，其液面感应系统能检测并提示试剂剩余量，并设置了防止试剂间携带交叉污染的功能。另一种类型为灌注式加试剂装置，该装置具有许多条试剂管路及其喷嘴，每种试剂单独使用一条试剂管路和喷嘴。这种加试剂方式的优点是不存在各试剂间的交叉污染。大型自动生化仪多具有两组加试剂装置，可分别从两个试剂室吸取两种不同的试剂加入不同的反应杯。

5．混匀与搅拌装置

反应杯里的样本与试剂通过搅拌捧搅拌而充分混匀。搅拌棒的形状为扁平棒状或扁平螺旋状，表面的疏水材料能防止反应液被搅拌棒所携带。其工作方式大多为旋转式搅拌，也有震动搅拌方式，同时设置了防止搅拌棒在不同的反应液之间携带交叉污染的清洗功能。

6．温控和定时系统

分析仪的反应杯浸浴在恒温循环水或恒温空气中，温度控制器能使循环水或循环空气的温度控制在规定温度土0.1 ℃。规定温度可有37 ℃和30 ℃两种选择，一般固定在37 ℃。

不同分析仪对检测吸光度的间隔时间有不同的规定，反应时间应该设定为此间隔时间的倍数。总反应时间一般限制在10 min 内，个别分析仪可以设定为15 min 或22 min。

7．光路和检测系统

与一般分光光度计一样，由光源、单色器和检测器组成。

⑴ 光源：一般为卤素钨丝灯，也有采用长寿命的氙灯，要求在340～800nm 波长范围内能发射出稳定且较平坦的光能。

⑵ 单色器：采用①干涉滤光片分光系统，常带有340、380、405、500、550、600、60nm 等几种滤光片，各滤光片固定在转盘上，以转盘旋转的方式来选择波长。②光栅分光系统，常在340～800nm 波长范围内选择12～13 种固定的单色光。光栅分光有前分光和后分光两种方式，目前以后分光方式为多见。后分光是光源先透过比色杯中的反应液再照射到光栅上，经色散后所有固定单色光同时发射到对应的检测器，微处理器按该分析项目的分析参数选择其中一个或两个波长的吸光度值，用于分析结果的计算。后分光的优点是单色器中没有转动部分，因而对每一波长光的检测均能达到稳定和准确。双波长光检测在同一时刻进行，致使检测“噪声”大为下降。

⑶ 检测器：由光敏二极管及放大电路组成，其在反应盘转动过程中通过检测窗口时连续测定各反应杯的吸光度值。

8．数据处理系统

⑴ 计算测定结果：分析仪检测到的吸光度值或吸光度的变化值扣除试剂空白，乘以定标系数或计算因子k，再由方法学补偿系数a 和b 校正，即得到被测样品的浓度值或酶的活性。对于两点法或连续监测法还可扣除试剂空白变化速率。

⑵ 给予各种提示：包括结果是否超过参考范围；结果是否超过检测线性范围；试剂空白的吸光度有无超范围；连续监测范围内吸光度值变化是否偏离线性；底物消耗是否超过设定范围等。

⑶ 保存各种数据：电脑的存储介质不仅可以保存大量的测定结果，还可以保留一定数量的其他相关数据，如被分析项目各检测点吸光度值、各次校准的校准曲线、每天的室内质控数据等，以供随时查询。

9．反应杯冲洗系统

对一个反应杯的吸光度检测一旦进行完毕，该反应杯就被冲洗系统及时冲洗。其清洗过程是：由废液针吸取反应杯内废液，加入清洗剂，经去离子水冲洗数次后，做杯空白的吸光度检查。若通过检查则此反应杯可继续循环使用；如果不能通过，分析仪将提示该反应杯异常，并跳过此反应杯使用下一个反应杯，或提示更换反应杯。

二、工作原理

㈠ 检测过程

在测定过程中所有机械步骤均由微处理器根据已设定的程序进行工作。

1．加样加试剂和混匀

样品盘转动，使样品进入待测位置，样品针定量吸取样品加入一反应杯；反应盘旋转；试剂室内试剂转盘转动使所需试剂瓶进入试剂吸取位置，试剂针定量吸取试剂加入反应杯；搅拌机构对反应杯内液体进行搅拌混匀。

2．保温反应和检测

反应盘旋转，反应杯内液体在恒温条件下进行化学反应，当该反应杯通过吸光度检测窗口时即被检测产生一个测光点；再按规定的间隔时间读取反应过程中的测光点。这种读数方式属全过程读吸光度方式，总反应时间一般为10㎜in。假如18s 为检测吸光度的间隔时间，则10㎜in 有34 个测光点。至该样品指定的项目测试完毕，分析仪即根据各自的测光点读数进行计算，显示或打印检测结果。

(二) 加样周期和测试速度

每加一次样品或试剂的时间为一个加样周期。加样周期决定了分析仪的工作速度。对于单针加样的分析仪，如加样周期为10s，理论上每60㎜in 可加样360 次，其工作速度为360 测试/h；若加样周期为4.5s，则理论工作速度为800 测试/h，依此类推。只有一组加试剂装置的分析仪在做双试剂法测定时，加第二试剂也要占用一个加样周期，使工作速度减半；如果有两组加试剂装置，因在另一试剂吸取位置添加第二试剂，所以工作速度不变。

具双圈反应盘 (一般有240 ×2 个反应杯) 的分析仪具有两套阵列式光电检测器，能同时对内圈和外圈的反应杯进行吸光度检测。这种系统要求有两支加样针，1 个样品被两支加样针同时吸取两份样品，分别加于内外圈反应杯中，再分别加两种不同的试剂。这个系统的测试速度更快，如果加样周期为4.5s，理论上每小时可得到1600 个测试。这个系统还可配置4 支加样针，1 个样品被4 支样品针同时吸取4 份样品，然后分别加4 种不同的试剂。这时如果加样周期为6s，则理论上每小时可得到2400 个测试。

组合式自动分析仪将相同或不同的两台或两台以上的分析部分 (称分析模块) 进行组合连接，采用样品架方式使样品在传输线上不同分析模块间进行传递并检测。各分析模块所分析项目的组合提高了分析效率，如两台每小时分别为2400、800 个测试的分析模块，可组合成分析速度为每小时3200 个测试的分析仪；两台同样为每小时1600 个测试的分析模块，也能组合成分析速度为每小时3200 个测试的分析仪。这些分析模块除了基于紫外－可见光谱分析原理的分析模块外，还有基于离子选择电极的电解质分析模块，甚至还可组合基于免疫发光分析原理的免疫分析模块。

第二节　分析方法概要

一、分析方法分类

㈠ 终点法

被测物质在反应过程中完全被转变为产物，即达到反应的终点，根据终点产物吸光度的大小求出被测物浓度，因而称为终点法。从反应液的时间－吸光度反应进程来看，到达反应终点时，吸光度将不再变化。分析仪通常在反应终点附近连续选择两个测光点，求出其吸光度平均值计算结果，并可根据两点的吸光度差来判断反应是否到达反应终点。实际上被测物并没有完全被转变，而只是与产物达到一个动态的化学平衡，因此，该法称为平衡法更为恰当。终点法参数设置和操作均简单，精密度较好，反应时间一般较长。

终点时间的确定：①根据检测项目的时间－吸光度反应曲线来确定，如Trinder 反应测定葡萄糖、甘油三酯等，反应曲线上3～5min 时其吸光度已趋向平衡。②根据被测物反应的终点并结合干扰物的反应情况来确定，如溴甲酚绿法测定血清白蛋白，白蛋白与溴甲酚绿反应很快，之后α球蛋白和β球蛋白与溴甲酚绿发生“慢反应”，因此，终点时间采用10～30s，从而消除了慢反应物质的干扰。

㈡ 两点法

1．固定时间两点法

指在时间－吸光度反应曲线上选择两个测光点，其吸光度差值用于结果计算，称为固定时间两点法。该分析方法有助于解决某些非特异性化学反应。例如：苦味酸法测定肌酐，反应的最初30s 内，血清中快反应干扰物（如乙酰乙酸等）能与碱性苦味酸反应；在第二个30s 时碱性苦味酸主要与肌酐反应，且此段反应曲线的线性较好（故也可用连续监测法测定肌酐）；在80～120s 及以后，碱性苦味酸可与蛋白质及其他慢反应干扰物反应。若选用反应的第二个30s 为测定时间，既避免了快反应物质的干扰，又避免了慢反应物质的影响，肌酐浓度与吸光度变化可呈良好的线性关系，有利于提高分析的特异性和准确度。

2．两点终点法

在被测物反应或指示反应尚未开始时，选择一个测光点，在反应到达终点或平衡时

选择另一测光点，此两点吸光度之差用于结果计算，称为两点终点法。该法可消除来自样品的某些非化学反应干扰，即能有效地消除由溶血、黄疸和脂浊等样品本身光吸收分析造成的干扰。在单试剂方式或双试剂方式的第二试剂加入后，如果指示反应进行初期吸光度尚未明显变化，则可在此时选择第一测光点，在指示反应终点时设置另一测光点。如果将第一测光点选择在第二试剂加入前，则必须将两次读吸光度时不同比色液体积进行系数校正，目前全自动分析仪均具有此自动校正功能。

㈢ 连续监测法

该法又称速率法，是在酶活性测定或用酶法测定代谢产物的过程中，连续监测某反应中随产物或底物浓度改变所发生的吸光度值改变，计算时间－吸光度变化曲线中线性期的单位吸光度变化值 （△A／min）。此变化值即为酶促反应的初速度，其大小与被测酶活性或被测代谢物浓度成正比。连续监测法的优点是可以确定线性期并计算△A／min。

连续监测法测定酶活性的计算公式为：

$$\text{酶活性}\ (U/L) = K \cdot \triangle A/\text{min}$$

其中K 为计算因子，由下式得出：

$$k = \frac{10 \times TV}{\varepsilon \times SV \times d}$$

式中ε为指示物质的毫摩尔消光系数；TV 为反应液总容量；SV 为样品容量；d 为比色光径。此K 值由人工计算得出，再输入到分析仪。

㈣ 免疫透射比浊法

抗原与相应的抗体结合形成的免疫复合物，在反应液中具有一定的浊度，可进行透射比浊测定，该法须做多点校准，再经非线性回归，可求出抗原或抗体的含量。测载脂蛋白、免疫球蛋白等可用此法。

二、双波长方式

在比色分析过程中，采用一个波长的称单波长方式：采用一个主波长和一个次波长，以主波长与次波长吸光度之差来计算结果的称双波长方式。

若反应液中存在非化学反应的干扰物如甘油三酯、血红蛋白、胆红素等，则会产生非特异性的光吸收，干扰测定结果的准确性。采用双波长方式测定可以部分消除这类干扰，提高检测的准确性。被测物的主波长确定之后，根据干扰物吸收光谱特征，选择次波长。干扰物在主、次波长处有尽可能相同的光吸收值，而被测物在主、次波长处的光吸收值则应有较大的差异。一般来说，次波长应大于主波长。

三、单试剂和双试剂方式

反应过程中只加1 次试剂称单试剂方式，加2 次试剂便为双试剂方式。

双试剂方式可以消除一些非特异性化学反应引起的干扰。如血清ALT 测定，血清中的其他酮酸也可与试剂中的指示酶起反应，使测定结果偏高。若先加入缺乏α－酮戊二酸的第一试剂，使其他酮酸与指示酶反应，之后加入含有α－酮戊二酸的第二试剂，启动真正的ALT 酶促反应，则可消除以上副反应。另外双试剂方式中可设置两点终点法来扣除一些来自样品的非化学反应干扰，已如前述。

一些双试剂混合成单一工作试剂时，其稳定时间缩短，所以双试剂方式还可增加某些试剂的稳定性。

第三节　分析参数设置

分析仪的许多程序步骤如加样、冲洗、比色、数据处理等都已经固化在存储器里，用户不能修改。各种测定项目的分析参数大部分也已设置好，存于磁盘中。但还有一些项目需要用户自己设置分析参数，这就需要理解各参数的确切意义。以下是常用分析参数的名称及含义：

1） 试验名称：测定项目的标示符，常以项目的英文缩写来表示。

2） 分析方法：终点法、两点法、连续监测法等，根据被测物的测定原理选择。

3） 反应温度：有30 ℃、37 ℃可供选择，一般固定37 ℃。

4） 主波长：选择一个与被测物指示反应有关的波长。

5） 次波长：选择次波长的方法参见本章第二节双波长方式。

6） 反应方向：正向为吸光度增加的反应，负向为吸光度下降的反应。

7） 样品量 (μl)：一般2 ～35μl，以0.1μl 为1 个进级，个别分析仪最少可达到1.6μl。

8） 第一试剂量 (μl)：一般是20 ～300μl，以1μl 为1 个进级。

9） 第二试剂量 (μl)：同上。

10） 总反应液容量：不同的分析仪有不同的规定范围，一般180 ～350μl，个别仪器能减少至120μl。

11） 孵育时间：终点法为样品与试剂开始混匀至反应终点为止的时间；两点法是第一读数点至第二读数点的时间。

12） 延迟时间：对于两点法或连续监测法是样品与试剂混匀开始至第一读数点的

时间。

13） 连续监测时间：一般为60～20s，或不少于4 个读数点（3 个△A）。

14） 校准液个数及浓度：若校准曲线直线性好并通过坐标零点，可只用1 个浓度的校准液；若校准曲线直线性好但不通过坐标零点，需使用2 个浓度的校准液。对于非线性反应，必须采用2 个以上浓度的校准液，每一个校准液都要有一个合适的浓度值。

15） 校准系数或计算因子：通过校准或计算得出。

16） 小数点位数：即检测结果的小数点位数。

17） 底物耗尽值：当反应方向属于负反应时，必须设定。

18） 前区检查：应用于免疫比浊法中。比较终点法终点附近两个测光点的差别，如果后一点吸光度比前一点低，表示已有抗原过剩，应稀释样品后重测。

19） 试剂空白吸光度范围：超过此设定范围表示试剂已变质，应更换合格试剂。

20） 线性范围：与试剂样品体积比有关。超过此范围应增加样品量或减少样品量重测。

21） 试剂空白速率：用于连续监测法或两点法，是试剂本身在反应过程中的变化速率。

22） 方法学补偿系数：用于校正不同分析方法间测定结果的一致性。

23） 参考值范围：测定结果超过此范围的，会打印出提示。

第四节　分析仪的操作方法

一、分析仪操作前的各项检查

1） 正常开机以后，检查冲洗用水装置是否正常、各项分析试剂是否充足、各种清洗剂是否足够，以及样品针、试剂针和搅拌棒是否清洁。

2） 确认要进行校准的项目，确认要做的质控批号及项目，以及校准品、质控品是否足够。

3） 进行光度计自检来确认比色系统是否处于正常工作状态。

二、校准和质控品测定

㈠ 校准

在分析样品之前都要对该分析项目进行校准（也称定标），校准前首先需设定有关校准参数，如校准液的代码、位置及浓度值等。校准时执行校准程序，检测得到校准液

的吸光度值，分析仪自动将校准液浓度除以反应液的吸光度值，即得出校准系数K。

㈡ 质控品测定

质控是保证检测结果可靠的一个重要手段，每批分析操作均应做质控样品测定。对于分析仪的批测定，包括一次开机至关机的过程。其中如果添加或更换了试剂、进行有可能改变吸光度的分析仪维护之后，均应进行1 次质控样品的检测，以便及时监测到分析系统的改变。

所有分析仪都设置有质控的分析程序：①质控参数，包括质控品的批号、靶值和标准差，以及质控图方式，如均值－标准差质控图；②质控样品检测项目的输入与测定；③质控结果的分析，分析仪保存每次测定的质控结果，并对其进行统计，以列表或质控图的形式在屏幕上显示。可根据某一质控结果在质控图上的位置判断其是否在控，如果判断为失控，则应按规定程序寻找原因。

三、检测项目的输入和测定

每份样品可以任选分析仪中已设置且试剂室内已预置试剂的项目中的一项、几项或全部项目的检验。

1）批量输入方式：对于有连续相同的测定项目，可使用批量输入的方法。

2）项目组合输入方式：与某一类疾病相关的检验项目可组合在一起，同时输入。

3）急诊检验：几乎所有全自动生化分析仪都具备“急诊样品优先检测”的功能。仪器备有急诊标本的分析位置或专用急诊样品架，以及急诊样品的专用编号。一旦设定了急诊检验的项目，并在急诊样品位置上放置了样品，分析仪就会在常规样品的测定过程中，优先对该样品进行分析测定。

四、测定过程的自动监测

各种自动生化分析仪都具有对测定过程的监测功能，以便提高检测的准确性。高档分析仪的监测功能更强。

1．试剂空白监测

每种试剂都有一定的空白吸光度范围，试剂空白吸光度的改变往往提示该试剂的变质：如利用Trinder，反应为原理的检测试剂会因酚被氧化为醌而变为红色，碱性磷酸酶、γ－谷氨酰转移酶、淀粉酶等检测试剂会因基质分解出硝基酚或硝基苯胺而变黄，有些试剂久置后变浑浊。这些情况均可使空白吸光度升高。丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶等负反应，在放置过程中其试剂空白吸光度会因NADH 自行氧化为NAD^+而下降等等。

试剂空白的测定方法：①每瓶试剂在使用前先检测其试剂空白吸光度。这种方式适用于先加样品后加试剂的分析仪。②每个样品测定之初，均检测试剂空白吸光度，适用于先加试剂后加样品的分析仪。

2．试剂空白变化速率监测

一些酶试剂在反应温度下不稳定，其空白吸光度可随时间逐渐发生变化，这种变化的主要原因与工具酶或辅酶的纯度有关，且因试剂的组成和生产厂家的不同而不同。这种试剂的空白变化将会影响测定结果的准确性，通常导致检测结果偏高。如果设置此项监测，则分析仪在结果计算时会自动减去试剂空白变化速率。

3．样品信息监测

样品的溶血、脂浊、黄疸等会对测定结果产生非化学反应的干扰，根据溶血、脂浊、黄疸的光谱吸收特性，用双波长或多波长检测其性质和程度。一般是测定样品在600nm/570nm、700nm/660nm 和505nm/480nm 吸光度比值的大小来分别判断样品溶血、脂浊和黄疸程度。然后在结果计算时自动校正，以部分减少干扰程度。

4．结果可靠性监测

1）终点监测：终点法测定要判断所选的测光点是否到达终点或平衡点。一些分析仪在所选终点后再选一个测光点，比较这两点吸光度的差异来判断反应是否到达终点。

2）线性期监测：连续监测法选择时间－吸光度反应曲线上的线性期来计算酶活性或被测物浓度，因此，仪器要确定此连续监测期是否呈线性。其监测方法为：①将连续监测到的各吸光度值进行线性回归，计算出各点的方差，根据方差值的大小来判断是否呈线性；②取连续监测期开始若干点的变化速率与连续监测期最后若干点的变化速率进行比较，来判断是否为线性期。

5．底物消耗的监测

在连续监测法、两点法测定酶活性时，如果监测期内吸光度上升或下降超过某一吸光度变化范围，则说明该样品酶活性非常高，底物已接近被耗尽，监测期的吸光度将偏离线性，使测定结果不可靠。此时不打印结果或打印结果同时也打印出底物耗尽提示，该样品应稀释一定倍数重新测定。此监测对于采用负反应分析酶活性的方法甚为重要。

6．方法线性范围监测

每种待测物都有一个可测定的浓度或活性范围，样品结果若超过此范围，分析仪将显示测定结果超过线性范围的提示，多数分析仪会自动将样品减量或增量重新测定。

五、分析仪的维护

分析仪的常规维护是保证分析仪能够正常运行的重要手段。要严格根据操作手册的

要求对其进行维护，一般包括每天维护、每周维护、不定期维护等几方面。

1）每天维护：清洗样品针、试剂针和搅拌棒。特别是搅拌棒容易缠粘上纤维蛋白，是最常见的交叉污染源。

2）每周维护：执行比色杯清洗程序对比色杯进行清洗，然后对比色杯进行空白吸光度检查。对于用恒温水浴方式进行保温反应的仪器，要对恒温水槽进行清洗。

3）不定期维护：是指对一些易磨损的消耗部件进行检查与更换。如检查进样注射器是否漏水，检查各冲洗管路是否畅通，检查各机械运转部分是否工作正常，及检查比色杯是否需要更换，光源灯泡是否需要更换等。

六、分析仪的数据联网

分析仪的数据联网是指分析仪与实验室网络系统之间分析数据的互传与共享。数据联网的实现是通过分析仪的数据接口以及接口软件来完成。通过数据联网，能使来自分析仪的结果在网络软件的强大功能下得到进一步的处理：如报告单的格式（形式）更加为医生与患者所接受；患者的个人信息及其检验结果能长期保存；结果的分析与管理更为完善等。

第五节　干片式自动生化仪简介

干片式自动生化仪由干片试剂和检测仪器两部分组成。

一、仪器结构和工作原理

（一）干片试剂

所有检测项目的试剂都做成干片，成为干片试剂，其结构从上到下一般分为展开层、试剂层、显色层和支持层。

（二）检测仪器

检测仪器也有半自动和全自动之分。半自动分析仪在分析过程中试剂片的选择、放入和待测样品的加入均需要由人工逐个去完成，且测定速度较慢。全自动分析仪只需在样品盘或样品架上放好待测样品，在操作屏幕上设定好需测定的项目，分析仪便会自动选取干片试剂、自动进行定量加样、孵育和检测，且测定速度较快。

二、分析过程原理

待测样品定量加到干片试剂时，由展开层把样品均匀展开，并且阻挡固体物质如红

细胞和大分子物质进入试剂层，同时展开层也为反射光检测提供了一个具有反射作用的背景；样品进入试剂层后，其中待测物质与试剂进行化学反应，试剂层提供了化学反应所需的干式试剂，样品中的水分作为干式试剂的溶剂，同时试剂层的结构也控制了多步化学反应的反应次序；化学反应的产物在显色层与显色试剂起呈色反应，而支持层为一透明胶片。整个过程经历一个规定时间后，由反射光度计进行光度分析，其单色光透过支持层、显色层、试剂层然后反射到接收器，根据反射光的强弱进行定量（图4－12－1）。

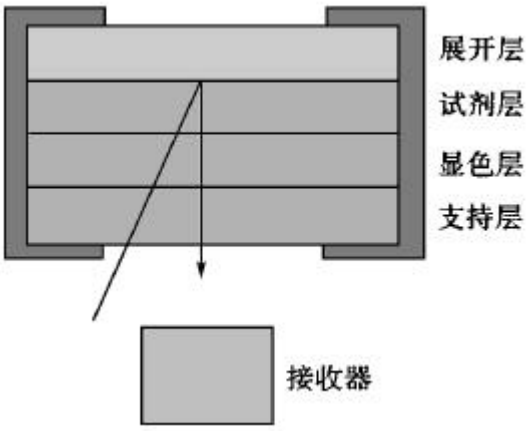


图4－12－1　干式试剂分析原理示意图

由于这类测定方法完全取消了液体试剂，所以也称干化学法。干化学法的特点是仪器体积小，结构简单，容易操作，人为影响因素很少，可以单个项目随机测定，也可以批量同时操作。但干式试剂片只能一次性使用，成本较一般液体试剂要高。

第六节　自动生化分析仪性能评价

一、自动化程度

全自动生化分析仪：从加样至出结果的全过程都由仪器自动完成。操作者只需把样品放在分析仪上一定的位置，输入要测定的项目代号，仪器就会根据分析程序自动地进行操作，并打印出测定结果。由于全自动化操作，并且设有完善的分析过程监测功能，因此，人的主观误差很小，精密度好。

半自动分析仪：分析过程中的某个或某些步骤需手工完成（如加试剂、加样、混合、保温等）。这类仪器体积小，结构简单，价格低，分析过程监测功能较为简单，存在一定的人为误差。

二、分析效率

是指在测定方法相同的情况下，不同分析仪的分析速度。以下因素影响分析效率：

1）通道数：对于单通道分析仪来说，一次只能分析一个项目，要等待这一个或一批相同的项目测定完毕后才能分析另一个项目。而多通道分析仪可同时任选分析多种测定项目，所以分析效率要比单通道高。

2）全自动分析仪在样品量较大，分析项目较多时才能体现出其较高的分析效率。当样品数量很少、分析项目也很少时，可能用半自动分析仪更快一些。

3）对于组合式分析仪则应在规定的项目组合下才能最大限度发挥其分析效率。

4）分析效率还与一次能完成的最大分析项目数、某个或某些试剂瓶的容量、一次投入最大样品量有关。

附录

●方法学评价中NCCLS 评价方案的应用

建立一个新的方法，或引进新的方法、试剂和仪器，都应对它们的技术性能如精密度、方法比较、线性范围以及干扰等作出评价。美国国家临床实验室标准委员会（NCCLS）制订了一套评价方案（Evaluation protocols）能客观而正确地对上述技术性能作出评价。这里介绍Excel 软件用作NCCLS 评价方案的统计学方法。

一、精密度评价

1．目的

评价分析方法、试剂和仪器给出结果的可重复程度，反映精密度好坏的指标是变异系数CV。CV 越小精密度越好，反之则差，故有人称其为不精密度。用本方案评价可以计算出批内、批间、日间和总CV，其中总CV 最重要，它代表整个分析体系的可重复程度。

2．评价前准备

1）对于评价对象（如新建立的方法，或新引进的方法，试剂和仪器）均应有一个熟悉过程，对评价方案亦应熟悉。

2）实验用的试剂应是同次配制，商品试剂盒和参考物应为同一批号，仪器应处于良好的工作状态。

3）精密度实验用的标本一般选择2 个（亦可更多），一个在正常范围或在医学决定水平附近，另一个为异常值。被测物在疾病时升高者用高值，降低者用低值。实验标本的介质应与临床标本一致，并应妥善保存，应保证在整个实验过程中稳定。

4）先作一个初步的批内精密度测定，即一个标本重复测定20 次，计算出均值、标准差和变异系数。

3．评价步骤

以氧化法测定总胆红素的精密度评价为例。

1）数据测定：2 个标本每天测定2 次（1 次测定间隔不得少于2h），每次测定均作双份，共测定20d。每次测定至少做一个质控。

2）离群点的检查：如每次双份测定的差值超过初步精密度测定时±标准差的5.5 倍（可信限99.99％），这对数据为“离群点”，应弃去或重做。

4．统计分析

打开Excel 软件，建立一个新文件。

在A1 栏输入：表1 总胆红素测定方法的精密度评价结果。

在A2、A3 栏和B2、C2 栏分别合并单元格后分别输入：天数和次数1。

在B3 栏和C3 栏分别输入：结果1 和结果2。

在D2、E2 合并单元格后输入：次数2。

在D3 栏和E3 栏分别输入：结果1 和结果2。

在F2、F3 栏G2、G3 栏H2、H3 栏分别合并单元格后分别输入：次数1 平均，次数2 平均和日平均。

在I2、I3 栏J2、J3 栏K2、K3 栏分别合并单元格后分别输入：次数1（结果1－2）^{2}，次数2（结果1－2）^{2} 和（次数1 平均一次数2 平均）^{2}。

在A4－A23 栏B4－B23 栏C4－C23 栏D4－D23 栏E4－E23 栏分别输入：实际测定次数，实际测定第一次结果1 数，实际测定第一次结果2 数，实际测定第二次结果1 数，实际测定第二次结果2 数。

在F4 栏输入：＝（B4＋C4）／2，并用复制键一直复制到F23 栏。

在G4 栏输入：＝（D4＋E4）／2，并用复制键一直复制到G23 栏。

在H4 栏输入：＝（B4＋C4＋D4＋E4）／4，并用复制键一直复制到H23 栏。

在I4 栏输入：＝（B4－C4）×（B4－C4），并用复制键一直复制到I23 栏。

在J4 栏输入：＝（D4－E4）×（D4－E4），并用复制键一直复制到J23 栏。

在K4 栏输入：＝（F4－G4）×（F4－G4），并用复制键一直复制到K23 栏。

在A24、B24 栏和E24、F24 栏分别合并单元格后输人：批间s 和日间s。

在C24 栏和G24 栏分别输人：=SQRT （SUM （K4 ：K23）／ 2 ×20)) 和=sTDEV (H4 ：H23)。

在A25、B25 栏和E25、F25 栏分别合并单元格后输入：A 和B。

在C25 栏和G25 栏分别输入：=SUM （4 ：I23） 和=SUM （J4 ：J23)。

在A26、B26 栏和E26、F26 栏分别合并单元格后输入：C 和日平均。

在C26 和G26 栏分别输入：=SUM （K4 ：K23） 和=AVERAGE （H4 ：H23)。

在A27、B27 栏和E27、F27 栏分别合并单元格后输入：批内s 和总s。

在C27 栏和G27 栏分别输入：=SQRT （（C25 +G25）／ 4 ×20)) 和=SQRT （2 × G24 ×G24 +C24 ×C24 +C27 ×C27）／2)。

在A28、B28 栏和E28、F28 栏分别合并单元格后输入：批间CV %和日间CV %。

在C28 栏 G28 栏分别输入：=SQRT （SUM （K4 ：K23）／ 2 ×20))／AVERAGE (H4 ：H23） ×100 和=G24／G26 ×100。

在A29、B29 栏和E29、F29 栏分别合并单元格后输入：批内CV %和总CV %。

在C29 栏G29 栏分别输入：=C27／G26 ×100 和=G27／G26 ×100。

输入所有的数据后，即可建立NCCLS 精密度评价自动计算系统，见表1。以后计算其他项目的精密度时只要修改测定数据即可自动计算出结果。

表1　总胆红素测定方法的精密度评价结果

天数	次数1		次数2		次数1	次数2	日	次数1	次数2	(次数1平均－次数2平均)^2
	结果1	结果2	结果1	结果2	平均	平均	平均	(结果1－2)^2	(结果1－2)^2	
1	181	183	182	182	182	182	182	4	0	0
2	183	179	182	181	181	181.5	181.25	16	1	0.25
3	187.34	186.55	187.57	183.48	186.95	185.525	186.235	0.6241	16.7281	2.0164
4	184.16	181.6	187.28	186.55	182.88	186.915	184.898	6.5536	0.5329	16.281225
5	184.4	181.79	185.36	187.57	183.1	186.465	184.78	6.8121	4.8841	11.3569
6	186.96	180.35	183.2	183.48	183.66	183.34	183.498	43.6921	0.0784	0.099225
7	187.28	186.55	183.2	184	186.92	183.6	185.258	0.5329	0.64	10.989225
8	185.36	187.57	183.32	183.28	186.47	183.3	184.883	4.8841	0.0016	10.017225
9	183.2	183.48	187.77	183.63	183.34	185.7	184.52	0.0784	17.1396	5.5696
10	183.2	184	187.34	181.59	183.6	184.465	184.033	0.64	33.0625	0.748225
11	183.32	183.28	186.55	184.16	183.3	185.355	184.328	0.0016	5.7121	4.223025

续表

天数	次数1		次数2		次数1	次数2	日	次数1	次数2	(次数1平均－次数2平均)^2
	结果1	结果2	结果1	结果2	平均	平均	平均	(结果1－2)^2	(结果1－2)^2	
12	187.77	183.63	187.57	184.4	185.7	185.985	185.843	17.1396	10.0489	0.081225
13	187.34	181.59	183.48	186.96	184.47	185.22	184.843	33.0625	12.1104	0.570025
14	186.55	184.16	184	187.28	185.36	185.64	185.498	5.7121	10.7584	0.081225
15	187.57	184.4	183.28	185.36	185.99	184.32	185.153	10.0489	4.3264	2.772225
16	183.48	186.96	183.63	184.16	185.22	183.895	184.558	12.1104	0.2829	1.755625
17	184	187.28	181.59	186.4	185.64	182.995	184.318	10.7584	7.8961	6.996025
18	183.28	185.36	184.16	186.96	184.32	185.56	184.94	4.3264	7.84	1.5376
19	183.63	184.16	184.4	187.28	183.9	185.84	184.868	0.2809	8.2944	3.783025
20	181.59	184.4	186.96	185.36	183	186.16	184.578	7.8961	2.56	10.017225

批间s＝1.492860091　　日间s＝1.163950425

A＝185.1542　　B＝143.8948

C＝89.14525　　日平均＝184.51375

批内s＝2.02808099　　总s＝2.127358096

批间CV％＝0.809077963　　日间CV％＝0.630820427

批内CV％＝1.099148974　　总CV％＝1.152953694

二、方法比较

1．目的

评价一个新建立的方法或新引进的方法和试剂给出的结果是否准确，在实验的范围内两方法间的平均差异，并确定偏差。理论上，两种方法间的差异均作为试验方法的偏差。因此，比较方法应是参考方法或推荐方法，如该测定没有参考方法或推荐方法亦可用公认的常规方法。但须具备：1）比试验方法有更好的精密度；2）干扰影响已知；3）与试验方法使用相同的计量单位。

2．比较前的准备工作

1）实验者应有足够的时间熟悉所用的仪器、试验方法和比较方法，同时还要熟悉评价方案。

2）实验标本应收集新鲜的正常和异常的临床标本，应有足够宽的浓度范围，各浓

度应有合适的比例。如不能及时测定，标本应妥善保存并应在分析物的稳定期内测定。

3．方法比较步骤

以总胆红素测定为例。

（1）样本大小至少为40 个标本，每个标本用2 种方法分别作双份测定，因此，样本应有足够的量，如临床标本的量太少可将2 份含量相近的标本混合。

（2）每天测定8 个标本，双份测定时第一次按顺序1，2，…，7，8，第二次8，7，…，2，1，共测试5d，将数据输入下面编制的Excel 表即可。

打开Excel 软件，建立一个新文件。

在A1 栏输入：表2 总胆红素测定新方法（Y）与J－G（K）法的比较结果。

在A2、A3 栏和B2、C2 栏分别合并单元格后输入：样品和试验方法。

在B3 栏和C3 栏分别输入：结果1（Yil）和结果2（Yi2）。

在D2、E2 合并单元格后输入：比较方法。

在F2 栏到I2 栏依次输入：试验方法、比较方法、试验方法、比较方法。

在D3 栏到O3 栏依次分别输入：结果1（Kil）、结果2（Ki2）、结果1－2（Dyi）、结果1－2（Dxi）、均值（Y）、均值（K）、DXi、DYi、Eil、Ei2、Eil’、Ei2’。

在A4～A43 栏输入：实际测定样品。

在B4～B43 栏输入：试验方法实际测定结果1 数。

在C4～C43 栏输入：试验方法实际测定结果2 数。

在D4～D43 栏输入：比较方法实际测定结果1 数。

在E4～E43 栏输入：比较方法实际测定结果2 数。

在F4 栏到O4 栏依次输入：=ABS（B4－C4）、=ABS（D4－E4）、=（B4＋C4）／2、=（D4＋E4）／2、=G4／14、=F4／H4、=ABS（B4－D4）、=ABS（C4－E4）、=ABS（B4－D4）／D4、=ABS（C－E4）／E4，并用复制键一直复制到各自的43 栏。

在A44 栏输入：方法内复测结果检查：。

在A45、B45 栏和D45、E45 栏分别合并单元格后输入：DX 均值和DX 控制限值。

在C45 栏到I45 栏分别输入：=AVERAGE（A：G43）、=4xC45、DY 均值、=AV－ERAGE（F4：F43）。

在J45、K45 栏和A46、B46 栏以及D46、E46 栏分别合并单元格后输入：DY 控制限值、DX’均值、DX’控制限值。

在IA5、C46、F46、H46、146、IA6 栏分别输入：=4xi45、=AVERAGE（J4：J43）、=4xC46、DY’均值、=AVERAGE（K4：K43）、=4xi46。

在J46、K46 和A48、B48 栏分别合并单元格后输入：DY’控制限值、E。

在A47、C48、F48 栏分别输入：离群点检查：=1/80 * SUM (L4 :L43) +SUM (M4 :M43))、=4 *C48。

在D48、E48 和J48、K48 栏合并单元格后输入：E 的控制限值、E，的控制限值。

在H48、148、IA8 栏输入：E'、=1/80x SUM (N4 :N43) +SUM (O4 :043))、=4xI48。

在A49 栏输入：适用范围的检查 (相关性计算) 和回归计算。

在AS0、B50 栏和E50、F50 栏分别合并单元格后输入：Y 均数＝和X 均数＝。

表2　总胆红素测定新方法 (Y) 与J—G (X) 法的比较结果

样品	试验方法		比较方法		试验方法	比较方法	试验方法	比较方法						
	结果1 (Y_{i1})	结果2 (Y_{i2})	结果1 (X_{i1})	结果2 (X_{i2})	结果1 — 2 (DY_i)	结果1 — 2 (Dx_i)	均值 (Y)	均值 (X)	DX_i'	DX_i'	E_{i1}	E_{i2}	E_{i1}'	E_{i2}'
1	14.54	12	6.5	7.5	2.54	1	13.27	7	0.14286	0.075358	8.04	4.5	1.237	0.6
2	19.04	18	14.3	14.5	1.04	0.2	18.52	14.4	0.01389	0.010799	4.74	3.5	0.331	0.241
3	12.5	11.4	3.39	3.5	1.1	0.11	11.95	3.445	0.03193	0.009205	9.11	7.9	2.687	2.257
4	8.45	8.1	4.53	4.6	0.35	0.07	8.275	4.565	0.01533	0.008459	3.92	3.5	0.865	0.761
5	7.91	7.5	4.36	4.4	0.41	0.04	7.705	4.38	0.00913	0.005191	3.55	3.1	0.814	0.705
6	12.02	12	5.27	5.1	0.02	0.17	12.01	5.185	0.03279	0.014155	6.75	6.9	1.281	1.353
7	6.95	7	4.25	4.1	0.05	0.15	6.975	4.175	0.03593	0.021505	2.7	2.9	0.635	0.707
8	28.42	26	21.39	22	2.42	0.61	27.21	21.695	0.02812	0.22418	7.03	4	0.329	0.182
9	12.7	10	7.05	7	2.7	0.05	11.35	7.025	0.00712	0.004405	5.65	3	0.801	0.429
10	17.56	16	13.92	14.2	1.56	0.28	16.78	14.06	0.01991	0.016687	3.64	1.8	0.261	0.127
11	14.65	14	6.71	7	0.65	0.29	14.325	6.855	0.0423	0.020244	7.94	7	1.183	1
15	43.2	44	43.63	44	0.8	0.37	43.6	43.815	0.00844	0.008486	0.43	0	0.01	0
16	85	86	85.61	87	1	1.39	85.5	86.305	0.01611	0.016257	0.61	1	0.007	0.011
17	22.34	21	17.49	18	1.34	0.51	21.67	17.745	0.02874	0.023535	4.85	3	0.277	0.167
18	23.85	22	19.96	21	1.85	1.04	22.925	20.48	0.05078	0.045365	3.89	1	0.195	0.048
19	30.24	28	25.35	26	2.24	0.65	29.12	25.675	0.02532	0.022321	4.89	2	0.193	0.077
20	40	38	34.66	35	2	0.34	39	34.83	0.00976	0.008718	5.34	3	0.154	0.086
21	60.97	57	56	58	3.97	2	58.985	57	0.03509	0.033907	4.97	1	0.089	0.017
22	104.94	101	100.37	102	3.94	1.63	102.97	101.185	0.01611	0.01583	4.57	1	0.046	0.01
23	225.34	224	230	227	1.34	3	224.67	228.5	0.01313	0.013353	4.66	3	0.02	0.013
24	19.69	18	15.3	16	1.69	0.7	18.845	15.65	0.04473	0.037145	4.39	2	0.287	0.125
25	20	17.9	19	18	2.1	1	18.95	18.5	0.05405	0.05277	1	1	0.053	0.006
26	21.32	22	16.93	18	0.68	1.07	21.66	17.465	0.06127	0.0494	4.39	4	0.259	0.222
27	24.45	22	19.19	21	2.45	1.81	23.225	20.095	0.09007	0.077933	5.26	1	0.274	0。048

续表

样品	试验方法		比较方法		试验方法	比较方法	试验方法	比较方法						
	结果1 (Yi1)	结果2 (Yi2)	结果1 (Ki1)	结果2 (Ki2)	结果1 －2 (DYi)	结果1 －2 (Dxi)	均值 (Y)	均值 (K)	DX_i'	DX_i'	Ei1	Ei2	Ei1'	Ei2'
28	28.99	27	25.38	26	1.99	0.62	27.995	25.69	0.02413	0.022147	3.61	1	0.142	0。038
29	39	40	39.49	40	1	0.51	39.5	39.745	0.01283	0.012911	0.49	0	0.012	0
30	68.73	65	63.97	64	3.73	0.03	66.865	63.985	0.00047	0.000449	4.76	1	0.074	0.016
31	110	108	107.5	108	2	0.5	109	107.75	0.00464	0.004587	2.5	0	0.023	0
32	211.32	208	210.67	208	3.32	2.67	209.66	209.335	0.01275	0.012735	0.65	0	0.003	0
33	184.39	182	182.81	183	2.39	0.19	183.195	182.905	0.00104	0.001037	1.58	1	0.009	0.005
34	478.31	475	480	476	3.31	4	476.655	478	0.00837	0.008392	1.69	1	0.004	0.002
35	14	11	9.87	10	3	0.13	12.5	9.935	0.01309	0.0104	4.13	1	0.418	0.1
36	182.33	184	184.02	184	1.67	0.02	183.165	184.01	0.00011	0.000109	1.69	0	0.009	0
37	14.45	12	9.88	11	2.45	1.12	13.225	10.44	0.10728	0.084688	4.57	1	0.463	0.91
38	176.15	175	174.71	175	1.15	0.29	175.575	174.855	0.00166	0.001652	1.44	0	0.008	0
39	235	236	239.4	236	1	3.4	235.5	237.7	0.0143	0.014437	4.4	0	0.018	0
40	106.8	104	92.02	94	2.8	1.98	105。4	93.01	0.02129	0.018786	14.78	10	0.161	0.106
41	199	188	185	189	11	4	193.5	187	0.02139	0.020672	14	1	0.076	0.005
42	220	215	216.89	217	5	0.11	217.5	216.945	0.00051	0.000506	3.11	2	0.014	0.009
43	349	344	350	347	5	3	346.5	348.5	0.00861	0.008658	1	3	0.003	0.009
方法内离群点检查：本例方法内未发现离群点														
DX’均值=1.02625　　控制限值=4.105　　DY 均值=2.22625　　控制限值=8.91														
DX'均值=0.02713　　控制限值=0.1085　DY，均值=0.02089　　控制限值=0.08														
方法间离群点检查：本例两方法间出现2 个离群点														
E=3.3615　　E 的控制限值：13.446　　E’=0.29125　　E’的控制限值；1.17														
适用范围的检查（相关性计算）和回归计算														
Y 均数=86.3806　　X 均数=83.7														
r=0.99955　　b=0.9838　　a=3.9888														

在C50、G50、C51、G51、151、J51 栏分别输入：=（SUM（B4：B43）+SUM（C4：C43））/80、=（SUM（D4：D43）+SUM（E4：E43））/80、=CORREL（B4：C43，D4：E43）、=LINEST（B4：C43，D4：E43）、a、=INTERCEPT（B4：C43，D4：E43）。

在A51、B51 栏和E51、P51 栏分别合并单元格后输入：I=和b=。

输入所有的数据后，即可建立NCCLS 方法比较的自动计算系统，见表2。以后计算

其他项目的精密度时只要修改测定数据即可自动计算出结果。

三、线性评价

1．目的

线性范围是分析方法的一个重要技术指标，它能判断对某一分析方法（试剂或仪器）测得的浓度或活性值与设定的浓度或活性值之间的比例关系的范围。

2．线性评价前的准备

（1）对仪器和评价的方法或试剂应有一个熟悉阶段。

（2）作为线性评价的标本其介质应与实际测定的标本相一致（如血清或其他体液），理想的标本是待测的低或高值标本，这往往不易收集到，亦可用待测的混合标本加入分析物作为高值标本，用对照标本作为低值标本（必要时可作处理如分析物为酶可以加热，小分子化合物可以透析，脂类可用超离心或多阴离子沉淀）。

（3）浓度范围的确定，应以分析项目的线性要求为准。线性评价应有5 个不同浓度，可选择低值和高值标本各一个，低值标本为1 号，高值标本为5 号，两者3 ∶1 混匀为2 号，等份混匀为3 号，1 ∶3 混匀为4 号，2～4 号标本的浓度按下式计算：

$$\text{标本浓度}=\frac{C_1V_1+C_5V_5}{V_1+V_5}$$

上式中C 为浓度，y 为体积。

3．线性评价方法

以总胆红素测定为例。

打开Excel 软件，建立一个新文件。

在A1 栏输入：表3 总胆红素测定方法线性分析结果。

在A2 到H2 栏依次输入：X、X^2、Y、2Y、X ΣY、Y^2、ΣY²、SS = ΣY2 -（ΣY）2/4。

在C4 -C7、C9 -C12、C14 -C17、C19 -C22、C24 -C27 栏分别输入：试验方法1 至5 号标本实际测定结果。

在A8、A13、A18、A23、A28 栏分别输入：1555 号标本理论值。

在A29 栏合并单元格后输入：数据计算。

在A30 至H30 栏依次输入：Tx =、=4 ×（A8 +A13 +A18 +A23 +A28）、Ty =、=SUM（C4 ∶C27）、Txx =、=4 ×（A8 ×A8 +A13 ×A13 +A18 ×A18 +A23 ×A23 +A28 ×A28）、Tyy =、=SUM（F4 ∶F27）。

在A31 至H31 栏依次输入：Txy =、=SUM（E8 ∶E28）、TE =、=SUM（H8 ∶H28）、X 均数=、=B30/20、Y 均数=、=D30/20。

在A32 至H32 栏依次输入：D ＝、＝ 20 ：F30） － 30 ：B30）、Tss ＝、＝F32／20、Q ＝、＝20 ×H30 － 30 ×D30）、Lssb ＝、＝ 33／B33）／ 20 ×B32）。

在A33 至D33 栏依次输入：M ＝、＝20 ×B31 －B30 ×D30、Rss ＝、＝D32 －H32。

在A34 栏输入：线性回归分析：。

在A35 至D35 栏依次输入人：b ＝、＝B33／B32、a ＝、＝H31 －B35 ×F31。

在A36 栏输入：稀释变异试验：。

表3　总胆红素测定方法线性分析结果

X	X^2	Y	ΣY	X ΣY	Y^2	ΣY^2	$SS = \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2/4$
		42.7			1823.29		
		44			1936		
		45			2025		
		43.5			1892.25		
47	2209		175.2	8234.4		7676.54	2.78
		88.9			7903.21		
		92			8464		
		94			8836		
		91			8281		
94.5	8930.25		365.9	34577.55		33484.21	13.5075
		180			32436.01		
		185			34225		
		184			33856		
		191			36481		
189	35721		740.1	139878.9		136998	61.0075
		368			135571.24		
		372			138384		

续表

X	X^2	Y	ΣY	X ΣY	Y^2	ΣY^2	$SS = \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2/4$
		369			136161		
		375			140625		
378	142884		1484.2	561027.6		550741.2	28.83
		753			567009		
		754			568516		
		751			564001		
		758			574564		
759	576081		3016	2289144		2274090	26

数据计算

Tx =5870	TY =5781.4	Txx =3063301	Tyy =3002990
Txy =3032862.45	T_E =132.125	X 均数=293.5	Y 均数=289.07
D =2689120	Tss =1331760.702	Q =26635214.04	Lss =1331601.77
M =26720431	Rss =158.9321065		

线性回归分析：

b =0.996691835　　a =−3.45905349

稀释变异试验：

P =0.461740776　界限值$P_{0.05}$ =0.6841 ；$P_{0.01}$ =0.7814，现<0.05，稀释变异可接受.

线性失拟检查：

LOF =26.80710647　G =1.014460037

界限值$F_{0.05}$ =3.29 ；$F_{0.01}$ =5.42 ；现G <$F_{0.05}$ 说明线性良好。

在A37、B37 栏分别输入：P =、=MAX (H8 ×H28) /D31。

在D37 至H37 栏单元格合并后输入：界限值$P_{0.05}$ =0.6841 ；$P_{0.01}$ =0.7814，现<$P_{0.05}$，稀释变异可接受。

在A38 栏输入：线性失拟检查：。

在A39、B39 栏分别输入：LOF =、=D33 −D31。

在C39、D39 栏分别输入：C =、=5 ×B39/D31。

在A41 栏合并单元格后输入：界限值$F_{0.05}$ =3.29 ；$F_{0.01}$ =5.42，现G <$F_{0.05}$ 说明线性良好。

输入所有的数据后，即可建立NCCIS 线性评价自动计算系统，结果见表3。以后计算其项目的精密度时只要修改测定数据即可自动计算出结果。

四、干扰试验

1．目的

判断某测定方法（或试剂）给出的结果是否受非分析物影响及影响程度。

1）干扰是指在测定某分析物的浓度或活性时，受另一非分析物影响而导致测定结果增高（正干扰）或降低（负干扰）。

2）干扰物质可分为内源性（标本中存在的）和外源性（外界污染的）两类。内源性的干扰物有：①血清中固有的代谢产物，如TG 测定时血清中的FG 、肌酐酶法测定时血清中的肌酸等；②病理情况下生成的：如胆红素、脂类、蛋白质、血红蛋白等；③治疗药物、肠道营养等。外源性干扰有：①标本收集中的添加物如抗凝剂、防腐剂、稳定剂、容器和塞子的污染等；②试剂中的杂质和杂酶等。

3）干扰的机制包括物理作用、化学作用以及非特异反应等。

4）干扰对于临床的重要性：测定结果与“真值”间的偏差，可由测定方法的系统误差、不精密度和干扰所引起。干扰可能是造成误差的一个原因，如果干扰物是恒定的将引起恒定误差；如干扰物随病理生理因素影响，将引起随机误差。因此，实验室应了解各种测定方法的干扰情况，主要是指溶血、黄疸和脂血和某些特殊项目的特殊干扰。

2．干扰试验前的准备

1）干扰试验的对象：①厂商研制的新产品。②检测单位和试剂管理单位，检测商品试剂盒。③建立的新方法。④新引进的方法或试剂。

2）应做的主要干扰物：①患者标本中常常出现的黄疸、脂血和溶血。②某些药物如维生素C 等。③实验常用的抗凝剂、防腐剂和稳定剂。

3）质量保证：①不存在系统误差。②批内精密度在可接受范围内。③应不存在前后结果的交叉污染。④实验过程有质控监督。

3．干扰试验方法、“配对差异”试验

即将不同浓度的干扰物加入到实验标本中，然后分别测定加与不加干扰物的标本，比较两者有无偏差，并了解干扰物浓度场与偏差程度的关系。

4．试验步骤

1）实验材料选择混合血清1 份，分成2 份。一份加入干扰物，含量为临床标本中可能出现的最高含量，另一份不加，按比例混合成5 个不同干扰物浓度。（见线性评价）

2）每份标本重复测定n 次，计算分析：干扰各组均值—未加干扰物相应组的均值：干扰值。对照这一浓度±1.96s，可得出某浓度内有无干扰。

3）打开Excel 软件，建立一个新文件。

在A1 栏输入：表4 胆红素测定甘油三酯干扰试验结果。

在A2 至E2 栏依次输入：基础值、TG2.8mmol/L、TG5.6mmol/L、TG8.4mmol/L、TGll.2mmol/L。

在A3 —A22、B3 —B6、C3 —C6、D3 —D6、E3 —E6 栏分别输入：1 至5 号标本实际测定结果。

在A23、B23、A24、B24 栏依次输入：基础值均数、=AVERAGE (A3 :A22)、基础值SD、=STDEV (A3 :A22)

在A25、B25 栏和A26、B26 栏分别合并单元格后输入：干扰无影响上限和干扰无影响下限。

在C25 和C26 栏输入：=B23 +1.95 ×B24 和=B23 —1.95 ×B24。

在A27 至A30 栏依次输入：TG2.8 的均数、TC5.6 的均数、TG8.4 的均数、TGll.2 的均数。

在B27 至B30 栏依次输入：=AVERAGE (B3 :B6)、=AVERAGE (C3 :C6)、=AVEBAGE (D3 :D6)、=AVERAGE (E3 :E6)。

输入所有的数据后，即可建立NCCLS 干扰试验的数据，结果见表4。本例甘油三酯浓度在5.6mm01/L 以下对总胆红素测定无干扰。以后计算其他项目的精密度时只要修改测定数据即可自动计算出结果。

表4　胆红素测定甘油三酯平扰试验结果

基础值	TG2.8mm01/L	TG5.6mill01/L	TG8.4n ’ Ltll01/L	TGll.2mlTl01/L
77	77.51	77.13	71.65	67.15
77.47	77.56	77.4	71.52	68.13
77.1	78.13	77.6	72.19	67.16
77.44	77.79	76.5	72.31	68.68
78.34				
77.61				
77.47				
77.95				
78.08				
77.97				
77				
77.47				
77.1				
77.44				
78.34				
77.61				
77.47				

续表

基础值	TG2.8mmol/L	TG5.6mmol/L	TG8.4mmol/L	TG11.2mmol/L
77.95				
78.08				
77.97				

基础值均数=77.643

基础值SD =0.42157724

干扰无影响范围上限	78.46507562
干扰无影响范围下限	76.82092438
TG2.8 的均数	77.7475
TG5.6 的均数	77.1575
TG8.4 的均数	71.9175
TG11.2 的均数	67.78

●用ROC 曲线评价检验项目的临床准确性

美国国家临床实验室标准化委员会（NCCLS）于1995 年批准“Receiver Perating Characteristic（ROC）曲线用作实验室试验的临床准确性评价”的准则。

ROC 的原意是“接收器工作特性”，首先由通讯领域开始使用，故名。ROC 曲线用作检验项目的临床准确性评价的优点有：①确定某检验项目正常和异常的最佳分界值（cutoff value）。②评价该检验项目的临床诊断准确性（灵敏度和特异性）。③对多项检验项目的临床准确性进行比较。

这里介绍用Execl 软件作ROC 曲线的方法。举例数据来自血清脂肪酶测定的临床准确性评价。

1.ROC 曲线的制作

（1）打开Excel 软件，建立一个新文件（参见表1）。

在A1 栏输入：表名称。

在A2、A3 栏合并单元格后输入：Lipase（U/L）。

在B2、C2 栏合并单元格后输入：急性胰腺炎。

在B3 栏输入：例数。

在C3 栏输入：累计例数。

在D2、E2 合并单元格后输入：非急性胰腺炎。

在D3 栏输入：例数。

在E3 栏输入：累计例数。

在F2、F3 栏合并单元格后输入：灵敏度 (TPR)。

在G2、G3 栏合并单元格后输入：特异性 (TNR)。

在H2、H3 栏合并单元格后输入：1－特异性 (FPR)。

在A4 －A13 栏分别输入：11～、1～、一直到>401。

在B4 －B13 栏输入：胰腺炎组各等级的频数。

在D4 －D13 栏输入：非胰腺炎组各等级的频数。

在C4 栏至C12 栏分别输入：=B4 +C5 依次类推一直至=B12 +C13。

在C13 栏输入：=B13。

在E4 栏输入：=D4。

在E5 栏至E13 栏分别输入：=D5 +E4 依次类推一直至=D13 +E12。

在F5 栏到F13 栏分别输入：=C5/B14 ×100 依次类推一直至C13/B14 ×100

在G5 栏到G13 栏分别输入：=E4/D14 ×100 依次类推一直至=E12/D14 ×100

在H5 栏输入：=100 －G5 并用复制键一直复制到H13 栏。

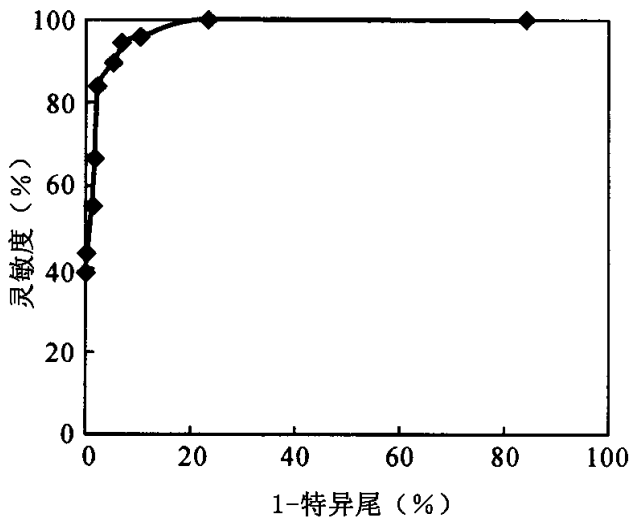
2) 输入所有的数据后，即可建立ROC 曲线评价系统。系统会自动制表，自动计算灵敏度 (真阳性率)、特异性 (真阴性率) 和1－特异性 (假阳性率)。结果见表1。图表类型选定折线图，纵坐标用灵敏度 (%)，横坐标用1－特异性 (%)。结果见图1。

表1　249 例急腹症患者血清脂肪酶测定的频数分布表

Lipase (U/L)	急性胰腺炎		非急性胰腺炎		灵敏度 (TPR)	特异性 (TPR)	1－特异性 (FPR)	诊断界限 (U/L)
	例数	累计例数	例数	累计例数				
10～	0	69	29	29				
21－	3	69	109	138	100.0	16.1	83.9	>20
41～	1	66	24	162	95.7	76.7	23.3	>40
61～	3	65	6	168	94.2	90.0	10.0	>60
81～	5	62	2	170	89.9	93.3	6.7	>80
101～	11	57	6	176	82.6	94.4	5.6	>100
15l～	8	46	1	177	66.7	97.8	2.2	>150
201～	8	38	1	178	55.1	98.3	1.7	>200
301～	3	30	2	180	43.5	98.9	1.1	>300
>401	27	27	0	180	39.1	100.0	0.0	>400
合计	69		180					

2．确定最佳诊断分界值

在ROC 曲线的拐角处找到最接近左上角的点，本例灵敏度94.2％、（1－特异性）93.3％相交的点即是，从该点可确定血清脂肪酶诊断胰腺炎的最佳分界值为80U/L。



1－特异性（%）

图1

249 例急腹症患者血清脂肪酶测定的ROC 曲线

3.ROC 曲线下面积（AUC）的计算及评价

（1）AUC 的计算，可以估价某检验项目的诊断准确性的高低，亦可判别多项检验项目诊断准确性的优劣。Swets 临床检验管理与技术规程的判断标准为：AUC <0.5，认为试验无诊断价值；在0.5～0.7 之间，试验有较低的准确性；在0.7～0.9 之间，试验有一定的准确性；>0.9 时，试验则有较高的准确性。现结合例子对Hanley 法计算AUC 的步骤及评价方法作介绍。

计算AUC 公式如下：以x 表示测定值的等级分类，A_x 表示急性胰腺炎组各等级的频数，N_x 表示非急性胰腺炎组各等级的频数。$A_{>x}$表示急性胰腺炎组各等级高于当前等级的频数，$N_{<x}$表示非急性胰腺炎组低于当前等级的频数。

$$W_x = N_x A_{>x} + 1/2 N_x A_x$$

$$AUC = \frac{\Sigma W_x}{NA}$$

式中N 表示非急性胰腺炎组的总例数，A 表示急性胰腺炎组的总例数。AUC 标准误差的计算用以下公式：

$$Q_{1x} = N_x \left[(A_{>x})_x^A A_{>x} + (A_x)^2/3 \right], \quad Q_{2x} A_x \left[(N_{>x})^2 \right] + N_x N_{>x} + (N_x)^2/3$$

$$Q_1=\frac{\Sigma Q_{1x}}{NA^2},\ Q_2=\frac{\Sigma Q_{2x}}{N^2A}$$

$$SE_{(AUC)}=\frac{AUC(1-AUC)+(A-1)(Q_1-AUC^2)+(N-1)(Q_2-AUC^2)}{NA}$$

AUC 的 $(1-\alpha)$ 双侧可信区间计算用公式为 $AUC\pm SE_{(AUC)}$

（2）打开 Excel 软件，建立一个新文件（参见表2）。

表2　脂肪酶对诊断急性胰腺炎的ROC 曲线下面积计算的有关各量

脂肪酶 (U/L)	非急性胰腺炎者		急性胰腺炎者		W_1	Q_{1x}	Q_{2x}
	N_x	$N_{<x}$	A_x	$A_{>x}$			
10	29	29	0	69	2001	138069	0
21	109	138	3	66	7358	496713	114139
41	24	162	1	65	1572	102968	30324
61	6	168	3	62	381	24198	87732
81	2	170	5	57	119	7085	146207
101	6	176	11	46	309	15974	352484
151	1	177	8	38	42	1769	252051
201	1	178	8	30	34	1161	254899
301	2	180	3	27	57	1626	98284
>401	0	180	27	0	0	0	874800
合计	180	69	11873 (ΣW_x)	789563 (ΣQ_{1x})	2210919 (ΣQ_{2x})		
AUC =	0.9559						
Q_1 =	0.9213						
Q_2 =	0.9890						
$SE_{(AUC)}$ =	0.0336						

在A1 栏输入：脂肪酶对诊断急性胰腺炎的ROC 曲线下面积计算的有关各量。

在A2、A3 栏合并单元格后输入：脂肪酶（U/L）。

在B2、C2 栏和D2、E2 栏分别合并单元格后输入：非急性胰腺炎和急性胰腺炎。

在B3、C3 栏分别输入：NX 和N <X。

在D3、E3 栏分别输入：AX 和A >X。

在F2、F3 栏和G2、G3 栏以及H2、H3 栏分别合并单元格后依次输入：WX、1X、

2X。

在A4 -A13 栏分别输入：11～、21～、一直到>401。

在B4 -B13 栏输入：非急性胰腺炎组各等级的频数。

在D4 -D13 栏输入：急性胰腺炎组各等级的频数。

在C4 栏输入：=B4。

在C5 栏至C13 栏分别输入：=B5 +C4 依次类推一直至=B13 +C12。

在E4 栏输入：=D5 +E5，并复制到E12 栏。

在E13 栏输入：0。

在F4 栏输入：=B4 ×E4 +0.5 ×B4 ×D4，并复制到F13 栏。

在G4 栏输入：=B4 ×（E4 ×E4 +D4 ×E4 +D4 ×D4/3），并复制到F13 栏。

在H4 栏输入：=D4 ×（C4 ×C4 +B4 ×C4 +B4 ×B4/3），并复制到H13 栏。

在A14、15 和B14、15 以及D14、15 分别合并单元格后输入：合计、=SUM（B4：B13）和=SUM（D4：D13）。

在F14、G14、H14 栏分别输入：=SUM（F4：F13）、=SUM（G4：G13）和；SUM（H4：H13）。

在F15、G15、H15 栏分别输入：（ΣW_x）、（ΣQ_{1x}）、（ΣQ_{2x}）。

在A17、18、19 栏依次输入：AUC =、Q_1 =、Q_2 =。

在B17、18、19 栏依次输入：=F14/（B14 *D14）、=C14/（B14 *（D14 *D14））、=H14/（B14 *B14）*D14）。

在A21 和B21 栏分别输入：SE（AUC）：=、=SQRT（（B17 *（1 -B17）+（D14 -1）*（B18 -B17 *B17）+（B14 -1）*（B19 -B17 *B17））/（B14 *D14））。

从计算结果得知本例AUC 的95 %可信区间为：0.9559 ±1.96 ×0.036。

4．多项检验项目间的临床准确性比较

1）判断两种不同诊断试验的ROC 曲线的差异是否有显著性，必须进行统计学检验。现举上例血清脂肪酶为实验1，血清淀粉酶为实验2（血清淀粉酶的AUC 计算方法同血清脂肪酶），得到血清脂肪酶AUC 和SE（Am）分别为0.9559 和0.0336、血清淀粉酶AUC 和SE（Am）分别为0.9494 和0.0153。计算公式如下：

$$Z = \frac{AUC_1 - AUC_2}{SE_{(AUC_1 - AUC_2)}}$$

配对试验

$$SE_{(AUC_1 - AUC_2)} = (SE_{AUC_1})^2 + (SE_{AUC_2})^2 - 2R(SE_{AUC1})(SE_{AUC2})$$

式中R 为表示两种诊断试验相关性的一个量值，需要计算脂肪酶和淀粉酶之间的正常

组和异常组的相关系数（用线性回归计算）的平均值（$r_{正常组}+r_{异常组}$）/2，以及两种诊断试验的AUC的平均值，查“配对设计两种诊断试验AUC差别假没检验用R值表”（参见表3）。本例及值为0.58。

非配对试验

$$SE_{(AUC1-AUC2)}=[SE_{(AUC1)}]^2+[SE_{(AUC2)}]^2$$

（2）Z值计算

打开Excel软件，建立一个新文件。

在A1至A6栏分别输入：AUC1、AUC2、SE（AUC1）、SE（AUC2）、R、Z。

在B1至B5栏分别输入：各对应数据。

在B6栏输入：=（B1-B2）/SQRT（B3*B3+B4*B4-2*B5*B3*B4）。

本例的Z值等于0.2456，查正态分布表，其P>0.05。说明两者间无显著性差异。

表3　配对设计两种诊断试验AUC差别假设检验用R值表

平均相关系数	两种诊断试验的平均AUC											
	0.700	0.725	0.750	0.775	0.800	0.825	0.850	0.875	0.900	0.925	0.950	0.975
0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.02
0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.04	0.03
0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.06	0.04
0.12	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.05
0.14	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.10	0.09	0.08	0.06
0.16	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.12	0.11	0.11	0.09	0.07
0.18	0.16	0.16	0.16	0.16	0.15	0.15	0.14	0.14	0.13	0.12	0.11	0.09
0.20	0.18	0.19	0.18	0.17	0.17	0.17	0.16	0.15	0.15	0.14	0.12	0.10
0.22	0.20	0.20	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.17	0.16	0.15	0.14	0.11
0.24	0.22	0.22	0.21	0.21	0.21	0.20	0.19	0.19	0.18	0.17	0.15	0.12
0.26	0.24	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.21	0.20	0.19	0.18	0.16	0.13
0.28	0.26	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24	0.23	0.22	0.21	0.20	0.18	0.15
0.30	0.27	0.27	0.27	0.26	0.26	0.25	0.25	0.24	0.23	0.21	0.19	0.16
0.32	0.29	0.29	0.29	0.28	0.28	0.27	0.26	0.26	0.24	0.23	0.21	0.18
0.34	0.31	0.31	0.31	0.30	0.30	0.29	0.28	0.27	0.26	0.25	0.23	0.19

续表

平均相关系数	两种诊断试验的平均AUC											
	0.700	0.725	0.750	0.775	0.800	0.825	0.850	0.875	0.900	0.925	0.950	0.975
0.36	0.33	0.33	0.32	0.32	0.31	0.31	0.30	0.29	0.28	0.26	0.24	0.2
0.38	0.35	0.35	0.34	0.34	0.33	0.33	0.32	0.31	0.30	0.28	0.26	0.22
0.40	0.37	0.37	0.36	0.36	0.35	0.35	0.34	0.33	0.32	0.30	0.28	0.24
0.42	0.39	0.39	0.38	0.38	0.37	0.36	0.36	0.35	0.33	0.32	0.29	0.25
0.44	0.41	0.40	0.40	0.40	0.39	0.38	0.38	0.37	0.35	0.34	0.31	0.27
0.46	0.43	0.42	0.42	0.42	0.41	0.40	0.39	0.38	0.37	0.35	0.33	0.29
0.48	0.45	0.44	0.44	0.43	0.43	0.42	0.41	0.40	0.39	0.37	0.35	0.30
0.50	0.47	0.46	0.46	0.45	0.45	0.44	0.43	0.42	0.41	0.39	0.37	0.32
0.52	0.49	0.48	0.48	0.47	0.47	0.46	0.45	0.44	0.43	0.41	0.39	0.34
0.54	0.51	0.50	0.50	0.49	0.49	0.48	0.47	0.46	0.45	0.43	0.41	0.36
0.56	0.53	0.52	0.52	0.51	0.51	0.50	0.49	0.48	0.47	0.45	0.43	0.38
0.58	0.55	0.54	0.54	0.53	0.53	0.52	0.51	0.50	0.49	0.47	0.45	0.40
0.60	0.57	0.56	0.56	0.55	0.55	0。54	0.53	0.52	0.51	0.49	0.47	0.42
0.62	0.59	0.58	0.58	0.57	0.57	0.56	0.55	0.54	0.53	0.51	0.49	0.45
0.64	0.61	0.60	0.60	0.59	0.59	0.58	0.58	0.57	0.55	0.54	0.51	0.47
0.66	0.63	0.62	0.62	0.62	0.61	0.60	0.60	0.59	0.57	0.56	0.53	0.49
0.68	0.65	0.64	0.64	0.64	0.63	0.62	0.62	0.61	0.60	0.58	0.56	0.51
0.70	0.67	0.66	0.66	0.66	0.65	0.65	0.64	0.63	0.62	0.60	0.58	0.54
0.72	0.69	0.69	0.68	0.68	0.67	0.67	0.66	0.65	0.64	0.63	0.60	0.56
0.74	0.71	0.71	0.70	0.70	0.69	0.69	0.68	0.67	0.66	0.65	0.63	0.59
0.76	0.73	0.73	0.72	0.72	0.72	0.71	0.71	0.70	0.69	0.67	0.65	0.61
0.78	0.75	0.75	0.75	0.74	0.74	0.73	0.73	0.72	0.71	0.70	0.68	0.64
0.80	0.77	0.77	0.77	0.76	0.76	0.76	0.75	0.74	0.73	0.72	0.70	0.67
0.82	0.79	0.79	0.79	0.79	0.78	0.78	0.77	0.77	0.76	0.75	0.73	0.70
0.84	0.82	0.81	0.81	0.81	0.81	0.80	0.80	0.79	0.78	0.77	0.76	0.73
0.86	0.84	0.84	0.83	0.83	0.83	0.82	0.82	0.81	0.81	0.80	0.78	0.75
0.88	0.86	0.86	0.86	0.85	0.85	0.85	0.84	0.84	0.83	0.82	0.81	0.79
0.90	0.88	0.88	0.88	0.88	0.87	0.87	0.87	0.86	0.86	0.85	0.84	0.82

第 五 篇

免疫学检验

第一章　临床免疫学检验基本技术

免疫学检验技术正随着免疫学和细胞生物学、分子生物学、免疫化学等相关学科的不断发展而日趋完善，成为检验医学领域的重要检测技术，为某些疾病的诊断、治疗和疗效监测提供新的手段。

临床免疫学检验技术包括体液和细胞免疫学检验技术。体液免疫学检验技术是根据抗原和抗体特异性结合原理，用已知的抗原或抗体，检测相应的抗体或抗原。目前这方面的技术发展很快，从经典的抗原抗体反应（凝集和沉淀反应等）发展到标记免疫学技术，从手工操作发展到全自动智能化操作。体液免疫学检验技术已广泛应用于内分泌疾病、肿瘤、传染病、免疫性疾病、移植免疫以及机体免疫功能评价等诊断与治疗监测，成为临床免疫科的主要工作任务。细胞免疫学检验技术主要是对免疫细胞进行分离、鉴定、计数和功能测定，从而反映机体免疫功能水平，用于免疫性疾病的发病机制和诊断、预后判断、疗效评价的研究。

本章主要介绍目前临床上常用的免疫学检验技术的原理、方法学类型、实验操作及临床应用。

第一节　免疫学检验技术原理

一、抗原

抗原（Antigen，Ag）是指能通过与T细胞或B细胞的抗原受体特异性结合而激活淋巴细胞并与其相应产物（抗体或致敏淋巴细胞）发生特异性结合反应的物质。从本质上看，抗原具有两重性：免疫原性和抗原性。所谓免疫原性是指能刺激机体产生免疫应答，包括诱导产生抗体及致敏T淋巴细胞；抗原性是指能与免疫应答的产物（抗体或致敏淋巴细胞）在体内或（和）体外发生特异性反应的能力。只有免疫原性而无抗原性的物质称为半抗原。体液免疫学检验涉及的是抗原的抗原性。

（一）决定抗原免疫原性的因素

一种物质能否成为抗原是由许多因素决定的。首先决定于其本身的若干性质，同时

也取决于宿主的免疫状况和免疫方式。下面阐述其本身因素。

1．抗原异物性

抗原异物性是针对机体免疫系统而言的，根据异物性将抗原分为自身抗原和外来抗原。自身抗原指免疫系统从未接触过的自身物质（如精子、眼晶状体蛋白、甲状腺球蛋白），因外伤或手术不慎等原因使这些物质进入血流，引起自身免疫应答；外来抗原指对机体产生免疫应答的非己物质，抗原与机体的种属关系越远，其差异越大，抗原性也就越强。

2．抗原分子大小

作为一种抗原，其分子量至少4000u；作为一种好的抗原，其分子量必须超过10000u；具有很强免疫原性的抗原，其分子量往往大于100000u。这是因为抗原分子量越大，抗原表位的种类和数量就越多。

3．抗原分子结构

一般来讲，一个分子的结构越复杂，抗原表位就越多，其抗原性就越强。天然蛋白质，不论是单纯的蛋白质还是糖蛋白、核蛋白或脂蛋白，结构都比较复杂，常有多个不同的表位，故为良好的抗原。少数结构复杂的多糖（如肺炎球菌荚膜多糖）也可作为抗原。

4．抗原分子构象

抗原分子的构象对于免疫原性也是至关重要的。某一分子由于变性或结构松散引起的构象改变可以导致其抗原性的改变。抗原物质的变性常引起原有表位丢失和新表位出现，导致抗原的免疫原性改变。

（二）抗原特异性的物质基础——抗原表位

抗原特异性主要表现在两个方面，即抗原免疫原性的特异性和抗原性的特异性。特异性是免疫应答中最重要的特点，也是进行免疫学诊断的理论依据。

抗原特异性的物质基础是存在于抗原表面的特殊基团，即抗原表位。抗原表位是被免疫细胞识别的靶结构，抗原表位的性质、数目和空间构型决定着抗原的特异性。抗原分子表面能与抗体分子结合的表位的总数称为抗原结合价，包括抗原表面功能价及其内部非功能价。一般指抗原结合价为功能价。有些半抗原一个表位只能与抗体分子中的一个结合点结合，称单价抗原，这类抗原只能用竞争法进行检测。大多数天然抗原分子结构十分复杂，分子表面带有多个相同和不同的表位，这类抗原就可以用双抗体夹心法进行检测。

㈢ 抗原的分类

对抗原物质进行分类的方法很多，但为了有利于理解对抗原抗体方法学设计和检测结果的分析，我们把临床上所检测的抗原按以下两种抗原分类法进行分类与归纳。

1．根据抗原来源与机体的亲缘关系进行分类

1） 异种抗原：指来自另一物种的抗原性物质。临床上检测的各种病原微生物（细菌、真菌、病毒等）及其代谢产物（例如外毒素）都属于异种抗原。检测血清中抗某一病原微生物或其毒素的抗体可作为相应感染性疾病的诊断和流行病学调查指标。此外，这些病原微生物可作为抗原免疫动物制备抗体，作为检测病原微生物的试剂。

2） 同种异型抗原：指来自同一种属而基因型不同的个体的抗原性物质。同种异型抗原基本上由机体细胞和组织成分组成。如临床上所检测的人类红细胞ABO 血型抗原，Rh 抗原，MHC 抗原、血小板抗原等。这种个体间的抗原性差异虽不像异种抗原的免疫原性那么强，但也可在同种间引起免疫应答。

3） 自身抗原：指能引起自身免疫应答的自身组织成分，导致机体产生抗自身抗原的抗体。目前临床上已有多种自身抗体检测可作为临床诊断免疫相关疾病的参考指标，如抗类风湿因子抗体、抗双链DNA 抗体及抗乙酰胆碱受体抗体等。

4） 肿瘤抗原：指由于正常细胞基因调控失调或病毒基因诱发细胞突变，使细胞癌变并表达某种在正常情况下没有的或含量极低的癌性物质。按其特异性，可分为肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原。目前用于临床检测的肿瘤抗原多为肿瘤相关抗原，例如甲胎蛋白、癌胚抗原及糖链抗原等。

2．根据抗原的化学组成不同分类

可分为蛋白质抗原、脂蛋白抗原、糖蛋白抗原、多糖抗原、多肽抗原和核蛋白抗原等。不同的抗原物质由于其化学组成和理化性质不同，体外与抗体反应所要求的实验环境因素亦不同，在进行检测时均应根据不同性质的抗原，选用合适的检测方法和实验条件，以便获得最理想的实验结果。

二、抗体

抗体（antibody，Ab）是机体在抗原刺激下所产生的能与相应抗原发生特异性结合反应的一类免疫球蛋白。抗体特异性是临床免疫学试验在临床广泛应用的基础，对于抗原的分析鉴定和定量检测极为重要。

(一) 免疫球蛋白的基本结构

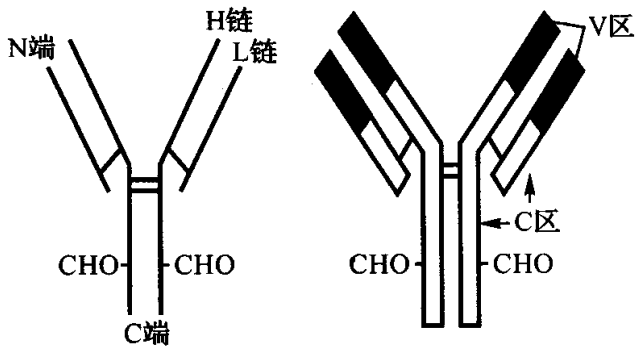


图5-1-1　免疫球蛋白单体的基本结构

免疫球蛋白（immunoglubin，Ig）单体的基本结构由4条肽链［即2条轻链（L链）和2条重链（H链）］通过二硫键连接而成（图5-1-1）。L链有2种类型，K型和γ型。同一抗体分子中2条L链是同一型的；H链有α，δ，ε，γ和μ这5种类型。相同的2条H链通过链间二硫键（—S—S—）连接，呈Y型：相同的2条L链也分别通过链间的二硫键与H链，呈Y双臂相连。Ig根据H链不同，分成IgE、IgD、IgA、IgG、IgM5种。

(二) Ig的分区和抗原结合部位

Ig的L链和H链，在从N－端起100多个氨基酸组成的区域，氨基酸的组成和排列顺序多变，称为可变区（V区）。Ig分子中V区以外的部分，也就是在Ig近C端L链的1/2及H链的3/4（或4/5）区域内，其氨基酸组成和序列在同一种系的同一类Ig中相对恒定，称为恒定区（C区）。

V区由L链的N端107个氨基酸残基（VL）和H链的N端107～130个氨基酸残基（VH）组成。VL和VH各有3个区域的氨基酸残基种类和顺序特别多变，所以称为超变区（HVR），为Ig分子的抗原结合部位；因其与抗原表位是互补的，故又称为互补决定区（CDR），分别称为CDR1、CDR2、CDR3。CDR外的V区部位存在一些相对恒定不变的氨基酸残基，IgV区的空间构象可能通过这些较保守残基形成一定的主体结构，即支架结构，夹持着CDR，称为骨架区（FR）。V区有4个FR、3个CDR区被FR1、FR2、FR3、FR4间隔开，构成一个稳定的抗原结合部位。

㈢ 抗体的质量指标与保存

1．免疫学检测的抗体质量指标及评价

用于免疫学检测时选择抗体应考虑多种因素，最为重要的是特异性、亲和力以及抗体的类别、纯度、稳定性等。因此，对抗体效价、特异性、亲和力等方面应作全面的评价。

⑴ 抗体效价：指血清中所含抗体的浓度或含量，通常用使抗原抗体出现可见反应的抗体最大稀释倍数来表示。在临床免疫学检验中对抗体的效价要求较高。

⑵ 抗体纯度：指抗体免疫球蛋白占抗体溶液中蛋白质总量的百分含量。在大多数临床免疫学检验中对抗体的纯度有一定要求。因此，根据试验，需对抗体进行纯化。

⑶ 抗体特异性：指抗体对相应的抗原及近似抗原物质的识别能力，特异性高则抗体的识别能力强。特异性通常以交叉反应率来表示，交叉反应率低，表示抗血清的特异性好；反之则特异性差。在临床免疫检验中要求抗体的特异性强，即抗体只针对某一抗原，对其他抗原没有交叉反应，这种抗原抗体反应是真正的特异性反应。由于单克隆抗体是针对抗原的单一表位，故用双抗夹心法时，包被固相载体最好选用抗某一抗原表位的单克隆抗体，酶标记则用多克隆抗血清，或设计夹心试验时可选用两种针对同一分子、但针对抗原不同表位的单克隆抗体，即选用一种单克隆抗体作为包被抗体，而抗同一抗原分子不同表位的另一种单克隆抗体作为酶标抗体。由于此两种抗体可结合同一抗原分子的不同表位以形成夹心，因此，便于检测待测物。

⑷ 抗体亲和力：指抗体与抗原结合的牢固程度。亲和力的高低主要是由抗体分子的结合位点与抗原表位之间立体构型的合适度决定的。维持抗原抗体复合物稳定的分子间力有氢键、疏水键、库仑引力、范德华引力。高亲和力抗体能与抗原表位形成不易解离的抗原抗体复合物，低亲和力抗体则相反。

2．抗体的保存

经过56 ℃，30 min 加热灭活后，加入适当的防腐剂保存。一般常用最终浓度为1／10000 的硫柳汞、1／1000 （或1／5000） 的叠氮钠或加入等量的中性甘油。置 -20 ℃以下低温保存，数月甚至数年内抗体效价无明显变化。但应防止反复冻融，反复冻融几次则效价明显降低。抗体 （抗血清或单克隆抗体） 也可冷冻干燥后置4 ℃冰箱保存，5 ～10 年内效价不会明显降低。一些贵重的抗体试剂及大批量的同一类抗体试剂最好置于有停电警报装置及专门供电系统的低温冰箱保存。从冰箱取出试剂后应置室温缓慢融化，不宜加温促融。

抗体低温保存应分装小瓶，以备取出后在短期内用完，特别是单克隆抗体及标记抗

体更应如此。

三、抗原抗体反应

抗原抗体反应是指抗原与抗体之间发生的特异性结合反应，既可发生于体内，也可发生于体外。体液免疫学检验技术就是依据抗原抗体反应的基本原理而设计的体外实验，其应用极为广泛，如机体内特种蛋白质、某些激素、治疗药物、肿瘤标志物的测定等。

㈠ 抗原抗体反应的基本原理

抗原抗体反应可分为特异性结合阶段及可见反应阶段，后者是抗原抗体复合物在环境因素的影响下，表现为肉眼可见的反应。抗原抗体反应的特异性结合是由于抗原表位和抗体Fab 段超变区之间具有互补性。抗原抗体结合有4 种分子间的引力作用，即库仑引力、范德华引力、氢键结合力及疏水作用。当pH 值和离子强度在生理条件下，这些引力通常是最大的，当pH 值低于3～或高于10.5 时，这些引力就非常弱，以致抗原抗体复合物易解离。因此，合适的pH 值和离子强度是抗原抗体反应的必要条件。

㈡ 抗原抗体反应的特点

1．特异性

抗原抗体的结合实质上是抗原表位与抗体超变区中抗原结合部位之间的结合。由于两者在结构和空间构型上呈互补关系，所以抗原抗体的结合具有高度特异性，这种高度特异性可精确区分物质间的极细微的差异。如果两种不同抗原分子上有相同的抗原表位或抗原表位与抗体间构型部分互补，皆可出现交叉反应。交叉反应给免疫学诊断带来困难，对于多克隆抗体常采用吸收反应制备单价的特异性抗血清；对于单克隆抗体应选择针对抗原上特异性表位的单克隆抗体。

2．抗原抗体结合的比例性

抗原与抗体分子的结合能否出现肉眼可见的反应，取决于两者的比例。若比例合适，则可形成二维晶格状结构的抗原抗体复合物；若比例不合适，则形成体积小、肉眼不可见的免疫复合物。根据抗原抗体分子的比例及形成免疫复合物大小的关系，将其分为抗体过剩区，又称前带；两者浓度大致相等区，又称等价带；抗原过剩区，又称后带。

3．抗原抗体结合的可逆性

抗原抗体结合是分子表面的结合，是一种非共价结合。结合虽稳定但可逆，结合后形成的复合物在一定条件下可发生解离，成为抗原抗体的游离状态。抗原抗体相互作用

遵循生物大分子热动力学反应原则，其反应式为：

$$K=\frac{K_1}{K_2}=\frac{[Ag\cdot Ab]}{[Ag]\cdot[Ab]}$$

K 为反应平衡时速度常数；K_1 为结合速度常数；K_2 为解离速度常数。由上式可知，K 值是反映抗原抗体间结合能力的指标，所以抗体的亲和力通常用K 值表示。

四、抗原抗体反应的影响因素

抗原抗体反应的影响因素较多，除了抗原和抗体本身的性质、活性及浓度等之外，还受到各种实验因素的影响。

1．电解质

电解质是抗原抗体反应体系中不可缺少的成分。离子强度可直接影响抗原抗体的结合，抗原与抗体发生特异性结合后，若溶液中无电解质参与，则不出现可见反应。在抗原抗体反应中，为了促使凝集物的形成，常用9g/L 氯化钠溶液作为抗原抗体的稀释液。氯化钠在水溶液中解离成的钠离子和氯离子可分别中和抗原抗体等胶体粒子上的电荷，使胶体粒子的电势下降，促使抗原抗体复合物从溶液中析出，形成可见的凝集物或沉淀物。但如电解质的浓度过高，则可引起蛋白质非特异性沉淀，此种作用称为盐析，常用于抗体的纯化。

2.pH 值

抗原抗体反应必须在合适的pH 值环境中进行，其最适PH 值为6.5～8.5，超过此限度则不易形成复合物，甚至可使复合物解离或出现假阳性结果。pH 值过高或过低均可影响抗原和抗体的理化性质。pH 值达到或接近抗原的等电点（PI）时，即使无相应抗体存在，也会发生非特异性的凝集或沉淀。例如，pH 值降至3.0 时，将出现非特异性的酸凝集，产生假阳性结果。

3．温度

抗原抗体反应，特别是在反应的第二阶段受温度的影响较大。在一定的范围内，温度升高可促进分子运动，抗原与抗体碰撞机会增多，使反应加速。但若温度高于56 ℃，可导致抗原抗体变性或遭破坏，补体被灭活，已形成的免疫复合物亦将发生解离；当反应温度在10 ℃以下时，结合反应速度慢，但结合致密、牢固。常用的抗原抗体反应温度为37 ℃。某些抗原抗体反应有其独特的温度，如冷凝集素在4 ℃左右与红细胞结合最好，20 ℃以上反而解离。

此外，适当的机械性振荡，也可促进抗原抗体分子接触，加速其反应。

五、抗原抗体反应的类型

现代免疫学技术发展很快，在经典血清学试验方法基础上，新的免疫学测定方法日

益增多，使方法的敏感性、特异性和稳定性都有不同程度的提高，检测项目也越来越多。根据抗原抗体反应所产生的现象和结果不同，可分为沉淀反应、凝集反应、补体参与的细胞溶解反应、细菌毒素中和反应、标记的抗原抗体反应。本章主要介绍其中几种在临床免疫学检验中最常用的技术，其他技术请参考相应专业书籍。

第二节　免疫比浊测定技术

免疫比浊测定技术是利用抗原抗体复合物在液相中形成的浊度对入射光产生散射特性来测定抗原含量的一门技术。目前临床上常用的免疫比浊法有免疫透射比浊法、免疫散射比浊法，这些技术可借助各种自动化分析仪来完成。其测定原理示意见图5 -1 -2 。

一、免疫透射比浊法

【原理】

可溶性抗原与抗体形成的免疫复合物，经一定时间后聚合增加了液相浊度，导致液相透射光强度下降。免疫透射比浊法常用吸光度值表示，吸光度值与液相中免疫复合物含量成正比。使用比浊仪测定，与已知浓度的标准参考品抗原相比较，可计算出标本中抗原含量。测定的方法有免疫比浊法和胶乳免疫比浊法。

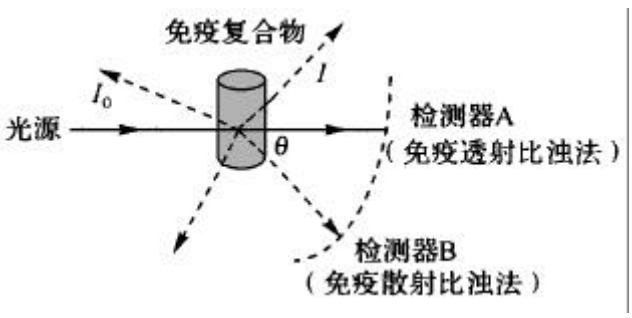


图5 -1 -2　免疫比浊法原理图

1．免疫比浊法

当抗体过剩时，抗原量与抗原抗体反应后形成的液相浊度在一定范围内呈线性关系。应用紫外光可测定抗原抗体复合物浊度。

2．胶乳免疫比浊法

抗体包被在一种颗粒大小适中、均匀一致的胶乳颗粒上，加上抗原时，致敏的胶乳颗粒与抗原相结合，形成大小不等的凝集块。其吸光度值在一定范围内与胶乳凝集程度成正比，而后者与待测抗原量直接相关。根据所测吸光度值，从标准曲线上即可得知待测样本中抗原含量。

【器材】

一般光电比色计、分光光度计、自动生化分析仪等，均可使用。

【试剂】

稀释液、反应液缓冲液、校正血清、质控血清、抗血清等。

以上试剂均有配套试剂盒供应。

【操作】

1）用稀释液将待检样品和标准品按规定稀释，取一定量加至测定管中。

2）加最适工作浓度（用方阵法预先滴定）的抗体，孵育一定时间，测定吸光度值。

3）以不同浓度抗原含量为横坐标，吸光度值为纵坐标，绘制标准曲线。从标准曲线可查得待检样品或标本抗原量。

【注意事项】

1）免疫透射比浊测定时，应选用免疫复合物最佳吸收波长，否则将影响灵敏度。

2）标本稀释倍数太高时，抗原量不足，抗体过剩，不能形成足够的浊度，甚至复合物分解等也导致结果偏低。

3）标本应清晰，避免混浊，每次应做标本空白，并用抗血清缓冲液作试剂空白。

4）透射比浊法在操作上类似比色法，供比色用的光电比色计、分光光度计、浓度计、自动生化分析仪等仪器均可使用。

5）比浊法容易受各种因素的影响，且方法的灵敏度低、重复性和准确性差，因此，必须严格控制实验条件。建议谨慎使用本法。

二、免疫散射比浊法

抗原抗体复合物形成的浊度，使入射光产生散射，散射光强度遵守 Rayleigh 散射方程式。散射光强度与免疫复合物数量成正比，也与散射角成正比，而与波长成反比。免疫散射比浊测定法是在入射光的一定角度检测粒子发出的散射光，散射光的强度与复合物的含量呈正比。可分为速率免疫散射比浊法和终点免疫散射比浊法。

（一）速率免疫散射比浊法

【原理】

是一种抗原抗体结合的动态测定法。所谓速率是抗原抗体结合反应过程中，在单位时间内两者结合的速度。速率法是测定最大反应速率，即在抗原抗体反应达最高峰时，测定其复合物形成的量。最大反应速率在抗体过量情况下与抗原的量成正比。

【器材】

速率激光散射比浊仪。

【试剂】

有商品化试剂盒，一般包含：稀释液、反应液缓冲液、校正血清、质控血清、抗血清等。

【操作】

1）用稀释液将待检抗原稀释成一定浓度或在电脑操作界面上输入待检抗原的稀释倍数进行自动稀释。

2）将稀释待检抗原和不同浓度抗原标准品加至试管内，再加入一定量抗体，立即比浊，记录最大速率值。

3）以抗原标准品含量为横坐标，最大速率值为纵坐标，于普通坐标纸上绘制标准曲线。根据待测抗原的最大速率值，查出相应抗原含量。

（二）终点免疫散射比浊法

【原理】

抗原抗体作用一定时间后，其反应达到平衡，测定其复合物形成的浊度。此时复合物的浊度不再受时间的影响，但测定仍应在复合物聚合产生絮状沉淀之前（大约反应数十分钟）进行。

【仪器】

终点激光散射比浊仪。

【试剂】

同速率免疫散射比浊法。

【操作】

1）用稀释液稀释待检抗原和抗原标准品。

2）取一定量稀释待检抗原液和不同浓度抗原标准品溶液加至试管中，加抗体充分混匀，孵育一定时间，比浊。

3）以抗原标准品量为横坐标，浊度值为纵坐标，绘制标准曲线。根据待检抗原的浊度值，查出抗原含量。

【注意事项】

1）当抗原抗体比例相等时，复合物的形成和解离是相等的。当抗原含量过多时，形成的复合物小，而且倾向于再溶解，可逆反应大；当抗体含量过多时，形成的复合物体积大，且为不溶性，可逆反应小。因此，作为速率比浊，令抗体过剩，有利于复合物的形成。

2）作为免疫反应的抗血清要求效价高、特异性强、纯度高。作为比浊用的抗血清还应具备如下条件：①抗血清的亲和力要大，故抗原免疫动物时可采取小量、长期免疫的方法获得。②各种动物中，以R 型动物（包括羊、豚鼠、家兔等）制备的抗血清亲

和力强，其抗原抗体结合后不易解离。③抗血清须严格处理，可采用高速离心或0.45 μm 超滤膜过滤以排除干扰。长期保存须放－20 ℃冰箱。

5）当试剂条件和反应条件不变时，曲线可相对用一段时间，但不能长期不变。应用质控血清校准，可保证测定值准确、可靠。

4）终点散射比浊法是在抗原抗体反应达到平衡时进行测定，影响因素较多；标本内抗原含量较低时，由于本底（即空白管）的散射较高会使检测敏感性下降，因此，选用本法应慎重。

5）速率散射免疫比浊法是目前比较先进的免疫比浊法，具有速度快、敏感性高（达ng/L 水平）、精确度高、稳定性好的优点，已成为目前测定特定蛋白质的主要方法。

6）光的强度不仅与颗粒（散射核心）的大小和数目有关，且与各种物理因素，如加入抗原或抗体后的时间、光源的强度和波长以及测量角度等均有关系。

三、免疫比浊法的临床应用

主要用于检测血浆（或血清）、尿液、脑脊液、胸腹水中非超微量蛋白质的含量，即通常所称特定蛋白质测定。

1）免疫球蛋白及轻链的检测：IgG、IgM、IgA 和κ、λ型轻链。

2）补体成分的检测：C3、C4。

3）其他蛋白质的检测：血清前白蛋白、白蛋白、α_1－微球蛋白、β_2－微球蛋白、α_1－抗胰蛋白酶、α_1－酸性糖蛋白、结合珠蛋白、铜蓝蛋白、转铁蛋白、C 反应蛋白、类风湿因子、抗链球菌溶血素O 等。

第三节　酶免疫测定技术

酶免疫测定技术（enzyme immunoassay technique，EIT）是以酶标记的抗原或抗体作为主要试剂的免疫测定方法，在抗原抗体的特异性反应后，通过标记酶对底物的酶解呈色，根据呈色的深浅可以对相应抗体或抗原进行定性或定量测定。

根据抗原抗体反应后是否需要分离结合的与游离的酶标记物将酶免疫测定技术分为均相和非均相两种类型。在均相法中结合的酶标记物中酶的活性被抑制，因此，无需进行分离，通过对游离酶标记物的测定即可反映受检物质的量，如酶放大免疫测定技术（enzymemultipled immunoassay technique，EMIT）。在需分离游离和结合的酶标记物的非均相法中，目前临床上常用的分离方法为固相分离法，如酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbentassay，ELISA）。ELISA 已成为目前临床检验中应用较广泛的免疫测定

方法。

【原理】

结合在固相载体表面的抗原或抗体保持其免疫学活性，抗原或抗体的酶结合物既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，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方式与固相载体表面的抗原或抗体起反应。通过洗涤使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，加入酶反应的底物后，底物被结合在固相上的酶催化变为可溶性有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，根据有色产物呈色的深浅对受检标本中抗原或抗体进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高，ELISA 法极大地提高了检测的灵敏度。

1．测定大分子抗原的ELISA

1）双抗体夹心法：先将特异性抗体包被固相载体形成固相抗体，与受检标本相应抗原反应，形成固相抗原抗体复合物；加入酶标抗体，形成固相抗体－抗原－酶标抗体复合物（图5－1－3）。此时，固相载体上带有的酶量与标本中受检抗原的量相关，加入底物显色，根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量分析。

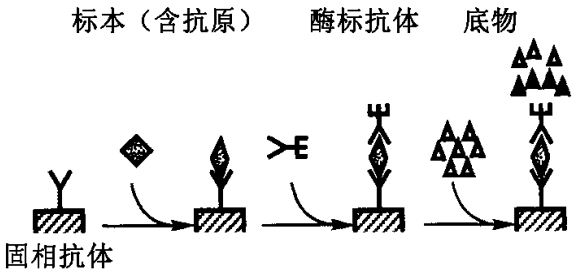


图5－1－3　双抗体夹心法测抗原示意图

2）双位点一步法：在双抗体夹心法中，如利用针对待测抗原分子上两个不同抗原表位的单克隆抗体分别作为包被抗体和酶标抗体时，待测标本和酶标抗体可同时加入，即变成双位点一步法。这种方法简化了操作、缩短了反应时间；但这只能应用于抗原的定性检测。同时应注意“钩状效应”的发生，即当标本中抗原含量很高时，过量抗原分别与固相抗体及酶标抗体结合，而不再形成双抗体夹心复合物，使反应物呈色减弱甚至出现假阴性结果。

2．测定小分子抗原的ELISA ——竞争法

小分子抗原和半抗原因缺乏可作夹心的2 个或2 个以上的位点，因此，不能采用双抗体夹心法，只能采用竞争法进行测定。

竞争法是将标本中的抗原和一定量的酶标抗原与固相抗体竞争结合（图5－1－4）。标本中抗原量愈多，结合在固相上的酶标抗原愈少。因此，抗原含量较多的标本，反应呈色较抗原含量少的标本为淡。小分子激素、药物等的ELISA 测定多采用此法。由于这

些定量测定的准确度要求较高，因此，试剂制备难度较大。

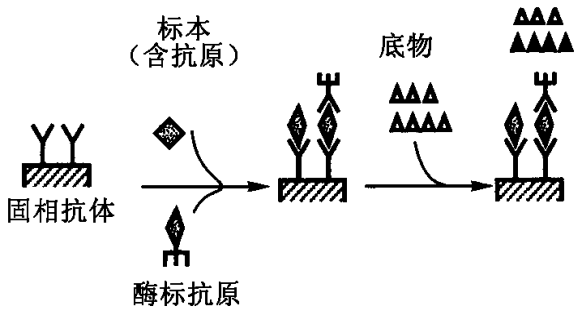


图5－1－4　竞争法测抗原示意图

3．测定IgG 类特异性抗体的ELISA

1）间接法：利用酶标记的抗抗体来检测已与固相抗原结合的受检抗体，最终形成固相抗原－抗体－酶标记的抗抗体复合物（图5－1－5），加入底物显色。呈色深浅与标本中受检抗体量相关。本法主要用于对病原体抗体的检测而进行传染病的诊断。本法的主要缺点为受检标本须经稀释后才能进行测定，否则血清中高浓度的非特异性IgG 和其他干扰物质会使阴性标本本底过高，影响结果的判断。

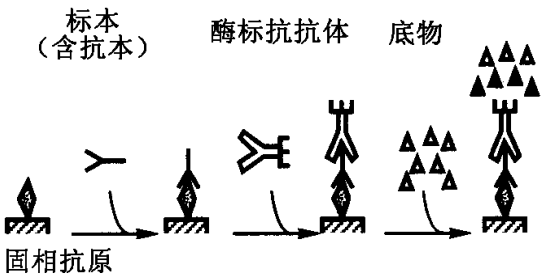


图5－1－5　间接法测抗体示意图

2）双抗原夹心法：用特异性抗原包被和制备酶结合物，检测相应的抗体。此法中受检标本不需稀释，可直接用于测定，因此，其敏感性相对高于间接法。

3）竞争法：标本中的抗体和一定量的酶标抗体与固相抗原竞争结合。标本中抗体量愈多，结合在固相上的酶标抗体愈少（图5－1－6）。因此阳性反应呈色浅于阴性反应。由于纯化抗原难得，在包被时多采用捕获法，即先包被与抗原相应的抗体，然后加入抗原，形成固相抗原。当相应抗原材料中含有与抗人IgG 抗体反应的物质，而且不易得到足够的纯化抗原进行包被时，可采用此法。

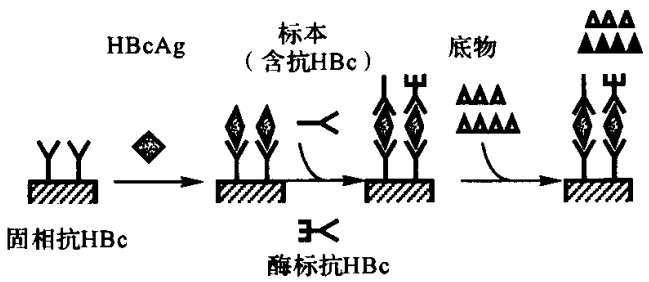


图5－1－6　竞争法测抗体示意图

4．测定IgM 类特异性抗体EUSA ——架桥法

用抗人μ链抗体包被固相后，捕获血清标本中的IgM （其中包括针对抗原的特异性IgM 和非特异性IgM）。然后加入纯化抗原，此抗原仅与特异性IgM 相结合。再加针对抗原的酶标记特异性IgG 抗体，与底物作用，呈色深浅与标本中的特异性IgM 含量成正相关 （图5 —1 —7）。此法常用于病毒性感染的早期诊断。

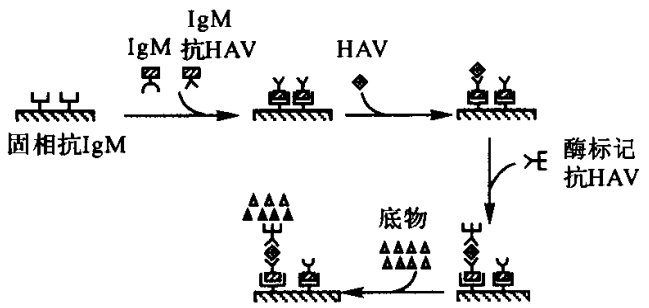


图5 —1 —7　夹心法测定特异性IgM 的示意图

【试剂】

1） 酶标记物和酶促反应底物：酶标记物即酶标抗体或抗原，在ELISA 试剂盒中最常用的酶为辣根过氧化物酶 （horseradish peroxidase，HRP） 和碱性磷酸酶 （alkaline phos—pharase，ALP）。

HRP 和底物：HRP 是从蔬菜作物辣根中提取的糖蛋白，由主酶 （酶蛋白） 和辅基 （亚铁血红素） 组成。主酶在275nm 波长处有最高吸收峰，辅基在403nm 波长处有最高吸收峰。HRP 的质量指标，一是HRP 的纯度，用RZ （Reinheit Zahl，德文，意为纯度） 表示，即403nm 的吸光度值与280nm 吸光度值之比，高纯度HRP 的RZ 应≥3.0；另一指标是HRP 酶的活性，这一指标更为重要，因为酶变性后，RZ 不变而活性下降。HRP 催化底物反应式如下：

$DH_2+H_2O_2 \rightarrow HRPD+2H_2O$ 上式中DH_2 为供氢体，H_2O_2 为氢受体。HRP 对氢受体的专一性很强，除H_2O_2 外，仅作用于小分子醇和尿素的过氧化物。在ELISA 中常用的供氢体底物为邻苯二胺 （O —Phenylendiamin，OPD）、四甲基联苯胺 （3，3，5，5 —tetram—ethyl —benzidine，TMB）。OPD 作为底物，灵敏度高，比色方便；缺点是配成的应用液稳定性差，而且具有致异变性。TMB 经酶作用后由无色变为蓝色，目测对比明显；加酸终止反应后变黄色，可在酶标仪中比色，因此应用日渐增多。

ALP 和底物：ALP 可从大肠埃希菌提取或小牛肠黏膜提取，前者分子量为80000u，酶作用的最适pH 为8.0；后者分子量为100000u，酶作用的最适pH 为9.6。酶作用的底物有对硝基苯磷酸酯 （p —nitrophenyl phosphate，p —NPP） 和4 —甲基伞形酮磷酸酯两种。p —NPP 经ALP 作用后生成黄色的对硝基酚在波长450nm 处有吸收峰，用氢氧化钠溶液

终止反应后，黄色可稳定一段时间。

在ELISA 中应用ALP 和底物系统其灵敏度一般高于HRP 和底物系统，而且空白值也低；但由于ALP 的制备、稳定性、价格等方面的原因，目前ELISA 试剂盒一般均采用HRP 标记。

2） 免疫固相载体：即包被有抗原或抗体的固相载体。最常用的固相载体是聚苯乙烯，可制作成4 种性状：小试管，小珠，微量反应板和微粒。临床上最常用的是微量反应板，专用于ELISA 的微量反应板产品称为ELISA 板，规格为12 ×8 或8 ×12 的96 孔板。ELISA 板的特点是可以同时进行大量标本的检测，并可在酶标仪上迅速读出结果。

3） 洗涤液：常用的洗涤液为含Tween 的磷酸盐缓冲液。

4） 酶促反应终止液：常用的HRP 终止液为2mol／L 硫酸溶液，ALP 终止液为1mol／L 氢氧化钠溶液。

5） 标本及结合物的稀释液：含有高浓度的无干扰作用的蛋白质和表面活性剂的磷酸盐缓冲液。

6） 阴性和阳性对照品 (定性测定) 或参考标准品和质控品 (定量测定)。

【器材】

各种型号的酶标仪或全自动酶标仪。

【操作】

用ELISA 检测各种物质时均有现成试剂盒提供，其基本步骤包括加标本、温育、洗涤、加酶结合物、温育、洗涤、加底物、保温、终止反应、比色测定、判读结果几个步骤。按试剂盒说明书操作。

1） 试剂准备：按试剂盒说明书要求，稀释或配制试验中所需要的试剂。所用水应是蒸馏水或去离子水；洗涤液应新鲜配制；自配的缓冲液应测定其pH 值；从冰箱中取出的试剂盒应恢复到室温后才可使用。

2） 加标本：夹心法可直接对检测标本作测定，间接法一般使用稀释的标本。标本加样量在定性测定时要求不高，在定量测定时则须用微量加样器准确加入。

3） 温育：一般实验室多采用在保温箱中放置预温的湿盒或在恒温水浴箱中进行。

4） 洗涤：洗涤不是ELISA 的反应过程，但却是决定试验成败的关键步骤。结合 (指与固相载体结合) 与游离 (未与固相载体结合) 的物质就是通过洗涤进行分离。游离的物质包括标本中未反应的待测物和其他杂质，在洗涤中应被彻底洗去。

5） 加酶结合物：双位点一步法和竞争法中，酶结合物和标本需同时加入；在其余方法中，先加入待测标本再加酶结合物。在定量测定时则须用微量加样器准确加入。

6） 温育：同步骤3。

7） 洗涤：同步骤4，主要洗去游离的酶结合物。

8）加底物保温显色：定量检测时可根据空白管和标准管的呈色情况灵活掌握显色时间。

9）终止反应：加入终止液终止酶促反应。

10）比色测定：将显色酶标板在酶标比色仪或分光光度计上测定有色产物在最高吸收峰波长处的吸光度值。

【结果计算】

1．定性测定

定性判断是指所测标本在该抗原抗体测定系统中有反应性或无反应性，可简单地表达为“阳性”或“阴性”结果。ELISA 类型不同，结果判断的方法也不同。

1）间接法和夹心法：在这种类型的ELISA 中阳性反应呈色，阴性反应不呈色或呈很浅颜色；用比色计测读呈色液的吸光度值。判断结果的方法有：①以受检标本的吸光度（S）除以阳性对照的吸光度值（N），所得的商（S/N）大于一定的数值作为判断阳性的标准。每一特定的方法这个数值应通过大量标本的检测而确定，但不少试剂盒将此定为2.1。②采用最低检测值的质控品的吸光度值作为cutoff 值，判断阴阳性结果。③有的试剂盒用N 值加上一个特定的数值作为阳性的判断值，结果计算参照说明书。

2）竞争法：这种类型的ELISA 阴性反应呈色，阳性反应不呈色。呈色的强度取决于反应中酶结合物的浓度和加入竞争抑制物的量，一般调节至阴性对照的吸光度值在1.0 左右。结果判断与上述（1）中的3 种方法正好相反。

2．定量测定

1）间接法和夹心法：以标准品的浓度为横坐标，以吸光度值为纵坐标，将各浓度的值逐点连接，所得曲线呈正相关。具体的标准曲线建议用标准曲线制作软件进行回归，选择最佳的回归曲线，推算待测标本的含量。

2）竞争法：以标准品的浓度为横坐标，以吸光度值为纵坐标，将各浓度的值逐点连接，所得曲线呈负相关。具体的标准曲线建议用标准曲线制作软件进行回归，选择最佳的回归曲线，推算待测标本的含量。

【注意事项】

1）加样应准确，以减少因加样所致的随机误差。

2）反应温度和时煎应按规定的要求，保温容器最好是水浴箱，可使温度迅速平衡，特别是定量检测时，务必保证有充足时间让抗原抗体反应达到平衡，有时需通过振荡加速抗原抗体反应。

3）洗涤是ELISA 实验成败的关键，洗涤的目的是洗去反应液中未与固相抗体或抗原结合的物质以及在反应过程中非特异吸附于固相载体上的干扰物质。

4）定性结果必须根据其吸光度值进行判断，不推荐通过目测比色进行判断。

5）定量检测时为了提高灵敏度，往往会引进生物素和亲和素系统。

【临床应用】

1）病原体及其抗体的检测：病毒感染如肝炎病毒、巨细胞病毒、风疹病毒、疱疹病毒、轮状病毒、艾滋病病毒等；细菌感染如链球菌、布氏杆菌等；寄生虫感染如阿米巴、弓形虫、锥虫等。

2）蛋白质和多肽：各种免疫球蛋白，肿瘤标志物如甲胎蛋白、癌胚抗原、前列腺特异性抗原等，激素如促绒毛膜性腺激素、生长激素等，酶如肌酸激酶－MB，其他蛋白质如铁蛋白等。

3）非肽类激素：如雌二醇，皮质醇等。

4）药物：治疗心脏病药物如地高辛，抗哮喘药物如茶碱，抗癫痫药物如苯巴比妥，抗生素如庆大霉素等。

第四节　放射免疫测定技术

放射免疫分析（adioimmunoassay，RIA）是以放射性核素作为示踪物的一种免疫标记技术。由于此项技术将核素分析的高灵敏度和精确性与抗原抗体反应的特异性相结合，因此，具有灵敏度高、特异性强、重复性好、样品及试剂用量少、试验方法易规范化等诸多优点，已在生命科学的许多领域及医学检验工作中得到广泛应用，适用于各种抗原和抗体、微量蛋白质、激素、核苷酸、多肽、小分子药物及肿瘤标志物等的定量测定。

放射免疫分析有以下两种主要类型：

1）以核素标记的已知抗原和检测样品中，非标记的待测抗原与限量的特异性抗体竞争结合的经典放射免疫分析。

2）以核素标记的过量已知抗体与检测样品中待测抗原直接结合，然后用固相抗原分离游离标记抗体的免疫放射分析（mmunoradiometric assay，IRMA）。

一、放射免疫分析

【原理】

RIA 的基本原理是标记抗原（Ag*）和未标记抗原（Ag）对有限量的特异性抗体（Ab）的竞争性结合或竞争性抑制反应。在RIA 反应系统中，标记抗原、未标记抗原和特异性抗体三者同时存在时，由于两种抗原具有相同的决定簇，互相竞争结合抗体的能

力相同，结果形成Ag＊—Ab 和Ag —Ab 复合物。

当Ag＊和Ab 的量固定时，两者结合形成免疫复合物会受到Ag 含量的制约。如反应系统中Ag 含量高时，对Ab 的竞争结合能力就强，Ag —Ab 复合物的形成量就增加，Ag＊—Ab 复合物则相对减少；反之，当Ag 含量低时，对Ab 的竞争结合能力弱，Ag＊—Ab 复合物的形成量即增多。因此，Ag＊—Ab 复合物的形成与Ag 含量之间呈一定的负相关关系（图5 —1 —8）。

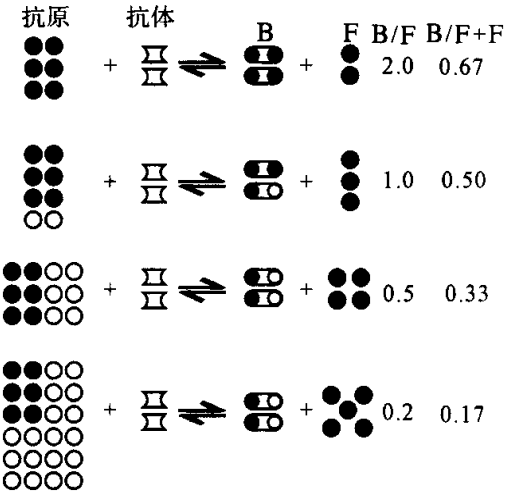


图5 —1 —8　RIA 试验原理示意图

●为标记抗原　○为未标记抗原

B 为抗原与抗体的复合物F 为游离标记抗原

B +F 为标记抗原总量（即为T）

【标准曲线】

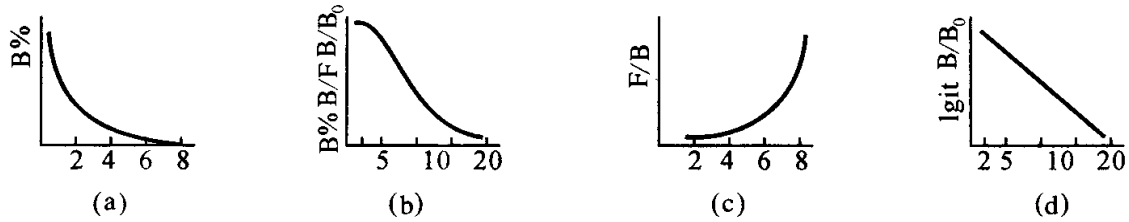


图5 —1 —9　RIA 标准曲线的类型

（a）以测定物标准品浓度为横坐标，B％或B／F、B／B$_0$、计数（cpm）为纵坐标，呈双曲函数；（b）以测定物标准品浓度的对数为横坐标，B％或B／F、B／B$_0$、cpm 为纵坐标，曲线呈反S型；（c）以标准品浓度的算术数（或对数）为横坐标，F／B（或B$_0$／B）为纵坐标，呈双曲函数；（d）以标准品浓度的对数为横坐标，lgitB／B$_0$ 为纵坐标，标准曲线为从左到右的渐降直线。

在RIA 中，对被测物进行测定的同时，设置一组反应系统用于绘制剂量反应曲线（doseresponse curve，习惯上称为标准曲线）。在各反应管中分别加入已知递增量的被测

标准品，一定量的标记抗原和有限量的抗体。在严格控制的条件下，待反应达到平衡后，分离出游离标记抗原（用F表示），测定结合物（用B表示）的放射性，根据不同剂量的标准品所对应的反应参数绘制标准曲线。纵坐标为放射性强度（用cpm表示，即counts per minute，每分钟放射性计数），有各种表示方式，除用结合率（B%或B/T）外亦可选用B/F、F/B、B/B_0的比值或B、F的cpm值或B/B_0。对数值来表示。横坐标为已知标准品的浓度，以算术数或对数表示。绘制标准曲线也可采用lg—lgit方式，绘制出一条直线，直线化以后不仅直观，容易查出结果，而且能提供标准曲线的质量控制参数，如斜率、截距和相关系数（图5—1—9）。

一条典型的标准曲线应符合以下条件：

1）标准曲线最低浓度点的最佳结合率（S_1，B/B_0，%）应大于85%，最高浓度点的最佳结合率（S_n）应小于15%。

2）标准曲线要反映一定测量范围，即包括低值、中值、高值等测量范围在内，或者包括对于判断临床意义有影响的检测范围在内。参考值最好落在标准曲线的直线部分。

3）标准曲线要有一定的落差或一定的下降陡度，即曲线的斜率要大。国外提出S_1/S_n的比应大于3。

典型标准曲线质控参数包括：

1）零标准管最高结合率：零标准管最高结合率（B_0/T，%）在30%～60%，最适中的结合率应为50%左右，在这种结合率下所得到的标准曲线的斜率最适宜，同时具有良好的灵敏度。

2）非特异管结合率：对二抗分离剂而言，非特异管结合率（NSB/T，%）在1%～5%，而活性炭或PEG分离剂的NSB/T（%）应小于10%。

3）标准曲线的3个有效剂量参数：在RIA中，当B/B_0结合率分别为75%、50%、25%时，从标准曲线上可以查出相对应的浓度，即称为3个有效剂量浓度，以ED_{75}、ED_{50}、ED_{25}来表示。对前后试验的这3个参数进行比较，可以直观地评价试剂盒的稳定性和操作的重复性好坏。

4）标准曲线直线化：对于能进行直线化的标准曲线，应该采用直线化的标准曲线。这不仅由于直线比较直观，而且可提供直线的斜率和截距，为质控提供判定分析方法的性能指标。

【试剂】

目前使用的试剂多由专业单位制成成套的试剂盒供应，通常包括：标记抗原、标准品、特异性抗体和分离剂等。

1）标记抗原：用于标记的抗原要求纯度高，并具有足够或完整的免疫活性。标记用的放射性同位素以^{125}I为最常用，也可用^{131}I、^{3}H或^{14}C等。标记抗原的放射化学纯度，即标记物中标记抗原的放射性占该标记物总放射性的百分数应达到95％以上。否则标记物中的放射性杂质较多会使非特异性结合（NSB）增高。这既影响检测的精密度，也影响检测的灵敏度。

2）标准品：要求纯度高，定量准确，抗原免疫活性好，并用国际标准校正。从理论上说，一切竞争性结合的体外RIA方法中，所使用的标准品应与被测物在化学结构上完全相同，只有这样才能与被测物具有相同的免疫活性，与抗体的亲和力也完全相同。部分标准品保存条件要求较高，否则标准品的免疫活性改变也会影响反应曲线，产生检测误差。

3）抗体：要求特异性强，效价高，并具有高亲和力。在具体检测时，要求抗体的量适当，即当标准品为0浓度时，标记抗原与抗体的最大结合率（B_0/T）在33％～50％之间较为理想。

4）分离剂：当抗原抗体反应达到动态平衡后，应借助于某些试剂将结合的标记抗原复合物（B）和未被结合的游离的标记抗原（F）分离，才能测定各自放射性强度。为了使测量结果能代表反应结果，要求分离方法能使B和F得以完全有效地分开，且要求分离时不破坏已经达到动态平衡的免疫反应。因此，常常要求提高分离速度、降低操作温度、缩短分离剂与反应系统的接触时间。

常用的分离剂有第二抗体、聚乙二醇（PEG）、硫酸铵、活性炭、固相抗体等。近年来，研究较多和分离效果较好的是固相分离技术，即将特异性抗体或第二抗体以物理吸附或共价键结合法与聚苯乙烯试管、塑料小珠、琼脂糖珠、Sephadex及磁性微球等固相载体连接，制成特异性固相吸附剂。此类分离方法稳定性好，操作方便，可避免非特异性因素影响。

【操作】

RIA方法一般分为3个步骤，即抗原与抗体的竞争结合反应，标记抗原抗体结合物（B）与游离标记抗原（F）的分离及放射性活度的测量。具体项目的检测过程及要求，试剂盒说明书中有详细说明，其基本流程如下：

加样：向反应管中加入Ag、Ab、Ag*

↓

温育：在一定温度下温育，使反应达到动态平衡

↓

分离：用适当的方法将处于反应动态平衡中的放射性抗原抗体复合物B （包括非放射性复合物） 与游离的标记抗原F （包括非标记的游离抗原） 分离

↓

测B 或/和F 的放射性计数

↓

绘制剂量反应曲线：以测定的放射性计数率按设定的反应参数作适当处理后，绘制曲线或进行数学拟合求曲线的数学表达式

↓

通过剂量反应曲线或其数学函数式求出被测样品中抗原含量

↓

签发检测报告

二、免疫放射分析

在IRMA 反应系统中使用了过量的标记抗体，且无竞争性抑制反应，因此，抗体与待测抗原达到结合状态的化学平衡只需2～3h ；同时一个抗原分子可以结合多个标记抗体分子，使IRMA 的灵敏度明显高于RIA 。

【原理】

用过量的标记抗体与待测抗原进行非竞争结合反应，分离游离的标记抗体，测定其复合物的放射性计数。如待测抗原含量多，则复合物的计数率就高，反之则低。其反应式如下：

$$Ag + Ab^{*}\ (\text{过量}) \longrightarrow Ag-Ab^{*}+Ab^{*}$$

式中，Ag 为未标记待测抗原或标准品；Ab^{*} （过量） 为标记抗体；$Ag-Ab^{*}$为标记的抗原抗体复合物；Ab^{*}为游离标记抗体。

IRMA 方法有单位点法和双位点法两种。单位点IRMA 中抗原分子只需一个反应位点，形成复合物后分离游离的标记抗体。单位点的IRMA 灵敏度和特异性均不够满意，目前应用较少。双位点IRMA ，亦称为双抗体夹心法，采用固相抗体与标记抗体同时与待测抗原的两个表位结合，形成待测抗原夹在两个抗体分子之间，经过洗涤，分离游离的标记抗体，因此，非特异性结合 （NSB） 较低，可大大提高测定的灵敏度。其基本过程参见图5 -1 -10 。

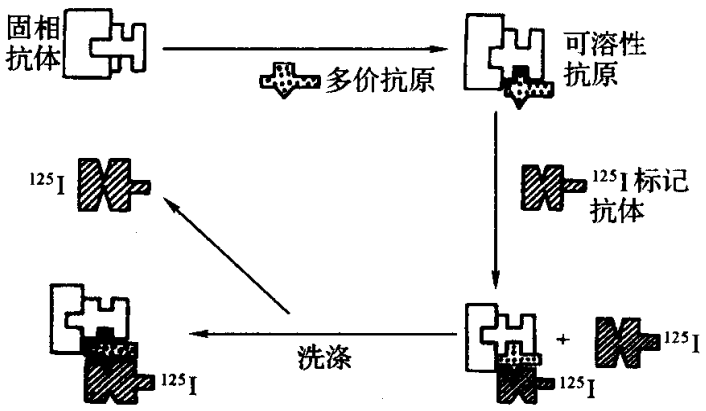


图5 —1 —10　双位点IRMA 法示意图

由于单克隆抗体的应用，同时双位点IRMA 法要求待测物必须同时具备两个表位才能最后形成标记复合物，故IRMA 法不易产生严重的交叉反应，具有较高的检测特异性。

同时因使用了过量的同位素标记抗体，复合物的计数效率较高；在试验过程中，将待测抗原与标记抗体同时加入固相抗体进行反应，反应很快达到平衡；加之固相结合的复合物与游离标记抗体有效分离等，这些均极大地提高了IRMA 法的灵敏度。IRMA 法测定结果的稳定性较好，因标记抗体和固相抗体均属过量，不易受外界环境的影响；也不易受试验操作时加样误差的影响。IRMA 与RIA 的区别见表5 —1 —1 。

表5 —1 —1　mMA 与RlA 的区别

区别项目	IRMA	RIA
标记物质	抗体	抗原
标记物用量	过量	限量
反应方式	直接结合	竞争性结合
B、F 分离方法	固相抗体等	第二抗体等

【试剂】

目前各试剂供应商提供的试剂盒均配备必须的相关试剂，主要包括：标记抗体、标准抗原或标准品、固相抗体等。

1） 标记抗体：由于抗体分子中含有多个酪氨酸残基，经过碘化反应后不影响其免疫学活性，并能结合上较多的放射性碘原子，标记物的比放射性较高，克服了RIA 中某些抗原不易标记，或在标记过程中容易发生化学或放射损伤等缺点。

2） 标准品：与RIA 的要求一样，要求纯度高、定量准确、抗原免疫活性好。

3） 固相抗体：将特异性抗体经包被固定在聚苯乙烯塑料小珠或试管上，通常采用吸附法。如采用化学法可使抗体结合较牢固，洗涤时不易脱落。

【操作】

IRMA 一般也分为3 个步骤，即抗原与固相抗体和标记抗体的非竞争性结合反应，

标记抗原抗体结合物（B）与游离标记抗体（F）的分离及放射性强度的测量。具体的检测过程及要求，试剂盒说明书中有详细说明，其基本流程如下：

加样：向已包被抗体的反应管（包被试管或包被珠）中加入Ag、Ab*

↓

温育：在一定温度下温育，使反应达到平衡（不时轻摇试管）

↓

分离：洗涤或吸弃上清液，以便除去未结合的游离标记抗体F（包括非标记的游离抗体）

↓

测包被管或包被珠的放射性计数

↓

绘制剂量反应曲线：对测定的放射性计数按设定的反应参数作适当处理后，绘制曲线或进行数学拟合求曲线的数学表达式

↓

通过剂量反应曲线或其数学函数式求出被测样品中抗原含量

↓

签发检测报告

【注意事项】

1）放射性同位素受物理半衰期的限制，如^{125}I标记的试剂盒半衰期为1～2个月。

2）对放射性测量仪器要求稳定性好、效率高。仪器的本底和效率应定期进行测量，对于多探头的测量仪，还要注意各探头之间的一致性。

3）因具有放射性危害、环境污染、污物处理等问题，开展放射性同位素检测需经政府机构准许。

4）由于RIA方法影响的因素较多，因此，实际操作过程中需进行室内质量控制；同时在有条件的情况下，应参加管理部门组织的室间质量评价，确保检测结果的可靠性。其误差主要有以下来源：①不同批号的标准品间存在的性质差异，使用标准品时称量、溶解稀释不准，以及取量差异；标记物在制备后的贮存期内发生标记核素的脱落，标记物自身辐射分解引起变性；抗体贮存条件不当，或使用中反复冻融造成其免疫活性改变；不同批号抗体间的亲和力差异；分离剂配制不当造成分离效果的差异或在存放期

中变质变性。②样品采集、分离、贮存、测定，每个环节都可能引入误差。③操作时，反应试剂与样品取样不准，反应条件控制不当，B 与F 分离操作掌握不好，均会影响结果的准确性；尤其B 与F 的分离更为重要，当残留液过多或沉淀被吸去均会影响检测结果。④测量和数据处理过程中，放射性测量的仪器校验不当，标准曲线数学拟合不当，均会导致测量结果较大的误差。

第五节　发光免疫测定技术

发光免疫分析（uminescent immunoassay）是免疫学反应和发光技术相结合的产物，可以自动化检测微量的抗原或特异性抗体。发光的类型有光致发光、酶促化学发光、化学发光、电化学发光等。相应发光免疫分析技术有荧光偏振免疫测定、时间分辨荧光免疫测定、发光酶免疫测定、化学发光免疫测定、电化学发光免疫测定。目前这些技术已广泛应用于检验医学中，成为免疫自动化分析的先驱。本节将对这些技术作简要介绍。

一、荧光偏振免疫测定

【原理】

荧光偏振免疫测定（fluorescence ploarization immunoasy，FPIA）是一种均相竞争荧光免疫分析法，即荧光素标记的小分子抗原和待测标本中小分子抗原与相应抗体发生竞争性结合反应，当荧光素标记的小分子抗原和相应抗体量恒定时，反应平衡时结合状态的荧光素标记小分子抗原量与待测标本中小分子抗原呈反比。经激发光作用下发射出的荧光经过偏振仪形成偏振光，这一偏振光的强度与荧光素受激发时分子转动的速度呈反比。游离的荧光素标记抗原分子小，转动速度快，激发后发射的光子散向四面八方，因此，通向偏振仪的光信号很弱；而与抗体大分子结合的荧光素标记抗原分子大，转动慢，激发后产生的荧光比较集中，故偏振光信号比未结合时强得多（图5－1－11）。因此，待测抗原越少与抗体竞争结合的量越少，而荧光标记抗原与抗体结合量就越多，当激发光照射时，荧光偏振的程度越强，因此，荧光偏振信号强。通过偏振光的检测可以测定其待测小分子抗原的含量，如药物浓度测定。

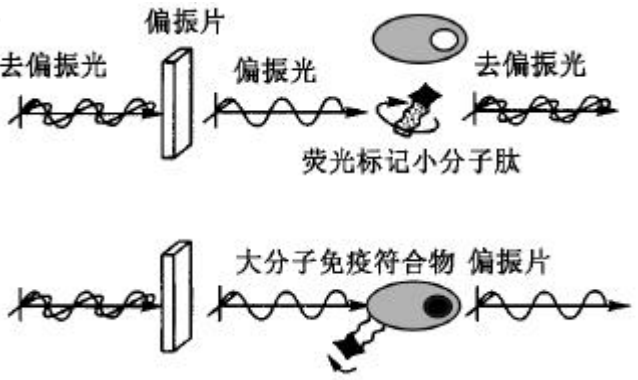


图5－1－11　荧光偏振免疫测定的原理示意图

【器材】

免疫偏振检测仪。

【试剂】

有现成配套的试剂盒供应，每个试剂盒组成基本相同。现以环孢素测定为例说明。

1）荧光素标记的环孢素荧光素标记环孢素，溶剂为磷酸盐缓冲液，内含表面活性剂、蛋白稳定剂和叠氮钠防腐剂。

2）抗环抱素抗体一般为鼠型单克隆抗体，溶剂为醋酸盐缓冲液，内含蛋白稳定剂（如牛血清白蛋白）和叠氮钠防腐剂。

3）标准品。

4）质控品。

5）缓冲液。

6）溶解剂和蛋白沉淀剂。

【操作】

按试剂操作说明书进行。

1）标本预处理取待检全血（一定要混匀）150μl，加入溶解剂50μl 和蛋白沉淀剂300μl，混匀后，13000r/min 离心5min，取上清液待用。

2）抗原抗体反应：在反应管中分别加入一定量的预处理标本上清液、荧光素标记的环孢素、抗环孢素抗体以及反应缓冲液，进行抗原抗体反应。

3）偏振荧光强度测定：抗原抗体反应开始时立即测定其空白偏振荧光强度（P_1），反应结束时再测定其偏振荧光强度（P_2），

4）结果计算：根据待测标本的偏振荧光强度P（P_2-P_1），从标准曲线上直接计算出所测物质的含量。

【注意事项】

荧光偏振免疫测定技术具有灵敏、特异、简便、重复性好等特点，试剂稳定、有效期长，为临床药物浓度检测的首选方法。

【临床应用】

1）临床治疗性药物浓度测定，如环孢素、卡马西平、苯妥英钠、丙戊酸、地高辛、氨茶碱、苯巴比妥等。

2）毒品的检测，如鸦片等。

3）其他，如酒精等。

二、时间分辨荧光免疫测定

【原理】

时间分辨荧光免疫测定（time-resolved florescence immunoassay，TR-FIA）使用的示踪物是三价稀土离子如铕（Eu^{3+}）、钐（Sm^{3+}）、镝（Dy^{3+}）和铽（Tb^{3+}）等螯合物，它们是具有双功能基团结构的化合物，在水溶液中很容易与抗原或抗体分子上的$-NH_2$以共轭双键结合，制成标记物。将Eu^{3+}螯合物标记在抗体上，其螯合物具有经紫外光激发所发出的荧光衰变时间长的特点，利用延迟测定时间，可有效消除样品或试剂中的蛋白质类的非特异性荧光的干扰；另一特点是激发光和荧光的波长移位大、荧光光谱峰窄，可有效消除激发光的干扰，测得的荧光为Eu^{3+}所发出特异性荧光信号。标记物与待测标本中相应抗原或抗体进行免疫学反应，然后进行B、F分离，测定免疫复合物（B）的荧光强度。由于荧光强度十分微弱，需加入荧光增强剂，使复合物中稀土离子解离出来，再与增强液中β-二酮体生成新的螯合物。后者经紫外光激发可产生很强的荧光信号，通过测定荧光信号强度可对标本中待测物进行定量或定性检测。

【方法学类型】

（1）固相抗体竞争法：待测标本中抗原和Eu^{3+}标记的抗原与固相抗体（特异性抗体包被固体）发生竞争性结合，温育和洗涤后，将游离Eu^{3+}标记抗原和Eu^{3+}标记抗原抗体复合物分开，然后在固相中加入荧光增强剂，测定Eu^{3+}标记抗原抗体复合物的荧光强度。荧光强度与待测抗原含量成反比，标准曲线与RIA曲线相似。目前为了生产试剂盒的方便，常用抗抗体（Ab_2）包被固相，这种固体的抗抗体实际上是一种通用的分离剂，分离Eu^{3+}标记抗原和Eu^{3+}标记抗原抗体复合物。

（2）固相抗原竞争法：将大分子抗原直接或半抗原通过化学偶联法制成半抗原－蛋白质结合物包被在固相上，成为固相抗原。固相抗原和样品中的待测抗原共同竞争有限量的Eu^{3+}标记抗体，样品中待测抗原含量越多，则Eu^{3+}标记抗体结合到固相上的量越少，故待测抗原含量与荧光强度呈反比。

（3）固相双位点夹心法：标准品或待测物先与固相抗体反应，洗涤后再加入Eu^{3+}标记抗体，再次温育，生成Eu^{3+}标记抗体－抗原－固相抗体复合物，充分洗涤后加入增强液，测定荧光强度，所测得荧光强度与待测物含量呈正比。

【试剂】

现已有现成的仪器和相应配套试剂盒供应。以双位点夹心法测甲胎蛋白（AFP）为例，试剂盒主要组成如下：

（1）固相抗体：以抗人AFP多克隆抗体包被聚苯乙烯微量滴定条或珠。

（2）生物素化抗人AFP单克隆抗体。

（3）Eu^{3+}标记链霉亲和素。

（4）AFP标准品和质控品。

5）荧光增强液。

6）反应缓冲液。

【器材】

时间分辨荧光计。

【操作】

分人工操作法和仪器自动化操作方法，具体参照操作说明书进行。一般步骤为：

1）取已包被抗人AFP 的微量滴定条或珠，加入不同浓度的AFP 标准品和待测血清一定量，并向每孔中加入一定量的反应缓冲液进行反应。

2）用洗涤液（如10mmol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液）洗数次，每孔加生物素化抗人AFP 单克隆抗体，振荡温育反应。

3）用洗涤液冲洗数次，每孔加Eu^{3+}标记链霉亲和素，振荡反应。

4）用洗涤液冲洗数次，弃净孔中残留的洗涤液，向每孔中加一定量的增强液，置振荡器上快速振匀，然后在时间分辨仪上测量，从编制程序直接得出待测标本中AFP 含量。

【注意事项】

1）双位点夹心法多采用单克隆抗体和多克隆抗体联合使用，即多克隆抗体包被固相，单克隆抗体标记Eu^{3+}。

2）所用的器材如移液管、加样器头、试剂瓶等必须专用。

3）新配制的缓冲液、磷酸盐缓冲液、洗涤液等必须进行自然本底荧光的测定。

4）严格执行规程，不得用手直接接触加样器头的尖部及微量滴定板的孔部等。

【临床应用】

已有多种试剂盒投放市场，其中包括蛋白质类、酶、肽类激素、甲状腺激素、类固醇激素、药物等。凡是目前用RIA 或ELISA 测定的物质均可以用本法测定。

三、发光酶免疫测定

【原理】

发光酶免疫测定（luminescence enzyme immunoasssay，LEIA）属于酶免疫测定中的一种。只是最后一步酶反应所用底物为发光剂，通过发光反应发出的光在特定的仪器上进行测定。常用的标记酶有辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（ALP），根据酶促反应底物不同，可分为荧光酶免疫测定和化学发光酶免疫测定。荧光酶免疫测定就是利用理想的酶荧光底物，生成的产物稳定并有较强的荧光，通过荧光强度测定进行定量；化学发光酶免疫测定就是利用酶对发光底物的催化作用而直接发光，通过光强度的测定而直接进行定量。

[方法学设计]

1．分离方法

(1) 磁颗粒分离法：用抗原或抗体包被磁颗粒，与标本中相应抗原或抗体和酶标的抗体或抗原通过一定模式的免疫学反应后，最终通过磁场将结合酶标记物免疫复合物与游离酶标记物进行分离。

(2) 微粒子捕获法：与磁颗粒分离法所不同的是所用颗粒以无磁性微粒子作为抗体或抗原的包被载体，然后用纤维膜柱子进行酶标记物的结合状态和游离状态的分离。

(3) 包被珠分离法：用聚苯乙稀等材料制成小珠，在小珠上包被抗原或抗体，经抗原抗体反应后，将结合状态与游离状态的酶标记物进行分离。

2．免疫学反应模式

以微粒子捕获法为例，主要有以下3 类：

(1) 双抗体夹心法：用微粒子固相抗体和酶标的抗体与待测标本中相应抗原反应，生成微粒子抗体－抗原－酶复合物，经纤维膜柱子分离，加入底物，经酶促反应后发出光。

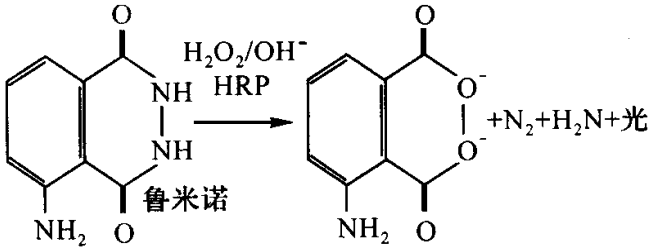
(2) 双抗原夹心法：用包被在微粒子上抗原和酶标记抗原与待测标本中相应抗体反应，生成微柱子抗原－待测抗体－酶标抗原复合物，经纤维膜柱子分离，加入底物进行酶促发光。

(3) 固相抗原竞争法：用已知抗原包被微粒子制成微粒子抗原，和待测标本的相应抗原与恒定的相对不足的酶标记抗体发生竞争性结合反应，反应平衡后经纤维膜柱分离微粒子，抗原与酶标抗体形成复合物，被截留在膜上。通过加入底物进行酶促发光反应，其发光量与待测标本中抗原含量呈反比。

[试剂]

1.HRP 和发光底物

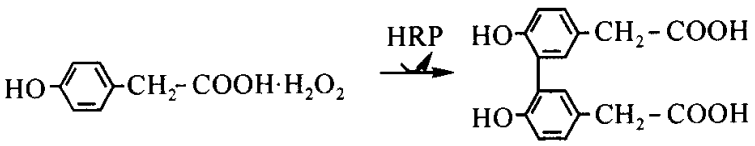
(1) 鲁米诺鲁米诺的氧化反应在碱性缓冲液中进行，通常以0.1mol/L、pH8.6 的Tris 缓冲液作底物液，发光反应式如下：



注意首先，鲁米诺和过氧化氢在无HRP 催化时也能缓慢自发发光，而在最后光强度测定中造成空白干扰，因而宜分别配制成2 瓶试剂溶液，只在用前即刻混合；其次，

HRP 发光增强剂如某些酚试剂（如邻－碘酚）或萤火虫荧光素酶可增强HRP 催化氧化的反应和延长发光时间，提高敏感度。

（2）对－羟基苯乙酸在过氧化氢存在下对－羟基苯乙酸被HRP 氧化成氧化二聚体（荧光物质），在350nm 激发光作用下，发出450nm 波长的荧光，可用荧光光度计测量。反应式如下：

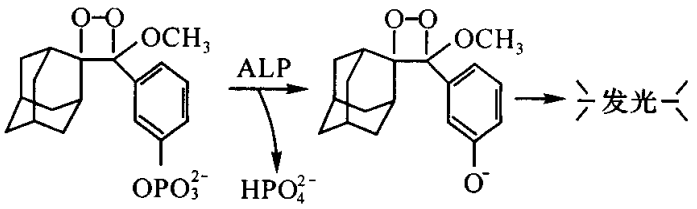


对-羟基苯乙酸　　氧化二聚体（荧光物质）

2.ALP 和发光底物

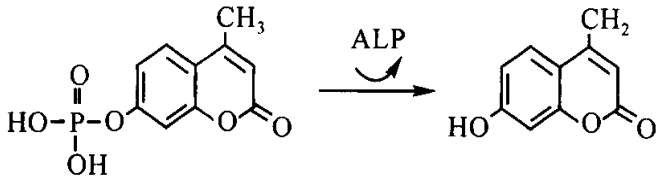
常用的底物为3－（2'－螺旋金刚烷）－4－甲氧基－4－甲基－4－（3'－磷酰氧基）－苯基－1，2－二氧乙烷（AMPPD）和4－甲基伞形酮磷酸盐（4－MUP）。

（1）AMPPD：在碱性条件下，AMPPD 被ALP 酶解生成相当稳定的AMP－D 阴离子，其有2～30min 的分解半衰期，发出波长为470nm 的持续光，15min 后光强度达到高峰，15～60min 光强度保持相对稳定。发光反应式如下：



AMPPD　　“稳定”

（2）4－MUP：ALP 催化4－MUP 生成4－甲基伞形酮，在350nm 波长激发光作用下，发出455nm 波长的荧光，可用荧光光度计进行测量。反应式如下：



4-甲基伞形酮磷酸盐　　4-甲基伞形酮（荧光物质）

【器材】

发光酶免疫测定仪。

【操作】

目前有各种仪器与相应配套试剂供应，操作应按各自的仪器操作指南和试剂盒说明书进行。以微粒子捕获双抗体夹心法测HBsAg 为例。

1）抗原抗体结合反应：将已包被了抗HBs抗体的乳胶微粒和待测血清标本加入反应杯中，经温育一定时间后，加入碱性磷酸酶标记抗体，再温育一定时间后，形成固相包被抗体－抗原－酶标抗体复合物。

2）结合和游离部分分离：将复合物转移到纤维膜上，用缓冲液洗涤，洗去未结合的抗原，酶标抗体－抗原－乳胶微粒抗体复合物则被保留在纤维膜上。

3）酶促发光反应：加入底物4－MUP，酶标抗体上ALP分解4－MUP，脱磷酸根基团后生成4－甲基伞形酮（4－MU），后者在350nm波长激发光的照射下，发出455nm波长荧光。经荧光读数仪记录、放大，最后根据标准曲线由电脑计算出所测物质的含量。

【注意事项】

1）洗涤要彻底，避免因血清中其他来源的过氧化物酶类物质所产生的非特异性反应影响测定结果。

2）因非特异性吸附而造成的较高本底，在实验评价时应引起注意。

四、化学发光免疫测定

【原理】

化学发光免疫测定（chemiluminescence immunoassay，CLIA）是用化学发光剂直接标记抗原或抗体（化学发光剂标记物），与待测标本中相应抗体或抗原、磁颗粒性的抗原或抗体反应，通过磁场将结合状态（沉淀部分）和游离状态的化学发光剂标记物分离开来，然后加入发光促进剂进行发光反应。通过发光强度的检测对标本待测物进行定量或定性。

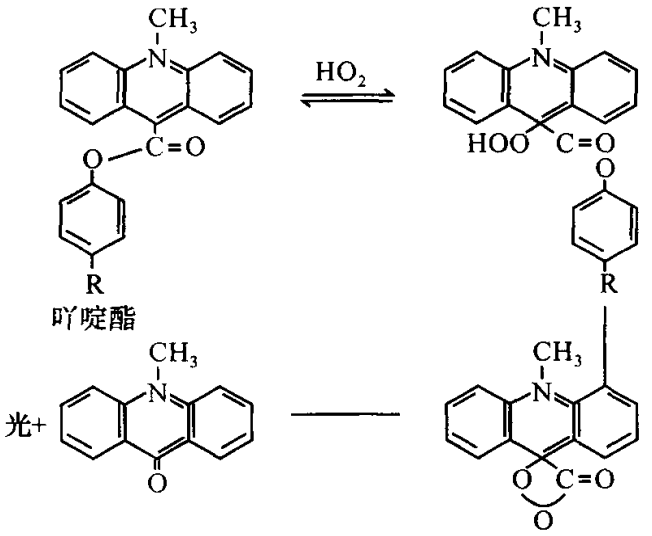
【方法学设计】

1）分离方法：常用磁颗粒分离法。

2）免疫学反应模式：同酶发光免疫测定技术，主要也有双抗体夹心法、双抗原夹心法和固相抗原竞争法3种模式，所不同的只是相应抗原或抗体上标记的是吖啶酯而不是酶。

【试剂】

1）化学发光剂标记物：临床上最常用的发光剂是吖啶酯类发光剂。吖啶酯类具有以下优点：①氧化反应不需催化剂，只要在碱性环境中就可以进行。反应物在加入过氧化氢溶液后再加氢氧化钠溶液，发光反应迅速，本底低。②在氧化反应过程中，结合物被分解，因此，游离的吖啶酯的发光不受抑制。③试剂稳定性好。化学发光反应式如下：



2）免疫磁颗粒：指由抗原或抗体包被的磁颗粒。

3）发光激发剂：指发光物发光时所需的氧化剂过氧化氢溶液和pH 纠正液氢氧化钠溶液。

4）定标液和质控液。

【器材】

化学发光免疫测定仪。

【操作】

目前有专用仪器与相配套试剂盒供应，操作时应按仪器和试剂盒说明书进行。现以双抗体夹心法测定促卵泡成熟激素（FSH）为例。

1）抗原抗体反应：将包被了抗FSH 的单克隆抗体的磁颗粒和待测标本加入到反应管中，标本中FSH 与磁颗粒上抗体结合，再加上吖啶酯标记抗FSH 多克隆抗体，经过温育，形成磁颗粒抗FSH －FSH －吖啶酯标记抗FSH 复合物。

2）游离和结合部分的分离：在电磁场中进行2～3 次洗涤后，很快地将未结合的多余FSH 和标记抗FSH 抗体洗去。

3）化学发光反应：经过洗涤的磁性颗粒中，加入氧化剂过氧化氢溶液和pH 纠正液氢氧化钠溶液，使其呈碱性，这时吖啶酯在不需要催化剂的情况下分解发光，由集光器接收光，经光电倍增管放大作用，记录1S 内所产生的光子能。这部分光的积分与被测标本中FSH 含量成正比，根据标准曲线可以自动计算出其中FSH 含量。

【注意事项】

1）吖啶酯作为标记物的优点是其背景噪音低、化学反应简单且快速，无催化剂。

2）吖啶酯用作标记物时，其与大分子的结合并未减少所产生的光量，从而增加灵敏度。本法灵敏度可达10－15g/L。

3）吖啶酯标记试剂有效期长，可达1 年。

4）固相分离剂为极细的磁粉，其除增大包被面积、加快反应外，亦同时使清洗及分离更简易、快捷。

【临床应用】

已应用于各种激素、肿瘤标志物、药物及其他微量生物活性物质的测定。

五、电化学发光免疫测定

【原理】

电化学发光免疫测定（electrochemi luminescence immunoassay，ECLI）是电化学发光（ECL）和免疫测定相结合的产物。ECL 原理与一般化学发光（CL）不同，是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应，实际上包括了电化学和化学发光两个过程。ECL 与CL 的差异在于ECL 是电启动发光反应，而CL 是通过化合物混合启动发光反应。化学发光剂三联吡啶钌［Ru（bpy）$_3$］$^{2+}$和电子供体三丙胺（TPA）在阳性电极表面可同时失去一个电子而发生氧化反应。二价的［Ru（bpy）$_3$］$^{2+}$被氧化成三价，成为强氧化剂，TPA 失去电子后被氧化成阳离子自由基TPA^{+}，它很不稳定，可自发地失去一个质子（H^{+}），形成自由基TPA，成为一种很强的还原剂，可将一个高能量的电子递给三价的［Ru（bpy）$_3$］$^{3+}$使其形成激发态的［Ru（bpy）$_3$］$^{2+}$。激发态的三联吡啶钌不稳定，很快发射出一个波长为620nm 的光子而回复到基态的三联吡啶钌。这一过程可在电极表面周而复始地进行，产生许多光子，使光信号增强（图5－1－12）。

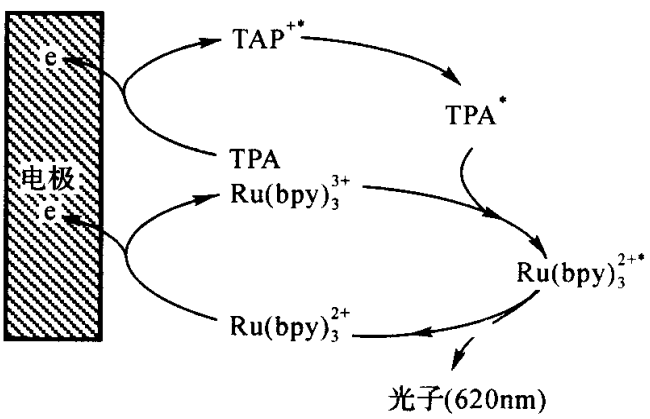


图5－1－12　电化学发光原理示意图

【方法学模式】

1）分离方法：磁颗粒分离法。

2）免疫学反应模式：同酶发光免疫测定技术，主要也有双抗体夹心法、双抗原夹心法和固相抗原竞争法3 种模式，所不同的只是相应标记抗原或抗体上标记的是三联吡啶钌而不是酶。

【试剂】

1）三联吡啶钌的标记物：通过三联吡啶钌的N 羟基琥珀酰胺酯将其与抗原或抗体连接，制成三联吡啶钌标记物。

2）免疫磁珠：可将抗原或抗体直接或通过生物素－亲和素系统包被在磁珠颗粒上，制成免疫磁珠。

3）三丙胺溶液。

4）定标液和质控液。

【器材】

电化学发光免疫测定仪。

【操作】

以甲胎蛋白（AFP）检测为例。

1）结合了 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$*－N 羟基琥珀酰胺酯的AFP 抗体和结合了生物素的AFP 抗体与待测血清同时加入一个反应杯中孵育9min。

2）将链霉亲和素包被磁珠加入反应杯中，再次孵育9min，使生物素通过与亲和素的结合将磁珠、抗AFP 抗体连接为一体，形成双抗体夹心。

3）蠕动泵将形成的 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$－抗体－抗原－抗体－磁珠复合体吸入流动测量室，磁珠被工作电极下面的磁铁吸附于电极表面。同时，游离的抗AFP 抗体（与生物素结合的和与 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$结合的抗体）也被吸出测量室。

4）蠕动泵加入含三丙胺（TPA）的缓冲液，同时电极加电压，启动ECL 反应过程。该过程在电极表面周而复始地进行，产生许多光子。通过光电倍增管检测光强度，光强度与 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$浓度呈线性关系，从而推测出待测抗原含量。

5）最后，终止电压，移开磁珠，加入清洗液冲洗流动测量室，准备下一个样品测定。

【注意事项】

1）标记物的再循环利用，使发光强度更高、时间更长、易于测定。

2）ECLI 具有灵敏度高（可达ng/L 水平）、线性范围宽、反应时间短、试剂稳定性好等特点。

【临床应用】

应用于各种激素、肿瘤标志物、药物及其他微量生物活性物质测定。

第六节　固相膜免疫测定技术

固相膜免疫测定（solid－membrane immunoassay）技术是最新发展起来的一种以固相

膜为载体的标记免疫技术，以快速定性测定为主。根据标记物不同，可分为酶、胶体金、胶体硒、彩色胶乳标记的固相膜免疫测定技术，本节重点介绍目前临床上常用的酶免疫渗滤试验、酶免疫电转移印迹法、斑点金免疫渗滤试验、斑点金免疫层析试验。

一、斑点酶免疫渗滤试验

【原理】

斑点酶免疫渗滤试验（dot immuno enzyme filtration assay，DIEFA）将抗原或抗体点加在固相载体硝酸纤维素薄膜上（这种固相载体具有过滤性能），制成抗原或抗体包被的微孔滤膜，贴置于吸水材料上，依次滴加在膜上的标本、酶结合物、底物及洗涤液等液体很快渗入吸水材料中，最后在膜上呈现着色斑点者为阳性反应。酶免疫渗滤试验中液体通过微孔滤膜时，渗滤液中的抗原或抗体与膜上的抗体或抗原相接触，起亲和层析的浓缩作用，达到快速检测的目的（一般在5min左右完成），同时洗涤液的渗入在短时间内即可达到彻底洗涤目的，简化了操作步骤。

【试剂】

该法的试剂均有现成试剂盒供应，试剂盒由反应板（包被有抗体或抗原）、酶标物和酶底物、洗涤液、抗原参照品或抗体阳性对照物等组成。

【操作】

以双抗体夹心法测抗原为例。

1）反应板1块，加入血清或尿液标本1滴，待其渗入，标本中抗原与包被在反应板微孔滤膜上的抗体发生反应。

2）酶标抗体1滴，待其渗入，酶标抗体与已结合的抗原发生反应。

3）加洗涤液2滴，待其渗入，洗去未结合酶标抗体。

4）加底物液1滴，待其渗入，使其显色。

【结果判断】

在膜中央出现着色斑点者为阳性。

【方法学评价】

简便、快速、特异，不需任何仪器设备，可随时随地实施，为“床边检验（POCD）”的方法之

【临床应用】

由于酶免疫渗滤试验属于定性检测，其结果用阴性、阳性表示，因此，目前主要应用于正常标本中不存在的物质的检测（如HBaAg和HAV-IgM检测等）或正常标本中仅有微量存在而在有临床诊断意义情况下含量会明显升高的物质（如尿液中HCG检测等）。

二、酶免疫电转移印迹法

【原理】

酶免疫电转移印迹法（enzyme linked immunoelectrotransfer blot，EITB）简称酶免疫印迹技术（immunoblotting technique，IBT，该法与由Southern早先建立的核酸分析方法（Southernblot）相似，亦被称Western印迹法（Western blot），其本质上就是蛋白质电泳技术和固相膜酶免疫技术相结合的一种分析方法，即先将抗原等蛋白质样品经十二烷基硫酸钠（SDS）处理后带上负电荷，进行SDS－聚丙烯胺凝胶电泳（SDS－PAGE），根据分子量大小分成不同条带，然后将电泳结果的条带转移至硝酸纤维素膜上，依次与标本中特异性抗体、酶标抗体作用后，加入底物启动呈色反应，产生不溶性显色物，使条带染色。临床上主要用于用已知的抗原混合物做试剂材料来检测标本中是否存在相应的特异性抗体。

【试剂】

现有商品试剂盒中包括：硝酸纤维膜抗原带、酶促反应底物、洗涤液、终止液、标准区带图谱、酶标记的抗人IgG抗体、质控物、阳性和阴性对照物、反应槽。

【操作】

1）将待检血清按说明书要求稀释后，加到放有抗原膜条的反应槽（已编号）内，平放于摇床上，按说明书规定的温度和时间等具体要求振摇。

2）振摇结束后，弃去槽内液体。按说明书要求，用洗涤液洗涤膜条，并吸干。

3）在反应槽内加入酶标记抗体，同上振摇。

4）同上洗涤并吸干膜条。

5）按说明书要求，在反应槽内加入显色液并经过规定时间后，再加入终止液终止反应。

6）按规定洗涤膜条后，取出吸干。

7）将膜条上的条带与试剂盒所附标准区带图谱对比，即可判断标本中存在的抗体。

【临床应用】

目前主要应用系列抗体的检测，如可提取性核抗原（ENA）系列抗体检测和人类免疫缺陷病毒（HIV）感染的确诊试验。

三、斑点金免疫渗滤试验

【原理】

斑点金免疫渗滤试验（dot immunogold filtration assay，DIGFA）的基本原理同酶免疫渗

滤试验，只是用胶体金标记物取代了酶标记物，胶体金标记物本身呈红色，阳性反应即在膜中央显示红色斑点。

【方法学类型】

(1) 双抗体夹心法测抗原：用抗体结合在微孔滤膜中央，滴加待检标本，若标本中含有待检抗原则与膜上抗体结合，然后滴加金标抗体，加洗涤液洗涤后，阳性者即在滤膜中央呈红色斑点（胶体金聚集）。

(2) 间接法测特异性抗体：用抗原包被在微孔滤膜上，滴加待检标本，滴加洗涤液洗涤后，滴加金标抗抗体，加洗涤液洗涤后，阳性结果在膜中央呈红色斑点（胶体金聚集）。该法由于血清标本中非目的IgG 的干扰，易导致假阳性结果，临床上较少用。

【试剂】

本法已有成套试剂盒供应。试剂盒主要由滴金反应板、胶体金标记物、洗涤液、抗原参照品或抗体阳性对照品等组成。

【操作】

以双抗体夹心法测绒毛膜促性腺激素（HCG）为例，具体步骤如下：

(1) 将反应板平放于实验台面，于小孔内滴加血清标本1～2 滴，待其完全渗入，与膜上的抗HCG 抗体反应。

(2) 于小孔内滴加胶体金标记的抗HCG 抗体试剂1～2 滴，待其完全渗入，使胶体金标记的抗HCG 抗体与结合在膜上HCG 发生反应。

(3) 于小孔内滴加洗涤液2～3 滴，待完全渗入，洗去未结合的胶体金标记抗HCG 抗体。

【结果判断】

在滤膜中央有清晰的淡红色或红色斑点显示者判为阳性反应，反之则为阴性反应。斑点呈色的深浅相应地提示阳性强度。

【临床应用】

同酶免疫渗滤试验。

四、斑点金免疫层析试验

【原理】

斑点金免疫层析试验（dot immunogold chromatrographic assay，DICA）是胶体金标记技术和蛋白质层析技术结合以微孔滤膜为载体的快速固相膜免疫分析技术，与胶体金免疫渗滤试验的过滤性能不同。DICA 中滴加在膜一端的标本溶液受载体膜的毛细管作用向另一端移动，犹如层析一般，在移动过程中被分析物与固定于载体膜上某一区域的抗体或抗原结合而被固相化，无关物则越过该区域而被分离，然后通过胶体金的呈色条带来

判定实验结果。

【试剂】

临床上有现成试剂盒供应，试剂盒主要成分为胶体金层析条，所用试剂全部为干试剂，它们被组合在一试剂条上（如图5－1－13），试剂条的底板为单面胶塑料片，层析条为多孔聚乙烯、硝酸纤维素、玻璃纤维素材料，A、B两端粘贴吸水性强的滤纸等材料。

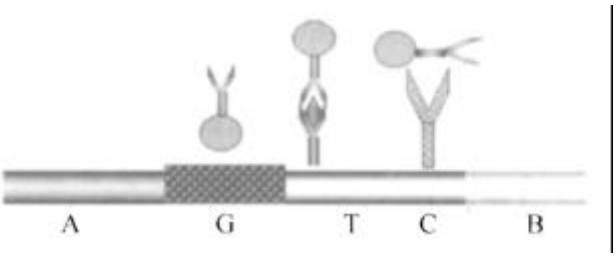


图5－1－13　免疫层析试验测抗原原理示意图

【方法学类型】

1）双抗体夹心法测抗原：以乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）检测为例（见图5－1－13）。G处为胶体金标记抗HBsAg单克隆抗体（免疫金），T处包被有抗HBsAg单克隆抗体，C处包被抗免疫金抗体，B处为吸水纸。测试时A端滴加血清，通过层析作用，血清向B端移动，流经G处时将金标记抗HBsAg抗体复溶，若血中含HBsAg，即形成金标记抗HBsAg－HBsAg复合物，移至T区时，形成金标记抗HBsAg－HBsAg－抗HBsAg复合物。金标记抗HBsAg抗体被固定下来，在T区显示呈阳性反应的红色反应线，多余的金标记抗HBsAg抗体移至C区被抗免疫金抗体捕获，呈现红色质控反应线。

2）间接法测抗体：为了消除待测血清标本中大量的非特异性IgG与特异性IgG竞争结合金标记抗人IgG，DICA测抗体常设计成反流免疫层析法如图5－1－14。测试卡分成可左右折叠的两部分，右面中央纵向贴有膜条，膜上包被有抗原线，E处为与血清结合的蓝色染料，F处为吸水材料；左面中央开有观察窗B，C处固定有金标记抗人抗体，A、处为吸水材料。测定时先将缓冲液加在D处使金标记抗人抗体复溶，然后将血清加在E处使其与蓝色染料一起在膜的层析作用下向F端移动。若血清中有待测抗体存在，则与膜上抗原结合形成抗原抗体复合物。待蓝色延伸至膜上标记线G处时，在F处加缓冲液，合上测试卡。此时A处的强大吸水作用使膜上液体反向流动，血清中非特异性IgG及无关物被洗回E处，随后而来的金标抗人抗体与抗原抗体复合物结合，出现棕红色线条。无棕红色线条出现则表明血清中无特异性抗体。该法可有效排除非特异性抗体对测试的干扰。

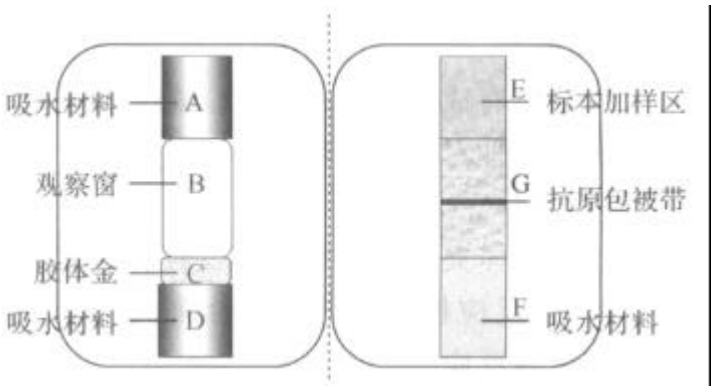


图5 —1 —14　免疫层析试验测抗体原理示意图

(3) 竞争法测小分子抗原：以检测吗啡为例。试剂条按图5 —1 —15 样制作，只是G 处为胶体金标记的抗吗啡抗体。T 处包被吗啡，C 处包被抗免疫金抗体。测试时尿液加于A 端，若尿液中含有吗啡，流经G 处时可结合胶体金标记的抗吗啡抗体，当复合物移至T 处时，因无足够游离的胶体金标记抗吗啡抗体与膜上吗啡结合，T 处无棕红色线条出现，实验结果为阳性，胶体金标记复合物流经C 处，与该处的抗免疫金抗体结合出现棕红色的质控带，若尿液中不含吗啡，标记的抗吗啡抗体则与T 处膜上的吗啡结合，在T 处出现棕红色的线条，实验结果为阴性。

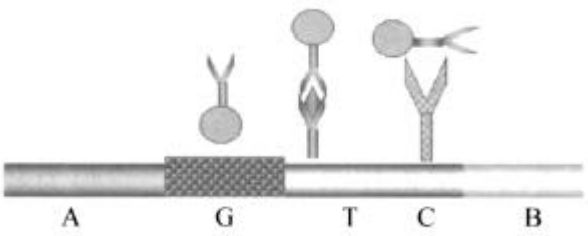


图5 —1 —15　竞争法测小分子抗原原理示意图

【操作】

以检测血清乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 为例。将试剂条标记线一端浸入待检血清中2 ~5s 或在标本加样处加一定量待检血清，平放于水平桌面上，5 ~20min 内观察结果。

【结果判断】

出现1 条棕红线质控条带为阴性，出现两条棕红线条带为阳性，若试剂失效则无棕红线条带出现。

【临床应用】

(1) 传染病抗原和抗体检测：如链球菌A 抗原、疟原虫抗原等和抗丙型肝炎病毒抗体，抗人类免疫缺陷病毒抗体等。

2）尿液绒毛膜促性腺激素检测：目前主要用于早早孕诊断。

3）药物检测：如吗啡、可卡因、鸦片等检测。

第七节　免疫组织化学技术

免疫组织化学技术（immunohistochemistry technique，IHCT）是利用抗原与抗体特异性结合原理，以标记抗体对组织或细胞内相应抗原进行定性、定位和定量检测，或用标记抗抗体和已知组织或细胞涂片，对标本中是否存在相应抗体以及抗体性质进行检测。根据标记物不同，分为荧光免疫组化技术、酶免疫组化技术、免疫金银组化技术等。

一、荧光免疫组化技术

【原理】

荧光免疫组化技术（fluorescence immunohistochemistry technique，FIHCT）将特异性抗体制成荧光标记抗体，使其与组织或细胞涂片上相应抗原结合后，用荧光显微镜检查荧光现象或荧光强度来判断有无待测抗原，并进行定位和相对定量。也可用荧光标记抗抗体，用已知抗原的组织或细胞涂片检测待检血清中有无相应抗体。

【器材】

荧光显微镜是荧光免疫组化技术中的基本设备。

1．荧光显微镜主要结构

1）光源：由于荧光物质的量子效率极低，要求有一个很强的激发光源，通常用高压汞灯、氙灯或卤素灯。卤素灯的灯丝产生较低强度的辐射光，其波长范围较宽，且呈连续性。氙灯产生高能的连续光谱。汞灯发出的光极强，其波长为不连续性，仅有一些特定的波长，其主要发射峰在365～435nm。

2）滤板：滤板的作用在于隔热、选择适宜的激发光及滤出荧光。按其作用分为隔热滤板、激发光滤板及吸收滤板。①隔热滤板：能阻断红外线的透过而隔热，安装在灯室的聚光镜前面。②激发光滤板：又称初级滤板，能透过紫外线可见光波长的光域，以激发荧光色素。常用的激发光滤板有以下3 类：紫外光滤板，主要透过275～400nm 的波段光，阻挡400nm 以上的可见光；蓝色滤光板，主要透过350～490nm 范围内的波段光；紫外蓝光滤板，主要透过300～450nm 范围的波段光。③吸收滤板：又称二级滤板或栅状滤板，其作用是阻断激发光而透过荧光，使标本在暗的背景上呈现荧光，易于观察，亦保护眼睛免受强激发光刺激。吸收滤板分为3 类：紫外光吸收滤板，能阻断紫外线的通过，可通过可见光；蓝紫色光吸收滤板，能阻断紫外线和蓝紫光，让波长大于

500nm 的光波通过；绿色光吸收滤板，为红色滤板，能阻断紫外光、蓝紫光及绿光，让波长大于580nm 的光波通过。

3）聚光器：有明视野、暗视野及相差荧光聚光器几种。聚光器不应吸收紫外线。它与光源、光路、激发光滤板适宜组合，以期在黑色的背景上获得满意的荧光。

4）镜头：镜头需无荧光。目镜有消色差、复消色差两类镜头，常用消色差镜头。

5）光路：分透射光及落射光两种形式。①透射光：其照明光线从标本下方经过聚光器汇聚后，透过标本进入物镜。适于观察对光可透的标本。②落射光：其照明光线是从标本上方，经过套在物镜外周的特殊的垂直照明器，从物镜周围落射到标本上，经标本反射而进入物镜。适用于观察透明度不好的标本以及各种活性组织等。与透射光联合照明，可同时观察两种荧光色素的荧光，或同时观察发荧光物质在细胞内的定位。

2．荧光显微镜使用的注意事项

在开启荧光显微镜前应注意仪器上的电源、电压及频率是否与实际相符，最好使用稳压电源，以免灯光闪烁不稳，损坏灯管。在点亮高压汞灯时，一般需待5～15min 预热。由于它是通过电极间放电，使水银分子不断解离和还原从而发射光量子，因此，开始时亮度极低，以后当水银完全蒸发时亮度最大。更需注意的是在启动后不能立即（或15min 内）关闭，以免水银蒸发不完全而破坏电极。熄灭后需待灯管完全冷却后才能开启，开启与熄灭频繁会大大缩短汞灯寿命。

在使用荧光显微镜进行检测时，应注意显微镜常用的普通香柏油在紫外线中会受激发光影响。因此，香柏油加入硝基苯（荧光熄灭剂）后才可使用。通常荧光显微镜需配以专用的无荧光油，也可用纯甘油1 份和pH7.6 的磷酸缓冲液9 份混合配制，或用苯甲醚等代用品。

【方法学类型】

1）直接法：只有抗原、抗体直接参与反应，利用荧光标记特异的抗体与相应的抗原结合，以此来鉴定未知抗原，示意如图5－1－16。此法优点是简单快速，特异性高。缺点是一种荧光标记抗体只能对应一种抗原，敏感性较差和不能检查未知抗体。

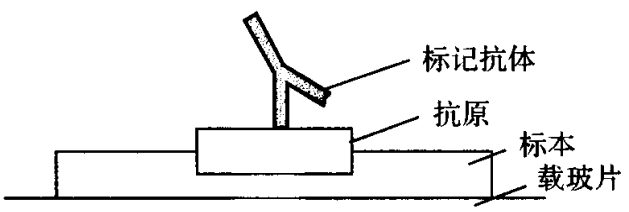


图5－1－16　免疫荧光直接法原理示意图

2）间接法：利用荧光标记抗免疫球蛋白抗体（抗－抗体）鉴定未知抗原或抗体。

第1 步，用已知抗体、抗原和未知抗原或抗体反应，这步反应是不可见的，反应的沉淀物（免疫球蛋白）被固定在组织、细胞等位置上。第2 步反应，加上荧光标记抗人免疫球蛋白的抗体（抗－抗体），前抗原抗体沉淀物（人免疫球蛋白）成为相对抗原和荧光标记抗人球蛋白的反应，形成抗原抗体复合物，再根据组织或细胞发荧光的部位来判断，示意如图5－1－17。其优点是只要一种标记抗体（抗人球蛋白）就能与所有免疫球蛋白对应的未知抗原或抗体反应。缺点是如果抗体或抗原纯度不高，实验可受非特异性荧光干扰。

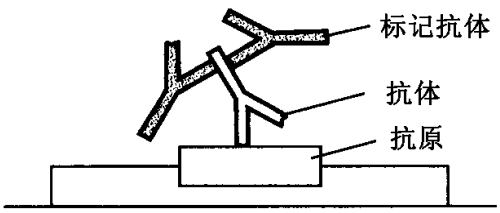


图5－1－17　免疫荧光间接法原理示意图

3）补体法：根据补体结合反应的原理，用荧光标记抗补体抗体鉴定未知抗原或抗体。第1 步，已知抗体或抗原和未知抗原或抗体反应；第2 步，加新鲜补体或新鲜正常人血清反应；第3 步，加荧光标记抗补体抗体，则荧光标记抗补体抗体特异地和固定的补体结合，见图5－1－18。此法的优点只需要一种荧光标记抗补体抗体，就可以检查所有种系的抗原抗体系统，因为补体可被任何哺乳类的抗体抗原系统所固定。缺点是补体不稳定，其次是非特异性荧光强。

【试剂】

以自身抗体检测为例。

1）抗原基片：将各种细胞或组织固定于载玻片上制成。

2）荧光素标记抗体：常用为异硫氰酸荧光素（FITC）标记的抗人IgG 抗体。

3）缓冲液：0.01mol/L PH7.2 磷酸盐缓冲液（PBS）。

4）质控物：阴性和阳性对照。

5）缓冲甘油（pH7.2）。

6）湿盒。

【操作】

1）被检物（血清、脑脊液或其他渗出液等），根据需要用缓冲液适当稀释（1∶5 或1∶10）滴于抗原基质片上，置室温或37℃温箱中反应30min～1h。

2）用缓冲液冲洗15min（更换磷酸盐缓冲液3 次）。

3）加荧光素标记抗体，置室温或37℃温箱30min～1h。

4）磷酸盐缓冲液冲洗，同步骤2。

5）缓冲甘油封片，荧光显微镜镜检。

【结果判断】

在荧光显微镜下观察，通过发光部位辨认特异性荧光和非特异性荧光，然后报告实验结果。

【注意事项】

1）每批实验都要做阴性、阳性对照。

2）磷酸盐缓冲液冲洗要充分。

3）抗原片从冰箱中取出，应立即用电吹风吹干。

4）固定问题：组织切片或细胞涂片应迅速固定，以防细胞自溶；同一固定剂对不同抗原的固定效果有区别，应注意选择；固定温度一般为室温即可。常用的固定剂及其固定时间如下：①丙酮：一般固定5～15 min。纯丙酮可使细胞收缩，故以80%的丙酮溶液效果较好。②10%中性甲醛溶液：一般固定10～15 min。③4%多聚甲醛溶液：用0.1 mol/L pH7.4的磷酸盐缓冲液配制。配制时，需加热至60 ℃，边滴加1 mol/L氢氧化钠溶液边搅拌，直至液体澄清。一般固定3～5 min。④95%乙醇：一般固定5～15 min。

标本经丙酮或乙醇固定后，应置于通风处10～15 min，使残留的固定剂挥发。用甲醛固定者需用缓冲液彻底清洗。固定后标本于室温下晾干数小时。若暂不使用，应用箔纸包裹保存于－20 ℃。

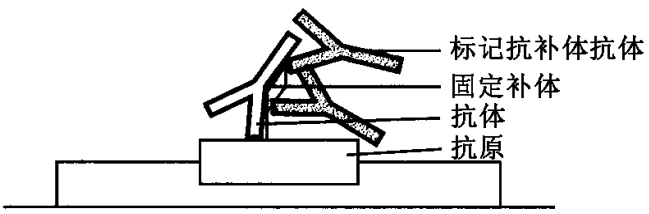


图5－1－18　免疫荧光补体法原理示意图

5）非特异性染色问题：非特异性染色表现为涂片上均匀的阳性或弱阳性染色，主要是细胞内高电荷化学基团吸附了抗体所致。可通过下列办法预防：①标本染色前先与5%正常牛或羊血清孵育20 min，或在一抗、二抗的孵育液中掺入5%正常牛或羊血清，以封闭这些高电荷基团。②选择高稀释度的抗体。在保证染色效果的前提下，稀释度宜高不宜低。③抗体孵育后彻底清洗载玻片，避免操作原因导致抗体残留。④洗液中加入Trinton－X，可减少抗体的非特异性吸附。

【临床应用】

目前主要应用于自身免疫病的诊断、免疫细胞分型以及细菌、寄生虫等病原体的诊断。

二、酶免疫组化技术

【原理】

酶免疫组化技术（enzyme immunohistochemistry technique，ZIHCT）基本原理同荧光免疫组化技术，所不同的是本法采用的是酶标记抗体。酶对底物作用，产生有色物质沉积在抗原抗体反应部位，通过普通光学显微镜对组织或细胞抗原进行定位、定性。

【方法学类型】

1）直接染色法：用酶标抗体直接与组织或细胞涂片上相应抗原反应，洗去未结合的酶标抗体后，加入酶促底物，产生有色物质沉淀在抗体抗原反应部位。通过染色物质对组织或细胞抗原进行定位、定性。

2）间接染色法：用已知抗体（Ab_1）与标本中相应抗原（Ag）反应，形成Ag－Ab_1复合物，再用酶标记抗体（Ab_1－E）与Ab_1－Ag反应，加入底物后根据底物呈色反应对抗原定性、定位。

3）酶桥染色法：用酶（E）和抗酶抗体（Ab）形成Ab－E复合物，用特异性抗体（Ab_1）与组织或细胞涂片上的相应抗原（Ag）形成Ag－Ab_1复合物，用抗－抗体（Ab_2）将Ab－E和Ag－Ab_1两个复合物桥联起来。可用于抗原或抗体的检测。

4）过氧化物酶抗过氧化物酶法：过氧化物酶抗过氧化物酶法（PAP法）同酶桥染色法，只是酶和酶抗体制成免疫复合物（PAP）代替了酶桥染色法中的酶和抗酶抗体，将两步变成一步。

5）葡萄球菌蛋白A法：葡萄球菌蛋白A（SPA）具有与人、小鼠、猴等动物的Fc段结合的能力，酶标记SPA可作为“标记二抗”；同时SPA的分子量小，穿透细胞的能力强于抗体，因此，可提高方法学的灵敏度。

6）ABC法：将链亲和素（SA）和酶标生物素（E－B）共温，形成亲和素－生物素－酶复合物（avidin－biotin－peroxidase complex，ABC），再加入生物素化二抗，与其中亲和素未结合部位结合，使抗原抗体反应体系与ABC标记体系连成一体，可大大提高方法学的灵敏度。

【酶与底物】

1）辣根过氧化物酶与底物：常用的辣根过氧化物酶（HRP）底物为3，3′－二氨基联苯胺（DAB），经酶促反应后产生棕色沉淀物，其反应式如图5－1－19。使用时应注意：①底物显色液须现配，配好后即刻使用；②内源性过氧化物酶导致非特异性染色，应在免疫染色前用含3％过氧化氢的缓冲液处理标本15min；③DAB具有致癌性，操作时应戴手套，称量时应无风。

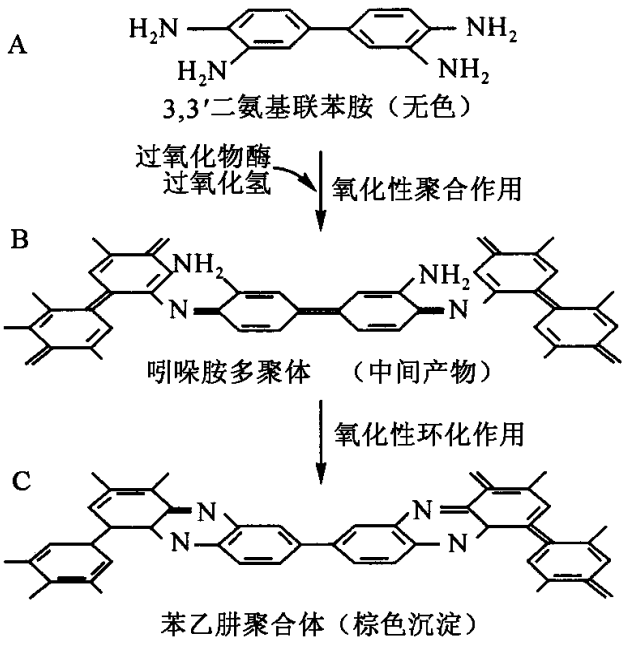


图5 —1 —19

2） 碱性磷酸酶与底物：碱性磷酸酶 （ALP） 主要用于检测内源性过氧化物酶含量高的细胞，以避免非特异性染色。内源性ALP 多存在肠黏膜、肾小管及血管内皮等物质运输活跃部位的细胞，可被左旋咪唑抑制。目前已有ALP －抗ALP （APAAP） 复合物，其底物为BCIP／NBT，显色为蓝紫色。反应式如图5 —1 —20。

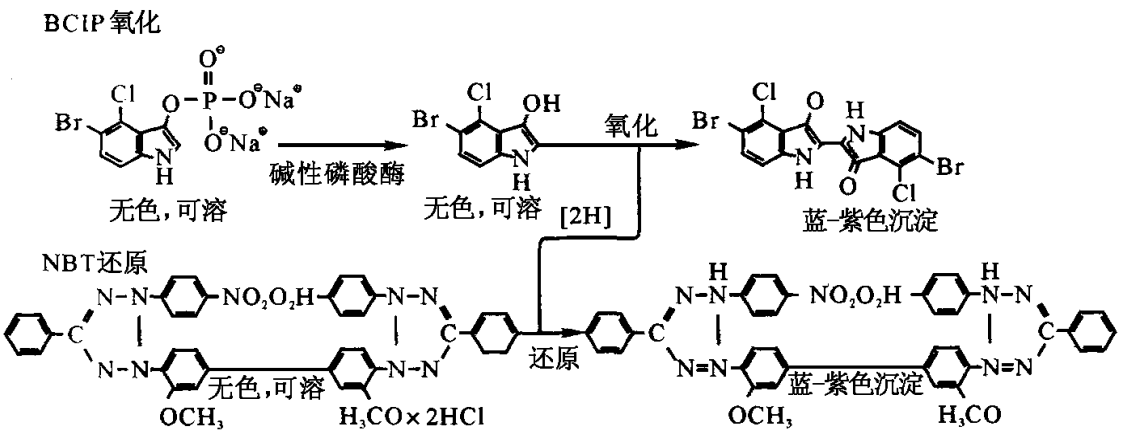


图5 —1 —20

【试剂】

以PAP 法为例：0.3 %过氧化氢溶液、甲醇、一抗 （Ab_1） 溶液、二抗 （Ab_2） 溶液、PAP 复合物、底物3，3′－二氨基联苯胺和过氧化氢溶液、正常羊血清。

【操作】

以PAP 法为例。

1） 标本处理：于室温用0.3 %过氧化氢溶液和80 %甲醇处理20 ～30 min，以消除

内源性过氧化物酶的干扰。

2）用正常羊血清处理，封闭非特异性结合点。

3）加Ab_1，孵育，形成Ag－Ab_1复合物。洗涤，洗去未结合Ab_1。

4）加Ab_2孵育，形成Ag－Ab_1－Ab_2复合物。洗涤，洗去未结合的Ab_2。

5）加PAP 孵育，形成Ag－Ab_1－Ab_2－PAP 复合物。洗涤，洗去未结合的PAP。

6）加底物显色。

7）用光学显微镜观察，根据显色特征对抗原定性和定位。

【临床应用】

同荧光免疫组化技术。

三、免疫金银组化技术

【原理】

免疫金银组化技术（immunogold silver histochemistry technique）又称免疫金银染色（immunogold silver staining，IGSS）是在免疫金染色技术上发展起来的一门新染色技术。免疫金染色使用的胶体金颗粒直径通常为20nm 左右，镜下呈粉红色，因体积较大的金颗粒与抗体的结合不十分稳定，降低了检测灵敏度；免疫金银染色技术可有效地提高方法学灵敏度。其原理是使已在抗原位置沉积的金颗粒发挥催化作用，促使银离子被对苯二酚还原为银原子，在金颗粒表面形成一层银壳。银壳本身也具有催化作用，可使更多银离子还原沉积，银壳边增大，镜下呈现较大的黑色颗粒，抗原存在部位便显著放大。

【方法学类型】

1）直接法：用金标抗体（Au－Ab）直接与组织或细胞涂片上的抗原反应，形成Ag－Ab－Au 复合物，加入银增强液，在光学显微镜下可观察到Ab－Au 结合部位呈现黑色颗粒。

2）间接法：用胶体金标记物（如Au－SPA、Au－Ab_2）检测组织或细胞上的抗原，或检测血清特异性抗体的方法。反应后形成Ag－Ab－Au 或Ag－Ab_1－Au－Ab_2复合物，加入银显色反应时，在光学显微镜下可观察到Au－SPA 或Au－Ab_2结合部位呈现黑色颗粒。

【试剂】

以金黄色葡萄球菌A 蛋白－胶体金银法为例。

1）胶体金标记金黄色葡萄球菌A 蛋白（SPA－G）。

2）2.0mol/L pH3.5 枸橼酸缓冲液：取枸橼酸25.5g 溶于100ml 蒸馏水中。

3）乳酸银溶液：取110mg 乳酸银溶于15ml 蒸馏水中。

4）对苯二酚溶液：取950mg 对苯二酚溶于15ml 蒸馏水中。

5）500g/L 阿拉伯树胶：阿拉伯树胶50g 溶于蒸馏水100ml 中，每天振摇5 次，5 天后过滤使用。

6） 银增强液工作液配制：将上述试剂2 、3 、4 、5 按体积比10 ∶15 ∶15 ∶60 比例混合即得。

7）0.02mol/LpH7.4 的Tris －盐酸缓冲液。

【操作】

以SPA －胶体金银染色法检测抗核抗体 （ANA） 为例。

1） 抗原片制备：可以购买或自制。自制方法：取肝印片或细胞培养涂片，用丙酮固定10min ，空气干燥10min ，用磷酸盐缓冲液清洗2min 。保存待用。

2） 免疫金银染色步骤：将待检血清用磷酸盐缓冲液作1 ∶10 稀释，均匀滴加于抗原片上，37 ℃湿盒中孵育30min 。流水冲洗后用磷酸盐缓冲液浸洗3 次，每次5min ，用16.0g/L 牛血清白蛋白溶液封闭15min ，倾去牛血清白蛋白溶液，滤纸吸干。均匀滴加最适工作浓度的SPA －G ，于37 ℃湿盒中反应30min 后同上法洗涤，吸干。均匀滴加新配银增强液工作液，置室温避光染色约10min ，流水冲洗后晾干，脱水，透明，封固，高倍镜或油镜检查。

【结果判断】

背景呈极浅的棕黄色，阴性细胞无色透明或浅棕黄色，阳性细胞核区有棕黑色颗粒吸附。

【注意事项】

1） 蒸馏水需以玻璃蒸馏器重蒸或三蒸，使其不含离子并防微生物污染。

2） 银染色液对光敏感，溶液应避光保存，工作液应现配现用，染色时应避光孵育。

第八节　外周血淋巴细胞分离技术

外周血是研究淋巴细胞功能的最好材料来源，利用体外检测技术对各种淋巴细胞进行功能研究，须将各种淋巴细胞分离出来。根据研究目的不同，分离的需求和技术也各异，有的仅需分离单个核细胞 （含淋巴细胞和单核细胞），有的需分离T 细胞和B 细胞或其亚群以及具有杀伤作用的大颗粒淋巴细胞。选择分离外周血淋巴细胞方法学的原则是技术简单、细胞回收率高、所得细胞纯度高、所得细胞活力好、分离量大，能满足临床需要。临床上常用的淋巴细胞分离技术有密度梯度离心法、尼龙毛柱分离技术、荧光激活细胞分离技术、免疫磁珠法分离技术等。

一、密度梯度离心法

【原理】

人外周血中不同细胞的密度不同，如单个核细胞密度为1.076～1.090g/ml，红细胞与多形核白细胞密度较大，约1.092g/ml，血小板为1.032g/ml。利用一种密度介于1.076～1.092g/ml之间的等渗溶液（又称分层液）作密度梯度离心，使不同细胞呈密度梯度分布，界面层为单个核细胞，底部为红细胞和粒细胞，上层为血小板。常用的分层液是聚蔗糖－泛影葡胺分层液，是由聚蔗糖和泛影葡胺按一定比例混合成密度为（1.077±0001）g/ml的等渗、无毒溶液，常称为淋巴细胞分离液。

【试剂】

淋巴细胞分离液（密度为1.077±0.001g/ml）；Hanks液；PMI1640培养液（含10%胎牛血清、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素）；20g/L锥虫蓝溶液：称取4g锥虫蓝置于研钵中，加少量蒸馏水反复研磨，加蒸馏水至100ml，以1500r/min离心15min，收获上清液用18g/L氯化钠溶液稀释1倍即可。

【器材】

显微镜、水平离心机、细胞计数板、刻度离心管、试管、吸管等。

【操作】

1）加分离液：将淋巴细胞分离液混匀后小心地加于离心管底部，体积不超过离心管体积1/4。

2）加待分离抗凝血：取抗凝血（建议用肝素抗凝，浓度为12.5～25.0U/ml）用Hanks液稀释1倍，混匀。用吸管将稀释血液沿管壁轻轻加于淋巴细胞分离液上面，保持界面清晰，稀释血与淋巴细胞分离液体积比为3∶2，且总体积不超过离心管3/4。

3）离心：将离心管置水平离心机中，以2000r/min离心20min。

4）吸出单个核细胞：用毛细吸管轻轻地插到单个核细胞的界面上，将细胞吸出，用Hanks液洗涤3次。

5）计数：取单个核细胞悬液100μl，加等量血细胞稀释液，混匀，按常规用计数板或细胞计数仪进行计数，然后根据实验需要，用RPMI1640培养液配成一定浓度。

6）细胞活性检查：取2滴细胞悬液加1滴20g/L锥虫蓝染液，混匀，5min后，取样作湿片检查，活细胞不着色，死亡细胞呈蓝色。共计数200个细胞，算出活细胞的百分率即细胞活性。

【注意事项】

1）本操作的关键是要求稀释的血液与淋巴细胞分离液之间必须形成分明界面。因此，将稀释血液叠加于分离液界面时，动作一定要轻，避免与分离液混合而影响分离效

果。

(2) 用锥虫蓝溶液检查细胞活性，应保证在15min 内完成，避免时间过长因活细胞摄取锥虫蓝而着色。另外细胞活力还可用中性红染色，但要注意，此时活细胞吸收染料呈红色，而死细胞不着色。

(3) 由于不同种属动物血液中白细胞密度不同，因此应使用不同密度的分离液，例如：人类为1.077g/ml，小鼠为1.098g/ml，马为1.090g/ml。

【临床应用】

用于外周血单个核细胞的分离。

二、连续Percoll 密度梯度离心法

【原理】

Percoll 是一种经聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒，对细胞无毒性。Percoll 溶液在高速离心力作用下，可自动形成连续性密度梯度，将待分离细胞悬液加于此梯度之上，通过低速离心，具有不同密度的细胞将按照自身密度分布于相应密度的梯度介质中，分步收集即可获得不同密度的细胞。

【试剂和材料】

Percoll 原液（相对密度为1.135g/L），0.01mol/L、PH7.4 的磷酸盐缓冲液，含10%胎牛血清的Hanks 液，毛细吸管、刻度吸管、离心管、高速离心机等。

【操作】

(1) 用1 支15ml 离心管，装入7ml Percoll 原液和6ml 磷酸盐缓冲液，混匀，以20000g 离心20～40min，制成密度梯度管，使分离液形成一个从管底到液面相对密度递减的连续密度梯度。

(2) 将单个核细胞悬液轻轻地叠加在密度梯度管的分离液的界面上，经1000g 离心20min，便得4 个细胞层（表层为死细胞碎片和血小板，底层为粒细胞和红细胞，中间上层富含单个核细胞，中间下层富含淋巴细胞）。

(3) 根据实验需要，收集相应细胞层，经洗涤、细胞计数、细胞活力测定后待用。

【注意事项】

(1) 细胞悬液叠加在分离液界面上动作要轻，以保持界面清晰。

(2) 本法分离纯化效果较佳，但需一定实验设备。

【临床应用】

临床上主要用于单个核细胞的进一步纯化。

三、尼龙毛柱分离技术

【原理】

尼龙毛即聚酰胺纤维，B 细胞在37 ℃时易粘附于尼龙毛表面，而T 细胞缺乏此能力。利用这一特性，将淋巴细胞加入特制的尼龙毛柱中，经温育后B 细胞粘附于尼龙毛上，而T 细胞不粘附，先被洗出。然后再用一定量的冲洗液洗出粘附在尼龙毛上的细胞，即获B 细胞。

【试剂和材料】

1） 尼龙毛准备：取尼龙毛放入烧杯中，加入双蒸水，煮沸10 min 左右，冷却至室温后将水倒去，如此重复洗涤6 次后，将尼龙毛置37 ℃恒温箱中干燥2 ～3d ，然后保存于有盖容器中。

2） 双蒸水、含10 %胎牛血清的RPMI1640 、Hanks 液。

3） 烧杯、注射器、细塑料管和支架等。

【步骤】

1） 尼龙毛柱的制备：将尼龙纤维拉松，一股股的纤维分开，梳理并去掉毛结，使之松散而均匀，然后疏松地装入注射器套筒内。

2） 细胞的分离：①将尼龙毛柱垂直固定于支架上，接上针头和细塑料管，用预温至37 ℃的RPMI1640 培养液过柱清洗。②夹住下端出口，加入RPMI1640 培养液浸泡尼龙毛，37 ℃下温育1h 后，排尽1640 培养液，夹住下端。③将预温至37 ℃的淋巴细胞悬液 （约5 ×10^7／ml） 加入柱中，37 ℃温育45 ～60 min 。④用预温至37 ℃的含10 %胎牛血清的RPMI 培养液20 ～60 ml 洗柱。流速控制为1 滴／s 。⑤收流出液即获T 细胞，离心计数待用。⑥柱内粘附细胞的收集：向柱内加入冷RPMI1640 培养液，平放置4 ℃冰箱内30 ～60 min ，用注射芯用力推挤，收集洗下来的细胞，即为B 细胞。

【注意事项】

1） 洗柱速度要适当，太快则T 细胞纯度降低，太慢则细胞回收率减少，一般T 细胞能通过尼龙毛柱，而B 细胞被截留下来。但某些T 细胞亚群也可能粘着在尼龙毛上，导致这些亚群的损失。

2） 尼龙毛可重复使用，使用后用9g／L 氯化钠溶液清洗，置于0.1 mol／L 盐酸溶液中浸泡至少12h ，然后用同新尼龙毛处理方法进行处理。

【临床应用】

应用于淋巴细胞中T 细胞与B 细胞分离。

四、荧光激活细胞分离技术

【原理】

荧光激活细胞分离仪是在流式细胞仪基础上发展而成的一种细胞分选系统，其工作原理见本章第九节。

人外周血T 淋巴细胞主要分为CD^{+4}和CD^{+8}两个亚群。用抗CD4 和CD8 单克隆抗体对T 细胞进行间接荧光染色后，经荧光激活细胞分离仪分离，即可获得相应T 细胞亚群。

【试剂和材料】

1） 鼠抗人CD4 、CD8 单克隆抗体，FITC 标记抗鼠IgG 抗体。

2） 含5 %胎牛血清的0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液 （PBS）。

3） 荧光激活细胞分离仪、加样器、冰箱、离心机、小试管等。

【操作】

1） 待分离细胞的制备：①用磷酸盐缓冲液将T 细胞洗涤3 次后，配成密度为1×10^{8} 个/ml 的细胞悬液。②加入适当浓度的抗人CD4 或CD8 单克隆抗体200 μl，混匀，置4 ℃冰箱中保持30 min。③取出试管，加入磷酸盐缓冲液3 ～5 ml，混匀，1000r/min 离心1 min，去上清液，重复洗涤3 次。④轻摇试管分散细胞，加入适当浓度的FITC 标记抗鼠IgG200 μl，混匀，置4 ℃冰箱中保持30 min。⑤同步骤③洗涤后，加入磷酸盐缓冲液约3 ml 悬浮细胞，移人专用试管。

2） 细胞分离：选择好测定参数，调试好荧光激活细胞分离仪，然后上样分离细胞。

3） 收集分离细胞：分离好的细胞以RPMI1640 培养液洗涤后悬浮于含10 %～20 %胎牛血清的RPMI1640 培养液中，备用。

【注意事项】

1） 样品制备好坏对实验结果至关重要，因此，应注意鼠单克隆抗体 （一抗） 和FITC 标记抗鼠抗体的最适浓度的预试。同时每步洗涤应注意离心速度和时间，若离心速度太快，细胞活力受影响且细胞不易分散，离心速度太慢，则细胞丢失太多。

2） 全部操作尽量避光，以减少荧光衰减。

3） 细胞样品制备好后最好立即上机分离，否则应用避光纸包裹置4 ℃保存，但放置时间不能过长，否则影响细胞活力。

4） 如果制备细胞用于细胞培养，则整个实验过程应采用无菌操作。

【临床应用】

应用于T 细胞亚群、B 细胞、自然杀伤细胞等免疫细胞分离纯化。

第九节　流式细胞分析技术

临床流式细胞分析 （clinical flowcyte analysis） 就是采用流式细胞仪对临床标本中的生物颗粒 （细胞、细胞成分或微生物） 进行识别、鉴定和分析的技术，即流式细胞术

(Flow Cytometry，FCM)。

一、流式细胞仪

目前用于临床的流式细胞仪，性能稳定、操作方便，其主要构造简述如下。

1) 光学元件：氩离子激光器 (激发光488nm) 或增加半导体激光器 (激发光635nm) 滤镜、光电管和光电倍增管。

2) 液流系统：流动室、射流、鞘液和流体动力学聚焦，稳流 (<10m/s)。

3) 信号的检测和转换：细胞逐个激光束，前向散射 (FS) 和侧向散射 (SS) 信号，几种荧光信号，经模拟/数字转换器 (ADC) 转变为数字信号。

4) 数据的收集、储存和分析：计算机以直方图或表式收集信号，并制作频数分布图、二维直方图、等高线图和加三维图等加以分析。其特点是能进行多参数测定，对成千上万个细胞逐个分析。

二、细胞免疫表型分析

【原理】

将荧光标记单克隆抗体结合于细胞上的对应抗原，再用流式细胞仪对选定细胞群进行荧光计数和分析。其最大优点是能用几种标记了不同荧光素的不同单克隆抗体同时进行多色分析，便于对细胞逐级分群。表型分析的常用抗原有以下几类。

1) 白细胞分化抗原 (CD 分子)：系不同谱系的血细胞在分化成熟的不同阶段以及活化过程中，出现或消失的细胞表面标记，至今已确定了243 种CD 分子。

2) 人类白细胞抗原 (HLA)：是人类的主要组织相容性抗原，包括MHC－Ⅰ和MHC－Ⅱ基因的表达产物，如HLA－R、HLA－B27 等。

3) 其他抗原：如肿瘤标志物、细胞因子、DNA 末端转移酶等。

【试剂】

1) 荧光单克隆抗体：单色 (仅含有一种荧光标记的单克隆抗体) 或多色 (含有2种、3 种甚至4 种标记了不同荧光分子的单克隆抗体) 荧光标记。

2) 荧光同型对照血清：含有与测定体系单克隆抗体同样的类型、标记相同荧光素但与反应体系无关的免疫球蛋白，用于设门 (gating)。

3) 溶血剂：在分析白细胞时用于溶解红细胞。

4) 鞘液：在流式细胞仪工作时将样品流包裹并进行冲洗的液体，可用血细胞计数仪的稀释液代替。

5) 校准微球：包括无荧光的和多种荧光的，用于仪器校准。

6) 细胞质控物：常用的有新鲜全血质控物和冻干的淋巴细胞质控物。

【操作】

1）开启流式细胞仪，测试或观测仪器的性能，必要时加以校准。

2）将荧光抗体及荧光同型对照血清按要求体积加入试管，然后按要求体积加入样品（全血或质控物）。混匀后室温避光放置20～30min。

3）加入规定体积的溶血剂，混匀后室温避光放置20min。

4）用垂直离心机离心白细胞沉淀，弃去上清液，再加入鞘液，再离心，弃去上清液。

5）在试管内加入少量鞘液，在流式细胞仪上进样。

6）使用仪器固有分析软件或手工设门分析。

【临床应用】

细胞胞免疫表型分析常用于淋巴细胞分群（如T细胞、B细胞和自然杀伤细胞，CD^{+4}细胞和CD^{+8}细胞），活化的淋巴细胞测定，多药耐药基因（MDR）的表达产物测定，血液病的诊断和分型，包括微小残留病灶（MRD），器官移植中的流式交叉配型、排异及感染的预报，活化血小板和血小板功能缺陷检测，以及与强直性脊柱炎密切相关的HLA－B27测定等等。

【注意事项】

1）有些试剂在溶血后直接进样，无需离心洗涤。

2）采用多色分析的结果更可靠。

三、细胞DNA分析

【原理】

用非离子去污剂破坏细胞膜脂质双分子层，用胰蛋白酶除去细胞骨架和核蛋白，再用RNA酶除去细胞内RNA，并用精胺稳定核内染色质，以碘化乙啶（PI）染色后，用流式细胞仪测定每个细胞的DNA，同时用相应软件对某群细胞的染色体倍体和细胞周期进行分析。现以PI染色为例介绍如下。

【试剂】

1）消化破膜液：含有胰蛋白酶、四氢氯化精胺去污剂，可用于分离实体组织片段，消化细胞膜及细胞骨架。

2）RNA酶液：含有胰蛋白酶抑制剂、NA酶、柠檬酸盐缓冲液、四氢氯化精胺。用于抑制胰蛋白酶的作用并消化RNA。

3）DNA染液含有PI、四氢氯化精胺、枸橼酸盐缓冲液。样品中的PI终浓度应不低于125mg/L。

4）枸橼酸钠缓冲液：用于收集或冷冻细胞悬液。

5）DNA 的参考物：常以鸡红细胞或正常人的外周血淋巴细胞作为DNA 分析中的标准参考细胞。样品的倍体是根据二倍体细胞峰的标准来计算的。临床标本中一些正常的二倍体核也可作为标准，但有时难以判断哪个峰是正常二倍体细胞。若事先加入标准参照细胞（如鸡红细胞或正常人淋巴细胞）会有助于判断。标准参照细胞应尽可能早地加入标本，与样品一起制备。

【操作】

1．制备细胞悬液

1）组织培养或体液中获得的细胞悬液：将细胞悬液在室温300g 离心5min，吸去上清液，加入1ml 缓冲液重新混悬细胞，再重复洗1 次，调整细胞浓度到1.0 ×10^6 细胞/ml，若非即刻染色，细胞悬液可冷冻，以待日后检测。

2）实体组织（若是冰冻组织，先复温到室温）：准备样品收集管，每管加入1ml 枸橼酸盐缓冲液（若为小于0.5cm 的样品，可将肿瘤组织样品置于透析袋中）。

3）细针穿刺组织标本：穿刺肿瘤组织时，每一种不同的组织用新的注射器和针头以免交叉污染。当针头中看到有物质出现时，拔出注射器，小心地将细胞注入1ml 缓冲液中，冲洗针头，尽可能多地回收细胞。计数细胞，使得枸橼酸缓冲液中的细胞浓度达到1.0 ×10^6 细胞/ml。若样品不立即处理，需冰冻保存，将细胞悬液转移到耐低温的聚丙烯管中，用带螺纹的盖子盖紧，在干冰和99％乙醇的混合物中迅速冷冻，保存于－80℃中。

2．染色

1）染色时要求样本的细胞浓度为5.0 ×$10^5$1 细胞/ml，同时应制备一待测样品和外周血单个核细胞的混合管作为对照管，肿瘤细胞和外周血单个核细胞的比例至少应为2∶1。

2）室温下离心细胞悬液，400g 离心5min，除去上清液。

3）加入250μl 消化破膜液，轻轻混匀，室温静置10min。

4）加入200μl RNA 酶液，轻轻混匀，室温静置10min。

5）加入200μl DNA 染液，轻轻混匀，2～8℃避光静置10min。

6）孔径为50μm 的尼龙网膜或35μm 细胞过滤器过滤细胞。

7）低温避光放置以待上机检测。建议加入DNA 染液后3h 内上机，上机前轻轻混匀细胞悬液。

3．上机测定

1）测定前应检查放大器的线性（如采用标准荧光微球、多倍体的肝细胞等），并检测标准微球或固定、染色的淋巴细胞CV 值来检查仪器状况（CV 值应不大于2％）；

DNA 直方图的道数值应至少为512，应以正常二倍体细胞的G_1峰位置来调节光电倍增管（PMT）电压；G_1峰道数值应不低于最大道数的1/5，即1024 道时的200，512 道时的100；阈值应设在DNA 荧光参数上。

（2）仪器收集所有的信号，测定细胞总数应在DNA 直方图中足够提供10～20000 个核（除外碎片）。DNA 直方图越复杂，需要收集的细胞数量越多。如需报告S 期数值，则S 期区域至少应有100 个细胞。

（3）为获得最佳CV，应保持在低流速（通常100～300 个粒子/s）。

4．结果分析

每一个样品至少获取20000 个细胞。若样品中含有一些小的细胞群体，则需要更多的细胞数。

（1）DNA 倍体分析：

DNA 指数（DI）＝样品细胞峰荧光/正常细胞峰（G_0G_1期细胞）荧光不同倍体细胞的DI 值：二倍体为0.9～1.1、近二倍体为0.85～1.15、四倍体为1.9～2.1 和多倍体＞2.1。

（2）细胞周期分析：计算静止期和DNA 复制前期（G_0+G_1期，二倍体）、DNA 复制期（S 期，二～四倍体）、有丝分裂前期和有丝分裂期（G_2+M期，四倍体）细胞的比例（%）。

【参考值】

DI 为0.9～1.1，CV 小于10%。

【注意事项】

为了得到可信的结果，建议用商品化DNA 质控颗粒设置光电倍增管的电压，检测仪器的分辨率，线性度以及双联体识别器的工作情况。在做DNA 分析时，为了得到较低的CV 值，建议使用低速进样，获取速率最好少于60 个细胞/s。直方图须用专门软件来分析。

四、细胞分选

有些流式细胞仪具有细胞分选功能，即能够自动分离出细胞群体以便进行研究。不同档次的仪器的分选速度和效率是不同的，通常分为静电分选和机械分选。此项工作一般限于医学和生物学研究。

第二章　临床免疫学检验质量控制

随着免疫学研究的深入以及免疫学实验技术的迅速发展，免疫学检验已成为临床实验室的重要组成部分。由于免疫学检验的方法学涉及多个技术领域，特异性强，灵敏度高，难免出现检测误差。对于生产厂家出品的试剂盒，其抗原的纯度，标准品的定值准确性，抗体的亲和力、滴度和特异性，标记物的比活性和免疫活性以及相应选择的分离方法等都会直接影响测定结果。因此，搞好免疫学检验质量控制极为重要。

第一节　基本概念及评价

一、灵敏度

灵敏度有两层含义：

（1）表示该试剂所具有检测最低被测物质的能力。如卫生部规定国产酶联免疫吸附法（ELISA）检测乙型肝炎表面抗原（HBsAg），最低检出能力1ng/ml/或以下为合格。有些无法定量的方法采用能检出阳性血清的最高稀释倍数来表示，如1∶64 或1∶256等。

（2）表示某种试剂对人群或大量样品中检出某一种疾病真正阳性的能力（即有多少假阴性的程度）。灵敏度的数学表达式如下：

$$\text{灵敏度}=\frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数}+\text{假阳性数}}\times 100\ \%$$

二、特异性

表示某种试剂对人群或大量样品中正确检出不存在某种疾病真正阴性的能力（即有多少假阳性的程度）。特异性的数学表达式如下：

$$\text{特异性}=\frac{\text{真阴性数}}{\text{真阳性数}+\text{假阴性数}}\times 100\ \%$$

在免疫学检验中，进行定性检测的结果只有阳性或阴性（存在或不存在）。我们要求获得正确的检测结果，就是说，患某种疾病，用某种试剂检测为阳性，称真阳性；未患该种疾病用这种试剂检测为阴性，称真阴性；如果患该种疾病用这种试剂检测为阴性，就称为假阴性；未患该种疾病用这种试剂检测为阳性，就称为假阳性。在常规检验

中，灵敏度和特异性是评价正确性的两个基本指标。理想的试剂灵敏度为100％（不出现假阴性，漏诊率为零）、特异性为100％（不出现假阳性，误诊率为零），实际上这是不可能的。在临床免疫检验过程中出现假阳性和假阴性是不可避免的。从检验结果的分布曲线图中可以看出灵敏度与特异性的关系（图5－2－1）。

三、有效性

有效性表示某一试验能从阳性患者中测出阳性结果和从阴性人群中测出阴性结果的能力。也就是该试验能区别患者与非患者符合的百分率。亦有人译为诊断效率。它是灵敏度和特异性的综合指标。某试验的有效性越高，实用价值越大。

$$\text{有效性（符合率）}=\frac{\text{真阳性数}+\text{真阴性数}}{\text{真阳性数}+\text{假阳性数}+\text{假阴性数}}\times 100\%$$

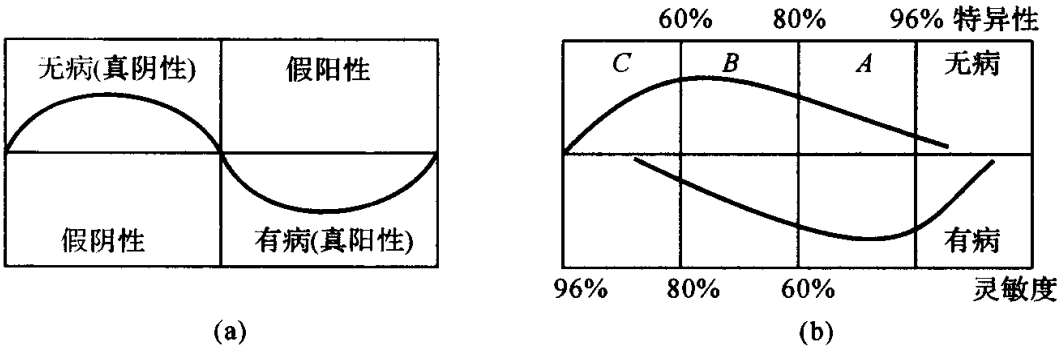


图5－2－1　灵敏度与特异性的关系示意图

(a) 图是最理想状态，有病和无病没有重叠。有病真阳性，无病真阴性都达100％，假阳性和假阴性为零，正确性达100％。(b) 图有病和无病在分布上有重叠部分存在，那么界限值的不同变化对判断阴阳性就产生不同的结果。在一定范围内，灵敏度和特异性呈反变关系。图中的判断界限值向右移至A时，则特异性96％，而灵敏度只存60％，此时虽然假阳性减少了，但假阴性却增加了（尚有40％的有病者检测为阴性）。如果判断界限值向左移至C时，此时检测灵敏度达96％，而特异性降至60％。虽然假阴性减少了，但假阳性却增加了（尚有40％无病者出现阳性）。如果将判断界限值移至中间B时，灵敏度、特异性均为80％。因此，我们必须选择恰当的灵敏度和特异性，有时采用一些折中的办法。在实际应用中，过筛试验要求采用灵敏度较高的试剂，减少漏诊率。如献血员的HBsAg检测要求把血源性传染病降低到最低限度，而确诊试验要求采用特异性较高的试剂，减少误诊率。既然假阳性和假阴性的出现是不可避免的，任何检测试剂都不能达到100％（阳性或阴性），而临床要求正确性是100％（阳性或阴性），这就必须加强检测的室内质量控制，对可疑范围的样品必须复做确诊试验，尽量减少误诊概率。

四、阳性预测值

阳性预测值是指试验结果阳性者中真正患病的概率。

$$\text{阳性预测值}=\frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数}+\text{假阳性数}}\times 100\%$$

五、阴性预测值

阴性预测值是指试验结果阴性者中的确未患病的概率。

$$\text{阳性预测值}=\frac{\text{真阳性数}}{\text{真阳性数}+\text{假阴性数}}\times 100\ \%$$

阳性预测值和阴性预测值是在临床试验中对试验实用性的正确评价指标。如对肿瘤标志物进行检测时，阳性预测值和阴性预测值是该检测方法价值的体现。阳性预测值和阴性预测值与灵敏度、特异性密切相关，且随选定的界限值的变化而变化。

六、前带现象与后带现象（钩状效应）

抗原抗体反应的特点除特异性结合和可逆性结合外，结合的强弱及结合的多少与抗原抗体的比例有十分密切的关系，用曲线图5－2－2表示。图中曲线的峰段为抗原抗体反应的等价带，这是抗原抗体分子比例合适的范围，抗原抗体充分结合，峰顶为抗原抗体反应的最适比例。在等价带前为抗体过剩带，在等价带后为抗原过剩带。前者抗体过量而无结合物形成，在血清学实验中称为前带现象。后者抗原过量而无结合物形成称为后带现象。在常规免疫分析中不是应用已知抗原测标本中抗体就是应用已知抗体测标本中的抗原。当标本中抗原或抗体过量时常使强阳性标本误测为弱阳性，甚至假阴性结果。定量分析中高浓度标本的检测结果成为低浓度。另外，根据抗原抗体最适比例结合这一特点，高浓度的标本应进行稀释后进行检测，结果需乘以稀释倍数。但应注意这种计算后的结果会有很大的误差。

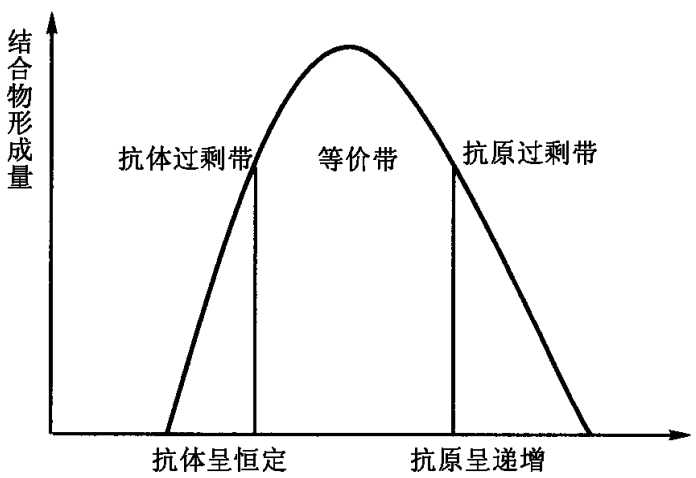


图5－2－2　抗原抗体反应曲线示意图

七、灰区

在免疫定性试验（如ELISA）中，经典的方法是两步法。厂商为了适应用户的需要大部分试剂盒采用一步法。但两种方法抗原抗体反应曲线是不同的，见图5－2－3。经

典的两步法其抗原抗体反应达到平衡时处于平台期B 点，B 点不会因反应条件的改变而影响A 值。而一步法时抗原抗体反应正处在上坡途中A 点，因此，很易受外界反应条件（特别是反应温度及时间）的改变而影响A 值，出现△A_1和△A_2（△A_1可能是假阳性，△A_2可能是假阴性），我们把△A_1至△A_2间的区域称为灰区。一步法造成的灰区使检测的重复性变差，加大了ELISA 室内质量控制的难度（变异范围增大）。因此，要做好ELISA 的室内质量控制就必须严格控制抗原抗体反应条件。控制灰区的范围一般有两种方法：一是以批内CV 来设定CO（1 ±CV），一般为15％左右；二是用试剂盒测临界值血清的标准差s 来设定CO ±2s。以s 确定的灰区各实验室的差异会较大。如待测标本A 值在灰区，必须重复检测，经过验证，慎重报告。

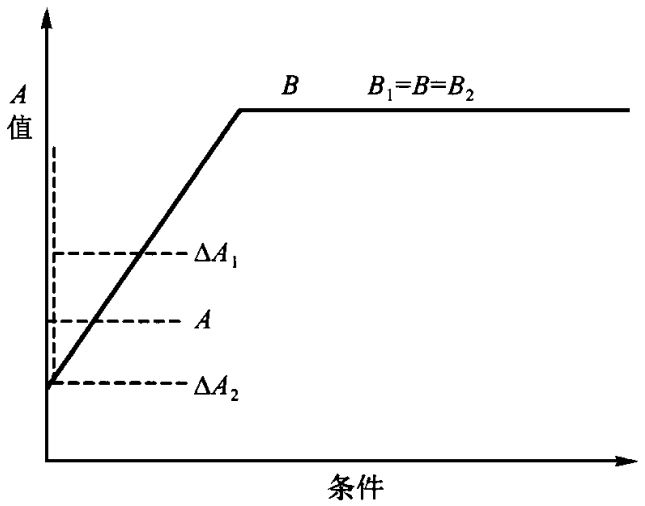


图5－2－3　抗原抗体反应的“灰区”示意图

第二节　免疫学检验质量控制要点

一、抗原和抗体

抗原和抗体是临床免疫学检验的两大重要因素及基本条件。作为试剂应选择特异性强、亲和力高的抗原及纯度高、效价高、特异性强、亲和力高的抗体。来源不同的抗原或抗体具有不同的适用性、优缺点，存在着不同程度的差异，这些决定了试剂盒的质量及应用的实效性。抗原与抗体结合反应受到电解质、pH 值、温度、时间及抗原抗体自身的性质、活性及浓度等的影响。抗体的特异性和亲和力是决定抗原抗体反应的关键因素，而抗原与抗体的浓度、比例对抗原抗体反应影响最大，是决定性因素。由于以上原因，实验前应探索待测标本和抗血清的最佳稀释倍数，防止前带现象与后带现象的发生。配制的抗体应用液不能长时间保存，在4 ℃超过1 周效价会显著降低。从冰箱取出

试剂后应置室温缓慢融化，不宜加温促融，防止抗体反复冻融而降低效价，并以小量分装存放为好，这有利于掌握使用条件、及时发现其性能改变。

二、标准参考品

国际统一的参考品通常由WHO 或IUIS 制备与提供，称为第一标准品。按此标准复制出来的国家标准为第二标准。再由此复制各实验室标准品。实验室标准品必须具备来源充足、可靠、活性及免疫反应性与被测物一致、不含交叉反应物质和干扰物质、靶物质的生物与免疫活性稳定。常用含稳定剂的冻干制品。

三、标记物

标记物必须与非标记物有相同的免疫学活性，且能在适当的使用条件下，有足够长时间保持其活性。标记物的贮存与标准品的贮存一样，要采取相同的措施，其中放射免疫标记抗原还需要辐射原稳定等。

四、仪器及操作

各种检测仪器的性能及仪器本身的精度直接关系到实验结果的正确程度。实验室必须建立仪器档案，有专人负责日常的管理。操作者要掌握仪器的使用原理，建立主要仪器的校准程序、使用和操作程序、周期性的维修程序。在规定的时间内进行校准，校准时要选择合适的（配套的）标准品，对不同的分析项目要根据其特性确立各自的校准频度。

操作的每一步骤必须到位，不得随意加减。更新试剂必须进行各项参数的摸索实验。建立本实验室的操作程序后，不得随意改动。

五、质控品

质控品是保证质控工作的重要物质基础。使用质控品，建立质控标准，在常规工作基础上评价检测结果的精密度和准确性。

1．质控品特性

临床免疫较理想的质控品至少应具备以下特性：①无传染性；②具有“医学决定水平”的临界值血清，在定性试验中确定试验灵敏度；③经国际参考品标化的定值血清。

2．质控品供应

实验室可根据各自的条件，从厂商处购买经二级、三级标化参考品或从卫生部临检中心购买定值质控品。也可用三级参考品或标准品来标化实验室收集的正常人混合血清（用于免疫球蛋白、补体及其他蛋白质成分的质控），患者血清（用于自身抗体测定质

控）或动物抗血清（用于荧光抗体、血凝、酶免疫、放射免疫试验质控）。对一些抗原性不稳定或抗体效价不易保持的质控品应定期质检或更换。

3．质控品使用

（1）灵敏度控制：将临界值血清插入常规检测工作中，检测试验盒灵敏度是否达到规定要求。

（2）精密度控制：使用临界值血清，连续测定20 次以上，得到平均值（$\bar{x}$）和标准差（s）作质控图。

六、标本的采集、处理与保存

标本采集要选择正确的时间和部位，某些特殊的检验项目（如激素类）对标本的要求更高。应正确地选择抗凝剂。收到标本应尽快地分离血清或血浆并存放在4 ℃环境中。防止脂浊、黄疸、溶血及药物对检验结果的干扰。

七、标准曲线拟合

在临床免疫分析中不少资料的两个变量间不呈直线关系。可以用计算机对标准曲线进行数学函数的运算，以计算每一个样品的浓度。这一数学函数必须尽可能地在浓度范围内与标准曲线拟合。曲线拟合的好坏，直接影响样品检测结果的可靠性、正确性。目前某些商家提供拟合好的标准曲线来监测曲线拟合的质量，但实验室最简单的方法是标准浓度测量值的逆运算值。这些结果可显示浓度变量的偏倚和不正确性。

第三节　实验室内质量控制

一、常用免疫学统计质控图

1．常规质控图

目前国内外最广泛使用的一种临床化学常规室内质控方法，标记免疫分析可借鉴这一方法。详见第四篇第十一章。

2．“即刻法”质控

有些免疫学检验项目如ELISA 法，不是每天操作，由于质控品效期短、批号更换频繁，因此，采用“即刻法”质控，只需连续测3 次，即可对第3 次检验结果进行质控。具体方法如下：

1）先将测定值从小到大排列X_1，X_2，X_3，…，X_n（X_1为最小值，X_n为最大值）。

2）计算$\bar{X}$和s。

3）计算$SI_{上限}$和$SI_{下限}$：

$$SI_{上限}=\frac{X_n-\bar{X}}{s},\ SI_{下限}=\frac{\bar{X}-X_1}{s}$$

4）将$SI_{上限}$、$SI_{下限}$与表5-2-1中数字比较。

当$SI_{上限}$和$SI_{下限}$<n2s时，表示在控，可继续往下测定并计算；当$SI_{上限}$和$SI_{下限}$有1值处于n2s和n3s之间时，说明该值在2s～3s范围，处于“告警”；当$SI_{上限}$和$SI_{下限}$有1值>n3s值时，说明该值已在3s范围之外，属“失控”。“告警”及“失控”状态数值应舍去。

表5-2-1　SI值表

n	n3s	n2s	n	n3s	n2s
3	1.15	1.15	12	2.55	2.29
4	1.49	1.46	13	2.61	2.53
5	1.75	1.67	14	2.66	2.37
6	1.94	1.82	15	2.71	2.41
7	2.10	1.94	16	2.75	2.44
8	2.22	2.03	17	2.79	2.47
9	2.32	2.11	18	2.82	2.50
10	2.41	2.18	19	2.85	2.53
11	2.48	2.23	20	2.88	2.56

二、失控处理程序

发现失控，应填写失控报告单并上报专业主管再作出是否发出与测定质控品相关的那批标本检验报告的决定。失控信号出现受多种因素影响，应迅速回顾，检查整个操作过程、操作步骤、仪器调整选择、试剂盒等是否有发生错误的环节，根据免疫检测具体项目，对失控作出恰当的判断。

免疫质控重点，应着重整体分析。既要看某点的变化，更要分析某一阶段变异的趋势。通过质控图，可以发现系统误差；可以掌握不同阶段（日、周、月、年）的变异；不同试剂、不同批号的变异；不同操作者、仪器方法的变异等。要不断选择“更好”，追求“最好”。只有持续开展室内质控，才能保证免疫学检验结果质量。

第四节　实验室间质量评价

实验室间质量评价（EQA）是由外部独立机构采用一系列的方法连续地、客观地收集和反馈实验室上报结果以评价实验室质控能力的过程。旨在建立实验室间结果的可比性。这种评价是一种回顾性评价，是实验室质量改进的工具。我国1988 年在卫生部临床检验中心建立了临床免疫质评实验室。十几年来开展免疫质评的项目从初期的乙型肝炎病毒标志物开始，陆续增加了甲型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体及免疫球蛋白、甲胎蛋白、梅毒抗体、自身免疫性疾病抗体、激素、PCR 等项目的室间质评。

有关免疫学检验实验室间质量评价的实施方式和评分方法详见第一篇医院检验科管理第二章医院检验科质量管理第四节实验室间质量评价。

第三章　人体特定蛋白测定

第一节　免疫球蛋白含量测定

一、免疫球蛋白G 含量测定

免疫球蛋白G 【mmunoglobulin G，IgG） 主要存在于血液内，也可存在于脑脊液、尿液等体液中，存在的场所不同，其浓度差别甚大。血浆IgG 含量较高，可采用免疫单向扩散、免疫比浊测定等方法进行测定，目前主要采用散射免疫比浊法；而脑脊液、尿液等体液中的IgG 含量较少，应采用比较灵敏的免疫学标记技术如RIA 、ELISA 等。

㈠ 散射免疫比浊法

【原理】

散射免疫比浊法包括速率散射比浊法和终点散射比浊法。速率散射比浊法是以IgG 和抗IgG 抗体反应形成免疫复合物的速率峰值推算待测标本中IgG 含量的方法；而终点散射比浊法是使IgG 和抗IgG 抗体作用一定时间使反应达到平衡后，通过散射比浊仪测定其散射光吸光度值来计算待测标本中IgG 含量。

【试剂】

不同试剂厂家有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗IgG 抗体、IgG 校准血清及IgG 质控血清。

【操作】

根据仪器和试剂说明书进行操作。操作要点见本篇第一章第二节。

【注意事项】

1） 标本：应及时分离血清；标本若置4 ℃则应于24h 内进行检测；注意溶血和脂浊标本对检测结果的影响，

2） 抗原抗体的比例和缓冲液对标本IgG 含量测定结果影响详见本篇第一章第二节。

3） 标准曲线：当试剂和室温条件不变时，曲线可相对使用一段时间，每天用质控

血清进行质控，以保证测定值的准确、可靠。

（二）放射免疫技术

【原理】

待测标本中IgG 以及^{125}I 标记IgG 与有限量的抗人IgG 抗体进行竞争反应，反应平衡后进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性强度值，查标准曲线，求出待测标本IgG 含量。

【试剂】

抗人IgG 抗体、^{125}I 标记人IgG、IgG 标准品；分离剂（PEG＋二抗）。

【操作】

根据试剂盒说明书操作。操作要点见本篇第一章第四节。

【注意事项】

1）标本：收集尿标本应弃去晨尿，患者饮500ml 水，1h 后留尿液，测定时应充分混匀后离心，除去杂质；各种体液标本要新鲜，无细菌污染；如不立即检测，置4℃冷藏不超过1 周，－20℃冰冻保存，尿液不超过1 个月，脑脊液不可超过2 个月，且不可反复冻融。

2）试剂：注意试剂的有效期，使用前试剂均要充分摇匀，禁止不同批号试剂盒内容物混用。

3）标准曲线：每次均应制作新的标准曲线，并利用数据处理软件拟合最佳标准曲线。

4）脑脊液IgG 含量测定：应测定血液和脑脊液中IgG 及白蛋白值，并计算白蛋白商值和IgG 指数，计算公式如下：

$$\text{白蛋白商值}=\frac{\text{脑脊液中IgG 含量}}{\text{血清中白蛋白含量}}\times 1000$$

$$\text{IgG 指数}=\frac{\text{脑脊液中IgG 含量}}{\text{血清中IgG 含量}}\div\frac{\text{脑脊液中白蛋白含量}}{\text{血清中白蛋白含量}}$$

【参考值】

血清IgG：（12.87±1.35）g/L。

尿液IgG：（3.87±1.58）mg/L。

脑脊液IgG：15～20 岁（35±20）mg/L；21～40 岁（42±14）mg/L；41～60 岁（42±10）mg/L；61～87 岁（58±16）mg/L。白蛋白商值<9，IgG 指数<0.6。

【临床意义】

1．血清IgG

低免疫球蛋白血症可由先天性低免疫球蛋白血症所致，如先天性无丙种球蛋白血症

和先天性无胸腺症患者；也可由获得性低免疫球蛋白血症所致，如淋巴肉瘤、肾病综合征和中毒性骨髓疾病等。血清IgG 降低易引起反复化脓性细菌感染。

高免疫球蛋白血症可见于非特异型多株峰免疫球蛋白增殖症如慢性感染、子宫内感染、自身免疫病、肝脏疾病 (如慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和隐匿性肝硬化)；也见于特异型单株峰免疫球蛋白增殖症即M 蛋白血症，如多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、重链病、半分子病、轻链病和非排泌型骨髓瘤等。

2．尿液IgG

生理条件下，血中大分子IgG 不能通过肾小球基底膜。当肾小球基底膜损伤时，尿中IgG 含量增加，并与肾小球基底膜损伤程度相关，而小分子的血浆蛋白虽可由肾小球滤过，但可被肾小管重吸收。因此，尿IgG 联合其他不同分子量蛋白质的检测可以确定肾脏受损部位以及肾小球损伤的程度。

3．脑脊液IgG

脑脊液中IgG 含量与血脑屏障通透性有关。脑脊液中IgG 含量增高见于中枢神经系统感染 (如化脓性脑膜炎、结核性脑膜炎、散发性脑脊髓膜炎等)；脑血管疾病 (如脑血栓、缺血性脑血管病、蛛网膜下腔出血)；神经系统肿瘤、急性感染多发性神经根神经炎、神经梅毒、系统性红斑狼疮与脊髓管梗死及重症肌无力等。

临床上一般以白蛋白商值反映血脑屏障的功能，以IgG 指数反映中枢神经系统鞘内合成IgG 能力。白蛋白商值<9 时，表示血脑屏障无明显损伤；9～14 为血脑屏障轻度损伤；14～33 为血脑屏障中度损伤；33～100 为血脑屏障重度损伤；>100 为血脑屏障完全破坏。正常人IgG 指数<0.6，若>0.6 则意味着鞘内合成IgG 增高，多见于亚急性硬化性全脑炎、吉兰－巴雷综合征、多发性硬化症、部分脑血管意外等。

脑脊液中IgG 降低见于癫痫、变性疾病、射线照射后。

二、免疫球蛋白A 含量测定

(一) 免疫散射比浊法

【原理】

同IgG 测定，其中所用抗体为抗IgA 抗体。

【试剂】

不同试剂厂家有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗IgA 抗体、IgA 校准血清、IgA 质控血清等。

【操作】

根据仪器和试剂说明书进行操作，一般步骤同IgG 测定。

【注意事项】

同IgG 测定。

(二) 放射免疫技术

【原理】

同Ig 测定，所用抗体是抗人IgA 或分泌型IgA (sIgA) 抗体。

【试剂】

抗人IgA (或sIgA) 抗体，^{125}I 标记人IgA 或sIgA、IgA 或sigA 标准品，分离剂 (PEG＋二抗)。

【操作】

根据试剂盒说明书操作，一般步骤同IgG 测定。

【注意事项】

同IgG 测定。

(三) ELISA 法

【原理】

采用ELISA 双抗体夹心法，即将羊抗人IgA 抗体包被到固相载体表面，与待测标本中的IgA 反应形成固相免疫复合物，洗涤除去其他未结合物质，再与辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgA 抗体反应，反应平衡后洗涤除去未结合酶标记物，加入底物显色，测定吸光度值，根据标准曲线，计算待测标本中IgA 的含量。

【试剂】

包被液、稀释液、洗涤液、底物液、终止液、羊抗人IgA 抗体、IgA 标准品、辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgA 抗体等。

【操作】

按照ELISA 双抗体夹心法，具体参照试剂盒说明书操作。

【注意事项】

(1) 标本：尿液应采集晨尿为标本，充分混匀后离心，除去杂质。各种体液标本要新鲜，无细菌污染，4 ℃冷藏可放72h，－20 ℃冷冻可放置数月。避免溶血和脂浊。

(2) 试剂：注意试剂的有效期，使用前试剂均要充分摇匀，禁止不同批号试剂盒内容物混用。

(3) 标准曲线：每次均应制作新的标准曲线。

(4) 操作：每次洗涤均应将液体吸干或甩干，蒸馏水应新鲜制备。

【参考值】

血清IgA：8～30d（0.0067±0.1710）g/L；31～60d（0.053±0.096）g/L；2～3个月（0.077±0.710）g/L；4～6个月（0.233±0.187）g/L；7～9个月（0.394±0.248）g/L；10～12个月（0.560±0.217）g/L；1～2岁（0.831±0.606）g/L；3～5岁（1.855±0.614）g/L；6～8岁（1.867±0.710）g/L；9～11岁（2.458±0.912）g/L；12～15岁（2.731±0.937）g/L；成人（2.500±0.752）g/L。

脐带血IgA：（0047±0.037）g/L。

尿液IgA：（0.4±0.2）mg/L。

脑脊液IgA：15～20岁（0.7±0.4）mg/L；21～40岁（0.7±0.3）mg/L；41～60岁（1.0±0.3）mg/L；61～87岁（1.1±0.6）mg/L。

唾液IgA：（45±15）mg/L。

血清sIgA：（3.14±7.60）mg/L。

尿液sIgA：（1.62±0.88）mg/L。

胃液sIgA：（80.6±37.1）mg/L。

唾液sIgA：（10.6±4.2）mg/L。

前列腺液sIgA：（140.6±71.2）mg/L。

泪液sIgA：（65.6±26.3）mg/L。

【临床意义】

1．血清IgA

低IgA血症可由先天性或获得性低免疫球蛋白血症所致，常见于先天性或获得性无丙种球蛋白血症和先天性无胸腺症、淋巴肉瘤、肾病综合征、中毒性骨髓疾病、遗传性毛细血管扩张共济失调征、吸收障碍综合征、淋巴样组织发育不全、IgG型骨髓瘤、急性和慢性淋巴细胞白血病等。IgA降低易引起反复呼吸道感染。

高IgA血症可见于非特异型多株峰免疫球蛋白增殖症如慢性感染、子宫内感染、自身免疫病、肝脏疾病（如慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和隐匿性肝硬化）；也见于特异型单株峰免疫球蛋白增殖症即M蛋白血症，如多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、重链病、半分子病、轻链病和非排泌型骨髓瘤等。

血清sIgA增高常见于原发性胆汁性肝硬化、胆道阻塞、急性病毒性肝炎、慢性肝实质病变和酒精性肝硬化。

2．尿液IgA

生理条件下，血中大分子IgA不能通过肾小球基底膜。当肾小球基底膜受到损伤时，尿中IgA含量增加，其增加程度与肾小球基底膜损伤程度相关，而小分子的血浆蛋白虽可由肾小球滤过，但可被肾小管重吸收。因此，尿液IgA的检测有助于判定肾小球

损伤的程度。

尿液IgA 含量增多常见于IgA 骨髓瘤、巨球蛋白血症。

尿液IgA 含量减少常见于IgG 骨髓瘤、IgA 缺乏症。

尿液sIgA 含量增多常见于尿路感染、输尿管结石、膀胱癌、慢性肾炎（普通型、肾病型、隐匿型）及慢性肾炎引起的肾功能衰竭、狼疮肾炎、糖尿病等。

尿液sIgA 降低主要见于反复慢性局部尿路感染。

3．脑脊液IgA

脑脊液中IgA 含量与血脑屏障通透性有关。脑脊液中IgA 增多见于病毒性脑膜炎、化脓性脑膜炎、结核性脑膜炎、细菌性脑膜炎、急性脑膜炎、脑血管病、原发性或继发性中枢神经系统恶性肿瘤、脑出血、急性感染多发性神经根神经炎等。脑脊液中IgA 含量减少见于癫痫、支原体脑脊髓膜炎、小脑共济失调等。

4．唾液sIgA

唾液sIgA 含量增多常见于IgA 骨髓瘤、支气管炎和儿童流行性腮腺炎。

唾液sIgA 含量减少常见于IgG 骨髓瘤、IgA 缺乏症、巨球蛋白血症。

5．泪液sIgA

泪液sIgA 含量减少常见于沙眼病。

6．前列腺液sIgA

前列腺液sIgA 含量增多常见于慢性前列腺炎。前列腺液sIgA 减少常见于慢性前列腺炎。

三、免疫球蛋白M 含量测定

（一）免疫散射比浊法

【原理】

同IgG 测定，其中所用抗体是抗人IgM 抗体。

【试剂】

不同试剂厂家有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗IgM 抗体、IgM 校准血清、IgM 质控血清。

【操作】

参照仪器和试剂说明书操作。

【注意事项】

同IgG 测定。

㈡ 放射免疫技术

【原理】

同IgG 测定，所用抗体为抗人IgM 抗体。

【试剂】

抗人IgM 抗体、^{125}I 标记人IgM 、IgM 标准品；分离剂 （PEG ＋二抗）。

【操作】

RIA 法，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

同IgA 测定。

㈢ 酶联免疫吸附试验

【原理】

同IgG 测定，但所用抗体是抗人IgM 抗体。

【试剂】

包被液、稀释液、洗涤液、底物、终止液、羊抗人IgM 抗体、IgM 标准品、辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgM 抗体。

【操作】

参见ELISA 双抗体夹心法，具体参照试剂说明书。

【注意事项】

同IgG 测定。

【参考值】

应建立本实验室的参考值，以下参考值仅供参考。

血清IgM ：8～30d （0.271 ±0.131）g/L ；31～60d （0.324 ±0.289）g/L ；2～3 个月（0.366 ±0.184）g/L ；4～6 个月 （0.427 ±0.125）g/L ；7～9 个月 （0.664 ±0.335）g/L ；10～12 个月 （0.838 ±0.372）g/L ；1～2 岁 （0.812 ±0.472）g/L ；3～5 岁 （0.833 ±0.213）g/L ；6～8 岁 （0.802 ±0.208）g/L ；9～11 岁 （0.826 ±0.209）g/L ；12～15 岁（0.877 ±0.304）g/L ；成人 （0.950 ±0.222）g/L 。

脐带血IgM ：（0.047 ±0.037）g/L 。

尿液IgM ：（0.032 ±0.002）mg/L 。

唾液IgM ：（3.1 ±3.1）mg/L 。

羊水IgM ：<200mg/L 。

脑脊液IgM ：15～20 岁 （0.2 ±0.09）mg/L ；21～40 岁 （0.16 ±0.03）mg/L ；41～60

岁（0.17±0.04）mg/L；61～87岁（0.17±0.05）mg/L。

【临床意义】

1．血清IgM

低IgM血症可见于先天性或获得性无丙种球蛋白血症和先天性无胸腺症、Wiskote－Aldie综合征、淋巴样组织增生病、淋巴样组织发育不全、IgA和IgG型骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病等。IgM含量减少易引起革兰阴性杆菌败血症。

高IgM血症可见于非特异型多株峰免疫球蛋白增殖症如各种感染早期（如寄生虫病、螺旋体病、锥虫病、放线菌病，风疹病毒、巨细胞病毒、弓形体等的感染）、子宫内感染时的脐血或出生后2d的新生儿血清、自身免疫性疾病（如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、各种结缔组织病）、肝脏疾病（如慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和隐匿性肝硬化）、传染性单核细胞增多症、原发性高血压恶性期；也见于特异型单株峰免疫球蛋白增殖症即M蛋白血症，如多发性骨髓瘤、重链病、半分子病、轻链病和非排泌型骨髓瘤等。

2．尿液IgM

生理条件下，血中大分子IgM不能通过肾小球基底膜。当肾小球基底膜受到严重损伤时，尿液中IgM含量增加。

尿液IgM含量增多常见于巨球蛋白血症、狼疮肾炎、糖尿病肾病、原发性高血压II期及III期患者等。

尿IgM含量减少常见于IgG骨髓瘤、IgA骨髓瘤、IgA缺乏症等。

3．脑脊液IgM

脑脊液中IgM含量增多主要由血脑屏障受到破坏所致。常见于病毒性脑膜炎、化脓性脑膜炎、结核性脑膜炎、脑血管病、脑出血、神经系统肿瘤、系统性红斑狼疮脑病、精神分裂症等。

4．唾液IgM

唾液IgM含量增多常见于巨球蛋白血症、IgA缺乏症。

唾液IgM含量减少常见于IgG型和IgA型骨髓瘤。

四、免疫球蛋白D含量测定

（一）放射免疫技术

【原理】

待测标本中免疫球蛋白D（IgD）以及^{125}I标记IgD与有限量的抗人IgD抗体进行竞

争反应，反应平衡后进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性强度值，查标准曲线，求出待测标本IgD 含量。

【试剂】

抗人IgD 抗体、^{125}I 标记人IgD、IgD 标准品、分离剂（PEG＋二抗）。

【操作】

按照RIA 操作方法。具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

同IgA 测定。

（二）酶联免疫吸附试验

【原理】

同IgA 测定，但所用抗体为抗IgD 抗体。

【试剂】

包被液、稀释液、洗涤液、底物液、终止液、马抗人IgD 抗体、兔抗人IgD 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 抗体。

【操作】

按照ELISA 双抗体夹心法操作。具体参见试剂盒说明书。

【参考值】

应建立本实验室的参考值。以下参考值仅供参考。

血清IgD：1d（3.24±7.23）mg/L；7 个月（5.23±6.88）mg/L：11 岁（7.36±11.36）mg/L：20 岁（3.53±7.58）mg/L；>60 岁（1.56±2.43）mg/L。

脐带血IgD：（0.310±0.292）mg/L。

脑脊液IgD：15～20 岁（3.56±2.00）kIU/L；21～40 岁（3.20±1.30）kIU/L；41～60 岁（2.96±0.88）kIU/L；61～87 岁（3.20±0.0）kIU/L。

【临床意义】

（1）血清IgD：血清IgD 增高常见于慢性感染、结缔组织病、流行性出血热、桥本甲状腺炎、孕妇、系统性红斑狼疮、某些对牛乳过敏者及某种肝病，选择性多克隆增加仅见于少数葡萄球菌感染者，单克隆增加仅见于IgD 型骨髓瘤。血清IgD 减少常见于矽肺、某种遗传性和获得性免疫缺陷综合征。

（2）脑脊液IgD：脑脊液中IgD 减少见于多发性硬化病。

五、免疫球蛋白E 含量测定

见本篇第十章第一节有关内容。

六、κ轻链含量测定

κ型轻链可采用免疫比浊法、热凝溶法、醋酸纤维膜电泳、免疫电泳法、ELISA 等方法，目前主要采用免疫比浊法中的散射免疫比浊法和ELISA 法。

㈠ 散射免疫比浊法

【原理】

散射免疫比浊法包括速率散射比浊法和终点散射比浊法。速率散射比浊法以κ轻链和抗κ轻链抗体反应形成免疫复合物的速率峰值推算待测标本中κ轻链的含量；终点散射比浊法是使κ轻链和抗κ轻链抗体作用一定时间，反应达到平衡后，通过散射比浊仪测量其散射光吸光度值来计算待测标本中κ轻链含量。

【材料】

不同厂家试剂有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗κ轻链抗体、轻链校准血清、κ轻链质控血清。

【操作】

按照散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 测定。

㈡ 酶联免疫吸附试验

【原理】

采用ELISA 双抗体夹心法，即用兔抗人游离κ轻链抗体包被微孔反应板，加入待测标本，其中的游离κ轻链与之结合形成抗原抗体复合物，再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 抗体与之结合，然后加入底物显色，加终止液终止反应，测定吸光度值，制作标准曲线，计算待测标本中κ轻链含量。

【材料】

主要试剂包括兔抗人游离κ轻链抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 抗体、稀释液、包被液、封闭液、底物、终止液、洗涤液。

【操作】

按照ELISA 双抗体夹心法操作。具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

血清κ轻链：5.74～12.76g/L，κ轻链/λ轻链比值：1.47～2.95。

尿液κ轻链：<18.5mg/L。

【临床意义】

1．血清κ轻链

血清κ轻链含量增多主要由于恶性单克隆增殖（κ轻链/λ轻链比值>2）、良性多克隆增殖（κ轻链/λ轻链比值与正常相同）。常见于多发性骨髓瘤、M 蛋白血症、系统性红斑狼疮、肾脏病、肝硬化或肝切除患者等。

2．尿κ轻链

尿中κ轻链含量增多主要有两种情况：一是分泌过多，主要由于恶性单克隆增殖者（尿中只出现单一型轻链），或良性多克隆增殖者（尿中轻链比例与正常人相同）；二是由于重吸收过少，当肾小管损伤或κ轻链被糖基化时，κ轻链重吸收减少，尿中κ轻链含量增多。

尿中κ轻链增多常见于多发性骨髓瘤、M 蛋白血症、系统性红斑狼疮、肾脏疾病（包括狼疮肾炎、肾病综合征、糖尿病肾病等）、肝硬化。

七、λ轻链含量测定

（一）散射免疫比浊法

【原理】

同κ轻链测定。

【试剂】

不同厂家试剂有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗λ轻链抗体、λ轻链校准血清、λ轻链质控血清。

【操作】

按照散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 测定。

（二）酶联免疫吸附试验

【原理】

采用ELISA 双抗体夹心法，即用兔抗人游离λ轻链抗体包被微孔反应板，加入待测标本，其中的游离λ轻链与之结合形成抗原抗体复合物，再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG 抗体与之结合，洗涤后加入底物显色，加终止液终止反应，测定吸光度值，制作标准曲线，计算待测标本中游离λ轻链含量。

【试剂】

主要试剂包括兔抗人游离λ轻链抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 抗体、稀释液、包被液、封闭液、底物、终止液、洗涤液。

【操作】

按照ELISA 双抗体夹心法操作。具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

应建立本实验室的参考值，以下参考值仅供参考。

血清λ轻链：2.69～6.38g/L，κ轻链/λ轻链比值：1.47～2.95。

尿液λ轻链：<50mg/L。

【临床意义】

同κ轻链测定。

第二节　补体成分含量测定

一、C3 含量测定

测定血清中C3 含量的方法有散射免疫比浊法及单向免疫扩散法等，目前常用的为散射免疫比浊法。

【原理】

散射免疫比浊法包括速率散射比浊法和终点散射比浊法。速率散射比浊法通过C3 和抗C3 抗体反应形成免疫复合物的速率峰值推算待测标本中C3 含量；终点散射比浊法是使C3 和抗C3 抗体作用一定时间，反应达到平衡后，通过散射比浊仪测定其散射光吸光度值来计算待测标本中C3 含量。

【试剂】

不同厂家试剂有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗C3 抗体、C3 校准血清、C3 质控血清。

【操作】

按照散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

1）标本：应及时分离血清用于检测；标本若置4℃则应于24h 内进行检测，否则会导致补体裂解使测定结果偏低。

2）其余注意事项同IgA 测定。

【参考值】

0.83～1.77g/L。

【临床意义】

血清中补体代谢速度非常快，在病理情况下会出现其他蛋白质所没有的急剧变化，因此，临床检测血中补体时，要在不同时期反复多次检测才能更有助于诊断和治疗。血清中C3含量异常主要是由于固有成分缺乏，导致C3不能激活；或调节成分缺乏使C3激活过多。

血清中C3含量增多常见于恶性肿瘤、某些急性炎症、一般传染病早期、组织损伤、阻塞性黄疸、原发性胆汁性肝硬化等。

血清中C3降低常见于系统性红斑狼疮活动期、急慢性肾小球肾炎、类风湿性关节炎、基底膜增殖性肾小球肾炎、肾病综合征、大面积烧伤、自身免疫性溶血性贫血、冷球蛋白血症、肝脏疾病、血清病、亚急性心内膜炎及同种异体移植排斥反应等。

二、C4含量测定

测定血清中C4含量的方法有散射免疫比浊法、单向免疫扩散法及免疫溶血法等，目前常用的为散射免疫比浊法。

【原理】

同C3测定，但所用抗血清为抗C4抗体。

【试剂】

不同厂家试剂有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗C4抗体、C4校准血清、C4质控血清。

【操作】

按照散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同C3测定。

【参考值】

0.12～0.6g/L。

【临床意义】

C4生理及病理变化机制同C3。

血清中C4含量增多常见于风湿热急性期、组织损伤、结节性动脉周围炎、皮肌炎、心肌梗死、Reiter综合征及各种多发性关节炎等。

血清中C4含量减少常见于系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化、慢性活动性肝炎、急性肾小球肾炎、IgA肾病、亚急性硬化性全脑炎等。

三、B 因子含量测定

血清中B 因子含量测定包括免疫溶血法测B 因子的活性；散射免疫比浊法、单向免疫扩散法、双抗体夹心ELISA 法、单向火箭电泳法测B 因子的含量。目前主要采用散射免疫比浊法。

【原理】

待检血清中B 因子与相应抗体结合，在抗体过量的情况下，形成可溶性免疫复合物，加入聚乙二醇（PEG），使其析出从而改变反应液浊度。根据标准曲线计算出B 因子的含量。

【试剂】

不同厂家试剂有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、抗B 因子抗体、B 因子校准血清、B 因子质控血清。

【操作】

按照散射免疫比浊法操作。具体根据仪器和试剂说明书进行。

【注意事项】

同C3 测定。

【参考值】

0.2～0.5g/L。

【临床意义】

B 因子是参与机体补体替代激活途径的重要成分。

血清中B 因子含量增多常见于恶性肿瘤、感染、自身免疫性疾病、慢性肾炎、肾病综合征。

血清中B 因子含量减少常见于自身免疫性溶血性贫血、急性肾小球肾炎、慢性活动性肝炎、肝硬化等。

四、C3 裂解产物测定

补体C3 裂解产物（C3 split product，C3SP）测定常用方法有免疫电泳法（包括双层火箭免疫电泳、对流免疫电泳、交叉免疫电泳及免疫固定电泳）及单向免疫扩散法等。目前主要采用对流免疫电泳。

【原理】

当抗原和抗体在琼脂介质中电泳时，由于抗原C3SP 带负电荷向阳极方向泳动，抗C3SP 抗体由于电渗作用向阴极方向移动，在比例合适时则在两孔之间形成沉淀线。由于C3SP 分子量比C3 小，而所带负电荷比C3 多，故进行对流免疫电泳时，C3 与相应抗

体形成的沉淀线偏向阴极，而C3SP 与相应抗体形成的沉淀线则偏向阳极。

【试剂】

10g/L 琼脂糖，pH8.6、0.05mol/L 的Tris－巴比妥缓冲液，抗C3 血清，C3SP 阳性血清。

【操作】

1）将10g/L 琼脂糖融化，浇板，打孔，备用。

2）将待测血清、C3SP 阳性血清及抗C3 血清分别加入孔中，再将加待测血清及C3SP 阳性血清孔侧置于阴极，加抗C3 血清孔侧置于阳极。

3）在电场中稳定电压80V，电泳20min 后，置37℃湿盒扩散1～2h。

4）观察待测血清，出现与C3SP 阳性血清一致的沉淀线为阳性。

【注意事项】

1）应及时分离血清用于检测；标本若置4℃则应于24h 内进行检测；并注意溶血和脂浊标本对测定结果的影响。

2）抗C3 血清质量是本试验的关键，应筛选含抗C3SP 不同片段的多克隆优质抗血清。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

血清中补体代谢速度非常快，检测C3SP 较单纯测定C3 更能全面评估体内补体代谢情况及综合分析C3 的动态变化及其与疾病的关系。不论血清C3 含量如何，C3SP 阳性表明存在补体活化。

血清中C3SP 阳性常见于系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等自身免疫性疾病和细菌感染、寄生虫感染、肾脏疾病、肝脏疾病等。

第三节　其他特定蛋白测定

一、抗链球菌溶血素O 含量测定

抗链球菌溶血素O（antistrepolysin O，ASO）含量的测定，可采用免疫比浊法、Todd 溶血法及胶乳凝集法等，目前主要采用散射免疫比浊法。

（一）散射免疫比浊法

【原理】

散射免疫比浊法包括速率散射比浊法和终点散射比浊法。速率散射比浊法以结合在聚苯乙烯微粒上的纯化重组链球菌溶血素O 与待测血清中的ASO （如果存在） 发生抗原抗体特异性反应，形成悬浮在溶液中的不溶性免疫复合物，利用比浊仪检测其散射光的改变速率，并通过其形成的免疫复合物速率峰值信号来测定标本中ASO 含量标本：终点散射比浊法是使链球菌溶血素O 与标本中的ASO 作用一定时间，反应达到平衡后，用散射比浊仪测量其散射光吸光度值来计算标本中ASO 含量。

【试剂】

不同厂家试剂有所不同。主要试剂包括稀释液、反应液、链球菌溶血素O 抗原、ASO 校准血清、ASO 质控血清。

【操作】

按照免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgG 测定。

【参考值】

0～125kIU/L （不同厂家的试剂参考值有所不同）。

（二） 胶乳凝集法

【原理】

ASO 与经交联的链球菌溶血素O 发生凝集反应。预先用2.5 结合单位/ml 溶血素O 中和，如不出现凝集说明血清中ASO <250U，凝集则说明血清中ASO >250U。

【试剂】

ASO 胶乳试剂 （将羧化聚苯乙烯胶乳与纯化溶血素O 用碳化二亚胺交联）；2.5 结合单位/ml 溶血素O。

【操作】

（1） 用9g/L 氯化钠溶液将待测血清作1∶50 稀释，56℃灭活30min。

（2） 将已灭活稀释待测血清1 滴滴于方格涂黑玻璃板上，再滴加2.5 结合单位/ml 溶血素O1 滴，摇动2～3min，使充分混匀。

（3） 滴加ASO 胶乳试剂1 滴，轻轻摇动8min 后，观察结果。

【参考值】

0～250U。

【临床意义】

A 族溶血性链球菌主要引起上呼吸道和皮肤急性感染，且其引起的免疫反应可致风湿热、肾小球肾炎等病。A 族溶血性链球菌感染后，ASO 通常于1～2 周开始上升，3～

4 周达高峰，2 个月后逐渐恢复正常。某些对链球菌溶血素 O 过敏或有鼻窦炎者，ASO 含量可持续数月不降。另外血清 ASO 含量还受年龄、链球菌流行情况、季节和地理位置等因素的影响。

ASO 含量增多常见于 A 族溶血性链球菌感染引起的疾病，如扁桃腺炎、感染性心内膜炎、链球菌感染后肾小球肾炎及风湿热等。

二、类风湿因子含量测定

类风湿因子（rheumatoid factor，RF）测定可采用免疫比浊法、IA 法、ELISA 法及胶乳凝集法等。

（一）速率散射免疫比浊法

【原理】

以变性人 IgG 与待测血清中的 RF 发生特异性结合反应，在一定浓度的增浊剂存在下快速沉淀，在速率散射免疫浊度仪上读出测定结果。

【试剂】

商品化试剂盒包括变性 IgG 抗原、校准物、程序卡及/或说明书、稀释液、缓冲液（含增浊剂）及质控物等。

【操作】

按照速率散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【参考值】

0～30kIU/L。

【临床意义】

RF 含量增多主要是由于患者体内存在有产生 RF 的 B 细胞克隆，在变性 IgG（与抗原结合的 IgG）或 EB 病毒直接作用下大量合成 RF 所致。可见于类风湿性关节炎、干燥综合征、进行性全身性硬化、冷球蛋白血症、亚急性细菌性心内膜炎、慢性间质性肺纤维化、矽肺、传染性单核细胞增多症、系统性红斑狼疮、混合性结缔组织病、皮肌炎、硬皮病、肝硬化、肝炎及老年人等。

（二）胶乳凝集试验

【原理】

待检血清中的 RF 与包被于聚苯乙烯胶乳颗粒上的热变性 IgG 结合，即可发生肉眼可见的凝集。

【试剂】

1）RF 试剂：1％热变性IgG 致敏聚苯乙烯胶乳。

2）阳性和阴性对照血清。

【操作】

1）将血清置56 ℃30 min 灭活补体。

2）用9g/L 氯化钠溶液作1∶20 稀释。

3）稀释血清和RF 试剂各1 滴，混匀。

4）观察3 min，若发生凝集为阳性。阳性标本应进一步稀释后重测。

【参考值】

1∶20 稀释血清为阴性。

【临床意义】

胶乳凝集试验测定的仅为IgM 类RF，一般认为它与类风湿性关节炎的活动性关系不大。

㈢ RF 免疫球蛋白类型测定

RF 包含各类免疫球蛋白自身抗体，但它们的临床意义是不同的，因此，有时需要测定RF 的Ig 类型。

【原理】

待检血清中若存在某类RF，即与包被于反应板微孔的热变性IgG 结合而被固定；再分别与随后加入的抗该类免疫球蛋白抗体酶标记物结合，通过底物显色反应而检出。

【试剂】

商品试剂盒一般包括热变性IgG 抗原、包被反应板、酶标记的抗人IgG、IgA 和IgM 抗体的F(ab)$_2$ 片段等。

【操作】

按照ELISA 间接法进行操作。具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

主要用于判断患者增高的RF 属于哪一类Ig，以利于诊治；实验室也可自行统计出正常人群测定值的分布范围。

【临床意义】

已知IgG 类的RF 与类风湿性关节炎患者的滑膜炎、血管炎和关节外症状有关；IgA 类的RF 是类风湿性关节炎临床活动性的指标，亦见于硬皮病、Felty 综合征和系统性红斑狼疮。

三、心肌肌钙蛋白I 测定

肌钙蛋白（troponin，Tn）是由TnI、TnT 和TnC 3 个球形亚单位组成的复合体，其

中TnT 是与原肌球蛋白结合的亚单位；TnC 是与钙离子结合的受体；TnI 是抑制性亚单位，可抑制肌球蛋白与肌动蛋白组合，阻止肌肉收缩，共有3 种亚型：分别为cTnI 、快骨骼肌和慢骨骼肌肌钙蛋白I ，其分子量分别为24000u 和20000u 。cTnI 仅存在于心肌收缩蛋白的细肌丝上，在肌肉收缩和舒张过程中起重要的调节作用。人类cTnI 有5 个螺旋区域，呈伸展式构型，主要以两种形式存在于心肌细胞内，即小部分游离于肌浆中，大部分以cTnI －cTnC 复合物形式存在于心房肌和心室肌细胞的胞质中（固定于肌原纤维上），且具有较强的抗原性及高度的心肌特异性。在心肌细胞膜完整状态下，cTnI 不能透过细胞膜进入血循环。但当心肌受损时，因cTnI 分子量较肌酸激酶同工酶CK －MB 小，更易从心肌细胞中弥散释出，故在心肌细胞损伤早期，游离于肌浆内的cTnI 快速释出，血清cTnI 水平于4 ～6h 后升高，其后肌原纤维不断崩解破坏，以固定形式存在的cTnI 不断释放，血清水平于18 ～24h 达高峰，1 周后可降至正常水平。cTnI 含量的测定，可采用放射免疫分析、ELISA 法、金免疫层析法、硒免疫层析法或发光免疫分析，目前主要采用发光免疫分析定量检测标本中cTnI 含量，或采用免疫层析法定性检测标本中的cTnI 。

（一）发光免疫分析

【原理】

采用双抗体夹心法。血清中cTnI 与包被在固相载体上抗cTnI 单克隆抗体和碱性磷酸酶标记cTnI 单克隆抗体结合形成夹心式复合物，再加入发光底物发光，通过检测发光强度计算血清cTnI 含量。

【试剂】

主要试剂为固相及液相抗cTnI 单克隆抗体、TnI 校准血清、发光底物等。

【操作】

双抗体夹心法，具体参照仪器和试剂说明书。

【参考值】

血清cTnI ：0 ～0.08μg／L ，血浆cTnI ：0 ～0.03ng／ml （不同厂家的试剂参考值有所不同）。

（二）免疫层析法

【原理】

标本中cTnI 与金或硒标记cTnI 单克隆抗体结合，并向试验区移动，与试验区包被抗cTnI 单克隆抗体结合，形成有色的夹心式复合物，并在质控区形成有色复合物，观察试验区和质控区是否呈色，从而判断标本中是否存在cTnI 。

【试剂】

金或硒标记免疫层析条。

【操作】

免疫层析法，具体参照试剂说明书。

【结果判断】

质控区与试验区同时呈色为阳性；质控区呈色，而试验区不呈色，为阴性；质控区不呈色为无效。

【参考值】

阴性。

【临床意义】

（1）判断心肌梗死：cTnI 不仅有助于早期诊断急性心肌梗死，并对其预后估计也有一定的帮助。患者发病后cTnI 出现较早，一般在胸痛发作后3～6h 血中cTnI 开始升高，14～20h 达峰值，5～7d 后恢复正常。急性心肌梗死发病24h 后血清cTnI 的释放峰值与心肌梗死面积呈正相关，而与梗死后4～6 周左室射血分数呈负相关。

（2）判断不稳定性心绞痛预后：cTnI 测定对不稳定性心绞痛患者预后判断具有较高灵敏度，血清cTnI 增高往往提示预后不好。

（3）监测心脏手术等造成的心肌损伤：cTnI 是冠脉成形术后微小心肌损伤非常敏感的检测指标，其与支架是否置入无关。血清cTnI 水平升高也是原发性高血压病左室肥厚的标志，可鉴别骨骼肌损伤或慢性肾衰患者是否有心肌损伤。

四、C 反应蛋白含量测定

C 反应蛋白（C-reactive potein，CRP）含量测定可采用免疫比浊法、ELISA 法及胶乳凝集法等方法，目前主要采用散射免疫比浊法。

【原理】

血清中的CRP 与试剂中的抗CRP 抗体结合，在一定浓度的增浊剂存在下快速沉淀，在速率散射免疫浊度仪上读出测定结果。

【试剂】

各厂家的试剂盒有所不同。主要包括稀释液、反应液、抗CRP 抗体、CRP 校准血清、CRP 质控血清。

【操作】

按照速率散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 免疫比浊法测定。

【参考值】

0～8mg/L（不同厂家试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

CRP 是一种急性时相反应蛋白，具有激活补体、调理素样作用，促进正常人末梢血单核细胞对黑色素瘤细胞的破坏作用；影响淋巴细胞对促细胞分裂物质的反应性，与部分T 淋巴细胞结合，抑制其功能；抑制混合淋巴细胞反应；抑制血小板凝集和血块收缩的作用及通过干扰前列腺的代谢而调节血小板活性。在各种急性和慢性感染、组织损伤、恶性肿瘤、心肌梗死、X 综合征患者内皮功能失常、急性白血病、强直性脊柱炎伴肺间质病、冠心病、手术创伤、放射线损伤等时，CRP 含量在病后数小时迅速增多，病变好转时又迅速降至正常，并不受放疗、化疗、皮质激素治疗影响。血清CRP 增多还提示排斥反应、孕妇宫内感染等。

胸水CRP 是一个较好的鉴别良恶性胸腔积液的指标，特别适用于鉴别炎症性胸水。

在尿路感染时，尿CRP 含量亦可增多。

五、β_2－微球蛋白含量测定

血清β_2－微球蛋白（β_2－microglobulin，β_2－MG）含量测定，目前主要采用免疫散射比浊法及RIA 法。

（一）速率散射免疫比浊法

【原理】

血清中的β_2－MG 与试剂中的抗β_2－MG 抗体结合，在一定浓度的增浊剂存在下快速沉淀，在速率散射免疫浊度仪上读出测定结果。

【试剂】

商品化试剂盒主要包含稀释液、反应液、抗β_2－MG 抗体、β_2－MG 校准血清、β_2－MG 质控血清等。

【操作】

按照速率散射免疫比浊法操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 免疫比浊法测定。

（二）放射免疫技术

【原理】

将待测标本中β_2－MG 以及^{125}I 标记β_2－MG 与有限量的抗人β_2－MG 抗体进行竞争

反应，反应平衡后进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性强度，以B/B_0 为纵坐标，以β_2－MG 为横坐标制作标准曲线，并根据标准曲线求出各测定管β_2－MG 的含量。

【试剂】

抗人β_2－MG 抗体、^{125}I 标记人β_2－MG、β_2－MG 标准品、分离剂。

【操作】

按照RIA 进行操作。具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

（1）标本：弃去晨尿，饮500ml 水1h 后留尿液，测定时应充分混匀后离心，除去杂质；而各种体液标本要新鲜，无细菌感染；置4℃冷藏，可放24h，－20℃冷冻则可放置数月。

（2）试剂：注意试剂的有效期，使用前试剂均要充分摇匀，禁止不同批号试剂盒内容物混用。加完标记物后，一定要摇匀后才能进行下一步加抗体步骤。

（3）标准曲线：每次应制作新的标准曲线，并利用数据处理软件拟合最佳标准曲线。

【参考值】

血清：0.91～2.20mg/L；尿液：0.03～0.37mg/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

体液β_2－MG 含量测定主要用于肾小球滤过率及肾小管功能的监测和尿路感染部位的确定。如血β_2－MG 增多而尿β_2－MG 含量正常，主要由于肾小球滤过功能下降；血β_2－MG 含量正常而尿β_2－MG 含量增多主要由于肾小管重吸收功能受损；血、尿中β_2－MG 含量均增多主要由于体内某些部位产生过多或肾小球和肾小管均受损。

血β_2－MG 含量增多常见于肾功能衰竭、炎症、肿瘤、自身免疫性疾病、慢性肝炎、糖尿病和老年人等。

尿β_2－MG 含量增多常见于肾病综合征、肾盂肾炎、肾移植排斥反应、糖尿病肾病、肾脏透析、先天性近曲小管功能缺陷、慢性镉中毒、范科尼综合征、Wilson 病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病、慢性肝炎和老年人等。

脑脊液β_2－MG 含量增多常见于急性白血病和淋巴瘤有神经系统浸润时。

六、铜蓝蛋白含量测定

铜蓝蛋白（ceruloplasmin，CER）目前主要采用免疫比浊法测定。

【原理】

抗CER 抗体与待测标本中CER 进行反应，用免疫比浊仪测量其透射光或散射光吸光度变化从而对待测标本中CER 进行定量。

【试剂】

各个厂家试剂有所不同。一般包含稀释液、反应液、抗CER 抗体、CER 校准血清、CER 质控血清等。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 散射比浊法测定。

【参考值】

0.26～0.63g/L （不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

血清CER 含量在不同年龄、种族及生理情况均有很大的差异。目前认为CER 也是急性时相反应蛋白。

血CER 含量增多常见于各种病毒、细菌、寄生虫等引起的急慢性炎症，恶性肿瘤如肝癌、白血病及霍奇金病等，风湿病，类风湿性关节炎，再生障碍性贫血，心肌梗死，手术，妊娠，口服避孕药，经高强度训练的运动员及使用雌激素或含此类激素的药物等。

血CER 含量减少常见于肾病综合征、恶性营养不良、吸收不良等引起的严重低蛋白血症，多发性硬化、急性肝炎及使用天门胺酶后等；尤其是Wilson 病（肝豆状核变性）患者，血中CER 含量明显减少。

七、α_1－抗胰蛋白酶含量测定

α_1－抗胰蛋白酶（α_1－antitrypsin，α_1－AT）含量测定目前主要采用免疫散射比浊法。

【原理】

抗α_1－AT 抗体与待测血清标本中的α_1－AT 反应，用免疫比浊仪测量其透射光或散射光吸光度改变对待测标本中α_1－AT 进行定量。

【试剂】

试剂盒一般包含稀释液、反应液、抗α_1－AT 抗体、α_1－AT 校准血清、α_1－AT 质控血清等。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 散射比浊法测定。

【参考值】

血清：成人1.03～2.02g/L；新生儿1.45～2.70g/L；60岁以上老年人1.15～2.00g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

脑脊液：9.4～16.6mg/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

血清α_1-AT为生理性抗凝物质，在病理情况下，具有中和及清除毒素、控制感染和炎症、阻止自身消化等多种功能。同时，α_1-AT还是急性时相反应蛋白。

血α_1-AT含量增多常见于炎症、肝病、恶性肿瘤如癌转移、霍奇金病、手术后、组织损伤、妊娠、系统性红斑狼疮、烧伤恢复期等。

血α_1-AT含量减少常见于肾病综合征、甲状腺功能亢进、胃肠道蛋白大量丢失、烧伤急性期、急性肝炎、呼吸窘迫综合征、急性胰腺炎等。尤其是遗传性α_1-AT缺乏引起的肝硬化及肺气肿等。

脑脊液α_1-AT含量增多可见于化脓性脑膜炎、结核性脑膜炎、吉兰-巴雷综合征、蛛网膜炎、蛛网膜下腔出血、脑膜白血病、脑损伤、脑梗死、脑出血及急性脊髓炎等。

八、α_1-酸性糖蛋白含量测定

α_1-酸性糖蛋白（α_1-acid glyco protein，α_1-AG）含量测定目前主要采用免疫比浊法。

【原理】

抗α_1-AG抗体与待测标本中的α_1-AG反应，用比浊仪测量其透射光或散射光吸光度改变，从而对待测标本中α_1-AG进行定量。

【试剂】

试剂盒一般包含稀释液、反应液、抗α_1-AG抗体、α_1-AG校准血清、α_1-AG质控血清等。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA免疫比浊法。

【参考值】

血清：0.47～1.25g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

脑脊液：2.8～5.4mg/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

血清α_1-AG目前主要作为急性时相反应的指标。亦可用于鉴别患者是急性时相反应还是雌激素所引起的一族急性时相反应蛋白升高；与结合珠蛋白测定联用是鉴别血管

内溶血的指标；同时还可鉴别渗出液和漏出液。

血 α_1 -AG 含量增多常见于炎症、恶性肿瘤、手术、组织损伤、妊娠、系统性红斑狼疮、烧伤、急性心肌梗死、风湿病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、克隆病及新生儿等。

血 α_1 -AG 含量减少常见于肾病综合征、营养不良、重症肝炎、肝硬化及某些药物的影响等。

脑脊液 α_1 -AG 含量增多见于结核性脑膜炎、化脓性脑膜炎、脑组织损伤及脑膜白血病等。

九、结合珠蛋白含量测定

血清结合珠蛋白（haptoglobin，HPT）含量测定目前主要采用免疫比浊法。

【原理】

抗HPT 抗体与待测标本中的HPT 反应，用比浊仪测量其透射光或散射光吸光度改变，从而对待测标本中HPT 含量进行定量检测。

【试剂】

试剂盒一般包含稀释液、反应液、抗HPT 抗体、HPT 校准血清、HPT 质控血清。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 免疫散射比浊法。

【参考值】

0.16～2.00g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

HPT 常用于急性时相反应和溶血是否处于进行状态的监测。

血清HPT 含量增多常见于急性炎症、慢性感染、结核病、风湿性关节炎、传染性单核细胞增多症、烧伤、肾病综合征、肾盂肾炎、转移性骨肿瘤、肺癌、急慢性粒细胞白血病、霍奇金病、库欣综合征、皮质类固醇激素治疗后、心肌梗死及糖尿病伴有动脉硬化等。

血清HPT 含量减少常见于急慢性肝细胞疾病、严重肝病、溶血性贫血（包括自身免疫性贫血、机械性溶血性贫血、珠蛋白生成障碍性贫血、输血反应、遗传性球形红细胞增多症、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷、阵发性睡眠性血红蛋白尿、疟疾、叶酸缺乏及脾功能亢进等。

十、转铁蛋白含量测定

转铁蛋白（transferrin，TRF）含量的测定目前主要采用免疫比浊法。

【原理】

速率散射免疫比浊法是以抗TRF抗体与待测标本中的TRF发生特异性反应而形成有浊度的免疫复合物，再将形成的浊度速率峰值转换为所对应待测血清标本TRF含量；而终点散射比浊法是抗TRF抗体与待测标本中的TRF作用一定时间，反应达到平衡后，用散射比浊仪测量其散射光吸光度值，从而计算待测标本中TRF含量。

【试剂】

试剂盒一般包含稀释液、反应液、抗TRF抗体、TRF校准血清、TRF质控血清。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参考仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA免疫比浊法测定。

【参考值】

血清：1.93～3.98g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

尿液：<2mg/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

脑脊液：13.5～43.5mg/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

（1）血清TRF：血清中TRF的浓度受铁离子供应的调节，与血浆中铁离子浓度呈负相关。测定血清中TRF含量可用于贫血的诊断、疗效观察、肝病预后判断。TRF也是一种负时相反应蛋白。血清中TRF含量增多常见于缺铁性贫血、妊娠末期、口服避孕药及使用雌激素等。血清中TRF含量减少常见于严重肝病、营养不良、急慢性炎症、恶性肿瘤、结缔组织病、肾病综合征、慢性肾功能衰竭、严重烧伤、胃肠道疾病及再生障碍性贫血等。

（2）尿液TRF：尿液TRF能反映糖尿病早期肾小球损伤。故尿中TRF含量增多主要见于糖尿病肾病。

（3）脑脊液TRF：脑脊液TRF含量增多可见于吉兰－巴雷综合征、结核性脑膜炎、神经系统肿瘤、脑出血及慢性缺铁性贫血等。脑脊液TRF含量减少可见于急慢性中枢神经系统感染、脑膜白血病及脑肿瘤等。

十一、前白蛋白含量测定

血清前白蛋白（prealbumin，PA）含量测定可采用散射免疫比浊法及醋酸纤维素膜

电泳法。目前主要采用散射免疫比浊法。

【原理】

速率散射免疫比浊法是以羊抗PA 抗体与待测血清中的PA 发生抗原抗体特异性反应而形成有浊度的免疫复合物，将形成浊度速率峰值转换为所对应待测血清中PA 的含量；终点散射免疫比浊法是抗PA 抗体与待测血清中的PA 作用一定时间，反应达到平衡后，用散射比浊仪测量其散射光值，计算待测标本中PA 含量。

【材料】

试剂盒一般包含稀释液、反应液、PA 抗体、PA 校准血清、PA 质控血清等。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 免疫比浊法测定。

【参考值】

0.15～0.36g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

PA 是营养不良敏感的监测指标。在营养支持的早期和严重高代谢状态下，应该每周检查数次PA 含量，此后需要1 周检测1 次，以确定营养支持的有效性及患者营养不良的程度。

血清PA 含量减少常见于急性炎症、恶性肿瘤、营养不良、甲状腺功能亢进、烧伤、溃疡性结肠炎、肾病综合征、肾炎、急性肝炎、慢性活动性肝炎、肝硬化及使用水杨酸类药物等。

血清PA 含量增多常见于蛋白质食物充足时的肾病综合征、霍奇金病，以及口服避孕药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇等。

十二、白蛋白含量测定

白蛋白（albumin，Alb）含量测定主要采用散射免疫比浊法和放射免疫技术。

（一）散射免疫比浊法

【原理】

散射免疫比浊法包括速率散射免疫比浊法和终点散射免疫比浊法。速率散射免疫比浊法是以羊抗Alb 抗体与待测标本中的Alb 发生抗原抗体反应，形成有浊度的免疫复合物，将形成浊度速率峰值转换为所对应待测标本中Alb 含量；终点散射法是抗Alb 抗体与待测标本中的Alb 作用一定时间，反应达到平衡后，用散射比浊仪测量其散射光吸光

度值，计算待测样本中Alb 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含稀释液、反应液、Alb 抗体、Alb 校准血清、Alb 质控血清。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

同IgA 免疫比浊法测定。

(二) 放射免疫技术

【原理】

放射性标记物^{125}I Alb 和待测标本（或标准品）中的Alb 与不足量的Alb 抗体竞争结合。在37 ℃温育半小时后竞争反应达到一定的平衡。加入分离试剂，充分摇匀，分离试剂与抗体结合的Alb 形成沉淀。离心分离未结合的^{125}I Alb 和待测标本（或标准品）中的Alb，抽去上清液，测定沉淀物放射性。由于标记Alb 和Alb 抗体的量都是固定的，标本中Alb 含量与^{125}I Alb－抗Alb 抗体复合物cpm 值呈负相关，用已知浓度的Alb 标准品制备标准曲线，即可求得标本中Alb 含量。

【试剂】

试剂盒一般包含缓冲液、^{125}I Alb、抗Alb 抗体、分离试剂、Alb 标准品。

【操作】

按照RIA 操作。具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

同IgG 测定。

【参考值】

血清：35～55g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

尿液：24h 尿2.0～13.4 mg/24h；晨尿0.5～9.2mg/L；随意尿0.62～11.0mg/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

脑脊液：3 个月～4 岁0～0.45g/L；4 岁以上0.1～0.3g/L（不同厂家的试剂参考值有所不同）。

【临床意义】

1）血清Alb：血清Alb 含量增多较少见，偶见于脱水及血液浓缩。

血清Alb 含量减少主要由于合成减少、营养或吸收不良、分解代谢增加、遗传缺陷、异常丢失或分布异常。见于营养不良、急慢性肝脏疾病、手术后、创伤、消耗性疾病、慢性消化系统疾病、遗传性无Alb 血症、门静脉高压、肾病综合征、慢性肾小球肾

炎、糖尿病、系统性红斑狼疮、甲状腺功能亢进、结核病、恶病质及腹腔恶性肿瘤等。

(2) 尿液Alb：尿液Alb含量是反映肾小球渗透性的一项重要指标。用于糖尿病肾病的早期诊断；用于高血压、药物不良反应及子痫前期肾损伤的筛查；用于心血管疾病危险率的人群调查，以及动脉硬化、视网膜病变的早期监测及肾脏移植的监护等。

尿液中Alb含量增多提示肾小球病变向慢性过渡，尿液中Alb升高常见于糖尿病肾病早期及急、慢性肾小球肾炎等。

(3) 脑脊液Alb：脑脊液中Alb含量增多提示血脑屏障受损，常见于脊髓压迫症、脑肿瘤、椎管梗阻、细菌性脑膜炎、吉兰－巴雷综合征、创伤及某些脑血管疾病等。

十三、α_1－微球蛋白含量测定

α_1－微球蛋白（α_1－microglobulin，α_1－MG）目前主要采用放射免疫技术测定。

【原理】

放射性标记物^{125}I α_1－MG和待测标本（或标准品）中的α_1－MG，与不足量的抗α_1－MG抗体竞争结合反应。反应平衡后，加入分离剂进行B/F分离，检测结合部分（B）cpm值，以B/B_0为参数制作标准曲线，即可求得标本中α_1－MG含量。

【试剂】

试剂盒一般包含缓冲液、^{125}I－α_1－MG，抗α_1－MG抗体，分离试剂，α_1－MG标准品。

【操作】

按照RIA操作。具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

参照RIA测IgG法。

【参考值】

血清：12.3～25.1 mg/L（不同厂家的试剂测定参考值有所不同）。

尿液：0.94～3.34 mg/24h（不同厂家的试剂测定参考值有所不同）。

【临床意义】

(1) 血清α_1－MG：血清中α_1－MG含量增多主要由于肾小球滤过率下降，可见于原发性肾小球肾炎、糖尿病肾病、急慢性肾功能衰竭、Fanconi综合征、狼疮性肾炎和间质性肾炎等。血清中α_1－MG含量减少主要由于合成减少，见于肝炎或肝硬化等。

(2) 尿液α_1－MG：尿α_1－MG是肾近曲小管损害的标志蛋白，其含量增多常见于肾小球、肾小管病变，比β_2－MG更敏感，对早期肾功能损害的判断更有意义。

十四、α_2－巨球蛋白含量测定

α_2－巨球蛋白（α_1－macroglobulin，α_2－MG）含量的测定可采用免疫比浊法、ELISA

法、免疫扩散法及免疫电泳法，目前主要采用散射免疫比浊法。

【原理】

速率散射免疫比浊法是以抗 α_2－MG 抗体与待测标本中的 α_2－MG 发生抗原抗体特异性反应而形成悬浮在溶液中的不溶性免疫复合物，根据其速率峰值转换为所对应待测标本中 α_2－MG 的含量；终点散射免疫比浊法是 α_2－MG 抗体与待测标本中的 α_2－MG 作用一定时间，反应达到平衡后，用散射比浊仪测量其散射光吸光度值，从而对待测样本中 α_2－MG 进行定量。

【试剂】

试剂盒一般包含抗 α_2－MG 抗体、α_2－MG 校准血清、α_2－MG 质控血清、稀释液、反应液。

【操作】

按照免疫比浊法进行操作。具体参照仪器和试剂说明书。

【注意事项】

参照IgA 免疫比浊法测定。

【参考值】

血清男性1.5～3.5g/L；女性1.75～4.20g/L（不同厂家的试剂测定参考值有所不同）。

羊水：妊娠15～29 周1.0～1.5mg/L（不同厂家的试剂测定参考值有所不同）。

【临床意义】

血清 α_2－MG 含量增多主要是低白蛋白血症时，机体为保持血浆胶体渗透压的一种代偿机制。见于肾病综合征、急慢性肾小球肾炎、糖尿病、急慢性肝炎、肝硬化、活动性结缔组织病、自身免疫性疾病等。另外在妊娠、1～3 岁幼儿、口服避孕药及雌激素药物治疗后血清 α_2－MG 含量亦可增多。

血清 α_2－MG 含量减少常见于营养不良、胃溃疡、严重急性胰腺炎、弥散性血管内凝血、大量丢失蛋白质的胃肠道疾病、心脏手术、纤维蛋白溶解治疗、某些疾病晚期，以及使用右旋糖酐、链激酶等药物后。

第四章　细胞免疫功能测定

细胞免疫功能在许多疾病的防御和免疫发病机制中有重要作用，如抗感染免疫、抗肿瘤免疫和自身免疫等。

细胞免疫功能主要涉及T 淋巴细胞，巨噬细胞、K 细胞、自然杀伤细胞和B 细胞等也参与其中。传统的细胞免疫功能检测以生物学活性测定为基础，近年随着流式细胞技术的发展与普及，流式细胞技术已部分替代了一些传统的细胞免疫功能测定方法。因此，对目前临床不常用或已淘汰的一些生物活性测定细胞免疫功能的方法，不再赘述。

第一节　巨噬细胞吞噬功能测定

【原理】

巨噬细胞吞噬功能试验应用斑蝥酊刺激皮肤而使发生水泡，诱出大量巨噬细胞，收集其渗出液中的巨噬细胞，与鸡红细胞共温后染色，在油镜下计数吞噬鸡红细胞的巨噬细胞百分比，以此测定巨噬细胞的功能。此法为斑蝥乙醇浸出液发泡法。

【材料】

1）100g/L 斑蝥浸出液：取10g 中药斑蝥浸于100ml 的95％乙醇中，磨口瓶塞紧，放冰箱备用。

2） 鸡红细胞悬液：鸡翅静脉血，肝素20～50kU/L 抗凝，以1∶10 比例放入Alsever 保存液中，可保存1 个月。使用前先用9g/L 氯化钠溶液洗3 次，配成5％鸡红细胞悬液。

3）1cm×1cm 滤纸片，塑料盖。

【操作】

1） 取1cm×1cm 滤纸两张，浸吸100g/L 斑蝥乙醇浸出液。

2） 滤纸贴于被检者前臂内侧中央皮肤，上压一块盖片或塑料薄膜，覆以消毒纱布，用橡皮膏加压固定。

3）3～5h 后，将滤纸、盖片、纱布一并取下，在斑蝥作用的皮肤上面扣上一个直径4cm 塑料盖，用橡皮膏固定，以保护水泡。

4）48h 后，经汞溴红或乙醇棉球消毒水泡表面及其周围皮肤，用2ml 无菌注射器

小心抽吸全部渗出液，注入小试管中，用消毒纱布包好发泡部位。

5） 取皮肤水泡渗出液0.5ml，加入经洗涤的5％鸡红细胞悬液0.01ml。

6） 置37℃水浴中温育30min，每10min 摇动1 次。

7） 用细管吸取1 滴于玻片作涂片，吉姆萨染色，高倍或油镜检查吞噬结果。

【计算】

1） 吞噬百分率：即每100 个巨噬细胞中吞有鸡红细胞的巨噬细胞数。

2） 吞噬指数：每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的数目不同（从零到十几个），将100 个巨噬细胞所吞的鸡红细胞的总和除以100，即得吞噬指数，即每个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的平均数。

上述两项指标测定往往是平行的，因此，只用吞噬百分率即可反映其吞噬活性。对一些“临界”病例（吞噬百分率在50％左右），同时参照吞噬指数的高低，对判断其吞噬功能是否正常，会有所帮助。

【注意事项】

1） 吉姆萨染液用pH6.9 的磷酸缓冲液作1∶10 稀释。染色4～5min 即可冲洗封片，镜检。

2） 很多因素均能影响试验的结果，故应尽量做到每次实验的条件一致。

3） 个体发泡差异较大，有的极为敏感，如青壮年人，有的则很难发泡。

4） 穿刺皮肤水泡液要无菌，以防感染。

5） 巨噬细胞吞噬鸡红细胞能力分3 级：鸡红细胞核正常为未消化；鸡红细胞核模糊、肿胀、色淡为部分消化；鸡红细胞核溶解、色极淡为完全消化。

【参考值】

吞噬百分率为0.6（60％），吞噬指数为1。

【临床意义】

本法为非特异性，用于判断巨噬细胞吞噬和消化功能，以评价机体免疫状态。

可用于恶性肿瘤与良性肿瘤的鉴别诊断及机体内巨噬细胞抗肿瘤能力的指标，还可作为观察恶性肿瘤化疗、放疗、免疫治疗和中西医结合治疗效果的客观指标，但影响吞噬能力的因素很多，需要综合分析。另外慢性支气管炎患者吞噬百分率增高。

第二节　T 淋巴细胞免疫功能测定

一、淋巴细胞转化试验

【原理】

T 淋巴细胞在体外培养过程中受到有丝分裂原如植物血凝素 （PHA） 刺激，可转化为体积较大的母细胞。此种转化与机体致敏无关，属非特异刺激的淋巴细胞转化试验，可反映机体的细胞免疫功能。

被某种抗原致敏的T 淋巴细胞，在体外再次遇到相应抗原时，转化为母细胞，这个过程称特异性淋巴细胞转化试验。

T 淋巴细胞受PHA 刺激，发生有丝分裂。若进入S 相时，在培养液中加入同位素标记的^{3}H －胸腺嘧啶核苷 （^{3}H －TdR），^{3}H －TdR 可渗入细胞，参与DNA 合成。用β闪烁仪测定淋巴细胞放射性强度，可判断细胞增殖程度。

活细胞特别是增殖细胞通过线粒体能量代谢过程，可以将四甲基偶氮唑盐 （MTT） 代谢为蓝紫色的甲臜沉积于细胞内或细胞周围，而且甲臜形成量与细胞增殖呈比例关系。通过比色分析可以准确地反映出细胞增殖量。

【试剂】

1） RPMI 1640 培养液RPMI 1640 培养基10.4g，溶于1L 双蒸水中，如混浊，可用二氧化碳或干冰调pH 至6.0，待粉末溶解后，加入碳酸氢钠1.0～1.2g，调pH 至7.0～7.2，用G6 号玻璃滤器过滤除菌，分装，－20℃冷冻保存，备用。用时加入10％小牛血清及青霉素、链霉素各100U／ml，L －谷氨酰胺50mg，并用60g／L 碳酸氢钠溶液调pH 至7.2～7.6。

2） PHA 凝素溶液：用RPMI 1640 培养液稀释成500～1000μg／ml。

3） 8.3g／L 氯化铵溶液。

4） 37MBq （1mCi） ／ml ^{3}H －TdR 用9g／L 氯化钠溶液稀释10 倍，置4℃保存，用时每管加20μl 即可，剂量为74kBq／管。

5） 50g／L 三氯醋酸溶液。

6） 闪烁液：2，5 二苯基恶唑 （PPO） 6g；1，4 双 （2′－C5′苯基恶唑） 苯 （POPOP） 0.75g；二甲苯1L，乙二醇乙醚550ml。

7） 四甲基偶氮唑盐 （MTT） 溶液：按5mg／ml MTT 溶于pH7.2 的磷酸盐缓冲液中，过滤除菌，4℃避光保存。

8） 二甲亚砜 （DMSO），分析纯。

9） 特异抗原：如旧结核菌素、结核菌素、甲状腺球蛋白、肌红蛋白、乙型肝炎病毒表面抗原、肝细胞膜特异性脂蛋白等。

10） 普通显微镜、液闪仪、酶标仪等。

11） 载玻片：取洁净无油渍玻片预先浸泡于蒸馏水中，置4℃冰箱备用。

【操作】

1．形态学方法

取无菌肝素抗凝血0.1ml，加入1.8ml RPMI 1640 培养液中，同时加入PHA0.1ml，于37℃水浴培养3d，每天摇动1 次。培养结束后取出，吸去大部分上清液，加入8.3g/L 氯化铵溶液4ml 混匀，置37℃水浴10min。取出后以2500r/min 离心10min，弃去上清液，沉淀物加5ml 固定液（1 份冰醋酸加9 份甲醇），室温作用10min，离心弃去上清液，留0.2ml 沉淀物。取2～3 滴沉淀物于冰冷带有水分的载玻片上，使其均匀铺开。自然干燥后，吉姆萨染液染色10～20min。水洗、干燥、油镜检查。计数200 个淋巴细胞中的母细胞数，计算转化率。

转化的淋巴细胞可分为以下几种类型：

（1）染色体形成期（相当于有丝分裂中期至后期）：细胞膜存在，核膜、核仁消失，染色体形成，胞浆中有空泡，细胞呈现圆形以至阿米巴形，直径>10μm。

（2）母细胞型（相当于有丝分裂前期）：细胞呈圆形、卵圆形、菱形以至阿米巴形。直径>10μm。核增大略偏于一边。核质疏松，有1～3 个核仁，染成深紫蓝色，有时可见粗块样早期染色体。胞浆呈天蓝色，有网状结构，并可见大小不等的空泡。

（3）过渡型（介于休止期和母细胞型之间的不典型转化细胞）：细胞大小在10μm 左右。核染色质变松，有的有核仁，胞浆增多，嗜酸性增强。

（4）休止期小淋巴细胞：大小为7μm 左右。核质致密，染色呈深紫蓝色。胞浆极少或仅在核周围呈狭带状环境，轻度嗜碱。

2.^{3}H －TdR 掺入法

按形态学法培养至48～52h 时加入^{3}H －TdR74kBq/管，继续置37℃水浴至72h 收获。如作特异性淋巴细胞转化，则用特异抗原代替PHA，在37℃水浴中培养96h 后加^{3}H －TdR74kBq/管，温育至120h 收获。培养完毕，轻轻吸出上清培养液，在沉淀细胞悬液中加入6ml 蒸馏水，低渗破坏红细胞。加入35g/L 氯化钠溶液2ml 调至等渗，1000r/min 离心10min。弃上清液，每管加9g/L 氯化钠溶液2ml 后滴入装在抽滤装置上的49 型玻璃纤维滤片中央，用9g/L 氯化钠溶液10ml 冲洗标本管，全部滴在滤纸上。滴加50g/L 三氯醋酸溶液2～3ml，固定标本，再滴加无水乙醇1～2ml，脱色取下滤片，置80℃烘箱烘干30min。将烘干滤纸（滴加标本的一面向上）放入盛有5ml 闪烁液的小瓶中。置β闪烁仪中测其放射性活度。

3.MTT 比色分析法

检测步骤同^{3}H －TdR 掺入法。在培养68h 后，加入MTT 溶液10μl，继续培养4～6h。取出后小心吸去上清液100μl，加酸性异丙醇100μl，充分混匀后静置数分钟。然后用酶标光度计以630nm 为参考波长，测定波长570nm 处吸光度值。

【计算公式及参考值】

形态学方法：

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

^{3}H -TdR 掺入法：

$$刺激指数=\frac{刺激管cpm\ 均值}{对照组cpm\ 均值}$$

MTT 比色分析法：

$$刺激指数=\frac{实验孔A_{570nm}均值}{对照孔A_{570nm}均值}$$

转化率参考值0.601 ±0.076 （60.1％±7.6％），其他无参考值。每批试验应设对照组。一般刺激指数>2 为有意义。

【注意事项】

1） 培养液成分RPMI 1640、小牛血清等对转化率影响较大，更换时应预试选定，培养液pH 最终为7.2～7.4。

2） 培养细胞需有足够的空间，一般10ml 试管内液体总量超过2ml。

3） 加PHA 后培养时间以72h 为好，加特异抗原以120h 为好。

4） 作^{3}H -TdR 转化时影响因素很多，要求加样准确，操作认真。严格控制实验条件。

5） 形态学方法最好设置不加PHA 的培养液对照，以排除非特异的母细胞转化和患者血液中原已存在的母细胞（如某些血液病时）对检测结果的干扰。

6） MTT 法具有简便、经济、无放射性危害等特点，但敏感性较^{3}H -TdR 掺入法差。

【临床意义】

1） 判断细胞免疫功能状态：细胞免疫缺陷或功能低下者，其淋巴细胞转化率可明显低于正常。此外，恶性肿瘤、霍奇金病、淋巴瘤、淋巴肉芽肿、重症真菌感染、重症结核、瘤型麻风等，淋巴细胞转化率均低于参考值。

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，其淋巴细胞转化率可由治疗前的低值转变为正常，反之则预后不良。

二、淋巴细胞亚群测定

利用抗分化抗原单克隆抗体鉴定不同T 细胞表面分化抗原，如抗CD3 与总T 细胞反应，抗CD4 与辅助性/诱导性T 细胞（Th/TI）反应，抗CD8 与抑制性/细胞毒性T 细胞（Ts/Tc）反应。利用CD 系统的单克隆抗体（McAb）与外周血单个核细胞反应的百分率，可确定人T 细胞亚群的分布情况。近年用流式细胞仪测定T 细胞亚群日益广泛，结果稳定，重复性好。本节介绍荧光免疫组化技术、酶免疫组化技术。

(一) 荧光免疫组化技术

【原理】

先用鼠抗人T 细胞分化抗原的抗CD3、CD4、CD8McAb 分别与外周血单个核细胞反应，洗去未结合的McAb 后，再加入兔抗鼠IgG 荧光抗体，经反应并洗涤后，在荧光显微镜下观察，结合了抗体的细胞在黑色背景中显荧光，将显荧光的细胞作为阳性细胞，或直接由流式细胞仪计数阳性细胞的百分率，从而确定T 细胞亚群数。

【试剂】

1) 鼠抗人T 细胞分化抗原McAb，常用抗CD3、CD4、CD8McAb。

2) 兔抗鼠IgG 荧光抗体。

3) 肝素、淋巴细胞分离液、Hanks 液。

【操作】

1) 肝素抗凝血1.5ml，加等量Hanks 液，叠加于3ml 细胞分离液上。2000r/min 离心25min。取单个核细胞层，用含10%新生牛血清的Hanks 液 (FCS－Hanks) 洗2 次，每次800～1000r/min 离心5～7min。然后配成5×10^6/ml 细胞悬液。

2) 取上述细胞悬液100μl，加入相应McAb 100μl，混匀，4℃放置45min，用FCS－Hanks 液洗2 次，吸弃上清液。

3) 加入最适浓度兔抗鼠IgG 荧光抗体100μl，混匀，4℃反应30min。用FCS－Han－ks 液洗3 次，每次800r/min 离心30s，吸弃大部分上清液。混匀后滴片 (细胞计数板)，用荧光显微镜观察 (或用流式细胞仪分析)。

【结果判断】

－表示细胞暗淡，轮廓不清楚。

＋表示细胞轮廓有很弱的荧光。

＋＋表示细胞轮廓有较强的荧光，可能确定未染荧光的细胞中心，但界限不清。

＋＋＋表示细胞轮廓有强的荧光，可以确定未染荧光的细胞中心，界线清楚。

＋＋＋＋表示细胞轮廓有很强的荧光，可以确定未染荧光的细胞中心，界线清楚。

每一标本计数200 个细胞，荧光强度在＋＋以上者为阳性，计算阳性细胞率。

【参考值】

CD3 细胞阳性率为 (71.5±6.2)%；CD4 细胞阳性率为 (45.7±5.3)%；CD8 细胞阳性率为 (27.9±5.0)%；CD^+4/CD^+8 细胞比值为1.6±0.3。

【临床意义】

作为临床细胞免疫功能的评价指标之一。

【注意事项】

1）年龄对T细胞数有一定影响。婴幼儿$CD^{+}4$细胞数较高而$CD^{+}8$细胞数较低；老年人$CD^{+}3$、$CD^{+}8$细胞数均下降，因而$CD^{+}4/CD^{+}8$细胞比值较高；男女性T细胞数及其亚群相似，但女性$CD^{+}4/CD^{+}8$细胞比值高于男性。在分析结果时应对此加以考虑。

2）洗涤时，离心速度不宜过快，时间不宜过长。洗涤液含10%新生牛血清可对细胞起保护作用，并可减少非特异性反应。

3）兔抗鼠IgG荧光抗体应有较高纯度，否则易出现假阳性结果。试验中所用McAb和荧光抗体的最适工作浓度均应通过预试验选择。

（二）酶免疫组化技术

【原理】

同荧光免疫组化技术，其中用辣根过氧化物酶（HRP）标记的兔抗鼠IgG抗体代替荧光抗体。

【操作】

基本操作步骤同荧光免疫组化技术。待外周血单个核细胞与McAb反应完毕并经FCS－Hanks液洗2次后，吸弃上清液，加入最适工作浓度的酶标记兔抗鼠IgG抗体100μl，4℃放置90min。用FCS－Hanks液洗3次（800r/min离心30s），吸弃上清液。加入底物3，3′－二氨基联苯胺（DAB）溶液100μl，混匀，室温反应15min。滴片（细胞计数板）用普通光学显微镜观察。阳性细胞呈蓝色。计数200个细胞，求出阳性细胞率。

【注意事项】

酶底物应于临用前配置。其余同荧光免疫组化技术。

【临床意义】

同荧光免疫组化技术。

第三节　B淋巴细胞免疫功能测定

【原理】

细胞膜表面免疫球蛋白测定法。以荧光素标记的羊抗人IgM、IgG、IgA和IgE、IgD抗体，分别与活的淋巴细胞反应，可与B淋巴细胞表面相应的Ig结合。在荧光显微镜下观察，细胞膜呈现荧光的细胞，即为细胞膜表面Ig（SmIg）阳性细胞（B淋巴细胞）。同时用普通光源照明，计数该视野的淋巴细胞数。根据发荧光和未发荧光的淋巴细胞

数，求得带各类SmIg 淋巴细胞的百分数。其总和即为血液中B 淋巴细胞的百分数。

【试剂】

1） 异硫氰酸荧光素（FITC）标记的羊抗人IgG、IgD、IgA、IgM、IgE，用0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液稀释至最适浓度。

2） 含1.0g/L 叠氮钠Hanks 液。

3） 相对密度为1.077～1.079g/ml 淋巴细胞分离液。

4）50％甘油磷酸盐缓冲液。

【操作】

1） 取肝素抗凝血2ml，加等量Hanks 液稀释，用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞，用Hanks 液洗2 次（1000r/min 离心10min），计数，配成10^5 细胞/0.1ml。

2） 将10^5 细胞/0.1ml 用Hanks 液洗1 次后，弃去上清液，用滤纸吸去内壁剩余液体，分别加入各类FITC 标记羊抗人Ig 抗体2 滴（约为0.08ml），轻轻摇匀，放37℃温箱染色30min。

3） 用Hanks 液洗细胞2 次，每次1000r/min 离心10min。吸去全部上清液，将管底沉淀的细胞加入50％甘油磷酸盐缓冲液1 滴，混匀，吸取1 滴于载玻片上。加盖片，在荧光显微镜下观察。SmIg 阳性细胞呈环状或斑点状荧光。用普通光源照明，计数淋巴细胞总数。算出300～400 淋巴细胞中SmIg 阳性细胞的百分数。

【参考值】

SmIg 阳性细胞总数平均为21.0％（标准为16.0％～28.0％）；SmIgG 阳性细胞为7.1％（标准为4.0％～13.0％）；SmIgM 阳性细胞为8.9％（标准为7％～13％）；SmIgA 阳性细胞为2.2％（标准为1％～4％）；SmIgD 阳性细胞为6.2％（标准为5％～8％）；SmIgE 阳性细胞为0.9％（标准为0～1.5％）。

【注意事项】

1） 细胞浆着染荧光者为死细胞，计数时应排除。

2） 单核细胞表面有Fc 受体，有时可呈假阳性。如从细胞大小及形态不能与淋巴细胞区别时，可用过氧化物酶染色法鉴别（单核细胞为阳性，淋巴细胞为阴性）。操作方法是将淋巴细胞用荧光抗体染色后制成涂片，干后滴加联苯胺乙醇溶液（联苯胺0.25g，亚硝基铁氰化钠0.5g，溶于95％乙醇100ml 中）固定3min；倾去固定液滴加底物溶液（联苯胺乙醇溶液1 份，加新配的0.2％过氧化氢溶液1 份），5min 后，用0.067mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液冲洗，吉姆萨或瑞特染液染色，油镜观察。细胞内有棕黑色颗粒者为过氧化物酶阳性细胞。

3） 近年来由于抗B 细胞表面特异分子（CD19、CD20 等）单克隆抗体的问世，倾向于应用荧光素标记的抗CD19 或CD20 的单克隆抗体直接与外周淋巴细胞反应；或用

抗CD19 或CD20 的单克隆抗体（第一抗体）先与淋巴细胞反应，再与荧光素标记的兔或羊抗鼠IgG（第二抗体）结合，在荧光显微镜下计数或流式细胞仪计数外周血B 淋巴细胞。

【临床意义】

B 淋巴细胞数量的减少与体液免疫缺陷有关，B 淋巴细胞数的增加则与B 细胞恶性增生等有关。

第四节　抗体依赖的杀伤细胞活性测定

【原理】

抗体依赖的杀伤细胞（K 细胞）活性测定采用乳酸脱氢酶释放法。其原理是在靶细胞（Hela 细胞）与抗靶细胞抗体结合后，K 细胞可利用其特有Fc 受体，识别带有抗体的靶细胞，将其破坏，释放出胞浆乳酸脱氢酶（LDH）。LDH 催化乳酸－丙酮酸反应，辅酶I 由还原型变为氧化型，前者在波长340nm 处有较大的光吸收峰，由此推知K 细胞活性。

【材料】

1）RPMI 1640 培养液：内含10％灭活新生牛血清，2mmol/L 谷氨酰胺、2mmol/LHEPES 及青霉素100IU/ml、链霉素100μg/ml。

2）测定（效应）细胞：取被检者新鲜静脉血4ml，肝素抗凝，用淋巴细胞分离液[相对密度（1.077±0.001）g/ml] 分离淋巴细胞，并用1640 液离心洗涤（1500r/min，10min）2 次，最后配成4×10^6/ml 细胞悬液。活细胞数应在95％以上。

3）靶细胞（Hela 细胞）：选择传代后第一天的Hela 细胞，经胰蛋白酶（Difco 1∶250）溶液消化后，用1640 液离心洗涤（1500r/min，10min）2 次，最后配成2×10^6/ml 细胞悬液。活细胞数应在95％以上。

4）抗Hela 细胞抗体：经胰蛋白酶消化分散的Hela 细胞，用9g/L 氯化钠溶液配成2×10^7/ml 与等量福氏完全佐剂配成乳液，免疫雄性家兔，在背部多点注射1ml。1 周后皮下注射Hela 细胞悬液（不加佐剂）1×10^7/ml，每周1 次，6 周后采血分离血清。临用前稀释至亚凝集效价。

5）TritonX－100。

6）反应液：临用前配制。pH7.4 0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液内含丙酮酸钠130mg/L，还原型辅酶Ⅰ（NADH）280mg/L。

【操作】

1）测试管：靶细胞2 ×10^6/ml 0.1ml，抗Hela 细胞抗体0.1ml，4 ×10^6/ml 效应细胞0.25ml，补加RPMI 1640 培养液0.55ml。

2）自然释放管：靶细胞0.1ml，补加RPMI 1640 液0.9ml。

3）最大释放管：靶细胞0.1ml，1 % Triton X —100 0.9ml。

4）将上述3 管置37 ℃、5.0 %二氧化碳细胞培养箱培养18h，低速离心取全部上清液，加入新鲜配制的LDH 反应液3ml，32 ℃恒温，用分光光度计测定波长340nm 处吸光度值，每15s 测1 次，共2min。

【计算】

先求出各管的LDH 单位数：

$$\text{LDH（U）} = \frac{\text{每分钟吸光度值降低数}}{6.22 \times 100}$$

然后根据下式求出百分细胞毒指数：

$$\text{细胞毒指数} = \frac{\text{测试管LDH 单位数} - \text{自然释放管LDH 单位数}}{\text{最大释放管LDH 单位数} - \text{自然释放管LDH 单位数}}$$

【参考值】

0.55 ±0.15。

【临床意义】

用于机体免疫功能评价，如肿瘤免疫与抗病毒免疫方面研究。

【注意事项】

1）靶细胞一定要选择传代第一天培养细胞，活细胞应在95 %以上。老化的细胞易导致检测结果偏高。

2）淋巴细胞分离纯度越高越好，如红细胞污染可影响测定结果。

3）测试管要求无菌，以免培养液污染影响测定结果。

4）NADH 及丙酮酸钠每批试剂批号要相同，若不同时需做预试验，选择最大释放管LDH 单位数为1 、自然释放管LDH 为0.15 ～0.17 时为最佳浓度。

5）抗Hela 抗体不可反复冻融，否则会导致效价下降。

6）NADH 极不稳定，反应液一定要新鲜配制。

第五节　自然杀伤细胞活性测定

一、^{51}Cr 释放法

【原理】

将肿瘤细胞（靶细胞）用^{51}Cr标记后与效应细胞——自然杀伤细胞（natural killer cell，NK细胞）作用，根据^{51}Cr释放的多少，即可判定NK细胞活性。

【试剂】

1）效应细胞：肝素抗凝血，用淋巴细胞分离液按常规方法分离单个核细胞，置37℃下2h，除去粘附玻璃的单个核细胞，调整活细胞数为5×10^6/ml。

2）标记靶细胞：用慢性白血病细胞（K562）株作为靶细胞，平时保存于液氮中，用时复苏，用含10%～15%新生牛血清的RPMI1640液于37℃培养24h。取4×10^6/0.5ml的K562细胞，加入3.7MBq$Na^{51}CrO_4$，置37℃水浴90min，时时摇动。洗去游离的^{51}Cr，调整靶细胞数为1×10^5/ml。

【操作】

1）自然杀伤管：于试管中加入效应细胞和靶细胞各0.2ml，效应细胞与靶细胞比例为50∶1。

2）自然释放管：以营养液代替效应细胞，加入标记靶细胞0.2ml。

3）最大释放管：加入标记靶细胞0.2ml，以20g/L十二烷基磺酸钠0.2ml代替效应细胞。

以上3组试管置37℃水浴4h后，分别加入冷Hanks液0.6ml中止反应，2500r/min离心5min，吸出上清液0.5ml至另一清洁试管中，分别用γ计数仪测cpm值。

【计算公式】

$$自然释放率=\frac{自然释放管cpm值-本底cpm值}{最大释放管cpm值-本底cpm值}$$

$$自然杀伤率=\frac{自然杀伤管cpm值-自然释放管cpm值}{最大释放管cpm值-自然释放管cpm值}$$

$$^{51}Cr利用率=\frac{标记靶细胞cpm值}{投入总放射性cpm值}$$

$$靶细胞标记率（cpm/细胞）=\frac{标记细胞cpm值}{标记细胞数}$$

【参考值】

自然释放率<0.10～0.15（标准为<10%～5%）；自然杀伤率为0.476～0.768（标准为47.6%～76.8%）；^{51}Cr利用率为0.065～0.478（标准为6.5%～47.8%）。

靶细胞标记率：>0.1cpm/细胞。

【注意事项】

1）应选择适当的^{51}Cr浓度，一般4×10^6/0.5ml细胞需标记1003.7MBq^{51}Cr。比放射活度过低，标记率<0.1cpm/细胞，自然释放率与自然杀伤率偏低，可影响测定结果。

2）效应细胞与靶细胞比例愈大，自然杀伤率越高。但如效应细胞与靶细胞比例大

于100 ∶1 时，自然杀伤率不再呈对数增加，且需血量多，不宜采用。

⑶ K562 细胞标记后，存放时间不宜过长，超过24h 会引起细胞死亡较多，影响自然释放测定结果。

二、^{125}IUdR 试验

【原理】

5 —^{125}I —2 ’ —脱氧尿嘧啶核苷（^{125}IUdR）分子上的碘原子与胸腺嘧啶核苷上的甲基在空间构型上类似，作为DNA 合成的前体物，^{125}IUdR 较特异地取代胸腺嘧啶核苷掺入到细胞核DNA 链上。因此，可用于标记快速分裂的瘤细胞。当标记的肿瘤靶细胞被NK 细胞攻击死亡后，靶细胞内的^{125}IUdR 可释放到培养液中，此释放的同位素几乎不再被活细胞利用。用γ计数器测定cpm 值，算出释放百分率，以此表示NK 细胞的活性。

【材料与试剂】

⑴ 淋巴细胞分层液、K562 细胞株、5 —FUdR 和^{125}IUdR 、胰蛋白酶和DNA 酶。

⑵ 效应细胞：静脉血单个核细胞分离提取同K 细胞测定方法。用RPMI1640 培养液洗涤2 次，最后用该液配成1 ×10^{7}/ml 细胞悬液。

⑶ 标记靶细胞：用人类红白血病细胞株K562 细胞作为靶细胞。取一定量的靶细胞加入一定量的5 —FUdR 和^{125}IUdR ，混匀置37 ℃培育2h ，然后用培养液洗3 次，配成1 ×10^{5} 细胞/ml ，检测细胞标记率（要求2cpm/每个细胞）。

【操作】

⑴ 效应细胞与靶细胞作用：将分离好的淋巴细胞悬液（效应细胞）和标记的K562 细胞（靶细胞）按100 ∶1 的比例加入平底塑料试管中，按表5 —4 —1 步骤操作，同时设自然释放管（作为对照管），每个标本作3 个重复管，最后用培养液使每管增至1ml ，1500r/min 离心，促进效应细胞与靶细胞结合，置37 ℃、5 %CO_2 细胞培养箱内孵育18h 。

⑵ 酶促反应：取出孵育试管，弃去各管上清液，剩下的细胞加一定浓度（1.2g/L）胰蛋白酶和DNA 酶各0.1ml ，混匀后37 ℃水浴30min ，促使被攻击的靶细胞释放^{125}I—UdR ，随后各管立即加入0.8mlHank 液终止酶促反应，混匀后1500r/min 离心2min 。

⑶ 放射性活度测定和计算：用γ计数仪分别测各管cpm 值。

表5 —4 —1　NK 细胞活性检测操作步骤

加入物（ml）	自然杀伤管	自然释放管	最大释放管
靶细胞	0.1	0.1	0.1
淋巴细胞	0.1		
培养液	0.8	0.9	
蒸馏水			0.9

【计算】

$$\text{自然释放率}=\frac{\text{自然释放管cpm 值}-\text{本底cpm 值}}{\text{最大释放管cmp 值}-\text{本底cpm 值}}$$

$$\text{自然杀伤率（NK 细胞活性）}=\frac{\text{自然杀伤管cpm 值}-\text{自然释放管cpm 值}}{\text{最大释放管cpm 值}-\text{自然释放管cpm 值}}$$

$$\text{靶细胞标记率（cpm／细胞）}=\frac{\text{标记细胞cpm 值}}{\text{标记细胞数}}$$

【参考值】

自然释放率＜0.10；自然杀伤率0.35～0.85。

【注意事项】

1）效应细胞／靶细胞若＞100∶1，自然杀伤率不呈对数增加，且标本用量亦大，不宜采用。

2）标记靶细胞放置时间不宜过久，因随时间延长导致死细胞增加。

3）标记的^{125}IUdR 浓度要合适，要求^{125}IUdR 的放射活性浓度为1.11×10^{7}Bq／ml。如浓度过低，靶细胞标记率＜0.1cpm／细胞，会影响检测结果。

三、胞浆乳酸脱氢酶释放法

【原理】

根据NK 细胞直接杀伤靶细胞所释放出的胞浆乳酸脱氢酶（LDH）浓度，来反映NK 细胞活性。测出的LDH 浓度大，则细胞毒性大，反之，则细胞毒性小。

【试剂】

同K 细胞测定。

【操作】

同K 细胞测定，测定管靶细胞（2×10^{6}／ml）为0.1ml，效应细胞（4×10^{6}／ml）为0.5ml，补RPMI1640 液0.4ml。

【参考值】

0.95±0.120。

【注意事项】

同K 细胞测定。

【临床意义】

同K 细胞测定。

第五章　细胞因子测定

细胞因子是一组多肽物质，调节细胞的增殖、分化及功能，在机体生长发育与维持正常的生理功能中起重要作用，尤其在调控免疫系统的功能和实现机体的一些自分泌、旁分泌功能方面的作用更是受到关注。在病理情况下，细胞因子可在免疫反应或炎症过程或其他病理过程中由有关被激活的细胞产生，也可由恶性肿瘤细胞产生。临床上测定细胞因子主要有以下几个方面的用途：免疫系统功能异常的辅助诊断、感染性疾病的辅助诊断、恶性肿瘤的辅助诊断、生殖功能异常的辅助诊断等。

细胞因子一般分为白细胞介素（interleukin，IL）、干扰素（interferon，IFN）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、集落刺激因子（colony-stimulating factor，CSF）以及干细胞因子（stem cell factor，SCF）、促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）、免疫粘附分子（adhension molecule）等。

测定细胞因子的方法主要有生物学活性测定、免疫学测定以及分子生物学方法。

生物学活性测定法是利用人或鼠等动物对某一细胞因子生长依赖的细胞系来测定。基本原理是这些细胞系依赖某一细胞因子生长且生长增殖程度与共浴或培养剂中的某一细胞因子的量呈正比，通过测定依赖细胞系的增殖情况即可了解或计算出细胞因子的含量。细胞增殖的测定方法有^{3}H-TdR 掺入法与MTT 法等。前者利用细胞增殖中DNA 复制需摄入单核苷酸，包括^{3}H-TdR，因此，根据^{3}H-TdR 的摄入量可计算细胞的增殖。后者是根据细胞增殖时的能量代谢推算细胞的增殖情况。能量代谢水平与细胞合成DNA 水平基本平行，所以测定细胞能量代谢水平可间接反应细胞增殖情况。四甲基偶氮唑盐（MTT）是一种淡黄色可溶性化合物，活细胞尤其是增殖期的细胞可通过线粒体能量代谢过程中的琥珀酸脱氢酶的作用使淡黄色的MTT 分解产生蓝色结晶状甲臜，沉积于细胞内或其周围。甲臜的量与细胞增殖程度成正比，甲臜经异丙醇或二甲亚砜（DMSO）溶解显色，因而测定其显色的深浅可计算细胞的增殖程度。生物学活性测定中也有利用某一细胞因子对某一细胞系的毒性作用来测定该细胞因子生物学活性的。如利用白细胞介素1 对人A375 细胞具有细胞毒活性，通过人A375 细胞对染料的摄取量的改变来定量检测人白细胞介素1 的生物学活性。

免疫学方法测定的是细胞因子的免疫活性。细胞因子或为蛋白质或为多肽，均能免疫动物产生相应的抗体，再利用这些抗体采用放射免疫技术（RIA）、酶联免疫吸附试

验（ELISA）等进行测定，其方法学原理详见本篇第一章有关内容。

在细胞因子的测定中尚有测定其mRNA以反映其生物学活性的。细胞因子的生物学活性测定，虽然直接反映了某一细胞因子在某一个体血液或组织中的活性水平，但因测定周期长，影响结果因素较多，有时不能满足实际工作需要；而免疫学方法需要特定的试剂盒，至少需要特定的抗体，有时可能一时难以办到。此时测定已知其DNA序列的细胞因子的mRNA表达量不失为一种较好的选择。如何设计引物和选择实验条件，用分子生物学方法（如RT-PCR）测定mRNA，请参考第七篇分子生物学检验有关内容。

鉴于细胞因子的作用通常具有多向多效性，许多细胞因子的临床意义尚在不断发现之中或在不断地被修改着，有的尚未明了，因此，本章所述临床意义可能有所缺漏或过时。生物活性的各测定方法多用于医学科学研究中，在临床检验中很少应用，因此，本章对生物学活性测定的具体操作不再赘述。免疫学测定方法虽然方法学原理相同，具体操作因试剂不同而不同。因此，在具体测定操作时应以试剂盒介绍的方法为准。

第一节　白细胞介素测定

一、白细胞介素-1测定

白细胞介素-1（IL-1）是一种激素样多肽，由一条肽链构成，其构型紧密，对许多肽链内切酶和肽链端解酶有相对的耐受力。IL-1又称血细胞生成素-1、淋巴细胞活化因子等，其主要由活化的巨噬细胞产生，内皮细胞、自然杀伤细胞和B淋巴细胞也可产生。IL-1分α和β两种分子形式，其分子量分别为17500u和17300u，两者结构间仅有25%的同源性，编码基因均定位于染色体2q12-21。生物活性测定法有胸腺细胞法、10细胞法、A375法－染料摄取法。本节介绍免疫学测定方法。

（一）放射免疫技术

【原理】

碘标记的IL-1与待测IL-1竞争结合吸附在试管壁上的多克隆抗IL-1抗体，由于抗体少于抗原，根据碘标记的IL-1被结合的多少即可推知被测物中IL-1的多少。该方法敏感性一般为250pg/ml，可以区分两种不同形式的IL-1（α、β），可以排除标本中其他因子存在对生物学方法测定的影响，但易受交叉免疫反应的影响。

【操作】

1）将纯化的抗IL-1抗体结合于试管壁上或特制的微粒上，然后悬于磷酸盐缓冲液中。

2）将一定稀释度的待测标本加入试管，置室温24h。

3）再加碘标记IL-1至每个试管中，作用24h。

4）1000g离心10min，去除上清悬液，再用蒸馏水洗1次。

5）测定试管捕获的放射性活度。

6）根据标准管的放射性活度，计算待测标本IL-1的含量。

（二）酶联免疫吸附试验

【原理】

用抗人重组IL-1抗体包被微孔板，各孔加入不同浓度的标准IL-1及待测标本，温浴后，加入酶（通常用HRP）标记的抗人重组IL-1抗体，温浴，洗涤，最后加入底物显色，在一定波长下测定吸光度值，根据标准曲线计算标本IL-1的含量。

【临床意义】

IL-1产生不足或过剩与某些疾病的发生关系密切，目前认为类风湿性关节炎可能是滑膜局部IL-1产生过剩所致，用抗HLA-DR制剂治疗风湿性关节炎，可以缓解其症状，可能与阻断巨噬细胞产生IL-1有关。痛风的一些症状也可能是尿酸盐结晶引起IL-1释放所致。而一些免疫缺陷患者，IL-1产生很少，甚至血清中不能测出。

二、白细胞介素-2测定

白细胞介素-2（IL-2）又称T细胞生长因子，能引起有IL-2受体的淋巴细胞发生活化、增殖，如活化的T细胞、B细胞、NK细胞及无标记的淋巴细胞、体外长期培养的IL-2依赖细胞（CTLL、CTLL-2、CTB6、F12）等。IL-2主要由辅助性T细胞产生，基因定位于染色体4q26-28，编码分子量15000～16000u的蛋白质。生物学活性测定通过比较待测标本与标准品对检测细胞促增殖能力的强弱来确定待测标本的IL-2活性（如MTT法）。

IL-2另可用免疫学方法测定，该法能缩短检测时间，不必维持待测细胞，排除了影响生物学活性测定的多种因素；不足之处是所测到的仅是具有免疫反应性的IL-2蛋白（有可能不具有生物学活性）。临床常用ELISA法，其灵敏度与特异性见各厂家试剂盒，原理见有关章节。

【临床意义】

1）血清IL-2水平降低：可见于老年人以及肿瘤、白血病和一些免疫功能缺陷患者。

2）测定血清IL-2水平可以观察肿瘤和白血病患者的病情变化，预测治疗效果，对肿瘤免疫的研究有很大的价值。

三、白细胞介素-3 测定

白细胞介素-3 （IL-3） 又称肥大细胞生长因子，为多克隆刺激因子。由丝裂原或抗原刺激激活的T 细胞及一些细胞株产生，其主要功能为调节多能干细胞的生长及分化，使之产生各系骨髓细胞。基因定位于染色体5q23-31，编码具有种族特异性、分子量为28000u 的高度糖基化单体蛋白。

IL-3 的生物学活性检测包括MC-9 肥大细胞增殖法检测鼠IL-3 的活性、半固体集落形成法检测人重组IL-3 活性等。

人IL-3 的免疫学检测采用双抗体夹心ELISA 法，操作同其他ELISA。此法可直接测定人IL-3 （存在于组织培养的上清液、血清、血浆及其他体液中），有较高的敏感性。血清标本中，可检测IL-3 的最小值为8.9pg/ml。非血清标本中，可检测IL-3 的最小值为7.4pg/ml。95%的正常人血清中IL-3 含量在检测范围内（10～2000pg/ml）。特异性也高，能检测天然或在大肠埃希菌中重组的人IL-3，与16 种不同的细胞因子或生长因子（rIL-6、hrTNF、hrGM-CSF、hTGF、pTGF、pPDGF、bFGF）无交叉反应，也不能检测鼠IL-3。测定中需注意用作标准曲线的IL-3 稀释度的选择应与待测标本一致。如果所测标本值高于标准IL-3 的最高值，则需要稀释标本并重新测定。

鉴于IL-3 对造血系统骨髓多能干细胞的特殊功能，检测血清IL-3 含量能反映造血功能。在再生障碍性贫血、骨髓移植后、放疗及化疗后等骨髓抑制性疾病中，IL-3 不仅是理想的治疗用药，测定血中IL-3 含量也可作为疗效观察的指标之一。

四、白细胞介素-4 测定

白细胞介素-4 （IL-4） 又称B 细胞生长与分化因子，主要由辅助性T 细胞产生，肥大细胞与骨髓基质细胞也参与分泌，基因定位于5 号染色体的细胞因子基因族之间，产物为19000u 的蛋白质。

IL-4 测定常用ELISA 双抗体夹心法。

五、白细胞介素-5 测定

白细胞介素-5 （IL-5） 主要由抗原激活的T 淋巴细胞和肥大细胞产生，基因定位紧邻IL-3 与GM-CSF 基因族，分子量约40000～45000u。重组IL-5 分子可引起骨髓细胞分化成嗜酸性粒细胞，也可与ConA 共同刺激使胸腺细胞增殖。

生物学活性检测采用嗜酸性粒细胞分化法，其原理是IL-5 可促进定向嗜酸性粒细胞前体细胞向嗜酸性粒细胞分化，因此，通过检测骨髓细胞培养液中IL-5 刺激产生的嗜酸性粒细胞数量是检测IL-5 含量最敏感方法。

六、白细胞介素－6 测定

白细胞介素－6 （IL －6） 又称B 细胞刺激因子、浆细胞瘤生长因子等，基因定位于7q^{21} －22 ，是一种21000 ～28000u 的多肽。IL －6 为急性期反应蛋白，由T 细胞、单核－巨噬细胞、成纤维细胞和肝细胞以及多种肿瘤细胞等产生，生物效应极为广泛。

（一） 生物活性检测

［原理］

MH60 细胞株依赖IL －6 而生长，通过检测待检标本对该细胞株增殖的支持程度即可直接反应IL －6 的活性，采用^{3}H －TdR 掺人或MTT 比色法测定。

［材料］

1） MH60 细胞株的增殖：将细胞培养于含定量重组IL －6 的RPMI1640 完全培养基中传代增殖。

2） 无钙离子、镁离子的Hank 液。

3） 5mg／mlMTT 用磷酸盐缓冲液溶解，滤过除菌，避光保存。

4） 酸化异丙醇：含0.04mol／L 盐酸的异丙醇。

5） 30g／L 十二烷基磺酸钠溶液。

［操作］

1） 取处于对数生长期的MH60 细胞，用Hank 液洗3 次，然后用RPMI1640 培养基（含10 %新生牛血清） 制成悬液再培养6h ，以去除细胞表面结合的IL －6 。

2） 于96 孔板中倍比稀释待检标本及rIL －6 标准品，每份标本做3 个平行孔。

3） 重悬并离心沉淀MH60 细胞，弃上清液，再用不完全RPMI1640 培养液调整细胞浓度为2 ×10^{5}／ml ，加入含待检标本的96 孔板中，每孔100μl （含10^{4} 细胞）

4） 将细胞培养于37 ℃、含5 %二氧化碳细胞培养箱中培养48h 。

5） 在细胞培养达44h 后，各孔加入MTT （5mg／ml） 20μl ，继续培养4h 。

6） 取出96 孔板，1000r／min 离心10min ，轻轻甩去上清液，并用纸巾吸取边缘残留的上清液。

7） 每孔加入100μl 酸化异丙醇，室温下放置20min ，期间轻轻振荡96 孔板，以使甲臜溶解充分。

8） 每孔加入30g／L 十二烷基磺酸钠溶液20μl 以消除异丙醇导致的蛋白质沉淀对吸光度测定的影响。

9） 用酶标仪分别测定各孔在波长570nm 和630nm 处的吸光度值，以此计算其生物活性。

㈡ 免疫学检测

ELISA 双抗体夹心法是目前检测IL －6 最常用的免疫学方法。该法有较好的特异性和敏感性，可检测出50 ～800pg／ml 量级的IL －6 含量。

【临床意义】

1） 免疫功能异常：免疫功能异常者IL －6 含量异常升高。患者常有发热、淋巴结肿大、血沉加快、高γ球蛋白血症、自身抗体阳性等，并与IL －6 的异常表达有密切相关。

2） 多克隆B 细胞异常及自身免疫疾病：心房内黏液瘤是最早观察到与IL －6 有关的疾病；类风湿关节炎为常见的自身免疫疾病，IL －6 在类风湿性关节炎发病中起重要作用。类风湿性关节炎患者持续产生IL －6 可部分解释患者局部及全身症状，如自体及浆细胞瘤和多发性骨髓瘤的自分泌生长因子，IL －6 和IL －6 基因表达失调是该类疾病发病的主要机制。已发现IL －6 是增生性肾小球肾炎患者肾小球系膜细胞的自分泌生长因子，在增生性肾小球肾炎患者尿中IL －6 较多，且与该病的预后有关。

3） 甲状腺疾病：亚急性甲状腺炎发作期间，患者血中IL －6 明显增多，当病情缓解后，其含量则恢复正常；胺碘酮（AMD） 所致甲减患者IL －6 含量正常，I 型胺碘酮所致甲亢患者IL －6 含量轻度升高，II型胺碘酮所致甲亢患者IL －6 含量明显高于正常。这些均与甲状腺细胞的破坏有密切关系。

4） 部分肿瘤患者IL －6 含量增多，如卵巢癌等。

5） IL －6 含量增多还与多种临床疾病有关，如急慢性炎症、烧伤、移植排斥等。

七、白细胞介素－7 测定

白细胞介素－7 （IL －7） 又称前B 细胞生长因子，由基质细胞 （如骨髓基质细胞、胸腺基质细胞） 以及肝癌细胞系分泌。IL －7 基因定位于染色体8q12 －123，编码25000u 的糖蛋白分子。IL －7 促进前B 细胞增殖与分化，而对成熟B 细胞无作用，这是IL －7 比较独特的生物学活性。IL －7 尚能促进前T 细胞和成熟T 细胞增殖，诱导细胞毒T 淋巴细胞活性。IL －7 在抗肿瘤免疫方面有潜在的价值。

IL －7 的生物学活性可以用一些前B 细胞系 （如clone2b 细胞） 来检测，这些细胞的生长及维持活力绝对依赖于外源性IL －7。人或小鼠IL －7 刺激clone2b 细胞增殖可通过^{3}H －TdR 摄入法或MTT 法检测。

八、白细胞介素－8 测定

白细胞介素－8 （IL －8） 又称中性粒细胞活化因子、T 淋巴细胞趋化因子，由单核

细胞、淋巴细胞、纤维母细胞、内皮细胞等多种细胞受LPS、TNF 或IL －1 刺激后产生。IL －8 基因定位于染色体4q12 －21，编码一种分子量为6000 ～8000u 的多肽。IL －8 的主要生物学效应是趋化和激活中性粒细胞，参与中性粒细胞介导的组织损伤。

IL －8 生物学检测主要基于它对中性粒细胞的趋化作用，因此，常规的中性粒细胞趋化实验，如琼脂糖法、Boyden 小室法等测定中性粒细胞的迁移距离，从而测出IL －8 的活性。该法虽能反映IL －8 的生物学活性，但有难以精确定量，特异性差，需要通过抗体阻断实验区分IL －8 和其他趋化因子的效应，操作繁杂，不适用于大批量临床标本等缺点。

目前国外已有商品化的IL －8ELISA 试剂盒。其特异性强，灵敏度高，最小检出量约为100pg／ml 。

【临床意义】

（1） 在许多感染性疾病中，常有IL －8 含量增多。如进展期成人呼吸窘迫综合征（ARDS） 患者支气管肺泡灌洗液中IL －8 含量明显增多，早期灌洗液中出现IL －8 可作为ARDS 病情恶化的诊断指标。细菌性尿路感染患者的血清IL －8 含量增多，并与中性粒细胞数相关。

（2） IL －8 还与感染引起的不育有关。

（3） IL －8 还参与多种疾病的病理过程，在许多慢性炎症性疾病，如类风湿性关节炎、银屑病 （牛皮癣）、肺纤维化和石棉肺等病变局部或血清中IL －8 产生异常，定量检测IL －8 对于了解这些疾病的发生、发展及指导治疗均有重要意义。

九、白细胞介素－9 测定

白细胞介素－9 （IL －9） 又称肥大细胞增强因子，主要由活化的$CD^{+}4T$ 细胞产生。基因定位于5 号染色体，编码30000 ～40000u 的糖蛋白，可与促红细胞生成素共同刺激肥大细胞与红系祖细胞的生长。

IL －9 的生物学活性检测方法主要是依赖性细胞株的增殖试验。IL －9 依赖的细胞株包括小鼠的TS_1、TS_2、K_9 和MC_9 和人MDTE 细胞。

十、白细胞介素－10 测定

白细胞介素－10 （IL －10） 又称细胞因子生成抑制因子，主要由Th_2 细胞产生。基因定位于1 号染色体，编码18000u 单体糖蛋白。与其他细胞因子不同的是，IL －10 除了能一定程度地诱导细胞毒T 淋巴细胞活性、增强B 细胞增殖与分化外，其主要生物学活性是起免疫抑制作用。它能抑制Th 细胞的增殖及IL －2、IL －3、IFN －γ、GM －CSF 等细胞因子的合成，故其免疫调节作用因靶细胞不同而表现出双向性。IL －10 的生

物学活性可采用如下检测方法：（1）用IL－10抑制Th_1细胞合成IFN－γ的活性以测定IL－10含量；（2）用D36肥大细胞株检测IL－10的活性，该细胞可与IL－10反应，而对人细胞因子（IL－1β、IL－2、IL－3、IL－4、IL－5、IL－6、IL－9、IL－12、Gm－CSF、TNF－α）不敏感。该法可检测标本中含量为0.05～1000U/ml的人或小鼠IL－10，缺点是不能检测血清样本（因其中含有抑制生长物质）。

十一、白细胞介素－11测定

白细胞介素－11（IL－11）主要由骨髓基质细胞产生。其基因定位于1q13.3－13，编码23000u的非糖基化蛋白。IL－11主要生物学活性是单独或与其他细胞因子协同刺激骨髓造血干细胞的增殖和分化成熟。IL－11可以促进巨核细胞系和红细胞系造血生成，与IL－1、IL－6、G－CSF的生物学活性有相似之处。

检测方法：用B9－11细胞株或T10细胞株检测IL－11生物学活性。

【临床意义】

IL－11在促进造血恢复、抗感染等方面有潜在的应用价值。可望用于血小板减少症以及放疗、化疗导致的造血损害，亦可用于感染和出血的治疗。检测IL－11则可用于上述疾病的治疗监测。

十二、白细胞介素－12测定

白细胞介素－12（IL－12）又称细胞毒淋巴细胞成熟因子、NK细胞生长因子，主要由具有抗原递呈功能的细胞产生。基因定位未明，产物由40000u和35000u蛋白质组成，并由二硫键相连成70000u的多聚体，单体无生物学活性。IL－12对T细胞和NK细胞具有显著的生物学作用。

第二节　干扰素测定

干扰素（Interferon，IFN）分两型，I型IFN包括IFN－α和IFN－β，IFN－α主要由白细胞产生，IFN－β主要由成纤维细胞产生；II型IFN，又称IFN－γ或免疫干扰素，是由有丝分裂原刺激T淋巴细胞产生。IFN是一种高效的抗病毒生物活性物质，又是一种具有广泛免疫调节作用的淋巴因子。

IFN检测方法较多，如溶血空斑形成抑制试验、细胞病变抑制法、放射免疫分析等。以下介绍细胞病变抑制法。

【原理】

INF具有广谱的抗病毒作用，主要功能表现在抑制病毒繁殖，因此，正常生理状态

的细胞，经一定稀释度的INF 作用之后对一定量的敏感病毒感染的保护程度可反映INF 抗病毒活性，如抗病毒活性高则细胞存活率高，INF 效价高，否则相反。

【材料和试剂】

1）细胞株：人羊膜传代细胞（WISH 株）。

2）淋巴细胞分层液，相对密度1.077g/ml。

3）Eargle 培养液（内含10％新生牛血清）。

4）病毒株：滤泡性口炎病毒。

5）消化液：10g/L 胰蛋白酶5ml，10g/LEDTA2ml，加无钙镁磷酸盐缓冲液至100ml。

6）结晶紫染液：含结晶紫0.03％，氯化钠0.85％，乙醇50％，甲醛3％，蒸馏水47％。

7）脱色液：50％乙二醇甲醚水溶液。

【操作】

1）IFN －α体外诱生：取静脉抗凝血2～3ml 加入等量Hank 液，置于淋巴细胞分层液上，比例为1∶1，2000r/min 离心30min，吸取淋巴细胞，连续洗3 次，用Eargle 培养液将细胞配制为浓度10^7/ml，加入IFN －γ100U，置37℃2h，加入NDV －F_{32}128 血凝单位，37.5℃悬转培养18～24h。收集上清液即为粗制干扰素，用1mol/L 盐酸溶液调节pH 值至2.0，置4℃5d 后，用1mol/L 氢氧化钠溶液调pH 值至7.0，置－30℃待测。

2）活性测定：将生长成片的人羊膜传代细胞，消化成单个细胞，加入适量Eargle 液，接种于96 孔微量塑料板内置于含有5％二氧化碳培养箱中长至单层。去除营养后加入倍比稀释的IFN 溶液，每稀释度接种3 孔，37℃孵育过夜后，去除IFN 溶液，用Eargle 液洗1 次，加入50～100$TCID_{50}$滤泡性口炎病毒，37℃培养24h 后，待病毒对照孔75％～100％细胞出现明显病变时，在倒置显微镜下观察。

【结果】

以能抑制50％细胞病变的稀释度倒数作为IFN 效价，每次测定均设有正常细胞对照和病毒对照。

【临床意义】

1）血清IFN －α升高可见于病毒感染及一些微生物的感染、器官移植后等。

2）血清IFN －α降低可见于哮喘。

第三节　肿瘤坏死因子测定

肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）可分为两类，TNF －α主要由成纤维细

胞、单核巨噬细胞、T 和B 淋巴细胞产生；TNF －β是由活化的淋巴细胞分泌的淋巴毒素。TNF 的主要生物学活性是对某些肿瘤细胞的细胞毒作用，亦称细胞溶解、细胞静止或抗增殖作用。其次，重组TNF 尚有广谱抗病毒活性，诱导主要组织相容性复合体抗原表达，刺激单核/巨噬细胞前体细胞分化，诱导多形核白细胞活化、诱导细胞因子（如GM －CSF、IL －1、IL －6、IL －2 等）合成与分泌等。

TNF 的检测方法很多，有^{3}H －TdR 掺入法、MTT 比色法、染料摄人法、ELISA 法、乳酸脱氢酶释放法、NAG 微量酶反应比色法、生物发光法与比色法等多种。以前以^{3}H －TdR 掺入法、染料摄人法和MTT 比色法为常规方法，目前则较多采用ELISA 法。正常情况下血清中几乎测不到TNF，但某些疾病患者如类风湿关节炎、肿瘤、肾移植后等可在外周血中测到微量的TNF。常常通过测定外周血单个核细胞在体外被诱生的TNF 来测得。

【肿瘤坏死因子的诱生】

1）单个核细胞分离：取人外周血5ml，肝素抗凝，经D －Hank 液等量稀释后以淋巴细胞分层液分离单个核细胞，用D －Hank 液洗3 次，然后将细胞悬浮于无血清培养液中，调整细胞浓度至4 ×10^{6}/L。

2）TNF 诱生：取96 孔圆底培养板，每孔加100μl 单个核细胞悬液。再加入脂多糖使终浓度分别为100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.0001μg/ml。置37℃、5％二氧化碳细胞培养箱中孵育16h，收集上清液，置－20℃冻存，以便测定TNF 活性。

3）注意事项：注意防止来自培养液、异种血清、洗涤液、玻璃器皿等方面对INF 诱生的影响，在单个核细胞分离、洗涤过程中，均不要接触异种血清。

一、^{3}H －TdR 掺入法

【原理】

TNF 敏感细胞（L929 细胞）在培养时加入^{3}H －TdR，使^{3}H －TdR 掺入到细胞内新合成的DNA 中，再用TNF 对此细胞进行攻击，通过测定细胞培养上清液所含^{3}H －TdR 的cpm 值，以了解TNF 敏感细胞受损程度，算出TNF 的活性。^{3}H －TdR 掺入法分为前标记和后标记两种方法。

（一）前标记法

【操作】

1）用含5％新生牛血清的IMDM 培养液培养的L929 细胞，长成单层后，加入74kBq 的^{3}H －TdR，继续培养3d 后，用温热的细胞培养液洗3 次。

2）加入TNF 待测标本，2～4h 后离心，测上清液中cpm 值，计算特异性杀伤能力

(即细胞毒作用)，同时设最大释放组。

(3) 在标记为自发释放组的L929 细胞培养瓶中加入50g/L 的十二烷基磺酸钠，离心30min，测上清液的cpm 值。

【结果计算】

$$\text{特异性杀伤力}=\frac{\text{待测上清液标本cpm 值}-\text{自发释放组上清液cpm 值}}{\text{最大释放组上清液cpm 值}-\text{自发释放组上清液cpm 值}}$$

(二) 后标记法

【操作】

(1) 取96 孔板，每孔加100μL L929 细胞 (2×10^5/ml)，再加100μl 不同稀释度的待检标本，每个稀释度3 个复孔，同时设不加TNF 的对照组。

(2) 在37℃、含5%二氧化碳细胞的培养箱中培养44h 后，加入1.85×10^4Bq/孔的^{3}H-TdR 继续培养4h。

(3) 用2.5g/L 胰酶消化，多头细胞收集器收集细胞，测cpm 值，计算杀伤率。

【结果计算】

$$\text{细胞杀伤率}=\frac{\text{对照组cpm 值}-\text{待测标本cpm 值}}{\text{对照组cpm 值}}$$

二、结晶紫染色法

【原理】

利用结晶紫染料使活细胞着色，再以十二烷基磺酸钠溶解，通过测定其吸光度值表示细胞存活状态并间接反映TNF 的生物学活性。

【操作】

(1) 取96 孔平底培养板，每孔加含10%新生牛血清的RPMI1640 (其他成分同上)培养液100μl。

(2) 在第1 排孔中加入待测上清液，混匀，依次1∶3 倍比稀释，每个样本平行测3孔阴性对照 (培养液)、阳性对照 (50IU/ml 的TNF-γ)。再加入终浓度1.0μg/ml 的放线菌素D。

(3) 以TNF 敏感的L929 细胞为靶细胞，用胰蛋白酶-EDTA 消化液消化，离心收集，调细胞浓度至6×10^6/ml，每孔加50μl，置37℃、5%二氧化碳细胞培养箱孵育18～20h。

(4) 弃上清液，用3%甲醛溶液室温下固定3min，洗涤。

(5) 用2.5g/L 结晶紫溶液染色10min，洗涤，经十二烷基磺酸钠溶解后，以酶标仪在波长550nm 处测吸光度值。

【结果计算】

导致50％细胞死亡的标本稀释度的倒数为1 个TNF 活性单位，以国际单位（U／ml）表示。取TNF （比活性为4 ×10^{7}IU／mg 蛋白）同上法绘制标准曲线求出标本的TNF 活性值。

三、MTT 比色法

【原理】

增殖的活细胞，通过线粒体能量代谢过程，可将MTT 代谢形成蓝紫色甲臜沉淀于细胞内或细胞周围，从而根据靶细胞（L929）死亡情况而间接反映出待测标本中TNF －α的细胞毒活性。

【操作】

1）于40 孔板每孔加100 μL929 细胞（1.5 ×10^5／ml）后，加不同稀释度的待测标本，再加10 μl 放线菌素D （终浓度1.0 μg／ml），置37 ℃、5 ％二氧化碳细胞培养箱孵育24h ，弃去上清液后以0.01 mol／L 、pH7.2 的磷酸盐缓冲液洗2 次。

2）每孔加10 mlMTT 溶液（按5 mg／ml 溶于pH7.2 、0.01 mol／L 的磷酸盐缓冲液中，溶解后G6 滤器除菌，4 ℃避光保存，一般不超过2 周）。每孔再加100 μl 培养液37 ℃、5 ％二氧化碳细胞培养箱孵育3 ～6h 。

3）每孔加100 μl 酸化异丙醇，室温放置数分钟待充分溶解后，以酶标仪测吸光度值（用仅加培养液和MTT 溶液的孔调零点，测定波长570nm ，参考波长630nm）。测定应在酸化异丙醇加入后1h 内结束。同时设不加TNF 标本的对照孔。

【结果计算】

$$\text{细胞毒活性}=\frac{\text{待测标本（波长570nm 吸光度值－波长630nm 吸光度值）}}{\text{1 －对照孔（波长570nm 吸光度值－波长630nm 吸光度值）}}$$

四、ELISA 法

（一）双抗体夹心法

96 孔板先用50 μl 抗TNF 抗体50 μg／ml 包被，阻断与洗涤后，每孔加50 μl 不同稀释度的待测标本，22 ℃孵育1h 。洗涤后再加20 μg／mlHRP 标记抗体50 μl ，于22 ℃孵育1h ，洗涤后，加底物显色，终止反应后，在波长405nm 测吸光度值。

（二）生物素－亲和素法

抗TNF －α的二抗不直接标酶而标生物素，再与过氧化物酶标记的链亲和素反应，洗涤后，加底物显色，终止反应后，在波长405nm 测吸光度值。

上述检测方法的具体操作参照有关试剂盒的操作说明。

【临床意义】

1）血清TNF 含量增多可见于类风湿关节炎、肿瘤、肾移植后、细菌性败血症、病毒性感染和炎症等。

2）测定外周血单个核细胞在体外诱生TNF 的能力，有助于了解细胞免疫功能状况，为肿瘤等疾病的治疗提供参考。

3）测定TNF 对观察肿瘤和白血病疗效具有参考价值；尤其对利用卡介苗和细菌脂多糖的免疫疗法的评价有参考价值。

第六章　自身抗体测定

血清自身抗体测定在自身免疫性疾病的诊断和治疗中具有重要的价值。近年来，由于生物薄片（biochip）和免疫印迹等高新技术的出现，以及优质商品化试剂的问世，使血清自身抗体测定已成为临床实验室常规的检查项目。自身免疫性疾病一般分为两类：非器官特异性自身免疫性疾病和器官特异性自身免疫性疾病。为便于描述，本章将这些病变中出现的自身抗体也分为非器官（或组织）特异性自身抗体和器官（或组织）特异性自身抗体两大类。

自身抗体的测定为一些自身免疫性疾病的诊断提供了重要的证据，但诊断时应当结合临床表现和其他实验室检查。

第一节　非器官/组织特异性自身抗体测定

非器官或组织特异性自身抗体包括抗细胞核成分的抗体、抗细胞质成分（如抗线粒体）的抗体和抗细胞膜的抗体。常见的有系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、系统性硬化症、多发性肌炎、皮肌炎、干燥综合征及其他与风湿病有关的自身抗体。

一、抗核抗体测定

抗细胞核成分的自身抗体的总称为抗核抗体（antinuclear antibodies，ANA），ANA 测定在系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus，SLE）等自身免疫性疾病的诊断及鉴别诊断中具有重要价值。常采用 HEp－2 细胞抗原片及灵长类肝组织的冰冻切片作为抗原基质，以荧光免疫组化技术的间接法来检测 ANA，其特点是特异性强、操作方便、结果可靠。

【原理】

采用间接免疫荧光测定，根据荧光在细胞核上的定位模式或特点来确定核型及判断特异性自身抗体。

【试剂】

间接免疫荧光测定试剂，其中抗原基片虽可有多种选择（如鼠肝印片、HEp－2 细胞等），但以 HEp－2 细胞抗原片联合灵长类动物肝组织的冰冻切片为基质的成套试剂盒最佳。

【操作】

参见本篇第一章临床免疫学检验基本技术第七节免疫组织化学技术有关荧光免疫组织技术内容，具体操作详见试剂盒说明书。

【临床意义】

虽然经常会见到同一种ANA 出现于不同的自身免疫性疾病，或一种自身免疫性疾病会有多种ANA，但各种ANA 在各已知疾病中的分布和概率是不同的，因此，它们能用于这些疾病的诊断。表5－6－1 列出了常见自身免疫性疾病的ANA 谱。

【注意事项】

1）在间接免疫荧光测定中，与典型模式不相关区域的荧光为非特异性荧光，即使有时非特异性荧光较强，此法仍能识别较弱的特异性信号，这是本法的优点。

2）由于这是ANA 测定的第一步过筛试验，因此，试剂质量极为重要。采用HEp－2 细胞抗原片联合灵长类动物肝组织的冰冻切片的联合基片的好处是能够获取最大限度的信息量，并能保证检测结果准确性。灵长类肝组织冰冻切片曾是识别ANA 的常用基质，现在大多为HEp－2 细胞所代替。

3）有时用HEp－2 细胞能测到的许多ANA 并不与灵长类肝组织起反应，亦有一部分ANA 不能用HEp－2 细胞检测到，而只能用肝组织片检测到。因此，ANA 正确测定需要对每一份血清进行HEp－2 细胞及肝组织切片两种基质的联合测定。抗U1nRNP、Sm、双链DNA（dsDNA）、组蛋白及核点型等抗体的荧光模式，在HEP－2 细胞与肝组织中具有相同的荧光强度，而抗SS－A、SS－B、着丝点及增殖性核抗原抗体在肝组织抗原基片上的荧光强度要比HEp－2 细胞的荧光强度弱得多。联合测定有利于做出正确的判断。

4）ANA 的最终鉴别需要使用以纯化抗原为基质的方法，即进行抗ENA 多肽谱抗体的测定。

表5－6－1　自身免疫性疾病中ANA 的分布和出现概率（%）

疾病	ANA	dsDNA	SsANA	Sm	RNP	SS－A	SS－B	组蛋白	Scl－70	Jo－1	PM－Scl	着丝点抗体
RA	56	2	4	5	1	4	1	10	—	—	—	—
KA＋SS	56	—	—	—	—	15	8	—	—	—	—	—
SS	75	—	—	—	5	70	60	—	—	—	—	—
Felty’s综合征	75	—	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—
青年型RA	57	5	3	—	3	—	—	—	—	—	—	—
SLE	100	49	42	23	34	35	5	46	—	—	—	—
PLE	90	—	24	—	—	—	—	94	—	—	—	—
ALE	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

续表

疾病	ANA	dsDNA	SsANA	Sm	RNP	SS－A	SS－B	组蛋白	Scl－70	Jo－1	PM－Scl	着丝点抗体
HLE	44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MCTD	100	25	—	8	100	—	—	—	—	—	—	—
PSS	58	—	14	—	5	33	6	—	23	—	—	10
CRESTS	100	—	—	—	2	—	—	—	10	—	—	77
PM	28	—	—	—	—	—	—	—	—	45	60	
DM	25	25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：表中疾病墒称分别为RA：类风湿关节炎；SS：干燥综合征；SLE：系统性红斑狼疮；PLE：普鲁卡因酰胺诱导的药物性狼疮；ALE：乙酰普鲁卡因酰胺诱导的药物性狼疮；HLE：肼苯哒嗪诱导的药物性狼疮；MCTD：混合结蹄组织病；PSS：进行性系统性硬化症；CRESTS：CRES了综合征（皮肤钙质沉着、雷诺氏病、食管硬化、指趾硬皮病及毛细血管扩张）；PM：多发性肌炎；DM：皮肌炎；Felty's综合征：系慢性关节炎、脾肿大、白细胞减少及下肢皮肤色斑并发的症状。

二、抗可提取核抗原抗体测定

一部分细胞核抗原可被9g/L氯化钠溶液所提取，称为可提取核抗原（extractable nuclearantigen，ENA），临床常用的抗ENA抗体主要包括抗Smith（Sm）抗体、抗核糖核蛋白（RNP）抗体、抗拓朴异构酶I抗体（Scl－70抗体）、抗组氨酰－tRNA合成酶抗体（Jo－1抗体）、SS－A（Ro）抗体和SS－B（La）抗体等。此类抗体测定的方法有ELISA和免疫印迹法等，但目前以免疫印迹法的使用最为普遍。

三、抗双链DNA抗体测定

抗DNA自身抗体可分为两类：抗双链（dsDNA）或天然DNA（nDNA）抗体和抗单链或变性DNA（ssDNA）抗体。前者的抗原表位在DNA（外围区）脱氧核糖磷酸骨架上，而后者则在碱基区。抗ssDNA抗体因不能提供有效的诊断依据已不常测定。

测定抗dsDNA抗体有荧光免疫组化技术间接法、ELISA法及放射免疫技术等方法。

抗dsDNA抗体的间接免疫荧光测定的阳性模式为：在HEp－2细胞抗原基片上，抗dsDNA抗体显示为细胞核均质荧光，分裂期细胞的浓缩染色体荧光增强，染色体周围区域色暗；灵长类肝组织细胞核呈现均质型荧光，但有时也出现粗的或细的块状荧光；在短膜虫抗原片上，抗dsDNA抗体在镜下呈均质的有时为边缘增强的动基体荧光。在有些低滴度血清标本中，有时只观察到短膜虫动基体有荧光，而HEp－2细胞和肝组织则没有，目前尚不清楚此种低效价抗体的临床意义。

采用短膜虫抗原基片的荧光免疫组化技术测定dsDNA 抗体对系统性红斑狼疮的诊断具有高度特异性。当有相关症状出现时，1 ∶10 的效价就有意义。对怀疑系统性红斑狼疮患者的标本最好进行更敏感的ELISA 法检测，但其特异性不高。

抗dsDNA 抗体仅能在系统性红斑狼疮患者中发现，抗dsDNA 抗体的检出为该病的重要诊断标准之一。因使用的实验方法和疾病活动程度的不同，其阳性率为60 %～90 %。如果无症状者的血清中检测到此抗体，有85 %的人可能会在今后5 年内发生系统性红斑狼疮。由于抗体效价与疾病活动程度相关，因此，抗体效价的测定就为疗效观察提供了可靠依据。

四、抗组蛋白抗体测定

抗组蛋白抗体的靶抗原是以组蛋白（histones）为基础的DNA 相关蛋白，其分子量介于11200～21500u。组蛋白可分为5 种：H_1、H_{2A}、H_{2B}、H_3 和H_4，这5 种组蛋白类型都有各自对应的自身抗体。

抗组蛋白抗体常采用荧光免疫组化技术间接法。

抗组蛋白抗体的阳性荧光模式与抗dsDNA 抗体相似：在HEp－2 细胞抗原基片上，抗组蛋白抗体在细胞核中也呈现均质型荧光，并使分裂期细胞的浓缩染色体荧光增强；在灵长类肝组织抗原基片上，则可见到细胞核为均质型、有时为粗块状荧光。

抗组蛋白抗体主要见于药物（普鲁卡因酰胺、膦苯哒嗪及其他药物）诱导的系统性红斑狼疮。另外，抗组蛋白抗体还见于部分非药物诱导的红斑狼疮和类风湿关节炎患者。

五、抗nRNP 抗体测定

抗nRNP 抗体最早是在混合结缔组织病（mixed connective tissue disease，MCTD，或称Sharp 综合征）患者中发现的一组自身抗体，其对应抗原是细胞核内的核糖核蛋白（nuclearribonucleo protein，nRNP）。后来有人在系统性红斑狼疮患者中也发现了针对类似抗原的抗体（即Sm 抗体）。

nRNP 由低分子量RNA 和多种蛋白质（分子量9000～70000u）组成，其RNA 中富含尿苷故称U－RNA。利用色谱分析可将其RNA 分为U1 至U66 个成分，每个nRNP 颗粒还具有6 种不同的核心蛋白（B、B’、D、E、F、G）。

在HEp－2 细胞抗原基片上，当抗U1－nRNP 及抗Sm 抗体存在时，荧光模式通常为整个细胞核呈现粗颗粒，时有中等到细的颗粒荧光，核仁阴性。在分裂期细胞中，浓缩的染色体部位为阴性，而外周区几乎为均质的荧光。灵长类的肝组织片也是颗粒型荧光，核仁阴性。与抗SS－A 及抗SS－B 抗体的荧光模式不同的是抗U1－nRNP 及抗Sm

抗体在灵长类肝组织及HEp－2 细胞呈相同的荧光强度。抗U3 －nRNP 抗体请参阅本节抗原纤维蛋白抗体。

对于上述阳性荧光模式的血清，应使用免疫印迹法或ELISA 法对抗nNP 抗体或抗Sm 抗体加以确认。

高效价的抗U1 －nRNP 为混合性结缔组织病的特征，阳性率约为95％～100％，且抗体效价与疾病的活动程度相关。抗U1 －nRNP 亦见于系统性红斑狼疮患者，但几乎均与抗Sm 抗体同时出现。

六、抗Sm 抗体测定

抗Sm 抗体是以最初被发现携带此抗体的患者名字（Smith）命名的自身抗体，主要出现于系统性红斑狼疮患者的血清中。抗Sm 抗体对系统性红斑狼疮具有高度特异性，虽然阳性率不高，但与抗dsDNA 抗体联合检测，对系统性红斑狼疮具有确诊价值。

七、抗SS －A 抗体测定

抗SS －A 抗体的抗原也是小核糖核蛋白，由1 个RNA 分子和2 种不同的蛋白质组成。SS －A 在mRNA 转化为翻译活性分子的过程中起着作用，它主要位于细胞核中。SS －A 的命名来自干燥综合征抗原A（Sjogren’s syndrome antigen A）。抗SS －A 抗体也称为RO 抗体，由最初被发现含有此抗体的患者名字的前两个字母（RO）命名。

在HEp－2 细胞抗原基片上，抗SS －A 抗体形成细颗粒型荧光模式，仅位于细胞膜边缘变化的分裂间期细胞的细胞核，核仁有部分不发荧光。分裂期细胞在染色体以外显示颗粒荧光，而染色体不发荧光。在灵长类肝组织切片上，肝细胞核及部分核仁中有细颗粒荧光，但细胞浆不发荧光。与U1 －nRNP 及Sm 抗体荧光模式相比，其在肝组织中荧光要比在HEp－2 细胞中弱得多。在有些细胞（淋巴细胞、巨噬细胞等）中的荧光反应更强。若荧光模式支持抗SS －A 抗体阳性的判断，应采用免疫印迹法或ELISA 法加以确认。

抗SS －A 抗体常见于干燥综合征，也见于系统性红斑狼疮及原发性胆汁性肝硬化，偶见于慢性活动性肝炎。

抗SS －A 的靶抗原有两种蛋白，分子量分别为52000u 和60000u，两者的抗体均可见于干燥综合征和系统性红斑狼疮，但抗52000u 蛋白的抗体仅见于干燥综合征，仅有抗60000u 蛋白的抗体见于系统性红斑狼疮。此外，抗SS －A 抗体在新生儿红斑狼疮的阳性率几乎为100％，它会经胎盘进入胎儿引起炎性反应。

八、抗SS －B 抗体测定

抗SS －B（SS －B 代表干燥综合征抗原B）抗体的靶抗原是一种磷酸化蛋白，分子

量为48000u，90％存在于细胞核中，作为RNA 多聚酶III的辅助蛋白。该酶合成低分子量的RNA。在转录过程中，SS－B 附着在所合成的RNA 分子上，随后释放出来。抗SS－B 抗体也称为La 抗体，是最初被发现携带此抗体的患者名字的前两个字母（La）命名的。

在HEp－2 细胞抗原基片上的分裂间期细胞核中，抗SS－B 抗体产生细颗粒荧光模式，核仁有部分不发荧光。分裂期细胞显示染色体以外颗粒性荧光，而染色体不发荧光。在灵长类肝组织切片中，部分核仁呈细颗粒荧光，细胞浆不发荧光。与抗U1－nRNP 及Sm 抗体相比，抗SS－B 抗体在肝组织印片的荧光强度比在HEp－2 细胞中要弱得多。在有些细胞（淋巴细胞、巨噬细胞）中反应更强。抗SS－A 和抗SS－B 抗体的荧光模式几乎相同。若荧光模式支持抗SS－B 抗体阳性的判断，应采用免疫印迹法或ELISA 法加以确认。

抗SS－B 抗体几乎仅在女性患者（男女性之比为29∶1）中发现，见于干燥综合征以及系统性红斑狼疮患者。在干燥综合征中，抗SS－A 抗体和抗SS－B 抗体几乎总是同时出现。

九、抗原纤维蛋白抗体测定

抗原纤维蛋白抗体也称为抗U3－nRNP 抗体，其抗原是分子量为34000u 的基质蛋白。使用电子显微镜可以观察到这种蛋白位于核仁的原纤维结构上。它是核糖核蛋白颗粒U3－nRNP 的组分，而U3－nRNP 除了原纤维蛋白外，还含有另外5 种蛋白和1 个富含尿苷的RNA 分子（U3－nRNA）。这种复合体可能参与前核糖体RNA 向核糖体RNA 的转化。

在HEp－2 细胞抗原基片上，分裂间期细胞核仁呈现颗粒荧光。与抗PM－Scl 抗体相比，当没有其他抗体存在时，其核浆不发荧光。分裂期细胞则显示为染色体周围的环形荧光。

到目前为止，抗原纤维蛋白抗体仅见于进行性系统性硬化症（硬皮病）。

十、抗RNA 聚合酶I 抗体测定

抗RNA 聚合酶I 抗体的靶抗原是一种核仁酶复合体，至少由13 种蛋白亚单位组成，这些蛋白亚单位分子量介于12500～210000u 之间。

在HEp－2 细胞抗原基片上，抗RNA 聚合酶I 抗体在核仁区产生颗粒荧光，核浆几乎不发荧光。在分裂期细胞，浓缩的染色体周围区不发荧光，染色体以外可观测到细颗粒甚至光滑型荧光。有时，在分裂期细胞可见一点或多点荧光，这些部位相当于核仁形成中心。

抗RNA 聚合酶I 至今仅见于进行性系统性硬化症 (硬皮病) 。

十一、抗PM —Scl 抗体测定

抗PM —Scl 抗体也称为抗PM —1 抗体，其靶抗原由16 条多肽亚单位构成，它们的分子量介于20000 ～110000u 之间，主要位于核仁，功能尚未明确。在免疫印迹试验中，其抗体仅对分子量为80000u 和100000u 的两条蛋白带染色。

在HEp —2 细胞抗原基片上核仁呈现均质荧光，同时，在核浆中也可以同时观察到弱的细颗粒荧光。分裂期细胞浓缩的染色体无荧光，而染色体以外可以观察到细颗粒荧光。在肝组织切片上可观察到核仁呈现均质荧光，以及细胞核呈现弱的细颗粒或网状荧光。

抗PM —Scl 抗体可见于重叠综合征，临床表现为多发性肌炎、皮肌炎以及进行性系统性硬化症的综合症状。

十二、抗着丝点抗体测定

抗着丝点抗体也称为抗动粒抗体。其靶抗原为着丝点的3 种不同蛋白质，主要为着丝点蛋白B 、着丝点蛋白A 和着丝点蛋白C 。

在HEp —2 细胞抗原基片上的荧光特点为细胞核产生的大小相同的细颗粒荧光。分裂间期细胞的荧光颗粒均匀地分布于整个细胞核。而分裂期细胞核荧光根据细胞分裂阶段而定，在分裂中期，细胞核荧光以带状形式出现在细胞中间位置；分裂后期，细胞核荧光则以两条靠近中心粒的平行带形式出现。在灵长类的肝组织切片中，可观察到有10 ～20 个颗粒分布于细胞核，分裂期细胞少见。与HEp —2 细胞抗原相比，肝组织切片上抗着丝点抗体的荧光相当弱，易被忽略。

由于抗着丝点抗体在进行性系统性硬化症局限型患者中特异性较高，阳性率达80 %～95 %，因此，对进行性系统性硬化症局限型有确诊意义。

进行性系统性硬化症 (又称系统性硬皮病) 可以表现为局限型和弥漫型，临床难以区分，需要通过抗着丝点抗体检测来鉴别。进行性系统性硬化症局限型患者为选择性肢体受累，而内脏很少受累；进行性系统性硬化症弥漫型患者始发于四肢或躯干，内脏严重受累，病情进展迅速，预后不良。

十三、抗Scl —70 抗体测定

抗Scl —70 抗体的靶抗原为DNA 拓扑异构酶I ，该酶的分子量为100000u ，最初在免疫印迹实验中仅发现其分子量为70000u 的降解物。DNA 拓扑酶I 位于核浆，在核仁中的含量更高。它在DNA 双链的复制和转录中起作用：将其中一股DNA 链的将要被拷贝

区域的起始位置切开，并附着在产生的自由端上（无须整个DNA 分子全部解螺旋），一旦该区域复制或转录完成，其DNA 双链就重新结合，恢复双螺旋结构，拓扑异构酶I 释放。

在HEp－2 细胞抗原基片上的荧光模式为：在分裂间期细胞中细胞核呈现几乎完全均质的荧光，核仁荧光加强而且也呈均质状，细胞浆不发荧光；在分裂期细胞中仅在浓缩的染色体区可以见到荧光。

若荧光模式支持抗Scl－70 抗体阳性的判断，应采用免疫印迹法或ELISA 法检测加以确认。

进行性系统性硬化症弥散型患者抗Scl－70 抗体可阳性，局限型患者此抗体阴性。

十四、抗增殖性细胞核抗原抗体测定

抗增殖性细胞核抗原抗体的靶抗原为增殖性细胞核抗原（proliferating cells nuclear－antigen，PCNA），系DNA 多聚酶8 的一种辅助蛋白，它可能在控制细胞周期中起关键作用，其含量在G_1 期增加，一旦超过某一阈值，DNA 合成就开始，在G_2 期含量下降至基础水平。

在HEp－2 细胞抗原基片上的阳性荧光模式：分裂间期细胞半数细胞核显示一种明亮的细颗粒状荧光，核仁无荧光；另半数细胞荧光模式与之相同，但是荧光强度仅为其1/10 左右。分裂期细胞中，浓缩的染色体区域不发荧光，而染色体周围区域也显示一种细颗粒荧光，其模式和强度与荧光较弱的分裂间期细胞相似。

在灵长类肝组织中，几乎所有的细胞核显示仅1～5 个细小荧光颗粒，而且这些荧光颗粒在放大1000 倍时才清晰可见。当400 倍放大时，每一个视野中仅见一个细胞呈现致密的荧光颗粒，鼠肝细胞的细胞核常不发荧光。

抗PCNA 抗体为系统性红斑狼疮的特异性抗体，但检出阳性率仅3％。

十五、其他抗细胞核成分的自身抗体测定

以下描述一些在HEp－2 细胞的抗原基片上有确定免疫荧光模式，而其诊断价值正在进一步探讨之中的抗细胞核成分的自身抗体。

（1）抗RNA 抗体：抗RNA 抗体在系统性红斑狼疮患者中的阳性率为50％，但特异性不高，有时也见于进行性系统性硬化症患者。抗RNA 抗体与抗ssDNA 抗体有交叉反应。抗4－6－s－RNA 抗体可引起核仁的均质染色。

（2）抗7－2－RNP（To）抗体：其靶抗原为核糖核蛋白颗粒，由1 个7－2－RNA 分子和7 种以上的不同蛋白质组成，其中有一种40000u 的蛋白载有抗原决定簇。7－2－RNA 通过RNA 聚合酶III合成，SS－B 为该酶的辅助蛋白，因此，7－2－RNP 暂时与SS

—B 相连。在核仁的7 —2 —RNP 的相应位置呈匀质荧光。有时此抗体可见于进行性系统性硬化症（局限型及弥散型）中。

3）抗NOR —90 抗体：其靶抗原为一种90000u 的蛋白质，该蛋白质与核仁形成中心有关。不同于抗RNA 多聚酶I 抗体（该抗体有时也与核仁形成中心反应）。其荧光模式为：分裂中期细胞核仁区显示一个或几个小点。抗NOR —90 抗体偶见于进行性系统性硬化症。

4）抗核点型抗体：其靶抗原为一种分子量为100000u 的蛋白质。荧光模式为在分裂间期细胞出现5 个至20 余个碎片样的颗粒荧光，大小不同且分布在整个细胞核，而细胞浆无荧光；分裂期细胞中染色体以外的区域有一些散在的颗粒荧光、而染色体无荧光。抗核点型抗体见于原发性胆汁性肝硬化，常与抗线粒体抗体同时出现。大鼠器官的冰冻切片无法测到这类抗体。这些抗体也见于进行性系统性硬化症、系统性红斑狼疮及重叠综合征。

5）抗Ku 抗体：其靶抗原为66000u 及86000u 两种核蛋白，它们以二聚体存在且结合于dsDNA 的自由端。这些抗体在细胞核中呈现部分细颗粒及部分网状荧光。抗Ku 抗体见于系统性红斑狼疮，阳性率为10 %。

6）抗Mi —1 及Mi —2 抗体：靶抗原Mi —1 为75000u 蛋白（也有报道为150000u），与IgG 有关，荧光模式不定。靶抗原Mi —2 为分子量从30 ～220000u 的5 种蛋白，细胞核荧光表现为细颗粒模式。抗Mi —1 抗体及抗Mi —2 抗体可见于皮肌炎。

7）抗板层素抗体：板层素包括数种蛋白质，分子量分别为60000u、68000u 及74000u。它们与中间丝相关，以网络的形式包被在核内膜的内侧。该抗体阳性时，在核膜区呈现线状荧光。抗板层素抗体有时可见于自身免疫性慢性活动性肝炎的活动期。

十六、抗细胞质成分的自身抗体测定

用HEp —2 细胞和灵长类动物的肝组织切片的抗原基片进行免疫荧光试验检测抗细胞核成分的抗体时，还能经常发现一些细胞质抗原。但由于它们的荧光模式特征性没有前者明显，所以并非总能将阳性标本进一步区分开。仅少数抗细胞浆成分抗体已明确与某一特定疾病相关。以下描述一些在HEp —2 细胞的抗原基片上常见的抗细胞质成分的自身抗体，它们分别对应于各自抗原所在的细胞器。

1）抗线粒体抗体：使用HEp —2 细胞可显示4 种类型的抗线粒体抗体（AMA），即：抗M_2、M_3、M_5 及M_9 抗原的抗体。若细胞浆中呈现清晰的粗颗粒荧光表明这些抗体的存在。抗M_2 抗原的抗体可见于95 %的原发性胆汁性肝硬化患者中。然而，其他特异性抗体也可以产生相似的荧光模式。因此，待测标本在HEp —2 细胞抗原基片上呈阳性反应时，还应用冰冻肾切片（大鼠或小鼠）进行验证或使用可区分抗线粒体抗体亚型

的ELISA 法进一步作AMA 分型。

(2) 抗核糖体抗体：该抗体能使细胞质中呈现一种细颗粒、非常致密的荧光。可见于系统性红斑狼疮。

(3) 抗高尔基体抗体：可在分裂间期细胞中见到细胞核的一侧有网状的颗粒状荧光便是该抗体阳性；分裂期细胞的高尔基体大部分已经降解，故荧光减弱或缺如。此抗体偶见于系统性红斑狼疮及干燥综合征。

(4) 抗溶酶体抗体：表现为细胞浆中精细的、中等大小的以及粗的滴状荧光颗粒。其临床价值至今未明，有时可见于健康人中。

(5) 抗Jo -1 抗体：该抗体可使间期细胞的整个细胞浆产生一种颗粒到细块状荧光。有时，细胞核也显示细颗粒荧光，但不很明显。在分裂期细胞，浓缩的染色体区不发荧光，染色体周围的细颗粒荧光显得更致密。当使用肝组织切片抗原时，仅可在细胞浆中观察到弱的荧光，但无诊断价值。已发现Jo -1 抗原为组氨酰-tRNA 合成酶，该酶是分子量为50000u 的细胞浆磷蛋白，能将细胞浆中的组氨酸连接到相应的tRNA 上。Jo -1 抗体不与变性组氨酰-tRNA 合成酶反应或仅起微弱反应，因此，不能用免疫印迹试验鉴定该抗体。抗Jo -1 抗体见于多发性肌炎 (有间质性肺纤维化)。如果用HEp -2 细胞作抗原进行测定时看不到典型的荧光表现，则可以认为抗Jo -1 抗体不存在。然而，免疫荧光法仅提供了抗体存在的可能性，对荧光模式阳性的标本应使用ELISA 法测定加以确认。

(6) 抗肌动蛋白抗体：该抗体阳性血清标本会在HEp -2 细胞或肝细胞的细胞质中观察到单个、有时无数个束状纤维结构跨过细胞核的荧光模式。在某种程度上，它与抗平滑肌抗体相应，然而后者需用啮齿类动物的胃组织作抗原进行荧光免疫组化技术的间接法可能更为可靠。抗肌动蛋白抗体与自身免疫性肝炎的慢性活动期有关。

(7) 抗波形蛋白 (vimentin) 抗体：这是很常见的自身抗体。它在细胞质中产生细的纤维状网格荧光，靠近细胞核区尤其致密。在分裂期细胞，染色体不发荧光，在其周围可观察到无数圆形的荧光点。对于其诊断价值所知甚少。

(8) 抗PL -7 (苏氨酰-tRNA 合成酶) 抗体、抗PL -12 (丙氨酰-tRNA 合成酶) 抗体、抗OJ (异亮氨酰-tRNA 合成酶) 抗体及抗EJ (甘氨酰-tRNA 合成酶) 抗体：它们在细胞浆中呈现细小颗粒甚至均质型荧光，这些抗体可见于多发性肌炎，但非常罕见。

(9) 抗信号识别粒子抗体：在多发性肌炎中发现的另外一种罕见的抗体，主要表现为细胞质荧光。该抗体的临床意义尚不清楚。

十七、抗有丝分裂相关抗原的自身抗体测定

采用HEp -2 细胞的抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法中，若存在抗有丝分

裂结构抗体，会在荧光显微镜下出现特征性图像。这些抗体的临床价值尚在研究中，目前认为很可能与进行性系统性硬化症有关。

(1) 抗中心粒抗体：在细胞核外可见一或两个荧光点，分裂期细胞中荧光点位于细胞的纵向相对两极。

(2) 抗纺锤体纤维抗体：有些患者血清可存在抗纺锤体纤维抗体。纺锤体纤维荧光仅见于分裂期细胞，分裂间期细胞可见弱的细小颗粒型荧光，但核仁和染色体都不发荧光。用肝组织切片作抗原不能检出此抗体，且细胞核的细颗粒荧光也比HEp－2细胞弱，核仁也不发荧光。在有丝分裂期，纺锤体纤维从中心粒呈放射状向各方向生长，主要集中在细胞的中间水平方向上。有些附着在染色单体的着丝粒上，在分裂后期拉向各自的中心粒。大部分纺锤体纤维并不与染色体接触，而是与对面的纺锤体纤维相遇。细胞分裂为子细胞产生重叠区（“分离带”）。在有抗分离带（中心体，MSA－2）抗体存在时，分裂中期的细胞在中间水平产生细颗粒荧光。与抗着丝点抗体的荧光模式相比，此荧光线在细胞分裂结束前始终保持在中间位置，其长度与分裂带的宽度一致，随细胞分裂至末期逐渐变短，直到一个小的荧光点把子细胞联在一起。半数分裂间期细胞含有大量的粗荧光点，其余的细胞不发荧光。其靶抗原为在重叠的纺锤体纤维中起排斥作用的具有ATP酶活性的蛋白质。

(3) 抗染色体相关抗原抗体：在分裂期细胞中，紧靠染色体的边缘呈现颗粒荧光，而染色体不发荧光（易与抗着丝点抗体的荧光模式相混同），在细胞周围可见光滑、明亮的荧光，部分分裂间期细胞的核可产生一种细的、弱到较强的颗粒荧光。

十八、抗心磷脂抗体测定

抗心磷脂抗体（anticardiac phospholipid antibody，ACA）是以心磷脂为靶抗原的自身抗体。磷脂是构成细胞膜的主要成分，其中心磷脂最重要。ACA与血栓形成、血小板减少、反复自然流产、系统性红斑狼疮及心脑血管缺血等疾病有密切关系。

第二节　器官/组织特异性自身抗体测定

一、类风湿因子测定

详见本篇第三章第三节中类风湿因子含量测定。

二、抗胰岛自身抗体测定

㈠ 抗胰岛素自身抗体测定

【原理】

ELISA 法：待检标本若存在抗胰岛素自身抗体 （nsulin autoantibody，IAA），即与包被于反应板微孔上的人胰岛素结合而被固定，随后又与加入的酶标记抗人IgG 抗体结合，通过底物显色而检出。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括人胰岛素包被反应板、酶标记抗人IgG 抗体和其他ELISA 试剂等。

【操作】

按ELISA 间接法操作要求，具体参照试剂说明书。

【参考值】

正常为阴性。

【注意事项】

这是一个定性的筛查手段，仅IAA 阳性不能作为1 型糖尿病的诊断依据。与抗谷氨酸脱羧酶自身抗体和抗胰岛细胞自身抗体联合检测能提高诊断效果。

㈡ 抗谷氨酸脱羧酶自身抗体测定

谷氨酸脱羧酶存在于人的胰岛细胞和脑细胞内。1 型糖尿病涉及胰岛β细胞损害的自身免疫性反应，故可在临床发病前期发现抗谷氨酸脱羧酶自身抗体 glutamic acid de－carboxy －lase autoantibody，GAD 抗体）。测定GAD 抗体的方法有RIA 法和ELISA 法等。

【原理】

ELISA 法：待检标本若存在抗GAD 抗体，即与包被于反应板微孔上的谷氨酸脱羧酶结合而被固定，随后又与加入的酶标记抗人IgG 抗体结合，通过底物显色而检出。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括GAD 包被反应板、标记抗人IgG 抗体和其他ELISA 试剂。

【操作】

按ELISA 间接法操作要求，具体参照试剂说明书。

【参考值】

正常人为阴性。

㈢ 抗胰岛细胞自身抗体测定

抗胰岛细胞自身抗体（islet cell autoantibody，ICA）于1型糖尿病临床症状出现前8年就能检出，故可作为早期诊断的重要手段。检测ICA的方法有采用灵长类或啮齿类动物胰腺切片为抗原基片的荧光免疫组化技术及ELISA间接法。

【原理】

ELISA间接法：待检标本若存在ICA，即与包被于反应板微孔上的高度纯化的胰腺抗原结合而被固定，随后又与加入的酶标记抗人IgG抗体结合，通过底物显色而检出。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括纯化胰腺抗原包被的反应板、酶标记抗人IgG抗体和其他ELISA试剂。

【操作】

按ELISA间接法操作要求，具体参照试剂说明书。

【参考值】

正常为阴性。

三、抗甲状腺自身抗体测定

㈠ 抗甲状腺过氧化物酶抗体测定

甲状腺过氧化物酶（thyroid peroxidase，TPO）是甲状腺微粒体（thyromicrosomal，TM）的主要有效成分，即甲状腺激素合成中的关键酶，参与碘的氧化、酪氨酸残基碘化及碘化酪氨酸的连接。它也是甲状腺特有的蛋白，因此，抗甲状腺过氧化物酶抗体（anti-thyroid peroxidaseantibody，TPOAb）是针对甲状腺的特异性自身抗体。鉴于抗甲状腺微粒体抗体（anti-thyromicrosomal antibody，TMAb）测定中使用的抗原不纯、会出现假阳性结果，目前一些实验室都已用TPOAb代替TMAb。测定TPOAb的方法主要有荧光酶免疫测定、酶免疫技术、放射免疫技术和免疫荧光组化技术等。现以酶免疫技术为例介绍如下。

【原理】

ELISA间接法：待检标本若存在TPOAb，即与包被于反应板微孔上的TPO结合而被固定，随后又与加入的酶标记抗人IgG抗体结合，通过底物显色而检出。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括纯化甲状腺TPO抗原包被的反应板、酶标记的抗人Ig抗体和其他ELISA试剂。

【操作】

按ELISA 间接法操作要求，具体参照试剂说明书。

【参考值】

<0.（<20 %）。

【临床意义】

TPOAb 与Graves 病（又称毒性弥漫甲状腺肿或突眼性甲状腺肿）、桥本甲状腺炎和原发性黏液性水肿有关。

【注意事项】

在采用灵长类动物甲状腺组织切片为基质的间接免疫荧光试验中，TPOAb 在滤泡上皮细胞的胞浆中呈现颗粒型荧光。

（二）抗甲状腺球蛋白抗体测定

甲状腺球蛋白（thyroglobulin，TG）作为甲状腺激素的储存形式，主要存在于甲状腺内。抗甲状腺球蛋白抗体（anti－thyroglobulin antibody，TGAb）的测定原理和方法及临床意义与TPOAb 类似。在灵长类甲状腺切片为基质的荧光免疫组化技术的间接法中，TGAb 在甲状腺滤泡腔内呈网状的荧光，若仅个别滤泡腔内胶质有荧光仍为阴性。

【参考值】

ELISA 法：<0.3（<30 %）。

荧光免疫组化：阴性。

【临床意义】

TGAb 主要见于以上自身免疫性甲状腺疾病以及糖尿病、慢性肾上腺功能减退、恶性贫血，也可见于甲状腺癌和非毒性甲状腺肿。

（三）抗促甲状腺素受体抗体测定

抗促甲状腺素受体抗体（TRAb）也常见于自身免疫功能紊乱导致的甲状腺病，其中有些是阻滞抗体，能抑制TSH 的作用；有些则促进甲状腺生长，不影响其功能；还有些能使受体活化，引起甲状腺功能亢进。目前主要的测定方法是ELISA 法。试剂和操作详见试剂说明书。

四、抗肾小球基底膜抗体测定

肾小球基底膜主要由内皮细胞层构成，其组分有IV 型胶原、板层素、蛋白多糖和肌纤维蛋白等，每个IV 型胶原分子有3 个α链亚单位，肺肾综合征抗原位于α_3 链的NC_1 区、为29000u 的蛋白。抗肾小球基底膜抗体也称为Goodpasture 抗体，一般采用以

灵长类的肾组织冰冻切片为基质的间接荧光免疫试验检测。原理、试剂和操作参见本章第七节的荧光免疫组化技术的间接法。其阳性的荧光模式为在肾小球基底膜呈现锐利的连续的荧光。

【参考值】

正常为阴性。

【临床意义】

在典型的活动性抗肾小球基底膜病变（Goodpasture 综合征）患者中，该抗体几乎均阳性。临床缓解后大约1 年内血清抗体仍会维持较高效价，以后缓慢下降。肾移植最好在该抗体转阴后进行，以免复发。肺肾综合征和急性肾小球肾炎患者中该抗体的阳性率仅为15 %～20 %，抗肾小球基底膜抗体阳性的患者往往预后较差。

【注意事项】

荧光免疫组化技术的间接法有时难以鉴别非特异性荧光或难以检出低水平的循环抗体，此时可选用优质的ELISA 体外诊断试剂进行测定。

五、与生育有关的自身抗体测定

不孕是当前生殖医学研究的一个热点，其中相当一部分患者的病理机制与其体内的自身抗体密切相关。研究证实一些原因不明的流产多数与免疫因素有关。与生育有关自身抗体包括抗精子抗体、抗子宫内膜抗体、抗卵巢抗体和抗滋养细胞膜抗原的抗体等，其测定一般采用以相应抗原片为基质的荧光免疫组化技术的间接法。其检测原理、试剂和操作参见本篇第一章第七节有关内容以及各自的试剂说明书。

（一）抗精子抗体测定

男性体内的血睾屏障可使精子与免疫系统隔离，但当此种屏障因创伤而受损时，精子或其可溶性抗原逸出，可导致机体产生抗精子抗体（Anti－sperm antibody，ASA），从而抑制精子产生，造成男性不育。女性生殖道有能降解进入的精子抗原的酶系统，此种酶系统的缺陷可使精子抗原保持完整而刺激抗精子抗体产生。大约10 %～30 %原因不明的女性不孕症可能由于ASA 所致。

（二）抗子宫内膜抗体

抗子宫内膜抗体（Anti－Endometrium Antibody，EMA）是子宫内膜异位症患者受到异位内膜组织的刺激，或经血逆流等因素导致免疫应答紊乱而产生的一种自身抗体，其与子宫内膜中靶抗原结合，在补体参与下，引起子宫内膜免疫病理损伤，影响孕卵着床，也容易发生早期流产。

㈢ 抗卵巢抗体

抗卵巢抗体（antiovarian antibody，AOA）最早发现于卵巢早衰、早闭经患者，已证实该病与自身免疫病理反应关系密切，近年来发现AOA的存在可以影响卵巢功能，且有显著的抗生育效应，因此，更引人注目。

㈣ 抗透明带抗体

透明带（zona pellucida，ZP）是围绕在卵细胞周围的一层无结构、嗜酸性的明胶样物质。由于猪的卵细胞透明带与人的卵细胞透明带具有相同的抗原性，故可用作抗原片进行荧光免疫组化技术的间接法染色或提取抗原用于ELISA测定。抗透明带抗体（anti-zona pellucida，AZP）与女性不孕有关。

㈤ 抗滋养细胞膜抗原抗体

对孕妇而言，胎儿相当于是一个半非已的同种异体移植物，胎儿之所以不被排斥，主要依赖于母体对胎儿特殊的免疫调节，以维持新的免疫平衡，若平衡失调可导致流产。胚胎的外层即滋养层是直接与母体循环相接触的部分，滋养层不表达任何HLA或ABO抗原，这是确保胎儿成活的保护性机制之一，但是滋养层浆膜上却存在其他抗原系统，并且可被母体识别。这些抗原无疑影响着孕妇与胎儿之间的免疫平衡。

已证实流产妇女血清中抗滋养细胞膜抗原抗体水平比正常孕妇明显增高，而且这种抗体的增高与流产之间有着密切的联系，很可能就是导致流产的主要因素。正常孕妇血清中这种抗滋养细胞膜抗原抗体的水平很低，当其水平达到一定高的程度，即有可能引起较强的抗原抗体反应，从而导致流产。

六、抗中性粒细胞胞浆自身抗体测定

采用灵长类肝组织切片进行荧光免疫组化技术的间接法时，若见肝血窦内的中性粒细胞胞质内有荧光，而肝细胞胞质内无荧光，提示存在抗中性粒细胞胞质自身抗体（anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody，ANCA）。此时应选择以中性粒细胞为抗原基片的荧光免疫组化技术的间接法（有市售成套试剂），来确定此抗体是胞质型（cANCA，主要是抗蛋白酶3抗体）还是核周型（pANCA，系抗髓过氧化物酶抗体），或者直接用ELISA试剂测定抗蛋白酶3抗体（anti-proteinas 3 antibody，APR3）和抗髓过氧化物酶抗体（anti-myeloperoxidaseantibodies，AMPO）。现以荧光免疫组化技术的间接法为例介绍如下。

【原理】

以中性粒细胞为抗原基片与稀释的待测血清反应，若血清中存在针对其胞浆成分的

抗体，在加入荧光标记的抗人Ig 抗体后，可在荧光显微镜下观察到特征性的荧光模式。

【试剂】

1） 中性粒细胞抗原基片。

2） 异硫氰酸荧光素（FITC） 标记的抗人IgG 抗体。

3） 0.01mol/L、pH7.2 的磷酸盐缓冲液。

4） 质控物：阴性和阳性对照品。

【操作】

按荧光免疫组化技术的间接法操作，具体参照试剂说明书。

【结果判定】

ANCA 的荧光阳性模式有两种：中性粒细胞胞质呈均一弥漫型荧光者为cANCA；中性粒细胞核周部分胞质呈荧光者为pANCA。

【参考值】

正常为阴性。

【临床意义】

cANCA 主要见于韦格纳（Wegener's） 肉芽肿（约占80%～95%），是活动性韦格纳肉芽肿和多发性微动脉炎的特异而敏感的指标。而pANCA 阳性患者中韦格纳肉芽肿仅占5%～20%，多发性微动脉炎却占49%～80%。ANCA 阳性的多发性微动脉炎通常与肾小球肾炎和/或肺毛细血管炎相关。ANCA 还出现于变应性肉芽肿性脉管炎（Churg－Strauss 综合征）、炎症性肠病、自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎和自身免疫性疾病如类风湿关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合征、多发性肌炎和皮肌炎等。

【注意事项】

抗原基片上的白细胞应均匀一致、不成堆重叠，用冷乙醇固定较佳，它增加细胞膜通透性，使带正电荷的MPO 游离出来，AMPO 就会形成环核型的pANCA。若用甲醛或多聚甲醛固定则MPO 等蛋白质被固定在嗜天青颗粒内，不利于观察。每次检测或每张玻片上均应有阴性对照、cANCA 和pANCA 的阳性对照。应由两位受过培训的医师或技师在双盲条件下读片以避免主观因素。应在低倍镜下判断是否阳性，再在高倍镜下观察形态并判断cANCA 或pANCA。当ANA 高效价时，ANCA 和ANA 较难区分，应注意鉴别。目前认为荧光免疫组化技术的间接法是ANCA 抗体筛查的可靠方法，其进一步确认可采用ELISA 试剂测定APR3 和AMPO。

七、其他自身抗体测定

1．涉及自身免疫性肝炎的自身抗体测定

涉及自身免疫性肝炎的自身抗体主要有抗肝肾微粒体（liver－kidney microsomes，

LKM）抗体、抗肝细胞膜抗原（liver membrane antigen，LMA）抗体、抗可溶性肝抗原（soluble liverantigen，SLA）抗体、抗肝特异性蛋白（liver special protein，LSP）抗体和抗平滑肌抗体（anti－smooth muscle antibody，ASMA）等。一般采用灵长类肝、肾、睾丸组织抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法。

已知有3 种荧光模式：抗LKM－1 抗体的荧光模式为肝细胞浆呈细颗粒状或均质状明显荧光，其抗原为细胞色素P450 IID6；抗LKM－2 抗体的荧光模式为门静脉周围的肝组织呈较强的荧光、小部分（近端）肾小管有荧光，其抗原为细胞色素P450 同工酶，系药物替尼酸结合部位，该抗体可由此药引起；抗LKM－3 抗体的荧光模式为肝肾组织均阴性，灵长类睾丸间质细胞有荧光，其抗原为UDP－葡萄糖醛酸基转移酶。

自身免疫性肝炎至少可分为3 型：狼疮性肝炎（Ⅰ型）以出现ANA、ASMA、LMA 为特征；Ⅱ型以出现抗LKM 抗体为特征；Ⅲ型以出现抗可溶性肝抗原抗体为特征。虽然部分丙型肝炎也有抗LKM 抗体出现，但抗体效价比自身免疫性肝炎低。

2．抗血小板自身抗体测定

抗血小板自身抗体有血清中游离的和与患者血小板结合的两类，前者可采用以血小板为基片的荧光免疫组化技术的间接法测定，并可获得自身抗体的Ig 类以及针对何种血小板亚结构的信息；后一种抗体需用患者的血小板测定，可以采用ELISA 法或荧光免疫组化技术的间接法。抗血小板自身抗体测定主要用于特发性血小板减少症的诊断。

3．抗肾上腺皮质抗体测定

抗肾上腺皮质抗体的靶抗原主要有21－羟化酶（为肾上腺特异性的）、细胞色素P450 侧链分裂酶（存在肾上腺、性腺及胎盘）和17－α－羟化酶（存在肾上腺及性腺）。后两种抗体会导致与抗类固醇细胞抗体的交叉反应。若采用灵长类肾上腺冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，抗肾上腺皮质抗体的阳性荧光模式为肾上腺皮质类固醇激素分泌细胞的胞质呈细颗粒至均质型荧光，皮质的球状带荧光较多，束状带也有荧光，但髓质无荧光；若所有细胞核或细胞质都有荧光则提示存在抗核抗体和抗线粒体抗体等其他细胞抗原的抗体。

大约36％～80％的原发性肾上腺皮质功能不全患者肾上腺皮质抗体阳性。出现此种自身抗体可作为肾上腺皮质功能减退的信号。肾上腺皮质抗体常与抗类固醇细胞抗体同时出现，这可能是患者伴有性腺功能衰竭的主要原因。

4．抗胃壁细胞抗体测定

系以胃黏膜壁细胞内H^+/K^+ATP 酶（质子泵）为靶抗原的自身抗体。若采用灵长类或小鼠的胃组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法检测，其阳性的荧光模式为胃黏膜壁细胞的胞质呈颗粒状或网状荧光，其他部位无荧光。

恶性贫血患者几乎均可测得此抗体，另外在Grave’s 病、桥本甲状腺炎和1 型糖尿病的患者血清中也可发现此抗体。

5．抗小肠杯状细胞抗体测定

系以小肠黏膜上皮层杯状细胞为抗原的自身抗体。若采用灵长类肠组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为小肠黏膜上皮层杯状细胞胞质呈致密的、边缘模糊的云雾状荧光。

高效价的抗小肠杯状细胞抗体主要见于溃疡性结肠炎，亦可见于Crohn 病。若在上述炎症性肠病患者的近亲中检得此抗体，可预示今后患病的可能。若与ANCA 同时测定可将诊断溃疡性结肠炎的准确率提高至72 %。

6．抗胰腺腺泡抗体测定

抗胰腺腺泡抗体的靶抗原可能为胰腺腺泡细胞的微粒体。若采用灵长类胰腺组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为胰腺外分泌细胞胞质呈滴状或网状颗粒荧光。

高效价的抗胰腺腺泡抗体主要见于Crohn 病，抗体以IgG_1 亚类为主。若与ANCA 同时测定可将诊断准确率提高至42 %。

7．抗桥粒抗体测定

抗桥粒抗体也可称为天疱疮抗体、抗表皮细胞间质抗体、抗角质细胞表面抗体或抗鳞状上皮细胞表面抗体等。其靶抗原为桥粒（desmosome），是分子量130000u 及160000u 的糖蛋白。若采用灵长类食管及舌组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为整个上皮棘层细胞间质区呈颗粒状和网状强阳性荧光。

抗桥粒抗体是天疱疮的特异性标志抗体，天疱疮是表皮角质细胞间粘连障碍性慢性自身免疫性疾病。

烧伤、系统性红斑狼疮和重症肌无力患者亦会出现阳性荧光模式。

8．抗表皮基底膜抗体测定

抗表皮基底膜抗体也称为类天疱疮抗体，其靶抗原为位于细胞内半桥粒板上的跨膜蛋白。测定方法同抗桥粒抗体。其阳性的荧光模式为表皮基底层与结缔组织间的细线型荧光。大约70 %的活动性大疱性类天疱疮患者的血清中可测得此抗体，在获得性大疱性系统性红斑狼疮患者中亦可检得。

9．抗骨骼肌抗体测定

抗骨骼肌抗体也称为抗横纹肌抗体，其靶抗原为肌动蛋白、α辅肌动蛋白、肌球蛋白、连接素以及肌浆网钙释放通道肌动蛋白。若采用灵长类骨骼肌组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为骨骼肌纤维有典型的横纹

荧光。此抗体见于年龄较大的重症肌无力患者及成年发病的重症肌无力患者，较少见于20 岁以下的发病者。重症肌无力合并胸腺瘤患者该抗体均为阳性。该抗体有时见于合并类瘤性神经病变的原发性肺癌患者。该抗体还用于骨髓移植后自身免疫反应的监测。

10．抗心肌抗体测定

抗心肌抗体也称为抗肌纤维膜抗体或抗纤丝抗体，其靶抗原为心肌线粒体膜中的腺嘌呤核苷酸易位蛋白和心肌浆球蛋白。若采用未固定的灵长类心肌组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式有多种，可表现为类似于抗骨骼肌抗体的荧光，或在心肌润盘处的平滑荧光。血清中出现此抗体见于心肌炎、特发性扩张性心肌病、风湿热、风湿性心脏病、心肌梗死综合征及重症肌无力等患者。该抗体还可采用ELISA 法进行定量测定。

11．抗肌内膜抗体测定

抗肌内膜抗体是在麸质过敏性肠病中出现的自身抗体，其靶抗原可能与胶原相关抗原有关。若采用灵长类小肠或食管组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为小肠的绒毛组织和腺管可见荧光，肌层呈蜂窝状荧光，黏膜下血管内皮有荧光，食管的黏膜上皮层下可见大片平滑肌有荧光，黏膜上皮层却无荧光。IgA 类的抗肌内膜抗体见于活动性麸质过敏性肠病和疱疹性皮炎，此类患者若IgA 缺陷，则IgG 类抗体阳性。此抗体在诊断上述疾病中的特异性高于抗麦胶蛋白抗体和抗网硬蛋白抗体，故国际上推荐采用此抗体作为疑似患者的首选检查项目。

12．抗唾液腺导管抗体测定

抗唾液腺导管抗体主要是在干燥综合征中出现的自身抗体，其靶抗原为唾液腺腺管上皮细胞胞质抗原 (可能与细胞角质蛋白有关)。若采用灵长类腮腺组织冰冻切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为腮腺腺管上皮细胞质细颗粒状或均质的荧光；若为SS －A 和/或SS －B 抗体阳性者则可见到较大的荧光颗粒。

13．抗丝集蛋白抗体测定

抗丝集蛋白抗体即抗角蛋白抗体，也称抗大鼠食管抗体或抗角质层抗体等。其靶抗原为丝集蛋白，而非角质蛋白。若采用大鼠食管中段1/3 处的冰冻组织切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，典型的荧光模式为只限于上皮角质层的、线性分层的、较强的均质荧光。此抗体主要见于类风湿关节炎患者，某些类风湿因子阴性的类风湿关节炎患者也可见到较高效价的该抗体。其他风湿病很少见到该抗体。

14．抗内皮细胞抗体测定

抗内皮细胞抗体确切的靶抗原尚未明了。若采用灵长类肺组织冰冻切片和培养的人脐静脉内皮细胞为抗原基片，进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性荧光模式为

肺组织切片的血管内皮呈特征性荧光，人脐静脉内皮细胞的细胞呈颗粒状荧光。许多疾病会出现该抗体，尤其是血管炎。此抗体的效价与自身免疫性系统性血管炎（Wegener肉芽肿、微动脉炎和Kawasaki病）的活动性有关。血清中出现抗内皮细胞抗体往往提示系统性红斑狼疮患者有肾脏受累，严重的硬皮病患者有外周血管闭塞，皮肌炎患者有肺部并发症，以及类风湿关节炎患者有血管炎。

15．抗普肯耶细胞抗体测定

抗普肯耶细胞抗体又称Yo抗体，其靶抗原为分子量34000u和62000u的两种蛋白，它们不仅存在于普肯耶细胞，还存在于其他神经元中。若采用灵长类小脑冰冻组织切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性的荧光模式为小脑组织普肯耶细胞的细胞质呈粗颗粒状荧光。抗普肯耶细胞抗体对于诊断类瘤性小脑变性合并卵巢和乳腺癌具有高度特异性。此抗体阳性几乎仅见于女性，若检得此抗体应进行彻底的盆腔和乳腺检查。肿瘤去除后该抗体会逐渐降低直至消失。

16．抗神经元核抗体测定

抗神经元核抗体的靶抗原有两个：Hu抗原为分子量35000～40000u的一组蛋白，存在于所有神经元中；Ri抗原局限于中枢神经系统的神经元中，与分子量55000u和80000u的两种神经元蛋白相关。若采用灵长类小脑和小肠冰冻组织切片为抗原基片进行荧光免疫组化技术的间接法测定，其阳性的荧光模式为小脑组织中神经元细胞核呈颗粒状荧光，小肠组织中Hu抗体（抗神经元核抗体Ⅰ型）能与肠肌层神经丛细胞核结合产生荧光，而Ri抗体（抗神经元核抗体Ⅱ型）则不产生荧光。Hu抗体比Ri抗体更常见，主要见于类瘤性感觉神经病变和类瘤性脑脊髓炎，也见于小细胞性肺癌、神经细胞瘤、前列腺癌等肿瘤以及肌阵发性痉挛。Ri抗体主要见于大脑、脑干和脊髓功能紊乱，而且还是乳腺癌或小细胞性肺癌的肿瘤标志抗体。

第七章　病原微生物感染的血清学检验

第一节　肝炎病毒感染的血清学检验

一、抗甲型肝炎病毒抗体测定

【原理】

常采用ELISA 架桥法。用抗人μ链捕获待测血清标本中IgM，然后依次与加入的HAV 抗原、酶标记抗HAV 抗体结合成复合物，与待测标本中抗甲型肝炎病毒（HAV）抗体IgM 形成酶标复合物，洗涤后加入底物显色，根据呈色情况判断待测标本中抗HAV 抗体IgM 存在情况。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括HAV 抗原、抗人μ链包被微孔板、辣根过氧化物酶（HRP）标记抗HAV 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

血清抗HAV 抗体IgM 是HAV 急性感染的标志，在感染的早期即已出现，是早期诊断甲型肝炎的依据。感染后3 个月内可维持较高滴度，6 个月后逐渐消失。

二、乙型肝炎病毒表面抗原测定

（一）酶联免疫吸附试验

【原理】

采用ELISA 双抗体夹心法。包被抗乙型肝炎病毒表面抗体（抗HBs 抗体），标本中乙型肝炎表面抗原（HBsAg）与之反应后，再与酶标抗HBs 抗体结合，加底物显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括：抗HBs 抗体包被的微孔板、HRP 标记抗HBs 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

国内目前多采用双位点一步法快速ELISA 试剂盒，检测灵敏度可达0.5～1.0 μg/L。对于少数高浓度标本应注意有可能产生前带现象而漏检。

㈡ 化学发光酶免疫测定技术

【原理】

用微粒子包被抗HBs 抗体，与标本中的HBsAg 结合，再与加入的生物素标记的抗HBs 抗体结合，再加入碱性磷酸酶标记的抗生物素抗体结合成复合物，此复合物经一种玻璃纤维组成的分离载体而达到与游离物质的分离，加入荧光底物4－甲基伞形酮磷酸盐（MUP），MUP 被碱性磷酸酶水解成4－甲基伞形酮和磷酸，在360nm 激发光作用下发出448nm 的荧光，根据荧光强度计算检测结果。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括微粒子包被抗HBs 抗体、生物素标记抗HBs 抗体、碱性磷酸酶标记抗生物素抗体、荧光底物MUP、缓冲液、反应杯、分离载体、校准品、阴性及阳性质控血清等。

【操作】

按化学发光酶免疫测定技术的双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

本法灵敏度可达0.2 μg/L 左右，特别适合于低水平HBsAg 血清标本的检测。

㈢ 斑点金免疫层析试验

【原理】

待测标本中HBsAg 与胶体金标记的抗HBs 抗体特异结合，通过渗滤转移，与固定于载体上某一部位的抗HBs 抗体结合成复合物，胶体金因聚合而呈现红色。

【试剂】

商品化试剂盒为所有试剂一体化检测条或检测板。检测条一般由加样区、测定区、对照区等几部分组成。

【操作】

按斑点金免疫层析试验操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1）对照区包被有抗人IgGFc 抗体，能与胶体金标记抗HBs 抗体特异性结合，出现红色条带，作为检测试剂有效性的证据，每次检测结果判断均须以此为前提。

2）该试验为一种快速床旁试验，可供检测血清、血浆以及全血标本，适合献血员等人群的快速初筛。目前的试剂金灵敏度较前述ELISA 法低，适当延长观察时间有利于提高检测灵敏度。应防止检测条（板）受潮，推荐使用单份独立包装的检测条（板）。

【临床意义】

HBsAg 是乙型肝炎病毒（HBV）的包膜成分，由病毒S 区基因编码。在HBV 急性感染早期出现于患者血循环中，随着疾病恢复，3～4 个月后逐渐消失（阴转）。而在慢性感染患者和无症状携带者可长期存在。HBsAg 是目前诊断HBV 感染最常用的病原学指标，主要有adr、adw、ayr 和ayw4 种血清型，我国以前两者为主。在一部分HBV 感染病例中，HBsAg 可能因水平低于检测灵敏度、表达缺失、病毒S 区变异等原因而无法检出。

【注意事项】

1）对于HBsAg 的检测技术，目前重在提高灵敏度和实施标准化，须重视低浓度HBsAg 标本的检测，同时，必要时作HBsAg 中和试验确认，有利于临床确诊。

2）目前的几类主要检测技术均存在“灰带”现象，对于落在该区域的标本须复检和/或随访。

3）由于检测HBsAg 的方法学存在灵敏度差异，可出现不同定性检测结果，应引起高度注意。

三、抗乙型肝炎病毒表面抗原抗体测定

【原理】

ELISA 双抗原夹心法。微量反应板包被纯化HBsAg，待测血清中抗HBs 抗体与之反应，再加HRP 标记HBsAg 形成HBsAg－抗HBs 抗体－HRP 标记HBsAg 复合物，最后加底物显色。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括HBsAg 包被的微孔板、HRP 标记的HBsAg、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗原夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

目前也采用MEIA 技术定量测定抗HBs 抗体，定量测定的优势在于可动态观察抗HBs 抗体含量消长规律以及对疫苗接种效果进行评价。

【临床意义】

抗HBs 抗体于HBV 感染趋向恢复期时出现，伴随HBsAg 的逐渐消失，抗HBs 抗体出现并逐渐升高，并可持续若干年。抗HBs 抗体为HBV 的中和抗体，有清除HBV、防止再感染的作用。有一部分患者可同时检出HBsAg 和抗HBs 抗体，可能处于恢复期的血清学转换过程，也有可能是S 区基因发生变异（主要见于慢性乙型肝炎患者），须结合临床其他相关资料作出正确判断。接种乙型肝炎病毒疫苗人群抗HBs 抗体常呈阳性，若短期内出现高水平抗HBs 抗体，提示接种效果佳。

四、乙型肝炎病毒e 抗原测定

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：包被抗乙型肝炎病毒e 抗原抗体（抗HBe 抗体），待检标本中乙型肝炎病毒e 抗原（HBeAg）与之反应后，再与酶标抗HBe 抗体结合，加底物显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗HBe 抗体包被的微孔板、RP 标记抗HBe 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

HBeAg 是HBV 的核壳蛋白，为前C／C 区基因编码产物，与HBV 核心抗原有高度同源性，可由细胞分泌至血循环中。一般认为HBeAg 阳性提示病毒复制活跃，是具有传染性的标志。在急性乙型肝炎中，随HBsAg 出现后出现，在HBsAg 消失前消失。在慢性乙型肝炎患者中可长期存在，作为感染后免疫耐受的调节因子，HBeAg“阴转”且出现抗HBe 抗体常提示病程好的转归，也是目前抗病毒治疗有效的一项指标。但在少数

病例，HBeAg “阴转”可能是由于前C／C 区发生变异，导致HBeAg 合成障碍而引起的，有可能导致免疫反应过度激活而加重病情。

五、抗乙型肝炎病毒e 抗原抗体测定

【原理】

ELISA 竞争法：包被抗HBe 抗体，加入血清标本、中和抗原HBeAg 和酶标抗HBe 抗体，如标本中含抗HBe 抗体含量高，则中和抗原HBeAg，与酶标抗HBe 抗体结合就少，加底物显色淡，反之则显色深。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗HBe 抗体包被的微孔板、HRP 标记抗HBe 抗体、中和抗原HBeAg、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 竞争法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

抗HBe 抗体是HBeAg 的相应抗体，出现于急性乙型肝炎的恢复期，可长期存在。一般认为HBeAg 消失和抗HBe 抗体出现是病情趋向好转的征象。在部分慢性乙型肝炎患者中可伴随HBsAg 等长期存在。

六、抗乙型肝炎病毒核心抗原抗体测定

【原理】

ELISA 竞争法：包被抗乙型肝炎病毒核心抗原（HBcAg），加入血清标本和酶（HRP）标抗乙型肝炎病毒核心抗体（抗HBc 抗体），竞争结合包被HBcAg，如标本中抗HBc 抗体含量高，则酶标抗HBc 抗体与包被抗原结合就少，加底物显色淡，反之则显色深。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗HBcAg 抗体包被的微孔板、HRP 标记抗HBc 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 竞争法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

目前国内常对标本稀释（如1∶30）后测定，抗HBc抗体阳性率较原倍检测明显下降，实际上是将低滴度抗HBc抗体人为剔除。

【临床意义】

游离乙型肝炎HBcAg一般不出现在血液中，但其免疫原性很强，抗HBc抗体是HBV感染后血清中最早出现的HBV的标志性抗体，在感染的“窗口期”可能是唯一能检测到的血清学标志抗体。许多个体在感染HBV后都能产生抗HBc抗体，其在恢复期患者和慢性患者中可长期存在。在乙型肝炎高发区域的人群中抗HBc抗体有很高的阳性率。一般认为，低滴度抗HBc抗体具有流行病学意义，而高滴度抗HBc抗体则是感染标志。但也有例外，因此，有人主张以不稀释标本检测，同时计算抑制率，以利临床综合判断。

七、抗乙型肝炎病毒核心抗原抗体IgM测定

【原理】

ELISA架桥法：用抗人μ链抗体包被酶标板，用以捕捉血清中IgM，再加HBcAg与标本抗HBc－IgM抗体特异结合，而后加酶标抗HBc抗体与HBcAg结合，最后加底物显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗人μ链包被微孔板、HBcAg、酶标记抗HBc抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

抗HBc抗体IgM在乙型肝炎急性期或慢性肝炎活动期出现，是病毒复制活跃的一项指标。

八、前S1及抗前S1抗体测定

前S蛋白有前S1和前S2两种，均由HBV的S区基因编码，与HBsAg共同构成HBV膜表面大分子蛋白。前S1可能与乙型肝炎病毒入侵肝细胞有关。前S蛋白有很强的免疫原性，能产生相应的抗前S1抗体和抗前S2抗体。本节以前S1和抗前S1抗体为例，介绍前S蛋白及其特异抗体的检测方法。

㈠ 前S1 测定

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：包被的抗前S1 抗体与标本中的前S1 特异性结合，再与酶标抗前S1 抗体结合，经显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗前S1 抗体包被的微孔板、酶标抗前S1 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

㈡ 抗前S1 抗体测定

【原理】

ELISA 间接法：包被的前S1 抗原与标本中的抗前S1 抗体特异性结合，再与酶标抗人IgG 抗体结合，经显色进行测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括重组表达的前S1 抗原包被的微孔板、酶标记羊抗人IgG 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

前S1 和前S2 出现在急性HBV 感染的最早期，在HBsAg 消失前消失，是病毒清除的最早迹象。前S1 与病毒复制有密切关系，前S1 持续存在者有可能发展为慢性。

抗前S1 抗体是HBV 感染中较早出现的抗体之一，但存在短暂。目前认为前S1 抗体主要通过对感染细胞的破坏而清除病毒，在急性感染中发挥免疫清除作用，是一种保护性抗体。而在慢性乙型肝炎中，可能参与病变的活动。

九、抗丙型肝炎病毒抗体测定

丙型肝炎病毒（HCV）感染检测主要有血清抗HCV 抗体测定和逆转录PCR 检测，

后者参见第七篇分子生物学检验有关内容。

【原理】

ELISA 间接法：用HCV 特异性多肽抗原包被微孔，待检血清中抗HCV 抗体与之反应后，再用酶标抗人IgG 检测抗体，加底物显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括基因工程表达或人工合成的HCV 特异性多肽抗原包被的微孔板、酶标记抗人IgG 抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

抗HCV 抗体为HCV 感染后产生的特异性抗体，是HCV 感染的标志，为非保护性抗体。抗HCV 抗体一般用于流行病学筛查。临床病原学诊断须结合HCVRNA 检测以及其他相关检测指标。

【注意事项】

曾经使用的第一代抗HCV 抗体IgG 试剂盒，包被抗原为HCV 非结构区（NS）基因编码的5－1－1 和C100－3。因患者体内相应抗体出现较晚，不利于早期诊断。第二代试剂盒包被抗原有核心区多肽C22、NS 区多肽C33、C100－3 和5－1－1。抗C22 和抗C33 的抗体出现较早，故有助于早期诊断。近期推出的第三代试剂盒所用包被抗原有核心区编码蛋白C22－3、NS3 和NS4，编码蛋白C200 以及NS5，进一步提高了抗HCV 抗体检测的敏感性和特异性。

十、抗丁型肝炎病毒抗体测定

【原理】

采用ELISA 竞争法。将人工合成的丁型肝炎病毒抗原（HDAg）包被于微孔板上，加待检血清和酶标抗丁型肝炎病毒（HDV）抗体，与包被HDAg 竞争结合，如标本中存在抗HDV 抗体，则加底物后不显色，为阳性结果，反之为阴性结果。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括HDAg 包被微孔板、酶标抗HDV 抗体、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 竞争法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判定】

按试剂盒说明书判断结果。

十一、抗丁型肝炎病毒抗体IgM 测定

【原理】

采用ELISA 架桥法：用抗人μ链抗体包被微孔板以捕捉待检血清中IgM，再加HDAg 与特异性IgM 反应，最后加酶标抗HDV 抗体，使底物呈色。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括经抗人μ链包被微孔板、HDAg、酶标记抗HDV 抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

十二、丁型肝炎病毒抗原测定

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：包被的固相抗HDV 抗体与待测标本中HDAg 特异结合，再与酶标抗HDV 抗体结合，经显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗HDV 抗体包被的微孔板、酶标记抗HDV 抗体、脱壳剂(含Tween －80、脱氧胆酸等)、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

HDV 由HBsAg 包裹，核心蛋白成分为多拷贝的Delta 抗原，即HDV 抗原，在HDV 感染早期，血清中可短暂出现HDV 抗原，但须用脱壳剂去除HBsAg 后才能检测到，因此，血清HDV 抗原不易检出。抗HDV 抗体可出现于急性感染的后期，而在慢性感染中可长期存在，抗HDV 抗体并非保护性抗体，特别是高滴度抗HDV 抗体常与HDV 平行复制。抗HDV 抗体IgM 阳性一般认为是近期感染，但并不能区分是HDV 急性还是慢性

感染。

十三、抗戊型肝炎病毒抗体IgG 测定

【原理】

ELISA 间接法：用基因工程表达的HEV 特异性多肽包被微孔板，加入待检血清与之反应，再加酶标抗人IgG 抗体并使底物呈色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括HEV 特异性多肽包被的微孔板、酶标记抗人IgG 抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

十四、抗戊型肝炎病毒抗体IgM 测定

【原理】

采用ELISA 架桥法：用抗人μ链抗体包被微孔板，以捕捉待检血清中IgM，再加HEV 抗原（HEVAg）与特异性IgM 反应，最后加酶标抗HEV 抗体，使底物呈色。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括经抗人μ链包被微孔板、HEVAg、酶标记抗HEV 抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

HEV 所致戊型肝炎的临床症状和流行病学特点均与甲型肝炎相似，是一种自限性急性肝炎。孕妇感染HEV 有较高的重症肝炎发生率。抗HEV 抗体检测所用抗原为合成多肽或克隆表达的融合蛋白，抗原序列多选自基因组开放读码框架ORF2 和ORF3 区。抗HEV 抗体IgM 阳性表示急性期感染，在潜伏期末、出现临床症状之前即可检测到，并在症状最典型期达到峰值，持续时间约1 个月。抗HEV 抗体IgM 产生不久，即可检测到抗HEV 抗体IgG，并紧随抗HEV 抗体IgM 之后达到峰值，持续约1 年。对HEV 感染的确诊还可结合其他相关手段，如酶免疫印迹技术、HEVRNA 检测等。

第二节　抗人类免疫缺陷病毒抗体测定

获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency symdrome，AIDS）由人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus，HIV）引起。HIV 有1、2 两型：HIV－1 全球流行，HIV－2 则主要流行于西非洲。HIV 属于逆转录病毒科、慢病毒属、灵长类免疫病毒亚属。HIV 基因组有10 个编码基因，编码至少9 种蛋白，与目前血清学检测相关的为其中3 个主要结构基因编码的主要结构蛋白，为Gag 蛋白（gag 基因编码的前体蛋白P55，被蛋白酶裂解成衣壳蛋白P24、P9 和P6 及基质多肽P17）、Pol 蛋白（pol 基因编码的前体蛋白p66，裂解成反转录酶P51 及整合酶P34）和Env 蛋白（env 基因编码前体蛋白Gp160，裂解成外膜蛋白GP120 和跨膜蛋白GP41）。

HIV 检测应按“全国艾滋病检测工作规范”进行。实验室分初筛实验室和确认实验室两种。人员、设备都应具备相应条件，经省或国家卫生主管部门审查批准后方可进行工作。HIV 的实验室检测方法包括血清抗HIV 抗体、HIV 抗原检测和HIVRNA 的核酸杂交、多聚酶链反应检测等。目前常规检测项目是抗HIV 抗体测定。抗HIV 抗体的筛选试验方法有ELISA、金免疫技术、明胶颗粒凝集试验、荧光免疫组化技术和乳胶凝集试验等，目前以酶联免疫吸附试验、胶体金免疫测定和明胶颗粒凝集试验应用较为普遍。确认试验有免疫印迹法和放射免疫技术，以前者常用。

一、酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 间接法：采用基因工程或人工合成多肽抗原（含HIV－1gp41、p24，HIV－2gp36）包被反应板，当待测标本中存在抗HIV 抗体时，与包被抗原特异性结合，再加酶标记抗人IgG 抗体与抗HIV 抗体结合，最后加底物显色测定。

【试剂】

必须使用经中国药品生物制品检定所检定并贴有“中国药品生物制品检定所检定合格”防伪标签的商品试剂盒。

商品化试剂盒一般包括重组HIV1/2 抗原或人工合成的多肽抗原包被的微孔反应板、酶标记抗人IgG 抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

筛选试验及结果判断可参照如下：

第一次检测	第二次检测	第三次检测	结　果
阴性		阴性	
阳性	阳性		阳性
阳性	阴性	阴性	阴性
阳性	阴性	阳性	阳性

【注意事项】

1）整个检测工作必须符合HIV 实验室管理规范和生物安全守则规定，严格防止交叉感染。操作者必须戴手套，穿工作衣，建立和执行严格的消毒隔离制度。

2）目前常用的还有ELISA 双抗原夹心法，其原理为待测抗HIV 抗体与包被抗原结合后，再与酶标抗原特异性结合，显色测定。还有一种是ELISA 竞争法，其原理为待测抗HIV 抗体、酶标记抗HIV 抗体与包被抗原竞争结合，如待测抗HIV 抗体含量高，则酶标记抗HIV 抗体与包被抗原结合少，显色弱或不显色，反之，则显色强。这两种方法特异性较ELISA 间接法强。

二、斑点金免疫层析试验

【原理】

抗HIV 抗体与胶体金标记的重组抗原特异结合，通过渗滤转移，与固定于载体上某一部位（测定区）的抗原结合成复合物，胶体金因聚合而呈现红色，阴性标本不显色。

【试剂】

必须使用经中国药品生物制品检定所检定并贴有“中国药品生物制品检定所检定合格”防伪标签的商品试剂盒。

商品化试剂盒为所有试剂一体化检测条或检测板。检测条一般由加样区、测定区、对照区等几部分组成。

【操作】

按斑点金免疫层析试验操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1）每次检测均须以对照区出现红色条带作为检测有效的前提。

⑵ 该试验为一种快速床旁试验，可供检测血清、血浆以及全血标本，适合献血员等人群的快速初筛。也有胶体硒标记的试剂盒。

⑶ ELISA 法、金（硒）标快速试验应包含混合重组抗原，检测 HIV－1 或 HIV－2 抗体应有较高的灵敏度，因此，本法可能存在一定比例的假阳性。初筛试验结果为阳性的标本，必须送国家卫生部门认定的确认实验室作进一步检测予以确认。

三、酶免疫印迹技术

【原理】

酶免疫印迹技术是目前公认的确认 HIV 抗体存在的首选方法。将裂解获得的 HIV 蛋白抗原通过十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳按分子量大小将其分离，再转印至硝酸纤维素薄膜上，与待检标本反应。若标本中含有 HIV 抗体，将会与膜条上的抗原区带结合，再加上酶标抗人 IgG 抗体，经过与底物反应，即可形成肉眼可见的不同有色区带。

【试剂】

必须使用经中国药品生物制品检定所检定并贴有“中国药品生物制品检定所检定合格”防伪标签的商品试剂盒。

商品化试剂盒一般包括已转印有 HIV－1 或 HIV－2 抗原的膜条、酶标抗体、底物溶液等。

【操作】

按酶免疫印迹技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

确认试验的结果判定可根据世界卫生组织推荐的标准，具体如下：阳性为至少有一条 env 带和一条 pol 带阳性；或至少有一条 env 带和一条 gag 带阳性；或至少有一条 env 带、一条 gag 带和一条 pol 带阳性，或至少有 2 条 env 带阳性。阴性为无 HIV 特异带出现。可疑为一条 gag 带和一条 pol 带，或只有 gag 带或 pol 带。

【注意事项】

⑴ 酶免疫印迹技术要求与初筛试验相似的灵敏度以及更高的特异性。

⑵ 判断是否感染 HIV 应十分慎重，有时会出现不确定或可疑结果，应进行随访监测，并结合其他病原学诊断指标作出正确判断。

⑶ 酶免疫印迹技术应严格按标准化要求进行操作，并做好质量控制。

第三节　其他病毒感染的血清学检验

一、抗流行性出血热病毒抗体IgM 测定

(一) 荧光免疫组化技术

【原理】

以感染流行性出血热（epidemic hemorrhagic fever，EHF）病毒的细胞作为抗原片，使待测血清与之反应，再用荧光素标记抗人IgM 抗体染色，最后用荧光显微镜观察特异荧光显示的阳性细胞。

【试剂】

1）抗原片：EHF 病毒接种Vero－E6 细胞单层3～4d 后换维持液（Eagle 培养液与199 培养液等量混合，加2％新生牛血清），37℃培养12～14d，其间换液3 次。制片前用Hanks 液洗去衰老细胞，换生长液。次日弃去生长液，经2.5g/L 胰蛋白酶消化后，将细胞层吹打分散，用生长液制成细胞浓悬液（每个大培养瓶3～5ml），滴于灭菌处理的10 孔涂膜载玻片上。置温盒于5％二氧化碳环境下，继续培养16～18h，使细胞贴附于玻片上。用5mmol/LpH7.2 磷酸盐缓冲液洗涤2 次，除去培养液。紫外线照射下自然干燥。冷丙酮固定15min。待丙酮挥发干，密封于塑料袋内，－20℃保存。同法制备未感染细胞片作对照用。

2）荧光素标记抗人IgM 抗体：抗人μ链单克隆或多克隆抗体用荧光素标记而成。用前滴定最适浓度。

【操作】

1）用5mmol/LpH7.2 的磷酸盐缓冲液倍比稀释待测血清。滴加在抗原片上，置湿盒内，37℃保温45min。

2）用磷酸盐缓冲液洗涤3 次，每次3min。振荡2min，吹干，滴加0.1g/L 伊文思蓝－磷酸盐缓冲液配制的荧光素标记抗人IgM 抗体。保温同上。

3）同前洗涤，吹干。用无荧光聚乙烯醇甘油胶封片，置荧光显微镜下观察。

【结果判断】

抗原片上细胞浆内呈现点、片状特异荧光者为阳性。根据阳性细胞的数量及荧光强度分为＋～＋＋＋＋。若血清阳性稀释度≥1∶10 为阳性，即有诊断意义。

(二) 酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 架桥法：用抗人μ链抗体捕获待测血清中的IgM，再加入EHF 病毒抗原、酶标记抗EHF 病毒抗体，特异结合形成复合物，加底物显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗原、酶标记抗EHF 病毒抗体、抗人μ链单克隆抗体或多克隆抗体等。

【操作】

按ELISA 架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

EHF 病毒是引起肾综合征出血热的病原体，主要通过鼠类传播，在全世界有广泛流行。标本中检出高滴度抗EHF 病毒抗体IgM 者，对于肾综合征出血热的早期诊断具有重要价值。

二、抗乙型脑炎病毒抗体IgM 测定

【原理】

ELISA 架桥法：用抗人μ链捕获待测血清中IgM，加入乙型脑炎病毒抗原，与特异性抗乙型脑炎病毒IgM 反应。再用酶标抗乙型脑炎病毒抗体与抗原结合，加底物显色。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗人μ链单克隆抗体、乙型脑炎病毒抗原、鼠抗乙型脑炎病毒IgG 酶结合物等。

【操作】

按ELISA 架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

抗乙型脑炎病毒抗体IgM 的检测对于乙型脑炎的早期诊断有重要价值。

第四节　细菌及其他病原微生物感染的血清学检验

一、伤寒和副伤寒

曾经普遍使用的肥达反应试验（Widal reaction）采用凝集反应检测抗伤寒及副伤寒沙门菌的菌体抗原（O 抗原）、鞭毛抗原（H 抗原）的抗体。但由于O 抗原、H 抗原血清型多变，因此，上述检测结果有较大的局限性。近年出现的主要检测抗伤寒、副伤寒沙门菌的脂多糖（LPS）、Vi 抗原、外膜蛋白、鞭毛蛋白等的抗体的一些血清学方法，有一定的临床应用价值。

（一）肥达试验

【原理】

用含伤寒沙门菌O、H 和副伤寒沙门菌甲、乙、丙诊断菌液与待测血清进行凝集反应，以测定血清中存在的针对菌体抗原的特异性抗体。

【试剂】

伤寒沙门菌O、H 和副伤寒沙门菌甲、乙、丙诊断菌液；9g/L 氯化钠溶液。

【操作】

1）取中号试管6 支，将待检血清作1∶20～1∶320 稀释，第6 管以9g/L 氯化钠溶液对照，每管稀释标本为0.5ml。

2）每管加入0.5ml 工作菌液（约含10 亿菌/ml）。

3）置37℃，16～20h，观察结果。

【结果判断及报告方式】

1）对照管（第6 管）应无凝集现象。

2）以血清最高稀释度呈现“＋＋”凝集为待检血清滴度。

（二）间接被动血凝试验

【原理】

用伤寒、副伤寒沙门菌的Vi 抗原致敏的红细胞与待测血清发生凝集反应。根据凝集效价，判定待测血清中有无抗伤寒沙门菌或抗副伤寒沙门菌Vi 抗体。

【试剂】

1）诊断红细胞：用已纯化的伤寒、副伤寒沙门菌Vi 抗原致敏的羊红细胞，制成冻干品。临用时用磷酸盐缓冲液稀释液溶解。

2）pH7.4 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液。

3）阴性、阳性对照血清。

【操作】

1）反应板第1 孔加入磷酸盐缓冲液40μl，其后各孔加25μl。

2）取已经56℃30min 灭活的待检血清10μl 加入第1 孔，混匀。吸取25μl 按倍比连续稀释至第8 孔。阴性、阳性对照血清按同样操作。

3）每孔加诊断红细胞悬液25μl，振荡1min，充分混匀，置37℃1h 后观察结果。

【结果判断】

阴性为不凝集，红细胞均匀沉积于孔底，集中于一点。阳性呈不同程度凝集，红细胞均匀平摊于整个孔底。以出现“＋＋”凝集的血清最大稀释倍数的倒数为待检血清滴度。具体判断方法参照相关章节以及说明书。

【注意事项】

除检测抗伤寒沙门菌或抗副伤寒沙门菌Vi 抗原的抗体外，还可用相似方法检测抗LPS 抗体等。

【临床意义】

血清抗Vi 抗体特别适用于诊断慢性带菌者，抗体血清滴度≥1∶40 者即具有流行病学筛查意义。抗LPS 抗体血清滴度≥1∶80 者即具有对伤寒或副伤寒的诊断意义。

二、链球菌感染

详见本篇第三章第三节中抗链球菌溶血素O 测定。

三、结核杆菌感染

【原理】

ELISA 间接法：用纯化的结核分枝杆菌外膜抗原包被微孔板，待测血清中相应抗体与之特异结合，再与加入的酶标抗人IgG 抗体结合，显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括微孔板、标本稀释液、酶结合物、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

1）结核杆菌抗体测定方法目前还有胶乳凝集试验、胶体金免疫检测等方法。

(2) 所测抗体依赖于包被抗原的特异性，目前采用的抗原有38000u 菌膜抗原、脂多糖抗原、抗原60 以及抗原85 复合体。其中以针对分子量为38000u 抗原产生的抗体较为特异。

(3) 除检测血清标本外，还可以检测脑脊液等标本。

【临床意义】

本法对于结核分枝杆菌感染，特别是肺外感染，或无法分离到结核分枝杆菌患者，有一定的辅助诊断价值，但特异性和灵敏度均不高。

四、布氏杆菌感染

(一) 试管法凝集试验

【原理】

本法为经典的诊断布氏菌病的方法，主要检测IgM 和IgG 类抗体，原理为直接凝集试验。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括诊断菌液、阴性及阳性对照等。

【操作】

按直接凝集试验试管法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

也可以采用玻片凝集法，其原理与本法相似，且两者有较好的相关性。

(二) 胶乳凝集试验

【原理】

待测血清中抗布氏菌抗体与胶乳试剂 (布氏菌抗原致敏胶乳) 相遇，发生抗原抗体反应，出现肉眼可见的凝集现象。

【试剂】

商品化试剂盒。

【操作】

于涂黑玻片上的红漆黑圈或方格 (2.5cm ×2.5cm) 内滴加待检血清50 μl。加等量胶乳试剂，连续摇动混匀。6min 内，在强光下观察结果。出现清晰均匀的凝集颗粒者为阳性，未见凝集颗粒者为阴性。

【临床意义】

IgG 类抗体一般在感染后的几周内出现，在恢复期患者中可存在相当时间。在无症状感染患者中也可持续存在。

五、脑膜炎双球菌感染

致病的脑膜炎双球菌主要是A 、B 、C 和Y 群。我国引起流行性脑膜炎的主要菌群是A 群，B 、C 群较少。流行性脑膜炎发病过程中，由于菌体自溶或被裂解，释放大量的多糖抗原进入血液、脑脊液及尿中，早期即可用免疫学试验检出。疾病中、晚期则能测出血清中抗体存在。本节介绍用ELISA 双抗体夹心法测可溶性抗原。

【原理】

用针对主要血清型菌株的多糖抗原的特异抗体包被微孔板，与标本中可溶性菌体抗原结合，再与酶标的特异抗体结合，经显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括经纯化的抗脑膜炎双球菌多糖抗原抗体包被的微孔板、酶标记抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【注意事项】

1） 待测标本应在56 ℃下灭活30 min ，否则会导致假阳性结果。

2） 为了提高检出率，尿液标本需浓缩处理，方法参照相关文献。

【临床意义】

对于流行性脑膜炎早期诊断和治疗有一定参考价值。临床确诊仍须结合涂片检查和细菌培养结果。

六、军团杆菌病

(一) 微量凝集试验

【原理】

待检血清中的特异性抗体与军团杆菌抗原发生凝集反应。

【试剂】

将用作抗原的军团杆菌，接种于BCYE 培养基上，35 ℃烛缸中培养3 ～4d ，用

0.01mol/LpH7.4 磷酸盐缓冲液洗下菌苔，置沸水浴1h 杀菌。2000r/min 离心10min，弃去上清液。用含0.5％甲醛的磷酸盐缓冲液配成菌悬液，后者在波长420nm、光径1cm 时的吸光度值为0.65。用前每毫升菌悬液加石炭酸复红1μl。

【操作】

在微量血凝反应板上进行。将待测血清用0.01mol/LpH7.4 磷酸盐缓冲液作倍比稀释至1∶128，每孔加25μl，各孔加入菌液25μl，混匀1min，置湿盒室温过夜。

【结果判断】

以50％凝集（＋＋）的血清最高稀释倍数为其效价。

（二）间接血凝试验

【原理】

同伤寒、副伤寒的间接血凝试验。

【试剂】

1）可溶性抗原：将军团杆菌标准株接种于BCYE 琼脂，35℃烛缸培养3～4d 后灭菌，在4℃下冷浸7～10d，2000r/min 离心15min，上清液即含可溶性抗原，加叠氮钠至1.0gL，4℃保存。

2）致敏红细胞：取双醛化压积绵羊红细胞0.1ml，加最适稀释度可溶性抗原（经预试选取出现特异凝集的最高稀释度，用0.01mol/LpH7.4 的磷酸盐缓冲液稀释）1ml，37℃水浴1h 致敏，用磷酸盐缓冲液洗3 次后，以含1.0g/L 明胶、0.4g/L 牛血清白蛋白、0.5％羊红细胞的0.01mol/LpH7.4 的磷酸盐缓冲液配成0.7％悬液。

【操作】

在微量血凝反应板上进行。待测血清用上述稀释液作倍比稀释至1∶128，每孔25μl，各孔补加稀释液25μl。每孔滴加致敏红细胞25μl，混匀1min，置湿盒于室温2h 后判读结果。

【结果判断】

出现50％凝集（＋＋）的血清最高稀释倍数为其效价。

【注意事项】

也可用荧光免疫组化技术间接法、ELISA 法等检测军团杆菌抗体。

【临床意义】

大多数患者在感染军团菌3～6 周后血清中出现特异性抗体，IgM 抗体阳性往往表示感染早期。其他细菌感染可能产生交叉反应。

七、梅毒感染

梅毒的血清学诊断方法有非特异的类脂质抗原试验和特异的密螺旋体抗原试验两

类。目前较常用的方法有下列几种：

1）类脂质抗原试验：性病研究实验室试验（venereal disease research alboratory test，VDRL），不加热血清反应素试验（unheated serum reagin test，USR），快速血浆反应素环状卡片试验（rapid plasma reagin circle card test，RPR），甲苯胺红不加热血清试验（toluidinered unheated serum test，TRUST）。

2）密螺旋体抗原试验：密螺旋体血球凝集试验（treponemalpallidum hema－ggluti－nationassay，TPHA），荧光螺旋体抗体吸收试验（fluoresent trepnemal antibody aborption test，FTA－ABS）。

在实际应用中，常以VDRL、USR、PR、TRUST 中的一种作为筛选试验，而用TPHA 或FTA－ABS 来做证实试验。

（一）性病研究实验室试验

【原理】

VDRL 试验所用的抗原是从牛心中提取的有效成分——心磷脂、卵磷脂及胆固醇。梅毒螺旋体在破坏组织的过程中，释放出抗原性心磷脂，它能刺激机体产生抗体，称为反应素。反应素能与牛心的心磷脂抗原特异结合。卵磷脂是为了加强心磷脂的抗原性，胆固醇可增强抗原的敏感性。心磷脂和卵磷脂都是醇溶性脂类，在水中形成胶体溶液。胆固醇遇水则析出结晶，反应时，结晶成为载体。在载体核心的周围，包裹了一层心磷脂和卵磷脂，形成一种胶体微粒。这种微粒遇到梅毒血清抗体（IgG 或IgM）后，即粘附在胶体微粒的周围，形成疏水性薄膜。由于摇动、碰撞，颗粒互相粘附而形成肉眼可见的颗粒凝集或沉淀，即为阳性反应。非梅毒血清中的白蛋白多于球蛋白，白蛋白对胶体颗粒有保护作用，形成亲水性薄膜。即使同样摇动碰撞，由于抗原颗粒周围没有粘附免疫球蛋白分子，不能形成较大颗粒和肉眼可见的凝集或沉淀，呈阴性反应。

【试剂】

商品化试剂盒，按要求准备试剂。

【操作】

1．玻片定性试验

1）待测血清在56 ℃水浴中灭活30 min。吸取50 μl 血清，加在玻片圆圈中并涂满整个圆圈。

2）用1 ml 注射器装上针头，滴加抗原1 滴（1 ml 约60 滴）。

3）摇动玻片4 min，每分钟约180 次（可在摇床上进行）。

4）观察结果：肉眼可见大的或中等大聚合在一起的块状物，报告为阳性（＋＋～＋＋＋＋）；肉眼可见小块状物，液体混浊，需要用显微镜放大100 倍观察块状物的性

状，报告为弱阳性（+）；显微镜观察，颗粒分布不规则，或呈细小粗糙颗粒，报告为可疑反应（±）；显微镜检查，颗粒细小，分布均匀，报告为阴性（-）。

2．玻片半定量试验

在玻片定性试验中，为排除前带现象或假阴性，可作玻片半定量试验。

待测血清用9g/L 氯化钠溶液在小试管中作6 个稀释度，即原血清、1∶2、1∶4、1∶8、1∶16、1∶32。每个稀释度血清取50μl，加入玻片圆圈中，按定性试验的方法进行测定，并以出现弱阳性（+）的稀释度作为待测血清的效价。

（二）不加热血清反应素试验

【原理】

本试验采用的是改良的性病实验室抗原。将该抗原用稀释液稀释后离心沉淀，于沉淀中加入EDTA、氯化胆碱和防腐剂。EDTA 可使抗原在半年内不变性，氯化胆碱可起化学“灭活”作用（灭活补体），因此，血清可不必加热灭活。抗原不必每天配制，在4～8℃冰箱中可保存6 个月。试验时，将1 滴血清（约50μl）滴于玻片漆圈中，再加1 滴抗原悬液于血清中。混匀振动4min。先用肉眼，再用100 倍显微镜观察抗原颗粒或凝集沉淀。

【试剂】

商品化试剂盒。

【操作】

（1）玻片定性试验：吸取待检血清50μl，加于玻片圆圈中，并涂布于整个圆圈。用1ml 注射器上专用针头吸取抗原，每份待检标本上滴加1 滴。摇动玻片，4min 后观察结果。＋＋＋＋～＋＋＋＋：肉眼可看到大的或较大的块状物；＋＋：肉眼可见小块状物，在显微镜下可见较大的块状物，悬液清亮；＋：在显微镜下可见小块状物，均匀分布；±：颗粒分布不规则，或为细小的粗糙物；＝：颗粒细小，分布均匀。

（2）玻片半定量试验：玻片定性试验阳性者，可做半定量试验，以进一步确诊。方法是将待检血清用9g/L 氯化钠溶液在小试管中作6 个稀释度，即原血清、1∶2、1∶4、1∶8、1∶16、1∶32。各取50μl 加在玻片上漆圈中，按定性试验的方法操作，并以出现＋的稀释度作为待检测血清效价。

（三）快速血浆反应素环状卡片试验

【原理】

此法的原理基本上与不加热血清反应素试验相同，唯抗原吸附于炭粒上，凝集时易观察。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括RPR 抗原、RPR 卡片、塑料加液滴管等。

【操作】

1） 取待检血清50μl，加入卡片上圆圈内并分散于整个圆圈。

2） 在每份血清上滴加1 滴RPR 抗原。

3） 旋转摇动8min，立即用肉眼观察结果。

【结果判断】

待测标本不凝集为阴性。待测标本反应液中见明显黑色凝集颗粒或絮片为阳性。根据颗粒或絮片的大小及有无，记录＋～＋＋＋＋或－。

阳性标本也可作1∶2～1∶32 稀释后在RPR 卡片上，按上述定性试验方法做半定量试验。

(四) 甲苯胺红不加热血清试验

【原理】

采用性病实验室抗原混悬于含有特制的甲苯胺红溶液中，与血清中反应素反应，可出现肉眼可见的红色凝集块。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括TRUST 抗原悬液、阴性及阳性对照血清、试验专用卡片、专用滴管及针头等。

【操作】

1） 将待检血清及TRUST 抗原于用前放室温平衡。

2） 分别吸取阴性和阳性对照各1 滴（50μl）加到反应卡的各自圈内并铺匀。

3） 吸取待检血清或血浆（不需灭活）1 滴（50μl），分别均匀涂布于卡片上的其余圈内。

4） 轻轻摇匀抗原，用专用滴管针头垂直滴加抗原1 滴于待测血清圈内。

5） 摇动卡片8min 后肉眼观察结果。

【结果判断】

呈粉红色均匀分散沉淀物为阴性。出现粉红色凝集块为阳性，根据凝集块大小记录＋～＋＋＋＋。

(五) 密螺旋体红细胞凝集试验

【原理】

被检血清中的密螺旋体抗体可与用螺旋体抗原致敏的羊红细胞发生特异性凝集反

应。

【试剂】

使用有正式批文的市售试剂盒。一般包括：

1） 诊断红细胞：从Nichols 株螺旋体纯化得到的可溶性抗原致敏羊红细胞。

2） 吸收剂：用Reiter 株螺旋体制备。

3） 阴性、阳性对照血清。

4） 磷酸盐缓冲液。

【操作】

具体操作参照试剂说明书。一般包括：

1） 取56 ℃下灭活30 min 的待检血清50 μl，加吸收剂50 μl，37 ℃30 min，以去除非特异性抗体。

2） 在反应板第一孔加入磷酸盐缓冲液40 μl，其后各孔加25 μl。

3） 加上述已经吸收待检血清10 μl 于第1 孔，混匀。用多头稀释仪取25 μl 按倍比连续稀释至第8 孔。阴性、阳性对照血清同样操作，空白对照加磷酸盐缓冲液。

4） 每孔加诊断红细胞悬液25 μl，振荡1 min，充分混匀，置37 ℃1h 观察结果。

【结果判断】

阴性者不凝集，红细胞均匀沉积于孔底，集中于一点。阳性者呈不同程度凝集，红细胞均匀平摊于整个孔底。以出现“＋＋”凝集的血清最大稀释倍数的倒数为待检血清效价。

具体判断方法参照试剂说明书。

【注意事项】

1） 非特异性的类脂质抗原试验中，唯有VDRL 试验可用于脑脊液标本的检测。

2） 非特异性试验可作半定量测定，其结果与疗效有关。而密螺旋体抗原试验与疗效相关性目前尚不明确。

3） 目前已有检测特异性密螺旋体抗体的ELISA、金标法试剂盒，操作更为方便。

【临床意义】

对于一期和二期梅毒，两类试验均有较高的敏感性，而对于潜伏期和晚期梅毒则以密螺旋体试验敏感性为高。非特异性试验效价下降3/4 以上表明抗梅毒治疗有效。在恢复期患者中，上述两类抗体均可能存在一段时期。在自身免疫性疾病、某些感染性疾病患者和孕妇等人群中，两类试验均可能出现假阳性结果，尤以前者为显著。临床确诊尚须结合其他指标检测结果。

八、沙眼衣原体感染

(一) 荧光免疫组化技术测沙眼衣原体抗原

【原理】

沙眼衣原体是细胞内寄生的微生物。将感染部位的分泌物涂片固定，直接用荧光素标记的抗各种血清型衣原体的抗体染色，观察细胞内着染荧光的特异形态。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括荧光素标记的抗沙眼衣原体单克隆抗体、阴性及阳性对照抗原片、缓冲洗涤液、碱性缓冲甘油等。

【操作】

1) 首先洗净感染部位的分泌物，用棉拭子用力擦拭局部黏膜，以获取上皮细胞。可取尿道黏膜、子宫颈内膜、肉芽肿中的感染组织及新生儿眼结膜分泌物。将拭子于无荧光的洁净玻片上涂片。用丙酮固定15 min，立即检测或-20 ℃贮存。

2) 在上述涂片上加沙眼衣原体荧光抗体一小薄层 (约20 μl)，放湿盒中，加盖，置37 ℃30 min。洗涤液冲洗，晾干。滴加缓冲甘油并加盖玻片封片，用荧光显微镜观察。

【结果判断】

沙眼衣原体在用荧光显微镜检查时，可见细胞内具有典型大小 (直径200～300nm)、边界清晰的亮绿色圆形颗粒，有时细胞内可见由原体分裂形成的包涵体，也呈亮绿色。

【注意事项】

1) 标本中所含的上皮细胞数应不少于1000 个。此外，沙眼衣原体的原体、包涵体均呈亮绿色，任何其他颜色荧光颗粒均不得判为阳性。每次应设阳性与阴性对照。

2) 如涂擦或刮片时损伤局部，或使用可的松后，常可激活原体而使包涵体增多。

(二) 酶联免疫吸附试验测沙眼衣原体抗体

【原理】

在已包被沙眼衣原体抗原的微孔板孔内，加入待测血清和酶标记抗人IgG 抗体形成复合物，再加入酶底物显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括用经纯化的沙眼衣原体抗原包被微孔板、酶标记抗人IgG 抗体、标本稀释液、阳性及阴性对照血清、底物、底物缓冲液和终止液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

沙眼衣原体有15 种血清型，其中A 、B 、Ba 、C4 种血清型主要与地方性沙眼有关；D ～K 型可在生殖道感染、结膜炎和婴儿肺炎患者中发现；L1 、L2 、L33 种血清型可引起性病淋巴肉芽肿。泌尿生殖道疾病如女性的宫颈炎、盆腔炎、子宫内膜炎，男性的附睾炎，两性的尿道炎以及肛周炎、直肠炎均可由沙眼衣原体引起。荧光抗体染色法直接检测沙眼衣原体，具有较高的敏感性和特异性，且能快速诊断。ELISA 法目前只能检测IgG 类抗体，具有辅助诊断价值。

九、肺炎支原体感染

【原理】

ELISA 架桥法检测抗肺炎支原体抗体IgM 。用羊抗人μ链抗体包被微孔板，与血清标本中IgM 结合，加入肺炎支原体抗原，与酶标抗肺炎支原体抗体结合，加底物显色。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗人μ链单克隆抗体、肺炎支原体抗原、酶标抗肺炎支原体抗体等。

【操作】

按ELISA 架桥法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

按试剂盒说明书判断结果。

【临床意义】

血清中抗肺炎支原体抗体IgM 出现在感染早期，约2 ～4 周内即能检出，较培养灵敏度高。但其他支原体感染会导致交叉反应。

十、血吸虫病

㈠ 酶免疫组化技术

【原理】

以血吸虫虫卵为抗原片，与加入的待测血清中抗血吸虫抗体IgG 结合，再与酶标记葡萄球菌A 蛋白 $PA） 结合。加入底物后，显色测定。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括血吸虫卵抗原片、酶标记SPA 、稀释液、清洗液、底物溶液等。

【操作】

具体操作按试剂说明书进行，一般步骤为：

1） 待测血清用稀释液作系列稀释后，分别滴加于抗原片上，37 ℃温育2h 。

2） 用磷酸盐缓冲液洗3 次，每次5 min 。

3） 滴加最适稀释度的酶标记SPA ，37 ℃温育20 min 。

4） 同2 洗涤后，加新鲜配制的底物溶液，置室温10 min 后冲洗观察。

【结果判断】

低倍显微镜下观察，凡虫卵卵壳和毛蚴不着色或呈微黄色为阴性；呈棕黄色为阳性。

(二) 环卵沉淀反应

【原理】

成熟虫卵内渗出的抗原 (毛蚴的排泄分泌物) 与血吸虫感染者血清中特异抗体相遇时，可在虫卵周围形成特异性沉淀物。

【试剂】

冷冻干燥的血吸虫虫卵粉，可在寄生虫病研究所等专业单位购买。

【操作】

预先用石蜡在洁净的载玻片上划两条互相平行、相距约20 mm 的直线。在两条蜡线之间滴加受试者血清2 滴 (约0.08 ～0.10 ml) 。用针尖挑取干卵100 ～150 个，加入血清中，混匀。覆盖24 mm ×24 mm 盖玻片，四周用石蜡密封后，置37 ℃温箱内48h 。用低倍显微镜观察结果，发现可疑者应在高倍显微镜下鉴别。

【结果判断】

阳性反应标本片中，观察100 个成熟虫卵，记录其环沉率。阳性片必须看完全片虫卵。以沉淀物大于10 μm 者作为阳性反应。效价以＋～＋＋＋记录。泡状沉淀物面积小于虫卵面积1/2 者为＋，大于虫卵面积1/2 者为＋＋；大于整个虫卵面积者为＋＋＋。条带样沉淀物小于虫卵长径者为＋；等于或大于虫卵长径者为＋＋；大于虫卵长径两倍者为＋＋＋。虫卵周围光滑，无上述沉淀物，或有小于10 μm 的泡状物，以及大小不等的球形和影状沉淀物者均属阴性反应。

【注意事项】

目前还可用胶乳凝集试验和ELISA 法检测血清血吸虫抗体。详见试剂说明书。

【临床意义】

目前所测血清血吸虫抗体均为IgG 类，大多用于流行病学调查。高效价者方具有一定的临床诊断价值。

第八章　肿瘤标志物测定

肿瘤标志物（tumor marker）指由于正常细胞基因调控失调或病毒基因诱发细胞突变，使细胞癌变并表达某种在正常情况下没有的或含量极低的一类抗原物质，或是宿主对体内新生物反应而产生的物质。按其特异性可分为肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原。目前用于临床检测的多为肿瘤相关抗原，可用生化、免疫、分子生物学等方法进行检测。

肿瘤标志物检测主要用于恶性肿瘤的诊断、预后观察和疗效监测。由于其特异性和敏感性不高，因此，某一肿瘤标志物升高并非一定是恶性肿瘤，同样，肿瘤标志物不升高也不能轻率地否定有恶性肿瘤的存在。在实际应用中肿瘤标志物用于肿瘤预后的判断和疗效的监测比用于诊断更有价值。

根据国际肿瘤发生生物学和医学会肿瘤标志物标准工作组1990 年公布的肿瘤标志物测定值变化的标准，肿瘤标志物用于临床判断有以下意义：①患者在治疗前若有3 次以上（间隔3 月测1 次）连续测定肿瘤标志物含量呈较大幅度线性上升，预示有肿瘤的发生或复发。如一次测定结果增高，必须在2～4 周内第二次采样测定，进行动态观察。②如患者正在治疗中，肿瘤标志物测定值增高25％以上，提示病程有进展，则必须在2～4 周重复采样，以提供追加治疗依据。③由于肿瘤负荷量与血清肿瘤标志物含量变化相关，若肿瘤标志物测定值下降50％以上，提示肿瘤部分缓解。④当肿瘤标志物含量不能确定肿瘤完全缓解，肿瘤标志物含量升高，而又不能对升高的原因作出其他解释，则根据常规方法作出完全缓解的临床判断应视为有误。

依据上述标准，临床在使用肿瘤标志物进行疗效观察和预后判断的过程中应该注意如下事项：①采用同一类型标本进行观察。如用血清在每次检测中都用血清。②尽量用同一仪器、同一试剂、同一方法进行动态检测，因为肿瘤标志物的检测有多种方法，不同的方法和试剂由于其抗体的纯度不一、抗体所结合的抗原表位不同，所测得的结果有时差异较大，影响动态观察的准确性。③同一肿瘤可有多种肿瘤标志物，而不同肿瘤或同种肿瘤的不同组织类型除有共同的标志物外，也有不同的标志物。因此，在肿瘤患者治疗前寻找一种已升高的标志物作为今后疗效和预后的观察指标十分必要。同时提示肿瘤标志物的联合检测和动态观察对提高肿瘤诊断的阳性率和特异性有着非常重要的意义。

肿瘤标志物除部分活性酶用生化方法进行检测外，大多应用免疫学方法检测。近年来，由于免疫定量技术的飞速发展，免疫学检测已从半定量或灵敏度较低的免疫扩散、对流电泳、火箭电泳或反向血凝法发展到化学发光免疫技术、放射免疫技术、酶联免疫吸附试验和金免疫技术。化学发光免疫技术具有高自动化、高特异性、高敏感性的特点，无污染，准确、快速，灵敏度高。但仪器较昂贵，目前尚难推广。放射免疫技术也是微量分析方法之一，其特异性和灵敏度也高。但由于放射标记物自身衰变和环境污染、实验操作中各种影响因素较多，必须重视实验的批内、批间质控。以上两种方法作定量测定是目前主要检测方法。

肿瘤标志物检测项目有上百种，一般包括酶类、激素类、肿瘤胚胎抗原、糖类抗原、受体、肿瘤基因等等。本章主要介绍几种目前普遍使用的肿瘤胚胎抗原、糖类抗原和部分激素等肿瘤标志物的测定。标本以血液、体液为主。

第一节　甲胎蛋白测定

甲胎蛋白（alpha fetoprotein，AFP）的测定方法有化学发光酶免疫技术、放射免疫技术、酶联免疫吸附试验和金免疫技术。常用测定标本为血液和羊水。

一、化学发光酶免疫技术

【原理】

包被在微粒子上的抗AFP抗体与血清中的AFP、碱性磷酸酶标记抗AFP形成抗体－抗原－抗体复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中AFP含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗AFP抗体包被的微粒子、碱性磷酸酶标记抗AFP抗体、稀释液、底物、AFP校准品、质控品、清洗液等。

【操作】

按照仪器和试剂说明书操作。

二、放射免疫技术

【原理】

待测标本中的AFP和^{125}I－AFP与限量的抗AFP抗体竞争结合，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B、F分离，在γ计数仪上测定每管中结合部分（B）放射性活度，

算出结合率，查标准曲线，求得标本中AFP 的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含马抗人AFP 抗体、^{125}I －AFP 、AFP 标准品、分离试剂。

【操作】

按照仪器和试剂说明书操作。

三、酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：向抗AFP 抗体包被的聚苯乙烯反应板微孔内加入待检标本，再加酶标记抗AFP 抗体，加入酶底物显色，用终止液终止反应，测定吸光度值，查标准曲线，计算待测标本中AFP 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗AFP 抗体包被的聚苯乙烯反应板、AFP 标准品、酶标记抗AFP 抗体、酶底物、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照仪器和试剂说明书。

四、斑点金免疫层析技术

【原理】

标本沿反应条迁移通过胶体金－AFP 抗体结合物包被处，与胶体金－AFP 抗体结合物结合。此混合物继续迁移通过固相包被抗体的检测窗口，如标本中含有AFP ，则与胶金体－AFP 抗体结合，并在检测窗口处被固相包被的抗体捕捉，形成一条红色反应线。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含已包被的试剂条、缓冲液等。

【操作】

按照试剂说明书操作。

【注意事项】

1） 极度溶血标本不能用。

2） 标本中有颗粒物质、红细胞、纤维蛋白或样品浑浊时必须离心后测试。

3） 羊水、母体血液需同时检测AFP 时，应先抽血液，再抽羊水。如羊水中含有胎儿红细胞，会使AFP 值升高。

4） 定性试验时最好以20ng/ml 的AFP 标准品为阳性对照。

【参考值】

正常成人血清：<20ng/ml；母体血清：因孕周不同而异，妊娠中期为90～500ng/ml；羊水：因孕周不同而异。

【临床意义】

1）羊水或母体血清AFP含量检测：AFP含量增多见于胎儿宫内死亡、遗传缺陷、神经管畸形、无脑儿、脊柱裂。AFP含量减少可能为先天愚型。

2）新生儿血清AFP含量检测：心力衰竭肝淤血、胆管闭锁、肝炎等AFP含量增多。

3）儿童期血清AFP含量检测：肝癌、肝母细胞瘤、性腺畸胎母细胞瘤、肝炎等AFP含量增多。

4）成人血清AFP含量检测：70%～90%原发性肝癌患者AFP含量增多；睾丸癌、卵巢肿瘤、恶性畸胎瘤、胰腺癌、胃癌、肠癌、肺癌等患者AFP含量也增多。

5）急慢性肝炎、肝硬化等良性肝病患者血清AFP水平有不同程度升高，但大多低于1000ng/ml，其升高与肝细胞坏死和再生程度有关。

一般，良性肝病AFP含量增多是一过性的，一般持续2～3周。而恶性肿瘤则进行性升高。因此，动态观察血清AFP含量既可鉴别良、恶性肝病，又可早期诊断肝癌。

第二节　甲胎蛋白异质体测定

不同的恶性肿瘤和不同的肝病，其血清中AFP的N－糖链结构不同。可用植物凝集素将甲胎蛋白异质体分成肝型和卵黄囊型。卵黄囊型AFP分子中含有一个N－乙酰葡萄糖，连接于μ－甘露糖，可阻断刀豆素A（Concanavalin A，ConA）在AFP分子上的结合位点，故其AFP的Conon非结合型所占百分率高，可达50%～70%。而肝型AFP由于缺少这一单糖，则可与Con A结合，其Con A非结合型所占百分率仅为10%～20%。因此，可用Con A结合试验来区分原发性肝癌和胚胎性肿瘤。也可用小扁豆凝集素（Lens culinaris agglutinin，LCA）结合于岩藻糖基化的N－乙酰葡萄糖分子上，这种岩藻糖基化的糖链，存在于肿瘤产生的肝型和卵黄囊型AFP分子中，但不存在于良性肝病产生的AFP分子上，因而，LCA结合试验也可用于区分肝脏良、恶性疾病。原发性肝癌时，LCA结合型AFP含量增多。本节介绍亲和交叉免疫电泳法和亲和电泳免疫印迹法检测LCA结合型AFP。

一、亲和交叉免疫电泳法

【原理】

将检样于含LCA的琼脂糖凝胶中电泳，与LCA结合的结合型甲胎蛋白异质体在电

泳时被留在阴极侧，而非结合型甲胎蛋白异质体则向阳极侧泳动。在第一相电泳后的样品中加入微量的标记AFF，再在含抗甲胎蛋白异质体的琼脂糖胶中进行第二相电泳，电泳方向与首次电泳的方向垂直。完毕后用X光胶片感光显影，可使峰带得以清晰显示。根据峰的大小即可了解结合型或非结合型甲胎蛋白异质体所占的比例。

【试剂】

1）LCA。

2）抗AFP血清。

3）10g/L琼脂糖凝胶：琼脂糖1.0g加0.25mol/LpH8.6巴比妥缓冲液100ml，沸水浴中使之融化，按1.0g/L加入叠氮钠，按需要量分装后密封，4℃保存。

4）^{125}I－AFP。

【操作】

1）将10g/L琼脂糖融化后，在6cm×12cm洁净玻板的一侧浇注2cm×12cm（厚约1.6mm）凝胶条（约需3.8ml凝胶液），凝固后于距内缘2～3mm处切割一0.5cm×10cm的槽。

2）用巴比妥缓冲液将LCA稀释成2mg/ml（－20℃可保存1个月），取80μl加入冷至56℃的已融化琼脂糖凝胶1ml中，混匀后浇注于上述槽中。待凝固后，于此胶条上距阴极端0.5cm处打一直径0.2～0.3cm的孔，距此孔4.5cm处打第二个孔。

3）两孔内各加一份待测血清，加样量5～10μl。以1.0g/L溴酚蓝溶液为指示剂，10V/cm稳压电泳，至白蛋白泳出4cm时关闭电源。

4）将抗AFP血清按效价与融化并冷至56℃的琼脂糖胶液混合（琼脂糖最终浓度为9.0g/L，抗AFP达最适浓度），并浇注玻板的其余部分（4cm×12cm），约需含抗血清胶液7.7ml，使凝固。

5）于LCA胶条下1.5mm处空白凝胶内切割一0.2cm×10cm的细槽，槽内注入含有1.0g/L溴酚蓝溶液5μl、－AFP 20μl（约6×10^4～7×10^4cpm）的0.35ml融化的10g/L琼脂糖胶液。电泳方向与第一次电泳呈90°，含I－AFP端接阴极，10V/cm稳压电泳，至白蛋白泳出4cm时终止。

6）电泳结束后，用滤纸覆盖于凝胶板表面，置37℃干燥或80～90℃烤箱中烤干，在暗室覆盖于X光底片，室温曝光48h（如将X光底片放置在增感屏上，则只需曝光24h），经显影、定影后观察。

【结果判断】

将X光胶片置坐标纸上，以峰两侧水平线作基线，峰形下总面积（小格数）为100%，各峰所占面积（小格数）与总面积的百分比即AFP异质体的百分比（靠近点样处的峰为LCA结合型AFP，远离点样处的峰为LCA非结合型AFP）。

二、亲和电泳免疫印迹法

【原理】

将含AFP 的待检血清置于含LCA 的琼脂糖凝胶中电泳。LCA 结合型AFP 泳动速度慢，而LCA 非结合型AFP 泳动速度快，形成前后2 条区带。用吸附有抗人AFP 抗体的硝酸纤维素（NC）膜进行免疫印迹，再依次与酶标记抗人甲胎蛋白异质体抗体和酶底物反应而显色。NC 膜上可呈现2 条着色区带，透明后用光密度计扫描，得出结合型与非结合型甲胎蛋白异质体所占百分比。

【试剂】

1）LCA。

2）马抗人AFP 抗体。

3）酶标兔抗人AFP 抗体。

4）结合马抗人AFP 抗体的硝酸纤维素膜（简称马抗人AFP－NC 膜）：将膜剪裁成与凝胶板相同大小，浸于最适稀释浓度的马抗人溶液中，5min 后取出，电吹风吹干，4℃保存，4 周内稳定。

5）洗涤液：9g/L 氯化钠溶液，含0.05%Tween－20。

【操作】

1）用25mmol/L Tris－巴比妥缓冲液（pH8.6）配制10g/L 琼脂糖凝胶（内含2g/L LCA），浇注玻板。凝胶厚度为1.0mm，长8cm，宽度视标本数而定，一般为1cm 宽/每份标本。在负极侧0.5cm 处，切一条7mm 长、1mm 宽的加样槽，槽内加待检血清4μl。端电压15V/cm，电泳45min。电泳毕取下琼脂糖凝胶板。

2）将马抗人AFP－NC 膜先用蒸馏水浸湿，仔细地覆盖于琼脂糖凝胶板上，再在NC 膜上加数层滤纸，上面置10g/cm^2 的重物。约经30min，凝胶板上AFP 电泳区带即转印至NC 膜上。

3）将免疫印迹的NC 膜浸入含20g/L 牛血清白蛋白的酶标兔抗人AFP 抗体溶液中，经37℃1h 后取出，用洗涤液洗3 次，将NC 膜浸于酶底物溶液中，待显现出两条棕黄色区带后取出，用蒸馏水冲洗数次，终止反应。

4）在阴极侧的区带为LCA 结合型AFP；阳极侧的区带为LCA 非结合型AFP。NC 膜在空气中干燥后，用十氢萘透明，用光密度计在波长490nm 下扫描，打印出两条区带的百分数。

【注意事项】

1）用LCA 结合试验区别肝脏良、恶性疾病优于ConA 结合试验。原发性肝癌时，LCA 结合型AFP 含量显著增多。

(2) 亲和电泳免疫印迹法中，电泳结果有时会出现3 条带，从阳极处开始依次为AFP $-L_1$ (非结合型)、AFP $-L_2$、AFP $-L_3$ (结合型)，AFP $-L_2$ 常出现在生殖细胞肿瘤患者血清中。

【参考值】

正常为阴性。

【临床意义】

主要用于鉴别原发性肝癌、良性肝病以及生殖细胞肿瘤。若LCA 结合型AFP > 0.25，提示为原发性肝癌，其阳性率为0.862～0.950 (86.2%～95.0%)，肝硬化患者血清和脐带血则以LCA 非结合型为主。

第三节　癌胚抗原测定

一、化学发光酶免疫技术

【原理】

抗癌胚抗原 (CEA) 抗体包被的微粒子与血清中的CEA、碱性磷酸酶标记抗CEA 抗体形成抗体－抗原－抗体复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中CEA 含量。

【试剂】

与仪器配套的试剂盒一般包含稀释液、抗CEA 抗体包被微粒子、碱性磷酸酶标记抗CEA 抗体、底物、CEA 标准品、质控品、清洗液等。

【操作】

按照仪器和试剂说明书操作。

二、放射免疫技术

【原理】

待测标本中的CEA 和I－CEA 与限量的抗人CEA 抗体竞争结合。当反应平衡后，加分离剂进行B、F 分离，测定最大结合管放射性强度 (B_0) 和各管结合部分的放射性活度 (B)，算出结合率 (B/B_0)，制作标准曲线，求得标本中CEA 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗人CEA 抗体、I－CEA、CEA 标准品 (S_1～S_6)、分离试剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

三、酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：向抗CEA 抗体包被的聚苯乙烯反应板微孔内加入待检标本，再加酶标记抗CEA 抗体，加入底物显色，用终止液终止反应，测定吸光度值，查标准曲线，计算待测标本中CEA 的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗CEA 抗体包被的聚苯乙烯反应板，CEA 标准品、酶标记抗CEA 抗体、酶底物、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

正常人＜3.0 μg/L ；吸烟者＜5.5 μg/L 。

【临床意义】

(1) 多种恶性肿瘤患者CEA 含量均增多。由于其特异性较差，且常在肿瘤晚期才升高，故仅作为肿瘤过筛试验。在结直肠癌患者中，CEA 含量与Duke 分期有关，病变越晚期血清CEA 含量越高，特别是当肿瘤有远距离转移时，CEA 含量明显增多，因此可作为临床预后判断、疗效观察、肿瘤转移和复发的监测指标。在肠道外肿瘤中，肺癌、胃癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、骨肉瘤、肝癌、膀胱癌等恶性肿瘤患者血清CEA 含量均可增多。CEA 含量如高于正常的5 ～10 倍，强烈提示肠癌或其他肿瘤可能。结肠癌完全切除后，CEA 恢复到正常需10d ～1 个月，肺癌完全切除后则需3 个月CEA 含量方可降至正常。

(2) 肠道炎症、肾功能不全、结肠息肉、肝硬化、慢性肝炎、闭锁性黄疸等患者的CEA 含量也会增多。

第四节　人绒毛膜促性腺激素测定

人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin，HCG）是滋养层细胞分泌的、由α、β两个亚单位构成的糖蛋白。α亚单位由92 个氨基酸组成，分子量16000u，β亚单位由145 个氨基酸组成，分子量23000u。人绒毛膜促性腺激素β亚单位（β－HCG）由人体胎盘滋养层细胞产生，其抗原特异性强，能将与α－HCG 链相类似的促黄体生成

素（LH）、促卵泡激素（FSH）、甲状腺刺激激素（TSH）等区分开来，因此采用抗β-HCG抗体测出的HCG含量，能更精确地反映血、尿中HCG的浓度，对滋养层细胞肿瘤的监测、早孕的诊断有重要意义。HCG的检测方法有化学发光免疫技术、放射免疫技术、酶联免疫吸附试验和金免疫技术等。

一、荧光酶免疫技术

【原理】

包被在微粒子上抗β-HCG抗体与标本中的β-HCG、碱性磷酸酶标记抗β-HCG抗体形成抗体－抗原－抗体复合物。该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度。根据标准曲线计算待测标本中HCG含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含稀释液、抗β-HCG抗体包被的微粒子、碱性磷酸酶标记抗β-HCG抗体、底物、HCG标准品、质控品、清洗液（玻璃纤维杯清洗液、管路冲洗液）等。

【操作】

按照仪器和试剂说明书操作。

二、放射免疫技术

【原理】

采用I标记的β-HCG和标本中的β-HCG竞争结合抗β-HCG抗体，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B、F分离，测定最大结合管放射性强度（B_0）和每管中沉淀物放射性活度（B），算出结合率（B/B_0），制作标准曲线，计算出HCG的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含I标记β-HCG、抗β-HCG抗体、HCG标准品、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

三、酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA双抗体夹心法：向抗β-HCG单克隆抗体包被的聚苯乙烯反应板微孔中加入标本，使标本中的HCG与包被抗体结合，再加上酶标记β-HCG抗体，形成双抗体夹心复合物，加入底物，用终止液终止反应，测定吸光度值，查标准曲线计算标本中

HCG 的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗β—HCG 单克隆抗体包被的聚苯乙烯反应板、酶标记抗体、标准品、显色剂、终止液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

四、斑点金免疫渗滤试验

【原理】

用抗β—HCG 抗体结合在微孔滤膜中央，滴加待检血清，若标本中含有HCG，则与膜上抗β—HCG 抗体结合，然后滴加胶体金标抗HCG 抗体，加洗涤液洗涤后，阳性者即在滤膜中央呈红色反应斑点。

【试剂】

本法已有成套试剂盒供应。试剂盒主要由滴金反应板、胶体金标记物、洗涤液、抗原参照品或抗体阳性对照品等组成。

【操作】

按斑点金免疫渗滤试验操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【结果判断】

在滤膜中央有清晰的淡红色或红色斑点显示者判为阳性反应，反之则为阴性反应。斑点呈色的深浅相应地提示阳性强度。

【参考值】

尿液：阴性。

血清：男性<5IU/L；正常未妊娠妇女<7IU/L；妊娠妇女>50IU/L（不同孕周和不同年龄孕妇含量亦不同）；女性若7IU/L <HCG <50IU/L 时应注意随访。

【临床意义】

1）诊断早孕（末次月经后30～35d 即可阳性）；监测先兆流产、异位妊娠。

2）诊断滋养层细胞肿瘤，并进行疗效监测：绒毛膜上皮细胞癌、葡萄胎早期，血中HCG 含量增多。化疗或刮宫术后HCG 含量明显减少。如治疗后HCG 含量减少不明显，提示疗效不佳；治疗后HCG 含量减少，后又见增多，常提示复发。

3）畸胎瘤、睾丸非精原细胞癌、胚胎性肿瘤患者HCG 含量可增多，与AFP 联合检测可提高检出率。通常胚胎癌AFP 和HCG 均升高；绒毛膜癌HCG 高于妊娠早期而AFP 常低于妊娠中期；卵黄囊肿瘤AFP 常阳性，而HCG 则阴性；分化的畸胎瘤AFP 和HCG 常均为阴性。

第五节　前列腺特异性抗原测定

在血清中，前列腺特异性抗原（prostate special antigen，PSA）存在的形式有3种：与α_1－抗凝乳蛋白酶结合的PSA（PSA－ACT）、游离的PSA（FPSA）和由α_2－巨球蛋白包裹的PSA，免疫学测定中测定的总PSA（TPSA）包含前两种PSA。FPSA无酶的活性。当前列腺病变时，PSA含量显著增高。常用的检测方法有荧光酶免疫测定、放射免疫技术、酶联免疫吸附试验、金免疫技术等。由于TPSA和FPSA的检测方法基本相似，本节以TPSA为例介绍常用的测定方法。

一、荧光酶免疫技术

【原理】

抗PSA抗体包被在微粒子上与血清中的PSA以及碱性磷酸酶标记抗PSA抗体形成抗体－抗原－抗体复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中PSA含量。

【试剂】

与仪器配套的试剂盒，一般包含稀释液、抗PSA抗体包被微粒子、碱性磷酸酶标记抗PSA抗体、底物、PSA标准品、质控品、清洗液等。

【操作】

按照仪器和试剂说明书操作。

二、放射免疫技术

【原理】

待测标本中的PSA和Ⅰ－PSA与限量的抗人PSA抗体竞争结合，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B、F分离，测定最大结合管放射性强度（B_0）和每管中沉淀物放射性活度（B），算出结合率（B/B_0），制作标准曲线，计算出待测标本中PSA含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗人PSA抗体、Ⅰ－PSA、PSA标准品、分离试剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

三、酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：向抗PSA 抗体包被的聚苯乙烯反应板微孔内加入待检标本，再加酶标记抗PSA 抗体，加入底物显色，用终止液终止反应，测定吸光度值，查标准曲线，计算待测标本中PSA 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗PSA 抗体包被的聚苯乙烯反应板、PSA 标准品、酶标记抗PSA 抗体、酶底物 (显色液) 、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

TPSA ：0～4 μg/L ；FPSA ：0～0.93 μg/L 。

【临床意义】

1) 生理性升高：直肠指检、前列腺穿刺、前列腺按摩均可使血液中PSA 含量增多。PSA 检测应于直肠癌指检2～3d 后或前列腺穿刺2 周后进行。

2) 良性疾病：前列腺增生、急性前列腺炎、慢性前列腺炎等患者血液中PSA 含量增多。

3) 恶性肿瘤：约70 %的前列腺癌患者PSA 含量高于参考值上限，已转移者阳性率可达91.7 %～100 %。美国癌症学会建议，在50 岁甚至更小年龄的高危男性人群中每年做直肠指检和PSA 检查以早期发现前列腺癌。

4) 鉴别前列腺良性与恶性疾病。当FPSA/TPSA 的比值＞0.25 时，常提示良性疾患，当比值＜0.10 时，则提示为恶性疾病。但当TPSA ＞10 μg/L 以上时要高度警惕前列腺癌变。

第六节　肿瘤糖类抗原测定

一、CA19 －测定

1979 年Koprowski 等用结肠癌细胞免疫鼠并与骨髓瘤杂交所得1116NS19.9 的单克隆抗体，其识别的抗原为CA19 －9 。这是一种黏蛋白型的糖蛋白类肿瘤标记物，在血清中以唾液黏蛋白形式存在。消化道腺癌患者血清中CA19 －9 含量可明显升高，其是胰腺癌、结肠癌、直肠癌、胃癌和胆管癌的血清标志物。常用的检测方法有荧光酶免疫测定、放射免疫技术、酶联免疫吸附试验等。

㈠ 荧光酶免疫测定

【原理】

包被在微粒子上的抗CA19 —9 抗体与血清中的CA19 —9 以及碱性磷酸酶标记抗CA19 —9 抗体形成抗体－抗原－抗体复合物。该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4 －甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中CA19 —9 含量。

【试剂】

与仪器配套的试剂盒一般包含稀释液、包被在微粒子上抗CA19 —9 抗体、碱性磷酸酶标记抗CA19 —9 抗体、底物、标准品、质控品、清洗液等。

【操作】

按照仪器和试剂说明书操作。

㈡ 放射免疫分析

【原理】

待测标本中的CA19 —9 和I —CA19 —9 与限量的抗人CA19 —9 抗体竞争结合，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B 、F 分离，测定最大结合管放射性强度 （B_0） 和每管中沉淀物放射性活度 （B），算出结合率 （B/B_0），制作标准曲线，计算出待测标本中CA19 —9 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗人CA19 —9 抗体、 I —CA19 —9 、CA19 —9 标准品、分离试剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

㈢ 酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 双抗体夹心法：分别向抗CA19 —9 抗体包被的聚苯乙烯反应板各微孔内加入标准品和标本，再加入酶标记抗CA19 —9 抗体与之结合形成双抗体夹心，加入底物显色。在一定波长下测其吸光度，计算其中CA19 —9 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗CA19 —9 抗体包被的聚苯乙烯反应板、CA19 —9 标准品、酶标记抗CA19 —9 抗体、酶底物 （显色液） 、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

正常值<37U/ml；警示值>70U/ml。

【临床意义】

(1) 诊断消化道恶性肿瘤：胰腺癌、胆道系统癌、胃癌、结肠癌等患者CA19-9 含量增多。其含量与肿瘤的分期有关，晚期患者CA19-9 值更高。肝癌患者阳性率也较高。部分卵巢癌、乳腺癌CA19-9 也可升高。

(2) 诊断胰腺癌：CA19-9 >70U/ml 可作为胰腺癌的诊断标准之一。黄疸亦可导致CA19-9 升高，与CA242 联合检测可资鉴别。CA19-9 敏感性较高，CA242 特异性较好，两者结合对导致阻塞性黄疸的良、恶性疾病可进行鉴别。

(3) 良性疾病：胆石症引起的黄疸、胆囊炎、肝炎、胰腺炎等患者CA19-9 含量可升高。Lewis 血型者CA19-9 也可升高。

二、CA242 测定

CA242 是由人体直肠癌细胞系colo205 单克隆抗体识别的抗原，是一种唾液酸化的糖类抗原，其抗原表型与CA19-9、CA50 相关但不完全相同。诊断消化系统肿瘤，CA242 的敏感性低于CA19-9，但特异性高于CA19-9，且与胆汁淤积程度无关，故在对导致阻塞性黄疸的良性与恶性疾病鉴别方面优于CA19-9。常用检测方法有放射免疫技术和酶联免疫吸附试验。

(一) 放射免疫技术

【原理】

待测标本中的CA242 和I-CA242 与限量的抗人CA242 抗体竞争结合，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B、F 分离，测定最大结合管放射性强度（B_0）和每管中沉淀物放射性活度（B），算出结合率（B/B_0），制作标准曲线，计算出待测标本中CA242 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗人CA242 抗体、I-CA242、CA242 标准品、分离试剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

(二) 酶联免疫吸附试验

【原理】

采用双抗体夹心法：标准品和待测标本中CA242 分别与包被在各反应孔中的抗CA242 抗体结合后，再与酶标记抗人CA242 抗体结合，加入底物显色。在一定波长下测其吸光度，计算其中CA242 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗CA242 抗体包被的聚苯乙烯反应板、CA242 标准品、酶标记抗CA242 抗体、酶底物、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

<17U／ml。

【临床意义】

(1) 胰腺癌患者CA242 增多，阳性率为86.2％，结肠癌及直肠癌患者CA242 增多，阳性率为62％，并与肿瘤分期有关。胃癌患者CA242 增多，异常率为32％。在消化道腺癌患者中，当有肝转移或远距离转移时CA242 含量显著增多。CA242 受胆汁淤积影响不大，与CA19－9 联合检测时可提高诊断特异性。肝癌、肺癌患者CA242 也可升高。

(2) 正常人群中约有4％左右的人CA242 含量增多。

三、CA50 测定

1983 年Lindholn 从人结肠、直肠癌colo－205 的单克隆抗体中筛选出一株对结、直肠癌有强烈反应的抗CA50 单克隆抗体，其识别的抗原称为CA50。CA50 存在于细胞膜内，其抗原决定簇有唾液酸化Lewis－a 和唾液酸化四乳糖。已发现在胰腺癌、胃癌、结肠癌和肝癌等胃肠系统肿瘤及子宫癌组织中存在CA50，它对这些肿瘤的诊断、监测有一定的应用价值。常用的测定方法有放射免疫技术、酶联免疫吸附试验等。

(一) 放射免疫技术

【原理】

待测标本中的CA50 和I－CA50 与限量的抗人CA50 抗体竞争结合，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B、F 分离，测定最大结合管放射性强度（B_0）和每管中沉淀物放射性活度（B），算出结合率（B/B_0），制作标准曲线，计算出待测标本中CA50 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗人CA50 抗体、I－CA50、CA50 标准品、分离试剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

(二) 酶联免疫吸附试验

【原理】

采用双抗体夹心法：标准品和待测标本中CA50 分别与包被在各反应孔中的抗CA50 抗体结合后，再与酶标记抗人CA50 抗体结合，加入底物显色。在一定波长下测其吸光度，计算其中CA50 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗CA50 抗体包被的聚苯乙烯反应板、CA50 标准品、酶标记抗CA50 抗体、酶底物、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

<20U/ml。

【临床意义】

与CA19—9 相近，在胰腺癌、肝胆系统恶性肿瘤患者中的异常率分别为85%和80%，在胃癌、肺癌和卵巢癌患者血清中也有异常表达。

四、CA125 测定

1981 年Bast 等发现人卵巢浆液抗原可被OC125 抗体识别，故称CA125，这是分子量为200～1000u 的糖蛋白，在卵巢上皮细胞恶性肿瘤组织中有很高的表达。测定方法有荧光酶免疫测定、放射免疫技术及酶联免疫吸附试验等。具体原理与操作见有关章节和试剂盒说明书。

【参考值】

<35U/ml。

【临床意义】

(1) 主要用于卵巢上皮细胞恶性肿瘤患者病程监测。血清CA125 含量异常检出率与卵巢癌患者的病程高度相关，越是晚期，CA125 含量异常检出率越高。持续高水平的CA125 预示治疗无效，CA125 水平下降，则说明治疗有效。CA125 与肿瘤的负荷和预后有关，如CA125 含量≥35U/ml，可能有肿瘤残留。在监测肿瘤复发、转移时，CA125 的诊断准确性约为75%。

(2) 非卵巢性恶性肿瘤患者血清CA125 含量也可增高，胰腺、肝脏、肺、胃肠道、子宫和乳腺癌症患者血清CA125 增高异常率分别为73%、70%、53%、27%、22%和20%。

（3）其他疾病患者血清CA125 含量也可升高，如子宫内膜异位、肝硬化、肝炎、心包炎、妊娠早期及月经周期中的滤泡期等，特别是子宫内膜异位症患者CA125 可高达300U／ml 以上，故在诊断上应注意鉴别。

五、CA153 测定

1984 年以人乳脂肪球膜上糖蛋白制成的小鼠单克隆抗体115 －D_2 和肝转移性乳癌细胞膜制成的单克隆抗体DF_3 所识别的抗原称CA153。CA153 主要是乳腺癌的标志物，其测定标本以血清为主，测定方法有荧光酶免疫测定、放射免疫技术及酶联免疫吸附试验等。具体原理与操作见有关章节和试剂盒说明书。

【参考值】

<28U／ml。

【临床意义】

（1）乳腺癌：CA153 作为乳腺癌早期诊断指标仍有一定局限性，目前主要用于乳腺癌疗效的监测和预后的评估。有20％左右未转移的乳腺癌患者血清CA153 含量增高，而转移者的异常率为63％～80％。

（2）其他恶性肿瘤：卵巢癌、胃癌患者血清中CA153 含量也可增高。

（3）乳腺癌术后有无残留的评估：乳腺癌术后若CA153 含量增高说明有肿瘤残留。

第七节　神经元特异性烯醇化酶测定

神经元特异性烯醇化酶（Neuron specific enolase，NSE）是烯醇化酶的一种同工酶，其分子量约为78000u，是一种酸性蛋白酶，能酵解糖，主要作用是催化2－磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸。当肿瘤糖酵解作用加强、细胞增殖周期加快时，细胞内NSE 分泌增多，进入血液也增多。据研究，小细胞肺癌是一种能分泌NSE 的神经内分泌性肿瘤，检测血清中NSE 的水平，对小细胞肺癌的诊断、鉴别、病情监测和疗效评估均有重要价值。目前检测NSE 的方法有放射免疫技术、酶联免疫吸附试验和荧光酶免疫测定等。

（一）放射免疫技术

【原理】

待测标本中的NSE 和 I －NSE 与限量的抗人NSE 抗体竞争结合，当反应平衡后，加入分离试剂，进行B、F 分离，测定最大结合管放射性强度（B_0）和每管中沉淀物放射性活度（B），算出结合率（B/B_0），制作标准曲线，计算出待测标本中NSE 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗人NSE 抗体、 I －NSE 、SE 标准品、分离试剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

(二) 酶联免疫吸附试验

【原理】

采用双抗体夹心法：标准品和待测标本中NSE 分别与包被在各反应孔中的抗NSE 抗体结合后，再与酶标记抗人NSE 抗体结合，加入底物显色。在一定波长下测其吸光度，计算其中NSE 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗NSE 抗体包被的聚苯乙烯反应板、NSE 标准品、酶标记抗NSE 抗体、酶底物、终止液、浓缩洗涤液等。

【操作】

按ELISA 双抗体夹心法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1) 血清中NSE 易失活，如不立即测定，应立即分离血清，置－20 ℃冰冻保存。

2) 重度溶血标本可使NSE 测定值偏高，应避免溶血。

3) 如标本中NSE 含量＞100 μg/L ，可用样品稀释液进行适当稀释后重测。

【参考值】

＜20 μg/L 。

【临床意义】

1) 可用于小细胞肺癌的鉴别诊断和监测小细胞肺癌复发。

2) 可用于神经母细胞瘤的诊断及监测病情、评价疗效和预报复发。

3) 神经内分泌细胞肿瘤如嗜铬细胞瘤、胰岛细胞瘤、甲状腺髓样癌、黑色素瘤及视网膜细胞瘤等患者血清中NSE 含量增加。

4) 脑外伤或脑肿瘤患者脑脊液中NsE 含量也增加，有诊断价值。

第八节　EB 病毒检测

鼻咽癌患者血清中含有高效价的EB 病毒的多种抗体。其中抗EB 病毒衣壳抗原（VCA） 抗体IgA 对鼻咽癌的诊断有很高的敏感性，而抗EB 病毒早期蛋白抗原 （EA） 抗

体IgA 对鼻咽癌具有较高的特异性。抗VCA 抗体IgA 和抗EA 抗体IgA 常用的检测方法有酶联免疫吸附试验和酶免疫组化技术。

一、抗EB 病毒衣壳抗原抗体IgA 测定

(一) 酶免疫组化技术

【原理】

用带EB 病毒衣壳抗原 (VCA) 的类淋巴母细胞株作抗原靶细胞，以辣根过氧化物酶标记羊抗人IgA 抗体检测人血清中抗VCA 抗体IgA。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含EB 病毒抗原靶细胞涂片、辣根过氧化物酶标记羊抗人IgA 抗体、酶标抗体稀释液、3—3′二氨基联苯胺、底物缓冲液等。

【操作】

按试剂说明书操作。一般步骤为：

1) 细胞涂片从冷存处取出，室温电吹风吹干，去除水汽。

2) 用pH7.4 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液将待检血清作1∶5、1∶10 (如初试抗体效价>1∶10 再将血清继续稀释至能测得抗体阳性的终点稀释度) 稀释，滴加于细胞涂片各小孔内，右侧两孔分别加EB 病毒IgA 阳性对照血清和磷酸盐缓冲液阴性对照，不使溢出。

3) 放37℃湿盒作用30min，用上述磷酸盐缓冲液轻洗3 次，每次5min，末次洗后吹干。

4) 滴加酶标抗体于各小孔内，放37℃湿盒中作用60min，同法轻洗3 次，待显色。

5) 将少量底物缓冲液加入二氨基联苯胺的安瓿中使充分溶解，再混匀在总量为10ml 的底物缓冲液中。

6) 将3%过氧化氢溶液用蒸馏水作10 倍稀释，吸0.1ml 加入已溶解的二氨基联苯胺溶液中，混匀，滴加于待显色的涂片上，使各孔浸没，避光作用15～20min。本液于临用前配制。

7) 倾去显色液，置于无水乙醇中浸3min 脱水。

8) 滴加中性树胶于涂片上，加盖玻片封固。

9) 用普通显微镜观察结果。

【结果判定】

阴性细胞：细胞不着色，或呈浅棕色的背景颜色。

阳性细胞：棕色的细胞，在胞膜周围着色较深，按阳性细胞的数量和着色的强度划分＋＋＋＋～＋阳性共4 级：①＋＋＋＋：每低倍镜视野散布100 个以上的阳性细胞，呈深棕色；②＋＋＋：每低倍镜视野有数十个阳性细胞，呈棕色；③＋＋：每低倍镜视野散布少数阳性细胞，呈浅咖啡色；④＋：在若干个低倍镜视野有少数阳性细胞，呈淡咖啡色。

【注意事项】

1）选取VC 病毒IgA 阳性患者血清作阳性对照；

2）温育时间不能随意改变。

㈡ 酶联免疫吸附试验

【原理】

ELISA 间接法：向EB 病毒VCA 抗原包被的聚苯乙烯反应板微孔内加入待检标本，若待检标本中存在特异性抗体，就能与固相上的抗原结合，形成抗原－抗体复合物，洗板后，与加入的辣根过氧化物酶标记羊抗人IgA 抗体结合，经显色后根据各标本管不同的吸光度值在标准曲线上查出其相应抗VCA 抗体IgA 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含VCA 抗原包被的聚苯乙烯反应板、标准品、辣根过氧化物酶标记羊抗人IgA 抗体、酶底物、终止液、浓缩洗涤液、质控液、标本稀释液等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

酶免疫组化技术：＜1 ∶10 ；酶联免疫吸附试验：＜10U／ml。

二、抗EB 病毒早期蛋白抗原抗体IgA 测定

㈠ 酶免疫组化技术

抗EA 抗体IgA 检测参照试剂说明书。

除玻片上靶细胞不同，其余试剂和操作步骤同抗VCA 抗体IgA 测定。

㈡ 酶联免疫吸附试验

抗EA 抗体IgA 检测参照试剂说明书。

除标准品、包被的酶标板不同，其余试剂和操作步骤均同抗VCA 抗体IgA 测定。

【参考值】

酶免疫组化技术：＜1 ∶10 ；酶联免疫吸附试验：＜10U／ml。

【临床意义】

1）鼻咽癌患者治疗前血清中抗VCA 抗体IgA 显著升高，酶免疫组化技术检出率达92.5％，且与临床分期、淋巴结转移、肿瘤复发相关，治疗后多数患者明显下降。抗VCA 抗体IgA 的出现可先于临床确诊10～16 个月。抗EA 抗体IgA 为EB 病毒早期抗体，在鼻咽癌患者中有显著的特异性。因此，抗VCA 抗体IgA 和抗EA 抗体IgA 同时检测对鼻咽癌的早期诊断有重要的辅助作用。

2）其他肿瘤中抗VCA 抗体IgA 也可升高，其异常率分别为：腮腺癌33.3％、颌下腺癌28.6％、鼻腔癌20.0％、扁桃腺癌14.3％、腮腺混合瘤11.8％、肺癌9.20％。故抗VCA 抗体IgA 阳性的非鼻咽癌患者应注意其他部位的检查。

3）鼻咽部感染、传染性单核细胞增多症亦可见抗VCA 抗体IgA 一过性升高。

第九节　血清铁蛋白测定

铁蛋白可分为H 亚基和L 亚基，L 亚基在肝、脾和血清中较多，而H 亚基在心、肾、胰和胎儿组织中较多。在许多肿瘤患者血清中发现H 亚基铁蛋白，类似于胎儿组织中的铁蛋白，故可视为一种癌胚蛋白。血清铁蛋白（serum ferritin，SF）的常用测定方法为荧光酶免疫测定和放射免疫技术。

一、荧光酶免疫技术

【原理】

包被在微粒子上的抗铁蛋白抗体与血清中的铁蛋白、碱性磷酸酶标记抗铁蛋白抗体形成抗体－抗原－抗体复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中铁蛋白的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含SF 标准品、质控品、抗SF 抗体包被的磁粒子、碱性磷酸酶标记抗SF 抗体、标本稀释液、发光底物、清洗液及缓冲液等。

【操作】

参照仪器和试剂说明书操作。

二、放射免疫技术

【原理】

待测标本中的铁蛋白和Ⅰ－铁蛋白与限量的抗人铁蛋白抗体竞争结合，当反应平衡

后，加入分离试剂，进行B、F 分离，测定最大结合管放射性强度（B_0）和每管中沉淀物放射性活度（B），算出结合率（B/B_0），制作标准曲线，计算出待测标本中SF 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含Ⅰ－铁蛋白、抗铁蛋白抗体、铁蛋白标准品、分离试剂。

【操作】

参照试剂盒说明书。

【参考值】

成年男性：100.0 ±40.0 μg/L；成年女性：绝经前6.9～282.5 μg/L；绝经后：14.0～233.1 μg/L。各实验室应建立自己的参考值。

【临床意义】

（1）恶性肿瘤：SF 与AFP 联合检测可提高原发性肝癌的检出率。肺癌、胰腺癌、白血病、霍奇金病、乳腺癌和卵巢癌等患者SF 含量亦可升高，有效治疗后SF 含量下降。

（2）肝脏疾病：急性肝炎和慢性活动性肝炎患者SF 含量明显升高，但慢性肝炎、肝硬化患者SF 含量也有所升高。

（3）缺铁性贫血：缺铁性贫血患者SF 含量下降（<10 μg/L）。SF 与平均红细胞体积、总铁结合力等及直接骨髓检查联合检测，是缺铁性贫血、隐性缺铁诊断和疗效观察的有效指标。

第十节　鳞状细胞癌抗原测定

鳞状细胞癌抗原（squamous cell carcinoma antigen，SCC）是一种分子量为48000u 的糖蛋白，从子宫颈鳞状细胞组织中分离出来，属于肿瘤相关抗原TA －4 的亚段，存在于鳞状细胞的胞浆内。SCC 是一种特异性较好的鳞状细胞癌标志物，但诊断敏感性相对较低。其常用测定方法有荧光酶免疫测定。

【原理】

抗SCC 抗体包被在微粒子上与血清中的SCC、碱性磷酸酶标记抗SCC 抗体形成抗体－抗原－抗体复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中SCC 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗SCC 抗体包被的微粒子、碱性磷酸酶标记抗SCC 抗体、稀释液、底物、SCC 标准品、质控品、清洗液等。

【操作】

参照试剂盒说明书。

【参考值】

<1.5 μg/L。

【临床意义】

1）宫颈鳞状细胞癌患者血清中SCC 含量增多，敏感性为73.4％，特异性为96.1％。

2）肺鳞状细胞癌患者血清中SCC 含量亦明显增多（阳性率为69.9％），且增多程度与病程相关。其他组织的鳞状细胞癌也可出现SCC 含量增多。

第十一节　肿瘤标志物的联合检测

在本章第一节中已经提到，肿瘤标志物的联合检测既可提高肿瘤的检出率，又可提高诊断的特异性，对肿瘤诊断、疗效观察、预后监测等方面有很重要的意义。现推荐常用的几种肿瘤标志物联合检测的组合模式（表5－8－1），仅供参考。

表5－8－1　肿瘤标志物联合检测组合模式

肿瘤部位	组织学类型	常用联合检测项目
肝	肝细胞癌	AFP、AFP 异质体、SF、AFU＊
	转移性肝癌	CEA、CA19－9
肺	鳞癌	SCC、CEA
	腺癌、小细胞肺癌	CEA、NSE
乳腺	腺癌	CA153、CEA、CA19－9、CA125
胃	腺癌	CA19－9、CEA、CA242、CA50、CA72－4
结肠、直肠	腺癌	CA19－9、CEA、CA242、CA50
胰腺	腺癌	CA19－9、CA242、CEA
前列腺	腺癌	TPSA、FPSA、PAP＊＊
卵巢	上皮细胞肿瘤	CA125、CA19－9、CA153
	胚胎癌	AFP、HCG
	腺癌	CEA、CA19－9、CA153
子宫	鳞癌	SCC
	绒毛膜癌	HCG、AFP、CEA
睾丸	非精原细胞癌	AFP、HCG
	精原细胞癌	HCG

注：＊AFU 为α－岩藻糖苷酶；＊＊PAP 为前列腺酸性磷酸酶

第九章　激素测定

第一节　甲状腺激素测定

甲状腺激素主要有3，5，3′，5′四碘甲状腺原氨酸即甲状腺素（T_4）、3，，3′三碘甲状腺原氨酸（T_3）和3.3′，5′三碘甲状腺原氨酸（rT_3），它们分泌人血循环后大部分即与特异的蛋白质［主要是甲状腺结合球蛋白（TBG）］结合，未与血浆蛋白结合的为游离型甲状腺激素（FT_3、FT_4）。与血浆蛋白结合的激素不具有生物学活性，只有游离型甲状腺激素才能对机体组织发挥生物学效应。

一、三碘甲状腺原氨酸测定

3，5，3′三碘甲状腺原氨酸（triiodothyronine，T_3）约10％～20％由甲状腺合成分泌，80％～90％由T_4在外周组织中脱碘形成。进入血液后，大部分的T_3是与TBG结合的。目前常用的检测方法有放射免疫技术、酶联免疫吸附试验、荧光酶免疫测定等。

（一）放射免疫技术

【原理】

采用8－苯胺－1－萘磺酸（ANS）作阻断剂，将待测标本中的T_3从血清结合蛋白上解离下来，解离出来的T_3与I标记的T_3共同与限量的抗T_3血清在适宜的条件下竞争性结合，当反应达到动态平衡后进行B、F分离，测定结合部分（B）放射性活度。通过标准曲线求出待测标本中的T_3含量。

【试剂】

商品化试剂盒，一般包含：I－T_3、T_3标准品、抗T_3抗体、免疫分离剂。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

1.2～3.4nmol/L（0.8～2.2μg/L）

【注意事项】

1）待测血清在4 ℃保存可稳定3d，若置－20 ℃可保存1 个月。

2）试剂盒启封后所有试剂应避光贮存于2～8 ℃，且不同批号试剂不可混用。

3）不同条件下其参考值有所差异，应建立自己实验室的参考值。

（二）化学发光免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗T_3 抗体与待测T_3 及碱性磷酸酶标记抗T_3 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中T_3 的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含T_3 标准品、质控品、抗T_3 抗体包被的磁粒子、碱性磷酸酶标记抗T_3 抗体、标本稀释液、发光底物、清洗液及缓冲液等。

【操作】

参照仪器和试剂盒说明。

【参考值】

0.6～1.81 μg/L。

【注意事项】

1）血清标本在室温下放置不超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低温保存。避免反复冻融。

2）当使用新批号的试剂时，先将标准曲线的条码扫描入仪器，定标后尚需做质控，然后才可做临床标本。

【临床意义】

1.TT_3 水平升高

1）甲状腺功能亢进症（以下简称甲亢）：T_3 值是早期诊断甲状腺功能亢进症的灵敏指标，常早于或大于T_4 含量的增高。

2）T_3 型甲亢：临床上有甲亢的症状及体征，但TT_4、FT_4 水平不增高或轻度增高，TT_3 明显增高，可达正常人的4 倍。

3）高甲状腺结合球蛋白血症：甲状腺结合球蛋白（TBG）与TT_3 有很强的亲和力，故凡是能使TBG 水平升高的因素如妊娠、葡萄胎、可产生雌激素的肿瘤、淋巴肉瘤、血卟啉病、口服避孕药、雌激素治疗及遗传性TBG 增多症等因素均可引起血中TT_3 水平增高。

4）抗甲状腺药物治疗甲亢疗效评价：甲亢在抗甲状腺药物治疗过程中，TT_3、TT_4 的下降早于临床症状的改善，当症状控制后，TT_3、TT_4 可下降至正常水平。如果TT_3 仍

然偏高，不论TT_4是否趋向正常，仍应判断为甲亢未得到有效控制。对于治疗后的甲亢，若患者血清T_4升高之前先有T_3升高，则复发的可能性大。

5）亚急性甲状腺炎：在病期的一段时间内，由于甲状腺滤泡被破坏，甲状腺激素释放增多，血清TT_3、TT_4增高。炎症控制后可恢复至正常。甲状腺吸I率降低。

2.TT_3水平降低

1）甲状腺功能减退症（甲减）：甲减患者TT_3水平降低但下降幅度不如TT_4明显。

2）低T_3综合征：TT_3水平降低，同时TT_4水平低下或正常、rT_3增高、促甲状腺素水平正常、FT_4水平正常。某些非甲状腺疾病如肝硬化、心肌梗死、慢性肾功能衰竭、糖尿病、恶性肿瘤、严重应激反应、饥饿、剧烈运动等时均可出现低T_3综合征。

二、甲状腺素测定

甲状腺素（thyroxine，T_4）是甲状腺分泌最多的一种激素，它的生物学活性虽低于T_3，但在血中含量比T_3大60～80倍。约80%的T_4在外周组织中脱去1个碘原子，转变成T_3和rT_3。在正常情况下，T_4大部分与TBG结合。因此，TBG含量和结合力的改变对血中T_4影响很大。常用的检测方法有放射免疫技术、荧光酶免疫测定、酶联免疫吸附试验等。

（一）放射免疫技术

【原理】

采用8－苯胺－1－萘磺酸（ANS）作阻断剂，将待测标本中的T_4从血清结合蛋白上解离下来，解离出来的T_4与I标记的T_4共同与限量的抗T_4血清在适宜的条件下竞争性结合。当反应达到动态平衡后进行B、F分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的T_4含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括I标记T_4、T_4标准品、抗T_4抗体、免疫分离剂等。

【操作】

参照试剂盒说明书。

【参考值】

55～176nmol/L（42～135μg/L）。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗T_4抗体与待测T_4及碱性磷酸酶标记抗T_4抗

体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中T_4的含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含T_4标准品、质控品、抗T_4抗体包被的磁粒子、碱性磷酸酶标记抗T_4抗体、标本稀释液、发光底物、清洗液及缓冲液等。

【操作】

参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1）待测血清标本在4 ℃保存，置－20 ℃可保存1 个月。

2）试剂盒启封后所有试剂应避光贮存于2～8 ℃，且不同批号试剂不可混用。

3）不同条件下其参考值有所差异，应建立自己实验室的参考值。

【参考值】

45～109 μg/L。

【临床意义】

1.TT_4升高

1）甲亢：TT_4明显升高，可达正常时的2～3 倍，但轻型甲亢及甲亢早期TT_4不如TT_3灵敏。

2）T_4型甲亢：有甲亢症状及体征，血中TT_4、FT_4含量升高，TT_3含量正常。

3）高甲状腺结合球蛋白血症：与T_3相同。

4）甲状腺激素不敏感综合征：可能系靶细胞甲状腺受体或受体后有缺陷，致使外周组织对T_4不敏感，T_4分泌增多。临床上出现甲状腺功能正常或减退而血中甲状腺激素升高。有些伴先天性神经性耳聋、骨骼发育障碍等，家族性发病多见。测定促甲状腺素和促甲状腺激素释放激素兴奋试验有助于与甲亢的鉴别，前者的促甲状腺素分泌对T_4的负反馈抑制相对不敏感，基础促甲状腺素水平仍正常或略升高，但无甲亢临床表现；而后者分泌受抑制，促甲状腺素水平很低或测不出。

5）亚急性甲状腺炎：因甲状腺滤胞受破坏导致胶质中的甲状腺球蛋白逸人细胞间质，进入血循环使TT_4升高。因甲状腺滤泡上皮细胞受破坏，甲状腺摄碘率降低。

6）药物：乙胺碘呋酮、造影剂、β－受体阻滞剂、雌激素、避孕药、奋乃静、5－氟尿嘧啶、苯丙胺、甲状腺片、海洛因、美散痛等均可使TT_4升高。某些药物除了诱发TBG 增多外，还可能阻滞局部T_4与T_3转换。

7）高原反应：可出现短暂的TT_4升高。

2.TT_4降低

1）甲减：因甲状腺分泌甲状腺激素减少，血中TT_4降低，诊断符合率可达95％以

上。诊断甲减TT_4比TT_3更敏感可靠。

(2) 缺碘性甲状腺肿 (地方性甲状腺肿)：因环境中缺碘使甲状腺合成甲状腺激素不足。TT_4降低、TT_3正常，促甲状腺素升高，但临床上无甲减的表现。

(3) 慢性淋巴细胞性甲状腺炎早期：又称桥本病或自身免疫性甲状腺炎。由于甲状腺上皮细胞损害，甲状腺储备功能减退导致TT_4降低，TT_3正常，促甲状腺素增多，但临床无甲减表现。

(4) 低TBG 血症：任何原因引起TBG 降低或与T_4竞争TBG 结合者均可出现TT_4降低。如应用糖皮质激素、雄激素、生长激素、水杨酸、苯妥英钠、安妥明等药物，发生肾病综合征、严重肝功能衰竭、活动性肢端肥大症、大手术后、遗传性TBG 减少症等患者均可出现TT_4降低。另外使用二硝基苯酚、肝素、保泰松、硫氰酸盐等，亦可导致T_4降低。

(5) 甲亢治疗过程中：甲亢应用抗甲状腺药物后，抑制了甲状腺激素的合成，但不抑制外周组织中T_4转化为T_3，故可出现TT_4降低而TT_3正常或增高的分离现象。

三、游离三碘甲状腺原氨酸测定

游离三碘甲状腺原氨酸 (FT_3) 只占TT_3的0.5％，而血浆中大部分TT_3是以非共价键与血浆蛋白结合，只有游离的甲状腺激素才能通过细胞膜进入细胞，并与细胞中的受体结合，发挥影响蛋白质合成及调节代谢的诸多生理作用。因此，游离甲状腺激素的水平与机体的代谢状态相一致，且不受TBG 含量和结合力的影响。FT_3常用的检测方法有放射免疫技术、荧光酶免疫测定、酶联免疫吸附试验等。

(一) 放射免疫技术

【原理】

在先用抗FT_3抗体包被的试管中，使待检标本中的FT_3和Ⅰ标记FT_3共同与限量的抗FT_3抗体在适宜的条件下发生竞争性结合，当反应达到动态平衡后进行B、F 分离，测定结合部分 (B) 的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的FT_3含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗FT_3抗体包被管、Ⅰ-FT_3、FT_3标准品等。

【操作】

参照试剂盒说明书操作。

【参考值】

1.4～4.4ng/L。

【注意事项】

1）待测血清标本应在2～8 ℃保存，可保存3d，置－20 ℃冰箱可保存1 个月。

2）脂血标本可能影响测定结果，建议采用超速离心机去除脂肪成分。

3）肝素会影响FT_3 水平，采集标本时应注意避免使用肝素。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗FT_3 抗体与待测FT_3 及碱性磷酸酶标记抗FT_3 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中FT_3 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含FT_3 标准品、质控品、抗FT_3 抗体包被的磁粒子、碱性磷酸酶标记抗FT_3 抗体、标本稀释液、发光底物、清洗液及缓冲液等。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【参考值】

2.3～4.2ng/L。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低温保存。样品避免反复冻融。

【临床意义】

1.FT_3 水平升高

1）甲亢：不论症状典型与否均可见FT_3 升高，而且比TT_3 和TT_4 变化敏感。

2）T_3 型甲亢：仅见FT_3 升高而FT_4 正常。

3）甲状腺疾病治疗时：甲亢用抗甲状腺药物治疗时，FT_4 的下降先于FT_3；甲减用甲状腺素片替代治疗时FT_3 升高先于FT_4。因此，甲亢用药治疗期间的甲状腺功能评价应结合促甲状腺素的变化，如果促甲状腺素低和FT_3 仍增高，应判断为甲亢未控制；如FT_3 已正常，即使TT_4 已低于正常仍应判断甲亢已控制且无甲减。只有FT_3、TT_4 均低于正常时才可能是由抗甲状腺药物过度治疗导致的甲减。

4）亚临床甲亢：患者的甲亢症状可不明显TT_3、TT_4 可能在正常范围，但FT_3、FT_4 已升高，促甲状腺素降低。

5）甲状腺激素不敏感综合征：因靶器官对甲状腺激素无反应，患者血清T_4 升高，

但临床上无甲亢或甲减症状。

2.FT_3 水平降低

1）甲减：典型的甲减患者FT_3 降低，但变化不如FT_4 敏感。

2）低T_3 综合征：因某些疾病造成5′－脱碘酶活性抑制，影响了外周组织对T_4 的脱碘，致血TT_3、FT_3 降低。

3）药物治疗：长期使用苯妥因钠、多巴胺、糖皮质激素等药物者FT_3 值可降低，但促甲状腺素水平正常。应用抗甲状腺药物治疗时，FT_3 低于正常，提示抗甲状腺药物过量。

四、游离甲状腺素测定

游离甲状腺素（FT_4）占TT_4 的0.05％，大部分与蛋白质结合的T_4 与FT_4 处于动态平衡，甲状腺的功能状态取决于FT_4 含量的恒定与否，血液中FT_3 与FT_4 是更能准确地反映甲状腺功能状态的指标。

（一）放射免疫技术

【原理】

在先用抗FT_4 抗体包被的试管中，使待测标本中的FT_4 与I 标记的FT_4 共同与限量的抗FT_4 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后进行B、F分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的FT_4 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗FT_4 抗体包被管、$I-FT_4$、FT_4 标准品等。

【操作】

参照试剂盒说明书。

【参考值】

8～20ng/L。

【注意事项】

1）待测血清2～8℃可保存3d，置－20℃可保存1 个月。脂血标本可能影响测定结果，建议采用超速离心机去除脂肪成分。肝素会影响FT_4 水平，采集标本时应注意避免。

2）一步法的离心温度应控制在4～10℃之间，否则影响检测结果。

3）试剂所有组分在使用前，需稳定到室温。包被管在开袋后，要注意防潮。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗FT_4抗体与待测FT_4及碱性磷酸酶标记抗FT_4抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中FT_4含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含FT_4标准品、质控品、抗FT_4抗体包被磁粒子、碱性磷酸酶标记抗FT_4抗体、标本稀释液、发光底物、清洗液及缓冲液等。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8 ℃冷藏不应超过48h。否则应在－20 ℃以下低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

8.9～18.0ng/L。

【临床意义】

1.FT_4水平升高

1）甲亢：甲状腺激素合成增多使FT_4升高。

2）T_4型甲亢：FT_4升高，FT_3、TT_3往往正常。

3）甲状腺危象：FT_4、FT_3均可明显升高。

4）药物：如乙胺碘呋酮或肝素可抑制5′－脱碘酶的活性导致FT_4升高。

5）非甲状腺疾病：如急性发热性疾病及某些危重病患者由于血清蛋白与甲状腺素结合减少或亲和力降低，导致FT_4升高。

2.FT_4水平降低

1）甲减：FT_4明显降低，尤其是轻度甲减或甲减初期，FT_4比TT_4变化更灵敏同时伴促甲状腺素升高。

2）亚临床甲减：FT_4降低、促甲状腺素升高但甲减症状不明显。

3）甲亢治疗中：FT_4比FT_3下降更明显，若促甲状腺素出现升高应考虑用药过量。

4）药物：多巴胺及糖皮质激素可抑制垂体释放促甲状腺素，短期服用亦可影响基础血清促甲状腺素，并使促甲状腺素对促甲状腺激素释放激素的反应下降，血清促甲状腺素不升高，出现垂体性甲状腺功能降低，FT_4水平下降。

五、反T_3测定

【原理】

放射免疫技术，标本中反T_3（rT_3）与I 标记rT_3 共同与限量抗rT_3 抗体在适宜的条件下竞争性结合，当反应达到动态平衡后进行B、F 分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中rT_3 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含：I 标记的rT_3、rT_3 标准品、抗rT_3 抗体、分离剂。

【操作】

参照试剂盒说明书操作。

【参考值】

0.3～1.15nmol/L（0.8～0.5μg/L）。

【注意事项】

（1）待测血清标本2～8℃可保存3d，－20℃可保存1 个月。

（2）试剂盒启封后所有试剂应避光贮存于2～8℃，且不同批号试剂不可混用。试剂如出现絮状沉淀时则应弃去。

（3）所有试剂待平衡到室温后再使用。

（4）各实验室应建立自己的参考值。正常人群因年龄而异，儿童至40 岁之间随年龄增长渐呈下降趋势，40 岁以上随年龄增大呈升高趋势。

【临床意义】

1.rT_3 水平升高

（1）甲亢：血循环中rT_3 含量升高，这是由于T_4 转变为rT_3 增多所致，rT_3 含量变化与T_3、T_4 变化平行。

（2）非甲状腺疾病：如急性心肌梗死、肝硬化、糖尿病、尿毒症、恶性肿瘤、脑血管意外、酸碱中毒、心力衰竭、心内膜炎以及一些发热感染性疾病等均可致rT_3 增高。这是因为5′－脱碘酶活性降低，T_3 减少，机体代谢减慢，使rT_3 代谢廓清率降低所致。

（3）甲亢治疗时：甲亢治疗中T_3 下降较快，但rT_3 下降缓慢，当rT_3 低于正常时常提示用药过量。

2.rT_3 水平降低

（1）甲减：对轻度甲减和亚临床甲减的诊断rT_3 优于T_4 和T_3，但促甲状腺素增多仍为诊断甲减最灵敏的指标。

（2）低T_3 综合征：因5′－脱碘酶活性降低，T_4 转化T_3 减少，T_4 向rT_3 转化增多。

（3）新生儿先天性甲减：新生儿脐带血中rT_3 与T_3 含量之比低于3/4 时，应考虑患儿是先天性甲减。

六、促甲状腺素测定

血清中促甲状腺素（thyroid stimulating hormone，TSH）水平受下丘脑促甲状腺激素释放激素的促进作用及血中甲状腺激素水平的负反馈作用所控制。外周FT_4的任何变化均会导致血清TSH的加倍响应。TSH检测方法有免疫放射分析、荧光酶免疫测定、酶联免疫吸附试验等。

（一）免疫放射分析

【原理】

用单克隆抗TSH抗体包被聚苯乙烯试管壁，用I标记多克隆抗TSH抗体，让TSH抗原结合于固相单克隆抗体和液相多克隆抗体之间。在适当的条件下反应后，去除未结合的I标记多克隆抗TSH抗体，测量包被管的放射性，TSH的浓度与其放射性活度呈正比关系。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含抗TSH抗体包被试管、I标记抗TSH抗体、TSH标准品、浓缩缓冲洗液。

【操作】

按免疫放射分析双抗体夹心法操作步骤，具体操作参照试剂盒提供的说明书。

【参考值】

0.3～5.0mIU/L。

【注意事项】

待测血清2～8℃可保存3d，－20℃可保存1个月。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗TSH抗体与待测TSH及碱性磷酸酶标记的抗TSH抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中TSH含量。

【试剂】

商品化试剂盒包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8℃冷藏不应超过48h，否则应在－20℃以下低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

0.35～5.50mIU/L。

【临床意义】

1.TSH 水平升高

1）原发性甲减：因甲状腺激素分泌不足而引起TSH 分泌的负反馈抑制减弱，使垂体分泌TSH 增多。TSH 测定是诊断原发性甲减最灵敏的指标。

2）垂体分泌促甲状腺激素腺瘤：因垂体自主性地分泌TSH 使血清TSH 升高，同时可能伴有其他激素分泌增多。

3）亚临床甲减：常见于慢性淋巴细胞性甲状腺炎，亦可见于产后甲状腺炎。多见于60 岁以上女性，并具有家族性，患者血清TSH 升高而FT_4 正常。常伴有抗甲状腺球蛋白抗体、抗甲状腺微粒体抗体阳性。

4）地方性甲状腺肿：缺碘时，甲状腺合成甲状腺激素不足，对垂体分泌TSH 的抑制作用减弱，垂体分泌TSH 增加，血清TSH 升高。

5）新生儿先天性甲减：若血清TSH 值升高可诊断新生儿先天性甲减，血清TSH 检测在我国一些地区已作为新生儿必查项目。

2.TSH 水平降低

1）甲亢：由于甲亢患者血中过多的甲状腺激素抑制了垂体TSH 的分泌，使血清TSH 含量低于正常甚至不能测出。

2）亚临床甲亢：常见于桥本甲状腺炎早期、I 治疗甲亢时、甲减患者使用甲状腺激素替代治疗药物过量时以及毒性结节性甲状腺肿早期等。也可见于甲亢治疗过程中的亚临床状态，此时患者血TSH 低于正常甚至测不出，而FT_4 正常。

3）药物：某些药物可能导致血TSH 一过性降低，如糖皮质激素、多巴胺及溴隐亭等。

4）库欣综合征：库欣综合征患者血中皮质醇激素含量较高，可导致TSH 对促甲状腺激素释放激素反应性降低。

5）肢端肥大症：未经治疗的肢端肥大症患者TSH 值可降低，这可能是由于生长激素产生过多而诱发下丘脑生长抑素释放增多，造成TSH 对促甲状腺激素释放激素反应受损，少数患者可出现甲减。

七、甲状腺素结合球蛋白测定

㈠ 放射免疫测定

【原理】

待测标本中的甲状腺素结合球蛋白（thyroxine－binding globulin，TBG）和I标记TBG与限量的抗TBG抗体在适宜的条件下发生竞争性结合反应。当反应达到动态平衡后进行B、F分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的TBG含量。

【试剂】

商品化试剂盒，一般包含I标记TBG、TBG标准品、抗TBG抗体、缓冲液、分离剂。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体操作参照试剂盒说明书。

【注意事项】

待测血清标本在4 ℃冰箱可保存1周，置－20 ℃冰箱可保存1个月。

㈡ 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗TBG抗体与待测TBG及碱性磷酸酶标记抗TBG抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中TBG含量。

【试剂】

商品化试剂盒，一般包含液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

11.4～30.0 mg/L；孕妇：35.0～50.0 mg/L；接受雌激素治疗者：30.0～45.0 mg/L。

【临床意义】

⑴ 甲状腺疾病：甲亢时血清TBG水平显著低于正常，并随着抗甲状腺药物的治

疗，病情逐步缓解，TBG 恢复至正常水平；甲减时血清TBG 明显升高，随治疗后症状逐步改善，TBG 水平也随之降至正常。

(2) 其他疾病：TBG 水平升高见于先天性TBG 增多症，服用雌激素、避孕药、奋乃静、海洛因、美散痛等药物，妊娠，传染性肝炎，肝硬化，甲状腺功能减退症，甲状腺癌等；TBG 水平降低见于先天性TBG 减少或缺乏症，服用雄激素、糖皮质激素、水杨酸、保泰松、肝素等药物，各种严重疾病，肾病综合征，甲亢等。

八、甲状旁腺激素测定

(一) 放射免疫技术

【原理】

标本中的甲状旁腺激素（parathyroid hormone，PTH）和 I 标记的PTH 与限量的抗PTH 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应。当反应达到动态平衡后进行B、F 分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的PTH 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括 I 标记PTH、PTH 标准品、抗PTH 抗体、温育液、分离剂。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体操作参照试剂盒说明书。

【注意事项】

采集早晨空腹血，低温分离血清，待测血清置－20 ℃冰箱可保存1 个月。

(二) 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗PTH 抗体与待测PTH 及碱性磷酸酶标记抗PTH 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中PTH 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照试剂盒说明书及仪器操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低

温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

血清PTH ：12～72ng/L。

【临床意义】

1）甲状旁腺功能亢进：分为原发性、继发性和特发性。原发性甲状旁腺功能亢进是由于甲状旁腺增生、腺瘤或腺癌所引起的甲状旁腺激素合成与分泌过多，导致高血钙、低血磷、尿钙增多和肾结石等。甲状旁腺腺瘤引起的原发性甲状旁腺功能亢进最常见，约占85％。继发性甲状旁腺功能亢进是由于在慢性肾功能不全、维生素D 缺乏或抵抗以及妊娠、哺乳等情况下，甲状旁腺受到低血钙、低血镁或高血磷的刺激而分泌过量的PTH ，以提高血钙、血镁和降低血磷的一种慢性代偿性变化。

2）甲状旁腺功能减退症：PTH 分泌功能障碍，导致明显的低钙血症，或仅有低钙血症，常发生于钙需要量增加时。甲状旁腺功能减退有血浆PTH 减少和PTH 增多两种类型。前者因PTH 合成减少或缺乏所致，表现为神经肌肉兴奋性增高、低钙血症、高磷血症与血清PTH 减少或不能测得；后者是一种显性遗传性疾病，由于PTH 受体缺陷所致，因此血钙降低，血PTH 增高。

3）骨质疏松：老年性骨质疏松可能是由于肾衰竭造成继发性甲状旁腺功能亢进所致，患者血清1，25－（OH）2－3 降低而PTH 升高。雌激素有对抗PTH 的作用，绝经期妇女由于雌激素水平降低导致PTH 分泌过多，尿钙排出增多，造成骨质疏松。

4）代谢性骨病（Paget 骨病又称畸形性骨炎）：这是一种原因不明的慢性侵袭性代谢性骨病，患者血PTH 、血钙均升高。肾性营养不良是一种继发于慢性肾功能衰竭的代谢性骨病，肾功能衰竭引起的高血磷、低血钙导致继发性甲状旁腺功能亢进，使血PTH 升高。

第二节　性腺轴激素测定

性腺是人体的重要内分泌腺。男子的性腺是睾丸，主要分泌雄激素；女性的性腺是卵巢，主要分泌雌激素。性激素促进性器官发育、生殖功能成熟，促进并维持第二性征。同时性激素通过正负反馈调节下丘脑和垂体的激素分泌，从而维持机体正常的生理和代谢，保证了正常的生殖和遗传功能。

一、睾酮测定

(一) 放射免疫技术

【原理】

待测标本中的睾酮（testosterone，T）与 I 标记T 一起与包被管上限量的抗T 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后进行B、F 分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的T 含量。

【试剂】

商品化的试剂盒一般包括含抗T 抗体包被管、I 标记T、T 标准品等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

(1) 待测血清标本应在4 ℃冰箱内保存，若超过7d 应分装成小管加盖，置－20 ℃冰箱2 月不影响测定结果。

(2) 正常人血睾酮含量的变化呈快速脉冲式波动，并且夜间轻度增高，建议在早晨采集血清标本，此时测定的结果可反映体内睾酮的真实水平。

(二) 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗T 抗体与待测标本中T 及碱性磷酸酶标记抗T 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中T 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

男性：9.4～26.6nmol/L；女性：0.67～3.20nmol/L。

【临床意义】

1）睾酮水平升高：常见于睾丸良性间质细胞瘤、先天性肾上腺皮质增生症、真性性早熟、男性假两性畸形、女性男性化肿瘤、多囊卵巢综合征、皮质醇增多症和应用促性腺激素、肥胖等。晚期孕妇血中睾酮水平也可升高。

2）睾酮水平降低：见于性功能低下、原发性睾丸发育不全性幼稚、高催乳素血症、垂体功能减退、系统性红斑狼疮、甲减、骨质疏松、隐睾炎、男子乳房发育等。

二、雌二醇测定

（一）放射免疫技术

【原理】

标本中的雌二醇（estradill，E_2）和I标记的E_2共同与限量的抗E_2抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入二抗和PEG混合的分离剂，进行B、F分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的E_2含量。

【试剂】

商品化的试剂盒一般包括抗E_2抗体、I标记E_2、E_2标准品、沉淀剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体操作试剂盒说明书进行。

【注意事项】

待测血清标本应在4 ℃冰箱内保存，若超过7d应分装成小管加盖，置－20 ℃冰箱2个月不影响测定结果。

（二）荧光酶免疫测定

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗E_2抗体与待测标本中E_2及碱性磷酸酶标记抗E_2抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中E_2含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包含液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低

温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

男性：15～308pmol/L。

女性：卵泡期4.8～512pmol/L；排卵期263～1081pmol/L；黄体期272～793pmol/L。

【临床意义】

1.E_2 含量增多

1）正常妊娠E_2 含量可轻度升高，但胎盘娩出后急剧下降。

2）性早熟时，由于卵泡刺激素和黄体生成激素含量增多，致使E_2 分泌增多。

3）双胎或多胎妊娠。

4）卵巢疾患：卵巢颗粒层细胞瘤、卵巢胚瘤、卵巢脂肪样细胞瘤、性激素生成瘤等表现为卵巢功能亢进。

5）心脏疾病：心肌梗死、心绞痛、冠状动脉狭窄。

6）其他：系统性红斑狼疮、肝硬化、男性肥胖症、男性乳房发育等。

2.E_2 含量减少

1）妊娠高血压综合征：若E_2 含量特别少，提示可能胎儿宫内死亡、无脑儿。

2）卵巢疾病：卵巢缺如或发育低下、原发性卵巢衰竭、卵巢囊肿。

3）垂体性闭经或不孕。

4）其他：葡萄胎、甲减或甲亢、库欣综合征、艾迪生病、恶性肿瘤、肾衰竭等。

三、雌三醇测定

【原理】

放射免疫技术：待测标本中的雌三醇（estriol，E_3）和 I 标记E_3 与限量的抗E_3 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合，当反应达到动态平衡后，加入固相二抗分离剂进行 B、F 分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的E_3 含量。

【试剂】

商品化的试剂盒一般包括抗E_3 抗体、I 标记E_3、E_3 标准品、沉淀剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1）血清标本在4℃可保存3d，置－20℃可保存1 个月。

2）试剂所有组分在使用前，需稳定到室温并摇匀。固相微球勿冻结，加样前摇匀。

【参考值】

孕28～31 周：73～253nmol/L；孕32～35 周：111～413nmol/L；孕36～40 周：156～579nmol/L。

【临床意义】

1）监测胎盘功能：胎儿正常发育者，在妊娠中期E_3 开始升高，26～34 周逐渐上升，35～36 周后迅速升高，41～42 周达到高峰，43 周后逐渐下降。如E_3 持续高水平，可等待自然分娩：当E_3 值降低，则反映胎儿－胎盘功能已趋向不良。建议对E_3 值做连续测定通过连续曲线观察胎儿－胎盘功能的动态变化。

2）监护高危妊娠：定期动态检测血、尿E_3 含量，可帮助估计孕期。如持续上升，提示未足月；若几次同一水平，提示为足月妊娠；若测定值逐步下降则为过期妊娠；若明显降低，提示胎儿宫内窘迫，临床应严密监测胎动、胎心，及时采以相应措施。

3）协助诊断胎儿疾病：胎儿宫内生长发育迟缓、因孕妇吸烟过多或营养不良而影响胎儿发育者，E_3 下降。胎儿先天性肾上腺发育不全或无脑儿等畸形，E_3 水平下降。

4）其他：如冠心病、肝硬化等疾病时，E_3 含量增高。

四、孕酮测定

（一）放射免疫技术

【原理】

待测标本中的孕酮（Progesterone，P）和^{125}I 标记P 共同与限量的抗P 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F 分离，测定结合部分（B）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的P 含量。

【试剂】

商品化的试剂盒一般包括抗孕酮抗体、^{125}I 标记孕酮、孕酮标准品、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

待测血清在4 ℃可保存7d，置－20 ℃可保存2 个月。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗孕酮抗体与待测孕酮及碱性磷酸酶标记抗孕酮抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，

形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中孕酮含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8 ℃冷藏不超过48h，否则应在－20 ℃以下低温保存。标本避免反复冻融。

【参考值】

男性：0.43～1.11nmol/L。

女性：卵泡期0.33～1.91nmol/L；排卵期1.67～5.03nmol/L；黄体期23.84～61.50nmol/L。

【临床意义】

(1) 生理性变化：正常妇女月经周期中，血中孕酮含量以黄体期最高，卵泡期最低。动态检测有助于判定排卵期，了解黄体功能，同时研究各种类固醇避孕药及抗早孕药的作用机制。正常妊娠自11周开始，血中孕酮含量升高，多胎妊娠时，含量更高。

(2) 孕酮含量病理性增高：见于糖尿病孕妇、葡萄胎、卵巢脂肪样瘤、先天性肾上腺增生、原发性高血压病等。

(3) 孕酮含量病理性降低：主要见于黄体生成障碍和功能不良、多囊卵巢综合征、无排卵型功能失调子宫出血、妊娠性胎儿发育不良、胎儿发育迟缓及死胎。

五、卵泡刺激素测定

(一) 放射免疫技术

【原理】

待测标本中卵泡刺激素（follicle stimulating hormone，FSH）和^{125}I标记的FSH与限量的抗FSH抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的FSH含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗FSH抗体、^{125}I标记FSH、FSH标准品、沉淀剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1）待测血清在4℃可保存7d，置－20℃可保存2个月。

2）机体分泌FSH不是持续性的，而是阵发性的，因此，各实验室的参考值可有很大差异。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗FSH抗体与待测标本中FSH及碱性磷酸酶标记的抗FSH抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中FSH含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8℃冷藏不应超过48h。可在－20℃以下长期低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

男性：4.45～14.60IU／L。

女性：卵泡期9.3～16.9IU／L；排卵期14.8～35.6IU／L；黄体期2.8～9.7IUL。

【临床意义】

见黄体生成激素测定部分。

六、黄体生成激素测定

（一）放射免疫技术

【原理】

待测标本中的黄体生成激素（uteinzing hormone，LH）和^{125}I标记的LH与限量的抗LH抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F分离，测定结合部分（β）的放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的LH含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗LH 抗体、^{125}I -LH 、LH 标准品、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

1）待测血清在4 ℃可保存7d，置-20 ℃可保存2 个月。

2）机体分泌LH 不是持续性的，而是阵发性的，因此，各实验室的参考值可有很大差异。

（二）荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗LH 抗体与待测LH 及碱性磷酸酶标记抗LH 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4 -甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4 -甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中LH 含量。

【试剂】

商品化试剂一般包含液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8 ℃冷藏不应超过48h。可在-20 ℃下长期低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

男性：3.3～13.5IU/L。

女性：卵泡期3.3～12.9IU/L；排卵期8.8～151.4IU/L；黄体期0.6～8.6IU/L。

【临床意义】

1）FSH、LH 水平升高：常见于性腺原发性病变，如卵巢功能早衰、性腺发育不全、原发性闭经、原发性性功能减退、曲细精管发育障碍、完全性（真性）性早熟。

2）FSH、LH 水平降低：主要见于垂体或下丘脑性闭经、不完全性（假性）性早熟。

3）垂体FSH 瘤或LH 瘤以及FSH/LH 瘤患者：因腺瘤类型不同，血清FSH 和LH 水平呈不同类型的改变。①FSH 瘤患者主要表现为FSH 升高，LH 可正常；②LH 瘤患者主要表现为LH 明显升高，FSH 降低；③FSH/LH 瘤患者主要表现为FSH 和LH 皆升高。

4）闭经诊断：测定妇女血清FSH 和LH 水平可对卵巢性闭经和垂体或下丘脑性闭经作出鉴别。①如果高FSH （>40IU/L） 并伴高LH ，则可以判断为卵巢功能衰竭。②如果血清FSH 、LH 均为异常低值或FSH 在正常下限，LH 为异常低值，可诊断为垂体或下丘脑性闭经，继而应用促黄体素释放素兴奋试验进一步区分垂体与下丘脑性闭经。③兴奋试验表现为LH 和FSH 增高而峰时推迟，提示垂体储备功能良好，应考虑为下丘脑性闭经。④如LH 和FSH 弱反应，提示垂体储备功能低，应考虑为垂体性闭经。

七、催乳激素测定

（一） 放射免疫技术

【原理】

待测标本中的催乳激素 （prolactin ，PRL） 和^{125}I 标记PRL 与限量抗PRL 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B 、F 分离，测定结合部分 （B） 放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的PRL 含量。

【试剂】

商品化的试剂盒一般包括抗PRL 抗体、^{125}I 标记PRL 、PRL 标准品、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

待测标本严重溶血应重新采集标本，血清在4 ℃可保存7d ，置－20 ℃冰箱可保存2个月。

（二） 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗PRL 抗体与待测标本中PRL 及碱性磷酸酶标记抗PRL 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4 －甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4 －甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中PRL 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8 ℃冷藏不应超过48h。可在－20 ℃以下长期保存。样本避免反复冻融。

【参考值】

男性：4.0～14.4 μg/L。

女性：卵泡期6.0～18.5 μg/L；排卵期8.0～25.7 μg/L；黄体期5.9～20.9 μg/L。

【临床意义】

1）PRL 含量升高：血清PRL 基础值＞30 μg/L 时，临床称为高PRL 血症。此症影响性功能，可导致育龄期妇女不孕、月经失调、闭经、溢乳等一系列症状。常见于以下原因：①下丘脑病变（侵犯正中隆突及垂体柄的器质性病变）：如颅咽管瘤、结节病、动脉瘤、假性脑瘤、转移性肿瘤等；功能性障碍，如产后闭经－溢乳综合征时亦表现有高PRL 血症。②垂体病变：垂体催乳素瘤、垂体增生、垂体柄切除后、出血性蝶鞍综合征、肢端肥大症等。③其他内分泌疾病：如甲亢、库欣综合征、多囊卵巢等。④产生异位PRL 的非内分泌肿瘤：如肾癌、未分化支气管癌及个别卵巢癌等。⑤药物影响：雌激素、口服避孕药、氯丙嗪、奋乃静、可待因、甲腈咪胺等均可导致血清PRL 基础值上升。⑥乳房疾病：如慢性乳腺炎、囊性乳腺炎、乳腺癌、男子乳房女性化等。⑦神经刺激：包括皮肤和周围神经损伤（手术创伤和灼伤等）、骨髓病变、子宫切除和精神创伤。

2）血清PRL 降低：主要见于全腺垂体功能减退症和单一性PRL 分泌缺乏症。某些药物也可引起PRL 降低，如左旋多巴、溴隐亭、多巴胺、去甲肾上腺素、降钙素等。

第三节　肾上腺轴激素测定

一、促肾上腺皮质激素测定

（一）放射免疫技术

【原理】

待测标本中促肾上腺皮质激素（Adrenocorticopic hormone，ACTH）和^{125}I 标记ACTH 共同与限量抗ACTH 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的ACTH 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗ACTH 抗体、^{125}I 标记ACTH 、ACTH 标准品、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

(1) 血浆用塑料试管分装不应用玻璃试管，－20 ℃可保存1 个月。脂血可能会对检测结果有影响，高脂血标本应超速离心后再测。黄疸患者血样不宜用。

(2) 肝素抗凝标本测定结果比EDTA 抗凝标本大约增加5 %。

(二) 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗ACTH 抗体与待测标本中ACTH 及碱性磷酸酶标记抗ACTH 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4 －甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4 －甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中ACTH 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2 ～8 ℃冷藏不应超过48h。可在－20 ℃以下长期保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

0 ～18.9pmol/L。

【临床意义】

血清ACTH 含量昼夜呈节律性变化，一般早晨最高，午夜最低。

1. 血清ACTH 含量增多

(1) 原发性肾上腺皮质功能减退症：是由于双侧肾上腺皮质萎缩、结核、肿瘤、手术切除或自身免疫有关因素等所致肾上腺皮质分泌皮质激素不足，对下丘脑－垂体的反馈抑制作用减弱，以致垂体分泌ACTH 增加。

(2) 先天性肾上腺皮质增生：该病为遗传性疾病，系肾上腺皮质激素合成过程中某种羟化酶的缺陷，导致正常的皮质醇合成减少，从而引起ACTH 分泌增多。

(3) 异源性ACTH 综合征：由于肾上腺以外的组织如肺癌、胸腺癌、胰腺癌、消化道癌症、甲状腺髓样癌、泌尿生殖系癌等肿瘤细胞分泌ACTH 样物质，经胰蛋白酶消化

转为ACTH 后发挥ACTH 活性，致使血浆中ACTH 水平升高。

4）其他疾病：如库欣综合征、肾上腺切除术、创伤、休克、低血糖、遗传性肾上腺皮质对ACTH 不反应综合征等均可引起血中ACTH 升高。

2．血清ACTH 含量减少

1）继发性肾上腺皮质功能减退症：垂体ACTH 分泌减少而致血浆ACTH 降低。

2）肾上腺皮质肿瘤：原发性肾上腺皮质肿瘤自主分泌皮质醇，不受下丘脑－垂体的调节，从而过多的皮质醇抑制垂体分泌ACTH 。

3）医源性ACTH 降低：由于临时治疗使用大量的糖皮质激素，负反馈抑制ACTH 的分泌，使血浆ACTH 降低。

二、皮质醇测定

㈠ 放射免疫技术

【原理】

待测标本中皮质醇（Cortisol，Cort）和^{125}I 标记Cort 共同与限量抗Cort 抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B 、F 分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的皮质醇含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗Cort 抗体包被管、^{125}I 标记Cort 、Cort 标准品、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

待测标本在4 ℃可保存7d ，置－20 ℃可保存2 个月，避免反复冻融。

㈡ 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗Cort 抗体与待测标本中Cort 及碱性磷酸酶标记抗Cort 抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4 －甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4 －甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中皮质醇含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器操作手册与试剂盒说明书。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8℃冷藏不应超过48h。可在－20℃以下长期保存。标本避免反复冻融。

【参考值】

50～280μg/L。

【临床意义】

血清皮质醇含量昼夜呈节律性变化，因此，需连续多次测定。

（1）血浆皮质醇增高：主要见于库欣综合征、肾上腺腺瘤、肾上腺癌等肾上腺自身疾病；亦可能为垂体嗜碱细胞分泌过量的ACTH刺激肾上腺皮质引起；也见于异位产生ACTH的肿瘤，如燕麦细胞肺癌，胰、甲状腺、甲状旁腺、卵巢、睾丸、大肠、胆囊、乳腺以及纵隔癌等疾病时，肿瘤组织具有分泌ACTH样物质的功能，可促进肾上腺皮质束状带合成皮质醇，使血浆皮质醇含量升高。肝硬化和肾病时，皮质醇降解减慢，排泄减少，血浆皮质醇含量可高于正常。

（2）血浆皮质醇降低：主要见于艾迪生病（原发性肾上腺皮质功能低下）、希恩综合征（继发性肾上腺皮质功能低下）和先天性肾上腺皮质增生。临床上长期接受ACTH或皮质激素治疗的患者，因下丘脑和垂体受反馈性抑制，致使ACTH分泌不足，肾上腺处于萎缩状态，其血浆皮质醇低于正常。

三、醛固酮测定

【原理】

待测标本中的醛固酮（Aldosterone，Ald）和^{125}I标记Ald共同与限量抗Ald抗体在适宜条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的Ald含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗Ald抗体、^{125}I－Ald、Ald标准品、缓冲液、阻断剂、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

用塑料试管分装血浆，在－20℃冰箱可保存1个月，严重溶血标本不宜采用。

【参考值】

普通饮食：卧位59.5～173.9ng/L；立位65.2～295.7ng/L。

低钠饮食：卧位121.7～369.6ng/L；立位139.0～634.8ng/L。

【临床意义】

血浆中Ald含量存在昼夜节律性分泌，一般早晨醒来之前，其血浆水平最高。

1 血浆Ald增多

(1) 原发性Ald增多症：血、尿Ald均明显增高，可为参考值的2～4倍。

(2) 继发性Ald增多症：如肾性高血压、Bartter综合征、特发性水肿、恶性高血压、充血性心力衰竭、肾病综合征、肝硬化肝功能失代偿期、肾素瘤等。

(3) 应用某些药物时：如利尿剂，口服避孕药等。

2 血浆Ald减少

(1) 肾上腺皮质功能减退症：除Ald降低外，常伴有血浆皮质醇和17－羟皮质类固醇降低，ACTH代偿性分泌过度出现皮肤色素沉着。

(2) 选择性Ald过少症：由于肾脏疾病引起肾素分泌减少，致血管紧张素减少，Ald降低。

(3) 某些药物：如心得安、可乐宁、利血平、甘草等药物可引起Ald分泌减少。

第四节　胰岛激素及其他激素测定

一、胰岛素测定

【原理】

放射免疫分析：待测标本中的胰岛素（Insulin，Ins）与限量的抗Ins抗体预先反应一段时间，然后加入^{125}I标记Ins竞争结合剩余的结合位点。当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中Ins含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗Ins抗体、^{125}I标记Ins、Ins标准品、缓冲液、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

(1) 待测血清在4℃保存不超过1周，－20℃保存不超过1个月。

(2) 胰岛素治疗可能会干扰检测结果。

(3) 溶血标本会使结果降低。

【参考值】

空腹血清：4.0～15.6mIU/L。

【临床意义】

(1) 用于糖尿病分型：1 型糖尿病患者空腹胰岛素水平低于正常或不能测得，口服葡萄糖后无高峰，呈低平坦；2 型糖尿病患者空腹胰岛素水平正常或稍高，刺激后高峰延迟至2～3h 出现。

(2) 判断自发性低血糖的原因：低血糖患者如血清C 肽超过正常，则可认为系胰腺分泌过多的胰岛素所致，如C 肽不高则为外源性胰岛素或其他原因所致的低血糖。

二、C 肽测定

【原理】

放射免疫分析：待测标本中C 肽（C－Peptide，C－P）和125I 标记C－P 与限量的抗C－P 抗体进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂，进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的C－P 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗C－P 抗体、125I 标记C－P、C－P 标准品、C－P 稀释液、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

(1) 待测血样应在－20℃冰箱保存。

(2) 由于溶解后的标准品和标记物不稳定，因此，应分装成若干份，放在－20℃保存，避免反复冻融。

(3) 溶血标本可影响胰岛素测定，而不影响C－P 的测定结果。

【参考值】

0.6～3.8μg/L。

【临床意义】

(1) 判断胰岛β细胞功能和指导糖尿病治疗：外源性胰岛素制剂的使用和胰岛素抗体的产生均严重影响糖尿病患者的内源性胰岛素测定，导致胰岛素不能准确反映β细胞功能；C 肽和胰岛素均等分子分泌入血，且C 肽不受胰岛制剂和胰岛素抗体的干扰，因此，可准确反映出β细胞的功能。此外，肾病时血C 肽水平增高，尿C 肽水平不降；肝硬化时，血C 肽水平可正常。

(2) 胰岛细胞增生症或胰腺癌切除术后的疗效观察：若可测到血C 肽的含量，提示

有胰腺组织残存；若血C 肽含量仍持续高水平，提示肿瘤复发或已转移。

(3) 胰腺或胰岛移植后的疗效观察：测定血C 肽有助于观察移植组织是否存活及其功能状况。

三、胰高血糖素测定

【原理】

放射免疫分析：待测标本中的胰高血糖素（glucagon）和125I 标记的胰高血糖素与限量的抗胰高血糖素抗体竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的胰高血糖素含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗胰高血糖素抗体、125I 标记胰高血糖素、胰高血糖素标准品、温育液、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

(1) 静脉采血后应放入含冷冻的EDTA 和抑肽酶的玻璃试管，低温离心，待测血浆在－20 ℃可保存1 个月。

(2) 肝素抗凝血比EDTA 抗凝血所测结果大约高5 %。

【参考值】

血清：0～200ng/L。

【临床意义】

1 血浆胰高血糖素水平升高

(1) 生理性升高：常见于禁食后、大量活动后。

(2) 病理性升高：糖尿病患者胰高血糖素明显升高，且增高数值与糖尿病的严重程度有关。胰高血糖素瘤患者血浆胰高血糖素具有特殊诊断价值，其测得值可达700～7000ng/L。其他疾病如急性胰腺炎、肝硬化、急性低血糖症、肾功能衰竭、肢端肥大症、神经性厌食、III型和IV型高脂蛋白血症、心肌梗死、库欣综合征及类固醇激素治疗、甲状腺功能低下、外伤、感染及灼伤等血浆胰高血糖素水平亦升高。

2 血浆胰高血糖素水平降低

慢性严重胰腺炎伴有继发性糖尿病、婴儿与儿童患“特发性低血糖症”、生长激素释放抑制激素分泌过多等。

四、生长激素测定

(一) 放射免疫技术

【原理】

待测标本中的生长激素（growth hormones，GH）和^{125}I标记GH与限量抗GH抗体竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中GH含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗GH抗体、^{125}I标记GH、GH标准品、缓冲液、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

（1）待测血清在-20 ℃可保存1个月。

（2）GH与胎盘催乳素（HPL）有交叉反应，因此，妊娠时测定GH结果不可靠。

（3）由于正常人基础GH水平值较低，有时甚至在可测范围以下，甚至基础值为0 μg/L。此时必须进行生长激素-L-多巴兴奋试验，如试验结果血清GH仍不升高，则表示GH分泌不足。

(二) 荧光酶免疫测定

【原理】

以双抗体夹心法为例：包被在固相上的抗GH抗体与待测标本中GH及碱性磷酸酶标记的抗GH抗体形成复合物，该复合物中的碱性磷酸酶水解发光底物4-甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4-甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中GH含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括液相试剂、固相包被管、定标液和发光底物试剂。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【注意事项】

血清标本在室温下放置不应超过8h，2～8 ℃冷藏不应超过48h。否则应在-20 ℃以下低温保存。样品避免反复冻融。

【参考值】

血清：0～5 μg/L。

【临床意义】

1.GH 水平升高

1）巨人症：由于青春期前GH 分泌过多，使血GH 升高。

2）肢端肥大症：在骨骼生长发育成熟以后，如果垂体前叶持续分泌过多的GH（如垂体微腺瘤），可引起血中GH 升高。

3）低血糖症：当血糖降低，细胞内葡萄糖缺乏时，可刺激GH 释放，使血GH 升高。

4）某些药物：许多神经介质及影响神经系统功能的药物能促使GH 分泌过多，如多巴胺能增效剂左旋多巴、阿扑吗啡、溴隐亭、α－肾上腺素、雌激素等均可使血GH 升高。

5）其他：在应激状态下，如烧伤、外科手术、急性感染、创伤、电休克及某些生理因素如睡眠、运动、蛋白餐、饥饿状态下等。

2.GH 水平降低

1）侏儒症：由于青春期以前垂体GH 分泌缺乏以致生长迟缓。如垂体性侏儒，表现为单一GH 缺乏，或同时伴有其他垂体前叶激素缺乏。有的患者在基础状态下的GH 值也可能在正常范围，必要时需进行兴奋试验。

2）垂体前叶功能减退症：由于垂体或下丘脑的多种疾病如希恩综合征、垂体嫌色细胞瘤致垂体破坏，累及GH 分泌细胞的功能而使GH 分泌减少。本病除GH 水平低下外，还常伴有其他垂体激素的水平低下。

3）某些激素和药物：如肾上腺皮质激素、甲状腺激素、葡萄糖、氨基酸、多巴胺能阻断剂酚噻嗪等均可抑制GH 的分泌，使血GH 降低。

五、肾素－血管紧张素－醛固酮系统测定

肾素－血管紧张素－醛固酮系统（renin－angiotensin－aldosterone system，RAAS）包括前肾素、肾素、血管紧张素原、血管紧张素Ⅰ（ATⅠ）、血管紧张素Ⅱ（ATⅡ）、血管紧张素转换酶（ACE）和醛固酮（Ald）等。下面仅介绍血浆肾素活性和血管紧张素Ⅱ测定，常用检测方法为放射免疫技术。

（一）血浆肾素活性测定

【原理】

血浆肾素活性（plasma renin activity，PRA）的测定是以ATⅠ产生的速度来表示的。将双份血浆中的一份直接测其ATⅠ含量，称为对照组；另外一份置37℃水浴中1h 后测其ATⅠ含量，减去对照组的ATⅠ含量，除以温育时间，则为单位时间内ATⅠ的产生速

率，即为肾素活性。

ATI 含量测定采用放射免疫技术：待测标本中的ATI和^{125}I 标记ATI 与限量抗ATI抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中的ATI 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗ATI 抗体、^{125}I 标记ATI、ATI 标准品、缓冲液、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【注意事项】

（1）标本采集方法：采集空腹静脉血，加入含有EDTA、8－羟基喹啉和二巯基丙醇的冰浴试管中，摇匀，低温离心分离血浆。待测血浆标本在－20 ℃冰箱可保存2 个月。

（2）β－阻断剂、血管扩张剂、利尿剂及甾体激素、甘草等均影响体内肾素水平，测定PRA 一般要在停药两周后。若用利血平等代谢缓慢的药物，则应在停药3 周后测定PRA。不宜停药的患者可改服胍乙啶等降压药。

（3）肾素分泌呈周期性变化，高钠饮食时PRA 分泌减少，低钠饮食时PRA 分泌增多；同一体位时早晨分泌量最多，中午至下午分泌量最少；肾素的分泌随年龄的增加而减少；成年女性卵泡期最少，黄体期最多，并随年龄增加分泌量减少。

（4）药盒启封后所有试剂应避光贮存于2～8 ℃，且不同批号试剂不可混用。

【参考值】

普通饮食：卧位0.5～0.79 μg/L·h；立位1.5～3.9 μg/L·h。

低钠饮食：卧位0.70～5.96 μg/L·h；立位1.13～8.10 μg/L·h。

【临床意义】

1.PRA 水平升高

（1）生理性升高：如正常妊娠、应用含有雌激素的避孕制剂、螺旋内酯、呋塞米等药物。

（2）病理性升高：见于继发性醛固酮增多症、Barter 综合征、肾脏血管外膜细胞肿瘤、Desmit 综合征；血浆容积减少，如出血、肾上腺功能减退及应用利尿剂治疗后；单侧动脉狭窄、患病部位的肾静脉血中肾素浓度增加；硬变病、肾病、充血性心力衰竭等。

2.PRA 水平降低

（1）生理性降低：如服用β阻滞剂、甲基多巴、可乐宁、利血平等药物。

（2）病理性降低：见于原发性醛固酮过多症；血浆容量增加；用类固醇治疗；尚有

约20％的原发性高血压病患者其PRA 可以降低。

(二) 血管紧张素Ⅱ测定

【原理】

放射免疫技术：待测标本中ATⅡ和^{125}I 标记ATⅡ与限量抗AⅡ抗体在适宜的条件下进行竞争性结合反应，当反应达到动态平衡后，加入分离剂进行B、F 分离，测定结合部分（B）放射性活度，通过标准曲线求出待测标本中ATⅡ含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括抗ATⅡ抗体、^{125}I 标记ATⅡ、ATⅡ标准品、缓冲液、分离剂等。

【操作】

按放射免疫技术操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

普通饮食：卧位28.2～52.2ng/L；立位55.3～115.3ng/L。

低钠饮食：卧位30.6～101.0ng/L；立位64～120ng/L。

【临床意义】

1.ATⅡ水平升高

（1）生理性升高：见于低钠饮食、月经周期黄体期、妊娠等。

（2）病理性升高：见于继发性醛固酮增多症、Bartter 综合征、肾血管瘤、单侧肾动脉狭窄、肾脏球旁细胞肿瘤、esmit 综合征、出血、肾上腺功能低下、利尿治疗所致的血容量减少、口服避孕药、肝硬化、肾炎、充血性心力衰竭、原发性高血压病、甲亢、嗜铬细胞瘤等。

2.ATⅡ水平降低

（1）生理性降低：见于高钠饮食、月经周期卵泡期等。

（2）病理性降低：见于类固醇治疗后。

第十章　变态反应性疾病的免疫学检验

变态反应性疾病（又称过敏反应性疾病）是一类异常的病理性免疫应答所导致的机体多种临床疾病。根据发病机制，可以分成4 型，分别为免疫球蛋白E（IgE）介导的Ⅰ型速发型变态反应、细胞毒性的Ⅱ型变态反应、免疫复合物引起的Ⅲ型变态反应和Ⅳ型迟发型变态反应。目前临床所指的大多为Ⅰ型变态反应性疾病，其发病机制是由于变应原进入机体，刺激B 淋巴细胞产生IgE 抗体，后者与肥大细胞或嗜碱细胞结合；当相同变应原再次入侵时，与上述细胞表面两个以上IgE 分子“搭桥”结合，从而激活肥大细胞或嗜碱细胞脱颗粒和释放炎症介质（如组胺、白三烯、前列腺素、嗜酸细胞趋化因子等），引起毛细血管扩张，血管通透性增加，平滑肌收缩和腺体分泌增多等。在临床上可表现为变应性鼻炎、支气管哮喘、皮肤变态反应性疾病、消化系统变态反应性疾病、变应性休克等变应性疾病。对变态反应性疾病的诊断以往主要依据病史、体征以及如皮肤试验、激发试验等体内试验等。体内试验存在干扰因素多、检出灵敏度低等缺点，而且，由于试验在患者体内进行，存在着诱发变应性休克、发生交叉感染等诸多危险因素。因此，目前愈来愈多地应用体外血清学试验来代替体内试验。体外诊断试验主要是检测血清（或血浆）中特异性IgE（specific IgE，sIgE）、非特异性总IgE、变态反应炎症介质如嗜酸细胞释放的嗜酸细胞阳离子蛋白（eosinophil cationic protein，ECP）、肥大细胞释放的类胰蛋白酶（tryptase）、白细胞介素（IL）-4、IL-5、外周血嗜酸细胞计数等。本章着重叙述Ⅰ型变态反应性疾病特异性变应原的免疫学测定（嗜酸细胞计数、IL 测定参见第二篇第一章和本篇第五章有关内容）以及与Ⅲ型变态反应相关的免疫复合物测定。Ⅱ型和Ⅳ型变态反应主要涉及细胞免疫功能的检测，参见本篇第四章有关内容。

第一节　特异性免疫球蛋白E 及相关炎症介质测定

一、血清总免疫球蛋白E 测定

1．荧光酶免疫测定

【原理】

固相载体包被单克隆抗IgE 抗体与待测标本中IgE 发生特异性结合，再加碱性磷酸

酶标记抗IgE 抗体形成复合物，该复合物中碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中总IgE 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括固相载体、酶结合物、反应缓冲液和清洗液、荧光底物、终止液、标准品等。

【操作】

参照仪器操作手册与试剂盒说明书。

【参考值】

<100kIU/L。

2．酶联免疫吸附试验

【原理】

包被微孔板的单克隆抗IgE 抗体与待测标本中IgE 发生特异性结合反应，再加酶标记抗IgE 抗体形成夹心免疫复合物。加入底物显色，显色强度与标本IgE 含量成正比，根据标准曲线可得出待测标本中总IgE 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括微孔反应板、酶结合物、稀释液和清洗液、底物、终止液、标准品等。

【操作】

按ELISA 间接法操作步骤，具体参照试剂盒说明书。

【参考值】

<100kIU/L。

【临床意义】

血清总IgE 在人群中呈偏态分布。年龄等多个因素可影响血清总IgE 水平。新生儿和老年人水平较低，青春期水平最高，学龄前儿童接近成人水平。男性高于女性。不同种族水平也有差异。约有70％左右的变应性疾病患者血清总IgE 升高（超过110kIU/L），而非变应性疾病患者大部分（约80％）血清总IgE 较低（小于25kIU/L）。寄生虫感染也可使血清总IgE 升高。因此临床诊断时必须注意，血清总IgE 升高不一定是变应性疾病，而变应性疾病血清总IgE 也不一定升高。

二、特异性免疫球蛋白E 测定

【原理】

采用荧光酶免疫测定：固相载体包被某一种纯化的变应原抗原（如粉尘螨），与待测

标本中针对该变应原的特异性IgE（sIgE）发生结合反应，再加碱性磷酸酶标记抗IgE抗体形成免疫复合物，该免疫复合物中碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中sIgE含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括固相载体、酶结合物、反应缓冲液和清洗液、荧光底物、终止液、标准品等。

【操作】

参照仪器与试剂盒说明书操作手册。

【参考值】

标准品划分成6级报告：<0.35kIU/L为0级，0.35～0.70kIU/L为Ⅰ级，0.71～3.50kIU/L为Ⅱ级，3.51～17.50kIU/L为Ⅲ级，17.51～50.00kIU/L为Ⅳ级，50.01～100.00kIU/L为Ⅴ级，>10000kIU/L为Ⅵ级。

【注意事项】

1）检测的特异性依赖于包被抗原的纯度。目前可供检测的常见变应原有上百种，大致包括吸入性（如尘螨、花粉、霉菌、特殊气体等）、食物（如牛奶、鸡蛋、肉类、水果、海产品等）、药物（如青霉素）、接触性（如油漆、毛发、避孕工具等）等几大类。

2）有的进口试剂盒中的包被抗原，尽管名称与国内所指变应原相同，但实际结构并不一致（如青霉素），此时，检测结果并不可靠。

【临床意义】

血清sIgE测定是目前体外检测变应原的重要手段，具有很高的灵敏度和特异性。一般而言，Ⅰ级sIgE水平较低，为可疑或轻度过敏；Ⅱ级sIgE为中等水平，为轻度过敏；Ⅲ级sIgE为水平较高，为中度过敏；Ⅳ级以上为sIgE水平特高，为中度到重度或严重过敏。临床症状有时并不与sIgE水平相一致。

变应原常呈地方性分布，不同地区可能差异较大。依据病史、临床特征、地方特点、年龄等资料，有重点地进行筛查，能提高诊断效率。我省以各类尘螨、霉菌、海产品引起的变应性疾病较多见。牛奶、鸡蛋引起的变应性疾病在儿童中也不少见。

三、吸入性变应原过筛试验

【原理】

采用荧光酶免疫测定：固相载体包被了空气中90％以上的常见变应原抗原（如尘螨、屋尘、霉菌、花粉等），待测标本中只要有针对其中之一种变应原的sIgE就能发生特异性结合反应，再加碱性磷酸酶标记抗IgE抗体形成免疫复合物，该免疫复合物中碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其

荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中sIgE 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括固相载体、酶结合物、反应缓冲液和清洗液、荧光底物、参考血清、阴性和阳性对照等。

【操作】

参照仪器操作手册与试剂盒说明书。

【参考值】

以荧光值报告，并以参考血清荧光均值为临界值，待测标本荧光值≥临界值为阳性，＜临界值为阴性。

【注意事项】

阴性对照荧光值应小于临界值，且一般阳性对照荧光值应为临界值的2 倍以上试验结果才可信。临界值的日间CV 应在规定范围内。

【临床意义】

变应性疾病由吸人性变应原引起的居多，如变应性哮喘、变应性鼻炎等，因此，将常见吸人性变应原集中于一个检测单元进行过筛试验，有利于提高诊断效率，并节约费用。检测结果阳性常有助于诊断，并落实治疗方案，或者进一步筛查具体变应原。

在一部分吸人性变应性疾病患者中（如部分老年患者），由于IgE 水平较低，导致检测结果阴性；同时包被抗原也不可能包括所有吸人性变应原，因此，检测结果阴性并不能排除吸人性变应性疾病。

除了特异性IgE，还可检测变应原特异性IgA。特异性IgA 主要反映黏膜变态反应情况，在诊断婴幼儿对一些饮食中含有的麦胶蛋白过敏引起的乳糜泻时有重要价值。

四、嗜酸细胞阳离子蛋白测定

嗜酸细胞阳离子蛋白（eosinophil cationic protein，ECP）是嗜酸细胞活化后脱颗粒释放的一种炎症介质，为一种呈碱性的单链糖蛋白，在变应性哮喘气道炎症形成过程中起着重要作用，是反映气道炎症活动的指标之一，测定血清ECP 水平可监测和指导哮喘的抗炎治疗。

【原理】

采用荧光酶免疫测定：固相载体包被抗ECP 抗体与待测标本中ECP 发生特异性结合反应，再加碱性磷酸酶标记抗ECP 抗体形成免疫复合物，该免疫复合物中碱性磷酸酶水解发光底物4－甲基伞型酮磷酸盐，形成荧光产物4－甲基伞型酮，测定其荧光强度，根据标准曲线，计算待测标本中ECP 含量。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括固相载体、酶结合物、反应缓冲液和清洗液、荧光底物、标准品和定值质控血清等。

【操作】

参照仪器操作手册与试剂盒说明书。

【参考值】

（7.42 ±3.56）μg/L。

【注意事项】

血标本的采集建议使用含惰性分离胶的专用试管，及时分离血清，并尽可能保持采样条件的一致。也可以检测组织标本（如肺泡灌洗液）。

【临床意义】

正常人群血清ECP 水平较低。哮喘患者气道组织和血循环中，ECP 水平明显升高。血清ECP 对于变应性哮喘的诊断，尤其在以慢性咳嗽为唯一症状的非典型哮喘（咳嗽变异性哮喘）的鉴别诊断中，有重要价值。ECP 水平变化与哮喘病程及严重程度相关，发作期哮喘患者ECP 水平明显高于缓解期哮喘患者。在缓解期哮喘患者中，ECP 水平如持续上升，可能预示哮喘的急性发作。因此，ECP 还可用于哮喘病情和预后的判断、疗效监测及评价。

第二节　循环免疫复合物检测

循环免疫复合物（circulating immune complex，CIC）是存在于血循环中的可溶性抗原－抗体复合物。通常能促进吞噬，有利于抗原的清除。但在某些情况下，如在血管壁、基底膜沉着，则激活补体、促进血小板聚集和炎症因子释放而导致免疫病理损伤，引发III型变态反应。CIC 与肾炎、感染、自身免疫病、肿瘤等诸多疾病相关。

一、沉淀比浊法

【原理】

CIC 因分子量较大，易被低浓度聚乙二醇（PEG）沉淀而使液相浊度增大。利用免疫透射比浊或散射免疫比浊法可测定CIC 的含量。

【试剂】

1）0.1mol/L pH8.4 硼酸盐缓冲液（BB）：含10 分子结晶水的硼砂4.29g，硼酸3.40g，加蒸馏水至1L，过滤备用。

2）PEG－氯化钠稀释液：PEG6000 40.0g，氯化钠10.0g，BB 加至1L，过滤备用。

【操作】

按试剂盒说明书操作。一般步骤如下：

1）取待检血清0.15ml，加BB 0.3ml（3倍稀释）。

表5－10－1　操作步骤

加入物（ml）	测定管	对照管
BB		2.0
PEG－氯化钠稀释液	2.0	
3倍稀释标本	0.2	0.2

2）按表5－10－1所示，加入各液（待检血清最终稀释倍数为33倍，PEG最终浓度为36.4g/L）。

3）37℃水浴60min后，用蒸馏水调零，在波长495nm处读取吸光度值。

【计算】

待测血清吸光度值＝（测定管吸光度值－对照管吸光度值）×100

【参考值】

4.3±2.0，>8.3为免疫复合物阳性。

【注意事项】

1）空腹取血，尽可能减少脂蛋白引起的伪浊度。

2）高γ球蛋白血症易造成假阳性结果。

3）此法快速、简便，但特异性稍差。

二、酶联免疫吸附试验

【原理】

待测血清由PEG沉淀后，加至葡萄球菌A蛋白（SPA）包被的固相载体上，SPA可与CIC中IgG的Fc段结合，再加入酶标记的SPA形成夹心反应，根据显色结果测定CIC含量。

【试剂】

1）50.0g/L和25.0g/LPEG 6000溶液：用0.02mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液配制。

2）牛血清白蛋白（BSA）缓冲液：用0.05mol/L pH7.4磷酸盐缓冲液配制，含0.01mol/LEDTA，1.0g/L叠氮钠，0.5%Tween－20，4.0g/LBSA。

3）辣根过氧化物酶标记SPA：用改良过碘酸钠法配制，滴定最适工作浓度；如为市售试剂，按说明书使用。

4）热聚合人IgG（HAHG）人IgG10mg/ml，63℃加热20min，立即放冰浴急速致冷

制成。分装贮存于－20 ℃备用。

5） 底物与终止液。

【操作】

1） 用磷酸盐缓冲液稀释SPA 成5 μg/ml，包被微量反应板，每孔100 μl （对照孔不包被），4 ℃过夜后洗4 次。

2） 待测血清50 μl，加磷酸盐缓冲液150 μl，50.0g/LPEG 溶液200 μl 混匀，4 ℃过夜。2000r/min 离心20 min，弃去上清液。沉淀用25.0g/L PEG 溶液洗3 次。加磷酸盐缓冲液200 μl，BSA 缓冲液200 μl，混匀，37 ℃水浴30 min，不时摇动，使完全溶解。

3） 将上述溶解物加至包被孔和对照孔中，置37 ℃60 min，洗3 次。各孔加HRP 标记SPA100 μl，37 ℃60 min，洗3 次。各孔加底物溶液100 μl，37 ℃20 min 显色。加2 mol/L H_2SO_4 50 μl，终止反应，于波长492nm 测定吸光度。

4） 标准曲线制备：取正常人血清200 μl，加HAHG （120 μg/ml）200 μl，再加磷酸盐缓冲液0.4 ml，50.0g/LPEG 溶液0.8 ml，4 ℃过夜。同时以不加HAHG 正常血清为空白对照。沉淀、清洗同标本操作。用稀释的BSA 缓冲液（加等量0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液）1.6 ml 溶解并稀释成120、60、30、15、7.5 μg/ml，与待测血清同法操作，制成标准曲线。

【结果判断】

以待测血清吸光度值查标准曲线，即可求得相当于HAHG 的CIC 含量（μg/ml）。

【参考值】

>28.4 mg/L 为阳性。

【注意事项】

1） HAHG 不宜反复冻融，否则易解聚。加入BSA 至最终浓度5.0g/L，可使HAHG 稳定。

2） PEG 浓度影响CIC 沉淀的量，须严格控制。

【临床意义】

一些自身免疫性疾病（如系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、结节性多动脉炎等）、膜增殖性肾炎、急性肾小球肾炎、感染性疾病（如化脓性链球菌感染、慢性乙型肝炎、登革热、EB 病毒感染、疟疾等）以及肿瘤（如急性粒细胞性白血病、霍奇金病、肺癌等）患者，血清中均可能检出CIC。CIC 反复出现、水平增高常提示病情进展和复杂化。血清CIC 测定对于上述疾病的疗效观察、预后判断等有重要意义。

第十一章　移植免疫学检验

移植（transplantation）是将细胞、组织或器官从原部位移植到自体另一部位或异体的过程。其中被移植的细胞、组织、器官称为移植物（graft），提供移植物的个体称为供者（donor），接受移植物的个体称受者或宿主（recipient or host）。根据供受者的关系，一般将移植分为自体移植（autograft）、同系或同基因移植（isograft or syngraft）、同种移植（allograft）、异种移植（xenograft）。

目前临床进行的移植绝大部分为同种移植，移植成败的关键在于供者与受者主要组织相容性抗原的差异，人类白细胞抗原（human leukocyte antigen，HLA）与ABO血型系统是移植相关的重要抗原系统。HLA分子分三类，其中HLA－Ⅰ类和HLA－Ⅱ类分子与移植免疫的关系较为密切。目前认为HLA－DR位点的抗原对移植最为重要，其次为HLA－A、HLA－B、HLA－DQ和HLA－DP，而HLA－C位点的抗原在移植免疫过程中意义不大。为了减少移植排斥反应的发生，有必要选择HLA抗原尽可能相同的个体作为供者。但由于HLA具有高度的多态性，决定了所表达的HLA抗原分子的多态性。因此，除同卵双胞胎外很难找到HLA基因完全相同者。

尽管人们在器官移植前进行了多种配型试验，挑选适宜的供者，然而除非同基因移植，其他均会发生排斥反应，主要有两种不同类型的反应，一种为移植物抗宿主反应（graft－versus－host reaction，GVHR），最终导致移植物抗宿主病（graft－versus－host disease，GVHD），最常见于骨髓移植。另一种为宿主抗移植物反应（host－versus－graft reaction，HVGR），依其发生时间、发病机制、临床表现及病理变化，一般分为超急性、加速性、急性和慢性排斥四种类型。排斥反应的临床表现与其他原因如药物的器官毒性作用或病原微生物感染的临床表现非常相似。因此，及时、准确地诊断移植排斥反应就显得非常重要。目前诊断和监视的手段主要有两种，一种是非特异性的，如观察移植器官和临床表现，包括生化指标及影像学诊断；另一种是特异性的，如免疫学检测和病理活检等方法。但只有免疫学检测有可能早于临床表现及影像学改变之前发现和诊断排斥反应。因此，免疫学检测在移植排斥反应的监视和诊断中有其独特的重要地位。

移植术后，免疫抑制剂的使用使移植物的长期有效存活成为可能，但长期使用又导致其它问题。第一，使用免疫抑制剂后，移植患者容易感染，移植术后1个月内，最常见的是细菌感染，术后2个月后，大多是病毒感染，最常见的有巨细胞病毒和EB病毒

等。第二，使用免疫抑制剂后，移植患者肿瘤的发病率高，常见的有B 细胞淋巴瘤、皮肤鳞状上皮细胞癌等，其发生机制可能与EB 病毒感染有关。第三，免疫抑制剂的毒性作用。因此，器官移植受体非常有必要进行治疗药物的浓度监测和感染性疾病有关指标的检测。

第一节　HLA 系统的检测

组织相容性抗原的配型是选择供体和受体的重要步骤。临床上主要通过ABO 血型和HLA 配型选择供体和受体。由于HLA 在人群中呈现高度的多态性，HLA 配型要比ABO 血型配型困难得多。常用的检测技术主要是血清学分型、细胞分型和基因分型技术。近年来传统的细胞分型法已逐渐被淘汰。

一、血清学分型法

采用补体依赖微量细胞毒（micro－complement dependent cytotoxicity，CDC）试验，应用该法检测的抗原称SD 抗原（serologically defined antigen），包括HLA－I 类抗原（HLA－A、B、C）和HLA－II类抗原（HLA－DR、DQ）。

【原理】

应用一系列已知抗HLA 的特异性标准分型血清与待测淋巴细胞混合，然后加入补体，待测淋巴细胞上的HLA 抗原与特异的抗HLA 抗体结合，激活补体导致靶细胞的溶解，溶解的细胞可被加入的锥虫蓝或伊红染料着染，而活细胞不着染。因此，可根据靶细胞的着色率，确定待检标本的HLA 特异性。

【试剂】

商品化的试剂盒一般包括：抗HLA 的标准分型抗体，补体，染料，淋巴细胞分离液。

【操作】

严格按试剂说明书进行操作。

【注意事项】

（1）HLA 抗体的选择：以往HLA 抗体主要来自经产妇外周血、胎盘血，也有从计划免疫者或有受血史者的外周血中分离获得。HLA－II类抗血清还需用混合血小板将其中可能含有的I 类抗体吸收除去。抗血清种类要覆盖本民族或本地区80％以上的抗原，定型板需经有关部门核准才可使用。

（2）待测细胞的要求：HLA－A、B、C 等I 类抗原存在于所有的有核细胞表面，只

需分离单个核细胞；检测HLA －DQ、DR 等II类抗原需分离较纯的B 淋巴细胞，目前采用磁珠（含抗CD －19 单克隆抗体的磁珠）分离法可较方便得到B 淋巴细胞。

3）结果的判断：如发现本底过高，常由于分离细胞的试剂不当以致死细胞过多，要用40％PERCOLL 液去掉死细胞。

4）染液：可采用荧光液代替伊红，然后在荧光显微镜下观察结果。

二、细胞分型法

采用混合淋巴细胞培养（mixed lymphocyte culture，MLC）或混合淋巴细胞反应（mixedlymphocyte reaction，MLR），即遗传型不同的两个个体的淋巴细胞在体外培养时，由于HLA 抗原不同，能相互刺激导致对方淋巴细胞分裂增殖和转化，可用形态学或^{3}H －TdR 掺入法进行检测。此法正逐步被淘汰，具体操作不作详细介绍。

三、基因分型法

采用DNA 限制性片段长度多态性分析、PCR 扩增产物的测序、特异性引物的PCR 技术等方法，从基因水平对HLA 基因多态性进行分析，方法准确、灵敏，且能检出血清学和细胞分型法无法检出的基因型别。

1.PCR －序列特异性引物分型法

【原理】

应用一套HLA 等位基因的特异性引物，通过PCR 技术，特异性引物仅扩增与其特异性相应的等位基因，而不扩增其他等位基因，从而获得HLA 型别特异扩增产物，通过电泳分析确定HLA 的型别。

【试剂】

商品化试剂盒一般包括：PCR 反应管，PCR 增强因子，染料溶液，Taq 聚合酶，石蜡油等。

【操作】

具体操作见试剂盒说明书。

【注意事项】

本法目前是HLA －基因分型的最常用方法，有成套的试剂提供，操作简便、结果可靠，可在2～4h 内得到分型结果，特别适合于临床急诊和尸体器官移植。

2．限制性片段长度多态性分析

将PCR 与限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，PCR －RFLP）相结合，用一组限制性内切酶酶切PCR 扩增产物，然后在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上进行限制性片段长度分析。

【原理】

由于HLA 的特异性是由其编码基因的碱基序列所决定的，不同特异性HLA 的DNA 碱基序列不同，导致限制性内切酶位点的不同，造成DNA 电泳后，限制性片段长度的多态性，由此可鉴定HLA 基因的型别。

【试剂】

商品化试剂盒。

【操作】

具体操作见试剂说明书，其基本操作流程为：①DNA 的提取；②PCR 扩增；③限制性内切酶酶切；④聚丙烯酰胺凝胶电泳和染色，分析。

【注意事项】

1） 本法是最早建立的研究HLA 多态性的DNA 分析技术。

2） 本法不能检测所有的等位基因，高度多态性等位基因的酶切图谱较复杂。

3.PCR 扩增产物直接测序

【原理】

由于HLA －I 和II 类基因DNA 序列已明确，可根据已知材料合成同义引物（Sense）及反义引物（Antisense）扩增单链DNA 片段直接进行单链DNA 序列的测序。采用4 种荧光染料标记的双脱氧核糖核苷酸（G、A、T、C）与模板DNA 末端碱基在PCR 循环中结合后在高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳中，电子计算机能自动记录大约400 个碱基顺序并以4 种不同的颜色来表示。

【试剂】

商品化试剂盒。

【操作】

具体操作见试剂说明书，其基本操作流程为：①DNA 提取；②PCR 扩增所需测序的靶DNA 片段（第1 次PCR）；③分离所需测序的DNA 片段；④序列分析PCR 扩增（第2 次PCR）；⑤PCR 产物的纯化；⑥PCR 产物的序列分析。

【注意事项】

本法可进一步证实扩增DNA 产物的结构，确定等位基因的多态性、变异性、未知基因的性质及等位基因等。但操作繁琐，实验持续时间较长，成本较高。

4PCR －序列特异性寡核苷酸探针分型法

【原理】

先合成HLA 型别特异的寡核苷酸（Sequence specific oligonucletide，SSO），经同位素、异羟基洋地黄甙元或辣根过氧化物酶标记制成探针，再用PCR 方法扩增待测细胞的

HLA 基因片段，最后与特异序列明确的寡核苷酸探针杂交，从而确定HLA 型别。

【试剂】

商品化试剂盒。

【操作】

具体操作见试剂说明书，其基本步骤为：①探针（SOP）制备；②用相应引物对HLA 基因不同位点进行PCR 扩增；③将扩增产物进行印迹杂交或斑点杂交；④用特异显色系统进行检测。

【注意事项】

本法分辨率高，特异性强，可区分只差一个核苷酸的序列，但实验持续时间长，不适用于快速分型。针对不同的等位基因需多个探针。

【临床意义】

（1）供、受者HLA －A 和HLA －B 等位基因相配的数目越多，移植物的存活率越高，常规不作HLA －C 位点的配型。

（2）HLA －位点相配很重要，它不依赖于HLA －A 、HLA －B 位点相配的数目，因为HLA －R 和DQ 基因处于连锁不平衡，所以DR 位点相配的个体，通常DQ 位点也相配，常规不作DQ 位点的配型。

第二节　交叉配型试验

传统的交叉配合试验是检测受者体内是否存在抗供者的特异性抗体，现在可同时检测受者对供者LD 抗原的相容程度。

一、抗淋巴细胞抗体的检测

以往多采用微量细胞毒交叉配合试验，之后发展为用已知HLA 型别的标准淋巴细胞作细胞毒抗体测定，目前可采用ELISA 进行群体反应性抗体（panel reaction antibody，PRA）检测。有条件的还可选用流式细胞仪检测。

1．微量淋巴细胞毒交叉配合试验

【原理】

利用淋巴细胞毒试验检测受者体内是否存在抗供者淋巴细胞的抗体，该抗体在补体的存在下可破坏相应的淋巴细胞。以锥虫蓝或伊红使死细胞着色，通过计数死细胞百分率估计细胞毒强度。

【试剂】

1）抗淋巴细胞血清。

2）补体：采集多只健康家兔血液，分离血清，分装置-20 ℃备用。

3）淋巴细胞悬液：分别取供、受者肝素抗凝血2～3 ml，分离淋巴细胞，用RPMI 1640 培养液配成2 ×10^6/ml 细胞悬液。

【操作】

1）试管法：按表5-11-1 步骤操作。

2）微量培养板法：将微量培养板按表5-11-2 标记，并浸入含液体石蜡的试验盒内进行操作。

【结果判断】

1）试管法：从各管吸样滴于血细胞计数板内，或直接用高倍显微镜观察，计数200 个淋巴细胞和其中的死细胞数，计算出死细胞比值。①－：<10 %，可进行移植；②＋：11 %～25 %，结合临床情况考虑；③＋＋：26 %～50 %，不能移植；④＋＋＋：51 %～80 %，不能移植；⑤＋＋＋＋：>80 %，不能移植。

2）微量培养板法：用高倍显微镜观察，计数死细胞百分率。①－：<20 %，可进行移植；②＋：21 %～40 %，不能移植；③＋＋：41 %～70 %，不能移植；④＋＋＋：>70 %，不能移植。

【注意事项】

1）淋巴细胞悬液要尽量避免红细胞污染。

2）补体要新鲜，无毒性。

表5-11-1　微量细胞建交叉配合试验试管法操作步骤

加入物（ml）	测定管	阳性对照	阴性对照	自身对照
受者血清	1.0			1.0
抗淋巴细胞血清		1.0	1.0	
供者淋巴细胞悬液	1.0	1.0	1.0	
受者淋巴细胞悬液				1.0
	轻轻摇匀，			
	37 ℃30 min			
补体	5.0	5.0		5.0
灭活补体			5.0	
置37 ℃下60 min 后，离心（100r/min）10 min，弃去一半上清液				
20g/L 锥虫蓝置37 ℃下15 min 后观察结果	1.0	1.0	1.0	1.0

表5－11－2　微量细胞毒交叉配合试验微量培养板法操作步骤

加入物（μl）	测定管	阳性对照	阴性对照
受体血清	0.1		
抗淋巴细胞血清		0.1	0.1
供者淋巴细胞悬液	0.1	0.1	0.1
	轻轻摇匀后，置37℃，30min		
补体	0.5	0.5	
灭活补体			0.5
	置37℃，60min		
20g/L 锥虫蓝（滴）置37℃下15min 后观察结果	2	2	2

（3）如计数不能在30min 内完成，每孔可加入10％甲醛1μl 与9g/L 氯化钠溶液固定细胞。

2．流式细胞仪检测

将供者淋巴细胞与受者血清共同孵育后，用荧光标记的抗人Ig 对结合有抗体的细胞染色，在流式细胞仪上进行荧光标记测定，具体操作见相关章节。

3．群体反应性抗体检测

【原理】

用HLA 抗原代替淋巴细胞包被在反应板上，血清中待测的抗HLA －IgG 抗体与相应的抗原结合后，再加碱性磷酸酶标记抗人IgG 抗体，最后加底物显色。

【试剂】

商品化的试剂盒，一般包括：包被有HLA 抗原的反应板，碱性磷酸酶标记的抗人IgG 抗体，阴性及阳性质控物，底物。

【操作】

严格按试剂说明书操作。

【注意事项】

（1）群体反应性抗体（PRA）属抗HLA 抗体，目前试剂盒有采用纯化的HLA －Ⅰ类及HLA －Ⅱ类不同位点的抗原包被的反应板，也有采用HLA 混合抗原包被的反应板。

（2）结果判断标准依不同试剂有所差异，此法灵敏度高于微量淋巴细胞毒交叉配合试验。

【临床意义】

本法检测受者血清中有无抗供者淋巴细胞抗体，是移植前供者选择的重要试验。检测阳性者常会导致超急性排斥反应，故为移植的禁忌。

二、混合淋巴细胞培养

【原理】

此法主要测定由供者淋巴细胞介导的受体对供者细胞抗原的反应。当受者、供者组织相容性抗原（HLA）差异较大时，供体移植抗原可刺激受体T淋巴细胞，使淋巴细胞致敏并发生母细胞转化。转化率越高，说明供受体间抗原差异越大，移植成活率越低。

【试剂】

包括细胞培养液：RPMI 1640，自身或AB型人血清代替小牛血清；淋巴细胞分离液；植物血凝素（PHA）。

【操作】

1）取供、受者静脉血各5～10ml，按无菌操作要求用细胞分离液分离淋巴细胞，用细胞培养液调节细胞数至2×10^6/ml。

2）用丝裂霉素处理供体淋巴细胞，每毫升细胞加丝裂霉素25μg，37℃ 30min后，用细胞培养液洗3次，配成2×10^6细胞/ml。

3）双向培养编组：①试验组供体细胞1ml＋受体细胞1ml＋培养液4ml；②对照组：供体细胞1ml＋培养液4ml，受体细胞1ml＋培养液4ml。

4）单向培养编组：①试验组受体细胞1ml＋丝裂霉素处理供体细胞1ml＋培养液4ml；②对照组：受体细胞1ml＋培养液4ml。

5）培养：将上述各组于37℃、5%二氧化碳环境中培养5d。每日摇动培养瓶1～2次。培养结束，各组培养液移入离心管中以1500r/min离心10min。弃上清液，吸去白细胞沉积物涂片，吹干、瑞特染色，晾干。

【结果观察】

油镜下计数300～500个淋巴细胞，计算母细胞转化率。

【注意事项】

1）单向或双向培养的结果应减去各自对照组结果。设对照的目的是检查培养液中有无非特异性刺激母细胞转化的物质。

2）细胞培养液中所用AB型血清，需以3000r/min离心30min，再经数层玻璃纤维纸过滤，以减少非特异性刺激作用。

3）也可用^{3}H－TdR掺入法进行检测。

【临床意义】

母细胞转化率<5％，说明受体与供体细胞之间组织相容抗原差异少，适合移植。

第三节　移植后排斥反应的免疫学检验

移植排斥反应主要是由于供者和受者主要组织相容性抗原不同引起的。移植物中主要组织相容性抗原激活受者的T、B 淋巴细胞及其它免疫细胞，产生各种细胞因子，从而导致一系列的免疫、炎症反应。移植后排斥反应与许多细胞因子、炎性介质、急性时相反应蛋白及免疫活性细胞的激活与增殖有关。因此，检测受者血清中这些成分有助于诊断排斥反应。移植后排斥反应的诊断和监测已从过去淋巴细胞转化试验、花环试验检测外周血T 细胞及其亚群，进入到细胞、分子和基因水平。

一、细胞因子及相关受体或可溶性分子检测

1．白细胞介素－1 及其受体检测

在移植后排斥反应中，白细胞介素－1 （IL －1） 是APC 细胞递呈抗原过程中产生的重要信号分子之一。大量的APC 细胞发挥生物学作用，产生较多的IL －1，此外，单核细胞、淋巴细胞、内皮细胞等均能分泌IL －1。T、淋巴细胞活化后表达白细胞介素－1 受体 （IL －1R），所以IL －1、IL －1R 在移植后排斥反应中具有重要的监视作用。IL －1 及IL －1R 的检测方法见本篇第五章有关内容。

2．白细胞介素－2 及其受体的检测

白细胞介素－2 （IL －2） 是免疫应答中最重要的细胞因子，IL －2 及其受体被认为是监视移植后排斥反应的重要指标之一。移植后，因受者使用免疫抑制剂，IL －2、IL －2R 和可溶性IL －2R 水平较低，而在急性排斥反应时明显升高。同时检测血液、尿液IL －2 和可溶性IL －2R 水平，对诊断急性排斥反应的意义更大。因此，手术前后行动态观察IL －2、IL －2R、可溶性IL －2R，很有价值。检测方法见本篇第五章有关内容。

3．肿瘤坏死因子及其受体的检测

肿瘤坏死因子 （TNF） 是免疫应答中重要的调节因子和效应因子，在急性排斥反应时，血清和移植局部组织中均明显升高。可溶性TNF 受体在肝移植患者术后升高，发生排斥反应时达到很高水平。检测方法见本篇第五章有关内容。

4．白细胞介素－6 的检测

白细胞介素－6 （IL －6） 主要是B 细胞分化因子，近来报道与排斥反应有密切关系。IL －6 的检测方法见本篇第五章有关内容。

【注意事项】

在感染或其他因素诱发的自身免疫性疾病或变态反应患者中许多细胞因子检测结果均可增加，而移植患者常存在继发感染，两者不易区分，因此，判断结果时应结合临床综合分析。

二、粘附分子检测

大部分粘附分子是在细胞因子的诱导下，由多种细胞产生的一种糖蛋白。参与移植后排斥反应的粘附分子主要有选择素、整合素和免疫球蛋白超家族3 类。

在急性排斥反应早期，血管内皮细胞可表达血小板选择素（P－Selectin）和内皮选择素（E－Selectin），循环中的白细胞表达白细胞选择素（L－Selectin）。内皮细胞上的内皮选择素与白细胞上相应的配体结合，在局部细胞因子的刺激下，白细胞可表达整合素如白细胞功能相关抗原1（Leukocyte Function Associated antigen，LFA－1）。同时内皮细胞表达免疫球蛋白超家族如细胞间粘附分子1（Intercellular Adhesion Molecule－1，ICAM－1）、血管细胞粘附分子1（Vascular Cell Adhesion Molecule－1，VCAM－1）等。此外与排斥反应关系较密切的免疫球蛋白超家族包括HLA－Ⅱ和HLA－Ⅰ类分子，国内外有较多文献报道在排斥反应的早期HLA－Ⅱ类抗原有明显的原位和异位表达。另外还发现血清中可溶性HLA 在排斥反应发生前明显升高，在运用免疫抑制剂后下降。

三、T 淋巴细胞及其亚群检测

以往主要通过T 淋巴细胞的花环试验和淋巴细胞转化试验检测T 淋巴细胞的数量及功能的改变，以监视移植后排斥反应。目前主要是采用单克隆抗体检测T 淋巴细胞亚群及活化的淋巴细胞，常用检测方法有APAAP 法、免疫荧光染色法、花环形成试验等，有条件的可采用流式细胞仪进行检测。具体方法见本篇第四章的有关内容。

四、细针抽吸活检

为了能及时准确地评估移植器官的变化，最直接、可靠的方法是采用移植器官的细针抽吸活检方法（fine needle aspiration biopsy，FNAB）进行细胞的组织学、免疫组化等分析。此为目前诊断排斥反应的“金标准”。急性排斥反应时FNAB 的特征为：出现淋巴母细胞、浆母细胞及淋巴细胞和单核细胞的浸润。通过免疫组化染色还可发现患者CD_8^+/CD_4^+比例发生变化，在排斥反应的早期，HLA－DR 及IL－2R 的表达增加，治疗后以上指标下降。

第四节　移植后治疗药物浓度检测

为了预防排斥反应的发生，移植后受者将终生接受免疫抑制剂的治疗。环孢素是目前临床上重要的免疫抑制剂，其通过干扰淋巴细胞活性阻断体液和细胞免疫效应，从而防止排斥反应的发生。他克莫司（FK506）是近年应用于临床的一种强效免疫抑制剂，其作用机制与环孢素相似，但效力更强。具体检测方法详见第四篇第九章药物浓度检测有关内容。

第五节　移植后感染性疾病的检测

移植后患者容易发生感染，移植后1 个月内最常见的是细菌感染，如创口、尿路感染及败血症。免疫抑制剂大量使用后，易出现病毒及真菌感染，最常见的有巨细胞病毒、EB 病毒等。对于不同的器官移植患者可选用不同的检测方法（见表5－11－3）。其检测方法见微生物及免疫学检验相关章节。

表5－11－3　不同器官移植后各感染性疾病检测方法和检测指标的选择

移植器官	检测方法和指标
肾脏	细菌学：尿培养
	病毒血清学：抗巨细胞病毒抗体、抗原的检测
肺	细菌学：痰及咽拭子培养，支气管及肺泡灌洗液培养
	病毒血清学：支气管及肺泡灌洗液巨细胞病毒抗原的检测
	真菌检测：痰及支气管肺泡灌洗液镜检、培养
心脏	细菌学：血培养
肝脏	病毒血清学：乙型肝炎病毒表面抗原、抗乙型肝炎病毒表面抗原抗体、抗乙型肝炎
	病毒核心抗体、抗丙型肝炎病毒抗体、抗巨细胞病毒抗体、抗EB 病毒抗体、抗单纯
	疱疹病毒抗体、抗戊型肝炎病毒抗体等
骨髓	病毒血清学：巨细胞病毒、EB 病毒等

第六篇

微生物学检验

第一章　临床微生物学检验的基本要求与质量保证

临床微生物学检验不仅能指导临床医师诊断疾病，而且对观察病情的演变，判断疾病的预后，选择合理的治疗药物，预防和控制医院感染的流行和暴发，均起着非常重要的作用。在医院内，临床微生物学检验的任务由临床微生物学实验室完成。因此，实验室必须及时提供高质量的检验报告。要达到这个要求，必须对微生物学实验室进行全面质量管理。

第一节　医院微生物学实验室的任务和职责

一、三级医院微生物学实验室的任务与职责

(1) 对全院各临床科室及下级医院送检的各种细菌检验标本进行检测，并准确及时地将检验结果报告给临床医师。除一般细菌外，还应对常见厌氧菌、真菌、革兰阳性杆菌、分枝杆菌、少见或疑难菌株进行分离鉴定；体外抗菌药物敏感性试验（药敏试验），除纸片扩散法外，还应开展最低抑菌浓度及体内抗菌药物活性检测，有条件的实验室可开展细菌常见耐药基因检测和研究等；实验室应重视医院感染工作，并对目前临床常见耐药菌如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）、多重耐药及耐万古霉素的肠球菌（MRE、VRE）、耐青霉素的肺炎链球菌（PRP）、产超广谱β－内酰胺酶（ESBLs）菌株等进行监测。

(2) 以多种形式参与临床治疗。制订标本采集和运送指南，指导临床医师、护士及患者正确及时地采集标本，以提高送检标本的合格率与检验结果的准确性；对细菌检验及药敏结果报告作出准确的评论和解释，在报告单上可提出耐药机制和用药参考意见，帮助临床选择正确的治疗方案；积极参加查房及临床病例讨论，随时了解患者临床情况，提高检验结果的可信度。

(3) 对消毒、隔离、灭菌及环境进行细菌学检测。包括临床各科室、换药室、手术室、产房、婴儿室、监护室、透析室等的空气微生物调查和物体表面细菌数量和种类的调查；医护人员手部带菌情况调查；使用中的消毒剂与消毒、灭菌效果检测等，以了解

医院内消毒、灭菌、隔离措施的正确性及效果。

4）结合临床需要不断开展分离菌株的耐药性检测和快速鉴定等新方法、新技术的研究、引进、推广和应用。及时将这些信息传递给临床医师，以便尽早地应用于临床诊断和治疗。

5）定期或不定期对临床分离病原菌的组成及耐药趋势做出总结和分析，并将结果通报给临床。使医生了解本单位流行的重要病原菌及其耐药性变化，同时作为临床医师经验用药和感染控制部门调整控制方案的依据。

6）承担医学院校检验医学与临床医学专业的教学任务；接收下级医院的进修人员，结合不同专业积极开展有关微生物学检验的讲座；有研究生导师资格的临床微生物学实验室应积极接收研究生的培养。

7）积极开展科研工作。有独立完成的研究课题，并配合临床各科完成临床专题研究。科研成果可指导常规工作，促进常规检验更好地为临床诊断服务，从而使微生物学实验室不断发展。

8）认真做好室内质控，并积极参加本省和全国组织的临床微生物学实验室室间质评，有条件的可参加国际组织的室间质评，创造条件，积极争取通过国家质量认证和实验室认可。

二、二级医院微生物学实验室的任务与职责

1）对全院各临床科室及下级医院送检的细菌检验标本进行检测，并准确及时地将检验结果报告给临床医师。对常见病原菌进行准确分离鉴定，对少见病原菌应有能力进行分离培养，但不一定能报告到种，如可报告为“革兰阴性厌氧杆菌”；正确地开展纸片扩散法药敏试验，根据条件可开展最低抑菌浓度检测、血清杀菌试验与各种耐药菌的监测。

2）加强与临床的联系。制订标本采集和运送指南，指导临床医师、护士、患者及有关人员正确采集标本，以提高送检标本的合格率，与检验结果的准确性；根据情况对细菌检验结果报告作出适当的评论和解释，并为临床准确选择抗菌药物和治疗方案提出参考意见；积极参加临床查房及病例讨论，随时了解患者的临床情况，以提高检验结果的可信度。

3）对消毒、隔离、灭菌及环境进行细菌学检测。包括临床各科室、换药室、手术室、产房、婴儿室、监护室、透析室等的空气微生物调查和物体表面细菌数量和种类的调查；医护人员手部带菌情况调查；使用中的消毒剂检测；消毒、灭菌的效果检测等。以了解医院内消毒、灭菌、隔离措施的正确性及效果。

4）结合临床需要不断采用临床微生物学检验的新方法、新技术。如检测细菌耐药

机制和耐药性的新技术、细菌的快速鉴定和药敏试验新方法、引进先进的设备等，及时将这些信息传递给临床医师，以便尽早地应用于临床诊断和治疗。

5）定期或不定期地对临床分离病原菌的组成及耐药趋势作出总结和分析，并将结果通报给临床。使医生了解本单位流行的重要病原菌及其耐药性变化，同时作为临床医师经验用药和感染控制部门调整控制方案的依据。

6）接收医学院校检验系、中等卫生专业学校学生的临床实习；承担下级医院选送的进修人员的培训。

7）积极开展科研工作。配合临床各科完成临床专题研究。

8）认真做好室内质控，并积极参加本省和全国组织的临床微生物学实验室室间质评。

三、一级医院微生物学实验室的任务与职责

1）对全院各临床科室送检的细菌检验标本进行检测，并准确及时地将检验结果报告给临床医师。对常见病原菌准确地进行分离鉴定，根据情况开展对某些少见菌的分离鉴定；正确地开展纸片扩散法药敏试验。

2）加强与临床联系。制订标本采集和运送指南，指导有关人员正确采集标本，以提高送检标本的合格率，与检验结果的正确性；根据情况对细菌检验报告作出适当的评论和解释，帮助临床选择有效的治疗方案；参加查房及临床病例讨论，了解患者的临床情况，提高检验结果的可信度。

3）对消毒、隔离、灭菌及环境进行细菌学检测。包括临床各科室、换药室、手术室、产房、婴儿室、监护室、透析室等的空气微生物调查和物体表面细菌数量调查；医护人员手部带菌情况调查；使用中的消毒剂检测；消毒与灭菌的效果检测等，以了解医院内消毒、灭菌和隔离措施的正确性及效果。

4）结合临床需要不断采用临床微生物学检验的新方法、新技术。如检测细菌耐药机制和耐药性的新技术、细菌的快速鉴定和药敏试验新方法、引进先进的设备等，及时将这些信息传递给临床医师，以便尽早地应用于临床诊断和治疗。

5）定期或不定期对临床分离病原菌的组成及耐药趋势作出总结和分析，并将结果通报给临床。使医生了解本单位流行的重要病原菌及其耐药性变化，同时作为临床医师经验用药和感染控制部门调整控制方案的依据。

6）接收从事检验医学的专业人员进修和学生的临床实习。

7）配合临床各科完成临床专题研究。

8）认真做好室内质控，并积极参加本省的临床微生物学实验室室间质评，有条件的可参加全国组织的临床微生物学实验室室间质评。

第二节　实验室分区及基本要求

良好的工作环境和健康的技术人员是保证检验结果正确的前提。临床微生物学实验室接触多种有害微生物，为了防止交叉污染，保护工作人员健康，实验室应至少划分成3 个区。

一、清洁区

包括办公室、休息室、培养基配制室与试剂储藏室。此区域禁止带人细菌检验标本。

二、操作区

1） 整洁：微生物操作区是各种病原菌相对集中的地方，为了减少粉尘流动，防止交叉污染，操作区应与外界分开。实验室工作人员进入操作区应换鞋，送标本人员不进入操作区，操作区地面用专用拖把每天拖1 次，每周用消毒剂擦洗1 次。每天早上工作前，用紫外线照射30 min，或每天工作后，用紫外线照射60 min，对整个操作区进行消毒；下午工作结束后用消毒液消毒工作台面，以保证工作环境的安全清洁。

2） 光线：细菌培养的细小菌落及血清试验凝集颗粒的观察，都需要有充足的光线。操作区除设置常规照明灯外，还必须安装操作台灯，以保证实验结果的正确判断。

3） 通风：由于各种病原菌集中，空气污浊，实验室要求保持良好的自然通风，必要时应配备抽风机。接种、分离及鉴定细菌等操作应在生物安全柜中进行，对结核杆菌等传染性极强的微生物学检验时必须在100 %外排的生物安全柜中进行。

4） 温度和湿度：由于无菌操作的要求，实验过程中经常使用酒精灯，因此，微生物学实验室不能安装吊扇。为了达到实验所需的适宜温度，尤其是满足某些仪器对温度湿度的要求，实验室应安装空调。

5） 电源：要求提供稳压、恒频的电源；根据仪器设备要求，必要时配备不间断电源。

6） 水源：操作区内须设置水源。用于标本处理 (如细菌染色) 的水槽与工作人员洗手用的水槽不能混用。

7） 污染物处理：操作区须备有消毒缸，以处理沾有活菌的玻片等污染物品。检验剩余的标本及使用过的带菌平板、试管均须集中地点安全放置，经消毒灭菌处理后再洗涤或丢弃。

三、无菌区

1）无菌室应完全封闭，进出无菌室至少要经两道门，中间隔有缓冲间，无菌室与外间设置一个可开闭的窗口，用于传递器具。

2）无菌室必须保持整洁。工作人员进入无菌室应换专用鞋、专用衣。无菌室使用前须用紫外线消毒30min，操作结束后清洁台面，再用紫外线消毒30min。定期用乳酸或甲醛熏蒸，彻底消毒。

3）无菌室仅用于培养基分装等无菌操作，不能进行有菌标本的操作。操作人员操作时应严格关门，并戴好专用的口罩、帽子。

4）无菌室内应有空气过滤装置，并安装空调。

第三节　实验室工作人员和设备要求

一、实验室工作人员要求

在微生物学检验中，几乎从标本处理到结果解释的每一步都需要丰富的理论知识和高度的主观判断力。所以，要求每个技术人员都具有丰富的实际操作经验和较强的主观判断能力。对实验技术人员的要求如下：

1）每个微生物学实验室工作人员必须经过临床微生物学检验的专门教育和训练，并要求实验室工作人员在一定的时间内相对固定，不应频繁变换。

2）微生物学检验是一个连续性极强的工作，必须在规定的时间内处理或判断结果才有意义。因此，要求微生物学实验室工作人员节假日也能进行必要且有效的工作，而且工作人员必须具备独立处理各类微生物学检验标本的能力。

3）工作人员必须通晓并严格遵守实验室操作规程。随时了解微生物学检验的新进展，并尽可能将新知识新理论应用到实际工作中。

4）每位工作人员均应直接参与质量控制工作。实验室负责人应定期或不定期地将已知结果的标本混入日常标本中考核工作人员的检验水平，提高质量意识。

5）工作人员应加强与临床科室的联系。可通过开设讲座、提供咨询、参与查房等方式，促进微生物学检验质量的提高。

二、实验室基本设备及要求

微生物学实验室基本设备有孵箱、冰箱、水浴箱、高压灭菌器、二氧化碳培养设备、厌氧培养设备、天平、pH 计、显微镜、玻璃器皿、接种器具、离心机及生物安全

柜等。目前越来越多的实验室配置了进口的自动化细菌鉴定仪和血液培养仪。每一台精密仪器均应有专人负责，定期维修和保养，并建立详细的档案（档案内容包括仪器设备名称、仪器型号、生产厂家的名称和地址、仪器编号、购置日期及使用日期、保修期、电源要求、操作手册、使用记录、故障出现及维修记录等）。

实验室基本设备的质控要求：

1）孵箱：根据需要设置温度，可调温度范围应由室温至60 ℃。孵箱温度允许的波动幅度为设置温度±1 ℃，如一般细菌培养，孵箱温度应为35 ℃±1 ℃。应每天记录孵箱温度，定期加水，每月清洁内壁和架子。

2）冰箱和低温冰箱：普通冰箱允许温度为4 ℃±2 ℃，每天记录温度，并定期清洁。尽量减少冰箱开启次数，减少温度的波动。低温冰箱控制温度－20 ℃±5 ℃，每天观察温度并记录，每隔3 个月除霜1 次。一旦温度失控，及时调整。

3）水浴箱：根据需要设置温度，允许的温度波动幅度为0．5 ℃，每日检查水位，记录温度。每月擦拭箱体内部并换水。

4）高压灭菌器：控制温度121 ℃，每次使用前观察并调整水位，记录使用时间、温度或压力。每周用嗜热芽孢杆菌检测灭菌效果，每月清理内部及换水，并定期检测密封圈的密封效果。

5）二氧化碳培养设备：常用的有二氧化碳箱和蜡烛罐，要求二氧化碳浓度为5％～10％，箱内或罐内保持湿度，并用淋病奈瑟菌作培养效果监测。

6）厌氧培养设备：主要有厌氧箱、厌氧罐、厌氧袋。混合气体组分要求二氧化碳10％、氢气10％和氮气80％。厌氧箱与厌氧罐内部要每周清洁，定期更换催化剂。每次使用培养设备均应用美蓝指示剂或铜绿假单胞菌检测厌氧效果。

7）天平：保持刀刃光滑而锋利、称盘清洁，并定期校正。

8）pH 计：要求误差不超过0．02，并定期校正。

9）显微镜：最常用的是光学显微镜，应注意保护油镜。每次使用后应用擦镜纸擦去油镜头上的镜油。每天工作结束后，应用含少量二甲苯的擦镜纸擦拭油镜，再用洁净擦镜纸擦干。另外，微生物学实验室还用到暗视野显微镜、荧光显微镜等，均应按规程清洁和保养。

10）玻璃器皿：微生物学实验室所用试管、吸管、平皿等应洁净无菌，不残留酸碱。

11）接种器具：分为接种针和接种环两种。应选用传热散热快、耐用和不生锈的材料，早先使用的白金丝由于价格昂贵，目前多用比较经济的镍铬丝代替。一般要求接种环长5～8cm、直径2～4mm，定量接种环要定期校正其容量，接种针长5～8cm。常用仪器设备的质量控制要求见表6－1－1。

表6－1－1　常用仪器设备质量控制要求

设备	控制标准保养及监测	
高压灭菌器	温度≥121 ℃	每次用前换水；每月清洁1 次
孵育箱	温度35 ℃±1 ℃	每天记录温度；每月清洁内壁和隔板
水浴箱	温度37 ℃±0．5 ℃	每天记录温度；每月擦内壁和换水
冰箱	温度4 ℃±2 ℃	每天记录温度；保持清洁并定期除霜
低温冰箱	温度－20 ℃±℃	每天记录温度；保持清洁并定期除霜
二氧化碳培养箱	二氧化碳5 %～10 %	每天记录温度；定期换水；用淋病奈瑟菌监测效果
厌氧培养箱	二氧化碳10 %、氢气10 %、氮气80 %	每次使用时用厌氧指示剂监测效果

第四节　实验室安全措施和质量保证

一、实验室安全措施

1）微生物学实验室工作人员要认真学习、严格执行实验室安全制度，并定期检查。

2）进入实验室要穿工作服，工作服应放置在指定的地点，并经常消毒洗涤；生活用品不能带人实验室，必要的书籍带入后要与操作面远离，带离实验室前必须经消毒处理。

3）实验室内不得高声谈笑，不准吸烟、饮食，不要用手触摸头、面等部位以免造成污染。如传染物污染手部，要立即用2 %～3 %甲酚皂或0．3 %过氧乙酸溶液浸泡，再用肥皂水和流水冲洗干净；如有传染物吸人口中，应立即吐出，再用大量清水漱口，并根据需要服用相应的药物以防感染。

4）如传染物污染桌面或地面应立即用2 %～3 %甲酚皂或5 %石炭酸溶液覆盖其上，经30 min 后方可抹去。如工作服被病原微生物污染，应立即脱下，进行高压灭菌处理。

5）实验室应用紫外线进行空气消毒，并定期检测；接种环（针）使用后应立即在火焰灯上烧灼灭菌；沾有活菌的玻片、吸管等物品应立即浸泡在盛有消毒液的消毒缸内。检验剩余的标本及接触过微生物的平板、试管均须集中放置，经消毒灭菌处理后再洗涤或丢弃。

6）实验动物应严格管理，不得让其逃离笼子，实验动物尸体应焚烧处理。

7）各种电器设备，如电炉、烤箱等，要专人保管，并有使用记录；易燃物品（如乙醇、乙醚等）应妥善保存，远离火源，若出现着火情况，应立即用湿布或沙土将其覆盖。

8）易燃、易爆、剧毒化学物品应有专人保管并有使用记录；分离出甲类或乙类传染病菌株，应及时上报有关部门，未经上级同意，不得带出实验室或擅自处理；菌种保存必须专人负责，并建立保存菌种档案和菌种使用、收发记录。

9）工作结束后，要用消毒液消毒工作台面；工作人员应将双手用消毒液浸泡后，再用肥皂、流水清洗干净；检查好水源、电源后，方可离开实验室。

10）微生物学实验室工作人员应定期进行健康体检及必要的预防接种，以增强自身抵抗力。

二、实验室质量保证的衡量

质量保证是指实验室为了达到应有的质量标准而采取的措施。微生物学检验的质量保证与其他检验相似，但也有其不同的特点，可以用以下几个指标来衡量：

1）可靠性：如为定量试验，即指测定值与真实值的接近程度，如血清抗体效价测定，抗菌药物最低抑菌浓度检测；如为定性试验，则观察测定值是否正确，如病原菌的鉴定、K－B 纸片法测抗菌药物敏感试验结果。

2）可重复性：指同一标本用同一方法检测获得的结果之间的重复程度。通常有两方面的原因会影响微生物学检验的可重复性和精确性：一是缺乏同种性，即同一位患者的同一个标本中含有不止一种微生物，重复培养会分离到不同的微生物；二是缺乏稳定性，指随着时间变化，一个标本中的微生物以不同速度繁殖或死亡，重复培养时会分离到不同的微生物。因此，要求标本的送检、处理、结果判断都要有一个统一的标准。

3）临床效果：指所做的试验正确诊断某种致病菌或某种致病条件的能力。常用敏感性和特异性表示。理想的试验应该是敏感性高，特异性好。在微生物学检验中，往往结合几个方面来诊断某种疾病，如单用麦康凯培养基分离粪便中的沙门菌，可能会因肠道非致病菌过度生长而掩盖致病菌，以致缺乏敏感性；同样，单纯靠肥达反应结果诊断伤寒，则缺乏特异性，因为既往感染和其他非特异性感染可导致交叉凝集反应。

4）及时性：临床微生物检验结果如果不能及时报告，就算准确性再高，患者也会因失去最佳治疗时机而使检验结果起不到作用。检验结果能否及时提供医生作诊治疾病之用，在临床微生物学检验中尤为重要，故要求实验室在建立准确性试验的基础上选择一些适应临床需要的快速试验，并实行培养标本的分级报告制度。

三、实验室质量保证的措施

1）室内质控：包括对实验质量的连续监测和对各个实验步骤的全面检查。微生物学检验质量要达到可靠、及时、重复性好、临床效果佳的要求，就必须从技术人员培训，标本的采集、运送和接种，细菌的分离、鉴定，结果的解释和评价，菌种的保存和保管，以及药敏试验、仪器、培养基、试剂等多方面进行全面的质量管理。

2）室间质评：室间质评是在卫生行政部门领导下，由各级权威组织如检验中心负责组织的活动，包括对实验质量的定期检查和对鉴定试验、分离技术的定点检查。通过室间质评可以评价和比较实验室结果的可靠程度，发现和改正经常出现的错误，促进实验室使用标准试剂和统一的操作程序，检验室内质控，促进室内质控的贯彻执行。

各级临床微生物学实验室在认真做好室内质量管理的基础上，应积极、认真地参加室间质评，以督促实验室应用统一的操作步骤和标准试剂，并纠正误差，在此基础上积极争取实验质量的有效认证和实验室认可。

第五节　细菌检验质量控制

一、细菌鉴定基本原则

1）除口腔奈瑟菌等少数菌群外，细菌要鉴定到种。部分肠道感染菌要进一步分出血清型。

2）及时更新检验方法或鉴定仪的软件，以适应病原菌的变迁和细菌分类和命名的修正，提高细菌鉴定的准确性。

3）各类增菌、分离和生化反应培养基、抗血清、染色液和生化反应试剂等均应定期作质控测试。

二、检验标本质量控制

正确采集和处理标本是实验室检查获得正确结果的前提，目前仍有不少实验室和临床医护人员对检验标本分析前质量控制的重视不够。对标本采集方法和时间、标本来源，实验室人员虽然不能直接控制，但有责任指导医师、护士、患者及家属正确采集标本，可采取集中讲课、个别辅导和到病房作取标本示教等方式给予指导。同时控制影响检验质量的其他因素，如检验标本的运送、储存和处理等，均应统一按正确的操作规程执行。有关微生物学检验标本的采集和送检规程及基本要求详见本篇第五章。

三、药敏试验质量控制

临床微生物学检验在快速检出病原体的同时应提供准确的药敏试验结果，作为临床上科学、准确地选择治疗用药的依据。药敏试验结果的正确和及时对指导临床感染性疾病的治疗用药十分重要，因此，需要对实验质量按国家有关操作标准和规程进行严格控制。

药敏试验方法很多，包括纸片扩散法、琼脂稀释法和液体稀释法等。实验室常采用的为K－B 纸片扩散法，此法适用于快速生长的细菌，如葡萄球菌、肠球菌、肠杆菌、假单胞菌和不动杆菌等。改良后可测定嗜血杆菌、淋病奈瑟菌和链球菌。

1.K－B 纸片扩散法药敏试验操作要求

1） 培养基选择：WHO 推荐使用水解酪蛋白琼脂（MH） 培养基，因其钙、镁离子含量适中且不含有与磺胺药物拮抗的物质，含磺胺药物的纸片的抑菌环不致受影响。检测肺炎链球菌敏感性时，要求在培养基中加入5％脱纤维羊血；检测嗜血杆菌及淋病奈瑟菌敏感性时，分别使用嗜血杆菌试验培养基（HTM） 和GC 琼脂基础+1％特定的生长补充品。要求琼脂平板厚度为4mm，pH 7.3±0.1）。

2） 含药纸片：必须经过质量鉴定。纸片要求酸碱度中性，直径6.35mm，含药纸片应低温保存，－20℃保存不超过1 年，日常可取出1 周用量存放于4℃冰箱。含药纸片应避免受潮，盛纸片的容器自冰箱或冰冻箱取出后，必须置室温1～2h 后再打开取出纸片使用，以避免冷凝水浸湿纸片。含药纸片与平板边缘至少相距15mm，纸片与纸片间中心点至少相距24mm。含药纸片贴在琼脂上不得再移动，否则会因部分药液渗入琼脂而影响试验结果。

3） 接种菌量：从孵育18～24h 的血平板培养物中，挑取4～5 个菌落，制成0.5 麦氏浊度的菌悬液。用棉拭子沾取菌悬液在M－H 平板上依3 个方向（转60°） 涂划，以保证接种物均匀分布。

4） 孵育：接种菌液后，待琼脂表面水分稍干后，即按要求贴上含药纸片，15min 内放入35℃孵箱孵育（检测肺炎链球菌、嗜血杆菌及淋病奈瑟菌敏感性的平板应放在5％～7％二氧化碳孵箱中孵育），平板最好单独摆放，重叠最多不能超过2 个。孵育18～24h，读取结果。

5） 判定结果：用刻度尺或卡尺准确量取抑菌环直径。抑菌环直径以肉眼见不到细菌明显生长为限。如变形杆菌抑菌环内出现蔓延生长，磺胺类药物抑菌环内出现微量生长，均忽略不计。判读药敏试验结果应参考NCCLS 最新公布的折点表。

2．药敏试验质控要求

1） 用质控菌株按标准方法与临床标本分离菌株同步进行药敏试验。

(2) 更换药物或培养基时必须用相应质控菌株测试。

(3) 三级医院每天用质控菌株进行常规监控，二级医院每周监测1 次。每次测试结果应作记录。

(4) 如出现抑菌环直径超出可接受范围，应从培养基、抗菌药物、接种浓度等方面寻找原因，并及时纠正。部分抗菌药物的纸片法药敏试验质量控制标准见表6 -1 -2。稀释法药敏试验质量控制标准见表6 -1 -3。

3．试验药物的选择

在进行体外药敏试验时，应根据不同抗菌药物的特点和耐药谱，结合患者的临床特点选择试验药物，选择药物的基本原则如下：

(1) 代表性：药敏试验所选药物应具有代表性及对同类药物有提示作用。见本篇第八章。

(2) 预报性：选择合适的药物作药敏试验，可对抗菌药物使用有提示作用。如金黄色葡萄球菌对苯唑西林耐药提示对目前所有β-内酰胺类抗生素耐药；革兰阳性菌耐庆大霉素提示对氨基糖甙类耐药；克雷伯菌属及大肠埃希菌对头孢泊肟、头孢他啶或氨曲南耐药，提示菌株可能产超广谱β-内酰胺酶（ESBLs）。

(3) 特殊性：选择感染部位有较高浓度的抗菌药物进行试验，有利于临床治疗。如尿路感染患者尿液标本中病原菌药敏试验可选用在泌尿道浓度较高的药物如硝基呋喃类的呋喃妥因；中枢神经系统感染患者脑脊液中病原菌药敏试验应选用能通过血脑屏障的药物，如氯霉素、头孢呋辛。

随着细菌耐药性日趋严重，多重耐药菌株不断出现。临床微生物学实验室应根据临床要求和实际情况，开展一些特殊的药敏试验，如耐甲氧西林葡萄球菌（MRSA）的检测，β-内酰胺酶及ESBLs 的检测，耐万古霉素肠球菌（VRE）的检测等。

四、检验结果质量控制

1．检验结果报告

微生物学检验结果报告单是反映微生物学检验水平的重要依据之一。报告单填写要准确、规范，将微生物学检验技术上的新进展充分反映在报告单上，如细菌名的更改，新的耐药原因导致的药敏结果修正等。每一份报告单发出前都要由专人审核，包括检查项目是否遗漏、结果有无明显错误、字迹是否清楚、检验者有无盖章签名等。核对后盖上审核章，才能将报告单正式发出。同时，微生物学实验室应实行分级报告制度，将标本显微镜检查的初级结果报告临床科室，并进行初级药敏试验，为临床早期治疗提供依据。

表6－1－2　4 种质控菌株对纸片法药敏试验抑菌环直径（mm）的允许范围

抗菌药物	纸片含量	大肠埃希菌 ATCC25922	金黄色葡萄球菌 ATCC25923	铜绿假单胞菌 ATCC27853	流感嗜血杆菌 ATCC49247
阿米卡星	30 μg	19～26	20～26	18～26	—
氨苄西林	10 μg	16～22	27～35	—	13～21
氨苄西林/舒巴坦	10/10 μg	19～24	29～37	—	14～22
羧苄西林	100D μg	23～29	—	18～24	—
头孢曲松	30 μg	29～35	22～28	17～23	31～39
氯霉素	30 μg	21～27	19～26	—	31～40
环丙沙星	5 μg	30～40	22～30	25～33	34～42
红霉素	151 μg	22～30	—	—	
庆大霉素	10 μg	19～26	19～27	16～21	—
卡那霉素	30 μg	17～25	19～26	—	—
哌拉西林	100 μg	24～30	—	25～33	—
左氧氟沙星	5 μg	29～37	25～30	19～26	32～40
亚胺培南	10 μg	26～32	—	20～28	21～29
呋喃妥因	300 μg	20～25	18～22	—	—
苯唑西林	1 μg	—	18～24	—	—
青霉素	10U	—	26～37	—	—
妥布霉素	10 μg	18～26	19～29	19～25	—
利福平	5 μg	8～10	26～34	—	22～30
TMP/SMZ	1.25/23.75 μg	23～29	24～32	—	24～32
万古霉素	30 μg	—	17～21	—	—

注：－表示该药敏试验不推荐或结果不准确或不作为常规使用

表6－1－3　5 种质控菌株对稀释法药敏试验最低抑菌浓度（MIC，μg/ml）的允许范围

抗菌药物	粪肠球菌 ATCC29212	大肠埃希菌 ATCC25922	铜绿假单胞菌 ATCC27853	肺炎链球菌 ATCC49619	流感嗜血杆菌 ATCC49247
阿米卡星	64～256	0.5～4	1～4	—	—
氨苄西林	0.5～2	2～8	—	0.06～0.25	2～8
氨苄西林/舒巴坦	—	2/1～8/4	—	—	2/1～8/4
羧苄西林	16～64	4～16	16～64	—	—
头孢曲松	—	0.03～0.12	8～64	0.03～0.12	0.06～0.25
氯霉素	4～16	2～8	—	2～8	0.25～1
环丙沙星	0.25～2	0.004～0.015	0.25～1	—	0.004～0.03
红霉素	1～4	— —	0.03～0.12	—	
庆大霉素	4～16	0.25～1	0.5～2	—	—
卡那霉素	16～64	1～4	—	—	—
哌拉西林	1～4 1～4	1～4	—	—	
左氧氟沙星	0.25～2	0.008～0.06	0.5～4	0.5～2	0.008～0.03
亚胺培南	0.5～2	0.06～0.25	1～4	0.03～0.12	—
呋喃妥因	4～16	4～16	—	4～16	—
苯唑西林	8～32	—	—	—	—
青霉素	1～4	—	—	0.25～1	—
妥布霉素	8～32	0.25～1	0.25～1	—	—
四环素	8～32	0.5～2	8～32	0.12～0.5	4～32
TMP/SMZ	≤0.5/9.5	≤0.5/9.5	8/152～32/608	0.12/2.40～1/19	0.03/0.59～0.25/4.75
万古霉素	1～4	—	—	0.12～0.5	—

注：－表示该药敏试验不推荐或结果不准确或不作为常规使用

2．检验结果记录

实验室应制定实验结果登记制度和原始记录，包括临床资料，细菌的分离、鉴定及药敏结果，培养基和试剂的配制记录。以备患者检验报告单遗失或结果有疑问时查考。详细的结果记录，有利于定时统计、分析和总结医院感染菌的类型及耐药情况，及时通报医院感染控制科、抗菌药物管理委员会和临床科室，指导临床抗菌药物的使用和采购。

五、培养基质量控制

培养基是否合格对检验结果的正确与否起到关键作用。所有的培养基在临床使用前都必须经过无菌试验和性能测试，这既适用于实验室用基础物质配制的培养基，也适用于商品培养基。大多数商品培养基是脱水的，运输和储存及在冷热接触中会发生变化，尤其对易变质的培养基更应注重无菌状况和性能测试。脱水培养基一旦开封，应注明开封日期。所有脱水培养基应储存在阴凉干燥处，贮藏架不宜放在靠近高压灭菌器和水源的地方，以防潮湿和受热。培养基质量控制，包括以下几个方面：

1．配制时的质量控制

(1) 容器：配制和分装培养基的烧瓶、平皿或试管等器材应为中性，无酸、碱抑制物残留，平皿底部要平，以免琼脂厚薄不一，影响药敏试验结果。

(2) 成分来源：各种成分来源可靠，不含对目的菌生长有抑制的物质。特殊要求的培养基，如葡萄糖氧化发酵试验（O/F 试验），除加入葡萄糖外，不能含有其他糖类，指示剂不能用乙醇溶液，避免O/F 试验的假阳性。培养基配制用水应是蒸馏水。

(3) pH 值调整：根据培养基的不同要求调整pH 值，控制在要求范围的±0.2 之内。应当注意，培养基在高压灭菌后其pH 值降低0.1～0.2，故矫正时应比实际需要pH 值高0.1～0.2。

(4) 灭菌：根据培养基所含成分及配制数量的不同，选择不同的灭菌方式，既要达到灭菌效果，又不破坏培养基成分。一般对稳定的培养基，如MH 琼脂、营养琼脂可用高压灭菌，即121 ℃15 min；而含糖的培养基则以108 ℃灭菌为好，以防止糖类破坏。不耐高热的物质如血清、牛乳等，可采用间隙灭菌法灭菌。

(5) 分装：根据使用的目的和要求决定分装量。分装培养基所用的平皿、试管要求清洁，不残留酸碱；制备平板培养基时，操作台要水平，以避免琼脂平板厚薄不一，同时确保无菌操作。

2．配制后质量控制

(1) 培养基外观情况：包括颜色、透明度、有无沉淀和凝固。如发现培养基表面有裂纹或与培养皿的边缘分离，说明培养基有脱水现象，必须丢弃。

(2) 无菌试验：每一批配好的培养基均须进行无菌试验。先灭菌后分装的培养基，可采用抽样方法试验，少于100 个样本通常选取5％～10％的量，如果配制大量培养基，则任意选取10 个培养基；无菌分装培养基则需全部做无菌试验。样本在35 ℃或其他适宜的温度下隔夜培养，如培养基含有血液，则需再置于室温1 天，以检查嗜冷菌。选择性培养基因含有抑制物质，能抑制许多微生物，因此，可加入10 倍量的无菌液体培养基，稀释抑制物质，以利于检出污染菌。即使做过无菌试验，接种时，也要检查每个平

板上的可见菌落。

⑻ 性能测试：每一批新制或新购的培养基，使用前均须取已知性质的库存菌种进行性能测试。培养基按目的不同可分为增菌培养基、分离培养基和鉴定培养基。①增菌培养基：接种少量难以生长的细菌，在一定时间内观察增菌情况，细菌能生长的最小接种浓度越小，说明增菌培养基性能愈好。②分离培养基：要求目的菌生长良好，非目的菌被抑制。一般要求生长的目的菌接种量不可过多，较好的方法是将测试菌调成0.5 麦氏浊度的菌悬液，再用0001㎖ 的标准接种环涂划在培养基上，观察菌落生长。常用分离培养基的性能要求见表6 —1 —4 。③鉴定培养基：应选择具有典型特征的菌株作性能试验。如三糖铁琼脂，须用弗劳地枸橼酸杆菌、福氏志贺菌及铜绿假单胞菌3 种菌分别接种3 支培养基，若反应结果为斜面产酸/高层产酸、硫化氢阳性，斜面产碱/高层产酸，斜面产碱/高层产碱，质量才算合格。监控常用鉴定试验培养基的推荐菌株见表6 —1 —5 。

表6 —1 —4　常用分离培养基的性能要求

培养基	目的菌名称	判定指标
羊血琼脂平板	化脓性链球菌	生长，明显的乙型溶血环
	肺炎链球菌	生长，明显的甲型溶血环
巧克力琼脂平板	流感嗜血杆菌	生长
	脑膜炎奈瑟菌	生长
普通琼脂平板	大肠埃希菌	大量生长
	表皮葡萄球菌	大量生长
甘露醇高盐琼脂平板	金黄色葡萄球菌	生长，黄色菌落
	表皮葡萄球菌	生长，无色菌落
	大肠埃希菌	抑制生长
沙保弱琼脂平板	白色念珠菌	生长
	大肠埃希菌	部分或完全抑制
	表皮葡萄球菌	部分或完全抑制
麦康凯琼脂平板	大肠埃希菌	生长，红色混浊菌落
	福氏志贺菌	生长，无色透明菌落
SS 琼脂平板	大肠埃希菌	部分抑制生长，红色混浊菌落
	鼠伤寒沙门菌	生长，黑色菌落中心
	福氏志贺菌	生长，无色透明菌落

表6－1－5　监控常用鉴定试验培养基的推荐菌株

培养基名称	阳性对照菌	阴性对照菌
靛基质	大肠埃希菌	产气肠杆菌
MR	大肠埃希菌	产气肠杆菌
VP	产气肠杆菌	大肠埃希菌
西蒙枸橼酸盐	肺炎克雷伯菌	大肠埃希菌
尿素酶	奇异变形杆菌	大肠埃希菌
三糖铁	弗劳地枸橼酸杆菌	铜绿假单胞菌
苯丙氨酸脱氨酶	奇异变形杆菌	大肠埃希菌
赖氨酸脱羧酶	鼠伤寒沙门菌	普通变形杆菌
鸟氨酸脱羧酶	鼠伤寒沙门菌	普通变形杆菌
精氨酸双水解酶	鼠伤寒沙门菌	普通变形杆菌
ONPG	大肠埃希菌	奇异变形杆菌
硝酸盐培养基	铜绿假单胞菌	醋酸钙不动杆菌
胆汁溶菌	肺炎链球菌	草绿色链球菌
65g/L 氯化钠肉汤	肠球菌	溶血性链球菌
DNA 酶	粘质沙雷菌	阴沟肠杆菌

4）记录：每批培养基的配制均应有记录，包括培养基名称、配制量、配方、配制者、原料批号、配制日期及灭菌分装情况等。如培养基出现质量问题，则可通过这些资料追查原因，并保证培养基在有效期内使用。

六、试剂、染色液和诊断血清质量控制

1．试剂

各种试剂配好后，均应注明试剂名称、配制日期、有效期及配制者，并作记录，商品试剂亦应注明购人日期及有效期。配制好的试剂均应用标准菌株作性能测试，不合格者不能使用。性能测试间隔可根据试剂的稳定性和使用频率而定，如氧化酶试剂每天用前测试，靛基质试剂每周测试1 次。试剂须根据不同要求作适当的贮存，如氧化酶试剂应置棕色瓶中4 ℃冰箱保存。

2．染色液

常用染色液如革兰染色液在每次配制后并常规至少每周检测1 次，用标准菌株金黄色葡萄球菌（ATCC25923）和大肠埃希菌（ATCC 25922）作阳性和阴性检测。不常用染

色液（如鞭毛染色液）应于每次使用前，用已知特征的菌株作检测。

3．诊断血清

诊断血清的使用和保存必须按说明要求执行，一般置4 ℃冰箱贮存，且不得暴露室温过久；使用前应注意有效期及效价，第一次使用抗血清时应用相应的菌株检查其有效性，以后每月检测1 次。如抗血清出现任何颜色的改变或混浊，即不能使用。监控常用试验与染色液的质控菌株见表6 -1 -6 。

表6 -1 -6　监控常用试验、染色液的质控菌株

试验和染色液名称	阳性对照菌	阴性对照菌
血浆凝固酶试验	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌
触酶试验	金黄色葡萄球菌	肺炎链球菌
氧化酶试验	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌
杆菌肽试验	A 群链球菌	B 群链球菌
奥普托欣试验	肺炎链球菌	草绿色链球菌
革兰染色液	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌
抗酸染色液	结核分枝杆菌	非抗酸菌

4．协同凝聚试验用试剂

协同凝聚试验常用于细菌鉴定和某些耐药基因的快速检测。凝集试剂不能冰冻，一般置4 ℃冰箱保存，使用前从冰箱取出恢复温度至25 ℃左右。每次使用时应同时用试剂空白、已知性能的阳性及阴性菌株作对照，一旦发现试剂过期或失效，应立即丢弃。

第六节　质控菌株及其保存与应用

临床微生物学实验室由于质控、科研、临床的需要，必须保存一定量的菌种，包括标准菌株和临床常规分离菌株。

一、菌种类型

㈠ 标准菌株

要搞好临床微生物学检验质控，必须保存有一批标准菌株，作为对仪器、培养基、染色液、试剂和诊断血清的质控菌株，也可作为从事细菌检验的工作人员熟悉某些菌株的教具。

1．标准菌株的条件

1）形态、生理、生化及血清学特性典型，并相当稳定。

2）菌株对所试药物产生恒定的抑菌环和恰当的MIC 值。

3）对测试项目反应敏感。如测试巧克力琼脂平板的分离能力，应选流感嗜血杆菌或脑膜炎奈瑟菌。

2．标准菌株的来源

1）ATCC ：美国典型菌种保藏中心。

2）NCTC ：英国国家典型菌种保藏中心。

3）(中国) 国家菌种保藏中心。

4）实验室分离菌株：实验室分离菌株必须经过严格鉴定，其形态、生理、生化特征典型，经多次传代，特征恒定，否则不能作为标准菌株。

(二) 临床菌株

临床分离的菌株，可保存几天、几星期或根据需要选择一些菌株长期保存，以便进行统计、分析，或用于教学和研究。

二、菌种保存

保存菌种用的培养基必须能维持使微生物长期生存且不出现生长或新陈代谢过于旺盛的情况，菌株能较长时间存活且保持性状稳定。

1．菌种保存的注意事项

1）不能用含有可发酵性糖的培养基保存菌种。

2）不可以使用选择性培养基，不能从药敏试验平板培养基上留取菌株。

3）不可使培养菌干枯，所有试管要保持良好的密封性。

4）对温度变化敏感的细菌，如淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌，不可贮存于冰箱，但可用快速冷冻干燥法长期保存。

5）作为抗菌药物敏感试验用的标准菌株，由保存状态取出后，不能连续使用1 周以上，应定期传代，但一般不超过6 次，必要时进行更换。

2．菌种保存的方法

保存菌种的方法，应根据菌种的类型和保存目的进行选择，一般包括以下几种方法：

1）培养基保存法：此法不需要特殊设备，并可随时提供使用，为常用的一种保存方法，其缺点是易发生变异。营养要求不高的细菌，可用半固体保存法，一般2 ～3 月转种1 次，并检查菌株特性，如特性已改变，则需丢弃。特殊培养要求的细菌，如流感

嗜血杆菌可接种巧克力琼脂斜面，密封后冰箱贮存，每2 周转种1 次。淋病奈瑟菌保存于巧克力琼脂，每天或隔天转种1 次，不宜4 ℃冰箱保存，因易死亡。

⑵ 快速冷冻法：将纯培养细菌在液体培养基上增菌后，取数个新鲜菌落加入含小牛血清或脱纤维绵羊血的培养基内制成浓菌悬液，再放人无菌玻璃珠，将此瓶放入－30 ℃以下低温冰箱保存。需要时用无菌镊子取出1 粒玻璃珠置增菌培养液中，增菌培养后即可获得新鲜菌种。用此方法，大部分细菌可保存6 ～12 月，甚至更长时间。

⑶ 冷冻干燥法：是菌种保存最佳方法，可以免去细菌因频繁传代而造成菌种污染、变异和死亡。此法需冷冻干燥设备，操作较费时，但适用于需要长期保存的菌种。

三、菌种管理

⑴ 实验室保存菌种需按规定时间转种，每转种3 代作一次鉴定，并有详细记录卡，包括菌种名称、编号、来源、保存日期、传代情况等。

⑵ 实验室保存菌株不得擅自处理或带出实验室，如确需要带离实验室，须经上级领导批准，并做好详细的记录。

⑶ 菌种应有专人保管，如遇工作调动，应及时做好交接工作。

第七节　质量控制手册的制订与相关法规

实验室必须制订一套指导实验室正常工作的手册，该手册除包括每个检测项目相应的操作规程及质量控制方法外，还必须包括下列内容：《标本采集、接收、存放及处理操作程序》、《实验室消毒及防止污染制度》 和 《实验室工作制度》 等，并置于实验室的醒目位置。每一项操作步骤和制度都必须严格执行，如果内容更新或增加则及时修订。

根据 《中华人民共和国传染病防治法》、《中华人民共和国传染病防治法实施办法》、《医院感染管理规范》、《消毒技术规范》 等法规和文件中的有关规定，将涉及微生物学实验室质量控制的条款概括为医院感染管理制度、传染病防治制度、菌 (毒) 种管理制度、消毒隔离制度与生物安全防护。

一、医院感染管理制度

1．检验科在医院感染管理中应履行的职责

⑴ 医院感染常规微生物监测。

⑵ 开展医院感染病原微生物的培养、分离鉴定、药敏试验及特殊病原体的耐药性监测，定期总结、分析，向有关部门反馈，并向全院公布。

3）发生医院感染流行或暴发时，承担相关检测工作。

2．检验科在医院感染管理中应达到的要求

1）工作人员必须穿工作服、戴手套，必要时穿隔离衣、胶鞋、戴口罩和戴工作帽。

2）使用合格的一次性检验用品，用后进行无害化处理。

3）严格执行无菌操作规程，静脉采血必须一人一针一管一巾一带；微量采血应做到一人一针一管一片。

4）无菌物品如棉签、棉球、纱布等及其容器应在有效期内使用，开启后使用时间不得超过24h；使用后废弃的物品应及时进行无害化处理，不得随意丢弃。

5）各种器具应及时消毒和清洗；各种废弃标本应分类处理（如焚烧处理、污水池处理、消毒或灭菌处理）。

6）报告单应消毒后发放。

7）检验人员结束操作后应及时洗手，毛巾专用，每天消毒。

8）保持室内清洁卫生。每天对空气、各种物体表面及地面进行常规消毒。在进行各种检验时，应避免污染；在进行特殊传染病检验后，应及时进行消毒，遇有场地、工作服或体表污染时，应立即处理，防止扩散，并视污染情况向上级报告。

二、传染病防治制度

（一）传染病防护和报告制度

1）对从事传染病预防、医疗、科研、教学的人员，现场处理疫情的人员，以及在生产、工作中接触传染病病原体的其他人员，应当根据国家规定，采取有效的防护措施和医疗保健措施。

2）任何人发现传染病患者或者疑似传染病患者时，都应当及时向附近的医疗保健机构或者疾病控制中心报告。执行职务的医疗保健人员、卫生防疫人员发现甲类、乙类和监测区域内的丙类传染病患者、病原携带者或者疑似传染病患者，必须按照国务院卫生行政部门规定的时限向当地疾病控制中心报告疫情。疾病控制中心发现传染病流行或者接到甲类传染病和乙类传染病中的艾滋病、炭疽中的肺炭疽的疫情报告，应当立即报告当地卫生行政部门，由当地卫生行政部门立即报告当地政府，同时报告上级卫生行政部门和国务院卫生行政部门。

3）凡在生产与工作中接触传染病病原体的工作人员，可以按照国家有关规定申领卫生防疫津贴。

㈡ 传染病相关物品的处理办法

1．废弃标本及容器的消毒处理

由于医学微生物学检验的标本大多数具有传染性，易造成实验室感染，甚至可能引起严重后果。因此，除了对实验室加强生物安全防护外，还必须建立废弃标本及容器的消毒处理的程序文件。

⑴ 接触怀疑有传染病如肝炎、艾滋病和结核病等检验标本或容器时，工作人员必须戴手套，一次性手套用后应与其他一次性可焚毁容器一起放人专用的密闭不漏水的生物垃圾袋（黄色）中，按操作规程由专人统一集中处理。

⑵ 用于微生物学检验所废弃的标本如尿、粪便、胸腹水、痰及各种分泌物等，在倒入厕所或粪便池前应预先用漂白粉（100ml 中加5g）或二氯异氰尿酸钠（100ml 中加2g）等消毒剂消毒2～4h；若是肝炎或结核病的标本消毒应延长至6h。

⑶ 对可再次使用的玻璃、金属或搪瓷容器，除干烤或高压蒸汽灭菌外，还可煮沸15min 或用1g/L 有效氯的漂白粉澄清液、二氯异氰尿酸钠溶液等消毒液浸泡2～6h，消毒后用水洗净，沥干。消毒液每日更换。

⑷ 对废弃细菌等微生物的培养物，已用于药物敏感试验和鉴定试验的器材与物品，感染动物的尸体或鸡胚等材料必须高压蒸汽灭菌后再处理。

2．被甲类传染病病原体污染的污水、污物与粪便的处理

有关单位和个人必须在卫生防疫人员的指导监督下，按照下列要求进行处理。

⑴ 被鼠疫病原体污染：①被污染的室内空气、地面、四壁必须进行严格消毒或者焚烧处理。②彻底消除鼠疫疫区内的鼠类、蚤类；发现病鼠、死鼠应当送检；解剖检验后的鼠尸必须焚烧。③疫区内啮齿类动物的皮毛不能就地进行有效的处理时，必须在防疫机构的监督下焚烧。

⑵ 被霍乱病原体污染：①被污染的饮用水必须进行严格消毒处理。②污水经消毒处理后排放。③被污染的食品要就地封存，消毒处理。④粪便消毒处理达到无害化。⑤被污染的物品，必须进行严格消毒或者焚烧处理。

⑶ 被伤寒或副伤寒、细菌性痢疾、脊髓灰质炎、病毒性肝炎病原体污染的水、物品、粪便，有关单位和个人应当按照下列要求进行处理。①被污染的饮用水应当进行严格消毒处理。②污水经消毒处理后排放。③被污染的物品应当严格进行消毒处理或焚烧处理。④粪便消毒处理达到无害化。

⑷ 死于炭疽的动物尸体必须就地焚化，被污染的用具必须消毒处理，被污染的土地、草皮消毒后，必须将10cm 厚的表层土铲除，并在远离水源及河流的地方深埋。

三、菌（毒）种管理制度

1．传染病菌（毒）种的分类

⑴ 一类：鼠疫耶尔森菌、霍乱弧菌、天花病毒、艾滋病病毒。

⑵ 二类：布氏菌、炭疽菌、麻风杆菌、肝炎病毒、狂犬病毒、出血热病毒、登革热病毒、斑疹伤寒立克次体。

⑶ 三类：脑膜炎奈瑟菌、链球菌、淋病奈瑟菌、结核杆菌、百日咳杆菌、白喉棒状杆菌、沙门菌、志贺菌、破伤风芽胞梭菌、钩端螺旋体、梅毒螺旋体、乙型脑炎病毒、脊髓灰质炎病毒、流感病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒。

国务院卫生行政部门可以根据情况增加或者减少菌（毒）种的种类。

2．传染病菌（毒）种的管理办法

⑴ 国家对传染病菌（毒）种的保藏、携带、运输实行严格管理。①菌（毒）种的保藏由国务院卫生行政部门指定的单位负责。②一、二类菌（毒）种的供应由国务院卫生行政部门指定的保藏管理单位供应。三类菌（毒）种由设有专业实验室的单位或者国务院卫生行政部门指定的保藏管理单位供应。③使用一类菌（毒）种的单位，必须经国务院卫生行政部门批准；使用二类菌（毒）种的单位必须经省政府卫生行政部门批准；使用三类菌（毒）种的单位，必须经县级政府卫生行政部门批准。④一、二类菌（毒）种，应派专人向供应单位领取，不得邮寄；三类菌（毒）种的邮寄必须持有邮寄单位的证明，并按照菌（毒）种邮寄与包装的有关规定办理。

⑵ 传染病菌种、毒种的保藏、携带、运输，必须按照国务院卫生行政部门的规定严格管理。

⑶ 从事实验、保藏、携带、运输传染病菌种、毒种的人员，违反国务院卫生行政部门的有关规定，造成传染病菌种、毒种扩散，后果严重的，依照刑法第一百十五条的规定追究刑事责任；情节轻微的，给予行政处分。

四、消毒隔离制度与生物安全防护

㈠ 生物安全防护实验室

医学微生物学检验技术与应用尽可能参照中华人民共和国卫生行业标准及《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》执行。

每类生物安全防护实验室根据所处理的微生物及其毒素的危害程度各分为四级。各级实验室的生物安全防护要求依次为一级最低，四级最高。

⑴ 一级生物安全防护实验室：实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用

于对健康成年人已知无致病作用的微生物，如用于教学的普通微生物实验室等。

2）二级生物安全防护实验室：实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于对人或环境具有中等潜在危害的微生物。

3）三级生物安全防护实验室：实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于主要通过呼吸途径使人感染上严重的甚至是致死疾病的致病微生物及其毒素，通常已有预防感染的疫苗。艾滋病病毒的研究（血清学实验室除外）应在三级生物安全防护实验室中进行。

4）四级生物安全防护实验室：实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于对人体具有高度的危险性，通过气溶胶途径传播或传播途径不明，目前尚无有效的疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。与上述情况类似的不明微生物，也必须在四级生物安全防护实验室中进行。待有充分数据后再决定此种微生物或毒素应在四级还是在较低级别的实验室中处理。

实验室生物安全防护细则详见本章附录。

㈡ 人员与机构

1）对从事传染病预防、医疗、科研、教学的人员，现场处理疫情的人员，以及在生产、工作中接触传染病病原体的其他人员，有关人员应当根据国家规定，采取有效的防护措施和医疗保健措施。

2）医疗保健机构必须按照国务院卫生行政部门的有关规定，严格执行消毒隔离制度，防止医院内感染和医源性感染。

3）疾病控制中心和从事致病性微生物试验的科研、教学、生产等单位必须做到以下几个方面：①建立、健全防止致病微生物扩散的制度和人体防护措施。②严格执行实验操作规程，对实验后的样品、器材、污染物品等，按照有关规定进行管理。③实验动物必须按照国家有关规定进行管理。

㈢ 检验相关器材与环境

1．适用范围

本节规范适用于检验科工作场所的空气、表面、器材、废弃标本及工作人员（含临时工和参观学习人员）的消毒。检验科的工作场所可分为清洁区、半污染区和污染区。清洁区包括办公室、会议室、休息室、储藏室、培养基室和试剂室；半污染区指卫生间、通道室；污染区包括标本存放室、临床生化检验室、临床微生物学检验室、临床免疫检验室、动物实验室等；有的医院有临床检验研究室，专业检验室如病毒性肝炎检验室、结核病检验室等，可根据所研究或检验内容确定其属清洁区或污染区。清洁区和污

染区的消毒要求、方法和重点有所不同，若分工不细，清洁区和污染区无明显界限，此时则按污染区处理。

2．污染区的消毒

(1) 表面消毒：每天开始工作前用湿布抹擦1 次，地面用湿拖把拖擦1 次，禁用干抹布干扫，抹布和拖把等清洁工具各室专用，不得混用，用后洗净晾干。下班时用0.25～0.50g/L 有效氯溶液或0.1％～0.2％过氧乙酸溶液抹擦1 次。地面的消毒用2 倍浓度上述消毒液体拖擦；各种表面也可用便携式高强度紫外线消毒器近距离表面照射消毒；若被明显污染，如具传染性的标本或培养物外溢、溅泼或器皿打破，洒落于表面，应立即用消毒液消毒，用1000～2000mg/L 有效氯溶液或0.2％～0.5％过氧乙酸溶液洒于污染表面，并使消毒液浸过污染物表面，保持30～60min，再擦，拖把用后浸于上述消毒液内60min；若已知被肝炎病毒或结核杆菌污染，应用2000mg/L 有效氯溶液或0.5％过氧乙酸溶液擦拭消毒30min；对结核杆菌污染表面也可用5％煤酚皂溶液擦拭，作用1～2h。

(2) 空气消毒：空气消毒按常规处理；对明显产生气溶胶的操作（搅拌、研磨、离心等），特别是可通过呼吸道传播又含有高度传染性微生物（炭疽杆菌、结核杆菌、球孢子菌、组织胞浆菌、军团菌、流行性感冒病毒等）的操作，应在生物安全柜内进行，使柜内空气经细菌滤器或热力杀菌通道排出室外，柜内形成负压；或在风筒式紫外空气消毒器的进风口邻近进行，使产生的微生物气溶胶立即经紫外线风筒消毒；要求严格无菌的操作如倾倒培养基、菌种转移和细胞转瓶等，应在100 级洁净间或100 级净化操作台柜内进行，使空气经初效、中效及高效滤器进入室（柜）内，形成正压，极大限度地减少污染。但应注意及时更换滤器，定时检测过滤效果。

(3) 器材消毒：除已知无传染性的器材外，凡直接接触或间接接触过临床检验标本的器材（包括临床生化检验时）均视为具有传染性，应进行消毒处理；小的金属器材如接种环，可用酒精灯烧灼灭菌。当接种环上有较多物品，尤其是液体时，应先在火焰上方，把接种环拷干后再缓慢伸入火焰烧灼，以免发生爆裂或溅泼而污染环境；较大的金属器材或有锋刃的刀剪受污染后不宜烧灼灭菌，可煮沸10～30min，或用2％戊二醛溶液或8％甲醛－乙醇溶液（用70％的溶液配成20％甲醛溶液）浸泡3h 后，清洗、沥干，再用干热或压力蒸汽灭菌；接种培养过的琼脂平板应压力蒸汽灭菌30min，趁热将琼脂倒弃，再刷洗。用于微生物检验者，吸管一端应塞少量棉花，管或瓶应有塞，再用牛皮纸包好，不宜用报纸包，因油墨气味可能影响细胞或细菌生长，包好后可用干热160℃灭菌2h，待冷至40℃以下才能开烤箱的门，以免玻璃炸裂；若箱内易燃物品冒烟或产生焦味，应立即切断电源并关闭气孔，切勿开启箱门以免供氧导致燃烧；也可用高压蒸

汽121 ℃15 ～30 min 灭菌，吸管应直放，空试管和空瓶口应朝下，且不能完全密闭。带螺旋帽的管瓶，灭菌时应将螺旋帽放松，玻璃容器灭菌时应在塞子与容器间填一纸条以利气体流通，灭菌后再塞紧。

4） 手的消毒：工作前、工作后、检验同类标本后再检验另一类标本前，均须用肥皂流水洗手1 ～2 min，搓手使泡沫布满手掌、手背及指间至少10s，再用流水冲洗，若手上有伤口，应戴手套接触标本。水龙头应用脚踏式或自动开关；肥皂应保持干燥或用瓶装液体肥皂，每次用时压出；洗手后采用红外自动干手机将手吹干或用消毒纸巾、纱布或手巾擦干，不宜设置公用擦手巾；肝炎或结核专业检验室工作人员应戴手套，当明显受致病菌污染，或从事烈性菌如霍乱、布氏杆菌、炭疽等检验后，应立即用0.2 %过氧乙酸溶液或1000 mg/L 有效氯消毒液浸泡3 min，然后用清水冲洗。

5） 废弃标本及其容器消毒：采集检验标本的容器或接触装有检验标本的容器，特别是接触装有肝炎和结核病患者检验标本，应戴手套，一次性使用的手套使用后放入收集袋内，集中烧毁；可反复使用者用后放消毒液内集中消毒；无手套时可用纸套使皮肤不直接与容器表面接触，用后将纸放人污物袋内烧毁；取标本的工具，如钳、镊、接种环、吸管等，用后均应消毒清洁，进行微生物学检验时，应重新灭菌，金属工具可烧灼灭菌或消毒液浸泡；玻璃制品可干热或高压蒸汽灭菌；废弃标本如尿、胸水、腹水、脑脊液、唾液、胃液、肠液、关节腔液等每100 ml 加漂白粉5g 或二氯异氰尿酸钠2g，搅拌后作用2 ～h 倒人厕所或化粪池；痰、脓、血、粪（包括动物粪便）及其他固形标本，焚烧或加2 倍量25 ～50g/L 有效氯的漂白粉或二氯异氰尿酸钠溶液，拌匀后作用2 ～4h；若为肝炎或结核病者则作用时间应延长至6h 后倒厕所或化粪池；若为一次性使用的纸质容器及其外面包被的废纸，应焚烧；对可再次使用的玻璃、塑料或搪瓷容器，可煮沸15 min，也可用1g/L 有效氯漂白粉澄清液或二氯异氰尿酸钠浸泡2 ～6h，消毒液每日更换，消毒后用洗涤剂及流水刷洗，沥干；用于微生物培养采样者，用高压蒸汽灭菌后备用；废弃标本及其容器应用专门密闭不漏水的污物袋或箱中存放，专人集中烧毁或消毒，每天至少处理1 次。

3．清洁区消毒

1） 清洁区若无明显污染，每天开窗通风换气数次，湿抹擦桌面、椅面及地面1次，保持清洁；每周（或有明显微生物污染时）应用消毒液如0.25 ～0.50g/L 有效氯溶液或0.01 %过氧乙酸溶液抹擦桌、椅、门、窗及地面，地面消毒浓度应加倍；所有清洁消毒器材（抹布、拖把、容器）不得与污染区或半污染区共用。

2） 工作人员每次下班前应用肥皂流水洗手1 ～2 min。

4．半污染区消毒

1） 空气、桌、椅、门、窗消毒同清洁区，地面消毒同污染区。

4）拖鞋每天用250～500mg/L有效氯溶液或0.1%～0.2%过氧乙酸溶液浸泡或擦抹1次。工作衣和帽每周换洗两次；结核专业检验室工作人员，每次连续佩戴口罩不得超过4h，每次用后放入密闭污物袋（箱）内，待高压蒸汽灭菌后再用，工作衣若有明显致病菌污染或从事烈性菌标本检验后，应随时更换，并高压蒸汽灭菌。

附录

●中华人民共和国卫生部通告

卫通【2003】14号

《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》（WS233—2002，以下简称《准则》）卫生行业标准已于2003年8月1日实施。该《准则》规定了微生物和生物医学实验室生物安全防护的基本原则、实验室的分级及其基本要求。贯彻实施该《准则》，对于各级微生物和生物医学实验室的建设和规范化管理将会起到积极的促进作用。

鉴于医疗机构微生物和生物医学实验室的实际状况以及生物安全要求的特殊性，我部决定，医疗机构推迟两年执行《准则》。在此期间，我部将组织有关专家，针对医疗机构微生物和生物安全实验室的特点对《准则》进行适当的补充完善，另行下发。

特此通告。

二〇〇三年八月十九日

●微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

（摘自中华人民共和国卫生行业标准）

5　实验室的分类、分级及适用范围

5.1　分类

5.1.1　一般生物安全防护实验室（不使用实验脊椎动物和昆虫）。

5.1.2　实验脊椎动物生物安全防护实验室。

5.2　分级

每类生物安全防护实验室根据所处理的微生物及其毒素的危害程度各分为四级。各级实验室的生物安全防护要求依次为：一级最低，四级最高。

5.3　适用范围

5.3.1　一般生物安全防护实验室

5.3.1.1　一级生物安全防护实验室

实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于对健康成年人已知无致病作用的微生物，如用于教学的普通微生物实验室等。

5.3.1.2　二级生物安全防护实验室

实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于对人或环境具有中等潜在危害的微生物。

5.3.1.3　三级生物安全防护实验室

实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于主要通过呼吸途径使人传染上严重的甚至是致死疾病的致病微生物及其毒素，通常已有预防传染的疫苗。

艾滋病病毒的研究（血清学实验除外）应在三级生物安全防护实验室中进行。

5.3.1.4　四级生物安全防护实验室

实验室结构和设施、安全操作规程、安全设备适用于对人体具有高度的危险性，通过气溶胶途径传播或传播途径不明，目前尚无有效的疫苗或治疗方法的致病微生物及其毒素。与上述情况类似的不明微生物，也必须在四级生物安全防护实验室中进行。待有充分数据后再决定此种微生物或毒素应在四级还是在较低级别的实验室中处理。

5.3.2　实验脊椎动物生物安全防护实验室，其适用微生物范围与同级的一般生物安全防护实验室相同。

6　一般生物安全防护实验室的基本要求

6.1　一级生物安全防护实验室6.1.1　安全设备和个体防护

6.1.1.1　一般无须使用生物安全柜等专用安全设备。

6.1.1.2　工作人员在实验时应穿工作服，戴防护眼镜。

6.1.1.3　工作人员手上有皮肤破损或皮疹时应戴手套。

6.1.2　实验室设计和建造的特殊要求

6.1.2.1　每个实验室应设洗手池，宜设置在靠近出口处。

6.1.2.2　实验室围护结构内表面应易于清洁。地面应防滑、无缝隙，不得铺设地毯。

6.1.2.3　实验台表面应不透水，耐腐蚀、耐热。

6.1.2.4　实验室中的家具应牢固。为易于清洁，各种家具和设备之间应保持一定间隙。应有专门放置生物废弃物容器的台（架）。

6.1.2.5　实验室如有可开启的窗户，应设置纱窗。

6.2　二级生物安全防护实验室

6.2.1　安全设备和个体防护

6.2.1.1　可能产生致病微生物气溶胶或出现溅出的操作均应在生物安全柜（II级

生物安全柜为宜）或其他物理抑制设备中进行，并使用个体防护设备。

6.2.1.2　处理高浓度或大容量感染性材料均必须在生物安全柜（II级生物安全柜为宜）或其他物理抑制设备中进行，并使用个体防护设备。

上述材料的离心操作如果使用密封的离心机转子或安全离心杯，且它们只在生物安全柜中开闭和装载感染性材料，则可在实验室中进行。

6.2.1.3　当微生物的操作不可能在生物安全柜内进行而必须采取外部操作时，为防止感染性材料溅出或雾化危害，必须使用面部保护装置（护目镜、面罩、个体呼吸保护用品或其他防溅出保护设备）。

6.2.1.4　在实验室中应穿着工作服或罩衫等防护服。离开实验室时，防护服必须脱下并留在实验室内。不得穿着外出，更不能携带回家。用过的工作服应先在实验室中消毒，然后统一洗涤或丢弃。

6.2.1.5　当手可能接触感染材料、污染的表面或设备时应戴手套。如可能发生感染性材料的溢出或溅出，宜戴两副手套。不得戴着手套离开实验室。工作完全结束后方可除去手套。一次性手套不得清洗和再次使用。

6.2.2　实验室设计和建造的特殊要求

6.2.2.1　生物安全防护二级实验室必须满足本标准6.1.2 中各款的要求。

6.2.2.2　应设置实施各种消毒方法的设施，如高压灭菌锅、化学消毒装置等对废弃物进行处理。

6.2.2.3　应设置洗眼装置。

6.2.2.4　实验室门宜带锁、可自动关闭。

6.2.2.5　实验室出口应有发光指示标志。

6.2.2.6　实验室宜有不少于每小时3 ～4 次的通风换气次数。

6.3　三级生物安全防护实验室

6.3.1　安全设备和个体防护

6.3.1.1　实验室中必须安装II级或II级以上生物安全柜。

6.3.1.2　所有涉及感染性材料的操作应在生物安全柜中进行。当这类操作不得不在生物安全柜外进行时，必须采用个体防护与使用物理抑制设备的综合防护措施。

6.3.1.3　在进行感染性组织培养、有可能产生感染性气溶胶的操作时，必须使用个体防护设备。

6.3.1.4　当不能安全有效地将气溶胶限定在一定范围内时，应使用呼吸保护装置。

6.3.1.5　工作人员在进入实验室工作区前，应在专用的更衣室（或缓冲间）穿着背开式工作服或其他防护服。工作完毕必须脱下工作服，不得穿工作服离开实验室。可再次使用的工作服必须先消毒后清洗。

6.3.1.6　工作时必须戴手套（两副为宜）。一次性手套必须先消毒后丢弃。

6.3.1.7　在实验室中必须配备有效的消毒剂、眼部清洗剂或生理盐水，且易于取用。可配备应急药品。

6.3.2　实验室设计和建造的特殊要求

6.3.2.1　选址

三级生物安全防护实验室可与其他用途房屋设在一栋建筑物中，但必须自成一区。该区通过隔离门与公共走廊或公共部位相隔。

6.3.2.2　平面布局

a）三级生物安全防护实验室的核心区包括实验间及与之相连的缓冲间。

b）缓冲间形成进入实验间的通道。必须设两道连锁门，当其中一道门打开时，另一道门自动处于关闭状态。如使用电动连锁装置，断电时两道门均必须处于可打开状态。在缓冲间可进行二次更衣。

c）当实验室的通风系统不设自动控制装置时，缓冲间面积不宜过大，不宜超过实验间面积的八分之一。

d）II级或III级生物安全柜的安装位置应远离实验间人口，避开工作人员频繁走动的区域，且有利于形成气流由“清洁”区域流向“污染”区域的气流流型。

6.3.2.3　围护结构

a）实验室（含缓冲间）围护结构内表面必须光滑耐腐蚀、防水，以易于消毒清洁。所有缝隙必须加以可靠密封。

b）实验室内所有的门均可自动关闭。

c）除观察窗外，不得设置任何窗户。观察窗必须为密封结构，所用玻璃为不碎玻璃。

d）地面应无渗漏，光洁但不滑。不得使用地砖和水磨石等有缝隙地面。

e）天花板、地板、墙间的交角均为圆弧形且可靠密封，施工时应防止昆虫和老鼠钻进墙脚。

6.3.2.4　通风空调

a）必须安装独立的通风空调系统以控制实验室气流方向和压强梯度。该系统必须确保实验室使用时，室内空气除通过排风管道经高效过滤排出外，不得从实验室的其他部位或缝隙排向室外；同时确保实验室内的气流由“清洁”区域流向“污染”区域。进风口和排风口的布局应使实验区内的死空间降低到最小程度。

b）通风空调系统为直排系统，不得采用部分回风系统。

c）环境参数：相对于实验室外部，实验室内部保持负压。实验间的相对压强以－30～－40Pa 为宜，缓冲间的相对压强以－15～－20Pa 为宜。实验室内的温、湿度以控

制在人体舒适范围为宜，或根据工艺要求而定。

实验室内的空气洁净度以GB50073—2001《洁净厂房设计规范》中所定义的七级至八级为宜。实验室人工照明应均匀，不眩目，照度不低于500lx。

d）为确保实验室内的气流由“清洁”区域流向“污染”区域，实验室内不应使用双侧均匀分布的排风口布局。不应采用上送上排的通风设计。由生物安全柜排出的经内部高效过滤的空气可通过系统的排风管直接排至大气，也可送人建筑物的排风系统。应确保生物安全柜与排风系统的压力平衡。

e）实验室的进风应经初、中、高效三级过滤。

f）实验室的排风必须经高效过滤或加其他方法处理后，以不低于12m/s的速度直接向空中排放。该排风口应远离系统进风口位置。处理后的排风也可排入建筑物的排风管道，但不得被送回到该建筑物的任何部位。

g）进风和排风高效过滤器必须安装在实验室设在围护结构上的风口里，以避免污染风管。

h）实验室的通风系统中，在进风和排风总管处应安装气密型调节阀门，必要时可完全关闭以进行室内化学熏蒸消毒。

i）实验室的通风系统中所使用的所有部件均必须为气密型。所使用的高效过滤器不得为木框架。

j）应安装风机启动自动联锁装置，确保实验室启动时先开排风机后开送风机。关闭时先关送风机后关排风机。k）不得在实验室内安装分体空调器。

6.3.2.5　安全装置及特殊设备

a）必须在主实验室内设置II级或III级生物安全柜。

b）连续流离心机或其他可能产生气溶胶的设备应置于物理抑制设备之中，该装置应能将其可能产生的气溶胶经高效过滤器过滤后排出。在实验室内所必须设置的所有其他排风装置（通风橱、排气罩等）的排风均必须经过高效过滤器过滤后方可排出。其室内布置应有利于形成气流由“清洁”区域流向“污染”区域的气流流型。

c）实验室中必须设置不产生蒸汽的高压灭菌锅或其他消毒装置。

d）实验间与外部应设置传递窗。传递窗双门不得同时打开，传递窗内应设物理消毒装置。感染性材料必须放置在密闭容器中方可通过传递窗传递。

e）必须在实验室入口处的显著位置设置压力显示报警装置，显示实验间和缓冲间的负压状况。当负压指示偏离预设区间必须能通过声、光等手段向实验室内外的人员发出警报。可在该装置上增加送、排风高效过滤器气流阻力的显示。

f）实验室启动工作期间不能停电。应采用双路供电电源。如难以实现，则应安装停电时可自动切换的后备电源或不间断电源，对关键设备（生物安全柜、通风橱、排气

罩以及照明等）供电。

g）可在缓冲间设洗手池。洗手池的供水截门必须为脚踏、肘动或自动开关。洗手池如设在主实验室，下水道必须与建筑物的下水管线分离，且有明显标志。下水必须经过消毒处理。洗手池仅供洗手用，不得向内倾倒任何感染性材料。供水管必须安装防回流装置。不得在实验室内安设地漏。

6.3.2.6　其他

a）实验台表面应不透水，耐腐蚀、耐热。

b）实验空中的家具应牢固。为易于清洁，各种家具和设备之间应保持一定间隙。应有专门放置生物废弃物容器的台（架）。家具和设备的边角和突出部位应光滑、无毛刺，以圆弧形为宜。

c）所需真空泵应放在实验室内。真空管线必须装置在线高效过滤器。

d）压缩空气等钢瓶应放在实验室外。穿过围护结构的管道与围护结构之间必须用不收缩的密封材料加以密封。气体管线必须装置在线高效过滤器和防回流装置。

e）实验室中应设置洗眼装置。

f）实验室出口应有发光指示标志。

g）实验室内外必须设置通讯系统。

h）实验室内的实验记录等资料应通过传真机发送至实验室外。

6.4　四级生物安全防护实验室

四级生物安全防护实验室分为：安全柜型实验室和穿着正压服型实验室。在安全柜型实验室中，所有微生物的操作均在III级生物安全柜中进行。在穿着正压服型实验室中，工作人员必须穿着特殊的正压服式保护服装。

6.4.1　安全设备和个体防护

6.4.1.1　在实验室中所有感染性材料的操作都必须在III级生物安全柜中进行。如果工作人员穿着整体的由生命维持系统供气的正压工作服，则相关操作可在II级生物安全柜中进行。

6.4.1.2　所有工作人员进入实验室时都必须换上全套实验室服装，包括内衣、内裤、衬衣或连衫裤、鞋和手套等。所有这些实验室保护服在淋浴和离开实验室前均必须在更衣室内脱下。

6.4.2　安全柜型实验室设计和建造的特殊要求

6.4.2.1　选址。实验室应建造在独立的建筑物内或实验室建筑物内独立的区域。

6.4.2.2　平面布局

a）实验室核心区域由安放有II级生物安全柜的房间（安全柜室）和进入通道组成。进入通道至少有3 个部分，依次为外更衣室、淋浴室和内更衣室。任何相邻的门之间都

有自动连锁装置，防止两个相邻的门被同时打开。对于不能从更衣室携带进出安全柜室的材料、物品和器材，应在安全柜室墙上设置具有双门结构的高压灭菌锅，并有浸泡消毒槽、熏蒸室或带有消毒装置的通风传递窗，以便进行传递或消毒。必须设置带气闸室的紧急出口通道。

b）安全柜室四周可设置缓冲区，为环形走廊或缓冲房间，属核心区域的一部分。缓冲区建设要求同三级生物安全防护实验室。

6.4.2.3　围护结构

a）安全柜房间和内侧更衣室的墙壁、地板、天花板等内部应形成密封的内壳。地板应整体密封，墙角成圆弧形。房间的内表面应防水、耐腐蚀。结构内所有的缝隙都应密封。尽量减小安全柜室和内更衣室门周围的缝隙，并可密封以利消毒。安全柜室地板上所有的下水管都直接通往液体消毒系统，下水道口和其他服务管线安装高效过滤器并防止害虫进入。

b）进入实验室的门可自动关闭，可以上锁。所有在实验室内外传递物品的设备都必须为双开门结构，两门之间也必须有自动连锁装置。

c）任何窗户都要求防破碎并密封。

d）在实验室的墙洞上安装用于对正级生物安全柜和安全柜室传递出来的物品进行消毒的双开门高压灭菌锅。其外门在实验室外开启。缝隙必须良好密封。

6.4.2.4　通风空调

a）必须安装精心设计建造的直排式通风系统。该系统进风和排风设计应确保定向的气流由最小危险区流向最大潜在危险区。进风口和排风口的布局应使实验区内的死空间降低到最小程度。

b）必须监测相邻区域的压差和气流流向，并安装报警器。在外更衣室的人口处安装压强仪表盘，显示和监测实验室内各区的压强或压差和进风、排风的风量。

c）必须设计安装通风系统的自动控制和警报装置以确保实验室内不出现正压并保持各房间压强和压差正常。II级生物安全柜的排风必须直接与排风管道相连。排风管道必须单独设置，不得与建筑物排风系统相连。

d）环境参数：安全柜室必须保持负压程度最高，其相对压强不得高于−60Pa；安全柜室、内更衣室、淋浴室和外更衣室的相对压强依次增高，相邻房间之间应有压差，保持在10～15Pa之间。核心区域的空气洁净度以七级至八级为宜。实验室人工照明应均匀，不眩目，照度不低于500lx。

e）进风为三级过滤系统，最后一级必须经过高效过滤器过滤。

f）来自整个核心区域的排风必须连续经过两个高效过滤器处理。排风口应远离实验室区和进风口。

g）进风和排风高效过滤器必须安装在实验室各房间设在围护结构上的风口里，以避免污染风管。高效过滤器风口结构必须在更换高效过滤器之前实现就地消毒。或采用可在气密袋中进行更换的过滤器结构，以后再对高效过滤器进行消毒或焚烧。每台高效过滤器安装前后都必须进行检测，运行后每年也必须进行一次检测。

6.4.2.5　安全装置及特殊设备

a）安全柜室必须设置正级生物安全柜。

b）高压灭菌锅的门必须自动控制，只有在灭菌循环完成后，其外门方可开启。

c）必须提供双开门的液体浸泡槽、熏蒸消毒室或用于消毒的通风气闸室，对来自III级生物安全柜和安全柜室的不能高压消毒的物品进行消毒，使其安全进出。

d）如果有中央真空管线系统，不应在安全柜室以外的空间使用。在线的高效过滤器尽可能接近每个使用点或截门处。滤器应易于现场消毒或更换。其他通往安全柜室的气、液管线要求安装保护装置以防止回流。

e）自内更衣室（含卫生间）、安全柜室及水池下水、地漏以及高压消毒室和其他来源流出的液体在排往下水道之前，必须经过消毒，最好用加热消毒法。地漏必须有充满对被实验传染性物质有效的化学消毒剂的水封，它们直接通往液体消毒系统。下水道口和其他服务管线均应安装高效过滤器。自淋浴室和外更衣室、厕所排出的液体可以不经过任何处理直接排到下水道中。对液体废弃物的消毒效果必须经过证实。

f）必须为实验室的核心区（安全柜室、内更衣室、淋浴室和外更衣室）的通风系统、警报器、照明、进出控制和生物安全柜设置可以自动启动的紧急电源。

6.4.2.6　其他

a）工作台表面应无缝或为密封的表面。应不透水，耐腐蚀、耐热。

b）实验室的家具应简单，为开放结构，且牢固。实验台、安全柜和其他设备之间留有空间以便能够清理和消毒。椅子和其他设施表面应铺上非纤维材料使之容易消毒。家具和设备的边角和突出部位应光滑、无毛刺，以圆弧形为宜。

c）在安全柜室、内外更衣室近门处安装非手动操作的或自动洗手池。

d）实验室与外部必须设有通讯系统，宜设闭路电视系统。

e）实验室内的实验记录等资料必须通过传真机发送至实验室外。

6.4.3　穿着正压服型实验室设计和建造的特殊要求

6.4.3.1　选址：实验室应建造在独立的建筑物内或实验室建筑物内独立的区域。

6.4.3.2　平面布局

a）实验室核心区域由安放有II级生物安全柜的房间（主实验室）和进入通道组成。进入通道包括更衣区和消毒区。更衣区依次为外更衣室、淋浴室和内更衣室。消毒区为化学淋浴室，工作人员离开主实验室时首先经过化学淋浴消毒正压防护服表面。核心区

任何相邻的门之间都有自动连锁装置，防止两个相邻的门被同时打开。对于不能从更衣室携带进出主实验室的材料、物品和器材，应在主实验室墙上设置具有双门结构的高压灭菌锅、浸泡消毒槽、熏蒸室或带有消毒装置的通风传递窗，以便进行传递或消毒。必须设置带气闸室的紧急出口通道。

b）同本标准6.4.2.2b）中的要求。

6.4.3.3　围护结构：与本标准6.4.2.3 中各款的要求相同。

6.4.3.4　通风空调

a）实验区必须保持负压程度最高，其相对压强不得高于 −80Pa ；实验区、化学消毒淋浴室、内更衣室、淋浴室和外更衣室的相对压强依次增高，相邻房间之间保持10～15Pa 的压差。核心区域的空气洁净度以七级至八级为宜。

b）除上述条款外，其他与本标准6.4.2.4 中各款的要求相同。

6.4.3.5　安全装置及特殊设备

a）主实验室必须设置至少为 II 级的生物安全柜。

b）进入主实验室的工作人员必须穿着正压防护服，由高效过滤器提供保护的生命支持系统供给呼吸用气。生命支持系统包括提供超量呼吸气体的正压供气装置、报警器和紧急支援气罐。工作服内气压相对周围环境为持续正压。必须为生命支持系统设置自动启动的紧急电源。

c）除上述条款外，其他与本标准6.4.3.5 中各款的要求相同。

6.4.3.6　其他：与本标准6.4.2.6 中各款的要求相同。

II 级生物安全柜至少装置一个高效空气过滤器对排气进行净化，工作空间为经高效过滤器净化的无涡流的单向流空气。工作时正面玻璃推拉窗打开一半，上部为观察窗，下部为操作窗口。外部空气由操作窗口吸进，而不可能由操作窗口逸出。工作状态下遵守操作规程时既保证工作人员不受侵害，也保证实验对象不受污染。

6.4.3.7　III级生物安全柜至少装置一个高效空气过滤器对排气进行净化，工作空间为经高效过滤器净化的无涡流的单向流空气。正面上部为观察窗，下部为手套箱式操作口。箱内对外界保持负压。可确保人体与柜内物品完全隔绝。

第二章　细菌分类及命名

第一节　概述

一、细菌分类的意义

细菌分类学（Taxonomy）是一门独立的分类学科，起源于林奈（Carl Von Linne）命名。细菌的属名与种名的基础由郭霍（Koch）和巴斯德（Pasteur）在100多年前确立。其实用价值是对已发现的细菌分类、命名与检索。意义如下：

1）有助于对细菌感染患者血清中检测抗原或抗体的评价。

2）参考菌株与标准菌株的确认、临床菌株的鉴定、药敏试验与抗菌药物的选择、耐药菌监控等。

3）用标准菌株对自动化仪器、诊断试剂盒和药敏试验纸片做出评价与鉴定。

4）利于新菌株的发现与鉴定。

5）科研成果的认定、学术论文撰写与发表、国际间的学术与技术交流。

近年来，由于各边缘学科的相互渗透，细菌检验领域不断引入新的方法，如分子生物学、生物化学和细菌学等领域的最新科学技术，有力地促进了细菌分类学迅猛发展。一方面一批原有菌名的分类隶属关系已经变动；另一方面涌现出独立的新属和种，这些新属种在第9版伯杰鉴定细菌学手册（Bergey's manual of determinative of bacteriology）中有了新的变动。

二、细菌分类的等级与定义

细菌分类服从于生物分类等级，由上而下分为7个层次，即界（Kingdom）、门（Division）、纲（Class）、目（Order）、科（Family）、属（Genus）、种（Spices），各等级下还设有亚级，例如“种”级之下设“亚种”。细菌分类的最小单位是“种”，由菌株构成“种”。临床细菌学检验常用的分类等级是科、属、种。根据细胞没有核膜包裹，核质裸露在细胞浆内及分裂的生物特征，分类学上将螺旋体、支原体、立克次体、衣原体等定格在原核生物界，均属于细菌范畴。

定义和解释：

1）“群”：将某种相同特征的一组不同细菌归类为“群”。

2）“种”：最基本的分离单位，将生物学性状基本相同的细菌群体归成一个菌种，相近的种合归为一属，相近的属归为同一科，依此类推；种进一步往下分为“亚种”、“型”和“株”。

3）“型”：种内的分类单位，分别有血清型、噬菌体型、细菌素型、生物型和毒素型等。

4）“株”：不同时间、地点、患者、标本、培养方法和生物学特性等单一纯培养细菌经明确标识（数码、文字及代码等）与其他培养菌相区别的分离菌。

三、细菌命名和国际细菌命名法规

每种细菌有学名与通俗名，细菌学名必须用拉丁文表示，对使用拉丁语以外的国家将细菌学名翻译成自己国家语言的命名，即为通俗名。在学术交流或发表的论文及公文中必须用细菌学名。属名与种名是命名的基础，一种细菌的名称由属名和种名两部分组成，属名在前，种名在后，而中文译名一般是种名在前，属名在后。如埃希菌属中的大肠埃希菌可写为Escherichia coli，属名可略写，而种名则应正确完整，菌名英文正式书写为斜体字（书写体），即E.coli，而不能写成E.c。当泛指某一属细菌而不特指其中的某个细菌则可在属名之后加上sp.（sp.代表菌种species，复数用spp.）。

细菌的命名由国际细菌命名法规所决定。此适用于亚种以上分类群的细菌命名，而对亚种以下如血清型、噬菌体型、毒素型及凝固酶型等细菌的命名均不受此约束。

标准菌株以种为基础，选用特别的试验作为阳性、阴性及药物敏感模式的标准。常用的标准菌种大多为美国典型菌种保藏中心（America Type Culture Collection，ATCC）保藏的菌种。标准菌种必须标记该保存机构的略语、细菌编号及符合国际细菌命名法规的细菌学名，如E.coli ATCC 25922。

第二节　细菌分类的依据和方法

细菌的分类主要根据细菌的生物学特性，并结合抗原结构和免疫学特征以及细菌脱氧核糖核酸结构等分子生物学检测结果，来阐明各种细菌间的亲缘关系。

一、生理、生物化学特性与细菌分类

由于细胞壁和细胞膜结构不同，各种细菌对革兰染色反应不同。根据其染色特性可将所有细菌分为革兰阳性菌和革兰阴性菌，并依据形态学特征又可将细菌分为球菌、杆

菌、弧菌和螺旋菌等。芽胞、鞭毛和荚膜等特殊结构和细菌的排列也作为细菌分类的依据。

根据细菌的营养方式、代谢产物和对氧的需求，分别将细菌分为氧化型、发酵型和氧化兼发酵型；厌氧菌、兼性厌氧菌、微需氧菌和需氧菌。

目前广泛采用的细菌分类法有两种：传统分类法和数值分类法。细菌传统分类法主要根据细菌的生物学特性进行分类。分类过程中往往以该菌重要的鉴别特征为基础，偏重于鉴定方法。数值分类法则根据细菌产生不同的生化反应结果，选择和比较反应结果的相似百分率，确定相似系数大小，相似系数值越大，表示相同特征越多，说明两种细菌间有较高的亲缘性，反之亲缘性就低。目前许多细菌鉴定系统，无论手工或半自动，还是自动细菌鉴定系统，多数采用此工作原理。

二、分子生物学特性与细菌分类

细菌的遗传基因决定其生理、生化等生物学表型。表型差异本质上是细菌基因物质差异性的体现，用分子生物学方法来研究细菌脱氧核糖核酸分子上各种基因的功能，比较各种细菌脱氧核糖核酸组成结构的相似性，可从基因组学的本质上阐明细菌间的亲缘关系。

通常用测定细菌脱氧核糖核酸中的鸟嘌呤和胞嘧啶（G +C）这二种碱基占总碱基含量的百分数作为分类指标。每种细菌的G +C 百分含量一般是恒定的，而不同种细菌的G +C 含量有差异，借此可将G +C 含量比较相近的细菌归属于同科或同属。但用此方法难以将细菌分类到种。

用脱氧核糖核酸分子杂交实验分类：选择标准菌株，将其脱氧核糖核酸分子用生物学标记。加热解链，将待测菌的脱氧核糖核酸与已标记的标准菌株脱氧核糖核酸进行脱氧核糖核酸－脱氧核糖核酸杂交，杂交率在80％以上就表明待测菌与标准菌是同一种类的细菌。随着分子生物学技术的发展与提高，目前的细菌分类依靠测定16SrRNA 基因的全序列来进行比较，建立系统分类。有人建议脱氧核糖核酸相关性≥70％，16SrRNA 序列差异≤1.0％～1.5％的细菌属于同一种，这可使细菌的种有一个稳定和统一的标准。

近年来细菌基因组学和蛋白质组学的研究已经获得极大的成功，这将给细菌带来更准确更科学的鉴定、分类与命名。

三、免疫学和生物学特性与细菌分类

根据细菌对噬菌体、细菌素敏感性及其抗原结构的不同可将细菌分型。如用特异的单克隆抗血清，可将铜绿假单胞菌分为20 多个血清型；用标准噬菌体和细菌素可将一

种细菌分成多种噬菌体型和细菌素型。

四、临床常见微生物名称

见本章附录。

附录　临床常见微生物名称

(一) 临床常见需氧及兼性厌氧细菌

1．葡萄球菌属（Staphylococcus）

葡萄球菌属属于微球菌科。第9 版伯杰鉴定细菌学手册中记载有27 种从人、动物及环境分离到的葡萄球菌。

阿莱塔葡萄球菌（S.arlettae）

金黄色葡萄球菌（S.aureus）

耳葡萄球菌（S.auricularis）

头葡萄球菌（S.capitis）

山羊葡萄球菌（S.caprae）

肌肉葡萄球菌（S.carnosus）

人葡萄球菌（S.hominins）

家畜葡萄球菌（S.hyicus）

克罗西葡萄球菌（S.kloosii）

缓慢葡萄球菌（S.lentus）

中间型葡萄球菌（S.intermedius）

里昂葡萄球菌（S.lugdunensis）

解酪葡萄球菌（S.caseolyticus）

产色葡萄球菌（S.chromogenus）

孔氏葡萄球菌（S.cohnii）

海豚葡萄球菌（S.delphinii）

表皮葡萄球菌（S.epidermidis）

马葡萄球菌（S.equorum）

鸡葡萄球菌（S.gallinarum）

溶血葡萄球菌（S.haemolyticus）

解糖葡萄球菌（S.saccharolyticus）

腐生葡萄球菌（S.saprophyticus）

施莱福葡萄球菌（S.schkleiferi）

松鼠葡萄球菌（S.sciuri）

模仿葡萄球菌（S.simulans）

华纳葡萄球菌（S.waneri）

木糖葡萄球菌（S.xylosus）

2．链球菌属（Streptococcus）

链球菌属在第9版伯杰鉴定细菌学手册中有较大的变动，肠球菌和乳球菌已独立成属。临床常见菌种如下：

1）化脓性溶血性链球菌群：

化脓链球菌（S.Pyogenes）

马链球菌（S.equi）

肺炎链球菌（S.pneumoniae）

无乳链球菌（S.agalactiae）

海豚链球菌（S.iniae）

2）口腔链球菌群：

唾液链球菌（S.salivarius）

米勒链球菌（S.milleri）

鼠链球菌（S.rattus）

野鼠链球菌（S.ferus）

温和链球菌（S.mitior）

可变链球菌（S.mutans）

仓鼠链球菌（S.cricetus）

血液链球菌（S.sanguis）

3）乳酸链球菌群：

乳酸链球菌（L.lactis）

棉糖链球菌（L.raffinolactis）

4）厌氧链球菌群：

麻疹链球菌（S.morbillorum）

多汉森链球菌（S.hansenii）

微小链球菌（S.paruulus）

5）其他链球菌群：

少酸链球菌（S.acidominimus）

牛链球菌（S.bovis）

嗜热链球菌（S.thermophilus）

乳房链球菌（S.uberis）

马肠链球菌（S.equinus）

多形链球菌（S.pleomorphus）

3．肠球菌属（Enterococcus）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册已将原链球菌属中的肠球菌群单独成立一个属，命名为肠球菌属。肠球菌属已命名的菌种有12 个：

粪肠球菌（E.faecalis）

屎肠球菌（E.faecium）

酪黄肠球菌（E.casseliflavus）

母鸡肠球菌（E.gallinarum）

假鸟肠球菌（E.pseudoavium）

孟德肠球菌（E.mundtii）

孤独肠球菌（E.solitarium）

鸟肠球菌（E.avium）

坚忍肠球菌（E.duians）

空肠肠球菌（E.hirae）

恶臭肠球菌（E.mOalodortus）

棉子糖肠球菌（E.raffinosus）

4．奈瑟菌属（Neisseria）

奈瑟菌属属于奈瑟菌科，除此属外，还包括莫拉菌属、不动菌属和金氏菌属。奈瑟菌属共含10 个种，原脱硝奈瑟菌现已命名为脱硝金氏菌。

淋病奈瑟菌（N.gonorrhoeae）

脑膜炎奈瑟菌（N.meningitidis）

嗜乳糖奈瑟菌（N.lactamica）

干燥奈瑟菌（N.sicca）

浅黄奈瑟菌（N.subflava）

金黄奈瑟菌（N.flavescens）

粘膜奈瑟菌（N.mucosa）

灰色奈瑟菌（N.cinerea）

细长奈瑟菌（N.elongata）

多糖奈瑟菌（N.polysaccharea）

5．莫拉菌属（Moraxella）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册中莫拉菌按球菌和球杆菌分为布兰汉亚属和莫拉亚属。

（1）莫拉菌属布兰汉亚属（Subgenus－Branhameila）包括4 个种，命名如下：

卡他莫拉（布兰汉）菌［M β）.catarrhalis］

猪莫拉（布兰汉）菌［M β）.caviae］

羊莫拉（布兰汉）菌［M β）.ovis］

兔莫拉（布兰汉）菌［M β）.cuniculi］

（2）莫拉菌属莫拉亚属（Subgenus－Moraxella）共有7 个种：

缺陷莫拉菌（M.lacunata）

犬莫拉菌（M.canis）

非液化莫拉菌（M.nonliquefaciens）

亚特兰大莫拉菌（M.atlantae）

林肯莫拉菌（M.linconii）

苯丙酮酸莫拉菌（M.phenylpyruvica）

奥斯陆莫拉菌（M.osloensis）

6．不动杆菌属（Acinetobacter）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册不动杆菌属只有醋酸钙不动杆菌1 个种；由DNA 杂交研究确定17 个群，其中6 个为原命名，有11 个基因种还未命名。临床标本中常能分离到的菌种名称如下：

醋酸钙不动杆菌（A.calcoaceticus）

洛菲不动杆菌（A.lwoffi）

溶血不动杆菌（A.haemolytius）

鲍曼不动杆菌（A.baumanii）

醋酸钙－鲍曼不动复合菌群（A.calco－baumaniicomplex）

琼氏不动杆菌（A.junii）

约翰逊不动杆菌（A.johnsonii）

7．嗜血杆菌属（Heamophilus）

该属隶属于巴斯德菌科，属内包括16 个种，与临床感染有关的种有9 个：

流感嗜血杆菌（H.influenzae）

副流感嗜血杆菌（H.parainfluenzae）

溶血嗜血杆菌（H.haemolyticus）

副嗜沫嗜血杆菌（H.paraphrophilus）

杜克雷嗜血杆菌（H.ducreyi）

埃及嗜血杆菌（H.aegyptius）

副溶血嗜血杆菌（H.parahaemolyticus）

嗜沫嗜血杆菌（H.aphrophilus）

迟缓嗜血杆菌（H.segnis）

8．军团菌属（Legionella）

1976 年新发现的细菌，第9 版伯杰鉴定细菌学手册已定为军团菌科军团菌属。目前已命名的分别来自人体和环境的菌种共有39 个种，3 个亚种，60 个血清型。与人类感染，有关的菌种有：

嗜肺军团菌：嗜肺亚种（L.pneumophiha subsp.pneumophila）

嗜肺军团菌弗拉塞亚种（L.pneumophila subsp.fraseri）

嗜肺军团菌帕斯科莱亚种（L.pneumophilasubsp.pascullei）

米克戴德军团菌（L.micdadei）

波兹曼军团菌（L.bozemanii）

杜莫夫军团菌（L.dumoftii）

戈尔曼军团菌（L.gormanii）

菲利军团菌（L.feelei）

海克利军团菌（L.hackeliae）

以色列军团菌（L.israelensis）

约旦军团菌（L.jordanis）

圣海伦军团菌（L.sainthelensi）

长滩军团菌（L.longbeachae）

马塞切尼军团菌（L.maceachernii）

橡树岭军团茵（L.oakridgensis）

沃兹沃思军团菌（L.wadsworthii）

伯明翰军团菌（L.birminghamensis）

辛辛那提军团茵（L.cincinnatiensis）

尼沙军团菌（L.anisa）

塔克索尼军团菌（L.tucsonensis）

拉西金军团菌（L.lansingensis）

9．棒状杆菌属 （Corynebacterviu m）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册中与人类有关的棒状杆菌有7 个种。医学上重要的棒状杆菌和相关微生物有3 个种：

1） 棒状杆菌

白喉棒状杆菌重型亚种 （C.diphtheriae subsp.gravis）

白喉棒状杆菌轻型亚种 （C.diphtheriae subsp.mitis）

白喉棒状杆菌中间型亚种 （C.diphtheriae subsp.intermedius）

白喉棒状杆菌贝尔法梯亚种 （C.diphtheriae subsp.belfanti）

溃疡棒状杆菌 （C.ulcerans）

假结核棒状杆菌 （C.pseudotuberculosis）

干燥棒状杆菌 （C.xerosis）

体沟棒状杆菌 （C.striatu m）

库什棒状杆菌 （C.kutscheri）

肾型棒状杆菌 （C.renale group）

假白喉棒状杆菌 （C.pseudodi phtheriae）

假生殖道棒状杆菌 （C.pseudogenitaliu m）

牛棒状杆菌 （C.bovis）

麦氏棒状杆菌 （C.matruchotii）

2） 红球菌属 （Rhodococcus）；

马红球菌 （R.equi）

化脓放线菌 （Actinomyces pyogenes）

骚动厄斯考维菌 （Oerskovia turbata）

3） JK 群包括杰克棒状杆菌 （Group JK，including C.jeikeiu m）；

微小棒状杆菌 （C.minutissimum）

霉菌样棒状杆菌 （C.mycetoides）

水生棒状杆菌 （C.aquaticu m）

生殖道棒状杆菌 （C.geanitaliu m）

溶血分泌杆菌 （Actinomyces hemolyticu m）

溶黄质厄斯考维菌 （O.xanthineolytica）

10．奴卡菌属 （Nocardia）

属内共包括9 个种，与人类有关的菌种有5 个：

星形奴卡菌 （N.asteroides）

鼻疽奴卡菌（N.farcinica）

巴西奴卡菌（N.brasiliensis）

豚鼠耳炎奴卡菌（No.otitidiscowiarum）

短链奴卡菌（N.brevicatena）

11．李斯特菌属（Listeria）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册本属细菌包括7 个种：

格氏李斯特菌（L.grayi）

无毒李斯特菌（L.innocua）

伊凡诺夫李斯特菌（L.ivanovii）

产单核细胞李斯特菌（L.monocytogenes）

默氏李斯特菌（L.murrayi）

西利坚李斯特菌（L.seeligeri）

威尔逊李斯特菌（L.welshimeri）

12．肠杆菌科（Enterrobacteriaecae）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册肠杆菌科包括20 多个属，100 多个菌种。但在临床标本中较常见的仅为其中的20 多个种。肠杆菌科分类如下：

1） 布特维西菌属（Budvicia）：

水生布特维西菌（B.aquatica）

2） 巴提奥杆菌属（Buttiauxella）：

乡间巴提奥杆菌（B.agrestis）

3） 西地西茵属（Cedecea）；

戴氏西地西茵（C.davisae）

西地西菌3（Cedecea sp.3）

西地西菌5（Cedecea sp.5）

拉氏西地西菌（C.lapagei）

奈氏西地西菌（C.neteri）

4） 枸橼酸杆菌属（Citrobacter）：

弗劳地枸橼酸杆菌（C.freundii）

异型枸橼酸杆菌［C.diversus（koseri）］

丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌（C.amalonaticus）

法摩枸橼酸杆菌（C.farmeri）

杨格枸橼酸杆菌（C.youngae）

布拉克枸橼酸杆菌（C.braakii）

乌克曼枸橼酸杆菌（C.werkmanii）

丝得雷枸橼酸杆菌（C.sedlakii）

枸橼酸杆菌种9（Citrobacter species 9）

枸橼酸杆菌种10（Citrobacer species 10）

枸橼酸杆菌种11（Citrobacter species 11）

5）肥杆菌属（Obesumbacterium）：

变形肥杆菌，生物2群（O.proteus biogroup 2）

6）布拉格菌属（Pragia）：

居泉布拉格菌（P.fontium）

7）变形杆菌属（Proteus）：

奇异变形杆菌（P.mirabilis）

普通变形杆菌（P.vulgaris）

潘尼变形杆菌（P.penneri）

产粘液变形杆菌（P.myxofaciens）

8）普罗威登斯菌属（Providencia）

雷极普罗威登斯茵（P.rettgeri）

斯图普罗威登斯菌（P.stuartii）

产碱普罗威登斯菌（P.alcalifaciens）

拉氏普罗威登斯菌（P.rustigianii）

海氏普罗威登斯菌（P.heimbachae）

9）拉恩菌属（Rahnella）：

水生拉恩菌（R.aquatilis）

10）沙门菌属（Salmonella）：

伤寒沙门菌（S.typhi）

猪霍乱沙门菌（S.choleraesuis）

甲型副伤寒沙门菌（S.paratyphi A）

鸡沙门菌（S.gallinarum）

雏白痢沙门菌（S.pullorrum）

DNA 2群菌株（DNA guoup 2 strains）

DNA 3a群菌株（DNA group 3a strains）

DNA 3b群菌株（DNA group 3b strains）

DNA 4群菌株（DNA group 4 strains）

DNA 5 群菌株　(DNA group 5 strains)

DNA 6 群菌株　(DNA group 6 strains)

(1) 爱德华菌属　(Edwardsiella)；

迟缓爱德华菌　(E.tarda)

迟缓爱德华菌生物型1　(E.tarda biogrouP 1)

保科爱德华菌　(E.hosginae)

鲶鱼爱德华菌　(E.ictaluri)

(2) 肠杆菌属　(Enterobacter)：

产气肠杆菌　(E.areogenes)

阴沟肠杆菌　(E.cloacae)

聚团肠杆菌群　(E.agglomerans group)

格高菲肠杆菌　(E.gergoviae)

坂崎肠杆菌　(E.sakazakii)

泰洛肠杆菌　(E.taylorae)

河生肠杆菌生物1 群　(E.amnigenus biogroup 1)

河生肠杆菌生物2 群　(E.amnigenus biogroup2)

阿斯布肠杆菌　(E.asburiae)

霍米奇肠杆菌　(E.hormaechei)

中间肠杆菌　(E.intermedium)

致癌肠杆菌　(E.cancerogenus)

分解肠杆菌　(E.dissolvens)

超压肠杆菌　(E.nimipressuralis)

(3) 埃希菌属－志贺菌属　(Escherichia －Shigella)；

大肠埃希菌　(E.coli)

大肠埃希菌，不活泼　(E.coli inactive)

志贺茵A，B，C 血清群

(Shigella.A，B，C serogroup)

宋内志贺菌　(S.sonnei)

费格森埃希菌　(E.fergusonii)

赫尔曼埃希菌　(E.hermanni)

创伤埃希菌　(E.hermanni)

蟑螂埃希菌　(E.blattae)

(4) 爱文菌属　(Ewingella)：

美洲爱文菌（E.americana）

（15）沙雷菌属（Serratia）：

粘质沙雷菌（S.marcescsens）

粘质沙雷菌生物1群（S.marcescens biogroup 1）

液化沙雷菌群（S.lique faciens group）

深红沙雷菌（S.rubidaea）

芳香沙雷菌生物1群（S.odorifera biogroup 1）

芳香沙雷菌生物2群（S.odorifera biogroup 2）

普城沙雷菌（S.plymuthica）

无花果沙雷菌（S.ficaria）

嗜昆虫沙雷菌（S.entopmophila）

泉居沙雷菌（S.fonticola）

（16）塔特姆酋属（Tatumella）：

痰塔特姆菌（T.ptyseos）

（17）特布尔西菌属（Trabulsiella）：

关岛特布尔西菌（T.guamensis）

（18）致病杆菌属（Xenorhabdus）：

发光致病杆菌（X.luminescens）

发光致病杆菌脱氧核搪核酸5群（X.luminescens DNA 5）

嗜线虫致病杆菌（X.nematophilus）

（19）耶尔森菌属（Yersinia）：

小肠结肠炎耶尔森菌（Y.enterocolitica）

弗氏耶尔森菌（Y.frederiksenii）

中间耶尔森菌（Y.intermidia）

克氏耶尔森菌（Y.kristensenii）

罗蒂耶尔森菌（Y.rohdei）

奥尔德瓦耶尔森菌（Y.aldovar）

波可望耶尔森菌（Y.bercvoveieri）

莫拉莱耶尔森菌（Y.mollaretii）

鼠疫耶尔森菌（Y.pestis）

假结核耶尔森菌（Y.pseudotuberculosis）

鲁氏耶尔森菌（Y.ruckeri）

（20）哈夫尼亚菌属（Hafnia）：

蜂房哈夫尼亚菌（H.alvei）

蜂房哈夫尼亚菌生物1 群（H.alvei biogroup 1）

12）克雷伯菌属（Klebsiella）：

肺炎克雷伯菌（K.pneumoniae）

产酸克雷伯菌（K.oxytoca）

解鸟氨酸克雷伯菌（K.ornithinolytica）

植生克霉伯菌（K.planticola）

臭鼻克雷伯菌（K.ozaenae）

鼻硬结克雷伯菌（K.rhinoscleromatis）

土壤克雷伯菌（K.terrigena）

12）克吕沃菌属（Kluyvera）：

抗坏血酸克吕沃菌（K.ascorbata）

栖冷克吕沃菌（K.cryocrescens）

13）莱克勒菌属（Leclercia）：

不脱羧莱克勒菌（L.adecarboxylata）

14）勒米诺菌属（Leminorella）：

格林蒙勒米诺菌（L.grimmontii）

理查德勒米勒诺菌（L.richardii）

15）约克纳菌属［Yokenella（Koserella）］：

雷吉斯约克纳菌（Y.regensburgei）

16）摩根菌属（Morganella）：

摩根摩根菌（M.morganii）

摩根摩根菌生物1 群（M.Morganii biogeoup 1）

摩根摩根菌伯尼1 型（M.Morganii sibonii 1 type）

17）默勒菌属（Moellerella）：

威斯康星默勒菌（M.wisconsensis）

13. 弧菌科（Vibrioacae）

弧菌科包括弧菌属、气单胞菌属和邻单胞菌属3 个属。与人类感染有关的弧菌有12 个种：

1）弧菌属（Vibrio）：

霍乱弧菌（V.cholerae）

01 群霍乱弧菌（Serogroup 01）

非01 群霍乱弧菌 (Non —01)

副溶血弧菌 (V.parahaemolyticus)

弗尼斯弧菌 (V.furnissii)

拟态弧菌 (V.mimicus)

霍利斯弧菌 (V.hollisae)

辛辛那提弧菌 (V.cincinnatiensis)

梅氏弧菌 (V.metschnikovii)

海鱼弧菌 (V.damsela)

致伤弧菌 (V.vulnificus)

溶藻弧菌 (V.alginolyticus)

河弧菌 (V.fluvialis)

沙鱼弧菌 (V.carchariae)

(2) 气单胞菌属 (Aeromonas)；本菌属包括9 个种。

嗜水气单胞菌 (A.hydrophila)

豚鼠气单胞菌 (A.caviae)

温和气单胞菌 (A.sobria)

威隆气单胞菌 (A.veronii)

简达气单胞菌 (A.jandaei)

舒伯特气单胞菌 (A.schubrtii)

杀鲑气单胞菌 (A.salmonicida)

中间气单胞菌 (A.media)

脆弱气单胞菌 (A.trota)

(3) 邻单胞菌属 (Plesiomonas)；与人类有关的致病菌只有1 个种，即

类志贺邻单胞菌 (P.Shigelloides)

14. 弯曲菌属 (Campylobacteria)

在第9 版伯杰鉴定细菌学手册中弯曲菌属分类有较大变动。

(1) 弯曲杆菌属 (Genus campylobacter)：

1) 真正弯曲杆菌 (True campylobacter)：

①嗜热、肠道致病性菌种：包括

空肠弯曲杆菌空肠亚种

(C.jejuni subsp.jejuni)

空肠弯曲杆菌亚种 (C.jejuni subsp.duyler)

大肠弯曲杆菌（C.coli）

鸥弯曲杆菌（C.laridis）

突起弯曲杆菌（C.upsaliensis）

②其他真正弯曲杆菌：

胎儿弯曲杆菌胎儿亚种（C.fetus subsp.fetus）

胎儿弯曲杆菌性病亚种

（C.fetus subsp.venerealis）

猪弯曲杆菌（C.hyoitestinalis）

痰弯曲杆菌痰液生物变种

（C.sputorum biovar sputoram）

痰弯曲杆菌牛生物变种

（C.sputorum biovar bubulus）

痰弯曲杆菌粪生物变种

（C.sputorum biovar fecalis）

黏液弯曲杆菌（C.mucosalis）

简洁弯曲杆菌（C.concisus）

2）嗜湿菌种（psyhrophilic species）：

固氮弯曲杆菌（C.nitrofigilis）

嗜寒氧弯曲杆菌（C.cryaerphila）

（2）与螺旋菌属相关的弯曲杆菌（genus helicobacter and related campylobacteria）：

幽门螺旋杆菌（H.pylori）

雪貂螺旋菌（H.mustelae）

西纳地弯曲杆菌（C.cinaedi）

费氏弯曲杆菌（C.fennelliae）

15. 假单胞菌属（Pseudomonas）

本属归属于假单胞菌科，第9 版伯杰鉴定细菌学手册按rRNA 同源性分为5 群。

（1）rRNA 同源群I：

1）荧光假单胞菌DNA 同源群：

铜绿假单胞菌（P.aeruginosa）

荧光假单胞菌（P.fluorescens）

恶臭假单胞菌（P.putida）

2）斯氏假单胞菌DNA 同源群：

斯氏假单胞菌（P.stutzeri）

CDC 群Vb－3（该菌生物学特性与斯氏假单胞菌相似，但精氨酸双水解酶阳性）

曼多辛假单胞菌（P.mendocina）

3）产碱假单胞菌DNA 同源群：

产碱假单胞菌（P.alcaligenes）

假产碱假单胞菌（P.pseudoalcaligenes）

2）rRNA 同源群II：

萨拉那塞假单胞菌DNA 同源群

假鼻疽单胞菌（P.pseudomallei）

鼻疽单胞菌（P.mallei）

洋葱伯克霍尔德菌（Burkholderia cepacea）

唐菖蒲假单胞菌（P.gladioli）

皮氏假单胞茵（P.picketii）

3）rRNA 同源群III：

食酸假单胞菌DNA 同源群

食酸假单胞菌（P.acidovorans）

睾丸酮假单胞菌（P.testosteroni）

土生假单胞菌（P.terrigina）

4）rRNA 同源群IV：

微小假单胞菌DNA 同源群

微小假单胞菌（P.diminuta）

泡囊假单胞菌（P.vesicularis）

5）rRNA 同源群V：

嗜麦芽窄食单胞菌－黄单胞菌DNA 群

嗜麦芽窄食单胞菌（Maltophilia Stenotrophomonas）

6）未确定RNA 同源群有关的种：

假单胞菌种CDC 群I（类似产碱假单胞菌，主要区别在于还原硝酸盐、亚硝酸盐产气）

腐败假单胞菌现已命名为腐败希瓦纳拉菌（Shewanella putre faciens）

16．寡杆菌属（Oligella）

本属细菌常从人类生殖泌尿道分离到，致病性不清楚。有2 个种：

尿道寡杆菌（O.urethralis）

解尿素寡杆菌（O.ureolytica）

17．产碱杆菌属（Alcaligenes）

从临床标本分离到的菌株有以下4 个种：

粪产碱杆菌（A.faecalis）

皮乔特产碱杆菌（A.piechaudii）

粪产碱杆菌II 型（A.faeclis type II）

木糖氧化产碱杆菌（A.xylosoxidans）

脱销亚种（subsp denitrificans）

木糖氧化亚种（subsp xylosoxidans）

18．黄杆菌属（Flavobacterium）

黄杆菌属中与临床相关菌种，已正式命名8 个种，未命名4 个群。

短黄杆菌（F.breve）

脑膜败血黄杆菌（F.meningosepticum）

芳香黄杆菌（F.odoratum）

IIb 群黄杆菌（F.group IIb）

水田黄杆菌（F.mizutaii）

嗜糖黄杆菌（F.multivorum）

嗜醇黄杆菌（F.spiritivorum）

嗜温黄杆菌（F.thalpophilum）

薮内黄杆菌（F.yabuuchiae）

IIe 群黄杆菌（F.group IIe）

IIh 群黄杆菌（F.group IIh）

IIi 群黄杆菌（F.group IIi）

19．威克斯菌属（Weeksella）

粘性威克斯菌（W.virosa）

动物溃疡威克斯菌（W.zoohelcum）

（二）与临床有关的厌氧细菌

1．厌氧性球菌

临床上常见厌氧性球菌主要是消化球菌属，分类如下：

（1）消化球菌属（Peptococcus）：

黑色消化球菌（P.niger）

（2）消化链球菌属（Peptostreptococcus）：

厌氧消化链球菌（P.anaerobius）

不解糖消化链球菌（P.asaccharolyticus）

产吲哚消化链球菌（P.indolicus）

四联消化链球菌（P.tetradius）

大消化链球菌（P.magnus）

微小消化链球菌（P.micros m）

普氏消化链球菌（P.prevotii）

产生消化链球菌（P.productus）

2．韦荣球菌（Veillonella）

在第9 版伯杰鉴定细菌学手册中变化较大，本属包括7 个种，其中4 个种与人类感染有关。

细小韦荣菌（V.parvula）

齿蚀韦荣茵（V.rodentium）

不典型韦荣菌（V.atypica）

差异韦荣菌（V.dispar）

3．革兰阴性无芽胞杆菌

与人类疾病有关系的厌氧革兰阴性杆菌主要是拟杆菌属、普雷沃菌属和梭杆菌属。分类如下：

（1）拟杆茵属（Bacteroides）：

可可拟杆菌（B.caccae）

吉氏拟杆菌（B.distasonis）

艾格斯拟杆菌（B.eggerthii）

脆弱拟杆菌（B.fragilis）

默迪拟杆菌（B.merdae）

卵形拟杆菌（B.ovatus）

粪拟杆菌（B.stercoris）

多形拟杆菌（B.thetaiotaomicron）

规则拟杆菌（B.uniformis）

普通拟杆菌（B.vulgatus）

内脏拟杆菌（B.splanchnicus）

多毛拟杆菌（B.capillosus）

腐败拟杆菌（B.putredinis）

条形拟杆菌（B.gracilis）

解脲拟杆菌（B.ureolyticus）

2）卟啉单胞菌属（Porphyromonas）：

不解糖卟啉单胞菌（P.asaccharolyticus）

牙髓卟啉单胞菌（P.endodontalis）

牙龈卟啉单胞菌（P.gingivalis）

唾液卟啉单胞菌（P.salivosa）

3）普雷沃菌属（Prevotella）：

双向普雷沃菌（P.bivia）

颊普雷沃菌（P.buccae）

口颊普雷沃菌（P.buccalis）

人体普雷沃菌（P.corporis）

住齿普雷沃菌（P.denticola）

两向普雷沃菌（P.disiens）

解肝素普雷沃菌（P.heparinolytica）

中间普雷沃菌（P.intermedia）

劳艾奇普雷沃菌（P.loescheii）

户黑色素普雷沃菌（P.melaninogenica）

口腔普雷沃菌（P.oralis）

口普雷沃菌（P.oris）

龈普雷沃菌（P.oulora）

真口腔普雷沃菌（P.veroralis）

动胶普雷沃菌（P.zoogleoformans）

4）梭杆菌属（Fusobacterium）：

核梭杆菌（F.uncleatum）

微生子梭杆菌（F.gonidiaformans）

坏死梭杆酋（F.necrophorum）

舟形梭杆菌（F.naviforme）

变形梭杆菌（F.varium）

死亡梭杆菌（F.mortiferum）

拉氏梭杆菌（F.russii）

4．厌氧革兰阳性无芽胞杆菌

有6 个属包括80 多个种，大多为人体皮肤、口腔、阴道、肠道的正常菌群，多数不致病，少数菌可引起内源性感染。

1）丙酸杆菌属（Propionibaceerium）：

痤疮丙酸杆菌（P.acnes）

贪婪丙酸杆菌（P.avidum）

颗粒丙酸杆菌（P.granulosum）

2）放线菌属（Actinomyces）：

衣氏放线菌（A.israelii）

奈氏放线菌（A.naeslundii）

龋齿放线菌（A.odomtolyticus）

粘性放线菌（A.viscosus）

化脓放线菌（A.pyogenes）

迈氏放线菌（A.meyeri）

3）蛛网菌属（Arachnia）：

丙酸蛛网菌（A.propionoca）

4）真杆菌属（Eubavterium）：

产气真杆菌（E.aerofaciens）

不解乳真杆菌（E.alactolyticum）

扭曲真杆菌（E.contortum）

迟缓真杆菌（E.lentum）

粘液真杆菌（E.limosum）

念珠状真杆菌（E.moniliforme）

短真杆菌（E.brachy）

砂真杆菌（E.saburreum）

凸腹真杆菌（E.ventriosum）

缠绕真杆菌（E.nodatum）

胆怯真杆菌（E.timidum）

5）乳杆菌属（Lactobacillus）：

嗜酸乳杆菌（L.acidophilus）

卷曲乳杆菌（L.crispatus）

格氏乳杆菌（L.gasseri）

詹氏乳杆酋（L.jensenii）

植物乳杆菌（L.plantarum）

发酵乳杆菌（L.fermentum）

短乳杆菌（L.bervis）

乳酪乳杆菌（L.casei）

（6）双歧杆菌属（Bifidobaceerium）：

青春双歧杆菌（B.adolescentis）

长生双歧杆菌（B.longum）

婴儿双歧杆菌（B.infantis）

双歧双歧杆菌（B.bifidum）

住齿双歧杆菌（B.dentium）

短双歧杆菌（B.breve）

（7）莫比兰克斯菌属（Mobiluncus）：

柯氏莫比兰克斯菌（M.curtisii）

缪氏莫氏兰克斯菌（M.mulieris）

5．厌氧革兰阳性芽胞梭菌属

厌氧芽胞梭菌属（Clostridium）在环境中分布较广，与人类感染有关的细菌有20个种，分类如下：

肉毒芽胞梭菌（C.botulinum）

双酶芽胞梭菌（C.bifermentans）

丁酸芽胞梭菌（C.butyricum）

尸毒芽胞梭菌（C.cadaveris）

梭形芽胞梭菌（C.clostridioforme）

难辨芽胞梭菌（C.difficile）

溶组织芽胞梭菌（C.histolyticum）

无害芽胞梭菌（C.innocuum）

泥渣芽胞梭菌（C.limosum）

诺氏芽胞梭菌（C.novyi）

产气荚膜芽胞梭茵（C.perfringens）

副产气荚膜芽胞梭菌（C.paraperfingens）

多枝芽胞梭菌（C.ramosum）

败毒芽胞梭菌（C.septicum）

索氏芽胞梭菌（C.sordellii）

产芽胞芽胞梭菌（C.sporogenes）

次端芽胞梭菌（C.subterminale）

第三芽胞梭菌（C.tertium）

破伤风芽胞梭菌（C.tetani）

楔形芽胞梭菌（C.sphenoides）

㈢ 与临床有关的致病性真菌

1．念珠菌属（Candida）

属酵母样真菌，产生假菌丝，与酵母菌不同而称其为类酵母菌，有的文献称为假丝酵母菌，均为同义词。临床标本中较为常见的有：

白色念珠菌（C.albicans）

链形念珠菌（C.catenulata）

季也蒙念珠菌（C.guillermondii）

高加索念珠菌（C.kefye）

克柔念珠菌（C.krusei）

朗比念珠菌（C.lambica）

溶脂念珠菌（C.lipolytica）

葡萄牙念珠茵（C.lusitaniae）

副秃发念珠菌（C.parapsilosis）

皱褶念珠菌（C.rugosa）

热带念珠茵（C.tropicalis）

伪热带念珠菌（C.pseudotropicalis）

涎沫念珠菌（C.zeylanoides）

原命名类星形念珠菌（C.stellatoidea）的真菌已作为白色念珠菌的生物变种。

2．隐球菌属（Cryptococcus）

与人类感染有关的有以下6 种：

新型隐球菌（C.neoformans）

白色隐球菌（C.albidus）

罗伦隐球菌（C.laurentii）

浅黄隐球菌（C.luteolus）

地生隐球菌（C.terreus）

指甲隐球菌（C.uniguttulatus）

3．其他酵母及酵母样真菌

包括9 个属，其中与人类感染有关的有9 个属。

（1）球拟酵母菌属（Torulopsis）：

光滑球拟酵母菌（T.glabrata）

皮托球拟酵母菌（T.pintolopesii）

念珠球拟酵母菌（T.candida）

（2）红色类酵母菌属（Rhodotorula）：

胶红色红色类酵母菌（R.glutinis）

深红色红色类酵母菌（R.rubra）

（3）酵母真菌属（Saccharomyces）：

酿酒酵母菌（S.cervisiae）

（4）毛孢子菌属（Trichosporon）：

白杰尔毛孢子菌（T.beigelii）

出芽毛孢于菌（T.pullulans）

（5）汉逊酵母菌属（Hansenula）：

异常汉逊酵母菌（H.anomala）

多形态汉逊酵母菌（H.polymorpha）

（6）地丝菌属（Geotrchum）：

念珠地丝菌（G.candidum）

（7）芽生裂殖菌属（Blastoschizomyces）：

头状芽生裂殖菌属（B.capitalus）

（8）原膜菌属（Prototheca）：

威克原膜菌（P.wickerhamii）

佐芬原膜菌（P.zopfii）

（9）马拉色霉菌属（Malassezia）：

糠秕马拉色霉菌（M.furfur）

（四）支原体（Mycoplasma）

从人体分离出的支原体有：

肺炎支原体（M.Pneumoniac）

口腔支原体（N.ovale）

唾液支原体（M.salvarium）

咽支原体（M.faucium）

嗜脂支原体（M.lipophilum）

嗜精子支原体（M.spematophilum）

渗透支原体（M.penetrans）

人型支原体（M.hominis）

解脲脲原体（M.urealyticum）

颊支原体（M.bucale）

莱氏无胆甾原体（M.laidlawii）

发酵支原体（M.fermentans）

灵长支原体（M.primatum）

生殖支原体（M.genitalium）

（五）衣原体（Chlamydiae）

第9 版伯杰鉴定细菌学手册将与人类有关的衣原体分为4 个种：

沙眼衣原体（C.trachomatis）

鹦鹉热衣原体（C.psittaci）

肺炎衣原体（C.pneumoniae）

家畜衣原体（C.pecorum）

（六）其他革兰阴性杆菌

对目前在临床上较少能分离到的菌种，但其对人类致病是明确的，如巴斯德菌属和布鲁菌属等以及有些临床意义还不十分明确的分离菌，其分类如下：

1．艾肯菌属（Eikenella）

侵蚀艾肯菌（E.Corrodens）

2．鲍特菌属（Bordetella）

百日咳鲍特菌（B.pertussis）

副百日咳鲍特菌（B.parapertussi）

支气管鲍特菌（B.Bronchsptica）

3．巴斯德菌属（Pasteurella）

多杀巴斯德菌（P.multocida）

嗜肺巴斯德菌（P.pneumotropica）

溶血巴斯德菌（P.haemolytica）

脲巴斯德菌（P.urea）

产气巴斯德菌（P.aerogenes）

母鸡巴斯德菌（P.qallinarum）

4．心脏杆菌属（Cardiobacterium）

人心脏杆菌（C.hominis）

5．色杆菌属（Chromonacterium）

紫色色杆菌（C.uiodaceum）

6．布鲁菌属（Brucella）

羊布鲁茵（B.melitensis）

牛布鲁菌（B.abortus）

猪布鲁菌（B.suis）

绵羊布鲁菌（B.ovis）

狗布鲁菌（B.canis）

木鼠布鲁菌（B.neetimais）

第三章　医院感染及监控

控制医院感染是现代化医院质量管理的重要目标之一。随着现代医疗技术的进步和社会人群构成的老龄化，免疫功能低下者日益增多，感染宿主由健康人群逐步转向免疫功能低下的人群，条件致病微生物逐步替代了毒力强的病原微生物而成为主要病原体，感染的主流已倾向于医院感染。医院感染严重威胁住院患者的身心健康和预后，直接关系到医疗质量和患者安危及医疗费用。目前，医院感染已成为国际医学界极为关注的问题。

第一节　医院感染

一、医院感染的定义

医院感染又称医院内获得性感染，指在病人人院时既不存在，又不处于潜伏期，而是在医院内发生的感染，包括在医院获得而于出院后发病的感染。

二、医院感染的分类

1）外源性感染又称交叉感染，病原体来自患者体外，即来自其他住院患者、医务人员、陪护家属和医院环境等。

2）内源性感染又称自身感染，病原体来自患者自身贮菌库（皮肤、鼻咽口腔、泌尿生殖道、肠道）的正常菌群或外来的已定植菌。在医院中当人体免疫功能下降、体内微生态环境失衡或发生细菌易位时即可发生感染。

三、医院感染常见的病原菌及变迁

引起医院感染的病原微生物中，90％为条件致病菌。目前我国以革兰阴性菌为主，其次为革兰阳性菌，真菌占第三位。革兰阴性菌中以大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肠杆菌属和克雷伯菌属为主；革兰阳性菌中主要是葡萄球菌，且以金黄色葡萄球菌最多见；真菌中白色念珠菌感染占首位。大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌占据医院感染病原菌的前三位。以上分布特点，不同的医院可能略有差异。

在抗生素应用以前，医院感染以化脓性链球菌和肺炎链球菌为主；青霉素应用于临

床后的50 年代，金黄色葡萄球菌取代链球菌成为主流；到了70 年代，耐β－内酰胺酶等新型青霉素应用，革兰阴性菌感染增多，且以肠杆菌科细菌为主，同时耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）感染增多；氨基糖苷类和广谱青霉素问世，铜绿假单胞菌感染增多；一代、二代头孢菌素应用，沙雷菌和不动杆菌增多；80 年代后期第三代头孢菌素开始大量应用，耐药的革兰阳性球菌和真菌逐渐成为医院感染的主要病原菌；90 年代以后，除MRSA 感染继续增多外，耐万古霉素肠球菌（VRE）、耐青霉素肺炎链球菌、多重耐药结核杆菌也日渐增多；近年来，产超广谱β－内酰胺酶（ESBLs）的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌引起的感染也日趋严重。

医院感染病原菌总的变迁趋势是由毒力高的药物敏感株向毒力低的多重耐药株发展。

我国医院感染的流行报告中，鼠伤寒沙门菌最为多见，其次是金黄色葡萄球菌和克雷伯菌属，偶有分枝杆菌引起的流行；在病毒引起的流行中，柯萨奇病毒最多见。

四、医院感染的传播方式

1．呼吸道传播

（1）患者呼出的带有病菌的飞沫可近距离地传给其他患者和医务人员，如麻疹。

（2）通过飞沫传播的病菌，可远距离传播，如结核分枝杆菌。

（3）医源性呼吸道传播，如超声雾化治疗、氧气湿化瓶的污染等等。空调系统可带有军团菌和喜湿性细菌污染。

2．消化道传播

医院内感染常见的有感染性腹泻、甲型肝炎、鼠伤寒沙门菌感染等。

3．接触传播

（1）直接接触：患者或医务人员直接与感染源接触而获得感染，如污染的消毒液和食物等。

（2）间接接触：间接接触是医院中的主要传播方式。医务人员手接触了感染源后，污染医疗设施和患者用具或直接传给其他患者；医院常见的侵入性操作既可带人外源性感染，又可将自体细菌带到另外部位，如消毒灭菌不彻底的内窥镜。

（3）血液和体液传播。

（4）垂直传播：①通过胎盘屏障传播；②产程中新生儿吸吮阴道分泌物或产伤致母婴血液接触；③哺乳。

五、医院感染的对象

医院感染可发生于与医院相关的人群，如门诊和住院患者、医务人员、陪护家属、

探视者等均可发生医院感染。

六、医院感染的流行特征

医院感染具有平时散发与严重时暴发的医院流行病学特点。医院感染多为免疫功能低下宿主的机会性感染，且以内源性感染为主，传染性较小，一般可在病区内针对其传播方式进行隔离。当医院消毒灭菌和隔离措施发生失误时可引起暴发感染。

第二节　医院感染的监控

一、医院感染监控的工作制度

微生物学实验室应积极协助医院感染管理科对抽检的标本进行微生物学检测。

1）每季度或每半年公布1 次全院各病区的细菌分布及药敏结果。

2）每月进行1 次临床各科室的环境空气培养。

3）每月对抽检的各病房使用中的消毒液及无菌器械保存液进行细菌培养。

4）每月1 次对透析液及透析用水进行细菌监测。

5）每季度1 次对物体表面细菌监测，对婴儿室、儿科病房的物体表面及餐具作细菌培养。

6）每季度抽查婴儿室、儿科病房、手术室医护人员的手，进行细菌培养。

7）所有蒸汽和环氧乙烷气体的灭菌器至少每周1 次用活芽胞杆菌作灭菌效果评价，干热灭菌每月监测1 次。

8）对无菌物品定期采样检测。

9）病房有医院感染暴发流行时进行外环境监测。

二、微生物学实验室在控制医院感染中的作用

临床微生物学实验室除完成对临床患者标本的微生物学检验外，还应主动积极地参与医院感染的控制与监测。微生物学实验室主任应作为医院感染管理委员会（或领导小组）的重要成员。微生物学实验室在控制医院感染方面的主要工作如下：

1）积极参加医院感染管理委员会活动。

2）正确鉴定医院感染中涉及的微生物。

3）对医院感染的重点微生物进行耐药性包括耐药基因和酶的监测（如MRSA、VRSA、ESBLs、VRE、PRP 等）。

4）定期统计和报告本院微生物的种类和体外药敏试验数据。

5）对医院各种环境及医用物品，包括一次性用品进行细菌学监测。

6）参加医院感染性疾病的大会诊和病例讨论。

7）参加抗菌药物管理委员会及相关会议，并参与制定抗菌药物应用管理规范。

8）对医院职工进行微生物学知识的继续教育。

三、医院感染监控中常用的检测方法

采样及检查原则：采样后必须尽快对标本进行相应指标的检测，送检时间不得超过6h；若标本4℃保存时，送检时间可延长，但不得超过24h。

1．医务人员手的微生物学监测

1）采样时间：在接触患者或从事医疗活动前进行采样。

2）采样面积及方法：被检人五指并拢，将浸有无菌9g/L氯化钠溶液的棉拭子1支在双手曲面从指根到指端来回涂擦各两次（一只手涂擦面积约30cm^2），并随之转动采样棉拭子，剪去手接触部位，将棉拭子放入装有10ml采样液的试管内送检。采样面积按平方厘米（cm^2）计算。

3）细菌菌落总数检查：1ml采样液放入灭菌平皿内，用普通营养琼脂作倾注培养，置35℃温箱内培养24～48h，菌落按以下公式计算：

$$\text{手细菌菌落总数（cfu/cm}^2\text{）}=\frac{\text{平皿上菌落数}\times\text{采样液稀释倍数}}{30\times2}$$

4）判断标准：见表6－3－1。

表6－3－1　各类环境空气、物体表面、医护人员手的细菌菌落总数卫生标准

环境类别	范围	细菌菌落总数（cfu/cm^2）		
		空气	物体表面	医护人员手
Ⅰ类	层流洁净手术室、层流洁净病房	≤10	≤5	≤5
Ⅱ类	普通手术室、产房、婴儿室、早产儿室、普通保护性隔离室、供应宣无菌区、烧伤病房、重症监护病房	≤200	≤5	≤5
Ⅲ类	儿科病房、妇产科检查室、注射室、换药室、治疗室、供应室清洁区、急诊室、化验室、各类普通病房和房间	≤500	≤10	≤10
Ⅳ类	传染病科及病房	－	≤15	≤15

注：－表示不要求；空气中细菌菌落总数单位是cfu/m^3

2．物体表面的微生物学监测

1）采样时间：消毒处理后4h内采样。

2）采样面积：被采表面＜100cm²，取全部表面；被采表面≥100cm²，取100cm²。

3）采样方法：用5cm×5cm 的标准灭菌规格板，放在被检物体表面，用浸有灭菌9g/L 氯化钠溶液的棉拭子1 支，在规格板内横竖往返各涂抹5 次，并随之转动棉拭子，连续采样式1～4 个规格板面积，剪去手接触部分，将棉拭子人装10ml 采样液的试管内送检。门把手等小型物体则采用棉拭子直接涂抹物体的方法采样。

4）细菌菌落总数检查：1ml 采样液放人灭菌平皿内，用普通营养琼脂作倾注培养，置35℃温箱内培养24～48h，按下式计算菌落：

$$\text{物体表面细菌菌落总数}\ (\text{cfu}/\text{cm}^2) = \frac{\text{平皿上菌落数} \times \text{采样液稀释倍数}}{\text{采样面积}\ (\text{cm}^2)}$$

5）判断标准：见表6－3－1。

3．空气的微生物学监测

1）采样时间：选择消毒处理后与进行医疗活动之前期间采样。

2）采样高度：与地面垂直高度80～150cm。

3）布点方法：室内面积≤30m²，设一条对角线上取3 点，即中心1 点、两端各距墙1m 处取1 点；室内面积＞30m²，设东、西、南、北、中5 点，其中东、西、南、北点均距墙1m。

4）采样方法：用90mm 直径普通营养琼脂平板在采样点暴露5～30min 后送检培养。

5）细菌菌落总数检查：将平板置37℃温箱内培养24h，按下式计算菌落：

$$\text{空气细菌菌落总数}\ (\text{cfu}/\text{m}^3) = \frac{50000N}{AT}$$

式中A 为平板面积（cm^2）；T 为平板暴露时间（min）；N 为平均菌落数（cfu／平板）。

6）判断标准：见表6－3－1。

4．使用中消毒剂和无菌器械保存液的微生物学监测

1）采样时间：采取更换前使用中的消毒剂与无菌器械保存液。

2）采样量及方法：在无菌条件下，用无菌吸管吸取1ml 被检样液，加入到9ml 稀释液中混匀。醇类和酚类消毒剂用普通营养肉汤作稀释液。含氯消毒剂、含碘消毒剂、过氧化物消毒液需在肉汤内加入0.1％硫代硫酸钠作稀释液。季铵盐类消毒液需在肉汤中加入3％Tween80 和0.3％卵磷脂作稀释液。含有表面活性剂的各种复方消毒剂需在肉汤中加入3％Tween80 作稀释液。常用消毒剂的中和剂见表6－3－2。

表6－3－2　常用消毒剂的中和剂

消毒剂	中和剂
含有效氯或碘0.1％～0.5％的消毒剂	硫代硫酸钠（0.1％～1.0％）
0.1％～0.5％的过氧乙酸溶液	硫代硫酸钠（0.1％～0.5％）
1.0％～3.0％的过氧化氢溶液	硫代硫酸钠（0.5％～1.0％）
1％的甲醛溶液	1）1％双甲酮与0.6％吗啉的混合液 2）0.1％～0.5％亚硫酸钠 3）25％氢氧化钠
2％的戊二醛溶液	甘氨酸（1％）或甲醛（1％）
0.1％～0.5％的季铵盐类消毒液	Tween80（0.5％～3.0％）＋卵磷脂（0.1％～2.0％）
酚类消毒剂	Tween80（0.5％～3.0％）
汞类消毒剂	巯基醋酸钠（0.2％～2.0％）
碱类消毒剂	等当量酸
酸类消毒剂	等当量碱
中草药剂	稀释法或过滤法
复方消毒剂	Tween80＋卵磷脂＋硫代硫酸钠

注：括号内为加入中和剂后消毒剂内中和剂的浓度

3）细菌菌落总数检查：分别取1ml采样液放人2只灭菌平皿内，用普通营养琼脂作倾注培养，将其中一只平板置20℃培养7d，观察细菌生长情况；另一平板置37℃温箱内培养72h，计数菌落。平板上有菌生长，证明被检样液有残存活菌，若每个平板菌落数在10个以下，仍可用于消毒处理（但不能用于灭菌）；若每个平板菌落数超过10个，说明每毫升被检样液含菌量已超过100个，不宜再用。

4）判断标准：使用中消毒剂，细菌菌落总数≤100cfu/ml，病原微生物不得检出；无菌器械保存液必须无菌。

5．医疗用品的微生物学监测

1）采样时间：在消毒或灭菌处理后，存放有效期内采样。

2）采样量及采样方法：可用破坏性方法取样的医疗用品，如输液（血）器、注射器和注射针等均参照《中华人民共和国药典》2000年版二部附录中“无菌检查法”规定执行。对不能用破坏性方法取样的特殊医疗用品，可用浸有无菌9g/L氯化钠溶液的棉拭子在被检物体表面涂抹采样，被采表面＜100cm^2，取全部表面；被采表面≥100cm^2，取100cm^2。

3）无菌检查：参照《中华人民共和国药典》2000年版二部附录中“无菌检查法”。

4）细菌菌落总数检查：1ml采样液放入灭菌平皿内，用普通营养琼脂作倾注培

养，置37 ℃温箱内培养24 ～48h，按下式计数菌落：

$$\text{物体表面细菌菌落总数}\ (\text{cfu}/\text{cm}^2) = \frac{\text{平皿上菌落数} \times \text{采样液稀释倍数}}{\text{采样面积}\ (\text{cm}^2)}$$

5）判断标准：进入人体无菌组织、器官或接触破损皮肤、黏膜的医疗用品必须无菌。接触黏膜的医疗用品细菌菌落总数≤20cfi/g 或100cfu/cm²，不得检出病原微生物。

6．血液和腹膜透析所用的水及透析液的微生物学监测

1）采样点：透析用水出口（自来水经过过滤、软化、活性炭吸附、去离子逆渗透等步骤处理后的出口）、透析液出口（即透析结束时透析液离开透析器的出口）。如疑有透析液污染或严重感染患者，应增加采样点，如原出水口、透析液配比机、反渗水出口、贮水罐出口、透析液进口等。

2）细菌菌落总数检查：取透析用水或透析液1ml 放人灭菌平皿内，用普通营养琼脂作倾注培养，放37 ℃温箱内培养24 ～48h，按下式计数菌落：

$$\text{细菌菌落数}\ (\text{cfu}/\text{ml}) = \frac{\text{平皿上菌落数} \times \text{采样液稀释倍数}}{\text{所取液体的容量}\ (\text{ml})}$$

3）判断标准：透析用水的细菌菌落总数≤100cfu/ml；透析结束时，透析液细菌菌落总数≤2000cfu/ml，并且无致热原物质存在。

7．紫外线消毒效果监测

1）紫外线灯管辐射强度值的测定：开启紫外线灯5min 后，按说明书操作，将测定波长为253.7nm 的紫外线强度测定仪（指定有效期内）探头置被检紫外线灯下垂直1m 的中央处，仪表稳定后所示数据即为紫外线灯管的辐射强度值。其中30W 直管型紫外灯新灯管辐射强度值≥100 μW/cm²，使用中辐射强度值≥70 μW/cm²；30W 高强度紫外线新灯的辐射强度值≥200 μW/cm²。

2）微生物学检测方法：开启紫外线灯5min 后，将8 片染菌玻片平放人灭菌器皿中，水平放于紫外线灯下适当距离处照射，于4 个不同间隔时间，各取出2 片染菌玻片，分别投入2 支盛有5ml 洗脱液（含1 %Tween80、1 %蛋白胨的9g/L 氯化钠溶液）试管中振打80 次。经适当稀释后，取0.5ml 洗脱液放人灭菌平皿内用普通营养琼脂作倾注培养；再放37 ℃温箱内培养48h，计数菌落。另取2 片未作照射处理的染菌玻片分别投入2 支盛有5ml 洗脱液试管中振打80 次，其余按上述步骤操作。

$$\text{计算细菌杀灭率}\ (\%) = \frac{\text{未照射染菌玻片回收菌数} - \text{紫外线照射染菌玻片回收菌数}}{\text{未照射染菌玻片回收菌数}}$$

3）判断标准：对指示菌杀灭率≥99.9 %为消毒合格；对达到物理学检测标准时，作为消毒合格的参考标准。

8．压力蒸汽灭菌器灭菌效果监测

1）采样时间：与被消毒或灭菌物品同时监测。

(2) 布点方法：小型灭菌器选1 个包装物品放入指示剂，置最底层中央；中型灭菌器选3 个包装物品放人指示剂，上层中央放1 个，下层前后各1 个；大型灭菌器选5 个包装物品放人指示剂，上、中层中央各放1 个，下层前、中、后部各放1 个。

(3) 监测方法：采用卫生部批准的化学指示剂和嗜热脂肪芽胞杆菌（ATCC7953，ATCC12980）作为生物指示剂。

9．环氧乙烷气体灭菌的效果监测

(1) 采样时间：与被消毒或灭菌物品同时监测。

(2) 监测方法：用环氧乙烷灭菌指示片，其由红色变成蓝色表示灭菌完全。枯草芽胞杆菌黑色变种（ATCC9372）作为生物指示剂。

四、环境监测的卫生标准

(1) 细菌菌落总数：各类环境空气、物体表面及医护人员手细菌菌落总数的允许检出值见表6－3－1。

(2) 病原微生物：不得检出乙型溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌及其他病原微生物。在可疑污染情况下进行相应指标的检测。母婴同室、早产儿室、婴儿室、新生儿及儿科病房的物体表面和医护人员手上不得检出沙门菌。

第四章　微生物学检验基本技术

随着现代医学及相关科学技术的发展，各学科相互交叉和渗透，医学微生物学检验技术已深入到细胞、分子和基因水平，许多新技术、新方法已在临床微生物学实验室得到广泛应用。医学微生物学实验室的基本任务之一是利用微生物学检验技术，准确、快速地检验和鉴定临床标本中的微生物，并对引起感染的微生物进行耐药性监测，为临床对感染性疾病诊断、治疗、流行病学调查及研究等提供科学依据。

第一节　细菌形态学检查

细菌形态学检查是细菌检验的重要方法之一。它根据细菌的形态、结构和染色反应性等，为进一步鉴定提供参考依据。

一、不染色标本检查

不染色标本一般可用于观察细菌形态、动力及运动情况。细菌未染色时无色透明，在显微镜下主要靠细菌的折光率与周围环境的不同来进行观察。有鞭毛的细菌运动活泼，无鞭毛的细菌则呈不规则布朗运动。苍白密螺旋体、钩端螺旋体、弯曲杆菌等的活菌各有特征鲜明的形态和运动方式，具有诊断意义。常用的方法有悬滴法、压滴法和毛细管法等。

1．悬滴法

在洁净凹玻片的凹孔四周涂上凡士林，用接种环取1 环菌悬液放在盖玻片中央，再将凹玻片的凹孔对准盖玻片中央的液滴并盖上，然后迅速翻转，轻压盖玻片，使其与凹孔边缘的凡士林粘紧封闭后置高倍镜下（或暗视野）观察。

2．压滴法

用接种环取1 环菌悬液置于洁净玻片的中央，在菌悬液上轻轻盖上1 盖玻片，避免产生气泡并防止菌悬液外溢，静止数秒钟后置高倍镜下明视野（或暗视野）观察。

3．毛细管法

主要用于厌氧菌动力的检查。通常选用60～70mm 长、0.5～1.0mm 孔径的毛细管虹吸厌氧菌悬液后，用火焰将毛细管两端熔封，并用塑胶纸将毛细管固定在载玻片上，

置高倍镜下暗视野观察。

二、染色标本检查

细菌标本经染色后，由于细菌与周围环境间在颜色上形成鲜明对比，故在普通光学显微镜下可清楚地观察到细菌的形态特征（如细菌的大小、形状、排列等）和某些特殊结构（如荚膜、鞭毛、芽胞等），并可根据染色反应性对细菌加以分类鉴定。

（一）细菌染色的一般程序

细菌染色的一般程序是：涂片（干燥）—固定—染色（媒染）—脱色—复染。

1．涂片制备

血液、分泌物、排泄物、穿刺液和液体培养物，直接在载玻片上作薄膜涂片；尸检或感染动物组织，病变局部涂抹采样的棉拭子直接涂片。固体培养基上的菌落或菌苔的制片，先用接种环取1 环9g/L 氯化钠溶液置载玻片中央，再用无菌接种环取少量的培养物在9g/L 氯化钠溶液中磨匀，涂布成1cm ×1cm 大小的涂面，置室温下自然干燥或远火慢慢烘干。

2．固定

目的是杀死细菌，凝固细菌蛋白及结构，便于染色；促使细菌粘附在载玻片上，避免在水洗过程中被水冲掉；改变细菌对染料的通透性，有利于菌细胞内结构的染色。通常用火焰加热固定，将已干燥的涂片在火焰中迅速通过3 次，以手背皮肤接触玻片不烫为佳。

3．染色

根据检验目的不同，选择不同的染色方法进行染色。染色时滴加染色液，以复盖标本为度。

4．媒染

增强染料和被染物的亲和力，使染料固定于被染物及引起细胞膜通透性改变，常用明矾、鞣酸、金属盐和碘等作为媒染剂，也可用加热法促进着色。

5．脱色

使已着色的被染物脱去颜色，常用乙醇、丙酮等作为脱色剂。脱色剂可以查出细菌与染料结合的稳定程度，作为鉴别染色之用。

6．复染

已脱色处理的细菌或其结构常以复染液作复染以便于观察。复染液与初染液的颜色不同而形成鲜明对比。复染不宜太强，以免掩盖初染的颜色。

㈡ 常用染色法

1．单染色法

只用一种染料染色。由于大多数细菌胞浆内含有酸性物质，可与碱性染料结合，故常用吕氏美蓝、结晶紫和稀释石炭酸复红等染色液。此法可观察细菌的大小、形态与排列，不能显示细菌的结构与染色特性。

2．复染色法

用两种或两种以上不同染料可将细菌染成不同的颜色，除显示细菌的大小、形态与排列外，还反映出细菌染色特性，具有鉴别细菌种类的价值。常用的有革兰染色法和抗酸染色法。

革兰染色

革兰染色步骤如下：

1）细菌涂片经火焰固定，加结晶紫染液染1min，清水冲去染液；

2）加碘液媒染1min，水洗，甩干；

3）用95%乙醇脱色，轻轻摇动约30s，至无紫色洗落为止，水洗，甩干；

4）加稀释石炭酸复红或沙黄染液数滴进行复染，约30s，水洗；

5）干后显微镜下镜检观察结果。革兰阳性菌染成紫色，革兰阴性菌为红色。

抗酸染色

1）萋－纳Ziehl－Neelse）抗酸染色法：①细菌涂片经火焰固定，加石炭酸复红溶液，徐徐加热至有蒸气出现，切不可沸腾。染液因蒸发减少时，应随时补充，防止染液蒸干。持续染5min（奴卡菌需要延长时间），水洗，甩干；②滴加3%盐酸乙醇脱色，不时摇动玻片至无红色脱落为止，水洗，甩干；③加吕氏美蓝复染液数滴复染1min，水洗；④干后显微镜下镜检观察结果。抗酸杆菌染成红色，非抗酸杆菌为蓝色。

2）金胺O－罗丹明B染色法：①细菌涂片固定后加第1液30～90s；②弃去第1液后加第2液染15min；③用第3液脱色1～2min，水洗；④滴加第4液染30s，水洗；⑤干后置荧光显微镜下镜检观察结果。抗酸菌在暗背景中呈现金黄色荧光。

3．特殊染色法

1）鞭毛染色（改良Ryu法）：①将新载玻片浸泡在95%乙醇中，临用时取出，以干净纱布擦干；②在玻片上滴蒸馏水1滴；③挑取培养物少许，轻触蒸馏水滴顶部，仅允许极少量细菌进入水滴，不可搅动，以免鞭毛脱落；④置35℃孵箱自然干燥，不能用火焰固定，滴加鞭毛染液染1～2min轻轻水洗；⑤干后显微镜镜检观察结果。鞭毛和菌体呈紫色。

2）异染颗粒染色（阿尔培托法）：①细菌涂片经火焰固定，加甲液染色3～5min，水洗；②滴加乙液染1min，水洗；③干后显微镜镜检观察结果。菌体呈绿色，异染颗粒呈蓝黑色，用于白喉棒状杆菌染色。

3）荚膜染色：①奥尔特荚膜染色法。将已固定的细菌涂片滴加3％沙黄染液，用火焰加温染色，持续3min，冷却后水洗，待干镜检。结果菌体呈褐色，荚膜呈黄色，此法主要用于炭疽芽胞杆菌。②Hiss 硫酸铜法。染液：第1 液为结晶紫乙醇饱和液5ml加蒸馏水95ml 的混合液；第2 液为200g/L 硫酸铜溶液。方法：细菌涂片自然干燥，乙醇固定。滴加第1 液，微加热染1min。再用第2 液将涂片上的染液洗去，勿再水洗，倾去硫酸铜溶液，以吸水纸吸干镜检。结果菌体及背景呈紫色，荚膜呈鲜蓝色或不着色。

4）芽胞染色：染液：第1 液为萋－纳氏石炭酸复红液，第2 液为95％乙醇，第3 液为碱性美蓝液。方法：将已固定的标本涂片滴加第1 液，微加热染5min，冷却后水洗；用第2 液脱色2min，水洗；加第3 液复染1min，水洗，待干镜检。结果菌体呈蓝色，芽胞呈红色。

4．负染色法

背景着色而菌体本身不着色的染色为负染色法。最常见的是墨汁负染色法，用来观察真菌及细菌荚膜等。在标本涂片处滴加染液，混合后加上盖玻片（勿产生气泡），轻压。在低倍镜下寻找有荚膜的菌细胞，转高倍镜或油镜确认，如新型隐球菌可见宽厚透亮的荚膜，背景为黑色。

5．荧光染色法

经荧光素染色的细菌，或荧光素标记的荧光抗体与相应的细菌、病毒抗原结合形成的复合物，在荧光显微镜下会发出荧光。

第二节　微生物培养和分离方法

大多数细菌均可以通过人工方法培养，而衣原体和病毒的分离培养往往需要活组织、鸡胚、特殊细胞株及动物接种。只有将微生物培养出来才能对它进行研究、鉴定。

一、接种方法

根据待检标本的性质、培养目的和所用培养基的种类，采用不同的接种方法。

1．平板划线分离培养法

对混有多种细菌的临床标本，采用划线分离和培养，使原来混杂在一起的细菌沿划线在琼脂平板表面分离，得到分散的单个菌落，以获得纯种。临床送检的标本如痰、咽

拭子、泌尿生殖道的分泌物和粪便等细菌检验均需要借助琼脂平板划线分离目的菌。平板划线分离法通常有分区划线分离法和连续划线分离法。

1）分区划线分离法：此法常用于含菌量较多的标本如痰、泌尿生殖道的分泌物和粪便或混合细菌的分离。先用接种环挑取标本涂布于琼脂平板1 区（占培养基总面积的1/4）并作数条划线，再于2、3、4 区依次划线。每划完一个区域，均将接种环烧灼灭菌1 次，冷后再划下一区域，每一区域的划线均与上一区域的划线交接1～3 次。一个成功分区划线的平板，培养后分别观察到1 区形成菌苔，2 区菌落连成线，3 区和4 区可有单个菌落。

2）连续划线分离法：此法常用于含菌量不多的标本或培养物中的细菌分离培养。先将接种物在琼脂平板上1/5 处轻轻涂抹，然后再用接种环或拭子在平板表面曲线连续划线接种，直至划满琼脂平板表面。

2．琼脂斜面接种法

主要用于菌株的移种，以获得纯种进行鉴定和保存菌种等。用接种环（针）挑取单个菌落或培养物，从培养基斜面底部向上划一条直线，然后再从底部沿直线向上曲折连续划线，直至斜面近顶端处止。生化鉴定培养基斜面接种，用接种针挑取待鉴定细菌的菌落，从斜面中央垂直刺入底部，抽出后在斜面上由下至上曲折划线接种。

3．穿刺接种法

此法多用于半固体培养基或双糖铁、明胶等具有高层的培养基接种，半固体培养基的穿刺接种可用于观察细菌的动力。接种时用接种针挑取菌落，由培养基中央垂直刺入至距管底0.4cm 处，再沿穿刺线退出接种针。双糖铁等有高层及斜面之分的培养基，穿刺高层部分，退出接种针后直接划线接种斜面部分。

4．液体培养基接种法

用于各种液体培养基如肉汤、蛋白胨水、糖发酵管等的接种。用接种环挑取单个菌落，倾斜液体培养管，在液面与管壁交界处研磨接种物（以试管直立后液体淹没接种物为准）。此接种法应避免接种环与液体过多接触，更不应在液体中混匀、搅拌，以免形成气溶胶，造成实验室污染。

5．倾注平板法

本法主要用于饮水、饮料、牛乳和尿液等标本中的细菌计数。取纯培养物的稀释或原标本1ml 至无菌培养皿内，再将已融化并冷却至45～50℃左右的琼脂培养基15～20ml 倾注入该无菌培养皿内，混匀，待凝固后置37℃培养，长出菌落后进行菌落计数，以求出每毫升标本中所含菌数。先数6 个方格（每格面积1cm×1cm）中菌落数，求出每格的平均菌落数，并算出平皿直径，然后按下列公式计数，求出每毫升标本中的细菌

数。

全平板菌落数＝每方格的平均菌落数×π^2，

每毫升标本中的细菌数＝全平板菌落数×稀释倍数

6．涂布接种法

本法多用于纸片扩散法药敏试验的细菌接种。将一定量或适量的菌液加到琼脂培养基表面，然后用灭菌的L 型玻璃棒或棉拭子于不同的角度反复涂布，使被接种液均匀分布于琼脂表面，然后贴上药敏纸片，或直接培养。本法经培养后细菌形成菌苔。

二、细菌的培养方法

根据不同的标本及不同的培养目的，可选用不同的培养方法。通常把细菌的培养方法分为需氧培养、二氧化碳培养、微需氧培养和厌氧培养4 种。

1．需氧培养

是指需氧菌或兼性厌氧菌在有氧条件下的培养，将已接种好的平板、斜面、液体培养基等在空气中置35 ℃孵育箱内孵育18 ～24h，无特殊要求的细菌均可生长。少数生长缓慢的细菌需要培养3 ～7d 甚至1 个月才能生长。为使孵育箱内保持一定的湿度，可在其内放置1 杯水。对培养时间较长的培养基，接种后应将试管口塞好棉塞或硅胶塞后用石蜡－凡士林封固，以防培养基干裂。

2．二氧化碳培养

某些细菌，如肺炎链球菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、布鲁氏菌和流感嗜血杆菌等的培养，特别是在初次分离时，须在5 %～10 %二氧化碳环境中培养才能生长。常用的有4 种。

1） 二氧化碳培养箱法：二氧化碳孵箱能自动调节二氧化碳的含量、温度和湿度，培养物置于孵育箱内阁，孵育一定时间后可直接观察生长结果。

2） 烛缸培养法：取有盖磨口标本缸或玻璃干燥器，将接种好的培养基放入缸内，点燃蜡烛后放在缸内稍高于培养物的位置上，缸盖或缸口均涂以凡士林，加盖密闭。因缸内蜡烛燃烧，氧逐渐减少，数分钟后蜡烛自行熄灭，此时容器内二氧化碳含量约占5 %～10 %。将缸置于35 ℃普通孵育箱内孵育。

3） 气袋法：选用无毒透明的塑料袋，将已接种标本的培养皿放人袋内，尽量祛除袋内空气后将开口处折叠并用弹簧夹夹紧袋口。使袋呈密闭状态，执断袋内已置的二氧化碳产气管（安瓿）产生二氧化碳，数分钟内就可获得需要的二氧化碳培养环境，置于35 ℃孵育箱内孵育。

4） 化学法：常用碳酸氢钠－盐酸法。按每升容积取碳酸氢钠0.4g 与浓盐酸

0.35ml 的比例，分别置碳酸氢钠和盐酸于容器内，再连同容器置于玻璃缸内，盖紧密封，倾斜缸位使盐酸与碳酸氢钠接触而生成二氧化碳。于35 ℃孵育箱内孵育。

3．微需氧培养

微需氧菌在大气中及绝对无氧环境中均不能生长，只有在含有5 %～6 %氧气、5 %～10 %二氧化碳和85 %氮气的环境中才能生长。将标本接种到培养基上，置于上述气体环境中，35 ℃进行培养。

4．厌氧培养

厌氧菌对氧敏感，培养过程中需造成低氧化还原电势的厌氧环境。厌氧培养常用的方法有物理法、化学法、生物法。如厌氧罐培养法、气袋法、厌氧手套箱法、需氧菌共生厌氧法等。

三、细菌在培养基上生长特性

1．固体培养基

标本或液体培养物划线接种到固体培养基表面后，单个细菌经分裂繁殖可形成一个肉眼可见的细菌集团，称为菌落（colsny）。

1）菌落的形态特征：大小、形状（露滴状、圆形、菜花样、不规则等）、突起或扁平、凹陷、边缘（光滑、波形、锯齿状、卷发状等）、颜色（红色、灰白色、黑色、绿色、无色、黄色等）、表面（光滑、粗糙等）、透明度（不透明、半透明、透明等）和黏度等。据细菌菌落表面特征不同，可将菌落分为3 型：①光滑型菌落（S 型菌落）：菌落表面光滑、湿润、边缘整齐，新分离的细菌大多呈光滑型菌落。②粗糙型菌落（R 型菌落）：菌落表面粗糙、干燥、呈皱纹或颗粒状，边缘大多不整齐。R 型菌落多为S 型细菌变异失去菌体表面多糖或蛋白质形成。R 型菌落细菌抗原不完整，毒力和抗吞噬能力都比S 型菌落细菌弱。但也有少数细菌新分离的毒力株就是R 型，如炭疽芽胞杆菌、结核分枝杆菌等。③粘液型菌落（M 型菌落）：菌落黏稠、有光泽、似水珠样。多见于厚荚膜或丰富粘液层的细菌、结核杆菌等。

2）菌落溶血特征：①α溶血：又称草绿色溶血，菌落周围培养基出现1 ～2mm 的草绿色环，为高铁血红蛋白所致；②β溶血：又称完全溶血，菌落周围形成一个完全清晰透明的溶血环，是细菌产生的溶血素使红细胞完全溶解所致；③γ溶血：即不溶血，菌落周围的培养基没有变化，红细胞没有溶解或缺损。

3）菌落色素：有些细菌产生色素，使菌落和/或周围的培养基出现绿色、金黄色、白色、橙色、柠檬色等颜色，产生的色素有水溶性或脂溶性。

4）菌落气味：某些细菌在培养基中生长繁殖后可产生特殊气味，如铜绿假单胞菌

（生姜气味）、变形杆菌（巧克力烧焦的臭味）、厌氧梭菌（腐败的恶臭味）、白色假丝酵母菌（酵母味）和放线菌（泥土味）等。

2．液体培养基

细菌在液体培养基中有3 种生长现象：大多数细菌在液体培养基生长繁殖后呈均匀混浊：少数链状排列的细菌如链球菌、炭疽芽胞杆菌等则呈沉淀生长；枯草芽胞杆菌、结核分枝杆菌和铜绿假单胞菌等专性需氧菌一般呈表面生长，常形成菌膜。

3．半固体培养基

半固体培养基主要用于细菌动力试验。有鞭毛的细菌除了沿穿刺线生长外，在穿刺线两侧也可见羽毛状或云雾状混浊生长。无鞭毛的细菌只能沿穿刺线呈明显的线状生长，穿刺线两边的培养基仍然澄清透明，为动力试验阴性。

第三节　细菌的生物化学试验

各种细菌具有各自独特的酶系统，因而对底物的分解能力不同，其代谢产物也不同。用生物化学方法测定这些代谢产物，可用来区别和鉴定细菌的种类。利用生物化学方法来鉴别不同细菌，称为细菌的生物化学试验或称生化反应。生物化学试验的方法很多，主要有以下几类。

一、碳水化合物的代谢试验

1．糖（醇、苷）类发酵试验

【原理】

不同种类细菌含有发酵不同糖（醇、苷）类的酶，因而对各种糖（醇、苷）类的代谢能力也有所不同，即使能分解某种糖（醇、苷）类，其代谢产物可因菌种而异。检查细菌对培养基中所含糖（醇、苷）降解后产酸或产酸产气的能力，可用以鉴定细菌种类。

【方法】

在基础培养基中（如酚红肉汤基础培养基pH7.4）加入0.5％～1.0％的特定糖（醇、苷）类。所使用的糖（醇、苷）类有很多种，根据不同需要可选择单糖、多糖或低聚糖、多元醇和环醇等，单糖如赤藓糖、核糖、核酮糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露糖，双糖如蔗糖（葡萄糖＋果糖）、乳糖（葡萄糖＋半乳糖）、麦芽糖（两分子葡萄糖），三糖如棉子糖（葡萄糖＋果糖＋半乳糖），多糖如菊糖（多分子果糖）、淀粉，醇类如侧金盏花醇、卫茅醇、甘露醇、山梨醇，非糖类如肌醇。将待鉴定

的纯培养细菌接种人试验培养基中，置35℃孵育箱内孵育数小时到2 周（视方法及菌种而定）后，观察结果。若用微量发酵管，或要求培养时间较长时，应注意保持其周围的湿度，以免培养基干燥。

【结果判断】

能分解糖（醇、苷）产酸的细菌，培养基中的指示剂呈酸性反应（如酚红变为黄色），产气的细菌可在小倒管（Durham 小管）中产生气泡，固体培养基则产生裂隙。不分解糖则无变化。

【应用】

糖（醇、苷）类发酵试验，是鉴定细菌的生化反应试验中最主要的试验，不同细菌可发酵不同的糖（醇、苷）类，如沙门菌可发酵葡萄糖，但不能发酵乳糖；大肠埃希菌则可发酵葡萄糖和乳糖。即便是两种细菌均可发酵同一种糖类，其发酵结果也不尽相同，如志贺菌和大肠埃希菌均可发酵葡萄糖，但前者仅产酸，而后者则产酸、产气，故可利用此试验鉴别细菌。

2．葡萄糖代谢类型鉴别试验

【原理】

细菌在分解葡萄糖的过程中，必须有分子氧参加的，称为氧化型；能进行无氧降解的为发酵型；不分解葡萄糖的细菌为产碱型。发酵型细菌无论在有氧或无氧环境中都能分解葡萄糖，而氧化型细菌在无氧环境中则不能分解葡萄糖。本试验又称氧化发酵（O—F 或Hugh —Leifson，HL）试验，可用于区别细菌的代谢类型。

【方法】

挑取少许纯培养物（不要从选择性平板中挑取）接种2 支HL 培养管中，在其中一管加入高度至少为0.5cm 的无菌液体石蜡以隔绝空气（作为密封管），另一管作为开放管。置35℃孵箱孵育48h 以上。

【结果判断】

两管培养基均不产酸（颜色不变）为阴性；两管均产酸（变黄）为发酵型；加液体石蜡管不产酸，不加液体石蜡管产酸为氧化型。

【应用】

主要用于肠杆菌科与其他非发酵菌的鉴别。肠杆菌科、弧菌科细菌为发酵型，非发酵菌为氧化型或产碱型。也可用于鉴别葡萄球菌（发酵型）与微球菌（氧化型）。

3．甲基红（MR）试验

【原理】

某些细菌在糖代谢过程中，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸进一步被分解为甲酸、

乙酸和琥珀酸等，使培养基pH 值下降至4.5 以下时，加入甲基红指示剂呈红色。如细菌分解葡萄糖产酸量少，或产生的酸进一步转化为其他物质（如醇、醛、酮、气体和水），培养基pH 值在5.4 以上，加入甲基红指示剂呈桔黄色。

【方法】

将待试菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水中，35 ℃孵育48 ～96h 后，于5ml 培养基中滴加5 ～6 滴甲基红指示剂，立即观察结果。

【结果判断】

呈现红色者为阳性，桔黄色为阴性，桔红色为弱阳性。

【应用】

常用于肠杆菌科内某些种属的鉴别，如大肠埃希菌和产气肠杆菌，前者为阳性，后者为阴性。肠杆菌属和哈夫尼亚菌属为阴性，而沙门菌属、志贺菌属、枸橼酸杆菌属和变形杆菌属等为阳性。

4.β－半乳糖苷酶试验（ONPG 试验）

【原理】

乳糖发酵过程中需要乳糖通透酶和β－半乳糖苷酶才能快速分解。有些细菌只有半乳糖苷酶，因而只能迟缓发酵乳糖，所有乳糖快速发酵和迟缓发酵的细菌均可快速水解邻硝基酚－β－D －半乳糖苷（O －nitrophenyl －β－D －galactopyranoside，ONPG）而生成黄色的邻硝基酚。

【方法】

将待试菌接种于ONPG 肉汤中，35 ℃水浴或孵箱孵育18 ～24h，观察结果。

【结果判断】

呈现亮黄色为阳性，无色为阴性。

【应用】

可用于迟缓发酵乳糖细菌的快速鉴定，本法对于迅速及迟缓分解乳糖的细菌均可短时间内呈现阳性。埃希菌属、枸橼酸杆菌属、克雷伯菌属、哈夫尼亚菌属、沙雷菌属和肠杆菌属等均为阳性，而沙门菌属、变形杆菌属和普罗威登斯菌属等为阴性。

5.VP 试验

【原理】

测定细菌产生乙酰甲基甲醇的能力。某些细菌如产气肠杆菌，分解葡萄糖产生丙酮酸，丙酮酸进一步脱羧形成乙酰甲基甲醇。在碱性条件下，乙酰甲基甲醇被氧化成二乙酰，进而与培养基中的精氨酸等含胍基的物质结合形成红色化合物，即VP 试验阳性。

【方法】

将待检菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水中，35 ℃孵育24 ～48h ，加入50g/L α－萘酚（95 %乙醇溶液） 0.6ml ，轻轻振摇试管，然后加0.2ml400g/L 氢氧化钾溶液，轻轻振摇试管30s 至1min ，然后静置观察结果。

【结果判断】

红色者为阳性，黄色或类似铜色为阴性。

【应用】

主要用于大肠埃希菌和产气肠杆菌的鉴别。本试验常与MR 试验一起使用，一般情况下，前者为阳性的细菌，后者常为阴性，反之亦然。但肠杆菌科细菌不一定，如蜂房哈夫尼亚菌和奇异变形杆菌的VP 试验和MR 试验常同为阳性。

6．胆汁七叶苷水解试验

【原理】

在10 %～40 %胆汁存在下，测定细菌水解七叶苷的能力。七叶苷被细菌分解生成七叶素，七叶素与培养基中的枸橼酸铁的二价铁离子发生反应形成黑色化合物。

【方法】

将被检菌接种于胆汁七叶苷培养基中，35 ℃孵育18 ～24h 后，观察结果。

【结果判断】

培养基完全变黑为阳性，不变黑为阴性。

【应用】

主要用于D 群链球菌、肠球菌属与其他链球菌的鉴别，以及肠杆菌科的某些种、某些厌氧菌 （如脆弱拟杆菌等） 的初步鉴别。D 群链球菌、肠球菌属本试验为阳性。

7．淀粉水解试验

【原理】

产生淀粉酶的细菌能将淀粉水解为糖类，在培养基上滴加碘液时，可在菌落周围出现透明区。

【方法】

将被检菌划线接种于淀粉琼脂平板或试管中，35 ℃孵育18 ～24h ，加入革兰碘液数滴，立即观察结果。

【结果判断】

阳性反应者菌落周围有无色透明区，其他地方呈蓝色；阴性反应者培养基全部为蓝色。

【应用】

用于白喉棒状杆菌生物型的分型，重型阳性，轻、中型阴性；也用于芽胞杆菌属菌

种和厌氧菌某些种的鉴定。

8．甘油复红试验

【原理】

甘油可被细菌分解生成丙酮酸，丙酮酸脱去羧基为乙醛，乙醛与无色的复红生成醌式化合物，呈深紫红色。

【方法】

取被检菌接种于甘油复红肉汤培养基中，于35 ℃孵育，观察2～8d。应同时做阴性对照。

【结果判断】

紫红色为阳性，与对照管颜色相同为阴性。

【应用】

主要用于沙门菌属内各菌种间的鉴别。伤寒沙门菌、甲（丙）型副伤寒沙门菌、猪霍乱沙门菌、孔道夫沙门菌和仙台沙门菌为阴性，乙型副伤寒沙门菌结果不定，其他不常见沙门菌多数为阳性。

9．葡萄糖酸氧化试验

【原理】

某些细菌可氧化葡萄糖酸钾，生成α－酮基葡萄糖酸。α－酮基葡萄糖酸是一种还原性物质，可与班氏试剂起反应，出现棕色或砖红色的氧化亚铜沉淀。

【方法】

将待检菌接种于葡萄糖酸盐培养基中（1ml），置35 ℃孵育48h，加入班氏试剂1ml，于水浴中煮沸10min并迅速冷却，观察结果。

【结果判断】

出现黄到砖红色沉淀为阳性；不变或仍为蓝色为阴性。

【应用】

主要用于假单胞菌的鉴定和肠杆菌科菌分群。

二、氨基酸和蛋白质的代谢试验

1．硫化氢试验

【原理】

某些细菌能分解含硫氨基酸生成硫化氢，与亚铁离子或铅离子结合形成黑色沉淀物。

【方法】

将待检菌接种于含硫化物及亚铁离子的培养基或克氏双糖铁琼脂（KIA）中，35℃孵育18～24h，观察有无黑色沉淀出现。或用醋酸铅纸条（白色滤纸，根据KIA管大小裁剪适当，在热的50g/L醋酸铅饱和水溶液中浸泡，然后于50～60℃烘干，121℃高压灭菌15min备用），悬挂于KIA管中。醋酸铅是最敏感的方法。

【结果判断】

有黑色沉淀物为阳性。

【应用】

主要用于鉴别肠杆菌科细菌，如沙门菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属、爱德华菌属等为阳性，其他菌属大多为阴性。但沙门菌属中亦有部分硫化氢阴性菌株，如甲型副伤寒、仙台、猪霍乱沙门菌等。

2．明胶液化试验

【原理】

细菌分泌的胞外蛋白水解酶（明胶酶）能分解明胶，使明胶失去凝固能力而液化。

【方法】

将待检菌接种于明胶培养基中，35℃孵育24h～7d或更长时间，每24h取出放入4℃冰箱约2h后，观察有无凝固。

【结果判断】

如无凝固，则表示明胶已被水解，液化试验阳性。如凝固，则继续培养。

【应用】

奇异变形杆菌、普通变形杆菌、沙雷菌属和阴沟肠杆菌等能液化明胶，肠杆菌科中的其他细菌很少液化明胶。有些厌氧菌如产气荚膜梭菌与脆弱类杆菌等也能液化明胶。另外，许多假单胞菌也能产生明胶酶而使明胶液化。

3．吲哚试验（靛基质试验）

【原理】

某些细菌有色氨酸酶，能分解色氨酸产生吲哚，吲哚与对二甲氨基苯甲醛形成红色的玫瑰吲哚。

【方法】

将待检菌接种于富含色氨酸的蛋白胨水培养基中，35℃孵育24～48h，加入靛基质试剂，观察结果。

【结果判断】

红色为阳性，无色为阴性。

【应用】

主要用于肠杆菌科细菌的鉴别，如大肠埃希菌与产气肠杆菌，肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌等的鉴别。

4．苯丙氨酸脱氨酶试验

【原理】

测定细菌是否产生苯丙氨酸脱氨酶。细菌产生的苯丙氨酸脱氨酶使苯丙氨酸脱氨后生成苯丙酮酸，加入三氯化铁试剂后产生绿色反应。若延长时间，会退色。

【方法】

将待检菌大量接种人苯丙氨酸培养基中，35 ℃孵育18 ～24h ，滴加100g/L 三氯化铁试剂4 ～5 滴，立即观察菌落生长处有无绿色出现。

【结果判断】

有绿色出现为阳性。

【应用】

变形杆菌属、普罗威登菌属、摩根菌属均为阳性，肠杆菌科其他细菌均为阴性。

5．氨基酸脱羧酶试验

【原理】

某些细菌可产生氨基酸脱羧酶使氨基酸脱羧生成胺和二氧化碳。由于胺的生成使培养基变为碱性，可用指示剂指示出来。

【方法】

将待检菌分别接种于1 支氨基酸 (赖氨酸、鸟氨酸或精氨酸) 脱羧酶试验管和1 支氨基酸脱羧酶对照管 (无氨基酸) ，各覆盖至少0.5cm 高度的无菌石蜡油，35 ℃孵育1 ～4d ，观察结果。

【结果判断】

若以溴甲酚紫为指示剂，则试验管紫色为阳性，黄色为阴性；对照管应为黄色。

【应用】

主要用于某些细菌种间的鉴别，如赖氨酸用于产气肠杆菌 (阳性) 与阴沟肠杆菌 (阴性) 鉴别；鸟氨酸用于阴沟肠杆菌 (阳性) 与克雷伯菌 (阴性) 鉴别；精氨酸用于阴沟肠杆菌 (阳性) 与产气肠杆菌 (阴性) 鉴别等。

6．精氨酸双水解酶试验

【原理】

精氨酸经两次水解后，生成鸟氨酸、氨及二氧化碳。鸟氨酸又在脱羧酶的作用下生成腐胺。氨及腐胺均为碱性物质，故可使培养基变碱，用指示剂显色。

【方法】

将待检菌接种于试验培养基上，置35 ℃孵箱孵育1 ～4d ，观察结果。

【结果判断】

溴甲酚紫指示剂呈紫色为阳性，酚红指示剂呈红色为阳性。黄色为阴性。

【应用】

主要用于肠杆菌科及假单胞菌属的鉴定。

7．尿素酶试验

【原理】

某些细菌能产生尿素酶，分解尿素产生大量的氨，使培养基变碱。

【方法】

将待检菌接种于含有尿素的培养基中，35 ～℃孵箱孵育18 ～24h ，观察结果。

【结果判断】

红色为阳性，不变为阴性。

【应用】

主要用于肠杆菌科变形杆菌属、普罗威登菌属、克雷伯菌属及假单胞菌属的鉴定。

8．霍乱红试验

【原理】

霍乱弧菌分解色氨酸生成吲哚，并能使硝酸盐还原为亚硝酸盐，当加入硫酸后生成亚硝酸吲哚，呈红色反应。

【方法】

将待检菌接种于蛋白胨水中，置35 ℃孵育24h ，加入浓硫酸数滴，观察结果。

【结果判断】

呈红色者为阳性。

【应用】

霍乱弧菌呈阳性反应，但本试验并非霍乱弧菌所特有。凡能产生吲哚并还原硝酸盐为亚硝酸盐的细菌，均可呈现阳性反应。

三、碳源和氮源利用试验

1．枸橼酸盐利用试验

【原理】

某些细菌能利用枸橼酸盐作为惟一碳源，而在此培养基上生长，并分解枸橼酸盐生成碳酸钠，使培养基变碱性。

【方法】

将待检菌接种于枸橼酸盐培养基上，置35 ℃孵育1 ～4d ，逐日观察结果。

【结果判断】

若用溴麝香草酚蓝指示剂，斜面出现菌落或菌苔，培养基变蓝色为阳性；无菌落生长，培养基呈绿色为阴性。

【应用】

可用此试验作细菌种属间鉴定。埃希菌属、志贺菌属、爱德华菌属和耶尔森菌属均为阴性，沙门菌属、克雷伯菌属通常阳性，粘质和液化沙雷菌和某些变形杆菌及枸橼酸杆菌阳性。此外，铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌和嗜水气单胞菌也能利用枸橼酸盐。

2．丙二酸盐利用试验

【原理】

某些细菌能利用丙二酸盐作为惟一碳源，丙二酸盐被分解生成碳酸钠，使培养基变碱。

【方法】

将待检菌接种于丙二酸盐培养基中，置35 ℃孵育24 ～48h ，观察结果。

【结果判断】 培养基由绿色变为蓝色为阳性。颜色无变化为阴性。

【应用】

肠杆菌科中亚利桑那菌和克雷伯菌属为阳性，枸橼酸杆菌属、肠杆菌属和哈夫尼亚菌属有不同生物型反应，其他各菌属均为阴性。

3．醋酸钠利用试验

【原理】

细菌利用铵盐作为惟一氮源，同时，利用醋酸盐作为惟一碳源时，可在醋酸盐培养基上生长，分解醋酸盐生成碳酸钠，使培养基变为碱性。

【方法】

将被检菌接种于醋酸盐培养基中，置35 ℃孵育2 ～7d ，逐日观察结果。

【结果判断】

培养基上有细菌生长，并变为蓝色为阳性。

【应用】

主要用于大肠埃希菌和志贺菌属的鉴别，前者为阳性，而后者为阴性。

4．马尿酸钠水解试验

【原理】

某些细菌可具有马尿酸水解酶，可使马尿酸水解为苯甲酸和甘氨酸，苯甲酸与三氯

化铁试剂结合，形成苯甲酸铁沉淀。

【方法】

将待检菌接种于马尿酸钠培养基中，置35 ℃孵育48h，离心沉淀，取上清液0.8ml，加入三氯化铁试剂0.2ml，立即混匀，经10～15min 观察结果。

【结果判断】

出现恒定之沉淀物为阳性。

【应用】

主要用于B 群链球菌的鉴定。

5．乙酰胺利用试验

【原理】

许多非发酵菌产生一种脱酰胺酶，可使乙酸胺经脱酰胺作用释放氨，使培养基变碱。

【方法】

将被检菌接种于乙酰胺培养基中，置35 ℃孵育24～48h，观察结果。

【结果判断】

培养基由绿色变为蓝色为阳性；颜色不变为阴性。

【应用】

主要用于非发酵菌的鉴定。铜绿假单胞菌、去硝化产碱杆菌、食酸假单胞菌为阳性，其他非发酵菌大多数为阴性。

四、酶类试验

1．氧化酶试验

【原理】

氧化酶又称细胞色素氧化酶，是细胞色素氧化酶系统中的最终呼吸酶。此酶并不直接与氧化酶试剂起反应，而是先使细胞色素c 氧化，然后此氧化型细胞色素C 再使对苯二胺氧化，产生颜色反应。因此，本试验结果与细胞色素C 的存在有关。

【方法】

取洁净滤纸条，沾取菌落少许，加氧化酶试剂（10g/L 盐酸四甲基对苯二胺溶液或10g/L 盐酸二甲基对苯二胺溶液）1 滴，1min 内观察结果。也可将试剂滴加到菌落上进行试验。

【结果判断】

阳性者立即变粉红色，5～10s 内呈深紫色。无色为阴性。

【应用】

用于奈瑟菌属的菌种鉴定，该属细菌均阳性。此外，也用于假单胞菌属与肠杆菌科细菌的区别，前者阳性，而后者阴性。莫拉菌属、产碱杆菌属等均为阳性。

【注意事项】

1）试验时应避免接触含铁物质，以免出现假阳性。

2）10g/L 盐酸四甲基对苯二胺或10g/L 盐酸二甲基对苯二胺溶液为无色溶液，在空气中易被氧化而失效，故应经常更换新试剂，并盛于棕色瓶中，若试剂已变成深蓝色，应弃去不用。

2．触酶试验

【原理】

触酶又称过氧化氢酶，具有过氧化氢酶的细菌，能催化过氧化氢成为水和原子态氧，继而形成氧分子，出现气泡。

【方法】

取洁净玻片1 张，用接种环挑取细菌，加3 %过氧化氢溶液1 滴，立即观察结果。

【结果判断】

若立即出现大量气泡为阳性；无气泡为阴性。

【应用】

大多需氧和兼性厌氧菌均产生过氧化氢酶，但链球菌科除外，故常用此试验来鉴定。此外，金氏杆菌属的细菌也为阴性。分枝杆菌的鉴别则用耐热触酶试验，结核分枝杆菌为阴性，戈氏分枝杆菌和地分枝杆菌则为阳性。

【注意事项】

1）3 %过氧化氢溶液要新鲜配制。

2）不宜用血琼脂平板上生长的菌落，因红细胞含有触酶。

3）取对数生长期的细菌。

3．凝固酶试验

【原理】

凝固酶试验是鉴定葡萄球菌致病性的重要试验。致病性葡萄球菌可产生两种凝固酶，一种是与细胞壁结合的凝聚因子，称结合凝固酶，它直接作用于血浆中纤维蛋白原，使发生沉淀，包围于细菌外面而凝聚成块，玻片法阳性结果是由此凝聚因子所致；另一种凝固酶是分泌至菌体外，称为游离凝固酶，它能使凝血酶原变成凝血酶类产物，使纤维蛋白原变为纤维蛋白，从而使血浆凝固。试管法可同时测定结合型和游离型凝固酶。

【方法】

1）玻片法：在1 张洁净玻片中央加1 滴9g/L 氯化钠溶液，用接种环取待检培养物与其混合（设阳性和阴性对照）制成菌悬液，若经10～20s 内无自凝现象发生，则加入人或兔新鲜血浆1 环，与菌悬液混合，观察结果。

2）试管法：于试管内加1∶4 稀释的兔或人血浆0.5ml，再加1～2 个待试菌菌落，置37℃水浴，每30min 观察1 次结果。

【结果判断】

1）玻片法：5～10s 内出现凝集者为阳性。

2）试管法：如有凝块或整管凝集出现为阳性。2h 后无上述现象出现，则放置过夜后再观察。

【应用】

本试验仅用于致病性葡萄球菌的鉴定。

【注意事项】

1）玻片法为筛选试验，阳性、阴性均需进行试管法测定。

2）血浆必须新鲜。

3）应使用肝素而非枸橼酸盐作抗凝剂抗凝的血浆。

4）本试验也可用市购的胶乳凝集试验试剂盒测定。

4.DNA 酶试验

【原理】

某些细菌能产生DNA 酶，水解外源性DNA 使之成为寡核苷酸。DNA 可被酸沉淀，而寡核苷酸则不会。故在DNA 琼脂平板上加盐酸后，可在菌落周围形成透明区。

【方法】

在DNA 琼脂平板上点种待检菌，35℃孵育18～24h，用1mol/L 盐酸倾注平板，观察结果。

【结果判断】

如菌落周围有透明区者为阳性，无透明区者为阴性。

【应用】

主要用于肠杆菌科及葡萄球菌属某些菌种的鉴定。沙雷菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌均阳性。

5．胆汁溶菌试验

【原理】

胆汁或去氧胆酸钠能导致某些细菌溶解，一方面是由于胆汁或去氧胆酸钠降低了细

菌细胞膜上的表面张力，使细菌的细胞膜破损或使菌体裂解。另一方面可能与激活细菌体内的自溶酶有关。

【方法】

1）试管法：用纯培养物制备1ml9g/L 氯化钠溶液浓菌悬液，PH 调至7.0，分装两支试管，各0.5ml。其中一管加0.5ml100g/L 去氧胆酸钠为试验管，另一管加0.5ml9g/L 氯化钠溶液作对照。35℃孵育每小时记录1 次观察结果。

2）平板法：在血平板上选取单个可疑菌落，作好标记，直接在菌落上加1 接种环20g/L 去氧胆酸钠（pH7.0），置35℃孵育30min（平板不要翻转）观察结果。

【结果判断】

1）试管法：在3h 内液体透明为阳性。

2）平板法：如菌落消失，仅留下溶血区为阳性，菌落不消失为阴性。

【应用】

用于肺炎链球菌的鉴定。

6．硝酸盐还原试验

【原理】

硝酸盐还原反应包括两个过程，其一是在合成代谢过程中，硝酸盐还原为亚硝酸盐和氨，再由氨转化为氨基酸和细胞内其他含氮化合物；另一是在分解代谢过程中，硝酸盐或亚硝酸盐代替氧作为呼吸酶系统中的终末受氢体。硝酸盐还原过程可因细菌不同而异。有的细菌仅使硝酸盐还原为亚硝酸盐，如大肠埃希菌等；有的细菌可使其还原为亚硝酸盐和离子态的铵；有的细菌能使硝酸盐或亚硝酸盐还原为氮，如沙雷菌属；有的细菌还可以将其还原产物在合成性代谢中完全利用。硝酸盐或亚硝酸盐如果还原生成气体的终末产物如氮或氧化氮，则称为脱硝化或脱氮化作用。某些细菌能还原硝酸盐为亚硝酸盐，亚硝酸盐与醋酸作用，生成亚硝酸，亚硝酸与试剂中的对氨基苯磺酸作用生成重氮基苯磺酸，后者与α－萘胺结合生成N －α萘胺偶氮苯磺酸。

【方法】

将待检菌接种于硝酸盐培养基（内含小倒管）中，35℃孵育1～4d。将甲、乙等量混合液（用时混合）0.1ml 加于试管内，立即或10min 内观察结果。

【结果判断】

出现红色为阳性反应。如欲观察有无氮气产生，可于培养基管内加1 只小倒管，有气泡产生，则表示有氮气生成。如欲检查培养基中硝酸盐是否被分解，可取锌粉少许加入培养基内，如出现红色表明硝酸盐仍存在；若不出现红色，表示硝酸盐已被分解。

【应用】

本试验广泛用于细菌鉴定。肠杆菌科细菌均能还原硝酸盐为亚硝酸盐；假单胞菌属中有的细菌能产生氮气，如铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌、斯氏假单胞菌，有的则能还原硝酸盐为亚硝酸盐，如鼻疽假单胞菌等；厌氧菌如韦荣菌也能还原硝酸盐为亚硝酸盐。

7．卵磷脂酶试验

【原理】

细菌产生的卵磷脂酶，经钙离子作用，能迅速分解卵黄或血清中的卵磷脂形成混浊沉淀状的甘油酯和水溶性磷酸胆碱。

【方法】

取待检菌划线接种或点种在卵黄琼脂平板上，置35 ℃孵育3 ～6h ，观察结果。

【结果判断】

3h 后在菌落周围形成乳白色混浊，即为卵磷脂酶试验阳性。6h 后该混浊圈可扩大到直径5 ～61ｍｍ 。

【应用】

该试验主要用于厌氧菌的鉴定。产气荚膜梭菌和诺维梭菌为阳性，其他梭菌为阴性。蜡样芽胞杆菌亦为阳性。

8．磷酸酶试验

【原理】

磷酸酶是磷酸脂的水解酶，可使单磷脂水解，其反应可根据反应基质不同而异，如用磷酸酚酞为基质，经磷酸酶水解后可释放酚酞，在碱性环境中呈红色。

【方法】

取待检菌接种于磷酸酚酞琼脂平板上，置35 ℃孵育18 ～24h ，于平皿盖内加1 滴浓氨水，熏蒸片刻，观察结果。亦可接种于液体培养基中，经孵育后，向管内加400g/L 氢氧化钠溶液1 滴，观察结果。

【结果判断】

菌落变为红色者为阳性。

【应用】

主要用于致病性葡萄球菌与非致病性葡萄球菌的鉴别，前者为阳性，后者为阴性。

9．脂酶试验

【原理】

细菌产生的脂酶可分解脂肪为游离脂肪酸。在培养基中加入维多利亚蓝，后者可与脂肪结合成为无色化合物，如果脂肪被分解，则维多利亚蓝释出，培养基呈蓝色。

【方法】

将待检菌接种于含维多利亚蓝的脂酶培养基中，置35 ℃孵育24h ，观察结果。

【结果判断】

培养基变为深蓝色者为阳性，否则可呈无色或粉红色。

【应用】

主要用于厌氧菌鉴定。在拟杆菌中产黑色素拟杆菌中间亚种阳性，其他拟杆菌阴性；在梭菌属中诺维梭菌和产芽胞梭菌也产生此酶，其他梭菌为阴性。

10.CAMP 试验

【原理】

B 群链球菌 (无乳链球菌) 产生一种“CAMP”因子，此种物质能促进葡萄球菌的β－溶血素活性，导致两种细菌的交界处溶血增强，出现箭头型透明溶血区。

【方法】

在羊血或马血琼脂平板上，先以β－溶血的金黄色葡萄球菌划一横线接种，再将待检菌与前一划线作垂直接种，两者相距1cm ，于35 ℃孵育18 ～24h ，观察结果。每次试验应做阴性和阳性对照。

【结果判断】

两种细菌划线交接处出现箭头型溶血区为阳性。

【应用】

主要用于B 群链球菌的鉴定，其他链球菌均为阴性。

11．石蕊牛乳试验

【原理】

由于牛乳内含有丰富的蛋白质和糖类，各种细菌对这些物质的分解能力不同，故可有数种不同反应，用以鉴别细菌。

【方法】

将待检菌接种于石蕊牛乳培养基中，若为芽胞梭菌，要在培养基中加入无菌铁末，置35 ℃孵育18 ～24h ，必要时可延长至14d 。观察结果。

【结果判断】

1) 产酸：发酵乳糖产酸，指示剂变为粉红色。

2) 产气：发酵乳糖而同时产气，可冲开上面的凡士林。

3) 凝固：因产酸太多而使牛乳中的酪蛋白凝固。

4) 胨化：将凝固的酪蛋白继续水解为胨，培养基上层液体变清，底部可留有未被完全胨化的酪蛋白。

5）产碱：乳糖未发酵，因分解含氮物质，生成胺及氨，培养基变碱，指示剂变为蓝色。

【应用】

主要用于梭菌、链球菌和丙酸杆菌的鉴定。

五、抑菌试验

1.ptochin 敏感试验

【原理】

Optochin 奥普托欣）是盐酸乙基氢化羟基奎宁的商品名。对肺炎链球菌有特异抑制作用，其作用机制可能是干扰叶酸生物合成作用，而对其他链球菌则无此作用。

【方法】

用棉拭子将待检菌的肉汤培养物均匀涂布于血琼脂平板上，贴上一张含5ug 奥普托欣纸片，置烛缸或二氧化碳孵箱，35 ℃孵育18 ～24h ，观察结果。

【结果判断】

抑菌圈直径大于14ｍｍ 为敏感，小于或等于14ｍｍ 为阴性。

【应用】

主要用于肺炎链球菌（敏感）与其他链球菌（耐药）的鉴别。

2．杆菌肽敏感试验

【原理】

A 群链球菌对杆菌肽几乎是100 %敏感，而其他群链球菌对杆菌肽通常耐药。故此试验可。对链球菌进行鉴别。

【方法】

用棉拭子将待检菌的肉汤培养物均匀涂布于血琼脂平板上，稍干后贴一张含0.04U 的杆菌肽纸片，置35 ℃孵育18 ～24h ，观察结果。

【结果判断】

抑菌圈直径大于10ｍｍ 为敏感，小于10ｍｍ 为耐药。

【应用】

主要用于A 群与非A 群链球菌的鉴别。从临床分离的菌株中有5 %～15 %非A 群链球菌（如6 %的B 群链球菌、7.5 %的C 群链球菌和G 群链球菌等）也对杆菌肽敏感。

3．新生霉素敏感试验

【原理】

金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌可被低浓度新生霉素所抑制，表现为敏感，而腐生

葡萄球菌则表现为耐药。

【方法】

用棉拭子将待检菌菌悬液均匀涂布于M－H琼脂平板或血琼脂平板上，在平板中央贴含5ug／片新生霉素诊断纸片1张，置35℃孵育16～8h，观察结果。

【结果判断】

抑菌圈直径大于16mm为敏感，小于或等于16mm为耐药。

【应用】

主要用于葡萄球菌某些种的鉴定。

4.O／129试验

【原理】

2，4二氨基—6，7－二异丙基喋啶（O／129）能抑制弧菌属、发光杆菌属和邻单胞菌属细菌生长，而气单胞菌属和假单胞菌属细菌则耐药。

【方法】

用棉拭子将待检菌菌悬液均匀涂布于碱性琼脂平板上，将10ug／片及150ug／片的O／129诊断纸片贴于平板上，置35℃孵育18～24h，观察结果。

【结果判断】

出现抑菌圈者表示敏感，无抑菌圈者为耐药。

【应用】

主要用于弧菌属、邻单胞菌属与气单胞菌属的鉴别，弧菌属和邻单胞菌属菌为敏感，气单胞菌属菌为耐药。其他菌属有发光杆菌属为敏感，假单胞菌属为耐药。

5．氰化钾试验

【原理】

氰化钾可抑制某些细菌的呼吸酶系统。细胞色素、细胞色素氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶均以铁卟啉作为辅基，氰化钾与铁卟啉结合，使这些酶失去活性，细菌生长受到抑制。

【方法】

将待检菌接种于氰化钾培养基中，同时接种不含氰化钾的对照培养基，置35℃孵育24～48h，观察结果。

【结果判断】

细菌在氰化钾培养基中生长（不受抑制）为阳性，不生长（受抑制）为阴性。

【应用】

肠杆菌科中的沙门菌属、志贺菌属和埃希菌属细菌的生长受到抑制，而其他各菌属

的细菌均可生长。

六、其他试验

1．克氏双糖铁或三糖铁琼脂培养基试验

【原理】

克氏双糖铁（KIA）或三糖铁琼脂（TSI）培养基制成高层和短的斜面，其中葡萄糖含量仅为乳糖或蔗糖的十分之一，若细菌只分解葡萄糖而不分解乳糖和蔗糖，分解葡萄糖产酸使pH 值降低，因此斜面和底层均先呈黄色，但因葡萄糖量较少，所生成的少量酸可因接触空气而氧化，并因细菌生长繁殖利用含氮物质生成碱性化合物，使斜面部分又变成红色；底层由于处于缺氧状态，细菌分解葡萄糖所生成的酸类一时不被氧化而仍保持黄色。细菌分解葡萄糖、乳糖或蔗糖产酸产气，使斜面与底层均呈黄色，且有气泡。细菌产生硫化氢时与培养基中的硫酸亚铁作用，形成黑色的硫化铁。

【方法】

用接种针挑取待检菌的菌落，先穿刺接种到KIA 或TSI 深层，距管底3～5mm 为止，再从原路退回，在斜面上自下而上划线，置35℃孵育18～24h，观察结果。

【结果判断】

常见的KIA 反应有如下几种：

（1）斜面碱性/底层碱性：不发酵碳水化合物，是不发酵菌的特征，如铜绿假单胞菌。

（2）斜面碱性/底层酸性：葡萄糖发酵、乳糖（和TSI 中的蔗糖）不发酵，是不发酵乳糖菌的特征，如志贺菌。

（3）斜面碱性/底层酸性（黑色）：葡萄糖发酵、乳糖不发酵并产生硫化氢，是产生硫化氢不发酵乳糖菌的特征，如沙门菌、亚利桑那菌、枸橼酸杆菌和变形杆菌等。

（4）斜面酸性/底层酸性：葡萄糖和乳糖（和TSI 中的蔗糖）发酵，是发酵乳糖的大肠菌群的特征，如大肠埃希菌、克雷伯菌属和肠杆菌属。

【应用】

鉴别肠道杆菌用。KIA 或TSI 对初步分离出的、可疑为革兰阴性杆菌鉴定特别有用。其反应模式是许多杆菌鉴定表的组成部分，也可作为观察其他培养基反应的有价值的质控依据。

2．氢氧化钾拉丝试验

【原理】

革兰阴性细菌的细胞壁在稀碱溶液中易于破裂，释放出未断裂的DNA 螺旋，使氢

氧化钾菌悬液呈现粘性，可用接种环搅拌后拉出粘丝来，而革兰阳性细菌在稀碱溶液中没有上述变化。

【方法】

取1 滴40g/L 氢氧化钾溶液（应新鲜配制）于洁净玻片上，取新鲜菌落少许，与氢氧化钾水溶液搅拌混匀，并每隔几秒钟上提接种环，观察能否拉出粘丝。

【结果判断】

用接种环拉出粘丝者为阳性，仍为混悬液者为阴性。

【应用】

主要用于革兰阴性菌与易脱色的革兰阳性菌的鉴别。大多数革兰阴性菌于5～10s内（有的则需30～5s）出现阳性反应，假单胞菌、无色杆菌、黄杆菌、产碱杆菌、莫拉菌等大多数在10s 内呈阳性，不动杆菌、莫拉菌反应较慢，大多数菌株在60s 内出现阳性，而革兰阳性菌在60s 以后仍为阴性。

第四节　血清学试验

血清学试验是根据抗原与相应的抗体在适宜的条件下，能在体外发生特异性结合的原理，用已知抗体或抗原来检测未知抗原或抗体。因抗体主要存在于血清中，抗原或抗体检测时一般都要采用血清，故体外的抗原抗体反应亦称为血清学试验或血清学反应。血清学试验包括血清学鉴定和血清学诊断。血清学鉴定即用含已知特异性抗体的免疫血清（诊断血清）去检测患者标本中或培养物中的未知细菌或细菌抗原，以确定病原菌的种或型。血清学诊断是指用已知抗原检测患者血清中的相应抗体，以诊断感染性疾病的方法。血清学试验是临床微生物学检验的重要方法之一。血清学试验基本类型包括凝集反应、沉淀反应和补体结合反应等。

一、凝集反应

颗粒性抗原（细菌、红细胞与乳胶等）与相应抗体可发生特异性结合，在一定条件下（电解质、PH 值、温度与抗原抗体比例适合等）出现肉眼可见的凝集小块，称为凝集反应。参与反应的抗原称为凝集原，抗体称为凝集素。凝集反应可分为直接凝集反应和间接凝集反应两大类。

㈠ 直接凝集反应

直接凝集反应指颗粒性抗原与相应抗体直接结合出现的凝集现象。

1．玻片凝集试验

这是一种定性试验。用已知抗体（诊断血清）测未知抗原，适用于细菌的鉴定或分群（型）等。方法是取已知抗体（诊断血清）滴加在载玻片上，直接从培养基上刮取待检菌混匀于诊断血清中，数分钟后，如出现细菌凝集成块或肉眼可见的颗粒，即为阳性反应。自临床初分离的细菌中，有些细菌表面含有某种表面抗原（如伤寒沙门菌的Vi抗原和志贺菌属的K抗原等），这些抗原能阻止菌体抗原（O抗原）与相应抗体发生凝集反应，从而导致错误的判定。此时应将菌悬液于100℃中隔水煮沸（Vi抗原100℃ 30min、K抗原00℃1h），待细菌表面抗原破坏后，再进行试验。

玻片凝集试验简便、快速、特异性强，常用于沙门菌、志贺菌、致病性大肠埃希菌、霍乱弧菌、布氏杆菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌及链球菌等的鉴定。

2．试管凝集试验

这是半定量试验。用等量抗原（细菌）悬液与一系列递倍稀释的抗血清混合，37℃保温4h后放室温或4℃冰箱过夜，观察结果。根据每管内抗原的凝集程度判定血清中抗体的相对含量。以血清最高稀释度仍有明显凝集现象者为该血清中抗体的凝集效价，表示血清中抗体的相对含量。

本法常用于测定免疫血清的效价、抗原的凝集性能；在临床上主要用于检测受试者血清中有无某种特异性抗体及其相对含量。如诊断伤寒、副伤寒的肥达反应、诊断布氏杆菌病的瑞特反应等。

（二）间接凝集反应

是将可溶性抗原或抗体吸附于某种与免疫无关、一定大小的颗粒载体表面，制成致敏载体，再与相应抗体或抗原作用，在电解质存在的适宜条件下，被动地使致敏载体凝集，称为间接（或被动）凝集反应。

可用红细胞、聚苯乙烯乳胶、活性炭等颗粒作载体，分别称间接血凝、间接乳凝、间接炭凝试验。由于载体颗粒增大了可溶性抗原的反应面积，当颗粒上的抗原与少量抗体结合后，就能出现肉眼可见的反应，故可提高反应的敏感性。常用间接凝集反应来测定待检血清中细菌、病毒、螺旋体、寄生虫等抗原及自身抗体。间接凝集反应又可分为4种。

1．正向间接凝集试验

即将已知可溶性抗原吸附于载体颗粒上，然后与相应抗体结合产生颗粒凝集现象，用以检测未知抗体。

2．反向间接凝集试验

反向间接凝集试验是将已知抗体吸附于载体颗粒表面，以检测相应可溶性抗原的凝集反应。适用于可溶性和颗粒性抗原的检出，如检测乙型肝炎表面抗原及甲胎蛋白，协助诊断乙型肝炎和原发性肝癌；从食品中检出肉毒毒素和葡萄球菌肠毒素等。

3．间接凝集抑制试验

间接凝集抑制试验是将已知抗体或可溶性抗原先与被测的抗原或抗体混合，然后加入有关抗原或抗体致敏的载体颗粒，如已知抗体或可溶性抗原与被测的抗原或抗体相结合，则不出现颗粒凝集现象。故也可称为正向间接凝集抑制试验或反向间接凝集抑制试验。

4．协同凝集试验

协同凝集反应属于间接凝集反应的一种类型。它所用的载体是含葡萄球菌A 蛋白（SPA） 金黄色葡萄球菌。SPA 能与人及多种哺乳动物血清中IgG 类抗体的Fc 段结合，IgG 的Fc 段与SPA 结合后，IgG 的两个Fab 段暴露于葡萄球菌菌体的表面，并仍保持正常的抗体活性，当结合于葡萄球菌表面的已知抗体与相应细菌、病毒或毒素抗原接触时，则出现肉眼可见的凝集现象。本法简便、快速、敏感性高，易于观察结果，已广泛用于细菌的快速鉴定和分群（型），如脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、乙型溶血性链球菌、布鲁氏菌、沙门菌及志贺菌等细菌。

二、沉淀反应

可溶性抗原（如细菌的培养滤液、含细菌的患者血清、脑脊液及组织浸出液等）与相应抗体相混合，在比例适合和适量电解质存在等条件下，形成肉眼可见的沉淀物，称沉淀反应。利用沉淀反应进行血清学试验的方法称为沉淀试验。分环状沉淀、絮状沉淀和琼脂扩散3 种基本类型。

1．环状沉淀试验

将已知的抗血清加于内径1～3mm、长75mm 的玻璃细管中约1/3 高度，然后沿管壁徐徐加入已适当稀释的待测抗原溶液，使之成为分界清晰的两层，置室温或35℃下5～30min。如果在两液面交界处形成肉眼可见的白色环状沉淀物为阳性反应。本试验主要用于鉴定微量抗原，如链球菌、肺炎链球菌、鼠疫耶尔森菌的鉴定及炭疽的诊断（Ascoli 试验）。

2．絮状沉淀试验

可溶性抗原与抗体在试管内以适当比例混合后，可在电解质存在的条件下，出现絮状沉淀物。絮状沉淀试验有2 种方法：一种是将恒定量的抗体分别与一系列稀释的抗原

溶液在试管内混合，另一种是将恒定量的抗原分别与一系列稀释的抗血清在试管内混合，随后观察各管沉淀物出现的时间和量。通常在抗原与抗体比例最适管，出现沉淀物最快，量最多。本试验常用于毒素、类毒素、抗毒素的定量测定，还用于已知抗原测血清中的相应抗体，如肥达试验用于诊断伤寒、副伤寒等。

3．琼脂扩散试验

用琼脂制成固体的凝胶，使抗原和抗体在凝胶中扩散，若两者比例适当，则在相遇处形成肉眼可见的沉淀物（线或环），是为阳性反应。常用的试验方法有：

1）单向琼脂扩散试验：将抗体预先在琼脂中混匀，制成凝胶板，凝固后在琼脂上打孔，孔中加入待试抗原，经一定时间扩散后，若抗原与抗体对应，则在孔周围比例适当处形成白色沉淀环。由于沉淀环大小与直径孔中抗原浓度成正比关系，故可事先用不同浓度的标准抗原制成标准曲线，来测定未知标本中抗原含量。本法是一种定量试验，主要用于检测标本中各种免疫球蛋白和血清中各种补体成分的含量。

2）双向琼脂扩散试验：先制备琼脂凝胶板，待凝固后，根据需要在其上面打孔，孔间保持一定距离，然后将抗原和抗体分别注入小孔中，使两者相互扩散。如抗原与抗体相对应，浓度比例适当，经一定时间扩散后，在抗原抗体孔之间出现清晰的白色沉淀线。一对相应的抗原抗体只能形成一条线。因此，根据沉淀线的数目即可推测抗原液中有多少种抗原成分，根据沉淀线融合与否及交叉关系，还可鉴定两种抗原是完全相同还是部分相同。本法可用于检测未知抗原或抗体、分析和鉴定抗原成分、检测抗体或抗原的纯度、滴定抗血清的效价等。缺点是需时长，敏感性差。

3）对流免疫电泳：是一种将双向扩散和电泳技术相结合的方法。试验时按双向扩散法在琼脂板上打孔，抗原加于阴极侧的孔中，抗体加于阳极侧的孔中，然后通电，在电场与电渗作用下抗原与抗体向相对方向移动，两者相遇后即可出现沉淀线。

4）免疫电泳：是将琼脂电泳与双向琼脂扩散相结合的方法。先将抗原在琼脂平板上进行电泳，使其中各成分因电泳迁移率不同而分离区带。而后沿电泳方向挖一与之平行的槽，加入特异性抗体作双向琼脂扩散。各区带中抗原分别在不同位置与抗体相遇生成弧状沉淀线。可据沉淀弧的数量、位置和形状，与已知标准抗原比对，分析样品中的成分及其性质。免疫电泳主要用于血清蛋白的组分分析，亦用于抗原和抗体提纯物的纯度鉴定。

三、补体结合反应

这是一种在补体参与下，以绵羊红细胞和溶血素为指示系统的抗原抗体反应。在试验时，先将定量补体（使用新鲜的豚鼠血清）加入待检系统中，使抗原抗体优先结合补体。如果待检系统中抗原与抗体相对应，加入的补体可被抗原抗体复合物所结合而固

定，不再与以后加入的溶血系统起反应，不出现溶血现象，为补体结合反应阳性。如待检系统中的抗原抗体不相对应，则游离的补体与后面加入的溶血系统反应，从而出现溶血，为补体结合反应阴性。如果待检系统中抗原抗体比例不适当时，仍有部分补体游离，则此剩余的游离补体可作用于溶血系统产生不同程度的溶血现象，据此可判断阳性反应的强弱，推知抗原或抗体的效价。本反应可用已知抗原测定未知抗体，也可用已知抗体测未知抗原；但多用于检测感染某些病毒、立克次体和螺旋体患者血清中的抗体，亦用于某些病毒分型试验。

四、荚膜肿胀试验

【原理】

特异性抗血清与相应细菌的荚膜抗原特异性结合形成复合物时，可使细菌荚膜显著增大出现肿胀。

【方法】

取洁净载玻片1 张，两侧各加待检菌1 ～2 接种环，于一侧加抗血清，另一侧加正常兔血清各1 ～2 接种环，混匀；再于两侧各加1％亚甲蓝 (美蓝) 溶液1 接种环，混匀，分别加盖玻片，置湿盒中室温放置5 ～10 min 后镜检。

【结果判断】

若试验侧在蓝色细菌周围可见厚薄不等、边界清晰的无色环状物而对照侧无此现象，为荚膜肿胀试验阳性；试验侧与对照侧均不产生无色环状物则为荚膜肿胀试验阴性。

【应用】

常用于肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和炭疽芽胞梭菌等检测。

五、制动试验

【原理】

特异性抗鞭毛血清与相应运动活泼的细菌悬液混合，则抗鞭毛抗体与鞭毛抗原结合，使鞭毛强直、相互粘着而失去动力，细菌运动停止。

【方法】

将待检标本或增菌培养液1 滴置于洁净玻片上，用显微镜观察细菌运动情况。再于待检标本上加1 滴滴适当稀释的特异的抗鞭毛血清，混匀，作悬滴镜检。

【结果判断】

若滴加抗血清后3 ～5 min 内，细菌运动停止，菌体凝集成块为制动试验阳性；反之，滴加抗血清后，细菌运动无改变为制动试验阴性。

【应用】

主要用于霍乱弧菌的快速鉴定。

第五节　分子生物学技术在微生物学检验中的应用

分子生物学技术的迅速发展，拓展了微生物学检验方面的应用空间。该技术具有敏感、特异、安全和快速等特点，在微生物学检验中发挥着日益重要的作用。本节简要介绍分子生物学技术在微生物学检验中的应用概况，具体检测方法参见有关专著或试剂盒说明书。

一、在细菌分类中的应用

细菌的传统分类法和数值分类法以表型特征相似性为基础，而单纯表型相似性还不能准确地确定系统发育关系。随着分子生物学及遗传学的发展，细菌分类学中发展了一系列核酸分析方法，包括DNA 分子中G +C 百分含量测定、DNA －NA 杂交、16S rRNA 同源性分析等。

1.DNA 分子中G +C 百分含量的测定

细菌DNAG +C 或A +T 摩尔百分比能反映细菌间DNA 分子同源程度，不同种属间（G +C）mol5 范围在255 ～75 %之间，但同一种细菌（G +C）mol %相当稳定，不受菌龄、培养条件和其他外界因素影响。亲缘关系越近的细菌，（G +C）mol %越相近，亲缘关系较远的细菌（G +C）mol %也不同，但（G +C）mol %相同或近似其亲缘关系不一定相近。最常用的测定方法是热变性温度法，其次是高效液相色谱法和浮力密度法。

2.DNA －NA 杂交

DNA 杂交可得出DNA 之间核苷酸顺序的互补程度，从而推断不同细菌基因组间的同源性。目前最常用的是复性速率法，变性DNA 在溶液中复性（杂交）时，同源DNA 的复性速率比异源DNA 要快。同源性愈高，复性速率愈快。复性的过程也伴随着260nm 紫外线吸收的减少，再通过分光光度计直接测定变性DNA 在一定条件下的复性速率，最后用理论推导的公式来计算DNA 之间的同源性。同一菌的复性率为100 %，80 %～90 %同源为同一种内同一亚种的细菌，60 %～70 %同源为同一种内不同亚种的细菌，20 %～60 %同源则是同一属中的不同菌种。这种方法还可对新菌种或表型性状差别很小而难以肯定的菌株做出较可靠的判定，并可修正其他方法的分类和鉴定错误。

3.16S rRNA 同源性分析

（1）rRNA －DNA 杂交：变性rRNA 与变性DNA 混合时，RNA 与其互补的DNA 链形

成杂交双链，RNA 分子与异源DNA 杂交时，也能在其同源区形成互补双链，这种杂交双链的稳定性与其同源性成正相关，适于细菌属及属上水平的分类研究。现最常用的是硝酸纤维膜结合法。

（2）16S rRNA 序列测定：RNA 分子具有高度保守性，在所有的细胞生物中都存在，在长期的进化中，16S rRNA 的总碱基数有所不同，保守的部分使不同序列很容易相互对齐进行比较。当前的细菌分类要求测定16S rRNA 基因的全序列来进行比较。16S rRNA 基因序列分析技术是建立系统分类的主要技术，建议将DNA 相关性≥70％、16S rRNA 序列差异≤1.0％～1.5％的细菌归属于同一种，这使细菌的种有一个稳定和统一的标准。

二、在细菌鉴定中的应用

以往，细菌的鉴定主要依靠细菌的表型特征。因其耗时长，往往耽误了对疾病的诊断与治疗。分子生物学技术的发展及其在临床微生物学检验中的应用，为微生物学实验室对细菌的快速鉴定，尤其是对难分离细菌的快速鉴定，提供了有利条件。目前在细菌鉴定中应用的分子生物学技术主要有核酸探针和核酸扩增技术等。

1．核酸探针技术

应用核酸探针技术检测病原微生物核酸是临床诊断学的重大发展，其原理是用带有酶、化学荧光物、放射性核素或生物素标记的已知序列特定DNA 片段（称为探针），在一定条件下，按碱基互补原则与待测标本中的核酸杂交，通过对杂交信号的检测，从而鉴定标本中有无相应的病原微生物基因及其分子大小。常用核酸探针技术有固相杂交（斑点杂交、原位杂交、Southern 印迹、Northern 印迹等）和液相杂交技术。

核酸探针适用于直接检出临床标本中的病原微生物，不受非病原微生物的影响，因此对某些尚不能分离培养或很难分离培养的微生物的检测具有重要意义。随着探针标记的不断改进，检测试剂盒商品化，操作更简便易行。

2．核酸扩增技术

核酸扩增（又称基因或DNA 扩增）技术是体外酶促合成DNA 片段的新方法，其原理类似于DNA 的体内半保留复制。主要由高温变性、低温退火和适温延伸3 个步骤反复的热循环构成。即在高温下（95℃）下，待扩增的靶DNA 双链受热变性成为两条单链DNA 模板；而后在低温（37～55℃）情况下，两条人工合成的寡核苷酸引物与互补的单链DNA 模板结合，形成部分双链；在Taq 酶的最适温度（72℃）下，以引物的3′端为合成的起点，以单核苷酸为原料，沿模板从5′→3′方向延伸，合成DNA 新链。这样每一双链DNA 模板，经过一次解链、退火、延伸3 个步骤的热循环后就成了两条双链DNA 分子。如此反复进行，每一次循环所产生的DNA 均能成为下一次循环的模板，

每一次循环都使人工合成的引物间的DNA 特异区段拷贝数扩增1 倍。经过上述25 ～40 个循环后，靶序列可以扩增成10^6～10^8 拷贝数。

核酸扩增（或称聚合酶链反应，PCR）技术具有高敏感性、高特异性、简便、快速等特点，临床实验室常用PCR 技术来检测标本中某些微生物，尤其是对难以培养微生物的检测。其他用于检测微生物的PCR 技术还有：RT －PCR、巢式PCR、多重PCR 和随机引物PCR 等。核酸扩增技术在临床微生物学检验中的应用见表6 －4 －1。

三、在细菌药敏试验中的应用

分子生物学技术在检测耐药基因方面日益受到重视。临床上可通过PCR 方法检测耐药基因，以判断待检菌对某种抗菌药物是否具有耐药性。但某些沉默耐药基因，如不表达相应产物，则可能不表现耐药表型。现在已有检测耐药基因的DNA 探针和PCR 商品化试剂盒供应，但多用于实验研究，常规工作中开展较少。目前能检测的耐药基因有：

1）β－内酰胺类：mecA、blaTEM、blaROB －1、blasHV、blaIMP、blaMIR －1、blaOXA、blaPER －1、blaPER －、blaOXY －1、blaOXA －10／11。

表6 －4 －1　核酸扩增技术在临床微生物学检验中的应用

微生物种类	核酸扩增技术	应　用
金黄色葡萄球菌	多重PCR	对mecA 基因检测
凝固酶阴性葡萄球菌	多重PCR	对mecA 基因检测
肺炎链球菌	PCR	自溶酶和青霉素结合酶的检测
化脓性链球菌	PCR	M 蛋白基因的菌株分型
淋病奈瑟菌	LCR	尿道分泌物标本直接检测
百日咳杆菌	PCR、巢式PCR	临床标本检测
结核分枝杆菌	PCR、SDA、Qbeta	肺结核的诊断、呼吸道标本检测、临床标本直接检测
鸟分枝杆菌复合群	PCR	鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌的区别
白喉棒状杆菌	PCR	产毒菌株的检测
肠致病性大肠埃希菌	多重PCR	产毒菌株检测
伤寒、副伤寒沙门菌	PCR	耐药质粒分型和检测
幽门螺杆菌	多重PCR	胃活检组织细菌检测

续表

微生物种类	核酸扩增技术	应　　用
小肠结肠炎耶尔森菌	PCR	菌株分型
弯曲菌属	PCR	通过16s rRNA 鉴定
杜克雷嗜血杆菌	多重PCR	生殖道溃疡患者的直接检测
嗜肺军团菌	PCR	与爆发相关菌株的分型
金氏杆菌属	PCR	临床标本鉴定
念珠菌属	PCR	通过“DNA”指纹鉴定
梅毒螺旋体	多重PCR	生殖道溃疡标本直接检测
伯氏螺旋体	巢式PCR	治疗前、中、后检测
问号状钩端螺旋体	PCR	钩端螺旋体血清型的鉴定
CDC group IV群	PCR	分型
沙眼衣原体	PCR	无症状患者的诊断

(2) 氨基糖苷类：aph (3') －III、aph (3') －VI、ant (2'') Ia、ant (4') －Ia、aac (3) －Ia、acc (6') －Ia、aac

(3) －Va、aac (6') －aph (2'')、ant (4')、ant (6') －Ia、aac (6') －Ic、aac (3) －Ib、aad (2'') －Ia、ant (6) －I、aPh (2'') －Ic。

(3) 氯霉素：catP、catQ、catD、catI。

(4) 大环内酯类：ereA、ereB、ermA、ermAM、ermC、ermF、smp、mphA、mefA、vat。

(5) 磺胺类：SUl I、sal II、SUlA。

(6) 四环素：tet (A)、tet (C)、tet (O)、tet (K)、tet (L)、tet (M)、tet (O)、tet (P)、tet (S)、tet (Q)、tet (U)、tetA (P)。

(7) 甲氧苄啶：dhfr I、dhfr II、dhfr III、dhfrV、dhfr VII、dhfr IX、dhfr X、dfrA、folH、dhfr VIII。

(8) 糖肽类：vanA、vanB、vailB2，vanCl、vanC3、vanD。

(9) 喹诺酮类：gyrA、gyrB、parE。

(10) 乙胺丁醇：embB。

(11) 吡嗪酰胺：pncA。

（2）利福平：rpoB。

（3）链霉素：rpsL、rrS。

（4）异烟肼：katG、inhA、ahpC。

第六节　自动化技术在微生物学检验中的应用

微生物鉴定的自动化技术近十几年得到了快速发展。数码分类技术集数学、计算机、信息及自动化分析为一体，采用商品化和标准化的配套鉴定和抗菌药物敏感试验卡或条板，可快速准确地对临床数百种常见分离菌进行自动分析鉴定和药敏试验。目前自动化微生物鉴定和药敏分析系统已在世界范围内临床实验室中广泛应用。本节简要介绍有关应用情况。

一、微生物数码鉴定法

早在90 年代中期，一些国外公司就研究出借助生物信息编码鉴定细菌的新方法。这些技术的应用，为医学微生物学检验工作提供了一个简便、科学的细菌鉴定程序，大大提高了细菌鉴定的准确性。目前，微生物编码鉴定技术已经得到普遍应用，并早已商品化和形成独特的不同细菌鉴定系统。如API、Micro －ID、RapID、Enterotube 和Minitek 等系统。这种鉴定系统是自动化鉴定系统的基础。

（一）数码鉴定法基本原理

数码鉴定是指通过数学的编码技术将细菌的生化反应模式转换成数学模式，给每种细菌的反应模式赋予一组数码，建立数据库或编成检索本。通过对未知菌进行有关生化试验并将生化反应结果转换成数字（编码），然后查阅检索本或数据库，得到细菌名称。随着电脑技术的进步，这一过程已变得非常容易。

1．计算步骤

1）出现频率（概率）的计算：将记录的阳性或阴性结果转换成出现频率：①对阳性特征，则除以100 即得；②对阴性特征，除以100 的商被1 减去即可；③对“0”和“100”，用相似值0.01 或0.99 代替。

2）在每一个分类单位中，将所有测定项目的出现频率相乘，得出总出现频率。

3）在每个分类菌群中的所有菌的总出现频率相加，除以一个分类单位的总出现频率，乘100，即得鉴定%（%id）。

4）在每个菌群中，再按%id 值大小顺序重新排列。将未知菌单次总发生频率除以

最典型反应模式单次总发生频率，得到模式频率T 值，代表个体与总体的近似值。T 值越接近1，个体与总体越接近，鉴定价值越大。按%id 大小排序，将相邻两项的%id 之比R，代表首选条目与次选条目的差距，差距越大，价值越大。如果%id ≥80，参考T 值及R 值可作出鉴定。

2．结果形式

在编码检索本中检索数据谱得出的结果有以下几种形式（以API 鉴定系统为例）：

1）有此数码谱时包括①有一个或几个菌名条目及相应的鉴定值（%id 和T 值）；②对鉴定结果好坏的评价，如最佳等；③用小括号列出关键的生化结果及阳性百分率；④有时鉴定结果不佳或有多条菌名条目，需进一步补充试验项目才能得出良好的鉴定结果；⑤指出某些注意要点，如提示“推测性鉴定”（将此菌送至参考实验室）；如提示“血清学鉴定”，则作进一步血清学试验证实等。

2）无此数码谱时可能有以下情形：①生化谱太不典型；②不能接受，鉴定值低（%id <80.0）；③可疑，应进一步确认是否纯培养，或重新鉴定，或与供应商技术服务部联系。

3．结果解释

1）如果排序第一的细菌%id ≥80.0，则可将未知菌鉴定在此条目中，并按%id 值的大小对鉴定的可信度作出评价。如%id ≥99.9 和T 值≥0.75 为最佳的鉴定；%id99.0～98.9 之间，T 值≥0.5 为很好的鉴定；%id90.0～98.9 之间，T 值≥0.25 为好的鉴定；%id 80.0～89.9 之间为可接受的鉴定。

2）如果第一条目细菌的%id <80.0，则将前2 个条目的细菌%id 加在一起，若仍不足80.0，则将前3 个%id 相加。若≥80.0，则有2 种可能：①同种细菌，可能是不同生物型；②同一菌属的不同种。

如果相加的几个条目既不属于同一细菌种，又不属于同一细菌属，在评价中会指出“补充生化反应”的项目及阳性反应率，可再通过这些生化反应将几种菌区分开来。若前3 个条目的和<80.0，则为不可接受的结果。

（二）常见数码鉴定系统

国内外已有许多种用于临床细菌鉴定的数码鉴定系统，为临床微生物学实验室对细菌的鉴定提供了简便、快速的方法。目前常见微生物鉴定系统见表6－4－2。

表6 —4 —2　目前常见微生物鉴定系统

生产厂商	系统名称	可鉴定的微生物	孵育时间及条件
BioMerieux	ANI	厌氧菌	4h ；需氧
	API20A	厌氧茵	24h ；厌氧
	APIAn —IDENT	厌氧茵	4h ；需氧
	API Staph （STAPH —Trac）	葡萄球菌、微球菌	24h
	GPI	革兰阳性球菌和杆菌	2 ～15h
	ID32 Staph	葡萄球菌	24h
	API Coryne （Rapid CORYNE）	棒状杆菌及相关菌	24h
	ApI20Strep （Rapid STREp）	链球菌、肠球菌	4 ～24h
	API20E	肠杆菌科、非发酵菌	24 ～48h
	EPS （Enteric pathogen Screen）	爱德华菌属、沙门菌属、志贺菌属、耶尔森菌属	4 ～8h
	GNI	肠杆菌科、非发酵菌	2 ～18h
	GNI ＋	肠杆菌科、非发酵菌	2 ～12h
	UID／UID —3	尿液来源尿道致病菌	1 ～13h
	YBC	酵母菌	24 ～48h
	AP120C AUX	酵母菌	48 ～72h
Becton	CrytalAnaerobe	厌氧菌	4h
Dickinson	Crystal E／NF	肠杆茵科、某些革兰阴性非发酵菌	18 ～24h
	Crystal Gram positive	革兰阳性球菌和杆菌	18 ～24h
	CrySta MRSA ID	MRSA	4h
	Crystal Neisserial ／Haemophilus	奈瑟菌属、嗜血杆菌属、莫拉菌属、加德纳菌属、其他苛养菌	4h
	Crystal Rapid stool／Enteric	革兰阴性肠道致病菌	3h
	Enterotube II	肠杆菌科	18 ～24h
	ID Tri —Panel	革兰阴性和阳性菌	16 ～20 ：40 ～44h
	MiniTek	厌氧菌、肠杆菌科、革兰阳性菌、奈瑟菌属、非发酵菌、酵母菌	4h （肠杆菌科、奈瑟茵属）；72h （酵母菌）

续表

生产厂商	系统名称	可鉴定的微生物	孵育时间及条件
	Oxi/Ferm II	革兰阴性、氧化酶阳性葡萄糖发酵或非发酵菌	24～48h
Dade	NEG ID Type2	肠杆菌科、其他的发酵和非发酵菌	15～42h
NiCIOScan	Pos ID	革兰阳性球菌和李斯特酋属	18～48h
	Rapid Anaerobe	厌氧菌	4h：需氧
	Rapid HNID	奈瑟菌属、嗜血杆菌属、卡他莫拉菌、阴道加德纳菌	4h
	Rapid NEG ID Type2	肠杆菌科、其他的发酵和非发酵菌	2h
	Rapid NEG ID Type3	肠杆菌科、其他的发酵和非发酵菌	2.5h
	Rapid Pos ID	革兰阳性球菌和李斯特菌属	2h
	Rapid Yeast ID	酵母菌	4h
lnnovative	Nicro —ID	肠杆菌科	4h
Diagnostics	RapID ANA II	厌氧菌	4～6h；需氧
(DS)	RapID CB P1us	棒状杆菌	4h
	RapID NF P1us	非发酵革兰阴性杆菌	4h
	RapID NH	奈瑟菌、嗜血杆菌和其他革兰阴性细菌	4h；1h（淋球菌）
	RapID onE	肠杆菌科和其他氧化酶阴性菌	4h
	RapID STR	链球菌	4h
	RapID Yeast plus	酵母菌和酵母菌样菌	4h
BioloS	AN	厌氧菌	4～16h：需氧
	CN Microplate	需氧革兰阴性杆菌	4～24h
	GP MiCIOplate	大多数革兰阳性球菌和杆菌	4～24h
	YT	酵母菌	24～72h
Remel	Neisseria Enzyme test	奈瑟菌属、莫拉菌属	30min
	r/b Enteric Differential System	肠杆菌科	18～24h
	Uni —Yeast Tek	酵母菌	24h～6d

续表

生产厂商	系统名称	可鉴定的微生物	孵育时间及条件
	Uni－N／F－Tek	革兰阴性发酵或非发酵细菌	24～28h
Medicsl Specialties Inc.	Fox Exera CNI	肠道和非肠道革兰阴性杆菌	18～24h
ACCUMed International Inc.	Sensititre AP 80	肠杆菌科和非发酵革兰阴性杆菌	5～18h

二、自动化微生物鉴定和药敏试验分析系统

自动化的微生物鉴定和药敏试验分析系统在临床微生物学实验室的应用，为微生物学检验工作者对病原菌的快速诊断和药敏试验提供了有力工具。鉴定系统的工作原理因不同的仪器和系统而异。不同的细菌对底物的反应不同是生化反应鉴定细菌的基础，而试验结果的准确度取决于鉴定系统配套培养基的制备方法、培养物浓度、孵育条件和结果判定等。大多鉴定系统根据细菌分解底物后反应液中pH 值的变化、色原性或荧光原性底物的酶解和是否有挥发酸、细菌是否生长等来分析鉴定。各种微生物鉴定系统的反应基础见表6－4－3。

表6－4－3　各种微生物鉴定系统的反应基础

系统源性	培养	分析对象	阳性结果指示	系统举例
酶谱分析(通常2～4h)	不需要	酶活性	色原性／荧光原性底物混合物被酶水解后产生颜色变化	MicroScan Rapid panels、IDs
pH 值变化(通常15～24h)	需要	碳水化合物利用	碳水化合物分解产酸，蛋白质或含氮化合物放水解产碱，致pH 指示剂颜色变化	API、Crystal、VITTEKcards、Micro Scan conventional panels
碳源利用	需要	有机物	无色变为紫色	Biolog
挥发性酸测定	需要	细胞脂肪酸	气相色谱鉴定的终末产物与已知图谱比较	MIDI
生长状况	需要	各种底物	混浊生长	酵母菌鉴定

药敏试验分析系统的基本原理是将抗菌药物微量稀释在条孔或条板中，加入菌悬液

孵育后放入仪器或在仪器中直接孵育，通过测定细菌生长的浊度，或测定培养基中荧光指示剂的强度或荧光原性物质的水解，观察细菌的生长情况。在含有抗菌药物的培养基中，浊度的增加提示细菌生长，根据判断标准解释敏感或耐药。

(一) 半自动化细菌鉴定和/或药敏分析系统

1.VITEK -ATB 半自动细菌鉴定和药敏分析系统

VITEK -ATB 是生物-梅里埃公司产品，由计算机和读数器两部分组成，计算机程序包括ATB 和API 的鉴定数据库、ATB 的药敏数据库、数据储存和分析系统及药敏专家系统。鉴定和药敏反应板在机外孵育后，一次性上机读取结果，由计算机进行分析和处理，并报告细菌鉴定和药敏结果。

2.AutoScan -4 半自动细菌鉴定和药敏分析系统

AutoScan -4 是由Dade MicroScan 公司生产，由计算机和读数器两部分组成。鉴定和药敏反应板在机外孵育后，一次性上机，自动判读鉴定和药敏试验结果；亦可人工进行判读，将编码输入计算机，由计算机软件评定结果。有鉴定及鉴定药敏复合板两种测试卡。

3.BBLTMCrystalTM 半自动细菌鉴定系统

BBLTM CrystalTM 半自动细菌鉴定系统是BD 公司产品，其将传统的酶、底物生化呈色反应与先进的荧光增强显色技术结合以设计鉴定反应最佳组合。反应板在机外孵育后，上机自动判读鉴定结果。配套提供独立分装的鉴定用肉汤试管，确保无菌状态，使用方便。配套比浊仪可快速调配所需浊度的菌液。

4.AutoReader 半自动细菌鉴定和药敏分析系统

AutoReader 半自动细菌鉴定和药敏分析系统是Trek Diagnostic Systems 公司产品，由计算机和读数仪等组成。采用荧光测定法，反应板在机外作定时孵育后，上机读数，由SAMS 软件评定测定结果，也可通过SAMS 系统人工确认法输入计算，或完全由人工输入作评定。所用鉴定板和药敏板与全自动机型中的反应板一样。

5. 抑菌圈直径测量仪

抑菌圈直径测量仪有BIOMIC (Giles Scientific Inc)、Accuzone System (AccuMed International Inc)、SIRSCAN ($IRSCAN) 等3 种单板读取机。经孵育后的药敏平板可被仪器的图象分析系统识别并计算抑菌圈直径。根据判断标准，报告药敏试验结果。这些仪器可减少人工测量抑菌圈直径大小差异及主观判断错误。BIOMIC 系统宣称能根据抑菌圈大小来计算MIC，值得注意的是该类仪器对抑菌圈内模糊生长或微小的菌落不能正确识别，而这些菌落对细菌的耐药性的判定至关重要，因此读取每个平板孵育结果时必须进行人工观察。

㈡ 全自动的微生物鉴定和药敏试验分析系统

1.VITEK 系统

VITEKAMS 是由生物－梅里埃公司生产的全自动微生物鉴定和药敏分析系统。第一代产品有以下4 个规格：VITEKAMS32、60、120、240。由计算机主机、孵育箱/读取器、充填机/封口机、打印机等组成。鉴定原理是根据不同微生物的理化性质，采用光电比色法，测定微生物分解底物导致pH 值改变而产生的不同颜色，判断反应结果。在每张卡上有30 项生化反应。由计算机控制的读数器，每隔1h 对各反应孔底物进行光扫描，并读数1 次，动态观察反应变化。一旦鉴定卡内的终点指示孔到临界值，则指示此卡已完成。系统最后一次读数后，将所得的生物数码与菌种数据库标准菌的生物模型相比较，得到相似系统鉴定值，并自动打印出鉴定结果。

获得细菌的纯培养后，调整菌悬液浓度，根据不同的细菌选择相应的药敏试验卡片，在充液仓中对卡片进行充液。置孵育箱/读数器中孵育，自动定时测试、读取数据和判断结果。VITEK 可快速鉴定包括各种肠杆菌科细菌、非发酵细菌、苛养菌、革兰阳性球菌、革兰阴性球菌、厌氧菌和酵母菌等500 种临床病原菌。具有20 多种药敏测试卡、97 种抗生素和测定超广谱β－内酰胺酶测试卡，可快速检测细菌药敏情况。

该系统有根据细菌耐药规律而设定的专家系统，可帮助校正和修改结果。对于专家系统提示的不可能的或极少见的耐药表型应予以充分重视，需采用确认试验重新鉴定。如对万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌，对泰能耐药的肠杆菌，对青霉素耐药的β－溶血性链球菌等。VITEK －2 是生物－梅里埃公司开发的新一代微生物分析仪，其工作原理与VITEKAMS 差别不大，但其容量更大，自动化程度更高，并且使用64 孔的反应卡片，鉴定更准确可靠，可同时作20 种抗生素的药敏试验。

2.MicroScan Walk/AWay 系统

MicroScan Walk/AWay 系统由主机、真空加样器、孵育箱/读取器、计算机、打印机等组成。除采用传统呈色反应法外，同时采用敏感度极高的快速荧光测定技术来检测细菌胞外酶，鉴定板有普通板和快速板两种，普通板获得结果需要16 ～18h，快速板测定只需2 ～3.5h。该系统有8 种鉴定反应板，可鉴定包括革兰阴性菌、革兰阳性菌、厌氧菌、酵母菌、嗜血杆菌和奈瑟菌等近800 种细菌。药敏部分采用比浊法进行测定，90％菌株可在5.5h 内获得17 ～33 种抗菌药物的MIC 值。此系统有walk/Away －40 和Walk/Away －96 两个型号，40 或96 代表该系统可同时容纳40 或96 个测试。

3.PHOENIX 系统

PHOENIX System 是新一代全自动快速细菌鉴定/药敏系统，由BD 公司生产。鉴定

试验采用BD 专利荧光增强技术与传统酶、底物生化呈色反应相结合的原理。药敏试验采用传统比浊法和BD 专利呈色（Chromogenic）反应双重标准进行药敏试验结果判断。仪器由主机、比浊仪、微生物专家系统等组成。有PHOENIX 100 或50 两种型号。PHOENIX100 型分别可进行100 个鉴定试验和100 个药敏试验。可鉴定革兰阳性菌139 种、革兰阴性菌158 种。有鉴定板、药敏板或鉴定/药敏复合板3 种可供选择。每个鉴定药敏复合板有51 孔用于鉴定试验，85 孔用于药敏试验，可同时进行17 种抗菌素5 种浓度或28 种抗菌素3 种浓度的MIC 药敏试验。90％细菌的鉴定在3～6h 完成，鉴定准确率大于90％；85％的细菌药敏试验在4～6h 内完成。

4.SENSITITREARIS 系统

该系统由计算机主机、孵育箱/读数仪、全自动加样器等组成。在培养箱中设置可存放64 块板的转盘，每块板均能检测3 个标本，故同时可检测192 个菌种标本。在测定板底物中加入酶基质，使其与细菌产生的酶结合成荧光物质。在较短时间内能够分析不同生化底物所反映出的荧光物质，通过荧光读数仪检测板孔中荧光Biocide 和Willcox 值来鉴定细菌。该系统的药敏试验有两种测定法，即当采用人工判定时为比浊法，当采用仪器自动判读时为荧光测定法。但均参照NCCLS 的标准和规则来解释结果。大多数菌种均可在5h 内报告检验结果。通常有革兰阴性菌、革兰阳性菌、厌氧菌、苛养菌及真菌鉴定板和300 多种抗菌药物不同组合的药敏板及鉴定/药敏复合板。

㈢ 使用自动化鉴定仪的注意事项

1）自动化鉴定系统是根据数据库中所提供的背景资料鉴定细菌，数据库资料的不完整将直接影响鉴定的准确性。目前为止，尚无一个鉴定系统能包括所有的细菌鉴定资料。对细菌的分类是根据传统的分类方法，因此鉴定也以传统的手工鉴定方法为“金标准”。使用自动化鉴定仪的实验室，应对技术人员进行手工鉴定基础与操作技能培训。

2）细菌的分类系统随着人们对细菌本质认识的加深而不断演变，使用自动化鉴定仪的实验室应经常与生产厂家联系，及时更新数据库。实验室技术人员应了解细菌分类的最新变化，便于在系统更新之前即可进行手工修改。

3）通过自动化鉴定仪得出的结果，必须与其他已获得的生物性状（如标本来源、菌落特征及其他的生理生化特征）进行核对。

三、自动化血液细菌培养系统

正常血液是无菌的，细菌侵入可导致菌血症、败血症、脓毒血症，及时准确地进行病原学诊断极为重要。传统的血培养是抽取5ml 血液注入血培养瓶中，放人孵箱，每天观察结果，费时费力，易延误诊断。全自动血液细菌培养仪主要优点是可以在较短培养

时间内提示血液培养瓶中有无微生物的存在。

1.BACTEC 系列

BACTEC460、NR —30 是早期的血液培养仪，目前基本上已被BACTEC9000 系列替代（包括9050、9120 和9240 等3 种型号，可分别容纳50、120 和240 个培养瓶）。微生物在生长过程中消耗培养基内的营养物质，产生的二氧化碳直接激活瓶底部预埋的对二氧化碳浓度变化高度敏感的荧光物质，在激发光的激发下放出荧光，荧光强度的变化直接反映瓶内二氧化碳浓度变化，可判断瓶内有无微生物生长。根据不同的培养要求，该系统配置了标准需氧/厌氧培养瓶、有中和抗菌药物的树脂培养瓶、厌氧菌和真菌等多种培养瓶。细菌培养生长曲线、结果等均可在联机的计算机上显示出来。

2.BacT/Alert 系统

该系统有BacT/Alert48、72、96、120、240 及3D 等型号。主要测定原理为当培养瓶内有微生物生长，代谢过程中产生的二氧化碳可经过半透膜渗透至瓶底，与固定于瓶底的Novel/二氧化碳感应器结合，产生颜色变化，通过光电检测和计算机处理后，在曲线图上反映、分析、判断阴性或阳性结果，并及时报警。该系统可在任何时间内放人培养瓶，通过条码识别允许该标本进入系统，并连续跟踪监测。系统配置有需氧培养瓶、厌氧培养瓶、中和抗生素需氧瓶、中和抗生素厌氧瓶、小儿培养瓶、血液分枝杆菌培养瓶和痰液分枝杆菌培养瓶等。

3.VITAL 系统

这是使用均质荧光技术的快速培养系统。培养瓶内的液体培养基中含有荧光底物，当细菌生长时，产生的质子、电子和离子与荧光分子结合后，荧光物可变成无荧光化合物，通过测量每瓶内荧光强度以反映细菌生长情况。

4.ESP 血培养系统

主要测定原理为细菌在生长过程中消耗氧，产生氮气、氢气和二氧化碳，导致培养瓶内压力改变。该系统采用气压传感技术，通过压力传感器监测瓶内压力变化，报警提示有细菌生长。

四、结核分枝杆菌快速检测系统

结核分枝杆菌的经典培养是将标本接种在特定培养基上，定时观察，15d 后生长的为可疑菌落。判定阴性需8 周时间，要完成阳性病例的鉴定、药物敏感试验需2～3 个月，且阳性检出率低，不易标准化。20 世纪70 年代以来，采用14C 棕榈酸作为底物快速检测结核分枝杆菌，使快速分离及鉴定结核分枝杆菌成为可能。第一代的仪器为BD 公司的BACTEC460TB 培养仪，其由于^{14}C 的放射性环境污染及探针穿刺开放等缺陷，基

本上已被淘汰。BACTEC9000 系列为了克服放射性的缺陷，改用荧光增强技术。由于分枝杆菌的生长需要添加一定浓度的二氧化碳，因此检测培养瓶中氧浓度的变化比二氧化碳浓度的变化更加敏感而直接。BACTEC9000 系列利用对氧浓度敏感的荧光物质，来测定培养瓶中结核分枝杆菌的生长。

BACTECMYCO/FTIC （含溶血素分枝杆菌/真菌培养瓶）适用于血液及无菌体液中结核分枝杆菌和真菌的检测。由于添加了溶血素，破坏了红细胞等血细胞对氧的利用，避免了假阳性。BACTECMYCO/FSPuta 培养适用于其他污染标本的使用。在此两种瓶中有微生物生长时，需鉴别是结核分枝杆菌还是真菌及其他细菌生长所导致的阳性结果，它们仅适用于结核分枝杆菌的筛查。

BACTEC960 和BacT/ALERT3D 系统可进行结核分枝杆菌的初代培养、阳性结果的鉴定和药敏试验。通过对标本的消化处理后，接种分枝杆菌快速培养管。培养管的基本组成为：①改良MiddleB Bro 7H9 分枝杆菌专用增菌肉汤；②抗菌剂两性霉素B、阿洛西林、奈啶酸、多粘菌素B、甲氧嘧啶、万古霉素；③营养添加剂。平均检出时间为9～13d，鉴定时间4～5d

还有其他一些适用于小型实验室的手工结核分枝杆菌快速鉴定系统，包括标本前处理管、结核分枝杆菌快速生长管、鉴定试验管、药敏试验管及荧光判读器。。

第五章　微生物学检验标本采集、运送、处理及检验流程

第一节　标本采集、运送与处理原则

标本的正确采集、运送与处理对于细菌的培养、鉴定，有着十分密切的关系。对可疑烈性呼吸道传染病（如SAR3、肺炭疽、肺鼠疫等）患者采集检验标本时必须注意生物安全防护。

1．标本采集

1）送检申请单必须惟一标识，并注明患者姓名、性别、年龄、临床诊断、标本来源、采集时间、检验目的及抗菌药物使用情况等，以便实验室能针对该标本选用相应培养基和适宜培养环境，有利于对检验结果的综合评估。

2）为避免漏检，确保病原体的检出，应尽量在抗菌药物使用前采集标本。

3）标本采集时应严格执行无菌操作，减少或避免机体正常菌群及其他杂菌污染。

4）以棉拭子采集标本，如咽拭、肛拭或伤口拭子，应插入运送培养基送检。

5）混有正常菌群的标本，如痰液、尿液、伤口拭子，不可置肉汤培养基内送检。

6）盛标本容器须经灭菌处理，但不得使用消毒剂。

7）实验室应制定各种送检标本的采集、运送、保存等正确方法和注意事项，并应向临床与患者详细介绍如何正确留取和送检标本。

2．标本运送

标本采集后应立即送至微生物学实验室。标本采集后在室温下超过2h未送达实验室者可视为不合格标本。床边接种可提高病原菌检出率，送检标本必须与检验申请单有相同的惟一标识。

3．标本验收

实验室只能接收和处理合格的检验标本，因此应制定不合格标本拒收标准；对不合格标本应注明原因，退回，并做记录。

4．标本处理

1）实验室收到标本后，应立即根据标本类型、患者的临床资料及检验目的，选择

合适的培养基接种。

(2) 混有正常菌群的标本，应作定量细菌培养。不能精确定量或常规定量操作较困难的痰液、伤口拭子等标本，分离出致病菌及条件致病菌为优势菌时，应作细菌鉴定及药敏试验，同时注明细菌量化指标。

(3) 对已用抗菌药物治疗的患者标本，可在培养基中加入某些物质以中和药物对细菌的抑制作用。

5．标本检验和鉴定流程

根据革兰染色特性、形态学特征和酶、动力及对糖酵解的方式，可将临床常见分离菌进行初步鉴定。鉴定流程见图6-5-1。

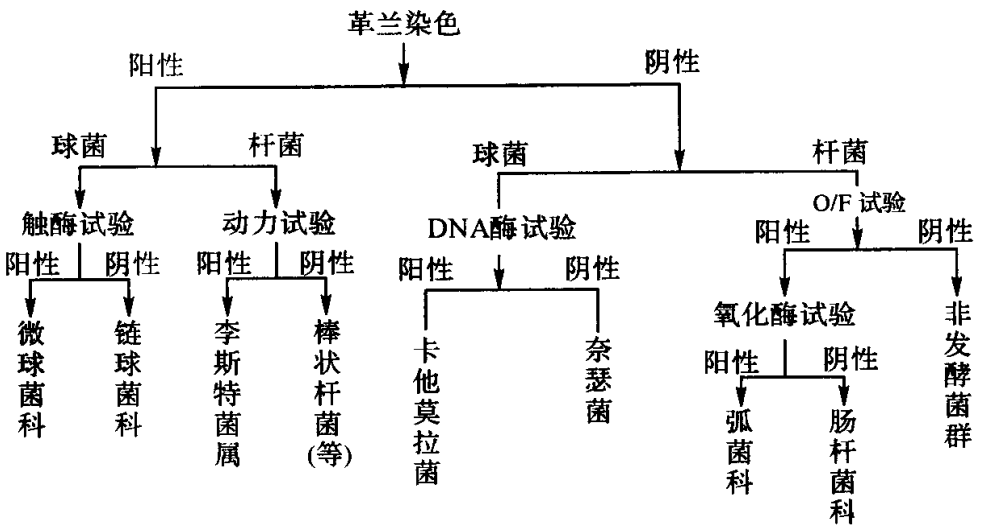


图6-5-1　临床常见细菌检验鉴定流程

革兰染色将细菌分成革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类。再根据细菌的生物学特性(形态、动力、NA 酶、触酶、氧化酶及O/F 试验等) 初步分类鉴定。

第二节　血液及骨髓标本采集、处理与检验流程

正常人血液与骨髓无菌，只有当细菌进入血液或骨髓后，人体内免疫功能又不能将其清除时，入侵的细菌才在血液与骨髓内生长繁殖，产生毒性物质，造成机体不同程度的病变，并引起全身性感染。依临床表现称之为菌血症、败血症和毒血症。

采集静脉血和骨髓标本进行细菌与真菌学检验是诊断菌血症、败血症和毒血症的“金标准”。由于影响阳性分离培养的因素很多，如采集标本的时间、部位、标本量、污染、采集标本次数及用药等，因此应严格把握采血指征，选择最佳培养与检验方法，提高阳性检出率。

【标本采集】

1．采血指征

患者出现以下临床表现时，可将其作为采集血液进行细菌培养的重要指征：发热（≥38 ℃）或低温（≤36 ℃），寒战，白细胞增多，粒细胞减少，血小板减少，皮肤黏膜出血，昏迷，多器官衰竭，血压降低，呼吸加快，C 反应蛋白升高，或同时具备上述几种表现，临床怀疑菌血症时应采血培养；怀疑新生儿菌血症时，应该增加尿液和脑脊液培养。

2．采血时间

对入院危重患者未进行系统性抗菌药物治疗之前，应及时采集血培养。

（1）怀疑急性原发性菌血症、真菌菌血症、脑膜炎、骨髓炎、关节炎或肺炎：应立即在不同部位采集2～3 份血标本。血培养持续阴性，应改变血培养方法，以检出罕见的或苛养的微生物。

（2）不明原因的发热：如隐性脓肿、伤寒热和波浪热，先采集2～3 份血标本（一次静脉采血注入到多个培养瓶中应视为单份血培养），培养24～36h 后，在体温升高之前再采集2 份以上的血标本。若24h 培养结果阴性，应重新采样。

（3）布鲁杆菌感染患者：应在发热期采集血液或骨髓标本。通常在24h 内采集3～4 次标本。

（4）沙门菌感染患者：根据病程可在不同时间采集标本。伤寒患者在病程第1～2 周采取静脉血液，病程第1～3 周采集骨髓标本。

（5）亚急性细菌性心内膜炎患者：治疗前1～2h 分别在3 个不同部位抽血样进行培养。若24h 培养阴性，重新采集2～3 份或更多标本送检。

（6）分枝杆菌感染患者：感染初期，容易发生淋巴－血流播散。早期采样，检出阳性率较高。

（6）螺旋体感染患者：感染早期（1 周内）未用药前采样。怀疑回归热螺旋体感染时，间歇采样可获得较高的检出率。

3．采集方法

无菌采取血液标本，成人5～10ml、儿童3～5ml；骨髓穿刺液1～2ml。血液与培养基比例以1∶5～1∶10 为宜。

【常见病原菌】

健康人血液中无菌，只有当人体局部感染向全身播散或全身感染时，血液中可出现细菌，导致菌血症、败血症或毒血症；当细菌侵入骨髓时可引起严重的骨髓炎。血液、骨髓中常见的病原菌有革兰阳性菌有金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、A 群及B 群链球

菌、草绿色链球菌、肺炎链球菌、肠球菌、厌氧链球菌、产单核李斯特菌、产气荚膜芽胞梭菌、丙酸杆菌、念珠菌；革兰阴性菌有脑膜炎奈瑟菌、卡他莫拉菌、伤寒及副伤寒沙门菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、肠杆菌属菌种、沙雷菌、铜绿假单胞菌、假单胞菌属菌种、不动杆菌、流感嗜血杆菌、胎儿弯曲菌、拟杆菌和梭杆菌等。

【检验方法】

1．培养基

1）一般细菌：可选牛肉浸液培养基、脑心浸液液体培养基及双相培养基等。

2）布鲁杆菌：肝浸液为基础的酚红葡萄糖肉汤。

3）链球菌和脑膜炎奈瑟菌：胰大豆胨酚红葡萄糖肉汤。

4）厌氧菌：牛心脑浸液为营养基础的厌氧培养基。

5）细菌L 型：高渗培养基。

此外，可根据临床需要选择合适仪器和配套培养基。一般有需氧培养基、厌氧培养基、高渗需氧培养基、小儿培养基、中和抗菌药物培养基等。

2．接种与培养

每天肉眼观察或仪器自动检测各培养瓶是否发现或提示微生物生长可视信号，对48～72h 未生长的培养瓶至少需氧转种培养1 次。

1）有细菌生长信号：应立即对阳性培养瓶取培养物涂片革兰染色和显微镜镜检，根据染色与形态学特性，选择合适培养基转种。对染色镜检未发现细菌的血培养瓶，应延长培养时间。

2）无细菌生长信号：连续培养7d 后盲目传种，仍未见细菌生长，可报告阴性。对临床怀疑军团菌和布鲁杆菌感染标本，应连续培养10d 和28d。

【检验流程】

见图6－5－2。

【报告方式】

阳性血培养结果应立即口头报告医生，包括革兰染色特性的形态特征、血培养阳性的瓶数和其他鉴定资料。口头报告后应重视对阳性培养物的结果追踪，尽可能快速进行书面初步报告，同时记录报告日期、时间、内容以及接受、报告者姓名。通常血培养72h 未见细菌生长时，应口头报告“72h 培养未见细菌生长”，但如果血培养瓶连续培养7d 后有细菌生长，应书面报告培养结果。

【注意事项】

1）不同部位采集血样可选择左、右手臂或颈部，避免通过静脉置管直接采集血样。

2）所用培养瓶必须仔细检查有无变色或混浊。

3）标本采集必须在治疗前完成，并采用多瓶接种，按一人一瓶一单的原则贴好标签。

4）对疑为细菌性骨髓炎患者标本做分枝杆菌培养时，骨髓培养比血培养有更高的敏感性。

5）严格做好患者抽血部位的无菌消毒工作，培养瓶盖以75％乙醇消毒。

6）同时作需氧菌和厌氧菌培养时，应先将标本注入厌氧瓶中，然后再注入需氧瓶。

7）接种有标本的培养瓶应立即送至细菌室。如有特殊情况不能送检的，应将培养瓶置于室温，切勿放入冰箱。

8）标本送检过程中应注意保温。

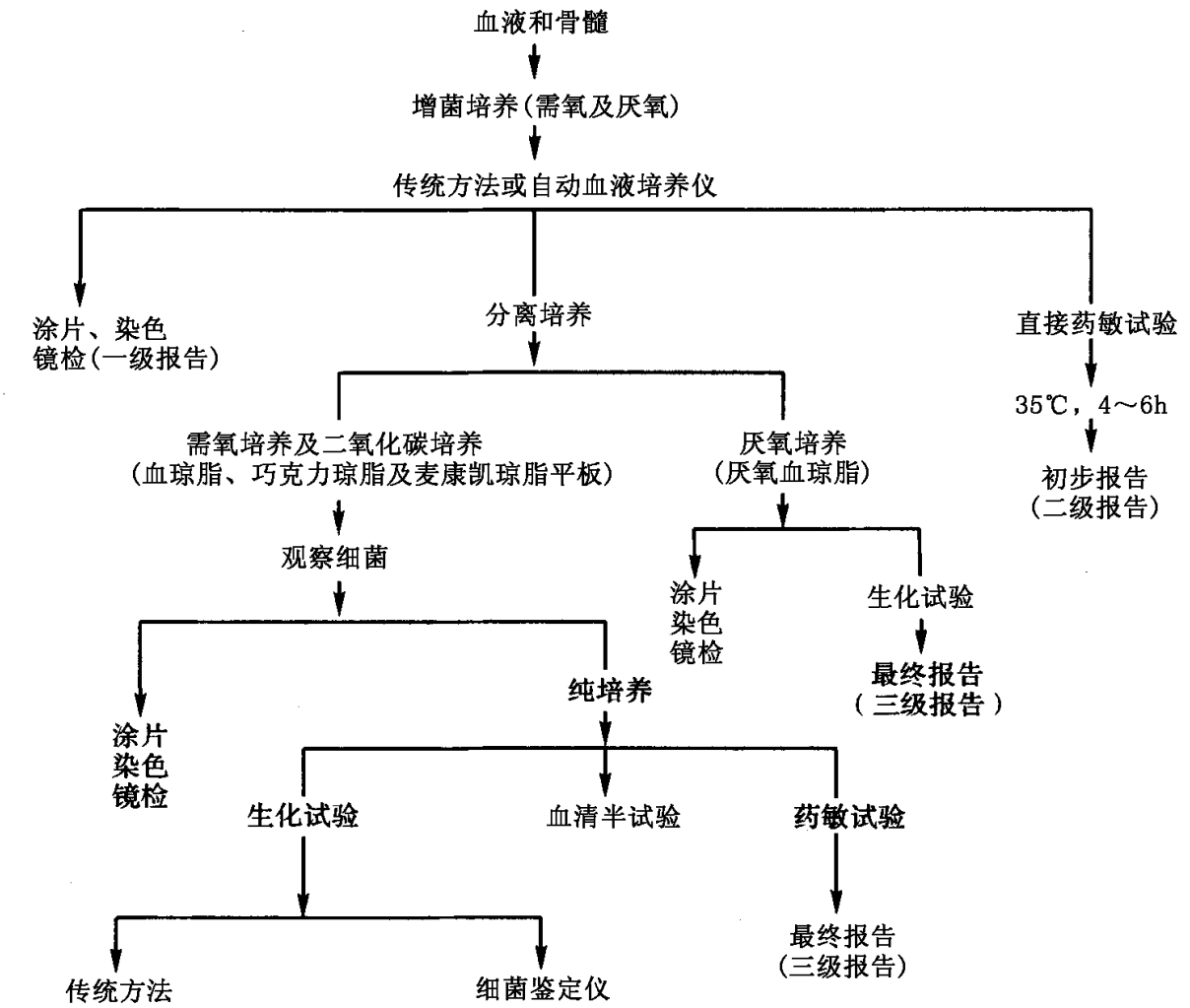


图6－5－2　血液和骨髓标本细菌检验流程

第三节　尿液标本采集、处理与检验流程

正常人尿液无菌，经尿道排出的尿液常受到体表、尿道口或环境中细菌的污染。在尿液中分离出细菌（排除污染因素）即称为菌尿症，同时伴有感染症状者称为尿路感染。根据感染部位，感染程度可分为上尿路感染（肾盂肾炎）及下尿路感染（膀胱炎、尿道炎），男性可出现前列腺炎。

【标本采集】

1．采集指征

1）有典型的尿路感染症状。

2）有肉眼脓尿或血尿。

3）尿常规检验白细胞或亚硝酸盐阳性。

4）不明原因的发热，无其他局部症状。

5）留置导尿管的患者出现发热。

6）有尿路感染症状者，抗菌治疗48h 后仍持续发热。

7）抗生素停药后，感染症状再次出现。

8）有尿路感染症状者，前次培养结果阴性。

2．采集时间

通常应采集晨起第1 次尿液送检，确保尿液在膀胱内停留4h 以上。应选择在抗菌药物应用之前采集尿液。标本采集后应及时送检，2h 内进行接种，否则应置4～8℃冰箱保存。冷藏保存标本必须在8h 内进行接种。怀疑沙门菌感染时应在发病2 周左右采集尿液培养。怀疑钩端螺旋体感染时在感染后2 周采集尿液培养。

3．采集方法

1）中段尿采集：成年女性外阴部先用肥皂水清洗，再以灭菌水冲洗尿道口，然后排尿弃去前段尿，留取中段尿10ml 左右于无菌容器内，立即加盖送检。男性先用肥皂水清洗尿道口，再以灭菌水冲洗，留取中段尿。

2）肾盂尿采集：通常由临床医师采集，用导尿管采集肾盂尿，充分冲洗膀胱，以最后一次冲洗尿作为对照，再用导尿管插入输尿管，分别标记左右两侧收集3 次尿；如输尿管尿菌数比对照尿菌数多或第3 次比第1 次尿菌数多，该菌尿可能来自膀胱。

3）膀胱穿刺采集：上述方法采集的中段尿要完全避免标本污染是很困难的，当培养结果与病情矛盾时，可采用耻骨上膀胱穿刺取尿。

4）集尿法：怀疑结核分枝杆菌感染时，可用一清洁容器留24h 尿取其沉渣10～

15ml 送检。

5）导尿法：用导尿管导取10～15ml 尿液置灭菌容器内送检。长期留置导尿管者，应在更换新导尿管后留取尿标本。留置导尿患者应采取无菌操作方法，消毒导尿管外部及尿管口，用注射器通过导尿管吸取尿液，注意防止带人消毒剂。不能采集收集袋中的尿液标本送检。

【常见病原菌】

引起泌尿系统感染的常见革兰阳性菌有金黄色葡萄球菌、A 群链球菌、腐生葡萄球菌、表皮葡萄球菌、结核分枝杆菌、假丝酵母菌、肠球菌、厌氧链球菌；革兰阴性菌有淋病奈瑟菌、大肠埃希菌、变形杆菌、肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌、沙门菌属、铜绿假单胞菌、沙雷菌和阴道加德纳菌等。

【检验方法】

1．涂片染色镜检

取新鲜尿液5～7ml，置无菌试管，3000r/min 离心30min，弃去上清液，取沉淀制成涂片；按照临床需要，选择革兰染色、抗酸染色或其他染色；根据细菌的着色、形态及排列，进行初步报告。如见有革兰染色阴性双球菌呈肾型时，可初步报告“在细胞内外均找到革兰阴性双球菌呈肾型，疑似淋病奈瑟菌”；抗抗酸染色时查见红色杆菌，报告“找到抗酸杆菌”。

2．培养

1）一般细菌培养：用无菌接种环取尿液分别接种血琼脂平板和麦康凯琼脂平板，35℃培养18～24h，观察结果。根据菌落的形状及涂片镜检菌体特征，选择相应方法进一步鉴定。

2）定量培养：有以下3 种方法。

倾注平板法：在含有9.9ml 无菌9g/L 氯化钠溶液的无菌试管中加入被检尿液0.1ml，混匀。取1ml 置灭菌平皿，加入冷却至50℃左右的培养基9ml，与尿混匀，待凝固后置35℃培养24h。生长菌落数乘以1000 即相当于每毫升中菌数。

平板接种法：取尿5ul 滴注在平板培养基上，用无菌接种环（或L 型玻璃棒）涂抹均匀，待表面干燥后，35℃培养过夜，计数生长的菌落数，乘以200 即相当于每毫升的菌数。

定量接种环涂抹法：用10ul 定量接种环取1 环尿液标本，在琼脂平板表面作均匀划线接种，置35℃培养24h 后计数生长菌落数，乘以100 即相当于每毫升中菌落数。

【检验流程】

见图6－5－3。

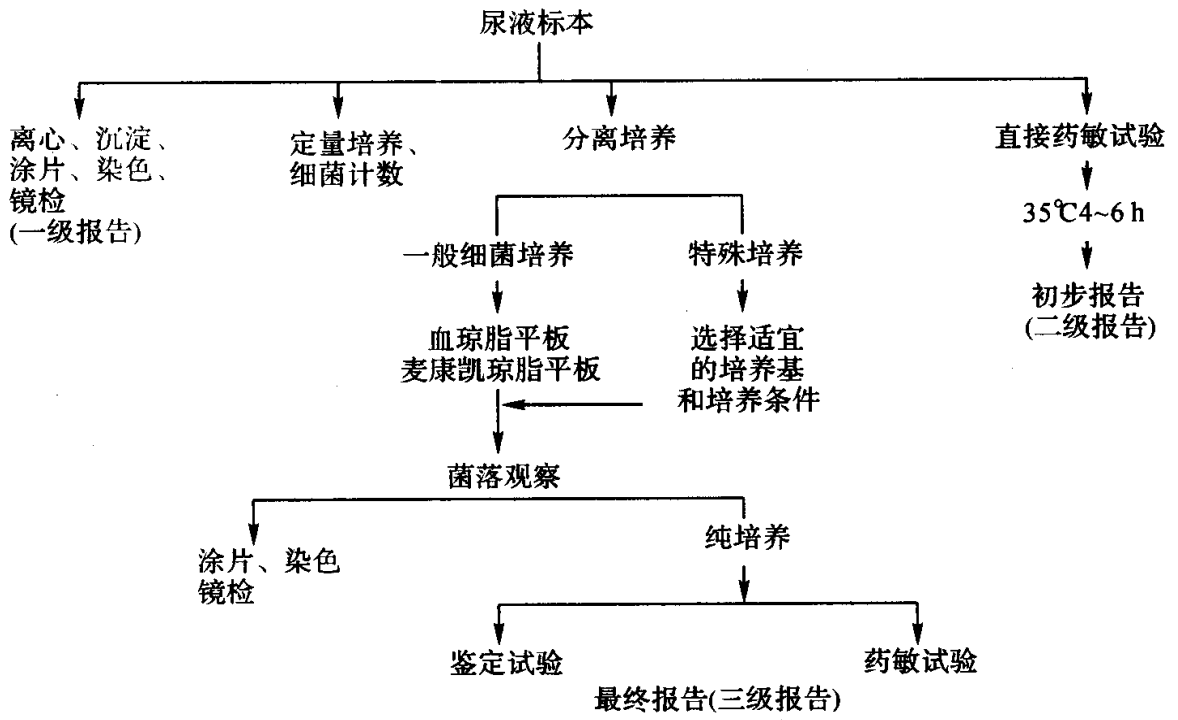


图6－5－3　尿液标本细菌检验流程

【报告方式】

48h 无细菌生长可报告“无细菌生长”。10％的尿路感染患者，可能会在同一份尿标本中分离到两种病原菌。若同一份标本中检到3 种以上不同种微生物，应认为采集或处理标本时被杂菌污染。当菌落生长过多难于计数时，可报告细菌数＞10^5cfu／ml。

尿标本菌落计数中革兰阴性杆菌数＞10^5cfu／ml 或革兰阳性球菌数＞10^4cfu／ml 时有临床诊断意义，应同时报告鉴定结果及药敏试验结果。

第四节　粪便标本采集、处理与检验流程

正常人肠道中栖居大量不同种类的微生物，组成了对人类健康极为重要的体内微生态环境－微生态菌膜屏障，参与营养、消化、吸收及清洁肠道，维护健康。腹泻是因病原菌或病毒在肠道内感染或其毒素等导致的结果。通过采集粪便标本进行微生物学检验查找其病因。

【标本采集】

1．采集时间

腹泻患者应在急性期，并尽可能在用药之前；伤寒患者在发病2 周以后。

2．采集方法

1）自然排便采集法：自然排便后，挑取有脓血或粘液部位的粪便2～3g，液状粪

便则取絮状物盛于无菌的容器内或置于保存液或增菌液中送检。

⑵ 直肠拭子法：对难以获得粪便或排便困难的患者及婴幼儿，可采用直肠拭子方法采集标本，标本采集后插入灭菌试管内送检。

【常见病原菌】

常见腹泻病原菌如革兰阳性菌有金黄色葡萄球菌、肠球菌、厌氧链球菌、结核分枝杆菌、产气荚膜芽胞梭菌、白色念珠菌、难辨芽胞梭菌，革兰阴性菌有伤寒及其他沙门菌、志贺菌属、致病大肠埃希菌、弧菌属细菌、气单胞菌、邻单胞菌、小肠结肠炎耶尔森菌、弯曲菌等。

【检验方法】

1．涂片镜检

粪便标本一般不作涂片检查，但临床怀疑抗菌素相关性肠炎、肠道菌群失调或霍乱弧菌、结核分枝杆菌、难辨芽胞梭菌、葡萄球菌以及念珠菌感染时可做涂片检查。

⑴ 葡萄球菌：疑似葡萄球菌引起的抗菌素相关性肠炎，可取水样便或肠黏膜样物涂片，革兰染色后镜检，当见有革兰阴性杆菌明显减少，革兰阳性球菌大量散在或成堆（葡萄状）排列，可提示肠道菌群失调的诊断。

⑵ 难辨芽胞梭菌：取患者新鲜粪便涂片，革兰染色后镜检可见大量革兰阳性粗大杆菌，无荚膜，大多能形成卵圆型芽胞位于菌体一端，可提示肠道菌群失调的诊断。

⑶ 结核分枝杆菌：取蚕豆大小粪便与饱和氯化钠溶液10～15㎖混合。静置1～2h，取浮面液体涂片作抗酸染色，若找到红色杆菌可报告“找到抗酸杆菌”。

⑷ 空肠弯曲菌：将粪便涂片作革兰染色，镜检可见细小、长而弯曲、呈S形或螺旋形、海鸥状的革兰阴性弧菌，可作初步报告“疑似弯曲菌”。

⑸ 念珠菌：将粪便制成压滴标本，用高倍镜观察时可发现光亮的卵圆形孢子或假菌丝。涂片革兰染色可见革兰阳性瓜子形状的孢子或假菌丝。若仅见到孢子则报“找到革兰阳性卵圆形芽生真菌孢子”，同时还有假菌丝则可报告“检出念珠菌”。

2．培养

⑴ 普通培养：取粪便接种于血平板，麦康凯/SS琼脂平板，35℃培养18～24h，挑取可疑菌落涂片行革兰染色后观察菌体的着色、形态及排列，并进一步作鉴定。

⑵ 选择培养：

致病大肠埃希菌：取样分别接种于麦康凯琼脂及血琼脂平板，经35℃培养18～24h，挑取发酵乳糖的菌落穿刺接种三糖铁（KLA）和尿素动力靛基质（UMI）培养基进行初步生化鉴定，并进行血清学分型。

沙门菌和志贺菌：取样分别接种于SS琼脂平板和麦康凯琼脂平板；必要时接种GN

增菌液，置35 ℃培养6h 后，再分别转种上述平板，35 ℃培养18 ～24h ，挑取可疑菌落接种KIA 和UMI 培养基，根据生化反应和血清学分型结果做出最终鉴定。

霍乱弧菌：取粪便标本直接接种碱性胨水，35 ℃培养6 ～8h 后转种4 号琼脂或TCBS 平板，35 ℃培养16 ～18h ，挑取可疑菌落进行生化和血清学等鉴定，必要时可作2 次增菌后分离鉴定。

副溶血弧菌将标本接种于副溶血弧菌增菌液，同时接种副溶血弧菌选择性平板和SS 琼脂平极，35 ℃培养18 ～24h ，挑取可疑菌落接种KIA 、MI 培养基及作耐盐试验进行鉴定。

小肠结肠炎耶尔森菌：将标本接种小肠结肠炎耶尔森菌培养基及麦康凯琼脂培养基，分别置22 ～25 ℃及35 ℃培养48h ，前者用于分离小肠结肠炎耶尔森菌，后者用于分离沙门菌和志贺菌，挑取可疑菌落接种KIA 和UMI 培养基进行鉴定。

难辨芽胞梭菌：将标本立即接种环丝氨酸－甲氧头孢菌素－果糖琼脂（CCFA）平板；也可将粪便作10－6 ～10－2 稀释后定量分离培养，厌氧培养48h ，挑取可疑菌落进行鉴定。

空肠弯曲菌：取液状或带血粪便标本立即接种于弯曲菌选择培养基（Camp －BAP 血琼脂）或接种CEM 空肠弯曲菌增菌培养基（经43 ℃微需氧培养18 ～48h 后，再接种于上述选择培养基上），在43 ℃微需氧（亦可用烛缸）条件下培养，最好采用混合气体（85 %氮气、10 %二氧化碳、5 %氧气）的方法，培养24 ～48h ，观察菌落特征，挑取可疑菌落进行鉴定。

结核分枝杆菌将粪便标本首先进行培养前处理，然后接种L －J 培养基，置35 ℃培养6 ～8 周，挑取可疑菌落进行鉴定。

念珠菌将标本接种于含氯霉素的沙保罗琼脂平板和血琼脂平板，置25 ～30 ℃和35 ℃培养24 ～48h ，取培养物进一步鉴定。

【检验流程】

见图6 －5 －4 。

【报告方式】

引起人类腹泻的细菌，不少要求特殊培养，因此分离粪便中的致病菌时，若未提供上述各类菌种生长的必要条件，培养阴性结果不应报告“无致病菌”或“未检出致病菌”。应以分离目的菌种的方式报告，如目前常规用SS 琼脂平板和麦康凯琼脂平板分离粪便中的致病菌，若培养阳性，报告“分离到沙门菌或志贺菌”；若培养阴性，报告“未检出沙门菌属和志贺菌”等。当粪便标本涂片染色显微镜镜检和细菌培养结果发现菌群异常如革兰阳性球菌（葡萄球菌或链球菌）或杆菌（芽胞梭菌）为主要细菌时应及时报告“菌群失调”。

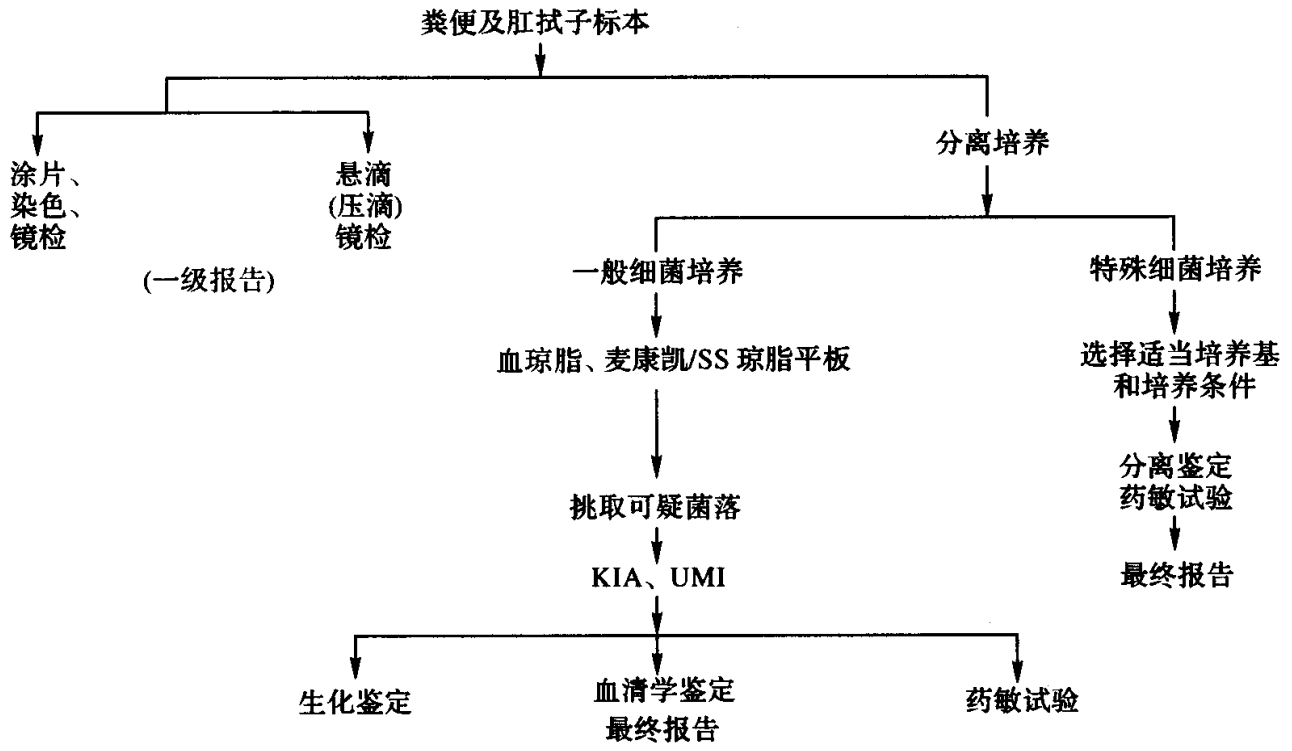


图6 -5 -4　粪便及肛拭子标本细菌检验流程

第五节　痰液及下呼吸道标本采集、处理与检验流程

【标本采集】

对可疑烈性呼吸道传染病（如SARS、肺炭疽、肺鼠疫等）患者采集检验标本时必须注意生物安全防护。痰液是临床微生物学实验室最常见的标本，但通常不是检验下呼吸道病原菌感染的最好标本。

1．采集指征

凡是发热、咳嗽和咳痰，痰呈脓性、黏稠或血性，并伴有胸痛、气急，肺部闻及湿啰音，外周血白细胞总数及中性粒细胞比例明显增高，线检查提示肺部有炎症性浸润或胸腔积液，甚至出现感染性休克和呼吸衰竭等患者，应采集痰液或下呼吸道标本。

2．采集方法

1）自然咳痰法：以晨痰为佳，采集标本前应用冷开水漱口，清洁口腔和牙齿。用力咳出呼吸道深部的痰，标本量应不少于1ml。咳痰困难者可雾化吸入加温至45℃的100g/L氯化钠溶液，使痰液易于排出。

2）支气管镜采集法、防污染毛刷采集法、环甲膜穿刺经气管吸引法、经胸壁针穿刺吸引法和支气管肺泡灌洗法取标本时，均应由临床医生按相应操作规程操作，并须注意尽可能避免咽喉部正常菌群的污染。

3）小儿取痰法：用弯压舌板向后压舌，将拭子伸入咽部，小儿经压舌刺激咳嗽时，可喷出肺部或气管分泌物粘在拭子上送检。幼儿还可用手指轻即胸骨柄上方，以诱发咳痰。

【常见病原菌】

正常人上呼吸道定植有大量的正常菌群，而气管、支气管和肺泡等下呼吸道通常无菌。临床呼吸道标本中常见革兰阳性菌有草绿色链球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、其他葡萄球菌、微球菌、消化链球菌、消化球菌、肠球菌、真杆菌、丙酸杆菌、乳酸杆菌、放线菌、奴卡菌、结核分枝杆菌、白喉棒状杆菌、类白喉棒状杆菌、念珠菌，革兰阴性菌有韦荣球菌、脑膜炎奈瑟菌、其他奈瑟菌、卡他莫拉菌、肺炎克雷伯菌及其他克雷伯菌、沙雷菌、变形杆菌、大肠埃希菌及其他肠杆菌科细菌、百日咳鲍特菌、不动杆菌、铜绿假单胞菌及其他假单胞菌属细菌、嗜肺军团菌、气单胞菌、流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、拟杆菌、梭杆菌。

【检验方法】

1．肉眼观察

观察痰液的颜色、粘度、有无血丝和是否呈脓性，如见有颗粒存在，则应注意可能与放线菌属及奴卡菌属感染有关。

2．显微镜检查

下呼吸道细菌学检验的标本均需涂片进行细胞学和细菌学显微镜检查，其目的是判别送检标本是否适合做细菌培养，并初步判定有否病原菌、病原菌的数量及其类别，有助于初步报告、选择培养基（如真菌）和对培养结果的综合分析。

1）涂片白细胞镜检：近年来推荐简单的方法是痰液标本涂片镜检＞10个白细胞／低倍镜时，就可判断合格并可用于细菌培养，尤其是白细胞减少患者的标本。

2）放线菌及奴卡菌涂片检验：将痰液用9g／L氯化钠溶液洗涤数次，然后挑取黄色颗粒（硫磺颗粒）或不透明的着色斑点，置载玻片上并覆以盖玻片，轻轻挤压，置高倍镜下观察，如见中央为交织的菌丝，且其末端呈较粗杆形呈放线状排列，揭去盖玻片，干燥后作革兰及抗酸染色镜检。

3）若镜检发现中间部的菌丝为革兰阳性，而四周放射的末梢菌丝为革兰阴性，抗酸染色为非抗酸菌，可报告送检标本肉眼观察的结果与涂片染色细胞学和细菌学显微镜镜检的描述性报告“直接涂片见白细胞内或白细胞外有大量或少量革兰阳性杆菌形似放线菌”。

4）若镜检发现革兰染色及形态学特性与放线菌相似，但抗酸染色为弱抗酸性时，可报告送检标本肉眼观察的结果与涂片革兰染色白细胞和细菌学显微镜镜检的描述性报

告“直接涂片见白细胞内或白细胞外有大量或少量细菌形似奴卡菌”。

3．分离培养

1）标本前处理：不含或含黏液很少的标本，可直接接种；含大量黏液的标本，应加入等量的液化剂（如pH7.6 的10g/L 胰酶溶液等），放置35 ℃待充分液化再行接种，亦可加液化剂后用旋转混匀器搅拌混匀，3000r/min 离心10min 弃上清液，取沉淀物接种培养基。

2）普通细菌培养：包括①血琼脂平板培养，适用于分离肺炎链球菌和其他细菌；②加抗生素的巧克力琼脂平板培养，适用于分离嗜血杆菌；③麦康凯/中国蓝琼脂平板培养，适用于分离革兰阴性杆菌。处理后的痰液标本应分别8 区划线接种于血琼脂平板、巧克力琼脂平板和麦康凯琼脂/中国蓝琼脂平板，35 ℃下孵育；血琼脂平板和巧克力琼脂平板需置5 %二氧化碳环境，详见图6 -5 -5 。

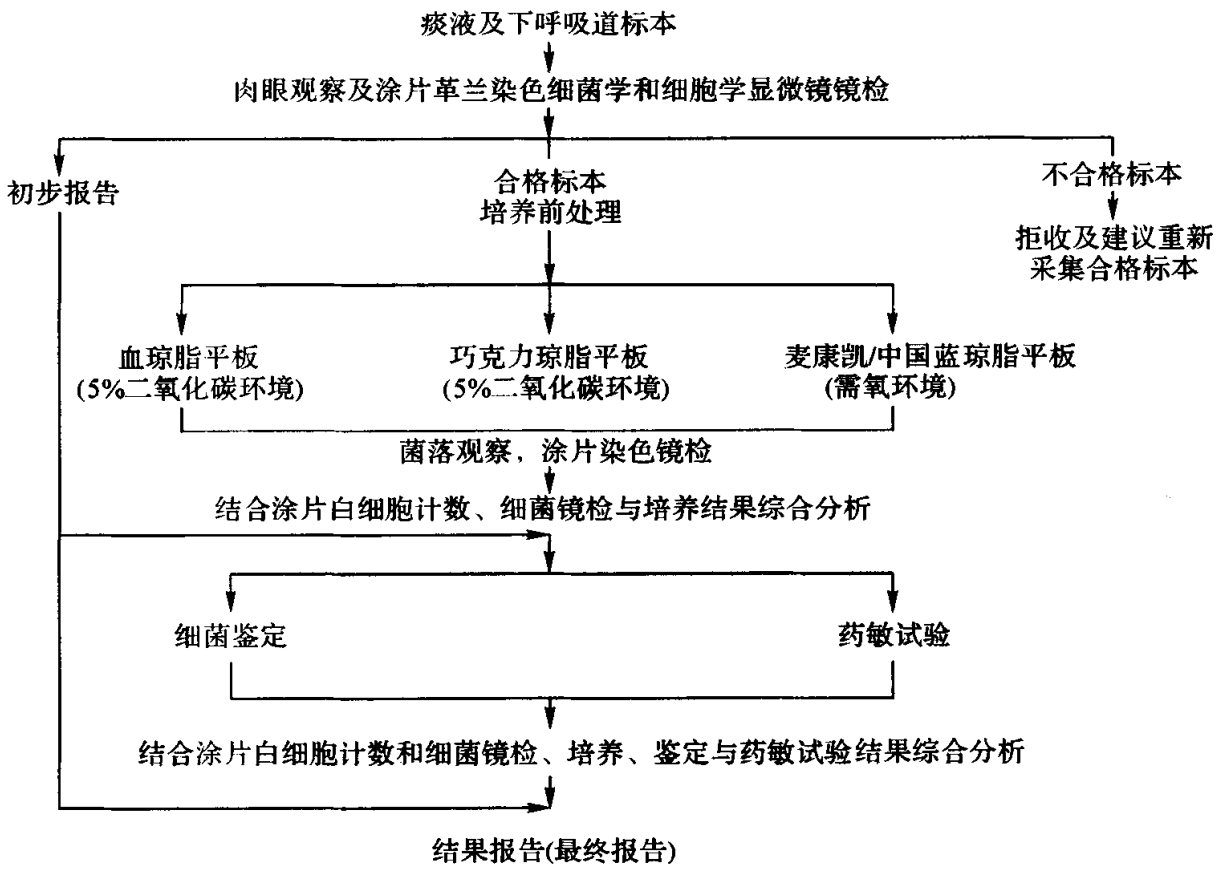


图6 -5 -5　痰液及下呼吸道标本细菌学检验流程

3）苛养菌培养：

嗜肺军团菌培养：将均质化的标本分别接种于血琼脂平板、巧克力琼脂平板和BCYE 平板，置35 ℃5 %二氧化碳环境中培养。若上述培养基中24h 内有细菌生长，则此菌不是军团菌；若在BCYE 平板上48h 后生长，而血琼脂平板和巧克力琼脂平板上不生长，此菌可能是军团菌，应进一步鉴定。

百日咳鲍特菌培养：将鼻咽拭子标本直接接种鲍－金琼脂平板上，亦可采用咳碟法接种。由于此菌生长缓慢，往往需要3～5d，饱和湿度对其生长有利，故将培养平板置于盛有少许水分的容器内进行培养，35℃培养48～72h后进一步进行细菌学检验。

厌氧菌、结核分枝杆菌、真菌、支原体和衣原体等培养见第八章。

4．半定量培养

由于下呼吸道细菌学定量培养实际操作困难，而半定量培养与定量培养两者具有较好的相关性，目前我国临床微生物学实验室多采用半定量培养法。不含或含黏液很少的标本，可直接接种；含大量黏液的标本，按要求将痰标本进行培养前处理后取沉淀物分三区划线分离接种平板，培养后判断各区内细菌菌落数，分别以＋（极少量）、＋＋（少量）、＋＋＋（中量）和＋＋＋＋（多量）表示。分区划线分离接种平板技术的好坏与判定细菌半定量培养结果至关重要。判定标准和临床意义见表6－5－1。

表6－5－1　下呼吸道感染标本细菌半定量培养结果判定标准及临床意义

级别	各区菌落数目			相当于菌落数（cfu/ml）	临床意义
	第一区	第二区	第三区		
极少量	<10			$\leq 10^4$	多为污染菌
少量	>10	<5		10^5	污染可能，建议重复培养
中量	>10	>5	<5	10^6	感染可能，建议重复培养
多量	>10	>5	>5	$\geq 10^7$	多为感染病原菌

分离培养的某一种细菌的相似菌落计数为多数菌落，或半定量培养结果为＋＋＋～＋＋＋＋的菌称为优势菌。

【结果分析】

痰液及下呼吸道分泌物标本易受到上呼吸道正常菌群的污染，从送检标本（检验流程见图6－5－5）中通常可分离出多种细菌，确定真正能代表下呼吸道感染的分离菌，对临床诊断与治疗感染性疾病至关重要。在实际工作中，有时由于细菌生长速度不一，如肺炎链球菌可能被生长速度快的细菌（包括正常菌群）菌落掩盖，不仔细观察就会忽略检验。

当在同一培养基上分离出1种以上的病原菌（复合菌）时，应主动与临床医师联系，结合患者的临床症状、痰涂片染色显微镜镜检及近期细菌培养结果（如近期同一患者多次分离培养出同一种菌）等综合判断所分离的多种细菌中哪一种菌可能为致病菌（优势菌）。当分离优势菌与涂片染色显微镜镜检结果相符时，优势菌必须进行药敏试验。若分离培养结果与涂片染色显微镜镜检结果不相符时，可不进行药敏试验（以免误

导），仅报告分离细菌鉴定结果。

【报告方式】

1．初步报告

应包括标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征的描述性报告（发现有诊断价值时可及时口头报告，但应按要求详细记录）。

2．最终报告

报告应包括送检标本肉眼观察的结果、标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征的描述性报告、分离致病菌的鉴定结果、药敏试验结果和评述性意见（建议）等。

3．标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征的描述性报告

1）细菌学镜检的描述性报告：如镜检见到排列成葡萄状的革兰阳性球菌，可报告“找到革兰阳性球菌，形似葡萄球菌”；如见到瓜子仁形呈矛头状，成双排列，具有明显荚膜的革兰阳性球菌时，可报告“找到革兰阳性球菌，形似肺炎链球菌”：如见到不易识别的细菌时则报告“找到革兰×性×形细菌”。

2）白细胞镜检计数的描述性报告：包括白细胞数/低倍镜、细胞内有否含有细菌和胞内细菌染色及形态学特性。

4．结果报告形式

1）标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征未发现有临床诊断意义结果（可不用初步报告），细菌分离培养均为正常菌群时，最终检验结果应报告“正常菌群”。当分离培养出少量病原菌，培养结果与涂片染色显微镜镜检结果不相符时可不做药敏试验（以免误导），最终检验结果仅报告分离细菌鉴定结果。

2）标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征发现有诊断价值时，细菌分离培养检出优势菌，并与涂片染色显微镜镜检结果相符时，除及时初步报告外，最终检验结果应报告标本肉眼观察的结果、标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征的描述性报告、优势菌鉴定的规范细菌名称和药敏试验结果和评述性意见（建议）等。

3）标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征发现有诊断价值时，细菌分离培养未检出优势菌，涂片染色显微镜镜检与细菌分离培养结果不相符时，除及时初步报告外，最终检验结果应报告标本肉眼观察的结果、标本涂片染色镜检白细胞计数和细菌染色与形态学特征的描述性报告。

第六节　穿刺液标本采集、处理与检验流程

穿刺液标本主要包括脑脊液、胆汁、胸水、腹水、心包液、关节液及鞘膜液等。上述体液正常情况下是无菌的，在排除污染的情况下，一旦检出细菌均视为病原菌。

【标本采集】

1．脑脊液

(1) 采集时间：怀疑为脑膜炎者，应立即采集脑脊液，最好在使用抗菌药物之前采集标本。

(2) 采集方法：无菌腰穿采集脑脊液3～5ml，分别注入3 支无菌试管，每支试管脑脊液量为1～2ml。如用于检测细菌或病毒，脑脊液量应不少于1ml；如果用于检测真菌或抗酸杆菌，脑脊液量不少于2ml。

2．胆汁等其他穿刺液

(1) 采集时间：一般在患者使用抗菌药物之前或停止用药后1～2d 采集。

(2) 采集方法：用针穿刺法抽取标本或外科手术方法采集标本，然后注入无菌试管或小瓶内，立即送实验室。尽可能采集较多的量，至少1ml。

【常见病原微生物】

1．脑脊液中常见病原菌

革兰阳性球菌如葡萄球菌、B 群链球菌、A 群链球菌、消化链球菌、肺炎链球菌、肠球菌等；革兰阴性球菌如脑膜炎奈瑟菌、卡他莫拉菌等；革兰阳性杆菌如炭疽芽胞杆菌、结核分枝杆菌、产气荚膜芽胞梭菌、产单核李斯特菌等；革兰阴性杆菌如流感嗜血杆菌、产气肠杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、假单胞菌、拟杆菌、无色杆菌、不动杆菌、脑膜败血性黄杆菌；其他如新型隐球菌、白色念珠菌、病毒、寄生虫和钩端螺旋体等。

2．胆汁中常见病原菌

革兰阳性球菌如肠球菌、厌氧链球菌、葡萄球菌，革兰阴性球菌如肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、变形杆菌、产气肠杆菌、假单胞菌、伤寒及其他沙门菌、脆弱拟杆菌、产碱杆菌属和气单胞菌等。

3．其他穿刺液中常见病原微生物

革兰阳性球菌如肺炎链球菌、A 群链球菌、葡萄球菌、草绿色链球菌、厌氧性链球菌、肠球菌，革兰阴性球菌如淋病奈瑟菌；革兰阳性杆菌如结核分枝杆菌、类白喉棒状

杆菌、产气荚膜芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌，革兰阴性杆菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、梭杆菌、拟杆菌、假单胞菌属、军团杆菌、变形杆菌、流感和副流感嗜血杆菌、沙门菌属、不动杆菌属、产碱杆菌属、产气肠杆菌；其他如放线菌、奴卡菌、真菌、支原体、病毒、立克次体和寄生虫等。

【检验方法】

1．涂片染色镜检

肉眼观察混浊或脓性穿刺液可直接涂片，或将标本3000r/min 离心10～15min，用沉淀物涂片、染色镜检。根据各种感染微生物的形态和染色特性，可初步提示感染细菌的种类，如脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌、抗酸杆菌和新型隐球菌等。

2．培养

1）普通细菌培养：直接将穿刺液或离心后沉淀物分别接种血琼脂平板、麦康凯琼脂平板和疱肉汤，置35℃培养18～24h，观察有无细菌生长。如果无细菌生长，再转种疱肉汤，继续培养至72h，仍无细菌生长者，可报告“无细菌生长”。如果有细菌生长，应根据菌落特点和菌体染色形态，初步判断细菌的种类，并进一步作生化反应及血清学检查加以鉴定，并作出报

2）苛养菌培养：包括脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、流感嗜血杆菌、结核分枝杆菌、新型隐球菌及厌养菌等特殊细菌的培养，详见第八章。

3．特殊检查

1）乳胶凝集试验：指直接测定释放在脑脊液中的各种细菌可溶性抗原。目前国外可供商品化试剂有肺炎链球菌，A 群、B 群、C 群脑膜炎奈瑟菌和抗B 型流感嗜血杆菌，定量隐球菌抗原，B 群链球菌抗原等。

2）分子生物学技术：包括DNA 或RNA 探针、PCR 技术等。

【检验流程】

见图6－5－6。

【报告方式】

排除标本污染，穿刺液中分离培养出的细菌均应报告鉴定及其药敏试验结果。

【注意事项】

1）穿刺液细菌涂片或培养标本采集后应在2h 内送至微生物学实验室，不可置于4℃冰箱内。

2）穿刺液培养时，建议同时作血培养。

3）为防止穿刺液凝固，应在无菌试管中预先加入灭菌肝素。

4）深部脓液穿刺物作普通细菌培养时，同时作厌氧菌培养。

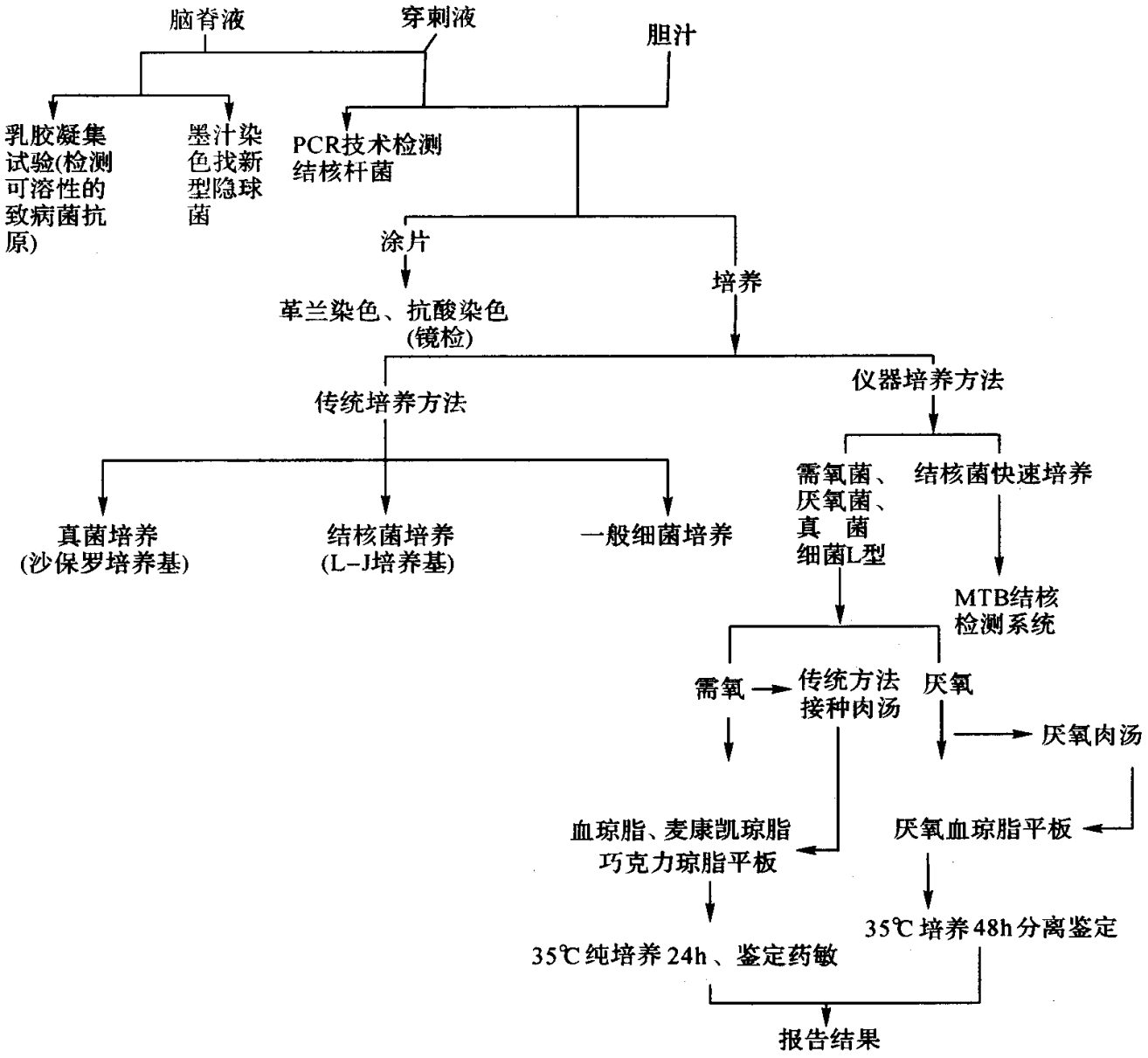


图6－5－6　穿刺物标本细菌检验流程

第七节　泌尿生殖道标本采集、处理与检验流程

【标本采集】

1）尿道分泌物：①男性患者清洗尿道口，采取从尿道口溢出的脓性分泌物或用无菌拭子从尿道内2～4cm 处取出分泌物。如无脓液溢出，可通过按摩，促使分泌物溢出。②女性患者清洗尿道口后，通过阴道内诊压迫尿道或向前按摩，使分泌物溢出。无肉眼可见的脓液，可用灭菌拭子轻轻深入前尿道内采集标本。

2）巴氏腺、尿道旁腺分泌物：清洗或局部消毒后，压迫腺体可使分泌物溢出，集于灭菌容器或用灭菌拭子蘸取。

3）阴道、宫颈分泌物：用窥器扩张阴道，用灭菌棉拭子采取阴道口或宫颈管1～

2cm 处分泌物培养或涂片镜检。

4）宫腔分泌物：在怀疑有急性宫腔内感染时，原则上不采取宫腔分泌物，以免引起感染播散；必要时用灭菌导管抽取，导管外套一层保护膜，经子宫颈插入宫腔后再刺穿保护膜抽取分泌物。

5）前列腺按摩液：清洗尿道口，冲洗尿道膀胱后，用前列腺按摩法采集前列腺按摩液，用无菌容器收集。

6）精液：受检者应5d 以上未排精，清洗尿道口，采用手淫法或体外排精法，射精于灭菌容器送检。

7）溃疡分泌物：用灭菌9g/L 氯化钠溶液清洗患处，用无菌拭子取其边缘或基底部的分泌物，置灭菌试管内送检。

8）组织标本：感染部位的组织可作组织印片和培养。一、二期梅毒感染时可取活体组织荧光抗体染色或镀银染色，检查病原体；组织磨碎成细胞匀浆接种于液体培养基。

【常见病原微生物】

与人体生殖器官感染有关的常见病原微生物有金黄色葡萄球菌、腐生葡萄球菌、无乳链球菌、屎肠球菌、化脓链球菌、粪肠球菌、聚团肠杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、淋病奈瑟菌、坏死梭杆菌、表皮葡萄球菌、消化球菌属、普通类杆菌、产黑色素类杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、阴道加德纳菌、奇异变形杆菌、芽胞梭菌属、消化链球菌、双向类杆菌、脆弱类杆菌、白色念珠菌、球拟酵母菌、热带念珠菌、梅毒螺旋体、沙眼衣原体、人型支原体和解脲脲原体等。

【检验方法】

1．涂片镜检

1）不染色标本：取清洁玻片1 张，加1 滴无菌9g/L 氯化钠溶液，将采集的标本与之混匀，覆盖盖玻片后镜检。适用于观察标本清洁度、线索细胞、细菌的数量和形态及其运动性。

2）染色标本：①单染色：亚甲蓝单染色湿片观察线索细胞和淋病奈瑟菌，单染也用于镜检阴道念珠菌假菌丝或孢子；②革兰染色：用以观察细菌的形态及染色性、炎症细胞的数量及线索细胞，有无念珠菌假菌丝及孢子等；③荧光染色：取尿道、宫颈及溃疡处分泌物或脓液在洁净玻片上制备成涂片，经特异性荧光抗体染色后置显微镜下镜检；④镀银染色：梅毒螺旋体镀银染色呈黑褐色，可见螺旋状结构。

2．培养

1）普通细菌培养：取标本接种血琼脂平板和（或）麦康凯琼脂平板进行培养、分

离和鉴定。

2）淋病奈瑟菌培养：接种改良的TM 培养基或NYC 培养基或巧克力琼脂平板或血琼脂平板，置70％湿度、5％～10％二氧化碳环境，35℃孵育24～48h，进一步鉴定。

3）沙眼衣原体、支原体和杜克嗜血杆菌培养，详见第八章。

【报告方式】

由于泌尿生殖道通常定植有正常菌群，因此报告分离菌的鉴定结果及抗菌药物药敏试验结果。

【注意事项】

1）生殖器是开放性器官，标本采集过程中应严格遵循无菌操作规程以减少杂菌污染。

2）阴道内有大量正常菌群存在，采取宫颈标本应避免触及阴道壁。

3）疑有宫腔感染，如遇产妇需行剖宫产，待胎儿娩出后取宫腔分泌物，并同时取婴儿耳拭子一同送检。

4）沙眼衣原体在宿主细胞内繁殖，取材时拭子应在病变部位停留十几秒钟，并采集尽可能多的上皮细胞。

5）疑有厌氧菌感染，标本采集和运送时避免与氧气接触，最佳方法是床边采样，直接接种至厌氧装置内。

第八节　烧伤患者感染标本采集、处理与检验流程

皮肤是人体抵抗微生物感染的天然屏障，存在于正常人皮肤表面的微生物群处于生态平衡，烧伤后随着机体抵抗力的下降与屏障功能的破坏，很容易引起创面或全身感染如败血症等。正确、及时地采集创面感染等标本进行分离培养、鉴定与药敏试验，对临床抗感染治疗至关重要。

【标本采集】

1）烧伤12h 后用无菌棉拭子以无菌操作直接从多个烧伤创面取样。

2）严重烧伤患者易发生败血症，应同时做血液细菌培养。初次血培养可作普通需氧瓶、普通厌氧瓶；若长期使用抗菌药物后采血，标本应接种在加有青霉素酶、对氨基苯甲酸等高渗需氧瓶或高渗厌氧瓶等，每瓶标本量为5～10ml。

【常见病原微生物】

烧伤12h 后创面可出现大量病原微生物如金葡萄球菌、A 群链球菌、肠球菌、消化链球菌、产气荚膜杆菌、坏疽芽胞梭菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、产气肠杆菌、枸

椽酸杆菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌、阴沟肠杆菌、坂崎肠杆菌、亚氏肠杆菌、粘质沙雷菌、普罗威登斯菌、不动杆菌、脆弱类杆菌、聚团肠杆菌、吉氏肠杆菌，以及念珠菌、曲霉菌、毛霉菌、青霉菌、镰刀菌、单纯胞疹病毒、巨细胞病毒、水痘疱疹病毒、牛痘疱疹病毒等。

【检验方法】

1．涂片镜检

取脓性分泌物直接涂片，将革兰染色镜检的检验结果初步报告临床。

2．培养

1）需氧菌：将带有脓汁的棉拭子，分别接种血琼脂平板和麦康凯琼脂平板，并置肉汤中增菌，于35 ℃培养16 ~18h，进一步鉴定。

2）厌氧菌、真菌：见第八章。

【检验流程】

见图6 -5 -7。

【报告方式】

报告分离菌鉴定结果及药敏试验结果。

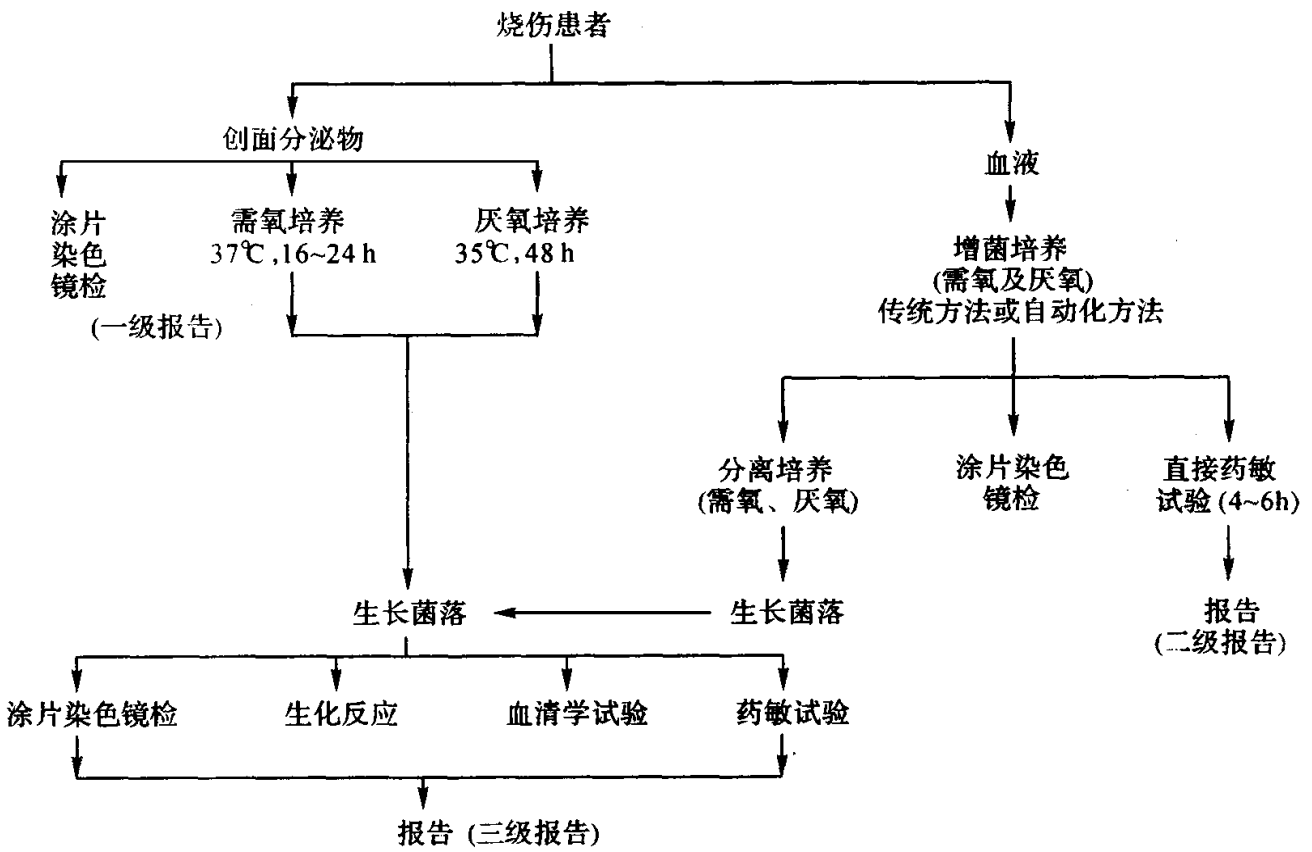


图6 -5 -7　烧伤患者感染标本检验流程

第九节　厌氧菌感染标本采集、处理与检验流程

厌氧菌感染是一种内源性感染，当感染患者常规细菌培养阴性时，不能排除厌氧菌感染的可能。厌氧菌感染可遍及临床各科、人体的各个器官和组织，而大部分与需氧菌混合感染。厌氧菌感染标本的正确采集、处理与检验有助于临床诊断与治疗。

【标本采集】

采集厌氧菌感染标本必须注意尽可能防止污染正常菌群和与空气接触。标本采集好后，应尽快送到实验室，最迟不超过半小时。标本不应放在冰箱内，低温对一些厌氧菌有害，且低温下标本吸收氧气较多。

1．标本采集

通过严格无菌操作，抽取血液、胸腔液、腹腔液、心包液、关节液、胆汁、脑脊液及通过外科无菌手术抽出的脓液等。抽取液体标本后，尽快排出空气，有条件可床边直接接种，置便携式厌氧装置内或直接运送（或接种至运送培养基内）。

2．标本运送

1）注射器运送法：液体标本如脓汁、胸腹水等，尽快送往临床微生物学实验室。用无菌针筒抽取标本时，必须先排除多余的空气。

2）无氧小瓶运送法：密封玻璃小瓶内装入1/2量的运送培养基，保持无氧状态并经过高压灭菌。

3）组织块运送法：组织块置于密闭的厌氧罐中运送。

4）大量液体标本运送法：装满标本瓶，即刻驱除氧，加盖运送。

5）棉拭子运送法：一般不采用该方法。

【常见厌氧菌】

从感染标本中分离的革兰阳性厌氧球菌有消化球菌属、消化链球菌属、矛状消化链球菌、厌氧消化链球菌、中间型消化链球菌、微小消化链球菌等，革兰阴性球菌有韦荣球菌，革兰阴性杆菌有脆弱类杆菌、产黑素类杆菌、核梭杆菌、坏死梭杆菌、死亡梭杆菌等，革兰阳性无芽胞杆菌有痤疮丙酸杆菌、贪婪丙酸杆菌、衣氏放线菌等，厌氧革兰阳性芽胞杆菌有破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、肉毒杆菌、难辨芽胞梭菌等。

【检验方法】

1．涂片镜检

取标本制备涂片后染色镜检，根据细菌染色特性及菌体形态特征，初步判断有否厌氧菌感染并为选择合适培养基提供依据，同时有利于分离菌的鉴定。

2．培养

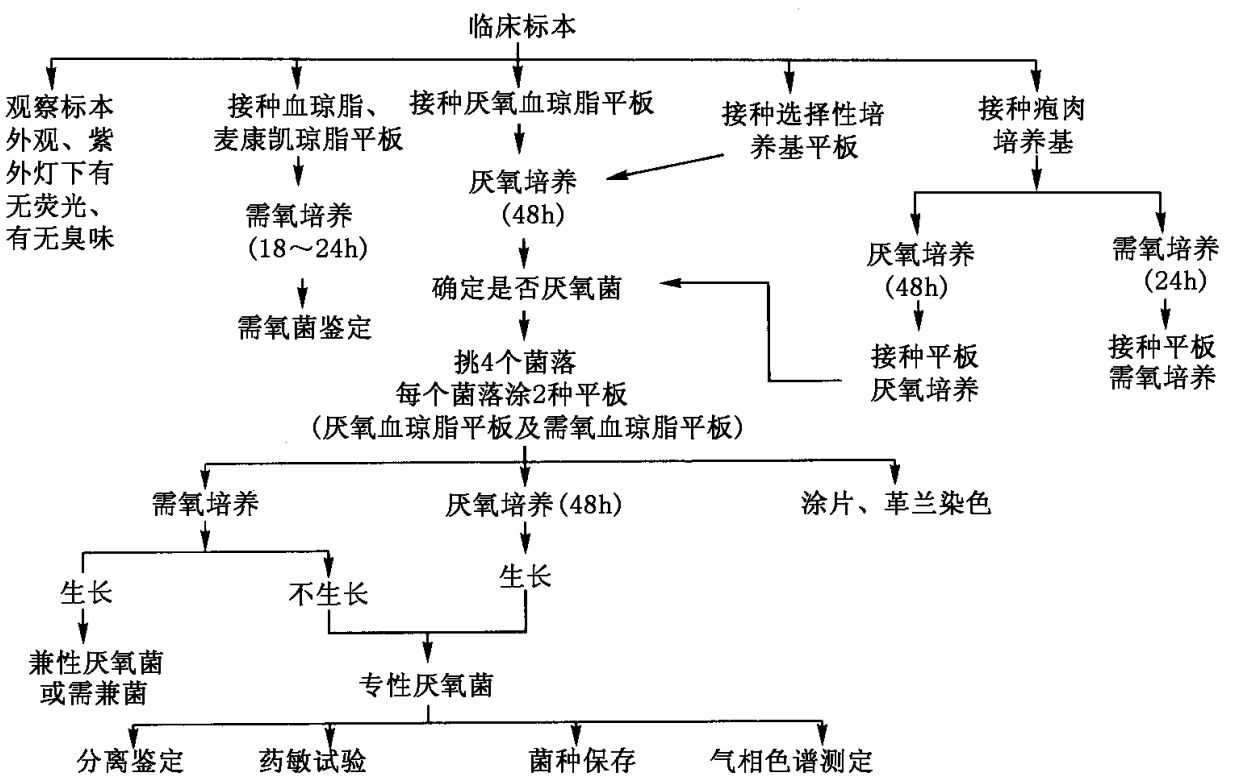


图6－5－8　厌氧菌检验流程

(1) 培养基：①选择性培养基：标本除接种厌氧血琼脂平板外，还可根据涂片镜检情况确定接种哪种选择性培养基。常用选择性培养基有卡那霉素、万古霉素溶血琼脂平板，卡那霉素、胆汁七叶苷琼脂平板，环丝氨酸、头孢甲氧噻吩、果糖和蛋黄琼脂平板；②液体培养基：接种前，液体培养基煮沸10min，排除其中空气，待迅速冷却后在底部接种。包括疱肉葡萄糖培养基、脑心浸液及硫乙醇酸钠培养基，后两种需要补充氯化血红蛋白（5μg/ml）、维生素K（10μg/ml）及半胱氨酸（500μg/ml）。

(2) 培养装置：①厌氧手套箱：价格较昂贵，适合大量标本的培养及鉴定操作，临床使用较少。②厌氧缸法和气袋法：接种完标本后将平板放人缸内，撕开气体发生袋立即放入缸内，迅速密闭厌氧缸，置35℃培养至少48h。或用含气体发生药片的气袋，加入10ml水，放触酶、亚甲蓝或刃天青指示剂。此法方便，可床边接种。

【检验流程】

见图6－5－8。

第十节　真菌感染标本采集、处理与检验流程

真菌通常按其感染部位不同分成两类：将侵犯皮肤、头发、指（趾）甲，引起癣病的称之为浅部真菌；而侵犯深部组织脏器或全身感染的称之为深部真菌。按其致病性可分成致病性真菌和条件致病性真菌。正确采集和处理标本有助于真菌感染性疾病的诊断与治疗。

【标本采集】

1．浅部真菌感染标本

（1）皮肤：皮肤癣菌病采集皮损边缘的鳞屑。采集前用75％乙醇消毒皮肤，待挥发后用手术刀或显微镜玻片边缘刮取感染皮肤边缘，刮取物放人无菌培养皿中送检。皮肤溃疡采集病损边缘的脓液或组织等。

（2）指（趾）甲：甲癣采集病甲下的碎屑或指（趾）甲。采集前用75％乙醇消毒指（趾）甲，去掉指（趾）甲表面部分，尽可能取可疑的病变部分，用修脚刀修成小薄片，5～6 块为宜，放人无菌容器送检。

（3）毛发：采集根部折断处，至少5～6 根。

2．深部真菌感染标本

（1）血液：采样量视真菌培养方法而定，一般为8～10ml。如用溶解－离心法，成人则需抽血15ml 加入2 支7.5ml 的isolator 管中，适用于细胞内寄生菌如荚膜组织胞浆菌和新型隐球菌的培养。采血后应立刻送检，如不能及时送检，血培养瓶应放室温环境，但不要超过8～9h，否则影响血中真菌的检测。

（2）脑脊液：采样量不少于3～5ml，分别加入两支无菌试管送检。一管作真菌培养或墨汁染色，另一管可用于隐球菌抗原检测或其他病原菌培养。

（3）其他深部真菌感染标本：呼吸道、泌尿生殖道等标本，采集及送检方法与细菌学检验相同，请参阅有关章节。

【常见病原菌】

临床常见真菌感染类型及病原菌见表6－5－2。

【检验方法】

1．涂片镜检

（1）标本处理：将一小块标本放在清洁的玻片上，加100～200g/L 氢氧化钾溶液1～3 滴，在酒精灯上来回移动加热数秒，加上盖玻片，或加上盖玻片后放室温15min 左右，待标本溶解。先用低倍镜检查，再用高倍镜检查，观察是否有孢子、菌丝等；黏膜

和小组织块标本放在玻片上加9g/L 氯化钠溶液数滴（视标本量确定），加盖玻片后在显微镜下检查，本法适用于皮屑、黏膜或指（趾）甲、断发残根标本。

(2) 染色镜检：①正染色：此法适用于多种标本及培养物。将临床标本固定于洁净玻片上，加染色液直接使真菌着色。常用染色法有乳酸酚染色、HE 染色、革兰染色、瑞特染色等。②负染色：真菌不着色背景着色，用于检查新型隐球菌。将离心后的脑脊液标本与1～2 滴墨汁混匀，加盖玻片后镜检。

表6-5-2　临床常见真菌感染类型及病原菌

类　型	疾　病	真　菌
皮肤感染	花斑癣	秕马拉色菌
	毛结节癣	吉利丝孢酵母（白色）、何德毛结节菌（黑色）
	掌黑癣	尼克暗色丝孢霉
	皮肤癣菌病	癣菌属、表皮癣菌属、小孢子菌属
	表皮真菌病	拟壳蠕孢属
	皮肤、粘膜念珠菌病	白色念珠菌及相关菌
皮下感染	着色芽生菌病	裴氏着色真菌及相关菌
	暗色丝孢霉病	皮炎着色霉等
	真菌性足菌肿	波氏假性阿利菌、足菌种马杜拉等
	鼻孢子菌病	孢子菌
	孢子丝菌病	申克孢子丝菌
全身感染		
致病菌感染	组织胞浆菌病	荚膜组织胞浆菌
	芽生菌病	皮炎芽生菌
	副球孢子菌	巴西副球孢子菌病
	球孢子菌	粗球孢子菌
条件致病菌感染	隐球茵病	新型隐球菌
	曲霉病	烟曲霉等
	接合菌病	毛霉属、犁头霉属、根霉属、中国林蛙
	粪霉、冠状耳霉	
	系统性念珠菌病	白色念珠菌及相关菌
	假性阿利菌病	波氏假性阿利菌

2．培养

(1) 培养基：常用培养基为沙保罗琼脂。曲霉菌和青霉菌还需加察氏培养基或麦芽

浸膏培养基，毛霉菌和暗色孢科真菌加马铃薯葡萄糖琼脂培养基。培养基中加入抗生素如氯霉素、庆大霉素等抑制细菌生长，加入放线菌酮抑制腐生真菌生长。根据培养要求，标本可接种沙保罗斜面培养基或沙保罗琼脂平板培养基。皮肤真菌中除疣状毛癣菌需在35 ℃培养外，其他皮肤真菌均能在25 ～28 ℃生长。深部真菌一般在25 ℃或37 ℃培养。血液、骨髓等无菌体液也可采用沙保罗液体培养基，但目前血培养多采用半自动或全自动仪器，培养基为各仪器专用血培养瓶。一般7 ～10d 生长的为快速生长真菌，3周才有少许真菌生长的为缓慢生长真菌。

⑵ 培养方法：①大培养：将临床标本接种于沙保罗琼脂平板或斜面进行分离培养，观察菌落形态及颜色等。②小培养：此法又分为钢丝圈小培养和琼脂块小培养，可直接在显微镜下观察菌丝及孢子形态、结构，以鉴定菌种。③单孢子培养：用于真菌分子生物学或生理学的研究。④悬滴培养：观察孢子发芽，如暗丝真菌的芽管试验。

3．鉴定

丝状真菌各菌种因有较明确分化的器官，鉴定主要以形态学为主，必要时进行一些特殊试验；而酵母样菌因形态单一、外形相似，缺乏明确分化的器官，因此在形态学鉴定基础上，主要根据生理、生化试验如对碳源和氮源的利用试验等鉴定至种水平。

第十一节　病毒感染标本采集与处理

1．标本采集

根据临床与流行病学资料初步推断是什么病毒感染，应采取什么标本（见表6－5－3）。尽量在疾病的早期采集标本。尸解标本最好在患者死亡后6h 内采取。

⑴ 咽拭子标本：采集呼吸道病毒感染的标本，可让患者先咳嗽，以后口服15㎖ 5g/L 的乳蛋白水解物，反复含漱3 ～4 次再吐入容器内；儿童患者不易取材，常应用无菌棉拭子先沾好0.5 %乳蛋白水解物，再涂拭咽后壁及扁桃腺前后组织，立即浸泡在乳蛋白水解物中。有的病毒不稳定，如合胞病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒等，应尽可能及早接种至敏感组织。

⑵ 血液标本：不需要加抗凝剂，如乙脑病毒主要存在于血清中，因此，全血或血清接种都可，如需加抗凝剂可用1 ∶1000 肝素，或将血液放入含有消毒玻璃珠的瓶内，振荡脱纤维。

⑶ 尿液标本：一般取中段尿，加双抗（抗菌素）防止细菌繁殖，立即置4 ℃冰箱中，最好在12h 内接种到敏感细胞或组织。

⑷ 粪便标本：一般留取粪便后应尽快送检。

表6－5－3　分离病毒时应采取的标本及宿主的选择

病毒名称	采取标本		选择宿主	接种途径
	临床	尸解		
(呼吸道感染)腺病毒	咽洗液、鼻咽拭子、痰	肺	细胞培养（人胚肾，二倍体，猴肾，人传代细胞)	
流感病毒	咽洗液、鼻咽拭子	肺	鸡胚、MDCK细胞	羊水腔
副流感病毒	咽洗液、鼻咽拭子	肺	人胚肾，猴肾	
鼻病毒	咽洗液、鼻咽拭子肺	原代或二倍体细胞		
肠道病毒、柯萨奇病毒 粪便、脑脊液	中枢神经组织、肠内容	原代或倍代细胞	脑内	
单纯疱疹病毒	咽洗液、脑脊液中枢神经系统细胞培养、乳鼠、鸡胚脑内、腹腔内、绒毛尿囊膜			
腮腺炎病毒	咽洗液、脑脊液	中枢神经系统	细胞培养、鸡胚	羊膜腔
狂犬病病毒	唾液	中枢神经系统小鼠	脑内	
乙型脑炎病毒	血液	中枢神经系统小鼠	脑内	
单纯疱疹病毒	水泡液、咽洗液、眼洗液、结膜拭子	中枢神经系统	细胞培养、乳鼠	脑内、腹腔内
水痘－带状疱疹病毒	水泡液、咽洗液	肝、脾	细胞培养、鸡胚	绒毛尿囊膜
风疹病毒	咽洗液	肺、肝脾	细胞培养	

2．标本运送

多数病毒对热不稳定，采取标本后应立即接种到敏感组织。如48h内能接种到敏感组织，可保存在4℃冰箱中，如需要空运时，应置冰壶内，于48h内送到实验室接种。

否则最好保存在－40 ℃以下。

3．标本处理

1）除菌处理：粪便、鼻咽拭子等标本，因带有大量的正常细菌，必须先经以下方法除菌处理。①高速离心沉淀法：先用细胞维持液将粪便制成20％悬液，再用普通离心机以3000r／min 离心15 min，除去粪便沉渣，取上清液用高速冷冻离心机在4 ℃下，以10000r／min 离心30 min，取上清液接种敏感细胞。如果不能立即接种可放－40 ℃以下保存。②加抗菌药物处理法：按上述方法制备悬液，低速离心沉淀，取上清液，按每毫升加入青霉素100U 和链霉素100 μg（根据标本污染情况增加用量）于试管中，放4 ℃冰箱过夜，再以3000r／min 离心30 min，取上清液接种于敏感组织或细胞，可放－40 ℃以下长期保存。鼻咽拭子加入上述抗生素后，放置4 ℃冰箱中4h，再2000r／min 离心20 min，即可接种敏感细胞，或放－40 ℃条件下保存。

2）研磨和稀释：应将组织在玻璃研磨器中充分研磨，游离脑、脊髓等组织细胞内的病毒，用细胞维持液稀释成10％悬液，离心沉淀后取上清液，尽快接种敏感细胞，如不能及时接种，应放－40 ℃以下保存。

4．检验方法

1）动物接种：常用的动物是出生后48h 左右的乳鼠，用于分离脑炎病毒和柯萨奇病毒。乳鼠连其母鼠，放在鼠罐内，消毒后将标本0.02 ml 注射到腹腔内。如果感染柯萨奇病毒A 型，乳鼠可出现强直性麻痹，最后死亡，在濒死前，取其肌组织研磨后制成悬液传代。如感染柯萨奇病毒B 型，发病缓慢，传代方法同前。

2）鸡胚接种：分离流感病毒和腮腺炎病毒，观察病毒生长中是否有血凝素产生，通过血凝试验证实。

3）细胞培养：根据病毒的种类选用各种细胞株。通常培养48h 后发现细胞病变，可收获，再传代，当48h 后细胞再发生病变时，对照细胞仍为阴性，初步判断病毒存在，可作病毒鉴定。

第六章　抗菌药物敏感试验

第一节　体外药敏试验抗菌药物选择与结果判断

一、体外药敏试验抗菌药物选择

近年来，由于广谱及超广谱抗菌药物在临床上广泛使用，细菌耐药性不断增加，新的耐药酶不断出现，不同种类的酶对抗菌药物的作用模式也不同。临床微生物学实验室应选择合适的抗菌药物用于体外药敏试验，为临床抗感染治疗提供依据。

㈠ 选择原则

抗菌药物敏感试验中药物种类的选择原则，由各级医院院内感染控制委员会、临床医师、药剂人员及微生物学检验人员等相互协商并根据本单位的实际情况制订，必须满足以下条件：

1）选用的抗菌药物应具备代表性及预示性。如选用苯唑西林检测金黄色葡萄球菌的耐药性，可提示金黄色葡萄球菌对其他β－内酰胺类抗菌药物的耐药性。

2）选用的抗菌药物有助于感染控制与流行病学的调查。

3）选用的抗菌药物应考虑分离菌株的来源，如临床分离的某菌株来自脑脊液，应选用能通过血脑屏障的抗菌药物进行体外药敏试验；否则，即使试验结果敏感，因临床治疗无效，就失去了药敏试验的意义。

4）选用的抗菌药物数量，可根据细菌种类或来源选择6～16 种。

㈡ 选择方案

在遵循上述原则基础上，依据NCCLS 标准选用抗菌药物进行药敏试验。

1．常见细菌药敏试验的抗菌药物选择

见表6－6－1～6－6－7。常用抗感染药物的分类见本章附录。

表6－6－1　肠杆菌科细菌抗菌药物敏感试验抗菌药物选择方案

方案	抗菌药物种类
首选试验	氨苄西林，氨苄西林/舒巴坦或阿莫西林/克拉维酸或哌拉西林/他唑巴坦或替卡西林/克拉维酸中任一种，头孢唑啉或头孢噻吩，头孢呋辛或头孢孟多，头孢西丁或头孢替坦，头孢噻肟或头孢他啶，头孢曲松或头孢哌酮中任选两种，头孢吡肟，头孢匹罗，庆大霉素，环丙沙星或左氧氟沙星或培氟沙星任选1～2种，亚胺培南，复方新诺明
次选试验	呋喃妥因，氯霉素，妥布霉素，卡那霉素，阿米卡星，氨曲南，奈替米星，四环素，诺氟沙星或氧氟沙星

注：①临床从肠道分离的沙门菌和志贺菌常规性试验应只做氨苄西林、复方新诺明及一种喹诺酮类抗菌药物的敏感试验；分离自肠道以外的沙门菌种应做多种抗菌药物的敏感试验，包括氯霉素和三代头孢菌素。②分离自脑脊液的肠杆菌科细菌，只需报告氨苄西林、头孢唑啉、头孢噻吩、庆大霉素的药敏试验结果。③应选合适的方法如双纸片法检测ESBLs；对产ESBLs细菌，不管实际药敏检测结果如何，所有青霉素类、头孢菌素类和氨曲南的试验结果均报告耐药

表6－6－2　假单胞菌属和不动杆菌属等药敏试验抗菌药物选择方案

方案	抗菌药物种类
首选试验	替卡西林或哌拉西林或萘洛西林中的一种，头孢他啶，氨曲南，头孢哌酮，头孢吡肟，亚胺培南或美洛培南，庆大霉素，阿米卡星，妥布霉素，环丙沙星等
次选试验	羧苄西林，头孢噻肟或头孢曲松，奈替米星，氯霉素，左氧氟沙星，四环素或诺氟沙星或氧氟沙星，复方新诺明等

注：作药敏试验时除铜绿假单胞菌和不动杆菌可用纸片扩散法，其他非发酵菌建议使用稀释法

表6－6－3　葡萄球菌属细菌药敏试验抗菌药物选择方案

方案	抗菌药物种类
首选试验	青霉素G，苯唑西林，头孢噻吩或头孢唑啉，红霉素或竟拉霉素或阿齐霉素，克林霉素，万古霉素，复方新诺明
次选试验	氯霉素，环丙沙星或左氧氟沙星或氧氟沙星，庆大霉素，四环素，利福平，呋喃妥因等

注：①青霉素G敏感的葡萄球菌对其他青霉素类、头孢菌素药物敏感。青霉素G耐药，苯唑西林敏感菌株，对β－内酰胺酶不稳定的青霉素类耐药，对β－内酰胺酶稳定的青霉素类、β－内酰胺酶抑制剂复合抗菌药物及头孢菌素类抗菌药物敏感。苯唑西林耐药的葡萄球菌对所有β－内酰胺类抗菌药物耐药。因此，只要从青霉素G及苯唑西林药敏试验结果，即可推断β－内酰胺类抗菌药物的敏感性，常规不必对这类抗苗药物进行药敏试验。②腐生葡萄球菌对苯哇西林的耐药性不稳定，应以每种

抗菌药物稀释法实际检测结果判定，不可采用上述标准

表6－6－4　肠球菌属和肺炎链球菌药敏试验抗菌药物选择方案

方案	肠球菌属	肺炎链球菌
首选试验	青霉素G或氨苄西林或万古霉素	青霉素G（或苯唑西林），红霉素，复方新诺明，氧氟沙星或左氧氟沙星或司帕沙星，四环素，万古霉素
次选试验	庆大霉素，链霉素，氯霉素，红霉素，四环素，利福平，环丙沙星，左氧氟沙星，呋喃妥因等	氯霉素，利福平

注：①在体外检测肠球菌对头孢菌素类、氨基糖苷类（除高水平耐药筛选外）、克林霉素、复方新诺明可出现敏感，但临床无效，应报告耐药。②不产β－内酰胺酶、青霉素G敏感的肠球菌，可预示氨苄西林、阿莫西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦的敏感性。来自血液、脑脊液的菌株，推荐做β－内酰胺酶试验。对严重肠球菌感染，如心内膜炎患者通常用青霉素或氨苄西林或用万古霉素加一种氨基糖苷类药物联合治疗。③耐万古霉素肠球菌，可选用氯霉素、红霉素、四环素、利福平等抗菌药物作药敏试验，并将检测结果报告临床。④可用阿莫西林、氨苄西林、头孢吡肟、头孢曲松、头孢呋辛、亚胺培南和美洛培南治疗肺炎链球菌感染，但作药敏试验时，建议不用纸片扩散法，而用稀释法。⑤从危重病患者（如脑膜炎、败血症）的血液和脑脊液中分离到肺炎链球菌，常规性试验应测青霉素G、头孢噻肟、头孢曲松和亚胺培南的MIC。其他标本的培养物可用苯唑西林筛选试验，若苯唑西林抑菌环小于19mm，应测青霉素G、头孢噻肟和头孢曲松的MIC。⑥氧氟沙星敏感的肺炎链球菌，左氧氟沙星也敏感；利福平不能单独用于治疗

表6－6－5　嗜血杆菌属细菌药敏试验抗菌药物选择方案

方案	抗菌药物种类
首选试验	氨苄西林或阿莫西林，氨苄西林/舒巴坦或阿莫西林/克拉维酸，头孢呋辛，头孢噻肟或头孢他啶或头孢曲松或头孢唑肟中的一种，氯霉素，复方新诺明，美洛培南
次选试验	阿齐霉素或克拉霉素，氨曲南，头孢克洛或头孢丙西或氯碳头孢中任一种，头孢克肟或头孢泊肟，头孢呋辛酯，环丙沙星或氧氟沙星或左氧氟沙星任一种，亚胺培南，利福平，四环素等

注：①从重危病（脑膜炎、败血症、会厌炎和面部蜂窝织炎）患者的血液和脑脊液中分离到流感嗜血杆菌，常规试验应报告氨苄西林、一种三代头孢菌素、氯霉素和美洛培南的药敏结果。②阿莫西林/克拉维酸、阿奇霉素、克拉霉素、头孢克洛、头孢丙烯、氯碳头孢、头孢地尼、头孢克肟、头孢泊肟和口服头孢呋辛酯抗菌药物可用于经验性治疗嗜血杆菌引起的呼吸道感染，上述抗菌药物对患者治疗时往往不做敏感试验，而在耐药性监测或流行病学调查时，才做敏感试验。③氨苄西林敏感试验结果可预报阿莫西林的活性，大多数耐氨苄西林和阿莫西林的流感嗜血杆菌分离株产生一种TEM型β－内酰胺酶。直接β－内酰胺酶试验是快速检出氨苄西林和阿莫西林耐药性的方法。④从细菌性脑膜

炎及败血症患者标本中分离的嗜血杆菌，应检测β－内酰胺酶

表6－6－6　淋病奈瑟菌药敏试验抗菌药物选择方案

方案	抗菌药物种类
首选试验	
次选试验	头孢克肟或头孢噻肟或头孢泊肟或头孢唑肟或头孢曲松，头孢西丁，头孢呋辛，头孢替坦，环丙沙星或氧氟沙星，青霉素G，壮观霉素，四环素

注：NCCLS 未推荐使用何种抗菌药物作为首选药敏试验，但可测β－内酰胺酶，结果阳性预示青霉素G 等耐药

表6－6－7　除肺炎链球菌外其他链球菌药敏试验抗菌药物选择方案

方案	抗菌药物种类
首选试验	青霉素G 或氨苄西林，红霉素，氯霉素，氯林可霉素，万古霉素等
次选试验	头孢噻肟或头孢曲松，头孢吡肟，左氧氟沙星，氧氟沙星等

注：①血液和正常无菌部位的体液分离到草绿色链球菌，应检测青霉素G 的MIC。②青霉素G、氨苄西林、左氧氟沙星、诺氟沙星的纸片扩散法解释标准仅适用于β－溶血性链球菌。③从尿道分离到的此类细菌，不选红霉素、氯霉素和克林霉素做常规药敏试验。④对FDA 批准治疗A 群、B 群链球菌的青霉素及其他β－内酰胺类抗菌药物，不需做常规敏感试验。发现万古霉素耐药或中介的A 群、B 群链球菌株，需送交参考实验室予以确认

2．其他细菌药敏试验的抗菌药物选择

1）结核分枝杆菌及其他分枝杆菌：NCCLS 暂定标准（M23－T）推荐选取以下抗菌药物进行药敏试验：乙硫异烟腙、乙胺丁醇、异烟肼、利福平、链霉素。

2）酵母样真菌：选用抗真菌药物5－氟胞嘧啶、两性霉素B、制霉菌素、伊曲康唑、咪康唑、益康唑、酮康唑、氟康唑等。

3）厌氧菌：厌氧菌的培养分离周期较长，一般不做药敏试验。但对严重感染病例，如心内膜炎、脑脓肿、肺脓肿、脓性胆管炎、骨髓炎等，体外药敏试验有重要的意义。选用抗菌药物氯霉素、克林霉素、红霉素、林可霉素、青霉素G、四环素、万古霉素、羧苄西林、氨苄西林、甲硝唑、环丙沙星、头孢菌素类等。

4）支原体：由于支原体为一类无细胞壁的微生物，选用的抗菌药物应避免作用于细胞壁的抗菌药物，可选红霉素、克拉霉素、乙酰螺旋霉素、强力霉素、交沙霉素、氧氟沙星、环丙沙星、阿奇霉素、四环素等（注：支原体的药敏试验只能用稀释法检测）。

二、体外药敏试验结果分析

1．体外药敏试验结果含义

1）敏感（susceptible，S）：表示受试菌株引起的感染可用推荐剂量抗菌药物治疗，处置（治疗）不当除外。

2）中介（intermediate，I）：分3 种情况：①表示受试菌株对被测定药物最低抑菌

浓度（MIC）能达到的血液或组织中浓度的应答率，可能低于相应的敏感菌株；②表示机体的适应性，机体某些部位在常规给药剂量下浓度较高（如喹诺酮类和β－内酰胺类抗生素在尿液中），或高剂量给药后产生的浓度对感染菌有抑制作用；③作为药敏检测的“缓冲区”，以防因微小的技术失误所导致的结果解释错误。纸片法药敏试验结果的抑菌环在此范围内的意义不很明确，如必需用此抗菌药物治疗，需通过稀释法确定其MIC。3）耐药（Resistant，R）：表示受试菌不能被常规剂量所能达到的组织或血液中的抗菌药物浓度所抑制。

4）最低抑菌浓度（Minimal inhibitory concentration，MIC）：抑制细菌生长的最低药物浓度。MIC_{90}表示抑制90％受试菌株生长的药物MIC值；MIC_{50}表示能抑制50％受试菌株生长的药物MIC值。

5）最低杀菌浓度（Minimal bactericidal concentration，MBC）：表示抗菌药物杀灭99.9％或以上受试菌所需的最低浓度。

2．药敏试验判断标准

通常以一菌一药一条标准的原则来判断，可参照NCCLS所列的标准。见表6－6－8～6－6－11。

3．药敏试验结果综合分析

1）对一个最佳组合的同类或同组抗菌药物的耐药表型进行观察。

2）根据观察的表型推测其对应的耐药机制。如金黄色葡萄球菌对苯唑西林耐药（MRSA）可能是MecA基因突变引起青霉素结合蛋白（PBP）改变或PBP过量产生所致。

3）以推测的机制分析耐药表型，如MRSA对所有β－内酰胺类药物耐药等。

表6－6－8　常见细菌药敏试验结果判断标准

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
青霉素类						
青霉素						
葡萄球菌	10*	≤28		≥29	β－内酰胺酶阳性	≤0.1
肠球菌	10*	≤14		≥15	≥16	≤8
产单核李斯特菌	10*	≤19		≥20	≥4	≤2
氨苄西林						
肠杆菌科细菌	10	≤13	14～16	≥17	≥32	≤8
葡萄球菌	10	≤28		≥29	β－内酰胺酶阳性	≤0.25

续表

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
肠球菌	10	≤16		≥17	≥16	≤8
产单核李斯特菌	10	≤19		≥20	≥4	≤2
羧苄西林						
铜绿假单胞菌	100	≤13	14～16	≥17	≥512	≤128
其他革兰阴性杆菌100	≤19	20～22	≥23	≥64	≤16	
甲氧西林						
金黄色葡萄球菌	5	≤9	10～13	≥14	≥16	≤8
美洛西林						
铜绿假单胞菌	75	≤15		≥16	≥128	≤14
其他革兰阴性杆菌75	≤17	18～20	≥21	≥128	≤16	
苯唑西林						
金黄色葡萄球菌	1	≤10	11～12	≥13	≥4	≤2
其他葡萄球菌	1	≤17		≥18	≥0.5	≤0.25
哌拉西林						
铜绿假单胞菌	100	≤17		≥18	≥128	≤64
其他革兰阴性杆菌100	≤17	18～20	≥21	≥128	≤16	
替卡西林						
铜绿假单胞菌	75	≤14		≥15	≥128	≤64
其他革兰阴性杆菌75	≤14	15～19	≥20	≥128	≤16	
青霉素类/β－内酰胺酶抑制剂						
阿莫西林/克拉维酸						
葡萄球菌	20/10	≤19		≥20	≥8/4	≤4/2
其他细菌	20/10	≤13	14～17	≥18	≥16/8	≤8/4
氨苄西林/舒巴坦						
革兰阴性肠道菌和10/10	≤11	12～14	≥15	≥32/16	≤8/4	
葡萄球菌						
哌拉西林/他唑巴坦						
铜绿假单胞菌	100/10	≤17		≥18	≥128/4	≤64/4

续表

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
其他革兰阴性菌100/10	≤17	18～20	≥21	≥128/4	≤16/4	
葡萄球菌	100/10	≤17		≥18	≥16/4	≤8/4
替卡西林/克拉维酸						
铜绿假单胞菌	75/10	≤14		≥15	≥128/2	≤64/2
其他革兰阴性菌	75/10	≤14	15～19	≥20	≥128/2	≤16/2
葡萄球菌	75/10	≤22		≥23	≥16/2	≤8/2
头孢菌素类						
头孢克洛	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢羟唑	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢唑啉	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢吡肟	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢他美	10	≤14	15～17	≥18	≥16	≤4
头孢克肟	5	≤15	16～18	≥19	≥4	≤1
头孢美唑	30	≤12	13～15	≥16	≥64	≤16
头孢尼西	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢哌酮	75	≤15	16～20	≥21	≥64	≤16
头孢噻肟	30	≤14	15～22	≥23	≥64	≤8
头孢替坦	30	≤12	13～15	≥16	≥64	≤16
头孢西丁	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢泊肟	10	≤17	18～20	≥21	≥8	≤2
头孢丙烯	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢他啶	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢布烯	30	≤17	18～20	≥21	≥32	≤8
头孢唑肟	30	≤14	15～19	≥20	≥32	≤8
头孢曲松	30	≤13	14～20	≥21	≥64	≤8
头孢呋辛酯（口服）	30	≤14	15～2	≥23	≥32	≤4
头孢呋辛钠	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢噻吩	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8

续表

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
氯碳头孢	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
拉氧头孢	30	≤14	15～22	23	≥64	≤8
碳青霉烯类						
亚胺培南（或美洛培南）	10	≤13	14～15	≥16	≥16	≤4
单酰胺菌素类						
氨曲南	30	≤15	16～21	≥22	≥32	≤8
糖肽类						
壁霉素（替考拉宁）	30	≤10	11～13	≥14	≥32	≤8
万古霉素						
肠球菌	30	≤14	15～16	≥17	≥32	≤14
其他革兰阳性菌	30	≤9	10～11	≥12	≥32	≤4
氨基糖苷类						
阿米卡星	30	≤14	15～16	≥17	≥32	≤16
庆大霉素						
肠球菌高水平耐药	120	6	7～9	≥10	>500	≤500
其他细菌	10	≤12	13～14	≥15	≥8	≤4
卡那霉素	30	≤13	14～17	≥18	≥25	≤6
乙基西羧霉素	30	≤12	13～14	≥15	≥32	≤12
链霉素						
肠球菌高水平耐药	300	6	7～9	≥10		
其他细菌	10	≤11	12～14	≥1.5		
妥布霉素	10	≤12	13～14	≥15	≥8	≤4
大环内酯类						
阿奇霉素	15	≤13	14～17	≥18	≥8	≤2
克拉霉素	15	≤13	14～17	≥18	≥8	≤2
红霉素	15	≤13	14～22	≥23	≥8	≤0.5
四环素类						
强力霉素	30	≤12	13～15	≥16	≥16	≤4

续表

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC 折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
米诺环素	30	≤14	15～18	≥19	≥16	≤4
四环素	30	≤14	15～18	≥19	≥16	≤8
瞳啮酮类						
西诺沙星	100	≤14	15～18	≥19	≥64	≤16
环丙沙星	5	≤15	16～20	≥21	≥4	≤1
依诺沙星	10	≤14	15～17	≥18	≥8	≤2
氟罗沙星	5	≤15	16～18	≥19	≥8	≤2
左氧氟沙星	5	≤13	14～16	≥17	≥8	≤2
洛莫沙星	10	≤1B	19～21	≥22	≥8	≤2
奈啶酸	30	≤13	14～18	≥19	≥32	≤8
诺氟沙星	10	≤12	13～16	≥17	≥16	≤4
氧氟沙星	5	≤12	13～15	≥16	≥8	≤2
其他						
氯霉素	30	≤12	13～17	≥18	≥32	≤8
克林霉素	2	≤14	15～20	≥21	≥4	≤1
呋喃妥因	300	≤14	15～16	≥17	≥128	≤32
利福平	5	≤16	17～19	≥20	≥4	≤1
磺胺	250 或 300	≤12	13～16	≥17	≥350	≤100
甲氧苄啶	5	≤10	11～15	≥16	≥16	≤4
复方新诺明	1.25/23.75	≤10	11～15	≥16	≥8/152	≤2/38

注：＊单位为U

表6－6－9　嗜血杆菌属药敏试验结果判断标准

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC 折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
阿莫西林/克拉维酸	20/10	≤19	≥20	≥8/4	≤4/2	
氨苄西林	10	≤18	19～21	≥22	≥4	≤1
氨苄西林/舒巴坦	10/10	≤19	≥20	≥4/2	≤2/1	

续表

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
阿奇霉素	15	≥12	≤4			
氨曲南	30	≥26	≤2			
头孢克洛	30	≤16	17～19	≥20	≥32	≤8
头孢吡肟	30	≥26	≤2			
头孢他美	10	≤14	15～17	≥18	≥16	≤4
头孢克肟	5	≥21	≤1			
头孢尼西	30	≤16	17～19	≥20	≥16	≤4
头孢噻肟	30	≥26	≤2			
头孢泊肟	10	≥21	≤2			
头孢丙烯	30	≤14	15～17	≥18	≥32	≤8
头孢他啶	30	≥26	≤2			
头孢布烯	30	≥28	≤2			
头孢曲松	30	≥26	≤2			
头孢唑肟	30	≥26	≤2			
头孢呋辛	30	≤16	17～19	≥20	≥16	≤4
氯霉素	30	≤25	26～28	≥29	≥8	≤2
环丙沙星	5	≥21	≤1			
克拉霉素	15	≤10	11～12	≥13	≥32	≤8
氟罗沙星	5	≥19	无			
亚胺培南	10	≥16	≤4			
左氧氟沙星	5	≥17	≤2			
洛莫沙星	10	≥22	≤2			
氯碳头孢	30	≤15	16～18	≥19	≥32	≤8
氧氟沙星	5	≥16	≤2			
利福平	5	≤16	17～19	≥20	≥4	≤1
四环素	30	≤25	26～28	≥29	≥8	≤2
复方新诺明	1.25/23.57	≤10	11～15	≥16	≥4/76	≤0.5/9.5

表6－6－10　淋病奈瑟菌药敏试验结果判断标准

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
头孢吡肟	30	≥31	≤0.5			
头孢他美	10	≥29	≤0.5			
头孢克肟	5	≥31	≤0.25			
头孢美唑	30	≤27	28～32	≥33	≥8	≤2
头孢噻肟	30	≥31	≤0.5			
头孢替坦	30	≤19	20～25	≥26	≥8	≤2
头孢西丁	30	≤23	24～27	≥28	≥8	≤2
头孢泊肟	10	≥29	≤0.5			
头孢他啶	30	≥31	≤0.5			
头孢曲松	30	≥35	≤0.25			
头孢唑肟	30	≥38	≤0.5			
头孢呋肟	30	≤25	26～30	≥31	≥4	≤1
环丙沙星	5	≤27	28～40	≥41	≥1	≤0.06
依诺沙星	10	≤31	32～35	≥36	≥2	≤0.5
氟罗沙星	5	≤28	29～34	≥35	≥1	≤0.25
洛美沙星	10	≤26	27～37	≥38	≥2	≤0.12
氧氟沙星	5	≤24	25～30	≥31	≥2	≤0.25
青霉素	10	≤26	27～46	≥47	≥2	≤0.06
大观霉素	100	≤14	15～17	≥18	≥128	≤32
四环素	30	≤30	31～37	≥38	≥2	≤0.25

表6－6－11　链球菌属药敏试验结果判断标准

抗菌药物名称	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径（mm）			相应的MIC 折点（μg/ml）	
		R	I	S	R	S
青霉素 肺炎链球菌	1μg 苯唑西林	—	—	≥20	—	≤0.06
β－溶血链球菌	10U	—	—	≥24	—	≤0.12
氨苄西林　β－溶血链球菌	10μg	—	—	≥24	—	≤0.25
头孢噻肟　β－溶血链球菌	30μg	—	—	≥24	—	≤0.5
草绿色溶血链球菌	30μg	≤25	26～27	≥28	≥4	≤1
头孢曲松　β－溶血链球菌	30μg	—	—	≥24	—	≤0.5
草绿色链球菌	30μg	≤24	25～26	≥27	≥4	≤1
万古霉素	30μg	—	—	≥17	—	≤1
红霉素	15μg	≤15	16～20	≥21	≥1	≤0.25
阿齐霉素	15μg	≤13	14～17	≥18	≥2	≤0.5
克拉霉素	15μg	≤16	17～20	≥21	≥1	≤0.25
地红霉素	15μg	≤13	14～17	≥18	≥2	≤0.5
四环素	30μg	≤18	19～22	≥23	≥8	≤2
加替沙星	5μg	≤17	18～20	≥21	≥4	≤1
左氧氟沙星	5μg	≤13	14～16	≥17	≥8	≤2
氧氟沙星	5μg	≤12	13～15	≥16	≥8	≤2
格帕沙星	5μg	≤15	16～18	≥19	≥2	≤0.5
曲发沙星	10μg	≤15	16～18	≥19	≥4	≤1
复方新诺明　肺炎链球菌	1.25／23.75μg	≤15	16～18	≥19	≥4／76	≤0.5／9.5
氯霉素　肺炎链球菌	30μg	≤20	—	≥21	≥8	≤4
其他链球菌	30μg	≤17	18～20	≥21	≥16	≤4
利福平　肺炎链球菌	5μg	≤16	17～18	≥19	≥4	≤1
克林霉素	2μg	≤15	16～18	≥19	≥1	≤0.25
奎奴普汀／达福普汀	15μg	≤15	16～18	≥19	≥4	≤1
利奈唑烷	30μg	—	—	≥21	—	≤2

注：— 表示目前尚无此项标准

4．注意事项

⑴ 某些细菌对某些抗菌药物具有天然耐药性，药敏试验结果分析应注意。如：阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、弗劳地枸橼酸盐杆菌对头孢西丁耐药；沙雷菌属对头孢呋辛耐药；普通变形杆菌对头孢噻吩、氨苄西林和头孢呋辛天然耐药；奇异变形杆菌对呋喃妥因和四环素天然耐药；铜绿假单胞菌对一代头孢天然耐药；斯图普罗威登或粘质沙雷菌对四环素和呋喃坦丁耐药；粪肠球菌、屎肠球菌对林可霉素和头孢菌素类耐药等。

⑵ 细菌种类与细菌的耐药表型相关，若出现一些不可能的药敏试验结果，应考虑操作所致，如所鉴定的细菌是否正确。以下是一些病原微生物不可能出现的药敏试验结果，如革兰阳性球菌：庆大霉素R，其他氨基糖苷类S；大环内酯类R，四环素S；金黄色葡萄球菌：苯唑西林R，青霉素或头孢菌素或碳青霉烯类S；A、C、G 群链球菌：青霉素R；肠球菌：替考拉宁R，万古霉素S；异型枸橼酸杆菌：氨基或/和羧基青霉素S；弗劳地枸橼酸杆菌、阴沟肠杆菌、摩根摩根菌、普通变形杆菌、普罗威登菌、沙雷菌、耶尔森菌等：氨基青霉素S，一代头孢菌素、氨苄西林/克拉维酸S；普通变形杆菌、沙雷菌：头孢孟多或头孢呋辛S；枸橼酸杆菌、肠杆菌属：头孢西丁S；肠杆菌科：三代头孢菌素R、氨苄西林、羧基青霉素和一代头孢菌素S；普通变形杆菌、普罗威登菌、沙雷菌：多粘菌素ES。

第二节　体外药敏试验常用方法

目前可用于细菌药敏检测的方法较多，常用的有纸片扩散法、肉汤稀释法、琼脂稀释法、E-test 法和自动化仪器法等。根据实验室条件和需要选用不同方法。

一、纸片扩散法（K-B 法）

1．适用范围

需氧及兼性厌氧的快速生长型细菌，如肠杆菌科细菌、非发酵菌、葡萄球菌和肠球菌；苛养菌如嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、肺炎链球菌及其他链球菌等。

2．操作方法

⑴ 培养基：K-B 法指定用M-H 琼脂，琼脂平板厚度为4mm，可按需要配成70mm、90mm、150mm 等直径。

⑵ 培养物制备：①直接菌悬液法：取纯培养物直接悬浮于无菌9g/L 氯化钠溶液或M-H 肉汤培养基，使浊度达到0.5 麦氏浊度单位（1.5×10^8cfu/ml）。②肉汤增菌法：取纯培养物接种于M-H 肉汤，35℃培养4～6h，使浊度达到0.5 麦氏浊度单位，浊度

超过时可用无菌9g/L 氯化钠溶液或M－H 肉汤稀释。

3）接种：用无菌棉签浸取上述菌悬液（取出时将棉签在管壁上挤压以除去多余的菌悬液），均匀涂布整个平板表面，置室温3～5min。

4）贴药敏纸片：用无菌镊子或分配器将纸片贴于平板表面，使纸片完全与培养基表面接触，每两个纸片间中心距离不少于24mm。一旦纸片贴上不可再移动。通常一个直径90mm 的平板可贴4～7 个纸片。置35℃孵育16～24h（苛养菌可置相应的环境）。

5）抑菌环直径测量：以肉眼观察无明显菌苔生长处为界，用卡尺量取抑菌环直径。变形杆菌在抑菌环内生长的薄菌苔可忽略不计。复方新诺明的抑菌环内会有少量细菌生长，少于20%可忽略不计。

6）结果报告：参考NCCLS 解释标准将各种抗菌药物的S、I、R 报告临床。

二、稀释法

有肉汤稀释法和琼脂稀释法。

1．适用范围

除可用于纸片扩散法适用的细菌外，还可用于厌氧菌、酵母样真菌及支原体等。

2．操作方法

1）抗菌药物的稀释：用肉汤或冷却至45～55℃琼脂培养液倍比稀释抗菌药物（如256、128、64、……、0.125、……），然后立即将琼脂培养基按要求倾注无菌平板。

2）菌液配制：用无菌9g/L 氯化钠溶液或M－H 肉汤配制成0.5 麦氏浊度单位的菌悬液。

3）接种：在每一浓度梯度的肉汤中加入上述菌悬液，使其终浓度为10^5cfu/ml，琼脂稀释法为10^4cfu/点。

4）MIC 的判读：按受试菌的生长条件，置35℃及适当的环境中培养16～24h 后观察结果。将高于MIC1～3 个稀释度的培养液转种于相应的培养基上，在合适条件下（35℃）培养18～24h，杀灭99.9%或以上受试菌所需的最低浓度为最低杀菌浓度（MBC）。

5）结果报告：可将MIC 值及其相应的S、I、报告临床。

三、E－test 法

本法由瑞典AB、BIODISK 公司建立。其原理是将一预先制备的含有抗菌药物浓度梯度的试条，放在已接种细菌的药敏试验平板上，经一定时间孵育后平板上可形成椭圆形抑菌环，环的边缘与试条交界处的数值为抗菌药物抑制细菌生长的浓度（C）。此IC 值即为该抗菌药物对受试菌的MIC。

1．适用范围

除需氧菌、苛养菌、厌氧菌、酵母菌外还适用于分枝杆菌、奴卡菌和幽门螺杆菌等特殊细菌的药敏试验。

2．操作方法

1）药敏培养基配制：按受试菌的营养要求配制药敏培养基，常用培养基平板直径为150mm。各种药敏培养基的配制方法见本篇第七章。

2）菌悬液制备及接种：同纸片扩散法。不同细菌的菌悬液浓度分别为非苛养菌（需氧及兼性厌氧菌）0.5麦氏浊度单位、嗜血杆菌0.5麦氏浊度单位、淋球菌0.5麦氏浊度单位、厌氧菌0.5麦氏浊度单位、分枝杆菌2.0麦氏浊度单位、酵母菌0.5麦氏浊度单位。

3）E-test试条粘贴：用无菌镊子取需测抗菌药物的试条贴于平板上。浓度高的一端靠近平板边缘，相邻试条间的夹角为60°。直径150mm的平板最多可同时贴6个试条。

4）孵育：将贴有E-test试条的药敏试验平板置合适环境中35℃孵育16～24h。

5）结果判读：试条周围可见椭圆形抑菌环，抑菌环边缘与试条交界处的数值为该抗菌药物MIC值，如图6-6-1。

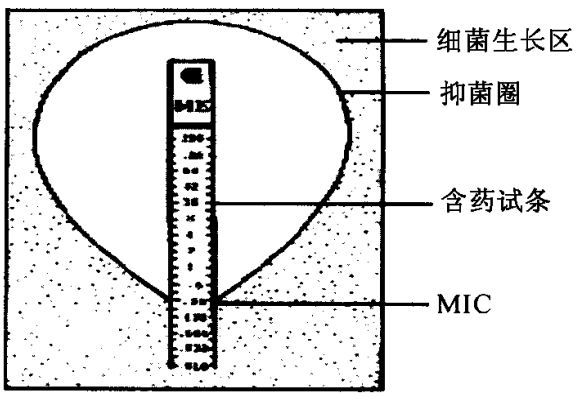


图6-6-1　E-test法检测示意图

四、自动化仪器法

目前临床实验室用于药敏试验自动化仪器品种较多，其原理见本篇第四章。应严格按各仪器操作程序进行操作。

五、联合抗菌药敏试验

1．适用范围

严重感染（如急性心内膜炎、败血症、腹腔脓肿及脑脓肿等）；病原菌不明确或单一药物疗效不佳；全身多重耐药菌株感染；感染部位药物不易渗入，如中枢神经系统感染；长期用药可能产生耐药性的感染性疾病，如结核病和慢性骨髓炎等；混合感染。

2．联合抗菌用药原则

根据抗菌药物作用机制可将药物分为杀菌剂和抑菌剂，按其作用的速度又可将其分为快效和慢效，因此，不同作用机制的药物可按如下方式联合应用。

1）杀菌剂之间联合：可增强抗菌作用或延迟耐药性，并可减少单药剂量，降低不良反应，是临床最常用的方法。如β－内酰胺类与氨基糖苷类药物联合；多粘菌素与β－内酰胺类或氨基糖苷类联合。

2）快效杀菌剂与快效抑菌剂联合：常可导致拮抗作用，如β－内酰胺类药物与四环素族抗菌药物或大环内酯类或林可霉素类或氯氨苯醇类抗菌药物联用。

3）慢效杀菌剂与快效抑菌剂联合：可起到累加或协同的作用，如多粘菌素或氨基糖苷类药物与四环素或大环内酯类或林可霉素联合。

4）快效杀菌剂与慢效抑菌剂联合：往往无关作用，如β－内酰胺类抗菌药物与磺胺类药物联用。

3．联合抗菌药敏试验的方法

1）纸片扩散法联合药敏试验：按上述原则选择的2 种药物纸片贴于已涂布受试菌的药敏试验培养基，两纸片中心间距为24mm 左右。一般不推荐3 种药物联用，但在厌氧菌和需氧菌或细菌和真菌混合感染以及分枝杆菌感染，可考虑加用第3 种药物纸片。35℃孵育18～24h 后读取结果，结果判断见图6－6－2。其中①协同作用：表示两种药物药效可大于单个药物使用的总和；②累加作用：表示两种药物联合应用，药效等于两个药物单独使用时的总和；③无关作用：表示两种药物联合应用，其药效等于活性最大的药物的药效；④拮抗作用：表示两种药物联合应用，其药效小于其中活性最大的药物的药效。

2）重叠纸片法：将联合药敏纸片，分别作单个和重叠扩散药敏试验，比较重叠纸片抑菌环直径与单个药物纸片抑菌环直径，判断两种药物的作用。判断标准同纸片扩散法。

3）棋盘滴定法：又称方阵测试联合效果法，将A、B 两种药物以不同比例混合，对受试菌测定MIC。将两种药物混合药敏试验的MIC 与单独药物MIC 值比较，并通过计算抑菌浓度指数（FIC）来判断两种药物是否具有协同或拮抗作用。如联合用药中甲药MIC 为4μg/ml（A），乙药MIC 为8μg/ml（B），单独用药时甲药MIC 为16μg/ml（C），乙药MIC 为32μg/ml（D），即甲乙联合用药的FIC＝A/C＋B/D＝4/16＋8/32＝0.50。FIC＜1.0 表示协同作用，FIC＞1.0 表示拮抗作用，FIC＝1.0 表示累加或无关作用。

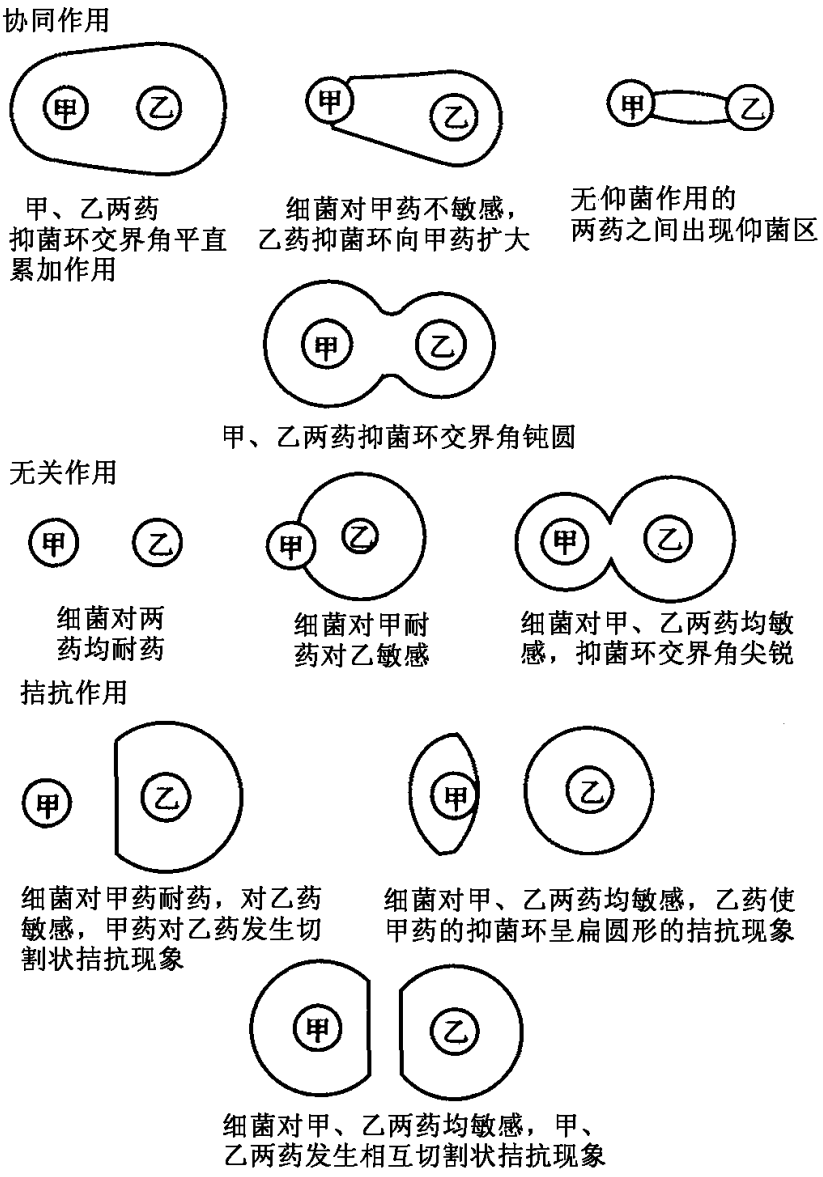


图6 —6 —2　纸片扩散法联合药敏试验结果判别

第三节　苛养菌体外药敏试验方法

苛养菌是指一类生长过程需特殊营养成分的细菌，如淋病奈瑟菌、嗜血杆菌及肺炎链球菌等。

一、淋病奈瑟菌

1．纸片扩散法

NCCLS 推荐用含1％添加剂（参见本篇第七章第六节）的GC（淋病奈瑟菌培养基基础）琼脂平板。操作方法同纸片扩散法。接种物制备按直接菌悬液法，在5％二氧化碳环境中35 ℃孵育20 ～24h 后测量抑菌环直径。结果判断参考表6 —6 —10 。

2．稀释法

见第二节有关要求。35 ℃，5 %二氧化碳环境，孵育20 ～24h 判读结果。

3.E －test 法

见第二节有关要求。

4．仪器法

按仪器提供的使用说明书操作。

二、嗜血杆菌属

1．纸片扩散法

NCCLS 推荐使用嗜血杆菌专用含血红素的HTM 琼脂培养基，操作同纸片扩散法。接种物制备按直接菌悬液法。在5 %二氧化碳环境中35 ℃孵育16 ～18h 后测抑菌环直径。结果判断参考表6 －6 －9 。

2．稀释法

按第二节要求实施。注意用HTM 肉汤，不用M －H 肉汤。可在常规条件下孵育20 ～24h 而不需在5 %二氧化碳环境中。

3.E －test 法按其操作要求实施。

4．仪器法

操作步骤按仪器提供的使用说明书进行，菌悬液配成0.5 麦氏浊度单位。

三、肺炎链球菌及其他链球菌

1．纸片扩散法

NCCLS 推荐使用含5 %绵羊血的M －H 琼脂平板，5 %二氧化碳、35 ℃孵育20 ～24h 。

2．稀释法

见第二节有关要求。用含溶解马血（2 %～5 %）、经阳离子调节的M －H 肉汤（CAMHB －LHB） 作为基质稀释抗菌药物，35 ℃培养20 ～24h 。

3.E －test 法

见第二节有关要求。

4．仪器法

见第二节有关要求。

四、其他细菌

1．李斯特菌属

NCCLS 推荐用肉汤稀释法。用含溶解马血（2%～5%）、经阳离子调节的M－H 肉汤（AMHBLHB）作为基质稀释抗菌药物，35℃培养16～20h。以MIC 氨苄西林≤2μg/ml、青霉素G ≤2μg/ml 为敏感。本菌对头孢菌素类药敏试验结果往往敏感，而临床实际疗效不佳，均应报告耐药。

2．幽门螺杆菌

NCCLS 推荐使用琼脂稀释法。用含溶解绵羊血（5%）及相应抗菌药物浓度的M－H 琼脂作为基质稀释抗菌药物。取72h 培养物，用9g/L 氯化钠溶液配成2.0 麦氏浊度单位菌悬液。在每种抗菌药物平板上滴加菌悬液1～3μl/每点，35℃微需氧环境下培养3d。

3．支原体和细菌L 型

目前NCCLS 还没有相应标准，一般可用稀释法检测支原体。细菌L 型待其返祖后，对原菌进行检测，方法和结果解释均参照相关标准。

第四节　结核分枝杆菌、厌氧菌、酵母样真菌体外药敏试验方法

一、结核分枝杆菌

结核分枝杆菌生长缓慢，营养要求高。目前NCCLS 已有暂定方法（M24－A，2003）。结核病院、结核病防治机构和少数综合医院的临床微生物学实验室多采用稀释法、仪器法（如Bact/ALERT3D 或BACTEC－460 TB）、E－test 法等作结核分枝杆菌药敏试验，也可用分子生物学技术如PCR 或DNA 探针检测结核分枝杆菌的耐药基因。

1．琼脂稀释法

制备含7～13 个浓度梯度待测抗菌药物的L－J 培养基。将受试菌悬液（1.0 麦氏浊度单位）或标本接种至上述培养基，同时接种不含药物的对照培养基，置35℃需氧培养4 周。对照管必须生长10 个菌落以上，以抗菌药物能抑制结核分枝杆菌生长的最低浓度为其MIC。根据不同抗菌药物的最高血药浓度与MIC 值进行比较，获得敏感性解释。

2.E －test 法

1）菌悬液的配制：取4～6 周菌龄的初始或新鲜传代培养物配成3.0 麦氏浊度单位的菌液，或直接取肉汤培养物2～5ml，10000r/min 离心10min，弃上清液，将沉淀物悬浮于7H9 肉汤（分枝杆菌专用增菌肉汤）中配成3.0 麦氏浊度单位。

2）平板接种及预培养将以上菌液均匀涂于L －J 培养基平板表面，35℃、7%～10%二氧化碳中预培养24h。

3）贴试条及结果判读：如第二节所述贴放E －test 试条，用封口膜或透气性胶带密封平板（以免平板干燥），35℃、7%二氧化碳中培养5～10d，当菌苔及椭圆形抑菌环清晰可辨时即可判断结果。在抑菌环及试剂条交界处（选择显著生长抑制终点处，忽略少量的零星菌落或轻微薄物状生长）读取IC 值，可用100 倍放大镜观察。

3．仪器法

按仪器提供的使用说明书要求操作。

4．注意事项

1）所有操作（包括结果的判读）必须在生物安全柜中进行，防止污染环境。

2）所用药敏试验培养基应保持湿润，但又不可水分过多，水分过多的平板用前应干燥。

3）E －test 法所用的培养基需2～8℃避光保存。

二、厌氧菌

由于厌氧菌的药敏试验有一定的局限性，一般不要求基层微生物学实验室进行厌氧菌的药敏试验。有条件的实验室可参照NCCLS 推荐（M11 －A6，2004）的常量肉汤稀释法、微量肉汤稀释法和琼脂稀释法进行厌氧菌的药敏试验，也可选用E －test 法。肉汤稀释法操作基本同需氧菌的药敏试验。

1．琼脂稀释法

1）菌悬液的配制：取一定量纯菌落接种于布氏肉汤或硫乙醇酸钠肉汤。调节菌浓度至0.5 麦氏浊度单位。

2）含不同浓度抗菌药物的平板准备：根据不同药物选择7～13 个梯度配制抗菌药物工作溶液，融化布氏琼脂或GAM 琼脂，平衡温度至55℃，加入5%羊血，分别倾注灭菌平皿，最后使各平板药物含量达到所选择的浓度梯度。

3）点种：用多点接种器，蘸取0.5 麦氏浊度单位菌悬液，接种于预定平板，每点实际含菌约为10^5cfu。

4）培养与结果判断：将平板立即置35℃中厌氧培养48～96h 后判定MIC。

5） 注意事项：①操作要迅速，整个过程一般不超过30min。②点种的菌量比需氧菌大10 倍。③所用培养基应为布氏琼脂，一般厌氧菌测定只需加5％羊血。若为苛养厌氧菌，应补充2％～3％溶解的马血或兔血清。对革兰阳性链球菌还可加入Tween －80使成1％浓度，厌氧平板保存时间不超过24h。④同时将接种不含抗菌药物的平板置于需氧环境培养，以资对照。若用厌氧气袋，应用氧化还原剂检测其厌氧条件是否合格。每批试验均应做质控菌、不含药物和需氧生长3 种对照。⑤判读结果时首先观察质控菌株的MIC 值是否在NCCLS 所规定的范围内，然后判定受试菌的MIC 值。

2.E －test 法

1） 菌液配制：根据细菌生长情况取24h、48h 或72h 厌氧血琼脂平板上的单个菌落制备菌悬液，并调节至0.5 麦氏浊度单位。

2） 菌液接种：用拭子充分蘸取菌悬液，挤去多余菌液，并从3 个方向均匀涂布整个琼脂表面。

3） 贴试条及培养：平板置室温10min 后，贴E －test 试条，置35℃厌氧环境下培养24～48h。

4） 结果判读：若细菌生长良好且椭圆抑菌环清晰可辨，则可读取IC 值。

5） 注意事项：①克林霉素必须在培养48h 后读取结果。②慢生长菌需孵育48～72h。③如生长欠佳或接种量不足，应重复试验。④判断结果应忽略薄雾状和散在的菌落生长部位。⑤不仅报告受试菌对每种药物的IC 值，也应报告敏感度类别。⑥每次操作除按基本步骤操作外，还应根据每批试条操作说明、质控菌范围和NCCLS M100 －S文件判读质控和MIC 解释标准。⑦甲硝唑药敏试验必须在最初数小时内达到足够的厌氧环境（氧化还原电势350～450mV），否则甲硝唑不能还原为具有活性的代谢物。⑧为确保厌氧环境，应注意催化剂的质量、厌氧气袋或抽气设备的完好，并推荐用刃天青或石炭酸复红作为指示剂，而不用亚甲蓝。⑨质控菌株要正确保存，防止其变异为耐氧株；一旦发现变异，应立即更换。

3．仪器法

目前已有一些仪器可用于厌氧菌的药敏试验，如ATB 系统中的ATB －ANA 试条中含24 种抗菌药物，可检测受试厌氧菌的MIC。具体操作可参见试剂盒说明。

三、酵母样真菌

NCCLS 推荐使用常量肉汤稀释法（M27 －A，1997）进行酵母样真菌的药敏试验，但其操作相当复杂，有条件的实验室可参照使用。近些年已有比较简便的用于酵母样真菌的检测方法，如E －test 法和仪器法等。

1．常量肉汤稀释法

1）抗真菌药物贮存液准备：将抗真菌药物溶解在不同的介质中，如5－氟胞嘧啶和氟康唑溶解在蒸馏水中，而酮康唑、伊曲康唑和两性霉素溶解在二甲亚砜溶液中，其浓度不小于1280μg/ml（注：二甲亚砜对酵母样真菌有抑制作用，溶解其中的抗真菌药物浓度应比一般贮存液高10～20倍，用时先用不含二甲亚砜的培养液进行100倍稀释后，再倍比稀释），过滤除菌后，在－60℃下可稳定6个月以上。

2）稀释管制备：按所测抗真菌药物不同，取7～13支无菌试管，用经0.165mol/L吗啉丙烷磺酸（MOPS）调pH至7.0的RPMI 1640培养液（含谷氨酰胺和酚红指示剂，不含碳酸氢钠）稀释抗真菌药物，制成不同稀释度，液体量为每管0.9ml。其中第1、2管不含药物，用于生长对照和阴性对照。

3）真菌悬液制备：挑取在固体培养基上35℃培养24h的纯菌落，混悬于5.0ml无菌9g/L氯化钠溶液中，使成0.5麦氏浊度单位（约1～5×10^6cfu/ml），用RPMI 1640培养液稀释至5.0×10^2～25×10^2cfu/ml。

4）接种和培养：在已制好的稀释管中分别加入应用菌悬液0.1ml（第一管加0.1ml无菌9g/L氯化钠溶液），35℃培养，一般酵母样真菌培养46～50h，新型隐球菌培养70～74h。

5）MIC判断：与生长对照管比，两性霉素B以肉眼观察清晰不混浊且含药量最小管浓度为MIC；其他抗真菌药物以浊度显著降低（与生长对照管比降低50%）管浓度为MIC。

表6－6－12　酵母样真菌抗真菌药物药敏试验结果判断标准（MIC，μg/ml）

抗真菌药物	S	剂量依赖敏感	I	R
氟康唑	≤8	16～32		≥64
伊曲康唑	≤0.125	0.25～0.5		≥1
氟胞嘧啶	≤4		8～16	≥32

6）结果判定：NCCLS只对3种抗真菌药物有解释标准，见表6－6－12。

2.E－test法

基本操作同厌氧菌药敏试验，只是所用的培养基、试剂和培养环境不同，通常培养温度为30℃，具体操作严格按照试剂盒内的说明。

3.ATB－FUNGUS真菌药敏试验

ATB－FUNGUS真菌药敏试条由16对小孔组成，第1对小孔不含任何抗真菌药物，作正常生长对照，另14对小孔含6种抗真菌药物，最后1对小孔为空白，可根据需要

添加不同抗真菌药物。将被检细菌悬浮在蒸馏水或9g/L 氯化钠溶液中，定量加入到生长培养基中，并将其接种于药敏试条中，于30 ℃孵育18 ～24h 后用肉眼观察或ATB 仪器检测生长与否，比较测定孔与对照孔生长程度确定待测细菌的敏感性。

1） 试剂组成：含25 个药敏试条、配套放置盘、ATB 或ATBS 培养基，9g/L 氯化钠溶液，ATB 悬浮培养基。

2） 操作：参照使用说明书。

3） 结果判断：可用肉眼观察或仪器自动判读，见表6 -6 -13 ，其中“浊”表示待检真菌生长，且浊度高于对照孔；“清”表示待检真菌不生长。

4） 结果报告：ATB -FUNGUS 试条包括氟胞嘧啶、两性霉素B 、制霉菌素、咪康唑、酮康唑和伊曲康唑6 种药物。每种药物可根据敏感试验结果报告S 、I 或R ，5 -氟胞嘧啶和两性霉素B 还可报告MIC 。

表6 -6 -13　ATB -FUNGUS 真菌药敏试验结果判定

结果判定	低浓度	高浓度
S	清	清
I	浊	清
R	浊	浊

5） 注意事项①严格按试剂盒内说明进行操作。②选用ATCC 菌株同时进行试验，确保判断的准确性。③菌液配制后应在15 min 内接种完毕，并置30 ℃孵箱培养。④试条应置2 ～8 ℃保存，所用试条必须在有效期内。⑤观察结果时，如对照孔待检真菌不生长，应重复试验。如出现低浓度孔清、高浓度孔浊的不合理结果时，应重复试验。肉眼观察时，仅在小孔四周有真菌生长应判为“清”。

第五节　体内抗菌药物浓度及活性检测

一、体内抗菌药物浓度测定

抗菌药物的疗效与感染部位组织中的药物浓度直接相关，体液中抗菌药物浓度只有达到和超过药物对感染菌的最低抑菌浓度时，才可能产生药效作用。但某些抗菌药物治疗浓度与中毒浓度相近，血药浓度过高可引起毒性反应。因此，血液及其他体液和组织

内抗菌药物浓度监测非常重要。

体液中抗菌药物浓度的测定方法有很多，除经典的微生物法以外，还有放射免疫、荧光免疫、气相色谱等多种方法。

1．微生物法

通常使用琼脂扩散法。其原理与K－B 琼脂扩散法相似。用已知含药浓度的纸片加到含有一定浓度指示菌的M－H 琼脂平板表面，35℃孵育16～20h，量取抑菌环直径。以抑菌环直径为横坐标，含药浓度为纵坐标，绘制标准曲线。在相同条件下进行体液标本的检测，根据所测标本产生的抑菌环直径，从标准曲线上查出相应的抗菌药物浓度。该法操作简便，灵敏度高，不需特殊设备，是目前临床微生物学实验室采用的主要方法。

2．荧光偏振免疫测定法（fluorescence polarization immunoassay，FPIA）

TDX 血药浓度检测仪就是应用此原理，数分钟即可获得准确的结果。由于仪器价格昂贵，且须依赖进口试剂，检测成本高，未能在国内普遍使用。

3．高效液相层析法（high pressure liquid chromatography，HPLC）

本法最大优点是特异性高、分离能力强，可测定药物的代谢产物，缺点是仪器价格昂贵，标本需预处理，技术操作较复杂，多用于研究工作。

4．均相酶免疫测定法（enzyme multiplied immunoassay technique，EMIT）和放射免疫测定法（radioimmunoassay，RIA）。

二、体内抗菌药物活性测定

临床微生物学实验室用于测定体内抗菌药物活性的方法有血清抑菌力和杀菌力测定（serum inhibitory/bactericidal test），又称Schlichter 试验。该法将感染部位分离的病原菌作为受试菌，来测定治疗过程中患者血液或其他体液中（单一或联合的）抗菌药物对该病原菌的抗菌活性，为临床现用抗菌药物的疗效评价及感染预后的判断提供实验依据。

采用与体外抑菌试验和体外杀菌试验相同的实验方法。其结果判断为无肉眼可见细菌生长的血清最高稀释度管，表示患者血清的抑菌力。其菌落计数等于或小于0.1％最初接种菌量的血清最高稀释度管，表示患者血清的杀菌力。血清的抑菌力/杀菌力高于1∶8 或1∶16，常提示治疗方案有效。但对于某些严重感染，如细菌性心内膜炎等，作为治疗有效的血清抑菌力/杀菌力标准应大于1∶64。

附录　常用抗感染药物分类

常用抗感染药物的分类

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
青霉素类	青霉素G（penicillin G，PENG） 苄星青霉素（benzathine B；长效青霉素） 青霉素V（penicillin V）	干扰细菌胞壁合成，对革兰阳性球菌和革兰阴性球菌、嗜血杆菌及多种致病螺旋体有抗菌活性
半合成耐青霉素酶类	甲氧西林（methicillin，MET；新青Ⅰ） 苯唑西林（oxacillin，OXA；新青Ⅱ） 萘夫西林（nafcillin；新青Ⅲ） 氯唑西林（cloxacillin）	具耐酸、耐酶的特点，对产酶金黄色葡萄球菌等细菌的抗菌活性强于青霉素类
广谱青霉素	双氯西林（dicloxacillin） 巴氨西林（bacampicillin） 阿莫西林（amoxicillin，AMX；阿莫仙）	对A组、B组溶血性链球菌、肺炎链球菌和对青霉素敏感的金黄色葡萄球菌的作用比青霉素差，但对革兰阴性菌、草绿色链球菌和肠球菌属的作用比青霉素强
抗假单胞菌青霉素	羧苄西林（carbenicillin，CAR） 替卡西林（ticarcillin，TIC；羟噻吩青霉素） 哌拉西林（piperacillin；氧哌嗪青霉素） 阿洛西林（azlocillin，AZL；阿乐欣）	
主要作用于革兰阴性杆菌青霉素	美洛西林（mezlocillin，AZL；天林） 匹美西林（pivmecillnam） 替莫西林（temocillin）	
头孢菌素类		
Ⅰ代头孢菌素	头孢噻吩（cefalothine；先锋霉素Ⅰ；头孢菌素Ⅰ） 头孢氨苄（cefalexin，先锋霉素Ⅳ；头孢力新） 头孢羟氨苄（cefadroxil，CFR） 头孢唑啉（cefazolin，CFZ；先锋霉素Ⅴ） 头孢拉定（cefradine，CRD；先锋霉素Ⅵ；头孢雷定）	对多数革兰阳性菌有抗菌活性（除肠球菌、MRSA和表皮葡萄球菌外），对革兰阴性杆菌的疗效较差

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
II代头孢菌素	头孢呋辛（cefuroxime，CXM；头孢呋肟；西力欣） 头孢呋辛酯（cefuroxime axetil，CXMA；新菌灵） 头孢替安（cefotiam，CTN） 头孢替安酯（cefotiam hexetil） 头孢克洛（cefaclor，CEC；希刻劳） 头孢丙烯（cefprozil，CPR） 氯碳头孢（loracarbef） 头孢孟多（cefamandole，FAM；头孢羟唑） 头孢尼西（cefonicid，CID）	对革兰阳性球菌的抗菌活性比I代头孢菌素低，对革兰阴性杆菌包括厌氧菌的抗菌活性比I代头孢菌素高
III代头孢菌素	头孢噻肟（cefotaxime，CTX；凯福隆） 头孢唑肟（ceftizoxime，ZOX） 头孢克肟（cefixime，CFM） 头孢甲肟（cefmenosime） 头孢匹胺（cefpiramide） 头孢曲松（ceftriaxone，CRO；头孢三嗪） 头孢地嗪（cefodizime；莫迪） 头孢哌酮（cefoperazone，CFP；先锋必） 头孢他啶（ceftzaidime，CAZ；复达欣） 头孢特伦酯（cefteram pivoxil） 头孢他美酯（cefetamet picoxil，FET） 头孢布坦（ceftibuten，CTB） 头孢地尼（cefdinir，CDR） 头孢泊肟酯（cefpodoxime proxetil，CPD）	对革兰阴性杆菌有很强的抗菌活性，对革兰阳性球菌的抗菌活性比I代头孢菌素低
IV代头孢菌素	头孢吡肟（cefepime，FEP） 头孢匹罗（cefpirome，CPO）	对革兰阴性杆菌活性与III代头孢菌素相似，主要增强了对革兰阳球菌的抗菌活性
β－内酰胺酶抑制剂复合制	氨苄西林/舒巴坦（ampicillin/sulbactam，AMP/S；优力新） 阿莫西林/舒巴坦（amoxicillin/subactam，AM/S；泰巴猛） 头孢哌酮/舒巴坦（cefoperazone/sulbactam，SP/S；舒普深） 阿莫西林/克拉维酸（amoxicillin/clavulanic acid，AM/C；安美汀） 替苄西林/克拉维酸（ticarcillin/clavulanic acid，TIM；特美汀） 哌拉西林/三唑巴坦（piperacillin/tazobaceam，TZP，特治星）	灭活β－内酰胺酶，增强抗菌活性
其他β－内酰胺类		

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
碳青霉烯类	亚胺培南/西司他丁（imipenem/cilastatin，IPM；泰能） 美罗培南（meropenem，MEM） 帕尼培南（panipenem，克倍宁）	新型单环β-内酰胺类抗生素，抗菌谱广，对多种质粒和染色体介导的β-内酰胺酶稳定，易受体内肾脱氢酶（DHP-1）降解，半衰期短（仅1h）
单酰胺类	氨曲南（azereonam，ATM） 肟莫南（oximonan） 替格莫南（tigmonan） 卡芦莫南（carumonam）	非典型的β-内酰胺类抗生素，抗菌谱窄，只对革兰阴性杆菌有效，对革兰阳性菌无抗菌活性，对厌氧菌的抗菌活性低，但对β-内酰胺酶稳定
头霉素类	头孢西丁（cefoxitin，FOX；美福仙） 头孢美唑（cefotetan） 头孢替坦（cefotetan）	
氧头孢烯类	拉氧头孢（moxalactam，latamoxref，MOX） 氟氧头孢（flomoxef）	抗菌谱广，对革兰阴性菌抗菌活性强大，对β-内酰胺酶稳定，血药浓度维持时间长，但对机体凝血系统影响较大
氨基糖苷类	链霉素（streptomycin，SM） 卡那霉素（kanamycin，KAN） 庆大霉素（gentamycin，GEN） 妥布霉素（tobramycin，TOB） 阿米卡星（amikacin，AMK；丁胺卡那霉素） 奈替米星（etimicin，NET） 依替米星（etimicin，ETI） 西梭霉素（sisomicin） 大观霉素（spectinomycin，壮观霉素） 核糖霉素（ribostamycin） 新霉素（neomycin） 异帕米星（isepamicin） 达地米星（dactimicin） 阿斯米星（astromicin） 地贝卡星（dibekacin）	水溶性好，性质稳定，作用于细菌核糖体30S亚单位制蛋白质合成，破坏细菌细胞膜完整性，抗菌谱广，与人血清蛋白结合率低，胃肠道吸收差，对肾和耳有毒性

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
大环内酯类 14 元环	红霉素（erythromycin，ERY） 克拉霉素（clarithromycin，CLR） 罗红霉素（roxithromycin，） 地红霉素（dirithromycin，DTM）	抗菌谱窄，主要作用于革兰阳性菌、革兰阴性球菌，抑制蛋白质合成，对支原体和衣原体有效，血药浓度低，不易透过血脑屏障
15 元环	氟红霉素（flurithromycin） 阿奇霉素（azithromycin，AZM）	
16 元环	麦迪霉素（midecamycin） 螺旋霉素（spiramycin） 乙酰螺旋霉素（acetylspiramycin） 交沙霉素（josamycin） 柱晶白霉素（leucomycin） 乙酰麦迪霉素（acetylmidecamycin） 吉他霉素（kitasamycin） 罗他霉素（rokitamycin）	
四环素类	四环素（tetracycline，TEL） 多西环素（doxycycline，DOX；强力霉素） 米诺环素（minocycline） 美他环素（metacycline）	抗菌谱广，口服方便，但易产生耐药
氯霉素类	氯霉素（chloramphenicol，CHL） 甲砜霉素（thiamphenicol）	性质稳定，抑制蛋白质合成，作用于细菌核糖体50S 亚基。抗菌谱广，口服吸收好，易透过血脑屏障，对人骨髓有抑制
林可霉素	林可霉素（lincomycin；氯洁霉素） 克林霉素（clindamycin；洁霉素）	作用于细菌核糖体50S 亚基，抑制蛋白质合成
多肽类抗生素	万古霉素（vancomycin，VAN） 去甲万古霉素（norvancomycin） 替考拉宁（teicoplanin；壁霉素） 克拉宁（actalanin） 雷莫拉宁（ramoplanin） 多粘菌素（polymyxin） 杆菌肽（bacitracin） 安福霉素（amfomycin）	抑制细菌细胞壁合成，对胞质 RNA 也有作用，不易产生耐药，对人肾和神经系统有毒副作用

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
喹诺酮类		
Ⅰ代	萘啶酸（nahdixic acid，NAL）	作用于DNA旋转酶，阻断DNA复制，抗菌谱窄，口服吸收差，毒，性大，目前已很少用
Ⅱ代	吡哌酸（pipemidic acid，PA） 诺氟沙星（norfioxacin，NOR；氟派酸）	抗菌谱窄，口服后少量吸收，毒性比Ⅰ代小
Ⅲ代	培氟沙星（pefioxacin，PFX） 那氟沙星（nadifioxacin） 罗素沙星（rosoxacin） 芦氟沙星（rufloxacin） 依诺沙星（enoxacin，ENX；氟啶酸） 氧氟沙星（ofloxacin，OFX；氟嗪酸） 环丙沙星（ciprofloxacin，CIP；环丙氟哌酸） 洛美沙星（lomefloxacin，LOM；罗氟酸） 氟罗沙星（fleroxacin，FLX） 妥舒沙星（tosufloxacin）	抗菌谱广，对革兰阴性菌和阳性菌均有较好的抗菌活性，口服吸收好，体内分布广，产生耐药性低
Ⅳ代	左氟沙星（levofloxacin，LEV） 司氟沙星（sparfloxacin，SPX） 克林沙星（clinafloxacin） 莫西沙星（moxifioxacin，MXF） 格帕沙星（grepafioxacin，GRX）	抗菌谱广，对革兰阴性菌和阳性菌均有更好的抗菌活性
磺胺类	磺胺甲噁唑（sulfamethoxazole，SMZ） 磺胺嘧啶（sulfadiazine，SD） 磺胺甲氧嗪（sulfasalazine，SMPZ；长效磺胺） 柳氮磺吡啶（sulfasalazine，SASP） 复方磺胺甲噁唑（sulfamethoxazole/trimethoprin，SXT；复方新诺明）　复方磺胺嘧啶（sulfidiazine—trimethoprin）	抑制叶酸代谢，使用方便，价格低廉，抗菌谱广，易透过血脑屏障，易产生耐药和变态反应
甲硝唑和替硝唑	甲硝唑（metronidazole；；灭滴灵） 替硝唑（tinidazole）	用于治疗原虫和厌氧菌感染，抗厌氧菌的机制在于硝基被厌氧菌还原成细胞毒物质抑制细菌DNA合成，抗原虫机制在于抑制原虫氧化还原反应

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
其他抗菌药	磷霉素（fosfomycin，phosphonomycin；复美欣） 夫西地酸（fusidic acid，fusidin；褐霉素）	作用于核糖体，影响细胞壁早期合成
抗分枝药物	异烟肼（isoniazid，INH；雷米封）	抑制分枝杆菌核酸（细胞壁）合成
利福霉素类	利福霉素SV（rifamycin，SV） 利福平（rifampin，rifamoicin，RIP） 利福喷汀（rifapentine，rifapentin，RFP） 利福布汀（rifabutin，ansamycin，RFB） 乙胺丁醇（ethambutol，EMB） 乙硫异烟胺（ethionemicle，Th1314） 丙硫异烟胺（protionamide，Th1321）	性质稳定，抗菌谱广，口服吸收好，对结核杆菌有高度抗菌活性，抑制核酸合成
	卷曲霉素（capreomycin） 环丝氨酸（cycloserine） 氨苯砜（dapsone，DDS）	抑制核酸、蛋白质合成
抗真菌药物	两性霉素B（amphoteficin B，AMB） 两性霉素B脂质体（liposome amphotericibwB，AMBL） 两性霉素B脂质复合体（amphotericin B lipid complex，ABLC） 两性霉素B胶质散体（amphotericin B co－lloidal dispersion，ABED）	影响细胞膜通透性
	氟胞嘧啶（fluorocytosine，5FC）	阻断核酸合成；
	酮康唑（ketoconazole，KTC） 克霉唑（clotrocytosine） 咪康唑（miconazole，MIC） 益康唑（econazole，ECO） 氟康唑（fluconazole，FLC） 伊曲康唑（itraconazole，ITC） 灰黄霉素（griseofialvin） 制霉菌素（nystatin，NYT） 克念菌素（cannitracin）	作用于细胞膜，改变其通透性作用于细膜，改变其通透性 抑制核酸合成 影响膜通透性
抗病毒药		
核苷类	碘苷（idoxuridine，IDUR）	与胸苷竞争，渗入疱疹病毒DNA导致编码错误
	三氟胸苷（trifluridine，TFT，F3TdR）	渗入疱疹病毒DNA，形成短DNA片断和缺陷病毒蛋白

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
	环胞苷（cyclocytidine）	抑制DNA聚合酶对“环胞苷”
	阿糖腺苷（vidaradine，ara－A）	竞争抑制病毒DNA聚合酶和DNA合成
	阿糖腺苷单磷酸（arabinofuranosyl adenine monophosphate，ara－AMP）	竞争抑制病毒DNA聚合酶和DiNA合成，脱磷分解为阿糖腺苷。水溶性较阿糖腺苷大400倍
	利巴韦林（ribavirin，virazole，RBV；病毒唑）	抑制肌苷单磷酸脱氢酶、RNA多聚酶、转录酶
	阿昔洛韦（acyclovir，zovirax，ACV；无环鸟苷） 更昔洛韦（ganciclovir，GCV；丙氧鸟苷） 喷昔洛韦（penciclocir，PCV）	抑制DNA多聚酶和DNA合成及DNA链延伸
	代昔洛韦（valaciclovir，VACV）	阿昔洛韦前体药
	法昔洛韦（famciclovir，FCV）	喷昔洛韦前体药，生物利用度提高
	齐多夫定（zidovudine ZDV，AZT；叠氮胸苷）	竞争性结合病毒cDNA，抑制DNA合成，阻断cDNA链延伸
	扎西他定（dideoxycytidine ddC，zalcitabine；双去氧胞嘧核苷）	类似齐多夫定的作用
	司他夫定（2’3’－dideoxycytidine ddC，zalcitabine，d4T；stavudine）	
	拉米夫定（lamivudine，3TC） 沙奎那韦（saquinavir，invirase）	抑抑制逆转录酶，渗入病毒DNA 制病毒复制
	吲哚那韦（indinavir，vrixavan，Mk639）	
	利托那韦（ritonavir，ABT538）	
	奈非那韦（nelfinavir，viracept）	
	尼维拉平（nevirapine）	

续表

分类	代表品种	主要作用机制及抗菌谱
	金刚烷胺（amantadine，symmetred）	干扰病毒穿透、脱壳和早期转录金刚乙胺（imantadine）
	酞丁胺（tai—ding—an，我国开发）	早期合成干扰素，作用于细胞受体，使细胞内产生抗病毒蛋白

第七章　微生物学实验室常用试剂与培养基

第一节　常用试剂及其使用方法

一、诊断用纸片

1）杆菌肽纸片（0.04U／片）：抑菌圈＞10mm 为敏感。质控菌株：D 群链球菌阴性，A 群链球菌阳性。

2）SMZ 纸片（1.25μg／片、23.75μg／片）：出现抑菌圈即为敏感。质控菌株：D 群链球菌阳性，A 群链球菌阴性。

3）新生霉素纸片（5.0μg／片）：抑菌圈≥16mm 为敏感。质控菌株：表皮葡萄球菌阳性，腐生葡萄球菌阴性。

4）O／129 纸片、奥普托欣（Optochin）纸片：参见本章第五节。

二、诊断用血清

1）沙门菌属诊断血清：①A～F 群O 多价诊断血清。②特异O 群因子诊断血清：常用的有O_2、O_4、O_7、O_9、O_{10}诊断血清。③特异H 因子诊断血清：常用的有Ha、Hb、Hc、Hd、Hgm、Hi、Hf、Vi 因子诊断血清。

2）志贺菌属诊断血清：志贺菌属4 种多价血清，包括痢疾志贺菌Ⅰ、Ⅱ血清，福氏志贺菌多价血清及分型血清（1～6 型），宋内志贺菌诊断血清，鲍氏志贺菌多价血清及分型血清。

3）致病性大肠埃希菌诊断血清：包括肠致病性大肠埃希菌（EPEC）诊断血清，产肠毒素大肠埃希菌（ETEC）诊断血清，肠侵袭性大肠埃希菌（EIEC）诊断血清，肠出血性大肠埃希菌（EHEC）诊断血清O_{157}：H_7。

4）霍乱弧菌O_1、O_{139}混合多价诊断血清及稻叶、小川、彦岛O_{139}分型血清。

5）脑膜炎奈瑟菌多价血清及分群血清。

6）链球菌分类诊断血清。

7）肺炎链球菌诊断血清。

8）耶尔森菌诊断血清。

三、常用染色液

1．革兰染色液

（1）结晶紫溶液A 液：结晶紫20g，95％乙醇20ml；B 液：草酸铵0.8g，蒸馏水80ml。

染色前24h 将A 液、B 液混合，过滤后装入试剂瓶内备用。

（2）碘液：碘1g，碘化钾2g，蒸馏水300ml。

将碘与碘化钾混合并研磨，加入几毫升蒸馏水，使其逐渐溶解，然后研磨，继续加入少量蒸馏水至碘、碘化钾完全溶解，最后补足水量；也可用少量蒸馏水将碘化钾完全溶解，再加入碘片，待完全溶解后，加水至300ml。

（3）脱色液：95％乙醇。

（4）复染液：沙黄2.5g，95％乙醇100ml 为贮存液；取贮存液10ml，加蒸馏水90ml为应用液。

2．抗酸染色液

（1）碱性复红染色液：①萋纳石炭酸复红溶液：碱性复红乙醇饱和溶液10ml，5％石炭酸溶液90ml。②脱色液：浓盐酸3ml，95％乙醇97ml。③复染液（吕弗勒美蓝液）：美蓝乙醇饱和溶液30ml，100g/L 氢氧化钾溶液0.1ml，蒸馏水100ml。

（2）金胺O－罗丹明B 染色液：①罗丹明B 液：罗丹明B0.1g 加蒸馏水100ml。②1g/L 金胺O 液：金胺O 液0.1g 加蒸馏水95ml，再加入纯石炭酸5ml，混匀。③3％盐酸乙醇。④稀释美蓝液：吕弗勒美蓝液100ml 加蒸馏水90ml，混匀。

3．鞭毛染色液（改良Ryu 法）

A 液：5％石炭酸10ml，鞣酸2g，饱和硫酸铝钾溶液10ml；B 液：结晶紫乙醇饱和液。应用A 液10 份、B 液1 份，混合滤纸过滤后室温存放备用。

4．异染颗粒染色液

甲液：甲苯胺蓝0.15g，孔雀绿2g/L，95％乙醇2.0ml，蒸馏水100ml。乙液：碘2g，碘化钾3g，蒸馏水300ml。

先将碘化钾加入少许蒸馏水（约2ml），充分振摇，待完全溶解，再加入碘，使完全溶解后，加蒸馏水至300ml。

5．荚膜染色液

（1）印度墨汁或50g/L 黑色素水溶液。

（2）5g/L 苯胺蓝水溶液。

第二节　基础培养基

一、液体基础培养基

1．蛋白胨水

【用途】

用于细菌靛基质试验、一般细菌培养和传代。

【配法】

蛋白胨（或胰蛋白胨）10g，氯化钠5g，蒸馏水1L。

将上述成分溶于水中，校正pH至7.4，分装试管，每管2～3ml，置121℃灭菌15min备用。

【质量控制】

大肠埃希菌生长良好，靛基质阳性；伤寒沙门菌生长良好，靛基质阴性。

2．营养肉汤

【用途】

一般细菌的增菌培养，加入1%的琼脂粉亦可作营养琼脂。

【配法】

蛋白胨10g，牛肉膏3g，氯化钠5g，蒸馏水1L。

将上述成分称量混合溶解于水中，校正pH至7.4，按不同用途分装于烧瓶或试管内。经121℃灭菌15min，作无菌试验后冷藏备用。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌、伤寒沙门菌、化脓性链球菌生长良好。

【保存】

置冰箱，3周内用完。

3．牛肉浸液培养基

【用途】

牛肉浸液培养基是细菌培养最基础的培养基，除用于一般细菌的培养外，又可以作营养琼脂及其他培养基的基础。

【配法】

新鲜除脂牛肉500g，氯化钠5g，蛋白胨10g，蒸馏水1L。

先将牛肉清洗，除脂肪、肌腱，并切块绞碎。称取500g置容器中加入蒸馏水1L，

搅匀后置冰箱过夜，次日煮沸加热30㎜，并用玻棒不时搅拌后用绒布或麻布进行粗过滤，再用脱脂棉过滤即成。在过滤中加入蛋白胨10g、氯化钠5g 溶解后，用氢氧化钠溶液校正pH 至7.6～7.8，并加热煮沸10㎜，补充蒸馏水至1L，最后用滤纸过滤，呈清晰透明、淡黄色液体，经121℃灭菌15㎜ 备用。

【用法】

根据不同用途可以制成营养肉汤，以此为基础制成其他培养基。如制作固体培养基，加入琼脂15～20g/L 即可。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、伤寒沙门菌、痢疾志贺菌等均生长良好。

【保存】

置4℃冰箱内可以使用较长时间。

【注意事项】

商品牛肉浸膏粉，一般使用量为3～5g/L。

二、固体基础培养基

1．营养琼脂培养基

【用途】

一般细菌和菌株的纯化及传种。

【配法】

蛋白胨10g，牛肉膏3g，氯化钠5g，琼脂粉（优质）12g，蒸馏水1L。

将上述成分（除琼脂外）溶于水中，校正pH 至7.2～7.4 后加入琼脂，煮沸溶解，根据不同用途进行分装，经121℃灭菌15㎜，倾注平板或制成斜面，冷藏备用。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌菌落呈浅黄色；痢疾志贺菌菌落无色；铜绿假单胞菌菌落无色或浅绿色。

【保存】

置4℃冰箱保存，2 周内用完。

2．血琼脂培养基

【用途】

一般病原菌的分离培养和溶血性鉴别及保存菌种。

【配法】

pH7.4～7.6 牛肉浸液琼脂100㎖，脱纤维羊血（或兔血）5～10㎖。

将血琼脂基础经121 ℃灭菌15 min，待冷却至50 ℃左右以无菌手续加入羊血，摇匀后立即倾注灭菌平皿内，待凝固后，经无菌实验冷藏备用。

【质量控制】

化脓性链球菌ATCC 19615 生长良好，β－溶血；肺炎链球菌ATCC 6303 生长良好，α－溶血；表皮葡萄球菌ATCC 12228 生长良好，不溶血。

【保存】

置4 ℃冰箱，1 周内用完。

3．巧克力琼脂培养基

【用途】

主要用于嗜血杆菌的分离培养，亦可用于奈瑟菌的增殖培养。

【配法】

鲜牛肉浸出液1L，蛋白胨10g，氯化钠5g，琼脂粉12g，无菌脱纤维羊血或兔血100 ml。

将上述成分（除兔血外）加热溶解，调pH 至7.2，置121 ℃高压灭菌15 min，待冷至约85 ℃，以无菌方式加入兔血，摇匀后置85 ℃水浴中，维持该温度10 min，使之成巧克力色。取出置室温冷至约50 ℃，倾注平板或制成斜面备用。

【质量控制】

流感嗜血杆菌ATCC 10211、肺炎链球菌ATCC 6305 生长良好，菌落典型。

【保存】

置4 ℃冰箱，1 周内用完。

4．胱氨酸胰化酪蛋白琼脂

【用途】

常用于测定脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌以及营养要求较高细菌的糖发酵试验。

【配法】

胱氨酸0.5g，胰化酪蛋白20g，氯化钠5g，亚硫酸钠0.3g，琼脂3.5g，酚红0.0175g，蒸馏水1L。

将上述成分（酚红除外）混合溶解，调pH 至7.2，加入酚红指示剂。分装试管，115 ℃灭菌15 min。

【用法】

用于测定糖发酵时，按需要加入各种糖溶液，将待检标本直接种于培养基管内，置35 ℃孵箱，18～24h 观察结果。培养基由红色变为黄色为阳性，不变色为阴性。

第三节　保存和增菌培养基

一、菌种保存培养基

【配法】

蛋白胨10g，牛肉膏5g，氯化钠3g，磷酸氢二钠2g，琼脂粉4.5g，蒸馏水1L。

将上述成分混合于水中，加热溶解，调pH 至7.4～7.6，分装试管2/3 左右高度，121℃高压灭菌15min，成为半固体培养基，备用。

【质量控制】

培养基呈淡黄色半固体状。大肠埃希菌（ATCC 25922）生长良好，动力阳性；福氏志贺菌（ATCC 12022）生长良好，动力阴性；金黄色葡萄球菌（ATCC 25923）生长良好，动力阴性。

二、增菌培养基

1．葡萄糖肉汤

【用途】

用于血液增菌。

【配法】

蛋白胨（或腊胨）10g，氯化钠5g，肉浸液（或心浸液）1L，葡萄糖3g，枸橼酸钠3g，5g/L 对氨基苯甲酸水溶液10ml，1mol/L 硫酸镁溶液20ml，青霉素酶1000U。

将蛋白胨、氯化钠混合于肉浸液中加热溶解，再加入葡萄糖、枸橼酸钠、对氨基苯甲酸及硫酸镁，继续煮沸5min，并补足失水，调整pH 至7.8。

过滤分装，每瓶50ml，115℃高压灭菌20min 后，每瓶加入青霉素酶50U，经无菌试验合格后，冷却备用。

【用法】

将采取的血液标本，以无菌手续注入培养瓶中（血液1ml，培养液10ml），置35℃培养箱内，每天1 次取出观察结果。如有细菌生长，可出现数种不同的表现，应随时作分离培养，可选用血琼脂、伊红美蓝琼脂及巧克力琼脂平板等。无细菌生长表现的培养瓶，需连续观察7d，仍无细菌生长方可弃去。在观察的过程中，至少应作两次分离培养。

【注意事项】

1）构橼酸钠为抗凝剂，可使血液加入培养基中不凝固。

2）对氨基苯甲酸主要中和血液中磺胺类药物的抑菌作用。

3）硫酸镁主要抑制血液中存在的四环素、金霉素、新霉素、多粘菌素及链霉素的抑菌作用。

4）本培养基近年来有许多改良配方，如加入0.3％～0.5％酵母浸膏以增加营养；加0.2％核酸刺激细菌生长；加0.1％粘液素能被覆于细菌的表面，保护细菌免受抗体破坏；加入聚茴香脑磺酸钠（SPS）除能抗凝外，也有抗补体作用，抗吞噬及拮抗某些抗菌药物，从而提高细菌检出率。

2．血液增菌培养基

【用途】

血液和骨髓液病原菌的增菌培养。

【配法】

蛋白胨10g，氯化钠5g，牛肉膏3g，葡萄糖1g，酵母膏粉3g，枸橼酸钠3g，磷酸氢二钾2g，5g/L 对氨基苯甲酸溶液5ml，1mol/L 硫酸镁溶液20ml，4g/L 酚红溶液6ml，青霉素酶50U，聚茴香脑磺酸钠（SPS）0.3g，蒸馏水1L。

将上述成分（除酚红指示剂、青霉素酶外）混合加热溶解，校正pH 至7.4，再加酚红，过滤分装每瓶30～50ml，经121℃灭菌15min 和35℃无菌试验24h，备用。临用时每瓶加入1.5～2.5U 青霉素酶。

【质量控制】

伤寒沙门菌ATCC 50096、白色念珠菌ATCC 10231、化脓性链球菌ATCC 19615、肺炎链球菌ATCC6305、金黄色葡萄菌ATCC 25923、铜绿假单胞菌ATCC 27853 均生长良好。

3．亚硒酸盐增菌培养基

【用途】

沙门菌增菌培养。

【配法】

蛋白胨5g，乳糖4g，磷酸氢二钠4.5g，磷酸二氢钠5.5g，亚硒酸氢钠4g，蒸馏水1L。

先将亚硒酸盐加到200ml 蒸馏水中，充分摇匀溶解。其他成分称量混合，加入蒸馏水800ml，加热溶解，待冷却后两液混合，充分摇匀，校正pH 至7.0～7.1（通过调整磷酸盐缓冲对的比例来校正pH 值）。最后分装于15mm×150mm 的试管内，每管10ml。置水浴隔水煮沸10～15min，立即冷却，置4℃冰箱保存备用。

【用法】

取新鲜标本1g 或棉拭子采样直接种于该培养管内。摇动后置35 ℃培养过夜。如发现均匀混浊，管底有红色沉淀物，表示细菌生长。然后取培养物分离在选择性培养基上，如SS 琼脂、麦康凯琼脂平板等，进行培养。

【质量控制】

培养基应呈淡黄色或无色，透明无沉淀物。增菌灵敏度：伤寒沙门菌1 ×10^{-5}，鼠伤寒及副伤寒沙门菌1 ×10^{-7}。

【保存】

4 ℃保存，1 周内用完。

【注意事项】

(1) 亚硒酸盐，包括亚硒酸钠、亚硒酸氢钠均可使用，但以亚硒酸氢钠效果为好。

(2) 磷酸盐缓冲对中，两者的用量比例与亚硒酸盐及蛋白胨的品种有关。制备前应进行调试，其总量为10g/L。

(3) 在制备过程中，亚硒酸盐不能直接加热。隔水煮沸时间亦不能超过规定时间，否则亚硒酸盐会变质，生成红色沉淀物。

(4) 培养基应呈淡黄色，有红色沉淀物出现时不可再用。

4.SS 增菌液

【用途】

用于沙门菌、志贺菌的增菌。

【配法】

胰胨2g，蛋白胨8g，牛肉膏3.5g，酵母膏2g，葡萄糖2g，枸橼酸铁10g，硫代硫酸钠10g，亚硫酸钠0.7g，胆盐5.5g，磷酸氢二钠4g，磷酸二氢钾0.1g，去氧胆酸钠(进口) 1.5g，煌绿0.005g，蒸馏水1L。

将上述成分加热溶于水中，调pH 至7.1，分装试管 (15mm ×150mm)，每管5～7ml，隔水煮沸5min 备用。

【用法】

取粪便标本1g 直接种于增菌液内，35 ℃下培养16～18h。取出转种于分离培养基即可。

【质量控制】

培养基应呈淡黄色或略呈淡绿色。伤寒沙门菌ATCC 50096、福氏志贺菌ATCC 12022 生长良好；大肠埃希菌ATCC 25922 生长抑制。

【注意事项】

（1）切勿高压，隔水煮沸时间不超过5min。

（2）煌绿用量应根据不同产品批号酌情增减。

5．碱性蛋白胨水

【用途】

霍乱弧菌增菌培养。

【配法】

蛋白胨20g，氯化钠5g，蒸馏水100ml。

将上述成分溶解于水中，校正pH 至8.6，分装于试管8～10ml，经121℃灭菌15min备用。

【用法】

将待检标本接种到碱性胨水中，置35℃培养6～8h，霍乱弧菌呈均匀混浊生长，表面有菌膜出现。取表面菌液1 白金环移种到碱性琼脂、庆大霉素琼脂或TCBS 琼脂平板上。必要时做第二次增菌。

【质量控制】

有条件的实验室可用标准菌株，一般临床实验室可用非01 群弧菌，培养后生长良好者方可使用。霍乱弧菌E1 －Tor 生物型和副溶血弧菌生长良好（6h）；大肠埃希菌ATCC 25922 不生长（6h）。

【保存】

置4℃冰箱，2 周内用完。

【注意事项】

若在每升碱性胨水中加入1％亚碲酸钾溶液0.5～1.0ml，则成为亚碲酸钾碱性胨水，其增菌效果更为理想。

第四节　分离培养基

一、革兰阳性杆菌分离培养基

1．罗－琴改良培养基

【用途】

用于结核分枝杆菌培养。

【配法】

磷酸二氢钾2.4g，硫酸镁0.24g，枸橼酸镁（或枸橼酸钠）0.6g，天门冬素3.6g，

甘油12ml，蒸馏水600ml，马铃薯淀粉30g，新鲜鸡卵液1L，2%孔雀绿水溶液20ml。

先将磷酸盐、硫酸镁、枸橼酸镁、天门冬素及甘油加热溶解于600ml 蒸馏水中。再添放马铃薯粉，边放边搅，并继续置沸水中加热30min，待冷却至60℃左右时，加入鸡卵液1L 及孔雀绿溶液20ml，充分混匀后，用无菌操作分装于灭菌试管，每支5～6ml，塞紧橡皮塞（最好是翻口塞），置于血清凝固器内制成斜面，经85℃1h 间歇灭菌2 次（或高压灭菌115℃20min），待凝固后经无菌试验，4℃冷藏备用。

【用法】

取晨咳痰或其他体液标本，经消化处理和离心沉淀的浓缩液0.1ml（约2 滴）滴种于培养基的斜面上，尽量摇晃，置35℃下5%～10%二氧化碳孵箱内培养1～4 周，观察结果。凡在1 周内发现生长的菌落，一般不可能是结核分枝杆菌；在2 周后生长的菌落，奶油状，略呈黄色，粗糙突起，不透明，即取菌进行涂片染色镜检及鉴定。

【质量控制】

用结核分枝杆菌菌株作阳性培养试验。

【保存】

置4℃冰箱内2～4 周有效。

【注意事项】

（1）本培养基在Lowenstein－Jenden 设计的基础上改良。

（2）本培养基pH 约为6.0 左右，一般无须校正。

（3）间歇灭菌的温度不宜超过90℃。

2．血清斜面培养基（吕氏血清斜面）

【用途】

用于白喉棒状杆菌培养。

【配法】

1%葡萄糖肉汤（pH7.6）100ml，无菌动物血清（牛、羊、猪、兔）300ml。

将上述成分混合后，分装于试管内，每管约4～5ml。斜插在血清凝固器内（或蒸笼）加热至80～85℃，30min，使血清凝固成斜面，冷却后放4℃冰箱内。取出后采用间歇灭菌法，85℃灭菌30min，连续3d，经无菌试验证明无杂菌生长即可应用。

【用法】

将喉拭子直接接种于上述斜面上，置35℃培养16～24h。白喉杆菌在上述培养基上，菌落呈圆形，表面光滑、完整，在9g/L 氯化钠溶液中易乳化，用阿尔培脱染色，两极异染颗粒明显。

【注意事项】

1）所用血清不能含有防腐剂。

2）该培养基不能高热灭菌，以防破坏其中营养成分。

3）配制时所有器皿、棉塞等均应高压灭菌。

3．亚碲酸钾血琼脂

【用途】

用于分离白喉杆菌。

【配法】

蛋白胨10g，氯化钠5g，牛肉浸膏3g，葡萄糖2g，胱氨酸0.05g，1％亚碲酸钾45ml，脱纤维羊血100ml，琼脂2g，蒸馏水900ml。

先将蛋白胨、氯化钠、牛肉浸膏、葡萄糖和胱氨酸加水加热溶解，调pH 至7.6，加入琼脂，115℃高压灭菌15min 备用。待冷至50℃左右，用无菌操作加入已灭菌的亚碲酸钾溶液及羊血，混匀倾注平板。

【用法】

将标本直接接种于亚碲酸钾平板上。置35℃孵箱，经24～48h 培养，观察结果。白喉杆菌能使亚碲酸钾还原成金属蹄而形成黑色和灰黑色的菌落。

二、革兰阴性杆菌分离培养基

㈠ 弧菌分离培养基

1．碱性琼脂培养基

【用途】

用于霍乱弧菌分离培养。

【配法】

蛋白胨10g，氯化钠5g，牛肉膏3g，琼脂20g，蒸馏水1L。

将前4 种成分混合于水中，加热溶解，校正pH 至8.4，分装后121℃灭菌15min，倾注平板。

【用法】

凡急性发作的水样便标本做增菌培养的同时，应直接取标本接种到碱性琼脂平板或亚碲酸钾琼脂平板上。置35℃培养12～16h，观察结果。霍乱弧菌生长较快，菌落大而扁平，呈青灰色，半透明，光滑湿润。在亚碲酸钾琼脂上菌落呈灰黑色。

【质量控制】

各实验室凡自配培养基或商品培养基，在使用前可用标准菌株生长对照，临床实验室可送防疫部门所设立的专门检验机构进行目的菌监测，质量可靠者方可使用。

EL －Tor 弧菌生长良好；大肠埃希菌ATCC 25922 生长抑制。

【保存】

置4 ℃冰箱，1 周内用完。

2．碱性胆盐琼脂培养基

【用途】

用于霍乱弧菌分离培养。

【配法】

蛋白胨10g，牛肉膏5g，氯化纳5 ～10g，琼脂20g，胆盐（牛、猪）2.5g，蒸馏水1L。

将上述成分称量混合于水中加热溶解，校正pH 至8.4，分装121 ℃灭菌15min，倾注平板。

【用法】

取粪便标本或增菌培养物1 接种环接种平板，置35 ℃温箱培养16 ～18h。霍乱弧菌迅速生长，其他细菌生长较缓慢。在16 ～18h 后，霍乱弧菌的菌落，直径可达2mm 左右，呈扁平，青灰色，半透明，光滑湿润，易挑起。其他细菌菌落小而凸起，不透明，或有色素。

【质量控制】

同碱性琼脂。

【保存】

置冰箱，1 周内用完。

3．庆大霉素琼脂培养基

【用途】

用于霍乱弧菌分离培养。

【配法】

蛋白胨10g，牛肉浸膏3g，氯化钠5g，枸橼酸钠10g，无水亚硫酸钠3g，蔗糖（或白糖）10g，琼脂15 ～20g，庆大霉素、多粘菌素B “双抗液”2ml，蒸馏水1L。

将上述成分（除“双抗液”外）称量混合于水中，加热溶解，校正pH 至8.4，分装灭菌121 ℃15min，待冷却至50 ℃后，每100ml 内加“双抗液”0.2ml，另加5g/L 亚碲酸钾溶液0.1ml，再倾注平板。最后每毫升培养基内含有庆大霉素0.5U，多粘菌素B6U。

【用法】

将粪便标本或增菌培养物划线接种到该平板上，置35 ℃培养16 ～18h。

由于该培养基抑制性强，其他非弧菌科细菌被抑制，而霍乱弧菌生长迅速，培养16h 菌落青灰色，半透明，扁平，光滑湿润，直径可达2mm。若培养时间长，菌落略呈黄色、隆起，中心厚而不透明。

【质量控制】

霍乱弧菌（小川、稻叶）生长良好，培养18～4h 菌落直径2.5～3.0mm；大肠埃希菌和变形杆菌生长抑制。

【保存】

置4℃冰箱内，1 周内用完。

【注意事项】

1）该培养基国内有商品出售，多数产品已加入庆大霉素，使用时，应详阅说明书。

2）“双抗液”配制：98ml 灭菌蒸馏水中加庆大霉素（5000U/ml）1ml，多粘菌素B 或抗敌E（300000U/ml）1ml。4℃冰箱保存，1 个月用完。

4．四号琼脂培养基

【用途】

用于霍乱弧菌分离培养。

【配法】

蛋白胨10g，氯化钠5g，牛肉浸膏3g，亚硫酸钠（无水）3g，枸橼酸钠10g，猪胆汁粉5g，十二烷基硫酸钠20g，利凡诺（雷佛奴尔）3g，琼脂粉12g，庆大霉素、亚碲酸钾混合液（40000U 庆大霉素1ml 加蒸馏水79ml 混合后，加入0.8g 亚碲酸钾溶解混合即成，每毫升含500U 庆大霉素和10g/L 亚碲酸钾1ml），蒸馏水1L。

将前8 种成分放入玻璃或搪瓷容器内（严禁用铝制容器等金属容器），加入蒸馏水，加热溶解混合后，调整pH 至8.0，然后按1.2%加入琼脂，煮沸至琼脂溶化后，冷至60℃左右，按每100ml 琼脂加入庆大霉素、亚碲酸钾混合液0.1ml，摇匀，倾注平板。

【用法】

取待检标本划线接种平板，置35℃培养过夜。

8h 后即可初步观察结果。24h 培养后，霍乱弧菌呈中心黑色、较大而扁平的菌落。

【质量控制】

配成的培养基呈亮黄色透明；EL－Tor 弧菌稻叶型生长良好；EL－Tor 弧菌小川型生长良好；大肠埃希菌ATCC 25922 生长抑制。

【注意事项】

1）庆大霉素、亚碲酸钾混合液应新鲜配制并置冰箱保存。

(2) 雷佛奴尔应避光保存，而且每批均应预试验后方可使用。成品培养基应避光保存。

(二) 肠杆菌分离培养基

1. 中国蓝琼脂培养基

【用途】

分离肠道菌的弱选择性培养基。

【配法】

肉膏汤琼脂（pH7.4）1L，10g/L 中国蓝溶液（灭菌）10ml，乳糖10g，10g/L 蔷薇红酸乙醇溶液10ml。取乳糖10g 置于已灭菌的肉膏汤琼脂瓶内，加热溶解琼脂并混匀。待冷却至50℃左右，加入中国蓝、蔷薇红酸乙醇溶液混匀，立即倾注平板，凝固后备用。

【用法】

将标本接种平板，置35℃培养18～24h。分解乳糖产酸的细菌，其菌落呈蓝色；不分解乳糖的细菌，菌落为透明的淡红色。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 菌落呈蓝色；痢疾志贺菌Ⅰ型ATCC 13313 和鼠伤寒沙门菌ATCC 13311 菌落呈淡红色。

【保存】

4℃冰箱保存，1 周内用完。

【注意事项】

(1) 中国蓝溶液需煮沸或115℃灭菌15min 后应用。蔷薇红酸乙醇溶液无需灭菌，但加热时应避开火焰。

(2) 蔷薇红酸能抑制革兰阳性细菌生长，但对大肠埃希菌没有抑制作用，标本接种量不宜太多。

(3) 此培养基pH7.4，应呈淡红色。若过碱呈鲜红色，过酸则呈蓝色，均不宜采用。

2. 木糖、赖氨酸、去氧胆酸盐（XLD）培养基

【用途】

为肠道菌选择性培养基。

【配法】

酵母浸膏3g，L－赖氨酸5g，氯化钠5g，D－木糖3.75g，乳糖7.5g，蔗糖7.5g，去

氧胆酸钠2.5g，硫代硫酸钠6.8g，枸橼酸铁铵0.8g，琼脂13.5g，1％酚红溶液8ml，蒸馏水1L。

将上述成分（酚红除外）混合，加热溶解，校正pH至7.2，再加入酚红溶液混匀。121℃高压灭菌15min，倾注平板备用。

【用法】

将标本划线接种平板，置35℃培养18～24h。大肠埃希菌、肠杆菌属、克雷伯菌属、枸橼酸杆菌属细菌可形成黄色、不透明菌落；大多数沙门菌属细菌因不利用糖类，为半透明红色或无色菌落。

【质量控制】

大肠埃希菌呈黄色菌落；宋内志贺菌呈无色菌落；伤寒沙门菌呈红色菌落有黑心；金黄色葡萄球菌抑制生长。

【保存】

贮存于4℃，有效期5d。

3.SS 琼脂培养基

【用途】

用于沙门菌属和志贺菌属（Salmonella－Shigella）的分离培养。

【配法】

腊胨5g，牛肉膏5g，乳糖10g，琼脂15～20g，胆盐（No.3）3.5g，枸橼酸钠8.5g，硫代硫酸钠8.5g，枸橼酸铁1g，1％中性红溶液2.5ml，0.1％煌绿溶液0.33ml，蒸馏水1L。

将上述成分（除中性红、煌绿外）混合于水中，加热煮沸溶解，校正pH至7.0～7.1，然后加入中性红和煌绿溶液，充分混匀冷却至50℃时倾注平板。

【用法】

将标本接种平板，置35℃培养18～24h。沙门菌属菌落呈无色半透明，产生硫化氢者菌落中心呈黑色；志贺菌属的菌落呈无色半透明；大肠菌属呈红色浑浊；宋内志贺菌能延缓发酵乳糖，培养24h后可以出现红色菌落。肠道致病菌的菌落直径均可达1.5mm以上。

【质量控制】

大肠埃希菌菌落呈红色；痢疾志贺Ⅰ型、福氏志贺菌和伤寒沙门菌生长良好，菌落无色；肠炎或猪霍乱沙门菌菌落呈黑色；粪肠球菌、金黄色葡萄球菌不生长。

【保存】

避光，3d内用完。

【注意事项】

煌绿要新配，中性红要优质。

4．麦康凯琼脂培养基

【用途】

麦康凯琼脂（Maconkey agar）用于肠道致病菌的分离培养和非发酵细菌的鉴别。

【配法】

蛋白胨20g，氯化钠5g，胆盐（猪、牛、羊）5g，乳糖10g，琼脂15～20g，1%中性红溶液5ml，蒸馏水1L。

将上述成分（除中性红外）称量加入水中，加热溶解，校正pH至7.2，加入中性红溶液，分装，115℃灭菌20min，冷却至50℃左右倾注平板。

【用法】

取标本或增菌培养物接种平板，置35℃培养18～24h。不发酵乳糖的肠道细菌呈无色菌落，直径约2.0mm左右，光滑半透明。

【质量控制】

大肠埃希菌菌落呈桃红色；痢疾志贺菌菌落呈无色；伤寒沙门菌菌落无色；金黄色葡萄球菌不生长。

【保存】

置4℃冰箱（避光），1周内用完。

【注意事项】

非发酵细菌在该平板上是否生长，是临床鉴定某些非发酵细菌的指标之一。

5．伊红美蓝琼脂培养基

【用途】

用于肠道致病菌及大肠菌群分离培养。

【配法】

蛋白胨10g，乳糖10g，磷酸氢二钾2g，20g/L伊红Y溶液20ml，6.5g/L美蓝溶液10ml，琼脂17g，蒸馏水1L。

将蛋白胨、磷酸盐、琼脂称量混合于水中，并加热煮沸溶解，校正PH至7.1，分装，121℃灭菌15min备用。临用时加热溶化琼脂加入乳糖，冷至50～55℃时加入伊红和美蓝溶液，摇匀倾注平板。

【用法】

取粪便标本或增菌培养物接种平板，置35℃培养18～24h。根据检验目的不同，挑取无色菌落或挑选紫红色及有金属光泽的菌落转种于克氏双糖或三糖铁琼脂进行鉴定。

【质量控制】

大肠埃希菌菌落呈紫红色，有时有金属光泽，直径>2.3mm；伤寒沙门菌菌落呈灰白色，直径>1.8mm；金黄色葡萄球菌不生长。

【保存】

置4℃冰箱，1 周内用完。

6．克氏双糖铁琼脂培养基

【用途】

克氏双糖铁琼脂（Kligeriron agar）用于肠杆菌科细菌的初步鉴定。

【配法】

蛋白胨20g，牛肉膏3g，酵母膏3g，乳糖10g，葡萄糖1g，氯化钠50g，枸橼酸铁铵0.5g，硫代硫酸钠0.5g，0.2％酚红溶液5ml，琼脂12ml，蒸馏水1L。

将前8 种成分称量混合于水中，加热溶解，校正pH 至7.5（pH7.5 时使用效果最佳），再加入琼脂和酚红溶液，煮沸溶解分装试管，每管4ml，经115℃灭菌20min，立即制成高层斜面，待凝固后经无菌试验备用。

【用法】

取待检菌纯培养物，用接种针作底层穿刺和斜面划线接种，置35℃培养18～24h，观察结果。斜面变黄，底层变黄，产气者或不产气者多属大肠埃希菌群及发酵乳糖的菌株。斜面变红，底层变黄，为不发酵乳糖菌株。产硫化氢菌株可使底层或全管产生黑色反应。

【质量控制】

奇异变形杆菌K/A 硫化氢阳性；大肠埃希菌A/A；志贺痢疾杆菌K/A；伤寒沙门菌K/A 硫化氢阳性；铜绿假单胞菌K/K。

【保存】

置4℃冰箱，2 周内用完。

7．三糖铁琼脂培养基

【用途】

用于肠杆菌科细菌初步生化鉴定。

【配法】

蛋白胨15g，腊胨5g，牛肉膏3g，酵母膏3g，乳糖10g，蔗糖10g，葡萄糖1g，氯化钠5g，硫酸亚铁2g/L，硫代硫酸钠0.3g，0.2％酚红溶液5ml，琼脂12g，蒸馏水1L。

将前10 种成分称量混合于水中，加热溶解后校正pH 至7.4，再加琼脂及酚红溶液，加热煮沸溶解。分装试管，每管4ml，经115℃灭菌20min，立即置高层斜面，待凝

固后，经无菌试验备用。

【用法】

取待检菌纯培养物，用接种针作底层穿刺和斜面划线接种，置35 ℃培养18 ～24h 观察结果。发酵乳糖或蔗糖的菌可使斜面及底层均变黄色。仅发酵葡萄糖不发酵乳糖和蔗糖的细菌底层变黄，斜面变红。产生硫化氢的菌株可使底层或整个培养基呈黑色。分解乳糖或蔗糖后产气时有些菌株还能使培养基断裂。

【质量控制】

伤寒沙门菌K／A 硫化氢阳性；副伤寒沙门菌K／A 硫化氢阳性；痢疾志贺菌K／A ；大肠埃希菌A／A ；普通变形杆菌A／A 硫化氢阳性；铜绿假单胞菌K／K 。

【保存】

置4 ℃冰箱，2 周内用完。

【注意事项】

该培养基pH7.5 时使用效果最佳。

8．山梨醇麦康凯琼脂培养基

【用途】

用于致病性、侵袭性和产毒性大肠埃希菌等分离培养。

【配法】

蛋白胨5g ，膵胨3g ，氯化钠5g ，胆盐 (猪、牛、羊) 5g ，山梨醇10g ，琼脂粉12g ，0.1g／L 结晶紫溶液1ml ，5g／L 中性红溶液5ml ，蒸馏水1L 。

将前4 种成分混合于水中，加热溶解，校正pH 至7.2 ，再加入琼脂粉加热煮沸溶解。分装三角烧瓶100ml 。经121 ℃灭菌15min 备用。临用时，加热溶解，再加山梨醇、结晶紫及中性红溶液，摇匀倾注平板。

【用法】

将标本或增菌液接种平板，置35 ℃培养18 ～24h 。与麦康凯琼脂不同之处是挑取致病性大肠埃希菌菌落时，以无色菌落为主，同时兼取红色菌落，如EPEC 迟缓分解山梨醇，菌落呈红色。EHEC O_{157} ：H_7 菌落无色。

【质量控制】

参照麦康凯琼脂。

【保存】

置4 ℃冰箱，1 周内用完。

㈢ 非发酵细菌用培养基

1．金氏培养基 (甲)

【用途】

金氏培养基 (Kings Medium) 用于检测假单胞菌产生的青脓素。

【配法】

蛋白胨20g，无水氯化镁1.4g，无水硫酸钾10g，琼脂15g，甘油10ml，蒸馏水1L。

将上述成分加热、溶解，调pH 至7.2，分装试管，118～121℃灭菌15min，制成斜面和高层备用。

【用法】

取待检菌划种于上述斜面上，35℃培养过夜。观察斜面上产色素情况。

2．氧化发酵试验 (O/F 试验) 培养基

【用途】

用于检测细菌代谢类型。

【配法】

(1) Hugh－Leifson 培养基 (革兰阴性杆菌用)：蛋白胨2g，葡萄糖10g，磷酸氢二钾0.3g，氯化钠5g，溴麝香草酚蓝 (BTB) 0.03g，琼脂2.5g，蒸馏水1L。

(2) 葡萄球菌O/F (葡萄球菌和微球菌鉴别用)：胰蛋白胨10g，酵母浸膏10g，琼脂20g，溴甲酚紫0.001g，蒸馏水1L，葡萄糖10g。

将上述成分混合加热溶解，调pH 至7.1，分装于试管中，每支试管5ml，高压灭菌121℃15min，使成琼脂高层，备用。

【用法】

从斜面上挑取少许培养物，同时穿刺接种两支培养基，其中一支接种后，滴加液体石蜡于培养基表面，高度约1cm。置35℃孵箱培养24～48h。培养基变黄表示细菌分解葡萄糖而产酸，颜色不变为不分解葡萄糖

【质量控制】

金黄色葡萄球菌ATCC 25923、大肠埃希菌ATCC 25922 发酵型；铜绿假单胞菌ATCC27853 氧化型；易变微球菌、粪产碱杆菌不利用。

【注意事项】

(1) 有些细菌不能在上述培养基上生长，需在该培养基中加入2%血清或10g/L 酵母浸膏，重做试验。

(2) 指示剂不能用乙醇配制，因有些细菌可使乙醇产酸，导致发酵或氧化反应影响

结果判断。

㈣ 其他革兰阴性杆菌用培养基

1．军团菌培养基

缓冲活性炭酵母琼脂培养基（BCYE）。

【用途】

用于嗜肺军团菌的分离培养。

【配法】

酵母浸液10g，活性炭（NoritSG）2g，L－半胱氨酸盐酸盐0.4g，可溶性焦磷酸铁盐0.25g，琼脂17g，N－2－乙酰氨基－乙氨基乙醇磺酸（ACES）10g，蒸馏水80ml。

上述成分除半胱氨酸及焦磷酸铁外，其余成分混合加热溶解，经121℃灭菌15min，放水浴中冷却到50℃。另外分别配新鲜L－半胱氨酸溶液（10ml 蒸馏水中含0.4g）及焦磷酸铁溶液（10ml 含0.25g），分别过滤除菌，加入已灭菌琼脂中，并加入1mol/L 氢氧化钾溶液4～5ml 使培养基的最终pH 为6.9～7.0，可用1mol/L 盐酸溶液校正，倾注平板，冷却后置4℃冰箱备用，亦可制成斜面，用于保存菌种。该培养基为黑色。

【用法】

液体标本可直接接种培养基，肺、肝、脾等固体标本须制成100g/L 悬液后再接种培养基，接种后的培养基置35℃需氧环境培养，培养箱需保持一定的湿度。每天用解剖镜检查平板培养物，用略大于100°角的斜射光源照明。在BCYE 平板上，培养4～5d，菌落直径约1～2mm，并出现亮蓝和切削玻璃样的构造；继续培养后菌落增大呈黄绿色，较光滑。

【保存】

在室温、暗室中可保存1 周。

2.Skirrow’s 培养基

【用途】

用于空肠弯曲菌及幽门螺杆菌分离培养。

【配法】

蛋白胨5g，胰蛋白胨5g，酵母膏5g，氯化钠5g，琼脂粉12g，万古霉素10ml，多粘菌素B2500U，TMP5mg，脱纤维羊血70ml，蒸馏水930ml。

除血和抗生素外，其余成分混合于水中，加热溶解，调pH 至7.2，121℃灭菌15min。待冷至50℃时加入羊血7ml 和多抗液0.5ml，摇匀，倾注无菌平板。

【用法】

将标本接种平板，置25 ℃或43 ℃微需氧环境中培养48h，菌落直径达1～2㎜，为不溶血的菌落。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 和粪肠球菌ATCC 33186 不生长；空肠弯曲菌胎儿亚种ATCC29424 生长良好。

【注意事项】

⑴ 多抗液的配制：①乳酸62㎎ (约2 滴) 加入100㎖ 灭菌水中，然后加入TMP100㎎，混合加热100 ℃灭菌。②取①液5㎖，再加万古霉素100㎎ 和多粘菌素B0.38㎎，摇匀后即可。

⑵ 弯曲菌属系微需氧菌，培养时可提供5％氧气及10％二氧化碳。高浓度氧不利于细菌生长，尤其是幽门螺杆菌。因此，标本采集后，应尽快接种培养，或置运送培养基中运送。

⑶ 弯曲菌运送可用布氏菌汤培养基。

3.Campy－BAP 培养基

【用途】

用于分离培养弯曲菌。

【配法】

蛋白胨10g，胰胨10g，葡萄糖10g，酵母浸膏3g，氯化钠5g，重亚硫酸钠0.1g，蒸馏水900㎖，脱纤维羊血100㎖，万古霉素10㎎，多粘菌素B 2500U，TMP5㎎，两性霉素B 2㎎。

将上述成分 (除羊血和抗菌药物外) 加入900㎖ 蒸馏水，加热溶解，调pH 至7.2后分装，121 ℃灭菌15㎜in，加入羊血和抗菌药物，充分混匀后倾注于无菌平皿内。

【用法】

取标本接种于平板，置25 ℃或43 ℃微需氧环境中培养48h，菌落直径达1～2㎜，不溶血。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 不生长；粪肠球菌ATCC 33186 不生长；空肠弯曲菌胎儿亚种ATCC 29424 生长良好。

第五节　生化试验培养基

一、糖发酵试验培养基

1．糖（醇）发酵试验培养基

【用途】

检查细菌对不同糖（醇）类的发酵能力，达到鉴定细菌的目的。

【配法】

蛋白胨10g，牛肉膏3g，氯化钠5g，安德烈（Andrade）指示剂10ml，蒸馏水1L，各种糖（醇）类5～10g。

将上述成分混合后，加热溶解。矫正pH至7.2。根据需要，分别再加相应的糖或醇。分装于13mm×100mm的试管，每管约3ml，115℃灭菌15min。如需观察产气，可在试管内加小倒管1只。

将分离的纯菌接种到糖（醇）发酵管中，置35℃培养18～24h。接种菌若能分解培养基中的糖（醇）类而生成酸，可使指示剂呈酸性反应；若产生气体，则可使液体培养基中的倒管（Durham管）内出现气泡；若接种菌不分解糖（醇）则无反应。

2．血清菊糖试验培养基

【用途】

用于肺炎链球菌与其他链球菌的鉴别。

【配法】

血清（兔血清或牛血清）25ml，1g/L酚红溶液2ml，菊糖1g，蒸馏水75ml。

先取血清25ml、蒸馏水75ml混合，置阿诺灭菌器内加热15min，以破坏血清内的淀粉酶。调pH至7.4，然后加入菊糖1.0g、1g/L酚红溶液2ml摇匀。分装于13mm×100mm的试管，每管2ml。用间歇灭菌法灭菌，每天1次，每次20min，连续3d。

【用法】

将被检菌接种培养基，置35℃培养18～24h。分解菊糖的菌株使培养基变黄；不分解菊糖的菌株，培养基不变色。

【质量控制】

肺炎链球菌ATCC 10015阳性；化脓性链球菌ATCC 19615阴性。

3．胆汁七叶苷试验培养基

【配法】

蛋白胨5g，牛肉浸膏3g，牛胆汁40g，七叶苷1g，枸橼酸铁0.5g，琼脂15g，蒸馏水1L。

将上述成分混合加热溶解，调pH 至7.2，分装试管，115℃灭菌15min。

将待测菌种接种到七叶苷培养基的斜面上，置35℃孵育18～24h，观察结果。培养基变为黑色或棕色者为阳性；不变色者为阴性。

【质量控制】

粪肠球菌ATCC 29212 阳性；化脓性链球菌ATCC 19615 阴性。

【保存】

置4℃冰箱，2 周内用完。

二、酶类测定培养基和试剂

1．氨基酸脱羧酶试验培养基

【用途】

检查细菌使氨基酸脱羧基形成胺使培养基变碱的能力。常用的氨基酸有赖氨酸、鸟氨酸和精氨酸。

【配法】

蛋白胨5g，牛肉浸膏5g，溴甲酚紫0.1g，甲酚红0.005g，吡多醛（VB_6）0.005g，葡萄糖0.5g，蒸馏水1L。

加热慢慢溶解，按10g/L 浓度加入所需要的氨基酸，调pH 至6.0，呈深亮紫色。分装每支2ml，同时配对照管（不加氨基酸），121℃高压灭菌15min，冷却后4℃冷藏备用。

【用法】

将试验菌接种培养基，同时接种对照管1 支。并用灭菌的液体石蜡覆盖，置35℃培养18～24h。阳性菌初期由于细菌发酵葡萄糖产酸呈黄色，若继续孵育，氨基酸经脱羧产生胺类使培养基变碱，指示剂改变颜色，呈紫色或紫红色。阴性呈黄色或不变色。

【质量控制】

赖氨酸脱羧酶迟缓爱德华菌阳性，弗劳地枸橼酸菌阴性；鸟氨酸脱羧酶：产气肠杆菌阳性，弗劳地枸橼酸菌阴性；精氨酸脱羧酶：鼠伤寒沙门菌阳性，普通变形杆菌阴性。

2．耐热DNA 酶培养基

【用途】

用于检测细菌所产生的耐热脱氧核糖核酸酶。

【配法】

胰蛋白胨1.5g，植物蛋白胨0.5g，氯化钠0.5g，DNA2g/L，琼脂1.5g，蒸馏水100ml，2g/L 甲苯胺蓝溶液0.25ml。

将前6 种成分徐徐加热溶解后，调pH 至7.4，加入甲苯胺蓝溶液，分装试管，121 ℃灭菌15min 后备用。

【用法】

上述琼脂倾注于载玻片上，凝固后，打孔，孔径2cm，孔内加入经100 ℃隔水加热15min 的肉汤培养物。将载玻片孵育于35 ℃湿盒内4h，取出观察结果。阳性反应在孔周围出现直径不小于4mm 的粉红色圈，阴性反应培养基的颜色无改变。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌ATCC 25923 阳性；表皮葡萄球菌ATCC 14990 阴性。

3.DNA 酶试验培养基

【用途】

供细菌DNA 酶测定用。

【配法】

DNA2g，胰酪胨15g，大豆胨5g，氯化钠5g，琼脂20g，蒸馏水1L。

将5 种成分混合于蒸馏水中，加热溶解，校正pH 至7.2～7.4，分装三角烧瓶，经115 ℃灭菌15min，倾注灭菌平皿，4 ℃冷藏备用。

【用法】

将待检菌作点状穿刺接种在平板上，置35 ℃培养24h。待细菌生长成集落菌苔后，在其菌苔上及周围滴加0.1mol/L 盐酸溶液数毫升，待片刻后，如待检菌DNA 酶阳性，可在菌苔的周围出现明显的透明圈；而阴性者则无透明圈出现。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌ATCC 25923 和粘质沙雷菌ATCC 274 阳性；表皮葡萄球菌ATCC 14990 和大肠埃希菌ATCC 25922 阴性。

【保存】

置4 ℃冰箱，1 周内用完。

4．氧化酶试验

【用途】

区别假单胞菌与氧化酶阴性的肠杆菌科细菌。

【配法】

盐酸二甲基对苯二胺（或四甲基对苯二胺）0.1g 加蒸馏水10ml。

【用法】

取白色洁净滤纸一角，沾取试验菌落少许，加试剂1 滴。阳性者立即显粉红色，并于5～10s 内呈现深紫色反应。若用四甲基对苯二胺则阳性者呈蓝色。

【质量控制】

铜绿假单胞菌ATCC 27853 阳性；大肠埃希菌ATCC 25922 阴性。

【保存】

置棕色瓶内可用1 周，4℃冰箱保存，或分装于棕色瓶内密封。

5．尿素酶试验培养基

【用途】

用于细菌尿素酶测定。

【配法】

蛋白胨1g，葡萄糖1g，氯化钠5g，磷酸二氢钾2g，4g/L 酚红溶液3ml，琼脂18～20g，200g/L 尿素溶液100ml，蒸馏水1L。

将前5 种成分混合于蒸馏水中，加热溶解，校正pH 至7.0，然后加入酚红溶液，分装每瓶100ml，经121℃灭菌15min 备用。临用时，加热溶解，冷却至55℃左右，加入无菌的尿素溶液10ml，摇匀立即无菌分装于灭菌试管，每支2ml，并置成斜面。经无菌试验后备用。

【用法】

取培养物接种斜面，35℃孵育24h。尿素酶阳性者斜面变红色，阴性者颜色无变化。

【质量控制】

普通变形杆菌ATCC 13315 整个培养基变红（8h）、肺炎克雷伯菌ATCC 27236 仅斜面变红（24h）；大肠埃希菌ATCC 25922 为阴性（24h）。

【保存】

置4℃冰箱，2 周内用完。

6．磷酸酶试验培养基

【用途】

测定细菌产生磷酸酶的能力。用于区别葡萄球菌有无致病性，致病性葡萄球菌呈阳性。还有助于克雷伯菌属与肠杆菌属的鉴定。

【配法】

含磷酸酚酞的营养琼脂培养基。

将上述琼脂加热溶化，待冷却至45℃时，加入滤过除菌的10g/L 磷酸酚酞溶液

1ml，摇匀后倾注平板。

【用法】

接种待测菌株，35℃培养18～24h。在平皿盖上滴加浓氨水1 滴，熏蒸片刻。如有酚酞释出，菌落即变为粉红色为阳性；不变色为阴性。

【注意事项】

(1) 亦可用液体法进行试验：经培养后在培养基内滴加氢氧化钠溶液，观察结果，显红色为阳性。

(2) 以上为酸性磷酸酶的试验方法。如果作碱性磷酸酶试验，可将磷酸对硝基酚加入pH10.5、0.04mol/L 的甘氨酸氢氧化钠缓冲液内。观察结果时不必另行加碱。

(3) 酚酞指示剂产生的颜色随其pH 而变化，试剂的量要准确，太少或太多的碱均可引起假阳性或假阴性结果。

7．马尿酸盐试验培养基

【用途】

测定细菌水解马尿酸钠能力。该培养基常用方法有2 种。

三氯化铁法：

【配法】

马尿酸钠1g，肉汤100ml。

三氯化铁试剂：三氯化铁12g 溶于2%盐酸100ml 中。

将马尿酸钠和肉汤（pH7.8）加热溶解后分装于试管中，每管4ml，121℃灭菌15min。冷却后用玻璃蜡笔记录培养基液面，置冰箱中备用。

【用法】

取纯菌接种培养基，35℃培养48h，观察培养基液面。如液面下降时以蒸馏水补充之。离心沉淀，取上清液0.8ml 加入三氯化铁试剂0.2ml，立即混匀。经10～30min 观察结果，出现稳定沉淀物为阳性；反之为阴性。

茚三酮法甘氨酸在茚三酮的作用下，经氧化脱氨基反应，生成氨、二氧化碳和相应的醛。而茚三酮则生成还原型茚三酮。反应过程中形成的氨和还原型茚三酮，与残留的茚三酮起反应，形成紫色化合物。

8．触酶试验培养基

【用途】

用于链球菌及革兰阳性球菌的初步分群。

【用法】

(1) 玻片法：取18～24h 培养物，置于清洁玻片上，加1 滴3%过氧化氢溶液，如

产生大量气泡为阳性。

2）试管法：取琼脂斜面（不含血液的）18～24h 培养物，接种于试管内，加入3%过氧化氢溶液1ml，如产生大量气泡为阳性。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌ATCC 25923 阳性；无乳链球菌ATCC 13813 阴性。

9.β－半乳糖苷（ONPG）试验培养基

【用途】

用于乳糖迟缓发酵菌和不发酵菌的鉴别。

【配法】

试剂甲为0.01mol/LpH 为7.0 的磷酸氢二钠缓冲液100ml；试剂乙为蛋白胨3g，氯化钠1.5g，蒸馏水300ml，pH7.0。

将试剂甲、乙分别置121℃灭菌15min，冷却至40～50℃左右，试剂乙加入ONPG0.6g，置56℃水浴中加热溶解，无菌过滤，将过滤液与试剂甲合并分装试管，每管2ml，做无菌试验后备用。

【用法】

将标本接种培养基，35℃培养4～18h。培养基呈黄色者为阳性，不变黄色为阴性。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阳性；普通变形杆菌ATCC 13315 阴性。

【注意事项】

ONPG 溶液不稳定，若培养基呈黄色即不可使用。

10．苯丙氨酸试验培养基

【用途】

苯丙氨酸脱氨酶是变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属所特有，可与肠杆菌科及其他细菌区别。也有助于种的鉴别，如苯丙酮酸莫拉菌呈阳性，其他莫拉菌属的菌种呈阴性。

【配法】

DL－苯丙氨酸2g，氯化钠5g，酵母浸膏3g，磷酸氢二钠1g，琼脂12g，蒸馏水1L。

除琼脂外其他的成分加热溶解，调pH 至7.3，再加入琼脂溶解后，分装，每管约4ml，121℃高压灭菌15min，置成斜面，凝固后4℃冰箱保存，备用。

【用法】

取18～24h 培养物，大量接种于培养基，35℃孵育18～24h 后在培养试管中加入100g/L 三氯化铁试剂4～5 滴，转动使试剂布满斜面，阳性者呈绿色，阴性者呈黄色。

【质量控制】

普通变形杆菌ATCC 13315 阳性；大肠埃希菌ATCC 25922 阴性。

【保存】

置4 ℃冰箱保存，2 周内用完。试剂可保存3 个月。

【注意事项】

1） 苯丙氨酸试验须在加入三氯化铁试剂后立即观察，因绿色易很快褪去，无论阳性或阴性结果都必须在5 min 内作出判断。

2） 将斜面试管转动，让三氯化铁试剂流动，可使反应加快，显色亦较明显。

11．淀粉培养基

【用途】

用于链球菌和白喉棒状杆菌的分型鉴定。

【配法】

蛋白胨5g，牛肉浸膏3g，琼脂 （肉场培养基中不加）20g，氯化钠5g，蒸馏水1L，可溶性淀粉20g，小牛血清50 ml。

准确称量前4 种成分加入500 ml 蒸馏水，缓慢加热溶解制成基础培养基。再将20g 淀粉溶于250 ml 蒸馏水中。天然淀粉微溶于水，并不耐热，切勿煮沸过度，防止淀粉水解。将上述两种溶液合并混匀，补足水至1L，调pH 至7.2，121 ℃灭菌15 min，倾注平板备用。

【用法】

取18 ～24h 纯培养物接种琼脂平板，一般可接种几个培养物。置35 ℃孵育。18 ～24h 或者直至出现足够的生长物。将Lugol 碘液＊直接加到孵育过的平板上，培养基呈深蓝色，菌落周围有透明圈为阳性，菌落周围无透明圈为阴性。

【质量控制】

无乳链球菌阳性；产气肠杆菌阴性。

【保存】

置4 ℃冰箱保存，2 周内用完。碘液易于褪色，使用前应进行质量控制。

【注意事项】

1） 倾注好的淀粉琼脂平板不宜放冰箱中保存，否则培养基会变为不透明，可影响结果判断。建议将培养基置带螺旋帽的试管中保存，临用时加热溶解倾注平板，冷却后使用。

2） 淀粉酶在pH 低于4.5 时不稳定。

3） 配制时，避免过热，否则淀粉颗粒自动分解导致假阳性结果。

4）培养时间应不少于36h。

三、碳源和氮源利用试验培养基

1．黏液酸利用试验培养基

【用途】

用于无动力不产气不发酵乳糖的大肠埃希菌与志贺菌属的鉴别。前者多数为阳性，后者均为阴性。

【配法】

蛋白胨10g，粘液酸10g，蒸馏水1L，2g/L 溴麝香草酚蓝溶液12ml。

将上述成分混合溶解，校正PH 为7.4。分装试管，每管约3～4ml，经121℃灭菌15min，4℃冷存备用。

【用法】

取试验菌株18～24h 肉汤培养物1 环接种培养基。35℃孵育1～2 周，每天观察结果。培养基呈黄色为阳性，表明细菌能利用粘液酸盐；若培养基不变色则为阴性。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阳性；痢疾志贺Ⅰ型ATCC 13313 阴性。

2．丙二酸盐试验培养基

【用途】

主要用于下述菌属的鉴定：阳性菌如粪产碱杆菌、亚利桑那菌、克雷伯菌；阴性菌如不动杆菌属、沙门菌属、放线菌属；特别是构橼酸杆菌属内种的鉴定如弗劳地、异型构橼酸杆菌呈阳性，而丙二酸盐阴性构橡酸杆菌呈阴性。

【配法】

酵母浸膏1g，硫酸铵2g，磷酸氢二钾0.6g，磷酸二氢钾0.4g，氯化钠2g，丙二酸钠3g，葡萄糖0.25g，溴麝香草酚蓝0.025g，蒸馏水1L。

将上述成分溶解后调pH 至6.8，分装小试管，每管3ml，121℃灭菌15min，冷却后置冰箱保存。取纯培养物接种培养基中，35℃孵育24～48h。培养基由绿色变蓝色为阳性，培养基为绿色或黄色（仅葡萄糖发酵产酸）为阴性。应观察48h 方可报告。

【质量控制】

肺炎克雷伯菌ATCC 27736 阳性；丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌阴性。

【保存】

置4℃冰箱，1 周内用完。

3．醋酸盐试验培养基

【用途】

用于肠杆菌科的鉴定。

【配法】

醋酸盐2g，氯化钠5g，硫酸镁2g/L，磷酸氢铵1g，磷酸氢二钾1g，琼脂20g，蒸馏水1L。

将上述成分加热溶解，校正pH 至6.8，然后加2g/L 溴麝香草酚蓝溶液12ml，121℃灭菌15min，制成斜面备用。

【用法】

将试验菌接种到斜面上，35℃培养7d，每天观察1 次。培养基由绿色变为蓝色为阳性。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阳性；宋内氏志贺菌ATCC 11060 阴性。

【保存】

置4℃冰箱，2 周内用完。

【注意事项】

(1) 试验菌株要新鲜。

(2) 阴性菌要观察至第7 天方可报告。

4．葡萄糖酸盐试验培养基

【用途】

帮助属间鉴别、种间鉴别和沙雷菌属菌种的鉴定。

【配法】

蛋白胨1.5g，磷酸氢二钾1g，酵母浸膏1g，葡萄糖酸钾40g 或葡萄糖酸钠37.25g，蒸馏水1L。

将上述成分加热溶解，调pH 至7.0，然后分装试管，每管2ml，115℃灭菌15min，冷却备用。

【用法】

取待检菌大量接种培养基，35℃培养24～48h，加斑氏试剂1ml，充分混匀，隔水加热煮沸10min，观察结果。产生黄橙色沉淀为阳性，蓝色沉淀为阴性。

【质量控制】

肺炎克雷伯菌ATCC 27236 阳性；大肠埃希菌ATCC 25922 阴性。

5．枸橼酸盐试验培养基

【用途】

鉴定细菌对枸橼酸盐及无机铵的利用能力。

【配法1　(Simmons)】

硫酸镁0.2g，磷酸二氢铵1g，磷酸氢二钾1g，枸橼酸钠5g，琼脂20g，氯化钠5g，2g/L 溴麝香草酚蓝溶液40ml，蒸馏水1L　(pH6.8)。

【配法2　(Christensen)】

枸橼酸钠3g，葡萄糖0.2g，酵母浸膏0.5g，盐酸半胱氨酸0.1g，枸橼酸铁铵0.4g，磷酸氢二钾1g，硫代硫酸钠0.08g，氯化钠5g，酚红0.012g，琼脂5g，蒸馏水1L　(pH6.9)。

先将盐类溶解于水内，调整pH 值，再加入琼脂，加热溶化后，加入指示剂，混合均匀后分装试管，121℃高压灭菌15min，放成斜面。

【用途】

将待检菌浓密地划线接种在上述斜面上，于35℃培养1～4d，逐日观察结果。Simmons (西蒙) 枸橼酸盐培养基斜面上有细菌生长，培养基由绿色变成蓝色为阳性，无细菌生长，颜色不变蓝色为阴性；Christinsen (柯氏) 枸橼酸盐培养基斜面呈红色为阳性，颜色不变为阴性。

【保存】

置4℃冰箱，2 周内用完。

【质量控制】

肺炎克雷伯菌ATCC 27736 阳性；大肠埃希菌ATCc 25922 阴性。

【注意事项】

(1) 当挑取同一培养物接种一组生化试验管时，在接种枸橼酸盐培养基前，接种针或环要用火焰灭菌，或先接种枸橼酸盐培养基。因培养基上若存在葡萄糖或其他营养物质可导致假阳性结果。

(2) 接种时菌量应适宜，过少可导致假阴性结果，接种物过量可导致假阳性结果。

(3) 通常培养24h 观察结果，但有些枸橼酸盐阳性的细菌则需孵育48h 以上，才能使培养基的pH 值发生变化。

6．碳源利用试验培养基

【用途】

测定细菌利用碳源的能力。

【配法】

磷酸氢二铵0.5g，磷酸二氢钾1.3g，磷酸氢二钠3.2g，硫酸钠0.8g，硝酸钠1g，待测物质2～10g，蒸馏水1L。

将各成分溶于水中，校正pH 至7.2，分装，116℃灭菌15min。

【用法】

将待试菌用9g/L 氯化钠溶液制成低浓度的菌悬液，接种培养基，于适当的温度下培养24～48h。若有细菌生长即为阳性，反之为阴性。

【质量控制】

菌液不可太浓，否则结果不易观察。应设已知菌阴性、阳性对照。可用多种细菌试验同一含碳化合物，亦可用多种含碳化合物试验同一种细菌。

【注意事项】

1）使用的含碳化合物主要为各种糖类和有机酸类。

2）不能用一支培养管做多项试验。

四、其他生化试验培养基

1．硝酸盐还原试验培养基

【用途】

肠杆菌科细菌均能还原硝酸盐为亚硝酸盐，如铜绿假单胞菌能还原硝酸盐并可产生氮气等，而有些细菌则无此特性，故可以此鉴别。

【配法】

蛋白胨10g，硝酸钾（分析纯）2g，蒸馏水1L。

上述成分混合后，加热溶解，校正pH 至7.4。分装试管，每管约4ml，121℃灭菌15min 后备用。

【用法】

将试验菌接种培养基，经35℃培养1～4d，每天吸取培养液1ml，加入试剂甲液、乙液＊各2 滴，阳性者立刻或数秒钟内显红棕色，阴性则不变色。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阳性；硝酸盐阴性不动杆菌ATCC 15038 阴性。

【注意事项】

1）因亚硝酸盐在自然界中分布很广，制备此培养基时所用器皿均要清洗干净。

2）硝酸盐试验很敏感，未接种的硝酸盐培养基应以试剂进行检查，确定培养基中是否存在亚硝酸盐，从而排除假阳性结果。

3）本试验在判定结果时，必须在加试剂后立即观察，否则可因培养液迅速褪色而影响判定。

4）沙门菌属、假单胞菌属的某些菌株，不但能还原硝酸盐为亚硝酸盐，而且还能使亚硝酸盐继续分解，生成氨和氮导致假阴性结果。

5）若加入硝酸盐试剂不出现红色，需检查硝酸盐是否被还原。可于原试管内再加

入少许锌粉，如出现红色证明产生芳基肼，表示硝酸盐仍然存在；如仍不产生红色，表示硝酸盐已被还原为氨和氮。亦可在培养基内加1 只小倒管，若有气泡产生，表示有氮气生成，可以排除假阴性。

2．亚硝酸盐还原试验培养基

【用途】

测定细菌还原亚硝酸盐的能力。

【配方】

蛋白胨10g，亚硝酸钾2g，酵母浸膏3g，蒸馏水1L。

将上述成分混合后，加热溶解，调pH 至7.0。分装试管，每管约4ml，加入小倒管1 只，121℃灭菌15min 后备用。

【用法】

将试验菌接种于亚硝酸盐培养基中，35℃培养24～48h。24h 观察倒管中有无气泡出现，若有气泡则为阳性，无气泡为阴性。48h 培养物检测亚硝酸盐存在与否，方法是在培养物内加入硝酸盐还原试剂甲、乙液各0.5ml，如无红色出现为阳性，说明亚硝酸盐已被还原；反之为阴性，说明培养基中尚有亚硝酸盐存在。

【质量控制】

铜绿假单胞菌ATCC 27853 阳性；硝酸盐阴性不动杆菌ATCC 15038 阴性。

【注意事项】

(1) 因亚硝酸盐在自然界中分布很广，故在制备此培养基时所用器皿均要清洗干净。

(2) 未接种的亚硝酸盐培养基应以硝酸盐试剂进行检查，出现红色反应方可使用。

3.40%胆汁肉汤培养基

【用途】

用于链球菌属的鉴别。

【配法】

蛋白胨10g，氯化钠5g，牛肉浸膏5g，新鲜胆汁 (猪、牛) 400ml，蒸馏水600ml。

先将蛋白胨、牛肉膏、氯化钠加热溶于蒸馏水中，调pH 至7.6，加入胆汁混匀后，分装试管，每管3ml，置115℃灭菌20min，冷藏备用。取新鲜猪 (牛) 胆若干只，取胆汁用沙布过滤，装于瓶中115℃灭菌20min，冷却后置4℃冰箱内，次日取出吸取上清液备用。

【用法】

取待检标本接种肉汤，置35℃培养24～48h，观察有无细菌生长。阳性菌呈颗粒状

生长，上清液澄清，管底有沉淀；阴性菌则不生长。

【质量控制】

粪肠球菌ATCC 29212 阳性；化脓链球菌ATCC 19615 阴性。

【注意事项】

若为初次观察或培养基本身不易观察，可转种血琼脂平板。

4.CAMP＊试验培养基

【用途】

检查细菌产生和合成CAMP 因子的能力。

【配法】

同血琼脂平板。

【用法】

在血琼脂平板上，先以金黄色葡萄球菌划一横线接种，再将被检的B 群链球菌与上述划线作垂直划线接种，两者不能相交，相距0.5～1.0cm，于35℃培养18～24h。在两种细菌划线之交接处出现箭头形透明溶血区为阳性；无箭头状溶血区为阴性。

【质量控制】

无乳链球菌ATCC 13813 阳性；粪肠球菌ATCC 29212 阴性。

【注意事项】

(1) 每批要用A、D 群链球菌作阴性对照，用B 群链球菌作阳性对照。

(2) 用无菌9g/L 氯化钠溶液洗涤3 次的羊红细胞，制成含5%羊血的琼脂平板效果较好。

(3) 用葡萄球菌β－溶血素滤液做成纸条进行试验效果亦较佳。

4．硫化氢试验培养基

检测硫化氢产物有很多方法，以醋酸铅法最为敏感。其适用于肠杆菌科以外的细菌所产生的少量硫化氢的检测；而硫酸亚铁法，为检查硫化氢的常规培养基。

【用途】

观察细菌产生硫化氢的能力。

醋酸铅培养基

【配法】

蛋白胨10g，胱氨酸0.1g，硫酸钠0.1g，蒸馏水1L。

将上述成分加热溶解，调整pH 为7.0～7.4，分装试管，每管液体高度为4～5cm，115℃灭菌20min。将滤纸剪成0.1～1.0cm 宽的纸条，用50～100g/L 醋酸铅溶液浸透、烘干，置于皿内备用。

【用法】

将培养物接种上述培养基中，挂上纸条经35 ℃孵育24h。纸条变黑为阳性，无变化为阴性。

硫酸亚铁琼脂培养基

【配法】

牛肉膏3g，酵母浸膏3 鸭蛋白胨10g，硫酸亚铁0.2g，氯化钠5g，硫代硫酸钠0.3g，琼脂12g，蒸馏水1L。

将上述成分加热溶解，分装试管，每管3ml，115 ℃灭菌20min 备用。

【用法】

将试验菌株穿刺接种到培养基中，经35 ℃培养24h 后，观察结果。培养基呈黑色为阳性，不变黑色为阴性。

【质量控制】

鼠伤寒沙门菌ATCC 13311 阳性；宋内志贺菌ATCC 11060 阴性。

【保存】

置4 ℃冰箱，2 周内用完。

5．奥普托欣敏感试验（Optochin sensitivity test）纸片

【用途】

测定细菌对化学药品奥普托欣的敏感性。

【配法】

将奥普托欣（Optochin，乙基氢化羟基奎宁，ethylhydrocupe hydrochloride）10mg 溶于10ml 蒸馏水中，取1ml 加入200 片直径为6mm 的灭菌纸片中，使其充分吸收，并于37 ℃烘干备用。每片含Optochin5μg 或将宽8mm 的滤纸条浸于1∶4000 的Optochin 水溶液中，取出烘干备用。

【用法】

将被检菌的肉汤培养物用无菌棉棒均匀涂布于血琼脂平板上，取Optochin 纸片贴于平板上，35～37 ℃培养18～24h。抑菌圈直径＞14mm 为敏感，≤14mm 为耐药。

【质量控制】

肺炎链球菌ATCC 10015 阳性；化脓性链球菌ATCC 19615 阴性。

6.O/129 试验纸片

【用途】

用于弧菌属的鉴定。

【配法】

0/12950mg，溶于50ml 无水乙醇中，取1ml 加入100 片直径6mm 的无菌滤纸片中，吸收后于37 ℃烘干备用。每片滤纸含0/12910 μg。

【用法】

将待检菌的肉汤涂布于碱性琼脂平板，取0/129 纸片贴于平板上，35 ℃培养18 ～24h。平板出现抑菌圈为阳性，无抑菌圈为阴性。

【质量控制】

创伤弧菌阳性；亲水气单胞菌阴性。

7.pH9.6 肉汤培养基

【用途】

用于鉴定链球菌。

【配法】

pH9.6 的肉汤100ml，葡萄糖2g/L。

将普通肉汤调整pH 至9.6，加入葡萄糖溶解后，分装试管，每管2 ～3ml，121 ℃灭菌15min 备用。

【用法】

将待检菌接种培养基，置35 ℃培养18 ～24h。培养基有混浊物为阳性。

【质量控制】

粪肠球菌ATCC 29212 阳性；化脓性链球菌ATCC 10389 阴性。

【保存】

4 ℃冰箱保存，2 周内用完。

8．氰化钾试验培养基

【用途】

主要用于属间的鉴别，生长如弗氏枸橼酸杆菌、克雷伯菌－肠杆菌菌群、铜绿假单胞菌，不生长如沙门菌－亚利桑那菌群、大肠埃希菌、粪产碱杆菌。

【配法去】

蛋白胨10g，氯化钠5g，磷酸二氢钾0.225g，磷酸氢二钠4.5g，蒸馏水1L。

将上述成分加热溶解在三角烧瓶中，121 ℃灭菌15min，临用时加入50g/L 氰化钾溶液1.5ml 混匀，分装于无菌试管中，一份不加氰化钾作对照。

【用法】

取纯培养物接种两管，1 支氰化钾实验管，1 支对照管，置35 ℃培养24 ～72h。阳性结果为实验管混浊，对照管混浊；阴性结果（敏感）为实验管清晰（不生长），对照管混浊（生长）。

【质量控制】

铜绿假单胞菌ATCC 27853 生长；福氏志贺菌不生长。

【保存】

置4 ℃冰箱内，1 周用完。

【注意事项】

1） 氰化钾抑菌能力与接种菌量及培养基成分有很大关系，所以在试验时接种菌量不宜过多。

2） 氰化钾剧毒，使用时注意安全。氰化钾培养基废弃前 (无论是否用过)，应作无害化处理：每管加400g/L 氢氧化钾溶液0.1ml 和米粒大的硫酸亚铁结晶。

9．葡萄糖蛋白胨水培养基

【用途】

1） 帮助肠杆菌属与大肠埃希菌属、葡萄球菌属与微球菌属的属间鉴别；

2） 帮助肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、臭鼻克雷伯菌、鼻硬结克雷伯菌间的菌种鉴别；

3） 帮助蜂房哈夫尼亚菌与小肠结肠炎耶尔森菌的菌种鉴定。

4） 用于VP 试验。

【配法】

多价蛋白胨7g，葡萄糖5g，磷酸氢二钾5g，蒸馏水1L。

将上述成分混合溶解后，调pH 至7.2，分装小试管，121 ℃灭菌15min。

【保存】

置4 ℃冰箱中保存备用。

【用法】

取18～24h 培养物小量接种，35 ℃孵育24～48h，有时可能延长数天。有些细菌，特别是哈夫尼亚菌，在35 ℃孵育时VP 试验结果不稳定，但在25～30 ℃下则呈阳性＊。若怀疑为哈夫尼亚菌时，可重复VP 试验并在25 ℃孵育。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阴性；阴沟肠杆菌阳性。

【保存】

培养基置4 ℃冰箱，2 周内用完。试剂易失效，应用前应进行质量控制。

【注意事项】

1） 加入奥梅拉试剂后要充分混合，促使乙酰甲基甲醇氧化，使反应易于进行。

2） 试剂必须用已知阳性和阴性的标准菌株进行对照检查。

3） 试剂中加入400g/L 氢氧化钾是为了吸收二氧化碳。加入量应少于0.2ml，且次序不能颠倒。

4） 贝立脱法十分敏感，可检出以前认为VP 试验阴性的某些细菌。

5） 许多实验室工作人员有一个错误的印象，即VP 试验阳性菌MR 试验自然是阴性，反之亦然。实际上，肠杆菌科的大多数细菌产生相反的反应（由于乙酰甲基甲醇形成碱性增加，导致MR 阴性和VP 阳性）。某些细菌如蜂房哈夫尼亚菌和奇异变形杆菌37℃下孵育可产生MR 和VP 同时阳性反应，后者常延迟出现。

6） α－萘酚乙醇溶液易失效，试剂放室温暗处可保存1 个月。氢氧化钾溶液可长期保存。国内多采用贝立脱法。

10．甲基红试验培养基

【用途】

检查细菌发酵葡萄糖产酸的能力；用于鉴别某些细菌，如大肠埃希菌（阳性）、产气肠杆菌（阴性）、阴沟肠杆菌（阴性），克雷伯菌属一般为阴性，耶尔森菌属阳性，其他革兰阴性非肠道杆菌阴性，单核李斯特菌阳性。

【配法】

1） 葡萄糖蛋白胨水培养基（见前）。

2） 试剂：甲基红0.1g，95％乙醇300ml，蒸馏水200ml。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阳性；产气肠杆菌阴性。

【注意事项】

1） 试剂和培养基在应用前要用已知阳性菌（如大肠埃希菌）和已知阴性菌（如产气肠杆菌）做对照试验。

2） MR 试验的正确性取决于足够的孵育时间，接种细菌后至少要孵育24h。通常每毫升培养物滴加1 滴指示剂。

【保存】

置4℃冰箱，培养基2 周内用完。甲基红试剂置密闭的棕色瓶内，可使用3 个月。

11．蛋白胨水培养基

【用途】

用于细菌靛基质试验。

【配法】

蛋白胨（或胰蛋白胨）20g，氯化钠5g，蒸馏水1L。

将上述成分溶于水中，校正pH 至7.2，分装试管，每管2～3ml，置121℃灭菌

15min 备用。

【用法】

将待检菌接种培养基，经35℃培养18～24h，在培养物液面，徐徐加入靛基质柯氏试剂＊数滴，阳性者立即出现玫瑰红色，阴性者呈黄色。

【质量控制】

大肠埃希菌ATCC 25922 阳性；肺炎克雷伯菌阴性。

【保存】

置4℃冰箱，使用期2 周。

【注意事项】

1）靛基质试验方法还有试纸悬挂法，色氨酸滴板法及斑点法，请参阅有关资料。

2）选用的蛋白胨一定要含有丰富的色氨酸，否则不能应用。

3）国内多采用柯氏试剂。

第六节　抗菌药物敏感试验培养基

抗菌药物敏感试验用于测定抗菌药物或其他抗微生物制剂在体外抑制细菌生长的能力。有琼脂扩散法和稀释法两种。

WHO 推荐改良Kirby－Bauer 法抗菌药物敏感试验，其技术简单，可重复性好，且特别适合快速生长的致病菌。但其不适用于肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和奈瑟菌的抗菌药物敏感试验，这些细菌须在常规的抗菌药物敏感试验培养基内补充特殊的营养成分。

一、M－H 琼脂培养基

【用途】

Kirby－Bauer 法抗菌药敏试验指定使用本培养基。M－H 琼脂（Muller－Hinton 琼脂，水解酪蛋白琼脂）加5％羊血制成血琼脂平板或制成巧克力琼脂平板用于检测肺炎链球菌和流感嗜血杆菌。

【配法】

牛肉浸出物1L，水解酪蛋白17.5g，可溶性淀粉1.5g，琼脂17g。

将上述各成分混合，静置10min，待可溶物完全溶解后，121℃高压灭菌15min。冷至50℃左右，吸取25ml 培养基注入直径90mm 的平皿内，制成厚度为4mm 的琼脂平板。

【质量控制】

用质控菌株测定药物的抑菌环与NCCLS 的标准参比判断培养基的质量。

常用的标准菌株有：金黄色葡萄球菌ATCC 25923；大肠埃希菌ATCC 25922；铜绿假单胞菌ATCC 27853；粪肠球菌ATCC 29212 或33186；肺炎链球菌ATCC 49619；流感嗜血杆菌ATCC 49247；淋病奈瑟菌ATCC 49226。

【保存】

琼脂平板应新鲜使用，4 ℃冰箱保存，1 周内用完。

【注意事项】

1）质量控制标准参见NCCLS 纸片法药敏试验操作标准。

2）在M－H 琼脂培养基中添加5％脱纤维羊血，即可用于肺炎链球菌的抗菌药物敏感试验。

3）在M－H 琼脂培养基上，补充辅酶Ⅰ15 μg／ml，牛血红蛋白15 μg／ml，酵母浸膏5 mg／ml，胸腺嘧啶脱氧核苷磷酸化酶0.2U／ml，可用于流感嗜血杆菌的抗菌药物敏感试验。

4）NCCLS 推荐淋病奈瑟菌用GC 琼脂平板，添加生长补充剂。生长补充剂由下列试剂组成：每100 ml 水中含有1.1 mg 胱氨酸，0.03g 鸟嘌呤，3 mg 硫胺，13 mg 对氨基苯甲酸，0.01g 维生素B_{12}，0.1g 羧化辅酶，0.25g 辅酶Ⅰ，1 mg 嘌呤腺，10 mg L－谷氨酰胺，100 mg 葡萄糖，0.02g 硝酸铁。

二、M－H 肉汤培养基

【用途】

用于稀释法细菌药物敏感试验（MIC 和MBC 测定）。

【配法】

牛肉浸汤600 ml，水解酪蛋白17.5g，可溶性淀粉1.5g，蒸馏水400 ml。

将上述成分混合加热溶解，校正pH 至7 百炼成钢3 ±0.1，121 ℃灭菌15 min 备用。如试验菌对营养要求较高，临用前按2％～5％比例加入羊血。

【质量控制】

质控菌株同M－H 琼脂培养基，凡自配或购置商品培养基均需用质控菌株和药物标准品进行测试，结果符合方可使用。

【保存】

置4 ℃冰箱，2 周内用完。

【注意事项】

NCCLS 推荐使用含阳离子M－H 培养基，即在M－H 液体培养基中含有钙离子10～25 mg／L，镁离子10～25 mg／L。配法如下：氯化钙3.68g 溶于100 ml 蒸馏水中，即为含钙离子10 mg／ml 贮存液；氯化镁8.36g 溶于100 ml 蒸馏水中，即为含镁离子10 mg／ml 贮存

液。

第七节　细菌L 型培养基

一、细菌L 型增菌培养基

㈠ 高渗液体细菌L 型增菌培养基

【用途】

可用作基础培养基。也用于血液、骨髓、胸水等标本进行细菌L 型增菌培养。

1．高渗盐液体增菌培养基

【配法】

新鲜牛肉500g，蛋白胨10g，氯化钠40g，蒸馏水1L。

将新鲜牛肉去除脂肪、筋膜，切成小块后用绞肉机绞碎，称取500g 加水1L 混合后置冰箱浸泡过夜；将肉浸液煮沸30min，然后用麻布或绒布挤压过滤；加入蛋白胨、氯化钠后加热溶解，并补足因蒸发而失去的水分，调整pH 至7.4～7.6；用滤纸过滤后分装小瓶，121℃灭菌15～20min。

2．高渗糖液体增菌培养基

【用途】

用于血液、骨髓、胸水等标本的细菌L 型增菌培养。

【配法】

新鲜牛肉500g，蛋白胨10g，氯化钠30g，蔗糖150g，蒸馏水1L。

同上述高渗盐培养基，惟高压蒸汽灭菌时采用温度为115℃，时间为20min，以免蔗糖分解。

【用法】

取5ml 血液或其他标本直接种于高渗盐、高渗糖液体培养基，置35℃培养1～7d，每天观察细菌生长情况。在上述增菌培养基上，细菌L 型呈颗粒状生长，颗粒可粘附于管壁或沉淀于管底。

【质量控制】

金黄色葡萄球菌L 型生长良好。

㈡ 普通液体细菌L 型增菌培养基

【用途】

用于血液、脑脊液等体液标本中细菌L 型的增菌培养。

【配法】

1） 牛肉浸液1L，氯化钠30～40g，蛋白胨（优质）20g。

2） 牛肉浸液1L，氯化钠30g，蔗糖150g，蛋白胨20g。

将各成分称量混合加热溶解后，校正pH 至7.4～7.6，分装培养瓶，每瓶15ml，121℃灭菌15min 备用。

【用法】

用无菌操作采集标本，立即接种于细菌L 型液体培养基和常规血液增菌培养基内，标本与培养基之比为1∶10，置35℃培养3～7d，逐日观察。如发现培养液产生混浊、溶血、絮状沉淀或瓶壁上附有粘性颗粒等细菌生长现象，立即分离至细菌L 型分离平板上进行鉴定。

【质量控制】

用细菌L 型做生长试验，培养24～72h，生长良好。

【保存】

置4℃冰箱内使用1～2 周。

二、细菌L 型分离琼脂培养基

【用途】

用于常见细菌L 型的分离培养。

1.Kagan 分离平板

【配法】

牛肉浸液800ml，氯化钠50g，蛋白胨（Oxoid）20g，琼脂粉（Oxoid）8g，血浆（人、马、羊）200ml。

将前四种成分称量混合加热溶解，校正pH 至7.5±0.1，分装每瓶80ml，121℃灭菌15min 冷藏备用。临用时加热溶解后，冷却至56℃加入血浆20ml 摇匀倾注平板。放在密封塑料袋中，置4℃冰箱备用。

【注意事项】

血浆要预先灭菌处理，并经56℃水浴灭活30min。

2．蚌埠85－7 分离琼脂培养基

【配法】

牛肉浸液1L，氯化钠40g，蛋白胨30g，明胶（生物试剂）30g，琼脂粉5～8g。

将上述成分混合，加热溶解，校正pH 至7.4～7.6，分装后，经121℃灭菌15min 后倾注平板，置4℃冰箱备用。

【用法】

将血、脑脊液、尿等标本或增菌培养物滴种于平板约0.1ml，用L 型玻棒均匀涂开，置35 ℃温箱内启盖片刻，除去平板表面水分。在平板的边端贴一片专用诱导纸片。覆盖后置35 ℃10 %二氧化碳环境下3 ～5d，逐日观察。如有可疑L 型菌落，用低倍镜检查。在诱导区与非诱导区同时见到L 型菌落说明标本内确有细菌L 型存在；若诱导区存在L 型菌落，而非诱导区无，则提示标本内有细菌L 型变异的趋向。

【质量控制】

1）细菌诱导试验：在该平板上能诱导金黄色葡萄球菌Coweng Ⅰ标准菌株出现L 型菌落和G 型菌落。

2）用L 型菌落作10^{-7}稀释，取0.1ml 接种，经培养获得单个菌落和纯培养。

【保存】

置4 ℃冰箱内，2 周用完。

第八节　钩端螺旋体、支原体和衣原体培养基

一、钩端螺旋体培养基——柯少夫（Korhof）培养基

【用途】

用于钩端螺旋体增殖。

【配法】

蛋白胨400mg，氯化钠700mg，碳酸氢钠10mg，氯化钾20mg，氯化钙20mg，磷酸二氢钾120mg，磷酸氢二钠440mg，蒸馏水500ml，无菌兔血清（灭活）8 ～10ml。

将各成分溶于蒸馏水内煮沸20min，以滤纸过滤，调整pH 至7.2，分装烧瓶内，每瓶100ml，121 ℃灭菌20min；无菌采取兔心血分离血清，置56 ℃水浴箱中30min 以破坏补体；上述蛋白胨盐溶液每100ml 中加入无菌兔血清8 ～10ml；混合后，无菌分装中号试管中，每管5ml；置56 ℃水浴箱30min；37 ℃温箱中孵育2d，剔去污染者。

【注意事项】

1）为防止污染，每100ml 培养基可加50mg 磺胺嘧啶钠。

2）为了促进钩端螺旋体生长，可于该培养基中加入维生素B_{12}及烟酸（各1mg／100ml），并将兔血清量自8 %减至5 %，培养基中不加氯化钙（因氯化钙对生长无作用，且常形成沉淀物），再以100 ℃加热30min。用此法制得培养基清晰，无任何沉淀。

二、支原体培养基

1.1.4 %PPLO 琼脂培养基

【用途】

分离支原体。

【配法】

牛心（去脂绞碎）250g，氯化钠5g，胰蛋白酶（不含乳糖）2.5g，蛋白胨10g，酵母浸膏1g，琼脂粉14g，蒸馏水1L。

1）牛心消化液配制：取去脂绞碎牛心250g，氯化钠5g 及蒸馏水900ml 混合；另取胰蛋白酶2.5g，溶解于100ml 5g/L 氯化钠溶液中，然后与上述牛心消化液混合，放置50～60℃水温箱内消化2h，中间不断搅拌，消化后用两层纱布过滤，滤液煮沸5min，用滤纸过滤后，补足水分至原量，然后加酵母浸膏1g，混匀，冷却后调pH 至8.0，分装后121℃灭菌15min 备用。

2）支原体基础琼脂：取上述牛心消化液（已加氯化钠）1L，加蛋白胨10g 和琼脂粉14g，混合后，加热溶解，调pH 至7.8～8.0，再加热煮沸，用脱脂棉或绒布过滤，过滤后分装于圆瓶中，每瓶70ml，121℃灭菌15min，备用。

3）250g/L 鲜酵母液制备：食用鲜酵母块250g，加蒸馏水1L，混合后，煮沸2min，用滤纸过滤，滤后置4℃冰箱中过夜，使之沉淀，次日吸取上清液，用150g/L 氢氧化钠溶液调pH 至8.0，再煮沸1 次，冷却后，3000r/min 离心45min，吸取上清液，分装于瓶中，121℃灭菌15min，放4℃冰箱中备用，可保存3 个月。

4）倾注平板：溶解基础琼脂，冷却至80℃左右，每瓶（70ml）内立即加预温在37℃培养箱内的无菌马血清或小牛血清20ml，250g/L 鲜酵母浸出液10ml，10g/L 乙酸铊溶液2.5ml，青霉素G 钾盐溶液（20 万U/ml）0.5ml 和两性霉素B 溶液（5mg/ml）0.1ml；充分混匀后倾注9cm 平板，经37℃培养过夜，无菌试验阴性者，存放4℃冰箱备用。

【注意事项】

1）乙酸铊是极毒药品，须特别注意安全操作。

2）支原体美蓝琼脂平皿为分离肺炎支原体的选择性平皿，口腔、唾液分泌物中的其他支原体均被抑制生长，肺炎支原体生长为“桑椹状”无色的菌落。

3）支原体传代、移种用0.1%半固体琼脂，配制时除用0.1%琼脂粉外，其他成分与支原体基础培养基相同，但不加两性霉素，此半固体琼脂分装在试管内灭菌备用。传代时将平皿上已选定的支原体菌落用无菌刀片切下一小块，直接移种于半固体管中，置适当的气体环境中，培养3～5d 后，可在琼脂小块出现“小岛状”絮片生长物，或呈

颗粒状，即次代支原体。

4）支原体传代用液体培养基：其成分与上述支原体半固体琼脂相同，不加琼脂粉和两性霉素B。

2．肺炎支原体分离用双相培养基

【用途】

用于喉拭标本直接分离肺炎支原体。

【配法】

1）底层琼脂斜面：其成分与上述支原体半固体琼脂相同，不加两性霉素B。无菌分装于经灭菌的链霉素空瓶中，每瓶3ml，置成斜面，此为底层。

2）液体培养基：其成分与上述支原体传代用液体培养基相同。但在未高压灭菌前，再加入葡萄糖1g，美蓝0.001g（即10g/L 美蓝溶液0.1ml），1g/L 酚红溶液2ml，115℃灭菌15min，冷却后，再加入辅助成分和防止杂菌生长的成分。然后，在上述底层琼脂斜面上，每瓶再加入液体培养基3～5ml，瓶塞用煮沸灭菌的厚口橡皮塞。经37℃培养过夜，无菌试验阴性者，存放4℃冰箱中备用，可保存1 个月。

【注意事项】

已接种的双相培养管，37℃下普通环境培养2～4 周，观察结果，阳性生长见双相管由淡紫色变成绿色，再转变为黄色，因肺炎支原体发酵葡萄糖，还原美蓝。取阳性管用分离支原体固体平皿分离菌落，平皿放人含95%氮气和5%二氧化碳的环境中，或放入含5%二氧化碳的环境中培养2～4 周，阳性平皿可见菌落生长。

三、衣原体培养基——鸡胚培养基

【用途】

培养增殖和分离鹦鹉热、性病淋巴肉芽肿和沙眼等衣原体。

【配法】

7 日龄鸡胚3～5 只。

精选产后10d 内并10℃左右保存的受精鸡卵孵育，置38～39℃、相对湿度40%～60%的孵卵箱中孵育，4d 后用检卵灯检视发育情况，挑出未受精及死亡者。鸡胚检视时可见清晰血管小团或花纹，其中有鸡胚暗影，稍大者并见胚动等。将感染材料研磨合并，加含抗菌药物的肉汤制成10%～20%的悬液，室温中置1h 后，接种鸡胚卵黄囊0.25ml，每份标本接种3～4 只鸡胚，置35℃培养，每日观察1 次。3d 以后收获死亡的鸡胚卵黄囊，先做涂片染色，选样疑似或阳性材料再行传代，直到含有丰富衣原体。

【注意事项】

1）如感染后13d 鸡胚仍然存活，再行盲目传代。先将鸡胚在4℃冰箱中放几小时，

然后解剖黄囊，研碎后制成悬液，低速离心，取上清液接种鸡胚。如连续3 代阴性，即为阴性结果。

1） 待检标本于室温不宜久置，如1h 内不能接种，可放普通冰箱中；如放置－70 ℃低温中，则可保存较长时间。

第九节　真菌培养基

一、沙保罗琼脂培养基

【用途】

供真菌及酵母样真菌的分离培养用。

【配法】

麦芽糖40g，蛋白胨10g，琼脂20g，蒸馏水1L。

将上述成分溶于水，加热溶解，调pH 至6.0 ±0.2，分装三角瓶或试管中，118 ℃灭菌15 min，倾注平板或置斜面，无菌试验后备用。

【用法】

将标本接种培养基，如系血液标本，则采取1 ～2 ml，与冷却至45 ℃左右沙保罗琼脂混合，倾注接种平板。分别置35 ℃和25 ℃恒温箱内同时培养。35 ℃培养48h，25 ℃需连续培养5d，逐日观察结果。发现真菌及酵母样可疑菌落，转种沙保罗琼脂斜面，获得纯培养后进行鉴定。

【质量控制】

白色念珠菌和新型隐球菌生长良好。

【注意事项】

1） 本培养基如不加入琼脂，即为沙保罗液体培养基，供真菌及念珠菌的增菌培养用。

2） 加入氯霉素0.05 ～0.125 mg/ml 或放线菌酮0.5 mg/ml，可抑制细菌和污染的霉菌及隐球菌生长。此两种药均耐热，可直接加入培养基内高压灭菌。

3） 添加酵母浸膏5 mg/ml，可促进皮肤癣菌生长。加入维生素$B_1$0.1 mg/ml，可促进紫色癣菌和断发癣菌生长。

4） 将麦芽糖减少到20g/L，为沙保罗20g/L 麦芽糖琼脂培养基，可供诱导真菌产生孢子用。

5） 该培养基呈酸性，应提高20 %的琼脂用量。

二、玉米粉琼脂培养基

【用途】

鉴定酵母样真菌用。白色念珠菌在该培养基上25 ℃培养24h 可长出假菌丝，顶端有典型的厚膜孢子，可与其他念珠菌鉴别。

【配法】

玉米粉4g，琼脂粉8g，蒸馏水1L（pH6.0 ±0.2）。

将细米粉加水浸泡数分钟，扎紧瓶口，浸入60 ℃水浴4h，取出后用沙布过滤，除去粗渣，补足水分。无须调整pH 值。加入琼脂，煮沸溶解，有沉淀物再过滤1 次，分装试管，121 ℃灭菌15 min 备用。用玻璃片法点种后，置平皿内，保持一定湿度，置23～26 ℃下培养24～48h。取出玻片培养物，用高倍镜观察真假菌丝和有无厚壁孢子。

【质量控制】

白色念珠菌（ATCC 26790）厚膜孢子阳性；新型隐球菌（ATCC9763）厚膜孢子阴性。

【注意事项】

（1）玉米粉可用糯米粉或可溶性淀粉代替，效果相同。

（2）该培养基加入10 ml/L Tween －80，制成玉米粉Tween －80 琼脂，用途相同，效果更好。

第十节　厌氧菌培养基

一、液体培养基——石蕊牛乳培养基

【用途】

观察细菌对牛乳的凝固及发酵作用。

【配法】

新鲜脱脂牛乳1L，20g/L 石蕊水溶液10 ml（16g/L 溴甲酚紫乙醇溶液1 ml，pH6.8）。

将新鲜牛乳隔水煮沸30 min，冷却后置4 ℃冰箱内过夜。用吸管吸出下层乳汁，注入另一烧瓶内，弃去上层乳脂。加入石蕊溶液，分装试管，113 ℃灭菌15 min（或间歇灭菌）。置35 ℃培养24～48h，若无细菌生长，即可4 ℃冷藏备用。

【用法】

将被检菌接种于上述培养基中，若为芽胞梭菌，要在培养基内加入微量铁末，于35 ℃培养8～24h，必要时可延长至14d。

【结果观察】

产酸：因发酵乳糖而产酸，使指示剂变为粉红色。

产气：发酵乳糖同时产气，可冲开上面的凡士林。

凝固：因产酸太多而使牛乳中的酪蛋白凝固。

胨化：将凝固的酪蛋白继续水解为胨，培养基上层液体变清，底部可留有未被完全胨化的酪蛋白。

产碱：乳糖不发酵，因分解含氮物质，生成胺及氨，培养基变碱，指示剂变为蓝色。

不变：乳糖不发酵，指示剂无变化，与未接种管相同。

白色：石蕊被还原成白色。

急骤发酵：酸凝块被产生的大量气体所破坏。

【质量控制】

粪产碱杆菌碱性反应，培养基呈蓝色；变形杆菌没有变化，培养基仍呈紫色；产气荚膜梭菌急骤发酵，酸凝块被气体破坏。

【注意事项】

培养基在灭菌前加入凡士林，可观察厌氧菌对牛乳中乳糖分解情况。若全脂牛奶需行脱脂处理，该培养基pH6.8，呈紫色。

二、疱肉培养基

【用途】

主要用于梭菌属的培养。

【配方】

牛肉渣0.5g，牛肉浸液7ml（pH7.6）。

将干燥的肉渣0.5g 装入15mm ×150mm 试管内，再加入pH7.6 牛肉浸液7ml，两者高度比例为1∶2。在试管液面上加一层3～4mm 厚度的融化凡士林。用橡皮塞塞紧，经121℃灭菌15min 后，置4℃冰箱备用。

【用法】

将各种采集的标本，在2h 内取0.5ml 种人培养基底层，立即置35～37℃厌氧恒温箱内进行培养，2～7d 观察结果。若发现培养基有混浊、沉淀、粘性菌膜生长现象及培养物出现臭味、肉渣消化、变色、产气等情况时，判断结果，并进行涂片染色镜检和分离培养。一般在培养48h 以后开始观察，直至3 周；无细菌生长，即可报告阴性。

【质量控制】

破伤风杆菌或坏死梭杆菌48h 的培养物稀释1000 倍，接种0.01ml，生长良好。

【保存】

置4 ℃冰箱内，数月有效。

【注意事项】

培养基的管口要密封，使用时将培养基置于水浴中煮沸10 min，以除去管内残存的氧。为提高培养效果，在底层可放少许铁粉作为还原剂。

第八章　病原微生物学检验

第一节　球菌

一、葡萄球菌属

葡萄球菌属是一类触酶试验阳性的革兰阳性球菌，归属微球菌科，包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌等32 种。

葡萄球菌属在自然界分布广泛。金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌是临床最常见的感染菌，近年溶血葡萄球菌有增多趋势。致病性葡萄球菌常引起疖、痈及切口、创伤等部位的局部化脓性感染。血液播散后可引起深部组织的化脓性感染，如骨髓炎、化脓性关节炎、肺炎、深部脓肿、败血症、脓毒血症、心内膜炎、脑膜炎等全身感染。产生的肠毒素可引起食物中毒，表现为急性胃肠炎。表皮葡萄球菌是皮肤上的正常栖居菌，是导致血培养污染的最常见细菌之一，经反复血培养阳性者应考虑其感染。近年来由于治疗中各种导管、人造组织和免疫抑制剂的广泛应用，凝固酶阴性葡萄球菌已成为医院感染的重要病原菌。从临床感染部位标本中分离的葡萄球菌株往往多重耐药，尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）和表皮葡萄球菌（MRSE），这已成为抗感染治疗的棘手问题。实验室应重视对β－内酰胺类抗生素和对万古霉素耐药的葡萄球菌的监测。

1．生物学特性

革兰阳性球菌，直径0.5～1.5μm，成单、双、四联、短链或不规则葡萄状排列。无鞭毛，无芽胞，无荚膜。对营养要求不高，在普通营养琼脂上或含10％氯化钠培养基上生长良好，最适生长温度35～37℃，pH 为7.4～7.6。金黄色葡萄球菌产生各种侵袭性酶，如血浆凝固酶、耐热核酸酶、透明质酸酶、溶纤维蛋白酶等；另外还产生外毒素，如溶血毒素、杀白细胞毒素等；在血琼脂平板上培养18～24h 菌落为金黄色，周围有明显的透明（β）溶血环，部分菌落可呈灰白色或柠檬色；在高盐甘露醇平板上呈淡橙黄色菌落。表皮葡萄球菌等在血琼脂平板上菌落呈白色或柠檬色，不溶血。代谢方式为呼吸兼发酵，利用多种糖类产酸不产气，触酶试验阳性，氧化酶试验阴性。

金黄色葡萄球菌细胞壁中含有大量A 蛋白（staPhylococcal protein A，SPA）。SPA 具有抗吞噬细胞吞噬的作用，可与人免疫球蛋白IgG 的Fc 段非特异性结合，不影响Fab 段的免疫活性。

2．鉴定

（1）与其他菌属鉴别：见表6 －8 －1。

表6 －8 －1　微球菌科内各属的主要生物学特性鉴别

菌属	触酶	四联状排列	动力	荚膜	葡萄糖发酵	杆菌肽耐药（0.04U／片）	呋喃唑酮耐药（100μg／片）
微球菌属	＋	＋	－*	－	－**	－	＋
葡萄球菌属	＋	－	－	－	＋	＋	－
口腔球菌属	v	－	－	＋	＋	－	v
游动球菌属	＋	－	＋	－	－	／	－

注：横栏均为各试验名称，“试验”两字省略，下同；＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定；／表示未统计结果；*表示动力性微球菌有动力；**表示克里斯汀微球菌能厌氧分解葡萄糖

（2）属内种间鉴别：凝固酶阳性葡萄球菌的生物学特性鉴别见表6 －8 －2，常见的凝固酶阴性葡萄球菌的生物学特性鉴别见表6 －8 －3。

表6 －8 －2　凝固酶阳性葡萄球菌主要生物学特性鉴别

菌种	DNA 酶	结合型血凝固酶	游离型血浆凝固酶	PYR 水解*	VP	鸟氨酸脱羧酶
金黄色葡萄球菌	＋	＋	＋	－	＋	－
中间型葡萄球菌	＋	－	＋	＋	－	－
施莱福葡萄球菌	＋	＋	－	＋	＋	－
里昂葡萄球菌	－	＋	－	＋	＋	＋

注：★L －吡咯烷酮－萘酰胺（PYR）水解；＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性

表6 －8 －3　常见的凝固酶阴性葡萄球菌生物学特性鉴别

菌种	新生霉素耐药（5μg／片）	PYR 水解	蕈糖	蔗糖	多粘菌素B 耐药（300U／片）	木糖	核糖
表皮葡萄球菌	－	－	－	＋	＋	－	－
腐生葡萄球菌	＋	－	＋	＋	－	－	－
溶血葡萄球菌	－	＋	＋	＋	－	－	－
模仿葡萄球菌	－	＋	d	＋	－	－	v
木糖葡萄球菌	＋	v	＋	＋	－	＋	v
孔氏葡萄球菌	＋	－	＋	－	－	－	－
华纳葡萄球菌	－	－	＋	＋	－	－	＋／－
人型葡萄球菌	－	－	＋	＋	－	－	－
头状葡萄球菌	－	－	－	＋	－	－	－

续表

菌种	新生霉素耐药（5μg／片）	PYR 水解	蕈糖	蔗糖	多粘菌素B 耐药（300U／片）	木糖	核糖
解糖葡萄球菌	－	－	－	－	－	－	－
耳葡萄球菌	－	v	＋	v	－	－	－
松鼠葡萄球菌	＋	－	＋	＋	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；d 表示迟缓反应；v 表示不定；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性

3）葡萄球菌属微生物学检验鉴定流程：见图6－8－1。

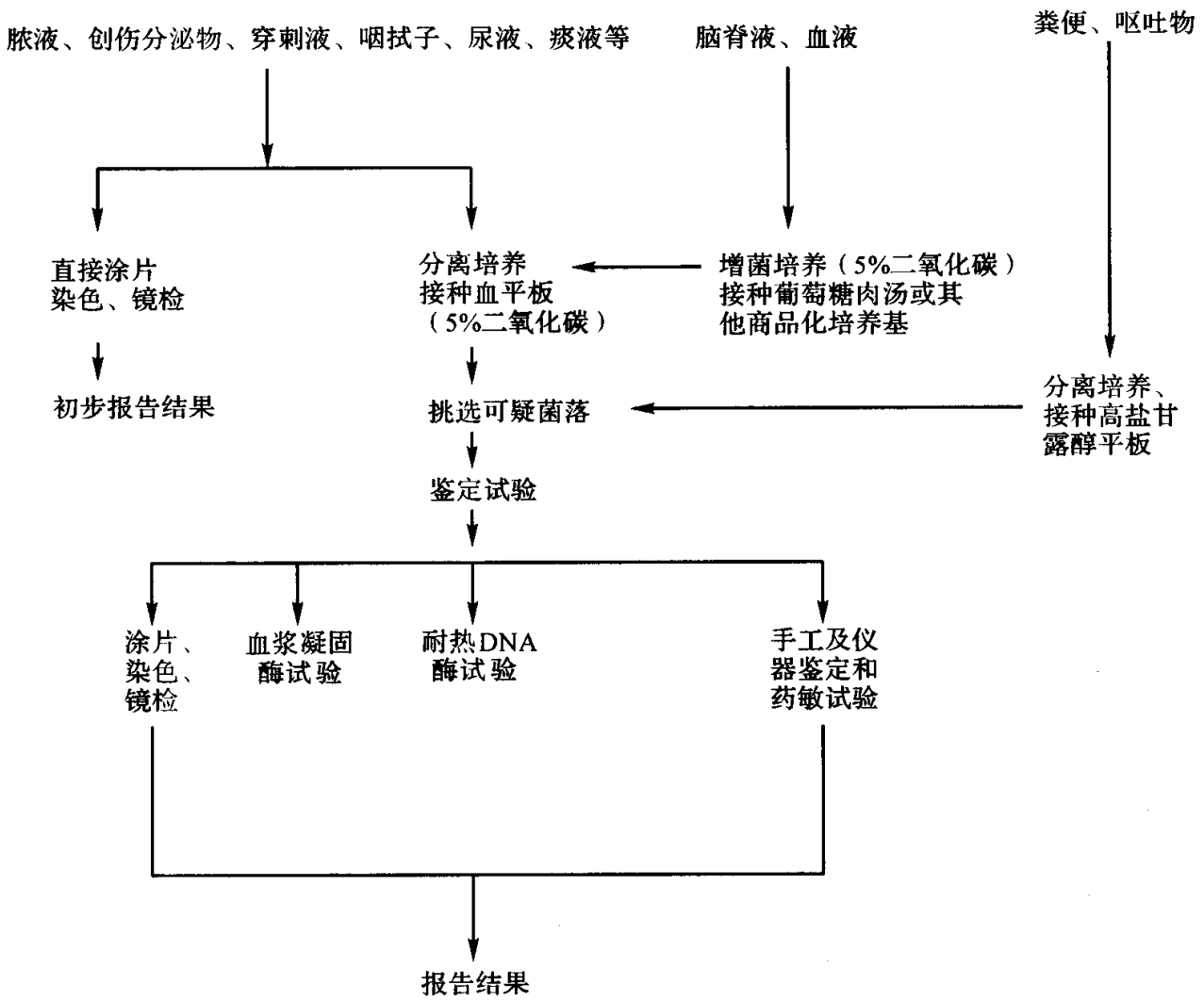


图6－8－1　葡萄球菌属微生物学检验鉴定流程

二、微球菌属

微球菌属是革兰阳性球菌，归属微球菌科，包括金黄色微球菌、玫瑰微球菌和变异微球菌等9 种。

微球菌属细菌广泛分布于自然界，也是人上呼吸道的正常菌群。一般不致病，但可

为条件致病菌。金黄色微球菌可导致伤口等局部组织感染，也可引起心内膜炎等严重感染性疾病。

1．生物学特性

革兰阳性球菌，直径0.5～2.0μm，大小不均，单独、成双、四联或不规则排列，通常无动力，无芽胞，需氧，触酶试验阳性，氧化酶试验大多数阳性，分解葡萄糖产酸不产气，对碳水化合物的分解因种的不同而异，多数菌种可产生类胡萝卜素色素，所有菌株均可在氯化钠浓度高于50g/L的胨水中生长。

2．鉴定

1）微球菌属与相关菌属的鉴别微球菌属与相关菌属的主要生物学特性鉴别见表6-8-1；微球菌属与葡萄球菌属的主要鉴别见表6-8-4。

表6-8-4　微球菌属与葡萄球菌属的主要生物学特性鉴别

菌属	葡萄糖发酵	厌氧生长(硫乙醇酸盐培养基)	甘油产酸	溶葡萄球菌素(100μg/片)	溶菌酶(5μg/片)	氧化酶(细胞色素C)	呋喃唑酮(100μg/片)	杆菌肽(0.04U/片)	O/129(0.5mg/片)
葡萄球菌属	+	+	+	S	R	−	S(抑菌圈直径>15mm)	R	R(抑菌圈直径6～10mm)
微球菌属	−	−	−	R	S	+/−	R(抑菌圈直径6～10mm)	S	S(抑菌圈直径20～36mm)

注：+表示90%以上的菌株阳性；−表示90%以上的菌株阴性；+/−表示多数菌株(90%以下)阳性，少数菌株阴性；R表示耐药；S表示敏感

2）微球菌属种间的鉴别：见表6-8-5。

表6-8-5　微球菌属各菌种主要生物学特性鉴别

菌种	菌落颜色	葡萄糖产酸	甘油产酸	七叶苷水解	精氨酸水解	硝酸盐还原	37℃生长	6.5%NaCl营养琼脂生长	无机氮琼脂生长	枸橼酸盐	动力	明胶液化	氧化酶	溶菌酶	V-P	尿素酶
金黄色微球菌	黄色	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	S	−	v
莱拉微球菌	乳白色	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+	+	v	−	−
变异微球菌	黄色	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	R	W	+
玫瑰微球菌	淡红/橙红	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	v	W	−
运动性微救菌	红色	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−	R	−	−
克里斯汀微球菌	淡橙色	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	+	R	+	v
奈雪奴美微球菌	橙色/乳白色	d	−	−	−	d	+	−	−	−	−	+	+	v	−	+
定居微球菌	奶油黄	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	v	−	−
需盐微球菌	无	+	+	/	−	−	+	+	/	−	−	−	+	R	+	−

注：+表示90%以上的菌株阳性；−表示90%以上的菌株阴性；d表示迟缓反应；v表示不定；/表示未统计结果；R表示耐药；S表示敏感；W表示弱阳性

三、链球菌属

链球菌属是一群触酶试验阴性、呈链状排列的革兰阳性球菌。Bergtey’s 分类法将该菌属分为6 个生物群，29 个种，如化脓性链球菌、无乳链球菌和肺炎链球菌等。Lancefield 根据链球菌细胞壁多糖抗原不同，将该菌属分为18 个血清群，即A、B、C、D、E、F 等。传统上根据溶血现象将其分为α－溶血或草绿色溶血链球菌、β－溶血或乙型溶血链球菌、γ－溶血或不溶血链球菌。

链球菌广泛分布于自然界和动物体内，常居于人体的鼻咽腔和肠道中。化脓性链球菌、无乳链球菌和肺炎链球菌是3 种重要致病菌。化脓性链球菌可导致化脓性扁桃腺炎、急性咽炎、丹毒、脓疱疮、猩红热、医源性伤口感染或产后感染等。同时可并发风湿热、风湿性心脏病、急性肾小球肾炎等严重变态反应性疾病。无乳链球菌是导致泌尿道感染、新生儿败血症和脑膜炎的主要病原菌。肺炎链球菌是急性肺炎、化脓性脑膜炎、胸膜炎、腹膜炎、中耳炎及上呼吸道感染的重要病原菌。其他链球菌可因损伤而侵入血液导致创面感染、泌尿生殖道感染及亚急性细菌性心内膜炎等。

1．生物学特性

革兰阳性球菌，直径0.5～1.0μm，呈单个、成双或链状排列，链的长短不一。无鞭毛，无芽胞。肺炎链球菌呈矛头状，宽端居中，尖端向外，有荚膜。本属菌大多为需氧或兼性厌氧菌，营养要求较高，需在含有血液或血清、葡萄糖、氨基酸、维生素等物质的培养基中才能生长。最适生长温度35～37℃，pH 为7.4～7.6。在液体培养基中易形成长链，在血琼脂平板上，经37℃18～24h 孵育后，可形成灰白色、圆形、凸起、直径为0.50～0.75mm 的小菌落。链球菌溶血性，可因菌株不同而异。触酶试验阴性，发酵型代谢，分解葡萄糖产酸不产气。除肺炎链球菌外，链球菌不分解菊糖。

链球菌的抗原构造较复杂，主要有多糖抗原，位于细胞壁上，Lancefield 根据链球菌的多糖抗原将其分为A、B、C、D 等18 个群。对人类致病的主要为A、B、C、D、F、G 等群。另一类为蛋白抗原，如位于菌体表面菌毛上的M 蛋白，以及F 蛋白和G 蛋白等。

2．鉴定

1）化脓性链球菌的鉴定特点：β－溶血、菌落呈针尖状，杆菌肽（0.04U／片）敏感可初步确定为化脓性链球菌，至目前为止，绝大多数菌株对青霉素仍敏感。

2）无乳链球菌的鉴定特点：CAMP 试验阳性，马尿酸盐试验阳性，淀粉酶试验阳性。

3）肺炎链球菌的鉴定特点：显微镜下呈矛头状成双排列，菌落草绿色α－溶血，由于肺炎链球菌的自溶作用，菌落呈脐窝状。菊糖试验阳性，Optochin 试验敏感，胆汁

溶菌试验阳性。了解肺炎链球菌对青霉素的敏感性，可通过苯唑青霉素（1μg／片）做药敏试验，若抑菌圈直径≤19mm 时，应补测青霉素的MIC。临床脑脊液及血液标本中检出肺炎链球菌时，苯唑青霉素药敏试验和测青霉素MIC 应同时进行。β－溶血性链球菌的主要生物学特性鉴别见表6－8－6，α－溶血性链球菌的主要生物学特性鉴别见表6－8－7。

表6－8－6　β－溶血性链球菌的主要生物学特性鉴别

Lantefield 分群	菌落	菌种	PYR*	VP	CAMP	海藻糖	山梨醇
A	大**	化脓性链球菌	＋	－	－		
A	小	米勒链球菌组	－	＋	－		
B		无乳链球菌	－	－	＋		
C	小	米勒链球菌	－	＋	－		
C	大	马链球菌	－	－	－	－	－
C	大	类马链球菌	－	－	－	＋	－
C	大	兽疫链球菌	－	－	－	－	＋
F	小	米勒链球菌组	－	＋	－		
G	大	似马链球菌	－	－	－		
G	小	米勒链球组	－	＋	－		

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性；*L－吡咯烷酮－萘酰胺（PYR）水解；**指孵育24h 后菌落直径大于0.5mm

表6－8－7　α－溶血性链球声的主要生物学特性鉴别

菌种	VP	精氨酸水解酶	尿素酶	七叶苷水解酶	甘露醇	山梨醇	菊糖	葡萄糖
变异链球菌	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋
轻型链球菌	－	－	－	－	－	－	－	－
牛链球菌ⅰ	＋	－	－	＋	＋	－	＋	＋
牛链球菌Ⅱ	＋	－	－	＋	－	－	－	－
口腔链球菌	－	－	－	－／＋	－	－	－	＋
表兄链球菌	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋
米勒链球菌组	＋	＋	－	－／＋	－	－	－	－
咽峡炎链球菌	＋	＋	－	＋	－	－	－	－
S.constellatus	＋	＋	－	－	－	－	－	－
中间型链球菌	＋	＋	－	－／＋	－	－	－	－
血链球菌组	－	＋	－	＋／－	－	－	＋	＋
副血链球菌	－	＋	－	－／＋	－	－	－	＋
格氏链球菌	－	＋	－	＋	－	－	＋	＋
唾液链球菌组	＋／－	－	＋／－	＋	－	－	＋／－	
前庭链球菌	＋／－	－	＋	＋／－	－	－	－	

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性

4）链球菌属的微生物学检验流程：见图6－8－2。

四、肠球菌属

肠球菌属是指一组主要存在于人类或动物肠道、具有共同生化特征的革兰阳性细菌，归属链球菌科。肠球菌引起的感染以尿路感染最常见，大部分为医院内感染，常与留置导尿管等有关。肠球菌也是导致老年患者和严重基础疾病患者败血症的常见病原菌。肠球菌败血症通常起源于泌尿生殖道、腹腔、胆管和血管内导管感染等原发病灶。此外，肠球菌还可导致心内膜炎、脑膜炎及伤口感染等

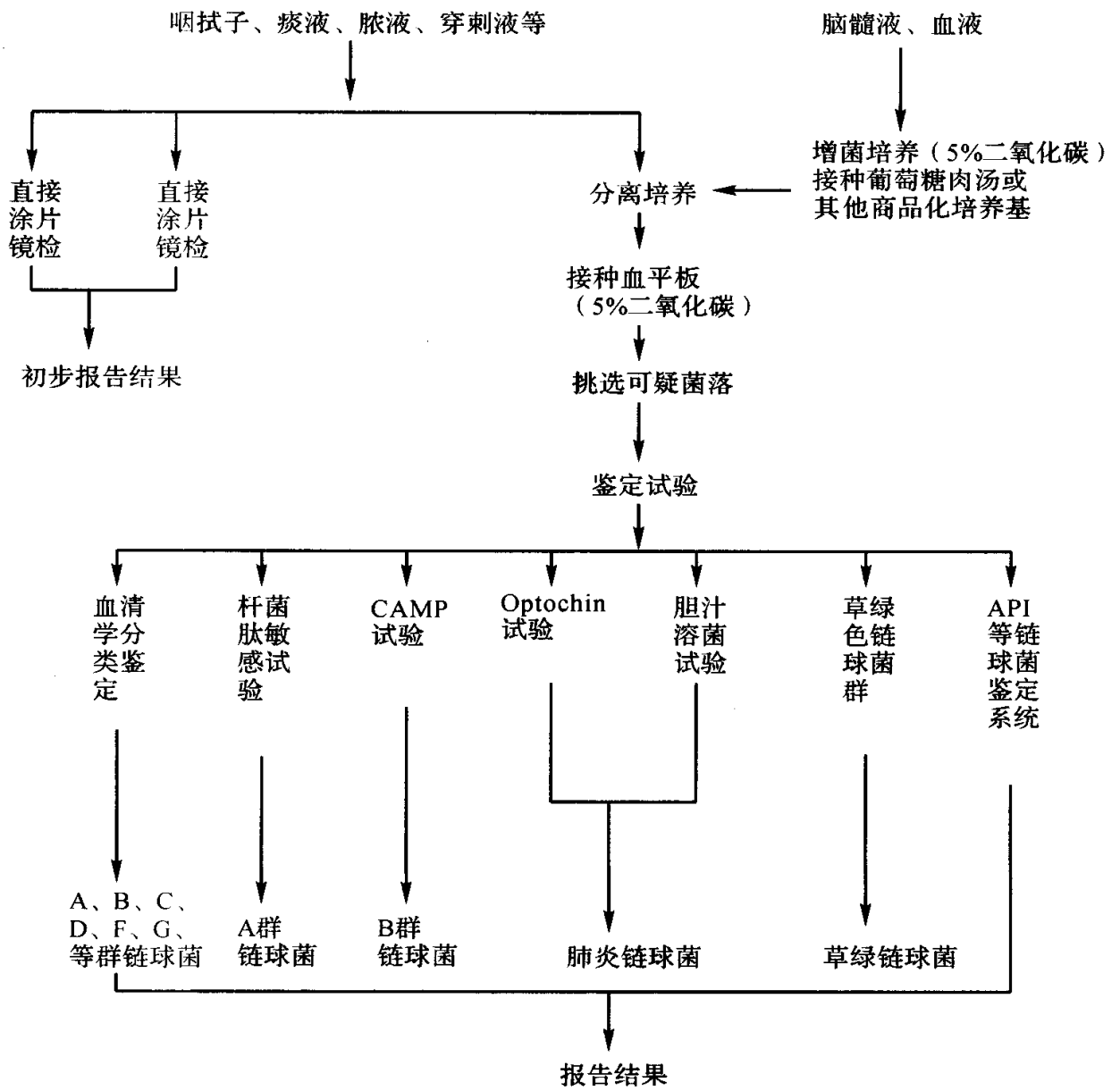


图6 -8 -2　链球菌属的微生物学检验鉴定流程

肠球菌对大多数常用抗菌药物呈固有耐药，如SMZ、头孢菌素类、氯林可霉素、苯唑青霉素等。治疗肠球菌所致的重症感染（如败血症和心内膜炎等），临床上常青霉素

或氨苄青霉素和一种氨基糖苷类抗生素（如庆大霉素）联合用药。近几年其耐药菌株有增加趋势，肠球菌所致重症感染的治疗已成为临床棘手的问题。因此，除常规K－B法药敏试验外，应考虑加作MIC测定和协同药敏试验。

1．生物学特性

革兰阳性球菌，直径0.5～1.0μm，镜下呈单个、成双或短链状排列的卵圆形。无芽胞，无荚膜，部分肠球菌（如鸡肠球菌等）有鞭毛。

肠球菌对营养要求较高，在含有血清的培养基上生长良好。在血平板上形成灰白色不透明的圆形菌落，主要表现为γ－或α－溶血。触酶试验阴性。与链球菌区别在于肠球菌能在65g/L氯化钠中生长，胆汁七叶苷试验阳性，水解PYR，在强碱性（pH9.6）条件下仍能生长。近几年来，发现屎肠球菌呈多重耐药，有时往往只对万古霉素敏感。

2．鉴定

1）肠球菌属与其他兼性厌氧、触酶试验阴性革兰阳性球菌的鉴别：见表6－8－8。

2）肠球菌属菌种的主要生物学特性鉴别：见表6－8－9。

表6－8－8　肠球菌属与其他兼性厌氧、触酶试验阴性革兰阳性球菌的主要生物学特性鉴别

菌属	菌细胞排列形态	溶血特征	65g/L氯化钠	胆汁七叶苷	PYR	万古霉素药敏	生长	
							10℃	45℃
肠球菌属	成双，链状	α，β，γ	＋	＋	＋	S	＋	＋
链球菌属	成双，链状	α，β，γ	－	－	－***	S	－	v
乳球菌属	成双，链状	α，γ	v	＋	＋	S	＋	－
气球菌属	四联，链状	α	＋	v	＋	S	＋	－
小球菌属**	四联，链状	α	v	＋	－	R	－	＋
溃疡球菌属	四联，链状	γ	＋	＋	＋	S	－	－
四联球菌属	四联，链状	α	＋	＋	－	S	－	＋
运动球菌属*	链状	α，γ	＋	＋	＋	S	＋	－
Leuconostoc **	链状	α，γ	v	v	－	R	＋	v
Gemella	四联，链状	α，γ	－	－	＋	S	－	－
Globicatella	链状	α	＋	－	＋	S	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v表示不定；R表示耐受；S表示敏感；*表示动力试验阳性；**由于对万古霉素耐药，故易被误鉴定为对万古霉素耐药的肠球菌；***A群链球菌PYR试验阳性

表6－8－9　肠球菌属菌种的主要生物学特性鉴别

菌种		甘露醇	山梨醇	山梨糖	精氨酸	阿拉伯糖	棉子糖	蔗糖	核糖	动力	色素	丙酮酸盐
组1	鸟肠球菌	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	＋	－	－	＋
	假鸟肠球菌	＋	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	－	－	＋
	棉子糖肠球菌	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	－	－	＋
	恶臭肠球菌	＋	＋	＋	－	－	－	＋	＋	－	－	＋
组2	粪肠球菌	＋	＋	－	＋	－	－	＋	＋	－	－	－
	屎肠球菌	＋	－	－	＋	＋	－	＋	＋	－	－	－
	卡氏黄色肠球菌	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
	盂德肠球菌	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	－
	酪黄肠球菌	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	－
	母鸡肠球菌	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－
组3	坚韧肠球菌	－	－	－	＋	－	－	－	／	－	－	－
	海瑞肠球菌	－	－	－	－	－	＋	＋	／	－	－	－
	不称肠球菌	－	－	－	＋	－	＋	＋	／	－	－	＋
	粪肠球菌（变异株）	－	－	－	＋	－	－	－	／	－	－	＋
组4	硫黄色肠球菌	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；／表示未统计

3）万古霉素耐药肠球菌（VRE）检测：VRE有3种表型：①VanA型，高水平耐万古霉素（MIC ≥64 μg／ml，壁霉素MIC ≥16 μg／ml）；②VanB型，呈不同水平耐万古霉素（MIC 16～512 μg／ml，不耐壁霉素）；③VanC型，天然低水平耐万古霉素（MIC 2～32 μg／ml），对壁霉素敏感。

NCCLS对万古霉素耐药判定标准：≤4 μg／ml为敏感，8～16 μg／ml为中介，≥32 μg／ml为耐药。用纸片琼脂扩散法、Vitek、MicroScan有可能测不出低水平VRE（VanB和VanC型）。用猪心浸液基础培养基加6 μg／ml万古霉素平板，点种培养物10^5～10^6cfu／点35 ℃培养24h，菌落数多于1个或有一层薄膜生长均为耐药。质控株粪肠球菌ATCC 29212为敏感。

4）肠球菌属的微生物学检验鉴定流程：见图6－8－3。

五、气球菌属

气球菌属仅绿色气球菌1种。气球菌是海洋中的微生物，常为腐生菌，是导致龙虾致死的主要病原菌。可引起人心内膜炎和外伤性感染。

1．生物学特性

革兰阳性球菌，直径1.0～2.0 μm，成对或四联状排列。无动力，微需氧，厌氧条件下不生长，血琼脂平板上呈α－溶血，大多数菌株可在10 ℃条件下生长，45 ℃不生长。分解葡萄糖、果糖、半乳糖、甘露醇、麦芽糖、蔗糖、蕈糖、乳糖等多种糖类，产酸不产气。触酶试验弱阳性，易误为阴性。

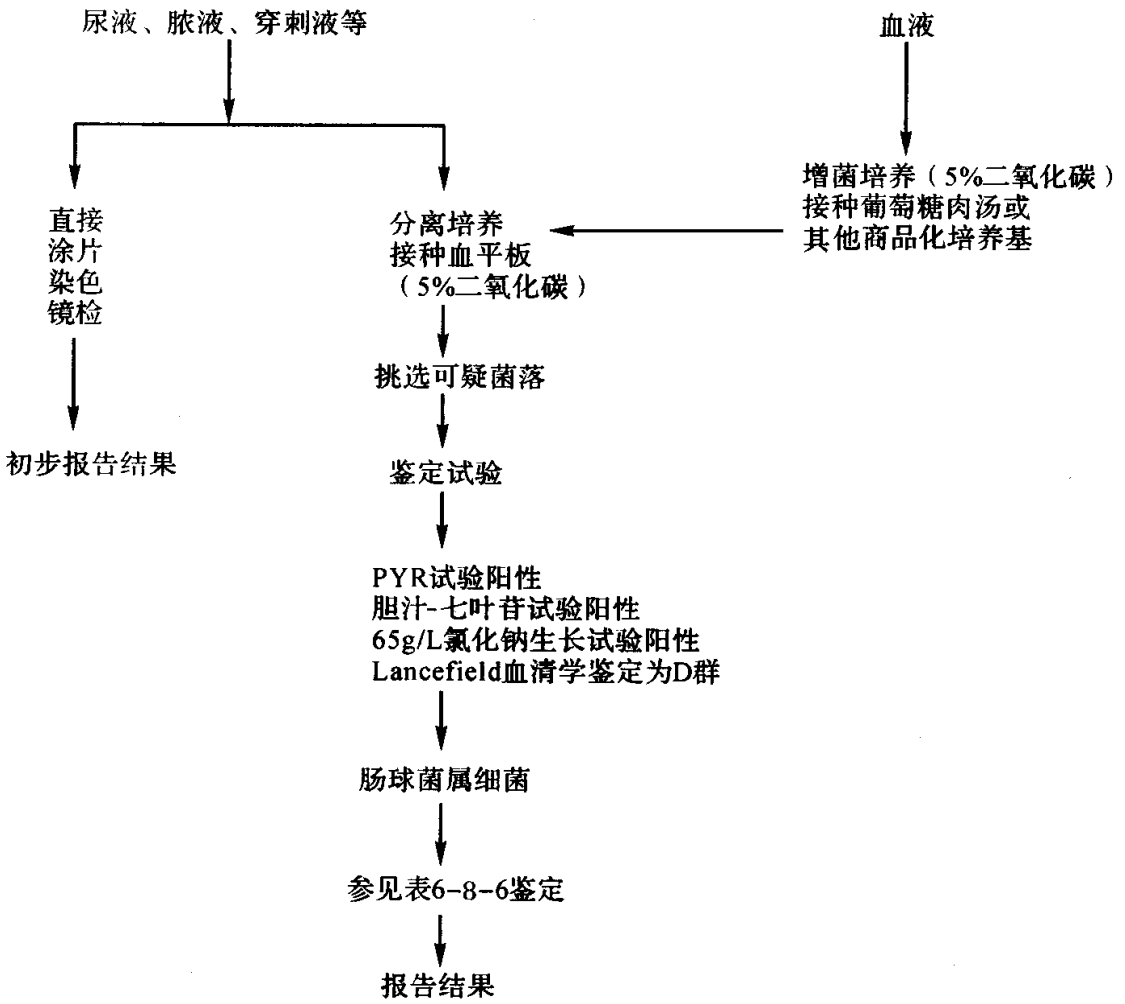


图6－8－3　肠球菌属微生物学检验鉴定流程

2．鉴定

绿色气球菌硝酸盐还原试验、明胶液化试验、精氨酸水解试验阳性，VP 试验阴性，这是与链球菌属和肠球菌属的鉴别要点。触酶试验阴性革兰阳性球菌的主要生物学特性鉴别见表6－8－8。

绿色气球菌在血琼脂平板上呈α－溶血，与草绿色链球菌极相似，显微镜下菌体形态往往成对或四联状，易被误认为是葡萄球菌。

六、奈瑟菌属和卡他莫拉菌

奈瑟菌属为革兰阴性双球菌，包括11 个种，仅脑膜炎奈瑟菌与淋病奈瑟菌对人类有致病性，其余为人体上呼吸道正常菌群，只有在血液、脑脊液及无菌部位培养出本菌才有诊断意义。

脑膜炎奈瑟菌是流行性脑脊髓膜炎的病原菌，可在人鼻咽部粘膜定植，流行期间正常人携带率可达5％～15％，可经飞沫、空气传播，冬末春初为流行高峰。感染人群多为幼儿和青少年。感染后多数患者呈携带状态或隐性感染，少数出现上呼吸道感染症状，仅极少数会发展成败血症，进而累及脑、脊髓膜，形成化脓性脑脊髓膜炎。临床表现为高热、头痛、皮肤瘀点、呕吐和颈项强直等脑膜刺激症状，脑脊液呈化脓性改变。继而出现休克或DIC 或痉挛、惊厥、昏迷等，不及时治疗病死率较高。青霉素、第三代头孢菌素对脑膜炎奈瑟菌有较强的抗菌活性。流行期间可服用磺胺类或利福平（耐磺胺类菌株）预防。

淋病奈瑟菌是淋病的病原菌，主要通过性接触传播，侵袭泌尿生殖道、口咽部和肛门直肠的粘膜柱状上皮细胞。临床表现为尿频、尿急、尿痛、尿道口有脓性分泌物，不及时治疗可继发附睾炎、前列腺炎和尿道狭窄。女性的感染部位是子宫颈内膜，表现为子宫颈红肿、阴道分泌物增多和排尿困难，可并发盆腔炎等。另外，口咽部淋病表现为慢性咽炎，肛门直肠淋病表现为局部灼痛和脓血便。淋菌性结膜炎多见于新生儿，因分娩时通过患淋病产妇的产道而感染。较为严重的为播散性淋病，表现为多关节肿痛、化脓性关节炎或脑膜炎，这些患者的血液、浆膜腔液和脑脊液中可分离出淋病奈瑟菌。淋病奈瑟菌的治疗常用青霉素、壮观霉素、第三代头孢菌素和氟喹诺酮类药物，根据药敏试验结果选择用药有利于提高治愈率。

卡他莫拉菌归属莫拉菌属布兰汉亚属，是人类和脊椎动物上呼吸道的正常寄居菌之一。当机体免疫功能低下时或其他因素可导致卡他莫拉菌引起的中耳炎、鼻窦炎和下呼吸道感染。目前卡他莫拉菌对青霉素类、头孢菌素类、酶抑制剂等仍高度敏感。

1．生物学特性

脑膜炎奈瑟菌为革兰阴性双球菌，肾形或咖啡豆状，常成对排列，凹面相对。无芽胞，无鞭毛，有多糖可形成荚膜。能产生自溶酶，陈旧培养物涂片形态及大小多变。初次分离时需在5％～10％二氧化碳环境中生长，血琼脂平板培养过夜可形成直径约1～2㎜、光滑、灰褐色、半透明的菌落；在巧克力琼脂平板上，形成圆形、凸起、湿润、有光泽、灰蓝色的似露滴状菌落。氧化酶及触酶试验阳性，分解葡萄糖和麦芽糖，产酸不产气。不分解其他糖类和蛋白质。根据荚膜多糖抗原的不同，可分为9 个血清群，我国流行的菌株以A 群为主。

淋病奈瑟菌的形态与脑膜炎奈瑟菌相似，直径0.6～1.0μm，成对、肾形排列，无芽胞，无鞭毛。营养要求比脑膜炎奈瑟菌更高，只能在巧克力平板和专用选择性培养基中生长，初分离时需5%～10%二氧化碳和温湿环境。比脑膜炎奈瑟菌生长更慢，也可发生自溶现象，培养3d 方可报告。氧化酶及触酶试验阳性，只分解葡萄糖而不分解其他糖类。

卡他莫拉菌为革兰阴性双球菌，呈咖啡豆形，无芽胞，无鞭毛，无荚膜。在血琼脂平板上孵育18～24h 可形成灰白色、光滑、圆凸、不透明、不溶血的菌落，菌落表面干燥，坚韧，若用接种环推移，整个菌落可移动。氧化酶、触酶及DNA 酶试验均阳性，还原硝酸盐，不分解任何糖类。

2．鉴定

(1) 奈瑟菌属与相关菌属的鉴别：见表6－8－10。

表6－8－10　奈瑟菌属与相关菌属的主要生物学特性鉴别

菌属	形态	氧化酶	触酶	三丁酸甘油脂酶	DNA 酶	麦康凯生长
奈瑟菌属	球形	＋	＋	－	－	－
莫拉茵属	球杆状	＋	＋	－	－	－
布兰汉菌属	球形	＋	＋	＋	＋	－
不动杆菌属	球杆状	－	＋	－	－	＋
金杆菌属	杆状	＋	－	－	－	－

注：＋表示90%以上的菌株阳性；－表示90%以上的菌株阴性

脑膜炎奈瑟菌检验的临床标本，如脑脊液、血液、瘀点穿刺渗出物、浆膜腔液、鼻咽拭子应立即送检，接种血平板35℃培养。标本直接涂片革兰染色检查，尤其在白细胞内找到革兰阴性双球菌，有利于临床对疾病的早期确诊。脑膜炎奈瑟菌A 群和C 群的菌株有荚膜多糖，可形成粘液状菌落。

淋病奈瑟菌对外界环境的抵抗力较低，易自溶。送检淋病奈瑟菌的临床标本应立即接种巧克力平板或其他选择性培养基，置35℃、5%～10%二氧化碳环境中孵育。男性尿道分泌物或脓性标本直接涂片革兰染色镜检是诊断男性淋病简单、快速、准确的方法。涂片发现有较多的革兰阴性双球菌，尤其在白细胞内者有助于临床对本病的早期诊断。女性阴道分泌物应以培养为主，WHO 不推荐直接涂片报告。

(2) 卡他莫拉菌和奈瑟菌属内菌种的鉴别：见表6－8－11。

表6－8－11　卡他莫拉菌和奈瑟菌属内菌种的主要生物学特性鉴别

菌种	营养琼脂生长（35℃）	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	果糖	硝酸盐还原	多糖合成	DNA 酶
脑膜炎奈瑟菌	v	＋	＋	－	－	－	－	－	－
淋病奈瑟菌	－	＋	－	－	－	－	－	－	－
卡他莫拉菌	＋	－	－	－	－	－	＋	－	＋
解乳糖奈瑟菌	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
干燥奈瑟菌	＋	＋	＋	－	＋	＋	－	＋	－
淡黄奈瑟菌	＋	＋	＋	－	v	v	－	v	－
金黄奈瑟菌	＋	－	－	－	－	－	－	＋	－
粘液奈瑟菌	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	－
灰色奈瑟菌	＋	－	－	－	－	－	－	－	－
去硝奈瑟菌	＋	＋	－	－	＋	＋	－	＋	－
细长奈瑟菌＊	＋	－	－	－	－	－	－	－	－
犬奈瑟菌	＋	－	－	－	－	－	＋	－	－
多糖奈瑟菌	＋	＋	＋	－	－	－	－	＋	－

注：＋ 表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定；＊细长奈瑟菌外形呈短杆状

第二节　需氧革兰阳性杆菌

一、棒状杆菌属

棒状杆菌属是一群菌体一端或两端膨大呈棒状的革兰阳性杆菌，属内包括16 个种，其中白喉棒状杆菌、假白喉棒状杆菌、假结核棒状杆菌、溃疡棒状杆菌、杰克棒状杆菌、纹带棒状杆菌和解脲棒状杆菌等与人类疾病有关。在临床上以白喉棒状杆菌最为重要。

白喉棒状杆菌的主要致病因素为外毒素。通常从呼吸道入侵，最初侵犯扁桃腺、口咽部，并扩延至鼻咽部和咽喉部，甚至气管。细菌产生的外毒素引起局部细胞坏死，同时伴有白细胞及纤维素渗出，形成灰白色假膜。外毒素从细菌繁殖部位进入血流，损害心肌及神经系统，导致心肌炎等。本菌偶尔侵袭眼结膜、阴道、外耳道和皮肤创口等，亦能形成假膜。其他棒状杆菌，有一些是条件致病菌。

1．生物学特性

革兰阳性，菌体细长、一端或两端粗大呈棒状，排列不规则，常呈栅栏状。染色不均匀，用美蓝、甲苯胺蓝或奈瑟染色，菌体一端、两端或中央可见明显深染颗粒（异染颗粒）。抗酸染色阴性。无鞭毛，无芽胞，无荚膜。

白喉棒状杆菌营养要求较高，在普通培养基上生长不良，需一种或多种维生素、氨基酸、嘌呤及嘧啶，在培养基中加入血液或血清有助其生长，最适生长温度35 ℃。白喉棒状杆菌在吕氏血清培养基上孵育48h 后，菌落细小灰白色；在亚碲酸钾血琼脂平板上菌落呈黑色；在液体培养基中，表面形成菌膜，同时有颗粒沉淀。需氧或兼性厌氧，触酶和硝酸盐还原试验阳性，不水解尿素，分解葡萄糖和麦芽糖、产酸不产气，蔗糖和蕈糖试验阴性。

2．鉴定

属内各菌种的主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —12 。

表6 —8 —12　棒状杆菌属菌种及相关细菌的主要生物学特性鉴别

菌种	触酶	动力	脲酶	β—溶血	硝酸盐还原	明胶水解	七叶苷水解	产酸				
								葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	苷露醇	木糖
白喉棒状杆菌	+	−	−	+/−	+	−	−	+	+	−	−	−
溃疡棒状杆菌	+	−	+	+	−	+ (25 ℃)	−	+	+	−	−	−
假结核棒状杆菌	+	−	+	+	+/−	−	−	+	+	−	−	−
干燥棒状杆菌	+	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	−
纹带棒状杆菌	+	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	−
库什棒状杆菌	+	−	+	+/−	+	−	+	+	+	+	−	−
肾型棒状杆菌群	+	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+/−
假白喉棒状杆菌	+	−	+	−	+	−	−	− −	−	−	−	
JK 群包括杰克棒状杆菌	+	−	−	−	−	−	−	+	+/−	−	−	−
微小棒状杆菌	+	−	−	−	−	−	−	+	+	v	−	−
霉菌样棒状杆菌	+	−	−	−	−	−	−	w	−	−	−	−
水生棒状杆菌	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
生殖道棒状杆菌	+	−	−	−	−	−	−	+	w	−	−	−
假生殖道棒状杆菌	+	−	−	−	−	−	−	+	w	−	−	−
牛棒状杆菌	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
麦氏棒状杆菌	+	−	−	−	+/−	−	−	+	+/−	+/−	+/−	−
红球菌属菌种	+	−	+/−	−	+/−	−	+/−	+	+/−	+	−	+/−
马红球菌	+	−	+/−	−	+/−	−	−	+/−	+/−	−	−	−
溶血分泌杆菌	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+/−	−	−
化脓放线菌	−	−	−	+	−	+	−	+	+	+/−	+/−	+
骚动厄斯考维菌	+	+	+/−	−	+/−	+	+	+	+	+	−	+
溶黄质厄斯考维菌	+	+	+/−	−	+	+	+	+	+	+	−	+

注：+ 表示90 %以上的菌株阳性；− 表示90 %以上的菌株阴性；+/− 表示多数菌株（90 %以下）阳性，少数菌株阴性；w 表示弱阳性；v 表示不定

二、芽胞杆菌属

芽胞杆菌属是一群需氧或兼性厌氧具有芽胞的革兰阳性大杆菌，包括48 个种，其中炭疽芽胞杆菌最为重要，所导致的炭疽为人畜共患疾病。炭疽芽胞杆菌其芽胞在土壤或植物中能存活数十年。主要传播途径为摄入污染食物或皮肤外伤直接接触病畜。人类炭疽根据感染的途径不同，分为体表、肠道及吸人型感染，分别可引起皮肤炭疽，肠炭疽，肺、纵隔炭疽，均可并发败血症和脑膜炎。蜡样芽胞杆菌也能引起人类严重疾病，如败血症、心内膜炎、创伤感染和肺感染。

1．生物学特性

革兰阳性杆菌，常成对或链状排列，末端圆或平，多数菌种具周身鞭毛，不形成荚膜。每一繁殖体至多产生一个芽胞。芽胞呈圆柱形、卵圆形，某些菌株芽胞可呈肾形或香蕉形，位于菌体中间、次端或顶端，有些菌体膨大。

需氧或兼性厌氧，大多数菌种能发酵葡萄糖，产酸不产气，通常触酶试验阳性。

2．鉴定

(1) 炭疽芽胞杆菌与其他需氧芽胞杆菌的主要生物学特性鉴别：见表6－8－13。

表6－8－13　炭疽芽胞杆菌与其他需氧芽胞杆菌的鉴别

菌种	细菌形态	菌落边缘	荚膜	碳酸氢钠培养基	肉浸液	生化试验					
						溶血	动力	串珠	青霉素抑制	噬菌体裂解	动物毒力
炭疽芽胞杆菌	两端平截或凹陷	卷发状	有	粘液型菌落	絮状沉淀，上层清晰	不溶或微溶	－	＋	＋	＋	＋
其他芽胞杆菌	两端钝圆	沙粒状	无	粗糙型菌落	均匀混浊，有菌膜	多明显溶血	＋	－	－	－	－

炭疽芽胞杆菌菌体粗大，两端平截，感染组织中呈单个或短链状排列，人工培养呈长链如竹节状；有荚膜，无鞭毛；血平板上菌落灰白色，大而扁，表面粗糙，边缘卷发状，有时轻度溶血。蜡样芽胞杆菌菌体两端钝圆，无荚膜，芽胞位于近端；普通琼脂平板上培养菌落呈乳白色，边缘不整齐，常沿划线扩展成片状，迎光看呈白蜡状。枯草芽胞杆菌在普通琼脂平板上培养的菌落呈灰白色、扁平、干燥、皱缩、表面粗糙；血琼脂平板上培养呈β－溶血；在液体培养基表面形成较厚菌膜，液体清亮。

(2) 芽胞杆菌属种间的鉴定：见表6－8－14。

表6－8－14　芽胞杆菌属种间的主要生物学特性鉴别

菌种	菌体直径(μm)	青霉素	动力	卵磷脂酶	β－溶血	芽胞膨胀细胞	VP	硝酸盐还原	水解淀粉	其他特性
炭疽芽胞杆菌	≥0.9	S	－	+/－	－	－	+/－	+		产生荚膜
蜡样芽胞杆菌	≥0.9	R	+	+	+	－	+/－	+/－		
蕈状芽胞杆菌	≥0.9	R	+/－	+	－	－	+/－	+		丝状菌落
巨大芽胞杆菌	≥0.9	+/－	－	－	－	－	+/－			
苏云金芽胞杆菌	≥0.9	R	+	+	+	－	+/－	+		昆虫致病
枯草芽胞杆菌	＜＜0.9	S	+/－	－	+/－	－	+/－	+/－	+/－	
矮小芽胞杆菌	＜0.9	S	+	－	+/－	－	+/－	－	－	
地衣芽胞杆菌	＜0.9	S	+/－	－	+	－	+/－	+	－	
强固芽胞杆菌	＜0.9	S	+	－	+/－	－	－	+/－	+/－	
凝固芽胞杆菌	＜0.9	S	+	－	+/－	－	+/－	－		生长于55 ℃或35 ℃
环状芽胞杆菌	＜0.9		+	－	－	+	－	+/－		菌落于琼脂上移动
圆形芽胞杆菌	＜0.9		+	－	－	+	－	+/－		球形芽胞
侧胞芽胞杆菌	＜0.9		+	+/－	－	+	－	+		舟形芽胞
短芽芽胞杆菌	＜0.9		+	－	－	+	－	+/－		
多粘芽胞杆菌	＜0.9		+	－	－	+	+	－		
蜂房芽胞杆菌	＜0.9		+	－	d	+	+/－	+		
嗜热芽胞杆菌	＜0.9		+	－	－	+	+/－	－		65 ℃生长,35 ℃不生长

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－ 表示90％以上的菌株阴性；+/－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性；R 表示耐药；S 表示敏感；d 表示迟缓反应

三、李斯特菌属

李斯特菌属为规则性无芽胞革兰阳性杆菌，包括9 个菌种。产单核细胞李斯特菌是主要的致病菌。人类感染此菌通常由于摄人被污染的食物所致。该菌也可通过胎盘和产道感染新生儿。产单核细胞李斯特菌可引起人脑脓肿、心内膜炎、胆管炎、骨髓炎、动脉炎和眼结膜炎等。

1．生物学特性

革兰阳性的短小杆菌或球杆菌，大小为（0.4～0.5）μm ×（0.5～2.0）μm。无芽胞，无荚膜，具周身鞭毛。需氧或微需氧。在肉浸液培养基上生长良好，呈均匀混浊，表面可有薄膜形成。血琼脂平板上菌落细小，有狭窄的β－溶血环；与金黄色葡萄球菌作垂直接种，则两种菌之间溶血性加强，CAMP 试验阳性。生长于20～25 ℃时，具动力，动力试验呈倒伞形。

2．鉴定

李斯特菌与链球菌的不同点是能产生触酶，与棒状杆菌的不同点是具有动力。鉴定

要点是革兰阳性、卜溶血、有动力。属内各菌种间主要生物学特性鉴别见表6 —8 —15 。

表6 —8 —15　李斯特菌属各菌种的主要生物学特性鉴别

菌种	β—溶血	CAMP试验（金黄色葡萄球菌）	CAMP试验（马红球菌）	产酸					水解马尿酸盐	硝酸盐还原	小白鼠致病性
				甘露醇	α—甲基甘露糖苷	鼠李糖	可溶性淀粉	木糖			
格氏李斯特菌	—	—	—	+	v	—	+	—	—	—	—
无害李斯特菌	—	—	—	—	+	+／—	—	—	+	—	—
伊凡诺夫李斯特菌	+*	—	+	—	—	—	—	+	+	—	+
产单核细胞李斯特菌	+**	+	—	—	+	+	—	—	+	—	+
默氏李斯特菌	—	—	—	+	v	+／—	+	—	—	+	—
西利坚李斯特菌	+	+	—	—	—	—	v	+	v	v	—
威尔逊李斯特菌	—	—	—	—	+	+／—	v	+	v	v	—

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90 %以下）阳性，少数菌株阴性。v 表示不定；＊溶血环宽且呈多样性；＊＊极少数菌株呈阴性；原命名脱氮李斯特菌现划归乔西菌属

四、丹毒丝菌属

丹毒丝菌属包括红斑丹毒丝菌、产单核细胞丹毒丝菌和扁桃腺丹毒丝菌。红斑丹毒丝菌广泛分布于自然界，对人类、动物有致病性，人类因接触病畜或其产品而感染，多数由皮肤擦伤而形成类丹毒。

1．生物学特性

革兰阳性杆菌。大小0.2 μm × （1.0 ～1.5） μm ，光滑型为单个或成丛状排列，粗糙型为多形性如长丝状、分枝状或颗粒状。无鞭毛，无芽胞，无荚膜。初次分离微需氧，传代后在需氧环境也可生长。适宜生长温度30 ～37 ℃。血琼脂平板上轻微α—溶血；光滑型菌落细小、圆形、隆起，粗糙型菌落较大、表面呈颗粒状。

通常发酵葡萄糖、乳糖，产酸不产气；不发酵麦芽糖、甘露醇和蔗糖。触酶、氧化酶、甲基红及VP 试验阴性。不形成吲哚，不液化明胶，不还原硝酸盐。产硫化氢。

2．鉴定

红斑丹毒丝菌菌落在血琼脂平板上与草绿色链球菌相似，轻微溶血，菌落也较小，镜检则形态不同；与棒状杆菌的不同点是触酶试验阴性。本属与李斯特菌属、乳杆菌属、库尔特杆菌属细菌的主要生物学特性鉴别见表6 —8 —16 。

表6 -8 -16　丹毒丝菌属与相似菌属的鉴别

菌属	动力	需氧性	35 ℃生长	触酶	硫化氢	分解葡萄糖产酸
线环状菌属	－	兼性厌氧	－	＋①	－	＋
丹毒丝菌属	－	兼性厌氧	＋	－	＋	＋
李斯特菌属	＋②	兼性厌氧	＋	＋	－	＋
乳杆菌属	－③	兼性厌氧	＋	－④	－	＋
库尔特杆菌属	＋⑤	需氧	＋	＋	－⑥	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；①：触酶产生依赖培养基和培养温度；②：所有菌株在20 ~25 ℃有动力，37 ℃时动力弱或无；③：个别菌株有动力；④：某些菌株触酶试验阳性；⑤：个别菌株无动力；⑥：某些菌株产微量硫化氢

第三节　分枝杆菌和奴卡菌

一、分枝杆菌属

分枝杆菌属是一类细长的、具有分枝生长趋势的需氧杆菌，因具有抵抗或耐受酸或乙醇脱色的特点，又称为抗酸或耐酸杆菌。本属至今已有80 余种，除结核分枝杆菌与麻风分枝杆菌外，其他分枝杆菌统称非结核分枝杆菌。结核分枝杆菌与麻风分枝杆菌是重要的致病菌。

结核分枝杆菌是结核病的病原体，不产生内、外毒素，也无荚膜和侵袭性酶。其致病性可能与其在组织细胞内大量繁殖引起的炎症、菌体成分及代谢物质的毒性以及机体因菌体成分产生的免疫损伤有关。结核分枝杆菌主要通过呼吸道、消化道或皮肤粘膜损伤处侵入人体，引起各组织器官的病变，尤其以肺部最为常见。

人类是麻风分枝杆菌的唯一宿主。麻风分枝杆菌主要通过破损的皮肤、粘膜进入人体，也可经呼吸道感染。麻风病传染性很低，长期接触可感染，但仅少数人发病。麻风是一种慢性传染病，主要表现为皮肤、粘膜和神经末梢的损害，晚期可侵犯深部组织和器官。

1．生物学特性

革兰阳性、细长或微弯曲的杆菌。繁殖时呈分枝样生长，易断裂为球状、杆状。无鞭毛，无荚膜，无芽胞。耐酸和抗乙醇。

专性需氧，5 %~10 %二氧化碳可刺激其生长。营养要求较高，一般培养基上不生长，多数菌种生长缓慢，触酶试验阳性，芳基硫酸盐阳性，耐溶菌酶。

2．鉴定

(1) 与相关菌属的主要生物学特性鉴别：见表6－8－17。

(2) 分枝杆菌属内鉴定：分枝杆菌属可通过培养、光反应试验和生化反应分别进行类别、群别和种别的鉴定。分枝杆菌的微生物学检验鉴定流程见图6－8－4。

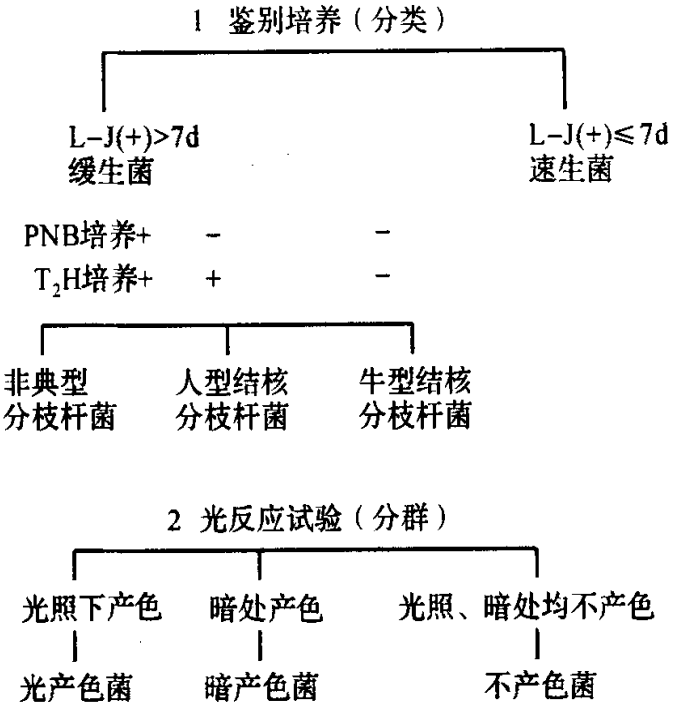


图6－8－4　分枝杆菌微生物学检验鉴定流程

非结核分枝杆菌在罗－琴（L－J）、噻吩－2－羧酸酰肼（T_2H）和对硝基苯酸（NAP）3种培养基上均能生长，而人型结核分枝杆菌可在L－J、T_2H两种培养基上生长，牛型结核分枝杆菌仅能生长于用以初次分离培养的培养基。

表6－8－17　分枝杆菌与相关菌属的主要生物学特性鉴别

菌属	形态	抗酸性	革兰染色程度	生长速度（以出现可见菌落时间计）	对青霉素敏感性	产芳基硫酸盐
分枝杆菌属	杆状、偶见细长分枝，罕见气生菌丝体	通常强抗酸	弱	2～60d	通常耐药	阳性，有时慢
棒状杆菌属	长杆菌，常为棒形排列栅栏状	有时弱抗酸	强	1～2d	敏感	阴性
奴卡菌属	菌丝样，后期断列为球、杆菌，常见气生菌丝体	通常局部抗酸	通常强	1～5d	耐药	少见
红球菌属	菌丝体稀少，断裂成不规则球、杆菌，无气生菌丝体	通常局部抗酸	通常强	1～3d	敏感	阴性

㈠ 结核分枝杆菌

1．生物学特性

本菌杆状、稍弯曲，牛型结核分枝杆菌较人型结核分枝杆菌短而粗，生长中可出现分支。抗酸染色阳性，革兰染色不易着色，常视为阳性。无芽胞，无荚膜，无鞭毛。专性需氧，无氧条件下迅速死亡。

在细胞内外皆可生长繁殖。生长时需一定湿度。营养要求高，需加入卵黄、血液、马铃薯等有机物和碳、氮、磷、钾等无机盐及氨基酸等。

两种菌均不发酵糖类，耐热触酶试验、Tween 80 水解试验和耐热磷酸酶试验阴性，尿素酶试验阳性，中性红试验有毒株阳性、无毒株阴性。

2．鉴定

与非结核分枝杆菌的主要生物学特性鉴别见表6 -8 -18 。

表6 -8 -18　结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌的鉴别

菌种	菌落外形	菌落色泽	索状因子	中性红	耐热触酶	对豚鼠致病性
结核分枝杆菌	粗糙、颗粒、结节	乳酪色	＋	＋	－	＋
非结核分枝杆菌	光滑或粗糙	黄色或橘红色	＋／－	＋／－	＋	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90 %以下）阳性，少数菌株阴性

人型与牛型结核分枝杆菌的主要区别是前者烟酸试验、硝酸盐还原试验和烟酰胺酶试验均为阳性。

㈡ 非结核分枝杆菌

非结核分枝杆菌分为光照产色菌、暗产色菌、不产色菌和速生菌4 群，其生物学性状与结核杆菌、麻风杆菌等不尽相同，与结核杆菌的主要生物学特性的鉴别见表6 -8 -18 。

速生分枝杆菌约有10 种，就目前所知对人类致病的仅偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌龟亚型和龟分枝杆菌脓肿亚型。可以造成严重的医院内感染，如肺部感染、皮肤感染及术后继发感染。在L -J 培养基上20 ～37 ℃孵育3d 就可形成菌落。菌落形态扁平，边缘粗糙，类似人型结核杆菌菌落，在孔雀绿培养基上，菌落呈黄绿色。菌体形态呈多形性，如球杆状、丝状或颗粒状。活体组织或体液中的菌体可见明显分枝。速生分枝杆菌的主要生物学特性鉴定见表6 -8 -19 。

在确定培养特性和色素产生与否的基础上，3 群缓慢生长分枝杆菌中各菌种的主要生物学特性鉴别见表6 —8 —20 。

表6 —8 —19　速生分枝杆菌（Runyon IV群）的主要生物学特性鉴别

菌种	分离适温	色素	尿素酶	硝酸盐还原	耐热触酶（68 ℃20 min）	Tween —80水解	芳香硫酸脂酶	50g／L 氯化钠生长	铁吸收
致病菌									
偶发分枝杆菌	37 ℃	—	+	+	+	(+)	+	+	+
龟分枝龟亚型	37 ℃	—	+	—	+	—	+	—	—
龟分枝脓肿亚型	37 ℃	—	+	—	+	—	+	+	—
非致病菌									
耻垢分枝杆菌	37 ℃	—	／	+	(+)	+	—	+	+
草分枝杆菌	37 ℃	+（S）	+	+	+	+	—	+	+
牡牛分枝杆菌	37 ℃	+（P／S）	+	／	+	+	—	+	+

注：+ 表示84 %以上菌株阳性；(+) 表示50 %～84 %菌株阳性；+／— 表示16 %～49 %菌株阳性；— 表示少于16 %菌株阳性；／表示无准确数据 S 表示暗产色 P 表示光产色

表6 —8 —20　缓慢生长分枝杆菌的主要生物学特性鉴别

菌种	分离适温	尿素酶	梢酸盐还原	耐热触酶（68 ℃20 min）	Tween —80水解	芳香硫酸脂酶	50g／L 氯化钠生长
照光产色分枝杆菌群（Runyon I群）							
堪萨斯分枝杆菌	37 ℃	+	+	+	+	—	—
海分枝杆菌	31 ℃～33 ℃	／	—	+／—	+	+／—	—
猿分枝杆菌①	37 ℃	—	+／—	+	—	—	—
暗产色分枝杆菌群（Runyon II群）							
致病菌							
瘰疬分枝杆菌	37 ℃	+	—	+	—	—	—
Szulgai 分枝杆菌②	37 ℃	+	+	+	+／—	+／—	—
转黄分枝杆菌③	37 ℃	+	+	+	+	—	—
非致病菌							
戈登分枝杆菌	37 ℃	—	—	+	+	—	—
不产色分枝杆菌群（Runyon III群）							
致病菌							
鸟－胞内复合分枝杆菌	37 ℃	—	—	+	—	—	—
蟾分枝杆菌④	42 ℃	—	—	+	—	(+)	—
溃疡分枝杆菌⑤	32 —33 ℃	／	—	+	—	—	／
非致病菌							
胃分枝杆菌	37 ℃	+	—	—	+	—	—
地复合分枝杆菌	37 ℃	—	+	+	+	—	—
次要分枝杆菌	37 ℃	—	+	+	+	+	／

注：+ 表示84 %以上菌株阳性；(+) 表示50 %～84 %菌株阳性；+／— 表示16 %～49 %菌株阳性；— 表示少于16 %

菌株阳性；-表示无准确数据；①表示有暗产色；②表示25 ℃光产色，37 ℃暗产色；③表示7～10d 可生长，可列入迷生群；④表示随菌龄增长或长期暴光后可产生色素；⑤表示可在NAP 培养基上不生长，也有快速生长者

㈢ 麻风分枝杆菌

麻风分枝杆菌较结核分枝杆菌短而粗。抗酸染色着色均匀，呈束状或团状排列。典型的胞内寄生菌，有该菌寄生的细胞呈泡沫状称麻风细胞。用药后细菌断裂为颗粒状、链杆状，着色不均匀。革兰阳性，无动力，无荚膜，无芽胞。人工培养至今尚未成功。

在感染部位（通常为麻风患者眶上、颧下、耳廓及鼻中隔粘膜等处）采取标本，进行涂片染色检查；或将活体组织切片进行抗酸染色及病理学检查。

二、奴卡菌属

奴卡菌属是一群需氧、能形成气中菌丝、有孢子的革兰阳性菌，包括9 个种。与医学有关的有星形奴卡菌、巴西奴卡菌、豚鼠奴卡菌、南非奴卡菌、鼻疽奴卡菌和新星奴卡菌6种。

奴卡菌在自然界分布广泛，多为腐物寄生菌，与人类致病关系最大的是星形奴卡菌和巴西奴卡菌，多为外源性感染。星形奴卡菌主要通过呼吸道入侵肺部，引起化脓性炎症与坏死，症状类似结核病；病灶可向其他组织器官扩散，进而引起脑膜炎、腹膜炎等。巴西奴卡菌可通过损伤的皮肤侵犯皮下组织，产生慢性化脓性肉芽肿，称为分枝菌病（mycetoma），好发于脚与腿部。

1．生物学特性

革兰阳性菌，培养早期菌体裂解为球形或杆形，分枝状菌丝较少；培养时间较长，则菌丝易断裂，形成丰富的菌丝体。抗酸染色弱阳性，与放线菌相同。盐酸乙醇中较长时间可完全脱色。专性需氧，较易培养。在沙保罗琼脂或普通琼脂培养基上，室温或35 ℃孵育缓慢生长。菌落表面皱褶，颗粒状。不同菌种所产色素各异，如橙红、粉红、黄、绿色等。在液体培养基中，细菌在液体表面生长形成菌膜，下部液体澄清。

星形奴卡菌的菌落黄色或深橙色，表面无白色菌丝；巴西奴卡菌菌落有白色菌丝。

可水解七叶苷和甘油，多数菌株脲酶、琥珀酸盐试验阳性，还原硝酸盐；所有菌种乳糖、木糖、纤维二糖、密三糖和苯甲酸盐试验阴性。

2．鉴定

⑴ 直接涂片镜检：组织液、渗出液或脓液标本直接涂片，如有色素颗粒，用玻片将其压碎涂片。见革兰阳性（有时不定）、纤细的菌丝体和长杆菌，抗酸染色弱阳性，可初步定为奴卡菌。脑脊液和痰液中发现抗酸阳性长杆菌，须与结核杆菌区别。

⑵ 奴卡菌属与分枝杆菌属等的鉴别：见表6－8－17。

(3) 奴卡菌属各菌种的主要生物学特性鉴别:见表6-8-21。

表6-8-21　奴卡菌属菌种的主要生物学特性鉴别

菌种	脲酶	45℃生长	葡萄糖产酸	肌醇产酸	明胶液化	碳源利用			
						侧金盏花醇	鼠李糖	半乳糖	甘露醇
星形奴卡菌	+	+/-	+	-	-	-	-	d	-
巴西奴卡菌	+	-	+	+	+	-	-	+	+
鼻疽奴卡菌	+	+	+	-	-	-	+	d	-
短链奴卡菌	-	-	-	-	-	+	+	+	+
豚鼠耳炎奴卡菌	+	+/-	+	+	-	-	-	-	+

注:+ 表示90%以上的菌株阳性;- 表示90%以上的菌株阴性;+/- 表示多数菌株(90%以下)阳性,少数菌株阴性;d 表示迟缓反应

第四节　肠杆菌科

肠杆菌科是一群生物学性状相似的革兰阴性杆菌,大多菌株寄居在人和动物肠道中,可随人及动物排泄物排出,广泛分布于水、土壤和腐败的物质中,一般不致病。但当机体状态改变,细菌侵入肠道以外的部位,也可作为条件致病菌而引起感染,如菌血症、脑膜炎、肺炎、肾盂肾炎、尿路感染或伤口感染等。有些菌种对人类有明显的致病作用,如沙门菌属、志贺菌属、致病性大肠埃希菌和耶尔森菌属某些种等可引起腹泻和其他感染。大肠埃希菌、肠杆菌属菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、粘质沙雷菌和枸橼酸杆菌等是引起院内感染的最重要肠杆菌科细菌。在临床微生物学实验室所分离的有临床意义的革兰阴性杆菌中,肠杆菌科菌约占80%;多于70%的尿路感染患者和约50%的败血症患者的感染由肠杆菌科菌引起。

表6 —8 —22　肠杆菌科各属的主要生物学特性鉴别

菌属	吲哚	甲基红	VP	枸橼酸盐	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	硫化氢	尿素	苯丙氨酸	动力	葡萄糖产气	DNA酶	明胶	酯酶	乳糖	蔗糖	甘露醇	卫矛醇	水杨素	侧金盏花醇	肌醇	山梨醇	阿拉伯糖	棉子糖	鼠李糖	麦芽糖	木糖	蕈糖
埃希菌属	+	+	−	−	+	V	V	−	−	−	+	+	−	−	−	+	V	+	V	V	−	−	+	+	V	P	+	+	+
志贺菌属	L	+	−	−	−	L	V	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	L	P	V	V	V	−	P
枸橼酸杆菌属	V	+	−	+	−	V	V	+	P	−	+	+	−	−	−	V	V	+	V	−	V	−	+	+	V	+	+	+	+
沙门菌属	−	+	−	+	+	P	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	V	+	+	−	+	+	+	+
克雷伯菌属	L	L	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肠杆菌属	−	−	+	+	V	P	+	−	V	−	+	+	−	−	−	+	+	+	L	P	V	V	+	+	+	+	+	+	+
沙雷菌属	−	L	+	+	+	−	+	−	L	−	+	V	+	+	+	−	+	+	−	+	V	P	+	−	−	−	+	−	+
变形杆菌属	V	+	L	V	−	−	V	+	+	+	+	+	V	+	P	−	V	−	−	V	−	−	−	−	−	−	V	+	V
普罗威登菌属	+	+	−	+	−	−	−	−	V	+	+	V	−	−	−	−	V	V	−	V	V	V	−	−	−	V	−	−	V
摩根菌属	+	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+	P	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	L
耶尔森菌属	V	+	−	−	−	−	V	−	P	−	−	−	−	−	V	−	+	+	−	V	−	V	+	+	−	−	P	P	+
哈夫尼亚菌属	−	V	P	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	L	−	−	−	+	−	+	+	+	+
克吕沃菌属	P	+	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	−	−	−	+	+	+	L	+	−	−	V	+	+	+	+	+	+
西地西菌属	−	+	V	+	−	V	V	−	−	−	+	P	−	−	−	L	P	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	P	+
爱德华菌属	+	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
爱文菌属	−	P	+	+	−	−	−	−	−	−	V	−	−	−	−	V	−	+	−	+	−	−	−	−	−	L	L	L	+
拉恩菌属	−	P	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	+	+	P	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+
塔特姆菌属	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	V	−	−	−	−	L	−	−	−	+
布特维西菌属	−	+	−	−	−	−	−	P	V	−	V	V	−	−	−	+	−	V	−	−	−	−	−	V	−	+	−	+	−
约克纳酋属 (克泽菌属)	−	+	−	+	−	+	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	L	+	+	+	+
莱克勒酋属	+	−	−	−	−	−	V	−	V	−	V	+	−	−	−	+	V	+	P	+	+	−	−	+	V	+	+	+	+
勒米诺菌属	−	C	−	C	−	−	−	+	−	−	−	C	−	−	−	−	−	−	D	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−
致病杆菌属	V	−	−	V	−	−	−	−	L	−	+	−	V	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	L	−	−	
巴提奥杆菌属	−	+	−	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
肥杆菌属	−	L	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	L	V	L	P
默勒菌属	−	+	−	P	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	V	−	−	+	−	−	−	+	−	V	−	−
布拉格菌属	−	+	−	+	−	−	−	+	−	L	+	−	−	−	−	−	−	−	−	P	−	−	−	−	−	−	−	−	−
布尔西菌属	V	+	−	P	+	V	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	L	−	−	+	+	−	+	+	+	+

注：+表示90 %以上的菌株阳性；−表示90 %以上的菌株阴性 P 表示75.0 %～89.9 %菌株阳性 V 表示25.1 %～74.9 %菌株阳性 L 表示10.1 %～25.0 %菌株阳性 C 表示格氏勒米诺菌100 %阳性，里查德勒米诺菌0 %阳性 D 表示格氏勒米诺菌83 %阳性，里查德勒未诺菌0 %阳性

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，大小为（0.3～1.0）μm×（1.0～6.0）μm、无芽胞、多数菌种有鞭毛，少数菌种（或株）无鞭毛。对营养要求不高，绝大多数菌种在普通培养基和麦康凯琼脂上生长良好。兼性厌氧，发酵葡萄糖产酸或产酸产气。氧化酶试验阴性，触酶试验阳性，还原硝酸盐为亚硝酸盐。肠杆菌科各属主要生物学特性鉴别见表6－8－22。

2．鉴定

目前，肠杆菌科内有30多个菌属。虽然本科与其他菌科生物学性状有所不同，但仍有交叉，因此，在鉴定时，首先应注意与其他菌科的鉴别。可通过形态、O/F试验、氧化酶、鞭毛等特性加以区别，见表6－8－23。

表6－8－23　肠杆菌科与其他菌科主要生物学特性的鉴别

菌类	形态	鞭毛	O/F	氧化酶	触酶
肠杆菌科	杆状	周毛或无	发酵	－	＋
弧菌科	弧状或杆状	单毛	发酵	＋	＋
非发酵菌	杆状	丛毛、周毛、单毛或无	氧化或不分解	＋*	＋
心杆菌属	杆状	无	发酵（弱）	＋	－
色杆菌属	杆状	单毛	发酵（弱）	＋	＋

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；*不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌除外

肠杆菌科细菌鉴定应按科→属→种顺序进行。根据苯丙氨酸脱氨酶及葡萄糖酸盐试验可将肠杆菌科的常见菌属分为3大群。

（1）苯丙氨酸阳性、葡萄糖酸盐阴性：此群包括变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属，3个属可通过硫化氢、鸟氨酸和枸橼酸盐3个试验加以区别。见表6－8－24。

表6－8－24　苯丙氨酸阳性菌属主要生物学特性鉴别

菌属	硫化氢	鸟氨酸	枸橼酸盐
变形杆菌属	＋	＋/－	＋/－
普罗威登斯菌属	－	－	＋
摩根菌属	－	＋	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性

（2）苯丙氨酸阴性、葡萄糖酸盐阳性：此群包括克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属和哈夫尼亚菌属，各属之间可通过动力、山梨醇、DNA酶、棉子糖等试验加以区别。见表6－8－25。

(3) 苯丙氨酸和葡萄糖酸盐均阴性：此群包括埃希菌属、志贺菌属、沙门菌属、枸橼酸杆菌属、爱德华菌属和耶尔森菌属，各属之间可通过硫化氢、动力、枸橼酸盐、吲哚、赖氨酸、尿素酶等试验加以区别。见表6－8－26。

表6－8－25　葡萄糖酸盐阳性苗属主要生物学特性鉴别

菌属	动力	山梨醇	DNA 酶	棉子糖
克雷伯菌属	－	＋	－	＋
肠杆菌属	＋	＋／－	－	＋
沙雷菌属	＋	＋	＋	＋／－
哈夫尼亚菌属	＋	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性表

表6－8－26　苯丙氨酸和葡萄糖酸盐均阴性各菌属主要特性鉴别

菌属	动力	硫化氢	吲哚	枸橼酸盐	尿素酶	赖氨酸
埃希菌属	＋／－	－	＋	－	－	＋／－
志贺菌属	－	－	－／＋	－	－	－
沙门菌属	＋	＋／－	－	＋／－	－	＋／－
枸橼酸杆菌属	＋／－	－／＋	＋	－／＋	－	
爱德华菌属	＋	＋	＋	－	－	＋
耶尔森菌属	－★	－	－／＋	－	＋／－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）阴性，少数菌株阳性；★表示25～30℃培养动力试验阳性

一、埃希菌属

本属包括大肠埃希菌、赫尔曼埃希菌、创伤埃希菌、费格森埃希菌和蟑螂埃希菌5种。代表菌株为大肠埃希菌，该菌为临床常见分离菌之一。

1．生物学特性

埃希菌属大多数菌株能发酵乳糖产酸或产酸产气，产生吲哚，甲基红试验阳性，能利用醋酸盐，VP 试验阴性，不分解尿素、不利用枸橼酸盐，侧金盏花醇、肌醇、苯丙氨酸脱氨和葡萄糖酸盐等试验均阴性。一般不产生硫化氢，不能在氰化钾培养基中生长。

2．鉴定

属内各个种之间的区别见表6－8－27。大肠埃希菌某些菌株动力可阴性，迟缓发

酵或不发酵乳糖，不产气，通常称为大肠埃希菌不活泼株，易与志贺菌相混淆。

大肠埃希菌某些血清型可引起人类腹泻，如肠致病性大肠埃希菌、产肠毒素大肠埃希菌、侵袭性大肠埃希菌、肠出血性大肠埃希菌和肠聚集性大肠埃希菌。血清型间的区别主要靠血清学试验、肠毒素检测、Hep－2 或 Hela 细胞粘附试验等；

表6－8－27　埃希菌属和志贺菌属的主要生物学特性鉴别

菌名	吲哚	赖氨酸	鸟氨酸	动力	醋酸盐	粘液酸盐	乳糖	黄色素	甘露醇	侧金盏花醇	山梨醇	KCN生长	阿拉伯醇	纤维二糖	葡萄糖产气
志贺菌A、B、C、血清群	V	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	V	－	－	－	－
宋内志贺菌	－	－	＋	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－		
大肠埃希菌不活泼株	(+)	V	(－)	－	V	V	(－)	－	＋	－	(+)	－	－	－	－
大肠埃希菌	＋	＋	V	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	－	－	－	＋
费格森埃希菌	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	＋	＋	－	－	＋	＋	＋
赫尔曼埃希菌	＋	－	＋	＋	(+)	＋	V	＋	＋	－	－	＋	－	＋	＋
创伤埃希菌	－	(+)	－	＋	V	(+)	(－)	V	＋	－	－	(－)	－	＋	＋
蟑螂埃希菌	－	＋	＋	－	－	V	－	－	－	－	－	－	－	－	＋

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；(+) 表示75.0％～89.9％菌株阳性；V 表示25.1％～74.9％阳性；(－) 表示10.1％～25.0％阳性

1）致病型大肠埃希菌（Enteropathogenic E.coli，EPEC）：EPEC 是流行性婴儿腹泻的病原菌，多发于夏秋季节，具有高度传染性。临床常见发热、呕吐、水样便等症状，但通常便中有粘液而无血。常见血清型有 O_{18}、O_{20}、O_{25}、O_{26}、O_{28}、O_{44}、O_{55}、O_{86}、O_{111}、O_{112}、O_{114}、O_{119}、O_{125}、O_{126}、O_{127}、O_{128}、O_{142}、O_{144}、O_{158}、O_{159} 等，其中以 O_{55}、O_{111}、O_{119}、O_{126}、O_{128}、O_{142} 最多。

采集新鲜粪便，挑取粘液部分，划线接种于麦康凯、血琼脂平板上，35℃培养18～24h。经生化反应确定的大肠埃希菌，用肠致病性大肠埃希菌诊断血清做玻片凝集试验。先用 OK 多价血清凝集，结果阳性时，再用所属 OK 单价血清进一步确定血清型，同时用9.0g/L 氯化钠溶液做阴性对照。当细菌与3 组多价诊断血清均不凝集时，可将可疑菌落挑至5.0g/L 氯化钠溶液中，100℃水浴1h，破坏 K 抗原后再做凝集试验，结果仍不凝集，则为阴性。

2）产肠毒素型大肠埃希菌（Enterotoxigenic E.coli，ETEC）：ETEC 是引起旅游者腹泻和发展中国家婴幼儿急性腹泻的病原菌。主要通过食人污染的食物和水而感染。临床表现主要有恶心、腹部痉挛疼痛，低热和突然发作、大量的水样便等。ETEC 可产生由质粒介导的两种肠毒素，一种是耐热肠毒素（ST），另一种是不耐热肠毒素（LT）。

常见血清型有 O_6、O_7、O_8、O_9、O_{15}、O_{20}、O_{25}、O_{27}、O_{63}、O_{73}、O_{78}、O_{114}、O_{115}、O_{128}、O_{148}、O_{153}、O_{159} 等，其中最多见的有 O_6、O_8、O_{25}、O_{78}、O_{115} 和 O_{128}。

按常规方法分离培养。除生化反应鉴定和血清分型外，最可靠的方法是检测肠毒素。毒素检测有体内和体外两种方法。ST 免疫原性较弱，主要采用体内检测法，如家兔和小白鼠肠袢试验；LT 的生物学活性和免疫原性较强，体内和体外检测法均可应用。体外检测法包括改良Elek 法、平板免疫溶血法、SPA 协同凝集试验等。

3）肠侵袭型大肠埃希菌（Enteroinvasive E.coli，EIEC）：EIEC 与志贺菌类似，不发酵或缓慢发酵乳糖，发酵葡萄糖不产气，不产生赖氨酸脱羧酶，动力试验阴性。通常随饮水、食物等经消化道感染，并在结肠粘膜上皮细胞内繁殖，破坏局部粘膜导致炎症和溃疡。临床症状与细菌性痢疾相似。常见血清型有O_{12}、O_{28}、O_{29}、O_{112}、O_{115}、O_{124}、O_{136}、O_{143}、O_{144}、O_{152}、O_{164}等。

分离培养与鉴定同EPEC，但要注意某些抗血清与志贺菌属有交叉反应，如O_{124}、O_{136}、O_{164}与志贺菌A 群3 型；O_{112}与志贺菌A 群2 型，C 群1 型、15 型呈交叉凝集等。致病力检查采用Sereny 试验，即用被检菌液接种于家兔或豚鼠眼角膜内，1～2d 内即可出现角膜充血、水肿、混浊、渗出、流脓，甚至溃疡等阳性反应，少数菌株5d 后出现炎症。

4）肠出血型大肠埃希菌（Enterohemorrhagic E.coli，EHEC）：EHEC 血清型超过50种，而最重要的是$O_{157}:H_7$，其次为$O_{26}:H_{11}$。人类感染大肠埃希菌$O_{157}:H_7$主要由于食用消毒不完全的牛奶、肉类而引起爆发性出血性结肠炎，亦可散发，少数病例可并发溶血性尿毒综合征（HUS）。大肠埃希菌$O_{157}:H_7$能产生Vero 细胞毒素（VT），可引起Hela 细胞病变。98.4％大肠埃希菌$O_{157}:H_7$血清型在2d 内不发酵山梨醇。个别菌株吲哚试验阴性，产生硫化氢，葡萄糖醛酸酶试验阴性。

采用山梨醇－麦康凯琼脂平板来分离或H，抗血清－山梨醇半固体培养基筛选该菌株。按常规方法接种，37℃培养24h 后，挑选无色菌落，与O_{157}和H_7抗血清作玻片凝集试验。如凝集试验阳性且生化反应也符合大肠埃希菌即可明确。其他检测方法还有DNA 探针和PCR 等。

5）聚集型大肠埃希菌（Enteroaggre gative E.coli，EAggEC）：EAggEC 曾名为肠粘附大肠埃希菌（Enteroadherent E.coli，EAEC）。不产生LT 或ST，不具侵袭性，与ETEC、EPEC、EIEC 和EHEC 的O:H 诊断血清不凝集。其特征是能聚集粘附Hep－2 和Hela 细胞。EAggEC 可引起慢性腹泻，患儿可有水样腹泻、呕吐、脱水，偶有腹痛、发热和血样便等症状。

实验室诊断有液体培养基中凝块聚集试验、粘附细胞试验和DNA 探针等检查。液体培养基中凝块聚集试验方法：挑取分离平板上的典型大肠埃希菌菌落，接种于M－H 肉汤中，置35℃培养18～24h 观察结果。表面形成凝块者为阳性，均匀混浊无凝集块者

为阴性。

二、志贺菌属

志贺菌属（Shigella）是人类主要肠道病原菌之一，主要引起人类细菌性痢疾，其中福氏和宋内志贺菌最为常见，一年四季均可发病，以夏秋季发病率最高。该属菌通常随饮水、食物等经消化道感染，侵犯肠粘膜而引起溃疡，粪便呈脓血粘液状，并含有大量脓细胞。该属分4 群。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，无鞭毛，无芽胞，无荚膜。需氧或兼性厌氧。最适生长温度为37 ℃，最适pH7.2 ～7.4 。对营养无特殊要求，普通培养基上生长良好。液体培养基中呈均匀混浊生长。血琼脂平板上形成灰白色、半透明、表面光滑湿润、边缘整齐、中等大小菌落，不溶血。在麦康凯、SS 等选择性培养基上可形成无色透明的中等大小菌落。宋内志贺菌菌落较大，由于迟缓分解乳糖，菌落可呈淡粉红色。志贺菌属主要生物学特性见表6 －8 －23 。

志贺菌属一般只有菌体（O）抗原，而无鞭毛（H）抗原。某些菌株（A 群、C 群及B 群的2a、6 型）含有K 抗原，K 抗原不耐热，100 ℃加热30 min 即被破坏。根据菌体抗原之不同，可将志贺菌属分为4 个血清群和38 个血清型。

（1）A 群：痢疾志贺菌（S.dysenteriae），甘露醇试验阴性。共分13 个血清型，均有K 抗原，国内仅发现1 ，2 两型。

（2）B 群：福氏志贺菌（S.flexneri），共有6 个血清型和X 、Y 变种，具有型特异性和群特异性抗原，藉此可再分亚型。本群菌中仅2a 及6 型有K 抗原。

（3）C 群：鲍氏志贺菌（S.boydii），大多数菌株不分解甘露醇，共有18 个血清型，含K 抗原。

（4）D 群宋内志贺菌（S.sonnei），仅有1 个血清型，有光滑型（S）和粗糙型（R）两种菌落。S －R 菌落变异可导致抗原改变。R 型菌株不被S 型血清凝集，宋内志贺菌因子诊断血清应同时含有S 型、型两种抗体。

2．鉴定

生化反应符合志贺菌属特性，再进行血清学试验，血清学试验是鉴定金标准。先用志贺菌4 种多价混合诊断血清做凝集试验，阳性者进一步用因子血清定群和分型，同时用9g/L 氯化钠溶液作对照；阴性者可进一步用C 群诊断血清做凝集试验。

对于生化反应符合志贺菌特性，而血清凝集试验阴性的菌株，可用9g/L 氯化钠溶液制成菌悬液，在100 ℃水浴中加热15 ～30 min 破坏K 抗原后重做凝集试验。应注意与EIEC 和大肠埃希菌不活泼株相区别。

三、沙门菌属

沙门菌属是一类分布广泛、血清型别多、抗原复杂的肠道病原菌。可引起人类胃肠炎、菌血症、局部感染及食物中毒等。

伯杰鉴定细菌学手册第9 版中，将沙门菌属分成邦戈尔沙门菌和猪霍乱沙门菌2 种。所有沙门菌属（包括亚利桑那菌）血清型皆属于上述2 个种。邦戈尔沙门菌血清型较少见，而猪霍乱沙门菌有2400 以上血清型。猪霍乱沙门菌再分6 个亚种：猪霍乱亚种、萨拉姆亚种、亚利桑那亚种、双相亚利桑那亚种、豪顿亚种和印第卡亚种。属于猪霍乱亚种的血清型皆已命名，如伤寒血清型、副伤寒甲血清型、猪霍乱血清型和鸡沙门菌血清型等，而其他亚种血清型仍未命名。为避免种名与血清型间混乱，WHO 沙门菌参考与研究合作中心及美国CDC 等单位使用肠道沙门菌名称取代猪霍乱沙门菌，肠道亚种取代猪霍乱亚种。见表6－8－28。

表6－8－28　沙门菌属内（沙门菌－亚利桑那菌群）6 个亚群的主要生物学特性鉴别

生物学特性	沙门菌属亚群1	沙门菌属亚群2	沙门菌属亚群3a	沙门菌属亚群3b	沙门菌属亚群4	沙门菌属亚群5	沙门菌属亚群6
以前使用沙门菌属亚属	I	II	III	III	IV	v	
爱文氏分类	沙门菌属	沙门菌属	亚利桑那菌属	亚利桑那菌属	沙门菌属	沙门菌属	沙门菌属
LeMinor 等分类的亚种	猪霍乱（肠道）	萨拉姆	亚利桑那	双相亚利桑那	豪顿	邦戈尔	印第卡
通常单相或双相鞭毛	双相	双相	单相	双相	单相	单相	双相
通常分离自人和温血动物	是	否	否	否	否	否	否
通常分离自冷血动物或环境	否	是	是	是	是	是	是
对人的致病性	高度	是	是	是	是	可能	可能
生化反应							
卫矛醇发酵	＋	＋	－	－	－	＋	v
乳糖发酵	－	－	(－)	(＋)	－	－	(－)
β－半乳糖苷酶	－	(－)	＋	＋	－	＋	v
丙二酸盐利用	－	＋	＋	＋	－	－	－
氰化钾培养基生长	－	－	－	－	＋	＋	－
粘液酸盐发酵	＋	＋	＋	v	－	＋	＋
明胶液化	－	＋	＋	＋	＋	－	＋
D－半乳糖醛酸发酵	－	＋	－	＋	＋	＋	(＋)
被01 噬菌体裂解	＋	＋	－	＋	－	v	＋

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；（＋）表示75.0％～89.9％菌株阳性；v 表示25.1％～74.9％菌株阳性；（－）表示10.1％～25.0％菌株阳性

目前，在临床微生物学实验室多以菌种的形式代替血清型报告，如伤寒沙门菌、肠炎沙门菌等。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，不产生芽胞，无荚膜，除个别菌株（鸡沙门菌和雏沙门菌）外，一般都有周鞭毛。需氧或兼性厌氧，最适生长温度35～37℃，最适pH为6.8～7.8。能在普通培养基上生长。在血琼脂平板上生长呈灰色或灰白色中等大小的菌落；在麦康凯、SS等选择性培养基上，不分解乳糖，呈透明或半透明、边缘整齐、中等大小的菌落。产硫化氢菌株在SS琼脂平板上形成中心黑色的菌落。在液体培养基中均匀混浊生长。沙门菌属主要生物学特性见表6—8—22。

本属细菌主要有以下几种抗原：

（1）菌体抗原：又称O抗原，是多糖－类脂－蛋白复合物，多糖成分决定抗原的特异性。菌体抗原比较稳定，能耐受100℃加热2.5h，并能抵抗乙醇及0.1%苯酚。目前已知有67种O抗原成分，分别以阿拉伯数字1、2、3、…表示。每个血清型细菌可含有一种或数种成分。凡含有共同特异性抗原成分的血清型归为一个群。这样可将本菌属许多血清型细菌分为若干菌群，分别以A、B、C、D、…Z和O_{51}～O_{67}等表示，作为定“群”分类的依据。能引起人类感染的沙门菌，绝大多数在A～F菌群内。

（2）鞭毛抗原：又称H抗原，成分是蛋白质，不耐热，加热60～70℃15min后即被破坏，也易被乙醇、稀酸等灭活。H抗原分2相，第1相特异性高，分别以a、b、c、…z表示，后面以z_1、z_2、z_3、…等表示。第2相为非特异性，分别以1、2、3、…表示。鞭毛抗原分析是定型的依据。常见沙门菌各血清型抗原成分见表6—8—29。

表6—8—29　常见沙门菌各血清型的抗原成分表

菌群	菌型	O抗原	H抗原第一相	H抗原第二相
A群	甲型副伤寒沙门菌	1,2,12	a	
B群	乙型副伤寒沙门菌	1,4,[5],12	b	1,2
	斯坦利沙门菌	1,4,[5],12,27	d	1,2
	圣保罗沙门菌	1,4,[5],12	e,h	1,2
	埃可沙门菌	4,12	e,h	1,6
	德比沙门菌	1,4,[5],12	f,g	[1,2]
	鼠伤寒沙门菌	1,4,[5],12	i	1,2
C群	丙型副伤寒沙门菌	6,7,[Vi]	c	1,5
	猪霍乱沙门菌	6,7	[c]	1,5
	汤卜逊沙门菌	6,7	k	1,5

续表

菌群	菌型	O 抗原	H 抗原第一相	H 抗原第二相
	波斯坦沙门菌	6，7	1，v	e，n，z15
	婴儿沙门菌	6，7	r	1，5
	曼哈顿沙门菌	6，8	d	1，5
	纽波特沙门菌	6，8	e，h	1，2
	科特布斯沙门菌	6，8	e，h	1，5
	病牛沙门菌	6，8	r	1，5
	克洛斯特鲁沙门菌	6，8	z10	e，n，z15
D 群	伤寒沙门菌	9，12，[Vi]	d	
	肠炎沙门菌	1，9，12	g，m	[1，7]
	德班沙门菌	9，12	a	e，n，z15
	仙台沙门菌	1，9，，12	a	1，5
	布利丹沙门菌	9，12	g，m，q	
	都柏林沙门菌	1，9，12，[Vi]	g，p	
	鸡沙门菌	1，9，12		
	莫斯科沙门菌	9，12	g，q	
E 群	鸭沙门菌	3，10	e，h	1，6
	纽兰芝沙门菌	3，10	e，h	e，n，x
	火鸡沙门菌	3，10	e，h	1，w
	伦敦沙门菌	3，10	1，v	1，6
	纽因顿沙门菌	3，15	e，h	1，6
	山夫顿堡沙门菌	3，19	g，[1]，t	
	利物浦沙门菌	1，3，19	d	e，n，z15
F 群	阿柏丁沙门菌	11	i	1，2
	赫伦沙门菌	11	i	1，6
其他群	上海沙门菌	16	1，v	1，6
	明尼苏达沙门菌	21	b	e，n，x
	达卡沙门菌	28	a	1，6

(3) 表面抗原：包括Vi、M 及5 等3 种K 抗原。Vi 抗原是一种酸性多糖聚合体，很不稳定，60 ℃加热30 min 或经苯酚处理即被破坏，经人工传代也易消失。Vi 抗原能阻碍O 抗原与相应抗血清凝集，加热后即可恢复凝集。M 抗原亦称粘液抗原，M 抗原也

能阻碍O 抗原与相应抗血清凝集，加热可破坏。5 抗原过去被认为是一种O 抗原，但它可被1.0mol/L 盐酸破坏，故与O 抗原有别。

2．鉴定

先用生化反应筛选，符合沙门菌属特性者再做血清凝集试验。用沙门菌属A～F 群多价血清作凝集试验，同时用9g/L 氯化钠溶液作阴性对照，血清凝集试验阳性而阴性对照不凝集时，再分别用O、H 因子血清进一步定群和分型；若均不凝集，需用Vi 抗原诊断血清作凝集试验，若结果阳性，可用9g/L 氯化钠溶液制成浓菌悬液，沸水浴30min 破坏Vi 抗原后，再与A～F 群多价血清进行凝集试验，阴性可排除A～F 群沙门菌，必要时进一步与A～F 群以外的沙门菌因子血清做凝集试验，或送有关机构进一步鉴定。

四、枸橼酸杆菌属

枸橼酸杆菌属是人和动物肠道的正常菌群，是条件致病菌，能引起腹泻和肠道外感染。目前有11 种，临床常见的有弗劳地枸橼酸杆菌、异型枸橼酸杆菌、丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌等。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌。在营养琼脂上发育良好，菌落光滑、微凸、湿润、半透明、灰色、表面有光泽、边缘整齐，偶尔有粘液或菌落呈粗糙型。能利用枸橼酸盐为唯一碳源，赖氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶、DNA 酶、明胶酶和葡萄糖酸盐等试验均阴性。部分特性与大肠埃希菌相似，如发酵乳糖、β－半乳糖苷酶和吲哚试验阳性。同时也具有沙门菌属部分特性，如利用枸橼酸盐，产生硫化氢等。

2．鉴定

(1) 与相关菌属的主要生物学特性鉴别：见表6－8－26。

(2) 临床常见的弗劳地枸橼酸杆菌、异型枸橼酸杆菌、丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌等3 种菌的主要生物学特性鉴别：见表6－8－30。

表6－8－30　3 种常见枸橼酸杆菌的主要生物学特性鉴别

菌种	硫化氢	吲哚	侧金盏花醇	丙二酸盐
弗劳地枸橼酸杆菌	＋	－	－	－/＋
异型枸橼酸杆菌	－	＋	＋	＋
丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌	－	＋	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；－/＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性

五、爱德华菌属

爱德华菌属广泛存在于自然界，是一种条件致病菌，包括3 个种和1 个生物群，即迟钝爱德华菌、保科爱德华菌、鲶鱼爱德华菌及迟钝爱德华菌生物群1。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌。在血琼脂平板上形成灰白色、湿润、凸起、光滑菌落。发酵葡萄糖，不发酵乳糖、木糖、山梨醇和甘露醇，赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶试验阳性，苯丙氨酸脱氨酶、明胶酶、DNA 酶、尿素酶和葡萄糖酸盐试验阴性。迟钝爱德华菌的大多数菌株产生硫化氢，其他不产生硫化氢。

2．鉴定

（1）与有关菌属的主要生物学特性鉴别：见表6－8－26。

（2）本菌属各种间主要生物学特性鉴别：见表6－8－31。

表6－8－31　爱德华菌属各种间的主要生物学特性鉴别

菌种	吲哚	硫化氢（TSI）	动力	丙二酸盐	发酵			
					D－甘露醇	蔗糖	蕈糖	L－阿拉伯糖
迟钝爱德华菌	＋	＋	＋	－	－	－	－	－
迟钝爱德华菌生物群1	＋	－	＋	－	＋	＋	－	＋
保科爱德华菌	(+)	－	＋	＋	＋	＋	＋	(－)
鲶金鱼爱德华菌	－	－	－	－	－	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；（+）表示75.0％～89.9％菌株阳性；（－）表示10.1％～25.0％菌株阳性

六、克雷伯菌属

克雷伯菌属广泛分布于自然界，为人类呼吸道的常居菌群，是引起医院感染的常见条件致病菌。包括5 个种，即肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、解鸟氨酸克雷伯菌、植生克雷伯菌和土生克雷伯菌。其中肺炎克雷伯菌又分3 个亚种，肺炎亚种、鼻硬结亚种和臭鼻亚种。由于3 个亚种在致病性上有一定特殊性，临床实验室仍可按菌种报告。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，大小（0.3～0.6）μm×（0.6～6.0）μm。在感染标本中菌体常呈球杆状，成对或短链排列，有荚膜，较菌体宽2～3 倍。培养后菌体较长，呈多形性，无鞭毛。兼性厌氧菌。营养要求不高，各菌种均能在营养琼脂上生长。在血琼脂平板上形成隆起、大而粘稠的菌落，相邻菌落易融合成鼻涕样菌苔，接种针挑取时呈丝状粘连，连续传代可变为光滑型菌落。在肠道选择性培养基上呈乳糖发酵型菌落。在液体培养中混浊生长，产

生大量荚膜的菌株，管底呈粘性沉淀。本菌属的主要生物学特性见表6 —8 —22 。

2．鉴定

1） 与相关菌属的主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —25 。

2） 本菌属各种间主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —32 。

表6 —8 —32　克雷伯菌属各种间的主要生物学特性鉴别

菌种	吲哚	甲基红	枸橼酸盐	尿素酶	丙二酸盐	赖氨酸	鸟氨酸
肺炎克雷伯菌	－	－	＋	＋	＋	＋	－
臭鼻克雷伯菌	－	＋	v	－	－	v	－
鼻硬结克雷伯菌	－	＋	－	－	＋	－	－
产酸克雷伯菌	＋	(－)	＋	＋	＋	＋	－
土生克雷伯菌	－	v	v	－	＋	＋	(－)
植生克雷伯菌	(－)	＋	＋	＋	＋	＋	－
解鸟氨酸克雷伯菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；(+) 表示75.0 %～89.9 %阳性；v 表示25.1 %～74.9 %菌株阳性；(－) 表示10.1 %～25.0 %菌株阳性

七、肠杆菌属与多源菌属

(一) 肠杆菌属

肠杆菌属 (Enterobacter) 包括13 个种，为广泛分布于自然界的腐物寄生菌，人或动物肠 道中偶尔可见，当机体免疫功能低下时，可作为条件致病菌引起各种感染，是医院感染常见 的分离菌。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌或球杆菌，周身鞭毛，无芽胞。兼性厌氧。营养要求不高，在普通培养基上 可生长；在血琼脂平板上菌落呈灰白色，不溶血；在液体培养基中均匀混浊生长，有菌膜。

本菌属主要生物学特性见表6 —8 —22 。

2．鉴定

1） 与相关菌属的主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —25 。

2） 本属内种间主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —33 。

表6 —8 —33　肠杆菌属内各种间及与聚团多源菌的主要生物学特性鉴别

菌　种	赖氨酸	精氨酸	尿素	甲基红	动力	乳糖	蔗糖	棉子糖	鼠李糖	密二糖	山梨醇	卫矛醇	七叶苷
产气肠杆菌	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+
阴沟肠杆菌	−	+	v	−	+	+	+	+	+	+	+	(+)	v
格高菲肠杆菌	+	−	+	−	+	v	+	+	+	+	−	−	+
坂崎肠杆菌	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+
泰洛肠杆菌	−	+	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+
河生肠杆菌生物1 群	−	−	−	−	+	v	+	+	+	+	−	−	+
河生肠杆菌生物2 群	−	v	−	v	+	v	−	−	+	+	+	−	+
阿斯布肠杆菌	−	(−)	v	+	−	(+)	+	v	−	−	+	−	+
中间肠杆菌	−	−	−	+	(+)	+	v	+	+	+	+	+	+
致癌肠杆菌	−	+	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+
分解肠杆菌	−	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	+
超压肠杆菌	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	−	+
霍米奇肠杆菌	−	−	(+)	v	v	−	+	−	+	−	−	(+)	−
聚团多源菌	−	−	(−)	v	(+)	v	(+)	v	(+)	V	V	(−)	v

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；（+）表示75.0 %～89.9 %菌株阳性；v 表示25.1 %～74.9 %菌株阳性；（−） 表示10.1 %～25.0 %菌株阳性

（二） 多源菌属

多源菌属是1989 年Gavini 等提议建立的一个新属，包括聚团多源菌 （聚团肠杆菌） 和弥散 多源菌2 种。聚团多源菌是条件致病菌，已从人的血、尿和伤口等标本中分离得到。

1．生物学特性

本届细菌体形态、染色和培养特性与肠杆菌属相似。75 %～85 %不产气聚团多源菌产黄色 素，而产气菌株小于5 %。生化反应最大特点是赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶及精氨酸水解酶 试验均阴性。

2．鉴定

与肠杆菌属的主要生物学特性鉴别见表6 —8 —33 。可用水杨素试验区别聚团多源菌 （阳性） 和弥散多源菌 （阴性）。

八、沙雷菌属与哈夫尼亚菌属

沙雷菌属广泛分布于自然界，是水和土壤中常居菌群。有些菌种在一定条件下可引

起感染，是医源性感染的重要细菌之一。沙雷菌属包括8 个种，临床上常见的是粘质沙雷菌和液化沙雷菌。

哈夫尼亚菌属包括蜂房哈夫尼亚菌（H.alvei）1 种和蜂房哈夫尼亚生物1 群。

1．煤生物学特性

沙雷菌属为革兰阴性杆菌，周鞭毛，能运动（30 ℃有动力），无芽胞，无荚膜。兼性厌氧菌。在普通琼脂平板上生长良好，菌落光滑、湿润、圆形、中心颗粒状，大多数不透明，常呈白色、粉红色或红色，直径约1.5 ～2.0ｍｍ。在液体培养基中呈混浊生长，产色素菌株表面有红色环。

哈夫尼亚菌在营养琼脂上形成直径2 ～4ｍｍ 光滑、湿润、半透明的菌落，呈灰色，边缘整齐。最适生长温度25 ～30 ℃，35 ℃时许多生化反应不规则。在鉴别培养基和选择性培养基上菌落特征与沙门菌相似。

沙雷菌属与哈夫尼亚菌属主要生物学特性见表6 －8 －22。

2．鉴定

（1）与相关菌属的主要生物学特性鉴别：见表6 －8 －25。

（2）沙雷菌属内种间主要生物学特性鉴别：见表6 －8 －34。

表6 －8 －34　沙雷菌属内种间主要生物学特性鉴别

菌种	吲哚	丙二酸盐	赖氨酸	鸟氨酸	阿拉伯糖	山梨醇	卫矛醇	侧金盏花醇	灵菌红素
粘质沙雷菌	－	－	＋	＋	－	＋	－	v	＋
液化沙雷菌	－	－	＋	＋	＋	＋	－	－	－
普城沙雷菌	－	－	－	－	＋	v	－	－	v
深红沙雷菌	－	＋	v	－	＋	－	－	＋	＋
芳香沙雷菌	＋	－	＋	v	＋	＋	－	v	－
无花果沙雷菌	－	－	－	－	＋	＋	－	－	－
泉居沙雷菌	－	(＋)	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－
嗜昆虫沙雷菌	－	－	－	－	－	－	－	＋	－

注：＋ 表示90 %以上的菌株阳性；－ 表示90 %以上的菌株阴性；(＋) 表示75.0 %～89.9 %菌株阳性；v 表示25.1 %～74.9 %菌株阳性

蜂房哈夫尼亚菌与蜂房哈夫尼菌生物1 群的区别：前者可在KCN 培养基中生长，发酵葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、麦芽糖和木糖等，而后者均阴性。

九、变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属

变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属等均为人肠道内寄居的正常菌群。在一定条件下能引起各种感染，亦是医院感染的常见条件致病菌。

变形杆菌属包括4 个种，普罗威登斯菌属有5 个种，摩根菌属有1 个种和1 个生物群。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，两端钝圆，有明显的多形性，在一定条件下可形成丝状或球形。周鞭毛，运动活泼，无荚膜和芽胞。需氧或兼性厌氧。营养要求不高，在普通营养琼脂和血琼脂平板上均可生长。生长温度10 ～43 ℃。变形杆菌属大多数菌株在营养琼脂上呈迁徙蔓延生长，遮盖琼脂表面。在琼脂中加入1g/L 苯酚、4 %乙醇、4g/L 硼酸、0.1g/L 叠氮钠或琼脂浓度增至50g/L ，可抑制其蔓延生长。普罗威登斯菌属和摩根菌属无此迁徙生长现象。变形杆菌属在肠道选择培养基上形成不发酵乳糖菌落，在SS 琼脂平板上产硫化氢者有黑色中心，在液体培养基中呈均匀混浊生长。

3 个菌属主要生物学特性见表6 －8 －22 。共同特征是苯丙氨酸脱氨酶试验为阳性，乳糖试验阴性。除普罗威登斯菌属某些种或株外，大部分菌株能迅速分解尿素。

2．鉴定

(1) 属间主要生物学特性鉴别：见表6 －8 －24 。

(2) 变形杆菌属和普罗威登斯菌属内种间主要生物学特性鉴别：见表6 －8 －35 和表6 －8 －36 。

表6 －8 －35　变形杆菌属内种间的主要生物学特性鉴别

菌种	吲哚	鸟氨酸	麦芽糖	D －木糖
普通变形杆菌	＋	－	＋	＋
奇异变形杆菌	－	＋	－	＋
潘尼变形杆菌	－	－	＋	＋
产粘变形杆菌	－	－	＋	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性

表6 －8 －36　普罗威登斯菌属内种间主要生物学特性鉴别

菌种	吲哚	尿素	枸橼酸盐	侧金盏花醇	阿拉伯醇	肌醇	甘露醇	半乳糖	鼠李糖	蕈糖
产碱普罗威登斯菌	＋	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－
斯图普罗威登斯菌	＋	－/＋	＋	－	－	＋	－	＋	－	＋
雷极普罗威登斯菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋/－
拉氏普罗威登斯菌	＋	－	－/＋	－	－	－	－	＋	－	－
海氏普罗威登斯菌	－	－	－	＋	＋	＋/－	－	＋	＋	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；＋/－表示大部分（90 %以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－/＋表示大部分阴性（90 %以下）阴性，少数菌株阳性

摩根摩根菌与摩根摩根菌生物1 群的区别：前者动力试验阳性、赖氨酸脱羧酶试验阴性，而后者是动力试验阴性、赖氨酸脱羧酶试验阳性。

十、耶尔森菌属

耶尔森菌属现有11 个种，其中最重要的是鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌3 种。鼠疫耶尔森菌是烈性传染病鼠疫的病原菌，健康人与啮齿类感染动物或人接触，或通过鼠蚤叮咬而受到感染。小肠结肠炎耶尔森菌在临床可引起胃肠炎、菌血症、腹膜炎、胆囊炎、内脏脓肿和肠系膜淋巴腺炎等。假结核耶尔森菌可感染啮齿类动物，亦可引起人类肠系膜淋巴腺炎和严重败血症。

1．生物学特性

革兰阴性短小杆菌，大小（0.5～0.8）μm ×（1.0～3.0）μm，培养3d 以上或35 ℃培养呈多形性，美蓝染色可显示两端浓染，无芽胞，无荚膜。鼠疫耶尔森菌无鞭毛，其他菌种在37 ℃无动力，30 ℃以下培养具周鞭毛，能运动。新分离菌株常需几次传代后才能运动。

需氧或兼性厌氧。在普通琼脂和SS 琼脂培养基上均能生长。虽4～40 ℃均能生长，但只有在20～28 ℃才能表现其特性。最适生长pH7.2～7.4。鼠疫耶尔森菌在营养琼脂上30～37 ℃培养24h，形成肉眼可见的小菌落（直径0.1㎜）；48h 后形成圆形、中央凸起、边缘整齐、灰到灰白色的颗粒状菌落，直径1～1.5㎜。28～30 ℃培养的菌落，表面干燥，易刮取和乳化；而在37 ℃培养的菌落，表面湿润、粘稠、不易刮取和乳化。小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌在营养琼脂上菌落相似，25 ℃培养24h，形成圆形、凸起、光滑、湿润、边缘整齐、无色无特殊气味、直径0.3～0.6㎜ 菌落，48h 菌落直径达0.8～1.0㎜ 的菌落。其他菌种在25～37 ℃培养24h，菌落直径1.0～1.5㎜，圆形、光滑、边缘不整齐；48h 菌落直径达2.0～3.0㎜，中心凸起，边缘整齐。小肠结肠炎耶尔森菌在SS 琼脂培养基上培养48h 后，形成直径0.4～0.8㎜、圆形、湿润、光滑、扁平、半透明、无色或略带淡桔色的菌落。

在麦康凯琼脂上，鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌生长不定，其他菌种生长良好。小肠结肠炎耶尔森菌较其他肠道致病菌生长慢，菌落小，25 ℃培养24h 菌落直径0.2～0.3㎜，48h 菌落直径为0.5～0.7㎜。

在液体培养基中，鼠疫耶尔森菌在其表面易形成白色薄膜，此菌膜逐日增厚，并紧贴管壁向下呈白色环状，底部絮状，肉汤透明。小肠结肠炎耶尔森菌在液体培养基中混浊生长，假结核耶尔森菌光滑型在肉汤中呈混浊生长，粗糙型呈沉淀生长。

耶尔森菌属在37 ℃生化反应结果不定，在28～29 ℃孵育结果稳定。氧化酶试验阴性，触酶试验阳性，除少数特殊生物型外，硝酸盐还原试验阳性。发酵葡萄糖、麦芽糖、甘露醇产酸不产气或产生少量气体，乳糖发酵试验大多数菌株阴性，而β－半乳糖苷酶试验阳性。硫化氢、苯丙氨酸脱氨酶、精氨酸水解试验阴性，尿素酶试验大部分阳

性（除外鼠疫耶尔森菌和鲁氏耶尔森菌）。

鼠疫耶尔森菌生化反应不活泼，不分解蛋白质和尿素，不产生吲哚和硫化氢，不液化明胶，葡萄糖酸盐试验阴性。不分解乳糖和蔗糖。缓慢分解葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、水杨素（4～14d）产酸产气。

小肠结肠炎耶尔森菌生化反应不稳定，绝大多数菌株不发酵乳糖、阿拉伯糖、水杨素、鼠李糖和七叶苷，能分解葡萄糖、蔗糖产酸产气。硫化氢试验阴性，尿素酶试验阳性，V－P 试验25℃阳性而37℃阴性。吲哚试验阴性或阳性，鸟氨酸脱羧酶试验阳性，而赖氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶试验阴性。

小肠结肠炎耶尔森菌O 抗原近60 种、K 抗原6 种、H 抗原19 种，血清分型主要靠O 抗原。引起人类腹泻的血清型主要是O_9，其次为$O_{3,4,5,8}$。O_9 与布鲁氏菌抗原呈明显交叉反应。此外，本菌的多种抗原与大肠埃希菌的多种O 抗原相互交叉，个别O 抗原与志贺菌、沙门菌O 抗原交叉。目前认为鼠疫耶尔森菌比较重要的抗原有3 种。

（1）F－1 抗原：亦称荚膜抗原，此抗原在37℃产生，是一种不耐热的糖蛋白，加热至100℃15min 即失去免疫原性，具有特异性，现作为主要诊断指标。

（2）VW 抗原：为菌体表面抗原，V 抗原为蛋白质，对豚鼠有免疫保护作用；W 抗原为类脂蛋白，对豚鼠无保护作用。

（3）T 抗原：即鼠毒素，对小白鼠、大白鼠有剧毒，对家兔、豚鼠、猴的毒性较低，不耐热，经0.2％甲醛37℃24h 处理后成类毒素，有较好的免疫原性。

假结核耶尔森菌有22 个O 抗原，5 个H 抗原（a～e）。O_1 抗原可存在于各血清型的R 型菌株中，鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌、福氏志贺菌、宋内志贺菌及大肠埃希菌均有此抗原。O_5 和O_9 分别见于B 群和D 群志贺菌中。由O_2～O_{22} 中的抗原交叉组成8 个血清群，其中血清群1、4、5 又分成a、b 两个亚群，血清群2 分为a、b、c3 个亚群。

2．鉴定

鼠疫耶尔森菌

在我国传染病防治法中规定由鼠疫耶尔森菌引起的鼠疫是甲类传染病，死亡率较高。本菌可以通过多种途径如呼吸道、皮肤粘膜等感染，工作人员必须特殊防护和严格执行安全制度和操作规程。

（1）标本采集：根据不同病例，采集不同标本，肺型鼠疫取痰、血液；腺鼠疫取淋巴结穿刺液、血液，人或动物尸体的肝、脾、肺和心等。

（2）分离培养与鉴定：将标本接种血平板，血液应增菌后再移种血平板，28～30℃培养24～48h。根据培养特性、生化反应、血清学分型及动物接种进行鉴定。由于临床

微生物学实验室平时很少备有诊断血清和噬菌体，缺乏系统鉴定条件，因此，可结合流行病学初步诊断。若怀疑鼠疫耶尔森菌感染时应按传染病防治法有关要求处理。耶尔森菌种间鉴别见表6－8－37。

小肠结肠炎耶尔森菌

1）标本采集：本菌在室温下易死亡，采取标本后立即送检或冷藏。粪便标本除直接划线接种平板分离培养外，为提高检出率，可选用冷增菌培养。按1∶9比例接种粪便于pH7.4～7.60.067mol/L磷酸盐缓冲液或改良磷酸盐缓冲液中，置0～6℃培养2周，分别在第7、10、14d分离培养。①水样品：直接取100～500ml水放入无菌容器中，加入10倍浓缩的葡萄糖肉汤溴甲酚紫液10～50ml，置0～6℃培养。逐日观察，发现指示剂变色时，立即分离。②食品和组织：用无菌刀将标本切碎或在无菌乳钵内加少量增菌液将其研成匀浆，再按粪便增菌方法处理。③血液：可按一般血培养增菌，在35℃培养1～2周。对可疑败血症患者，应同时采双份血培养标本，分别置25℃和35℃培养，并在第2、7、10、14d移种。④各种穿刺液和分泌物：同时接种两个平板，分别置25℃和35℃培养24～48h后观察。接种1个平板时，先置35℃培养24h再转25℃培养24～48h后观察。

2）分离培养与鉴定：分离培养基可选用血、SS和麦康凯琼脂平板等。25℃培养24～48h。挑取可疑菌落接种双糖铁琼脂，再于25℃培养24h，选择K/A或K/AG、不产硫化氢者，继续做生化反应进行菌株鉴定，再结合诊断血清的凝集试验结果加以确定。与其他耶尔森菌鉴别见表6－8－37。

表6－8－37　耶尔森菌属常见菌种的主要生化特性

菌种	吲哚	VP 25℃	枸橼酸盐 25℃	动力 25℃	尿素酶	苯丙氨酸	赖氨酸	鸟氨酸	ONPG	蔗糖	鼠李糖	山梨醇	密二糖
鼠疫耶尔森菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
假结核耶尔森菌	－	－	－	＋	＋	－	－	－	＋	－	＋	－	＋
小肠结肠炎耶尔森菌	v	＋	－	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	－	＋	－
中间耶尔森菌	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋
弗氏耶尔森菌	＋	＋	v	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－
克氏耶尔森菌	v	－	－	＋	＋	－	－	＋	＋	－	－	＋	－
鲁氏耶尔森菌	－	－	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	－	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v表示不定

假结核耶尔森菌

形态、培养特性、生化反应及抗原性与鼠疫耶尔森菌较相似，两者主要区别在于前者25℃有动力，尿素酶、密二糖和鼠李糖等试验阳性，而后者阴性，见表6－8－37。

十一、其他菌属

布特维西菌属（Budvicia）：仅有水生布特维西菌1 种，该菌硫化氢试验阳性，发酵甘露醇，其他主要生物学特性见表6 —8 —22 。

巴提奥杆菌属（Buttiauxella）：目前有7 个种，即B.agrestis、B.brennerae、B.ferragutiae、B.gaviniae、B.izardi、Bnoackiae 和B.warmboldiae。生化反应与克吕沃菌属相似，主要分布在水、土壤和软体动物。

西地西菌属（Cedecea）：与沙雷菌属相似，两者的主要区别是本属菌不产生DNA 酶和明胶酶，种间的主要生物学特性鉴别见表6 —8 —38 。

表6 —8 —38　西地西菌属种间的主要生物学特性鉴别

菌种	鸟氨酸	发酵					
		蔗糖	D －山梨醇	棉子糖	D －木糖	蜜二糖	丙酸盐
戴氏西地西菌	＋	＋	－	－	＋	－	＋
拉氏西地西菌	－	－	－	－	－	－	＋
奈氏西地西菌	－	＋	＋	－	＋	－	＋
西地西菌3	－	v	－	＋	＋	＋	－
西地西菌5	v	＋	＋	＋	＋	＋	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；v 表示不定

爱文菌属（Ewingella）：仅有美洲爱文菌1 种。DNA 酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶和脂酶试验均阴性，不发酵L －阿拉伯糖、蜜二糖、棉子糖、D －山梨醇和蔗糖等，分解葡萄糖产酸不产气，VP 试验阳性。

克吕沃菌属（Kluyvera）：包括4 个种，即抗坏血酸克吕沃菌、栖冷克吕沃菌、K.cochleae 和K.georgiana。主要引起机会感染。与枸橼酸杆菌、聚团多源菌、大肠埃希菌某些特征相似，可用丙二酸盐、枸橼酸盐、鸟氨酸脱羧酶、棉子糖发酵等试验与前3 种细菌区别。与巴提奥杆菌属大多数表型特征相同，其鉴别见表6 —8 —39 。

表6 —8 —39　克吕沃菌与巴提奥杆菌的主要生物学特性鉴别

菌种	吲哚	赖氨酸脱羧酶	抗坏血酸试验	蔗糖	4 ℃生长（4d）
抗坏血酸克吕沃菌	＋	＋	＋	－	＋
栖冷克吕沃菌	(＋)	v	－	＋	＋
乡间巴提奥杆菌	－	－	－	－	＋

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；（＋）表示75.0 %～899 %阳性；v 表示不定

莱克勒菌属（Leclercia）：仅有不脱羧莱克勒菌1 种（曾命名为不脱羧埃希菌、肠道

菌群41、聚团肠杆菌C_3生物群）。多数菌株产黄色素，主要特性是不具有脱羧和脱氨基酶。临床可从包括血、痰、尿、粪和创伤分泌物以及食品、水和外环境等标本中分离出该菌。与相关菌属主要生物学特性鉴别见表6－8－22。

默勒菌属（Moellerella）：仅有威斯康星默勒菌1种。在麦康凯和伊红美蓝平板上菌落形态与大肠埃希菌相似。与大肠埃希菌及其他肠杆菌科细菌区别见表6－8－22。

勒米诺菌属（Leminorella）：有格林蒙勒米诺菌和里查德勒米诺菌2种。硫化氢试验均阳性，通过甲基红、枸橼酸盐和卫矛醇等试验可将格林蒙勒米诺菌与里查德勒米诺菌区别开，前者3种试验均阳性，后者均阴性。

布拉格茵属（Bragia）：仅有泉居布拉格菌1种。最初分离自水源。该菌产硫化氢，不发酵卫矛醇、L－阿拉伯糖和木糖，主要生物学特性见表6－8－22。

拉恩菌属（Rahnella）：仅有水拉恩菌1种。大多数菌种分离自淡水，也可从骨髓移植患者的血液和肾移植患者的尿液中分离出该菌。菌株生物学特性见表6－8－22。

塔特姆菌属（Tatumella）：仅有痰塔特姆菌1种，大多数菌株从呼吸道标本中分离出，少数分离自血液。该菌生化反应不活泼，36℃无动力，发酵D－葡萄糖产酸不产气，能发酵蔗糖、蕈糖、甘露糖产酸；少数菌株发酵水杨素、棉子糖、密二糖产酸，苯丙氨酸脱氨酶试验阳性。

特布尔西菌属（Trabulsiella）：仅有关岛特布尔西菌1种（曾命名为“肠道菌群90”）。生化特性与沙门菌相似，主要生物学特性见表6－8－22。

致病杆菌属（Xenorhabdus）：有2种，即嗜线虫致病杆菌和发光致病杆菌。最适生长温度为25℃，36℃时生长不良甚至完全不生长。在25℃营养琼脂平板上培养，可产生黄色、橙色、棕色或红色色素。生化反应不活泼，发酵葡萄糖产酸弱或迟缓，对其他糖类不发酵或产酸量极少，硝酸盐还原试验阴性。发光致病杆菌等在暗处可产生弱的生物荧光。种间主要生物学特性区别见表6－8－40。

表6－8－40　致病杆菌属内种间主要生物学特性鉴别

菌种	生物发光	触酶	硝酸盐还原	黄色素
发光致病杆菌DNA群5	＋	＋	－	＋
发光致病杆菌	＋	＋	－	v
嗜线虫致病杆菌	－	－	(－)	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v表示25.1％～74.9％菌株阳性；(－)表示10.1％～25.0％菌株阳性

约克纳菌属（Yokenel）：仅有雷吉斯伯约克纳菌1种（曾命名为“肠杆菌45群”和特氏克泽菌），生物学特性与蜂房哈夫尼亚菌很相似，但大部分雷吉斯伯约克纳菌株发

酵蜜二糖，不发酵甘油，V —P 试验阴性，主要生物学特性见表6 —8 —22 。已从呼吸道、伤口、尿和粪便标本中分离出该菌。

第五节　弧菌科

一、弧菌属

弧菌属归属弧菌科，目前有30 多种，与人类疾病有关的菌种有12 个。霍乱弧菌是烈性传染病霍乱的病原菌。霍乱的传播途径主要是通过污染的水源或食物。一般经口摄入细菌2 ～3d 后，病菌粘附于小肠粘膜，迅速繁殖，并产生大量的肠毒素导致感染者腹泻及呕吐，进而造成严重失水、微循环衰竭，最终可因肾功能衰竭、休克而死亡。及时用抗生素治疗则可缩短病程。霍乱可致暴发流行，古典型霍乱弧菌所致疾病较El —tor 型严重。而非O —1 群霍乱弧菌通常仅引起胃肠炎而并不会导致霍乱或严重的流行。

1．生物学特性

革兰阴性，弧形或逗点状，极端1 条或多条鞭毛，运动活泼。直接用患者米泔水样粪便作涂片，可见弧菌呈“鱼群”样排列。兼性厌氧。所有菌种能生长于20 ℃，大多数菌种能生长于30 ℃，最适温度为37 ℃，耐碱不耐酸，在pH8.8 ～9.0 碱性蛋白胨水中生长良好，6 ～8h 培养可在液体表面形成菌膜，液体均匀浑浊；在含亚碲酸钾平板上培养18 ～24h 可还原亚碲酸钾成金属蹄，菌落中心呈灰黑色。发酵葡萄糖及其他碳水化合物，产酸不产气，氧化酶试验阳性。大多数菌株对O／129 敏感，钠离子能促进其生长，并为多数菌生长所必需。

2．鉴定

（1） 与气单胞菌属和邻单胞菌属的主要生物学特性鉴别见表6 —8 —41 。

（2） 弧菌属中12 个临床常见菌种及其所属的6 个群的主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —42 。

（3）12 种致病性弧菌的主要生物学特性鉴别：见表6 —8 —43 。

（4） 霍乱弧菌的分群、分型：霍乱弧菌具耐热的O 抗原和不耐热的H 抗原。据O 抗原的特异性，可将霍乱弧菌分为155 个血清群。首先依据是否与O_1 抗血清凝集，分O_1 群霍乱弧菌与非O_1 群霍乱弧菌。群霍乱弧菌的菌体抗原由A 、B 、C3 种抗原成分组成，A 为群特异抗原，B 、C 为型特异抗原。含A 、C 抗原者为稻叶血清型，含A 、B 抗原者为小川血清型，含A 、B 、C 抗原者为彦岛血清型。根据生物学特性不同将霍乱弧菌分为古典生物型和El —tor 生物型，其生物学特性见表6 —8 —44 。

表6－8－41　弧菌科各菌属的主要生物学特性鉴别

菌属	甘露醇	精氨酸	鸟氨酸	嗜盐性	0/129 敏感性
弧菌属	+/−	+/−	+/−	+/−	S
气单胞菌属	+	+/−	−	−	R
邻单胞菌属	−	+	+	−	S

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以下的菌株阴性；+/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；R 表示耐药；S 表示敏感

表6－8－42　弧菌属的6 群各菌种的主要生物学特性鉴别

试验	1 群		2 群	3 群	4 群	5 群		6 群				
	霍乱弧菌	拟态弧菌	麦氏弧菌	辛辛那提弧菌	霍利斯弧菌	海鱼弧菌	河弧菌	弗尼斯弧菌	副溶血弧菌	致伤弧菌	沙鱼弧菌	
不含氯化钠培养基	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
含10g/L 氯化钠培养基	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶			−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原			−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
精氨酸双水解酶			+	−	+	+	+	−	−	−	−	
赖氨酸脱羧酶				−				+	+	+	+	
鸟氨酸脱羧酶				−								
肌醇	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；口表示关键性试验

表6－8－43　致病性弧菌的主要生物学特性鉴别

试验	霍乱弧菌	拟态弧菌	麦氏弧菌	霍利斯弧菌	海鱼弧菌	河弧菌	弗尼斯弧菌溶藻弧菌	溶藻弧菌	副溶血弧菌	致伤弧菌	辛辛那提弧菌	沙鱼弧菌
氧化酶	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产气	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
麦芽糖	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	+	−
水杨苷	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
蔗糖	+	−	+	+	−	+	+	+	−	−	+	−
ONPG	+	+	+/−	−	−	+/−	+/−	−	−	+/−	+/−	−
硝酸盐还原	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+
枸橼酸盐	+	+	+/−	−	−	+	+	−	−	+/−	+/−	−
不含氯化钠培养基	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
含10g/L 氯化钠培养基	−	−	+/−	−	−	+/−	+/−	+	+/−	−	+/−	−
精氨酸（含10g/L 氯化钠培养基）	−	−	+/−	−	+	+	+	−	−	−	−	−
赖氨酸（含10g/L 氯化钠培养基）	+	+	+/−	−	+/−	−	−	+	+	+	+/−	+
鸟氨酸（含10g/L 氯化钠培养基）	+	+	−	−	−	−	−	+/−	+	d	−	−
0/129 敏感	+	+	+	+/−	+	+/−	−	+/−	+/−	+	+/−	+

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；d 表示不定

表6－8－44　不同生物型霍乱弧菌的生物学特征

型别	VP 试验	溶血（羊红细胞）	血凝（鸡红细胞）	多粘菌素B（50U/片）	噬菌体Ⅳ	噬菌体Ⅴ
古典生物型	－	－	－	S	＋	－
El－tor 生物型	＋	＋	＋	R	－	＋

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；R 表示耐药；S 表示敏感

4）$O_{1}39$ 型霍乱弧菌：1992 年10 月在印度发生的一起由非O_{1} 群霍乱弧菌所致的霍乱流行，由于该菌不属已知的138 种血清型中任一种，故命名为$O_{1}39$ 型霍乱弧菌。其生物学特性符合霍乱弧菌，绵羊红细胞溶血反应不定，抗O/129、抗多粘菌素B（50U/片）和复方新诺明，对Mukherjea Ⅳ型和Ⅴ型噬菌体不敏感。

二、气单胞菌属

气单胞菌感染一般与直接饮用被污染的水源有关。引起的肠道内感染主要为腹泻，而引起的肠道外感染主要为菌血症和伤口感染。也会导致蜂窝组织炎、泌尿道感染、中耳炎、腹膜炎、胆囊炎及溺水后的支气管肺炎等。人类感染气单胞菌常为散发流行。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，单个、成对或短链状，无芽胞，无荚膜，具极生鞭毛、穿梭样动力。兼性厌。氧。普通培养基上可生长，在血琼脂平板上于35℃培养24～48h，形成大而扁平、灰白色的β－溶血性菌落，亦有不溶血菌株，在麦康凯培养基上形成扁平无色大菌落。氧化酶、触酶试验阳性，发酵葡萄糖产酸产气或不产气，不发酵肌醇，抗O/129，含60g/L 氯化钠培养基中不生长。

2．鉴定

1）与其他科鉴别：与肠杆菌科的区别是气单胞菌氧化酶试验阳性；与非发酵菌的区别是气单胞菌能发酵葡萄糖。

2）与弧菌属、邻单胞菌属的区别：见表6－841。

3）本属中各菌种的鉴定：见表6－8－45。

表6－8－45　气单胞菌与邻单胞菌的主要生物学特性

菌种	靛基质	葡萄糖产气	精氨酸双水解酶	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	VP	水杨苷	七叶苷	阿拉伯糖	乳糖	蔗糖	肌醇	甘露醇	β－溶血（羊血）	O/129（10 μg/150 μg）
嗜水气单胞菌	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	＋	R/R
豚鼠气单胞菌	＋	－	＋	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	R/R
温和气单胞菌	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	－	－	＋	－	＋	＋	R/R
威隆气单胞菌	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	＋	－	＋	＋	R/R
简达气单胞菌	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	－	－	－	－	＋	＋	R/R
舒伯特气单胞菌	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋/－	R/R
脆弱气单胞菌	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋/－	R/R
类志贺邻单胞菌	＋	－	＋	＋	＋	－	＋/－	－	－	－	－	＋	－	－	S/S

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；R/R 表示10 μg/150 μg 耐药；S/S 表示10 μg/150 μg 敏感

三、邻单胞菌属

邻单胞菌属只有1 种，即类志贺邻单胞菌。类志贺邻单胞菌可引起爆发性或散发性的腹泻，也可引起肠外感染，如败血症、关节炎和骨髓炎等。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，直线型或圆型末端，极端鞭毛，运动活泼。兼性厌氧。最适宜温度35 ℃。在血琼脂平板培养18～24h 后形成直径0.5～2.0 mm、不溶血、灰白色菌落。麦康凯琼脂平板上为不发酵乳糖的无色菌落。氧化酶、触酶、靛基质试验阳性，VP 试验阴性。发酵葡萄糖及碳水化合物产酸不产气，赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶和精氨酸水解酶试验阳性。还原硝酸盐，多数菌株对O/129 敏感。含60g/L 氯化钠培养基中不生长。具肠杆菌科细菌共同抗原，某些菌株与宋内志贺菌有共同抗原，可发生交叉凝集。

2．鉴定

1）与肠杆菌科和非发酵菌的鉴别：邻单胞菌氧化酶试验阳性能发酵葡萄糖。

2）与弧菌属和气单胞菌属的主要生物学特性鉴别：见表6－8－41 和表6－8－45。

第六节　弯曲菌属和螺旋菌属

一、弯曲菌属

弯曲菌属是一类氧化酶试验阳性、有动力、微需氧、菌体弯曲的革兰阴性细菌。主要引起人类肠道内感染和各种肠道外感染。空肠弯曲菌是最常见的引起散发性肠炎的细菌之一，亦可引起肠炎暴发流行。人类的传染源常是动物源性不洁食物，如未经消毒的牛奶。胎儿弯曲菌胎儿亚种主要导致肠外感染，特别是免疫功能低下的老人或恶性肿瘤、肝硬化、心血管疾病和糖尿病患者，易感染此菌并引起菌血症、脑膜炎、亚急性心内膜炎、动脉炎和血栓静脉炎等。

1．生物学特性

革兰阴性的细小杆菌，呈弯曲螺旋形、S 形、弧形或纺锤形。菌体一端或二端有单鞭毛，长达菌体2 ～3 倍，具螺旋样动力。微需氧菌，初次分离在含5 %氧气、85 %氮气和10 %二氧化碳的环境中方能生长，传代培养在10 %二氧化碳中可生长。有些菌株在厌氧条件下生长。生长所需温度因菌种不同而异，胎儿弯曲杆菌25 ～37 ℃能生长，42 ℃不能生长。空肠弯曲菌37 ℃、42 ℃生长，25 ℃不能生长。营养要求较高，在普通培养基上不易生长，需在加血液或血清的营养丰富的布氏肉汤中、微需氧条件下方能生长。在改良弯曲菌培养基（Campy－BAP）上培养48h，形成扁平、灰色或蓝灰色菌落，具不规则边缘，并有弥散倾向；或形成圆豆状、凸起、湿润、周围粘液样菌，直径达1 ～2 mm；不溶血。

弯曲杆菌氧化酶、触酶试验阳性，还原硝酸盐，不氧化，不发酵糖类，不分解尿素，不液化明胶，VP 试验和甲基红试验阴性。

2．鉴定

弯曲菌的鉴定要点为革兰阴性，菌体弯曲或呈S 形，氧化酶试验阳性。弯曲菌属主要菌种的生物学特性鉴定见表6 －8 －46 。

二、螺旋菌属

幽门螺旋菌为慢性胃炎的致病因素之一，与消化性溃疡，尤其是十二指肠溃疡有密切关系。幽门螺旋菌长期感染也可能是引起胃癌的危险因素。

1．生物学特性

革兰阴性，菌体细长，呈螺旋形、S 形或海鸥状，菌体一端或二端有多根带鞘的鞭

毛。微需氧（5％～7％氧气）、5％～10％二氧化碳，营养要求高，最适生长温度35～37 ℃，28 ℃、43 ℃不生长。生长需一定湿度。氧化酶、触酶试验阳性。不发酵葡萄糖。快速尿素酶试验强阳性。产硫化氢，靛基质、硝酸盐还原、马尿酸水解试验阴性。

2．鉴定

（1）与弯曲菌的鉴别：螺旋菌尿素酶试验强阳性。

（2）幽门螺旋菌和雪貂螺旋菌鉴别：人类感染螺旋菌主要是幽门螺旋菌和雪貂螺旋菌，其主要生物学特性鉴别见表6－8－47。

表6－8－46　弯曲菌属主要菌种的生物学特性

菌种	触酶	马尿酸酶	脲酶	硫化氢	还原硝酸盐	最适生长温度		药敏试验结果（30 μg／片）	
						25 ℃	42 ℃	萘啶酸	头孢噻吩
空肠弯曲菌空肠亚种	＋	＋	－	－	＋	－	＋	S	R
道伊莱亚种	＋／－	＋	－	－	－	－	＋／－	S	S
大肠弯曲菌	＋	－	－	－	＋	－	＋	S	R
胎儿弯曲菌胎儿亚种	＋	－	－	－	＋	＋	－／＋	R	S
性病亚种	＋	－	－	－	＋	＋	－	R	S
鸥弯曲菌	＋	－	＋／－	－	＋	－	＋	R	R
突起弯曲菌	－／＋	－	－	－	＋	－	＋	S	S
猪弯曲菌	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	R	S
痰弯曲菌痰液变种	－	－	－	＋	＋	－	＋	S	S
牛变种	－	－	－	＋	＋	－	＋	R	S
粘液弯曲菌	－	－	－	＋	＋	－	＋	R	S
简明弯曲菌	－	－	－	＋	＋	－	＋	R	R
费氏弯曲菌	＋	－	－	－	－	－	－	S	S
嗜寒氧弯曲菌	＋	－	－	－	＋	＋	－	S	R

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数菌株（90％以下）阴性，少数菌株阳性；R 表示耐药，S 表示敏感，I 表示中介

表6－8－47　螺旋菌属主要菌种生物学特性及药敏试验结果

菌种	42 ℃生长	多根侧生鞭毛	富含氧气及10％二氧化碳生长	PSD[a]上生长	1％氨基乙酸生长	还原硝酸盐	药敏试验结果（30 μg／片）	
							萘啶酸	头孢噻吩
幽门螺旋菌	＋	＋	－	－	＋／－	＋	S	R
雪貂螺旋菌	－	－	＋	＋	－	－	S／R	S

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性；R 表示耐药；S／R 多数菌株敏感，少数菌株耐药；PSD[a] 为peptone－starch－dextrose

第七节　非发酵菌群

非发酵菌群是指一群不发酵葡萄糖、需氧或兼性厌氧的无芽胞革兰阴性杆菌。主要存在于外界环境中，其中大多数是条件致病菌。近年来，广谱抗菌药物、免疫抑制剂和抗肿瘤药物的广泛应用，导致机体微生态失调和抵抗力下降，非发酵菌引起的感染或院内感染日益增多，如败血症、呼吸系统或泌尿系统感染、伤口及皮肤感染、脑膜炎及角膜溃疡等。

该群细菌生化反应之间共性少，根据科—属—种的鉴定程序，可选用葡萄糖氧化发酵（O/F 试验）、氧化酶试验、动力、菌落色素等试验，必要时可作鞭毛染色观察。O/F 试验对非发酵菌群的鉴定非常关键，其中试验培养基中的蛋白胨浓度应为2g/L。多数非发酵菌广泛存在于自然界，培养和鉴定温度选择30 ℃为宜，动力试验应选择18～20 ℃培养温度，此温度有利于鞭毛蛋白的合成。多数非发酵菌氧化酶试验阳性。

非发酵菌的鉴定可选用试剂盒，也可用自动化仪器鉴定。

非发酵菌群属间生物学特性的主要鉴别见表6—8—48。

一、假单胞菌属

假单胞菌属在自然界如水、空气、土壤中广泛存在，也存在于人体皮肤和肠道，组成人体的正常菌群。各种原因导致机体免疫功能下降（如手术、化疗和应用激素、抗菌药物、免疫抑制剂以及慢性消耗性疾病等），尤其是烧伤病房患者、ICU 患者，最容易引起铜绿假单胞菌感染。常见有皮肤、呼吸道、泌尿道和伤口感染以及菌血症、中耳炎、心内膜炎、角膜溃疡、褥疮等；治疗可选氧哌嗪青霉素、妥布霉素、阿米卡星、环丙沙星、头孢他啶、舒普深和亚胺培南等。

1．生物学特性

革兰阴性，直或微弯杆菌，较细长，专性需氧，在普通培养基上能生长。大多数菌种有动力，有鞭毛，无荚膜和芽胞，氧化酶阳性（少数也可阴性）。

铜绿假单胞菌是临床最常见的分离菌，在血琼脂平板上35 ℃培养18～24h 后，形成大而扁平、湿润、有金属光泽、有生姜味的灰绿色或蓝绿色（产生绿脓素）的菌落（也可以产生荧光素、红脓素等），大部分形成透明溶血环。无绿脓素、荧光素的铜绿假单胞菌菌落大多为粘液状。

荧光假单胞菌的最适生长温度为25～30 ℃。部分假单胞菌属在35 ℃培养时不能生长。

铜绿假单胞菌具有O 抗原和H 抗原。应用O 抗原可对铜绿假单胞菌进行血清分型，目前可分为20 个血清型。

2．鉴定

1）假单胞菌属与其他非发酵菌属间的鉴别：见表6－8－48。

2）临床常见假单胞菌的生物学特性鉴别：见表6－8－49。

3）产荧光素的3 个假单胞菌主要生物学特性鉴别：见表6－8－50。

表6－8－48　非发酵菌群属间的主要生物学特性鉴别

菌属	氧化酶	葡萄糖O/F	动力	菌落色素	鞭毛部位
假单胞菌属	＋	O/－	＋/－	不定	端毛
黄杆菌属	＋	－/O	－	橙黄色	－
不动杆菌属	－	O/－	－	无色	－
产碱杆菌属	＋	－	＋	无色	周毛
丛毛菌属	＋	－	＋	淡黄色	丛毛
摩拉菌属	＋/－	－	－	无色	

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；O/－表示氧化葡萄糖/不发酵葡萄糖；－/O 表示不氧化葡萄糖/发酵葡萄糖；＋/－表示多数菌株（90％以下）阳性，少数菌株阴性；－/＋表示多数（90％以下）阴性，少数菌株阳性

表6－8－49　临床常见假单胞菌的主要生物学特性鉴别

菌种	葡萄糖	麦芽糖	ONPG	荧光素	绿脓素	氯化氢	精氨酸双水解酶	赖氨酸	鸟氨酸	七叶苷	明胶	乙酰胺	对多粘菌素敏感性	鞭毛数目	
铜绿假单胞菌★	＋	－/＋	－	＋/－	＋/－	＋	－	＋	－	－	－	＋/－	＋	＋	ù3
荧光假单胞菌	＋	－/＋	－	＋	－	＋	－	＋	－	－	－	＋	－	＋	>1
恶臭假单胞菌	＋	－/＋	－	＋/－	－	＋	－	＋	－	－	－	－	－	＋	>1
嗜麦芽窄食假单胞菌	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	＋	－	＋	＋	－	＋	>1
洋葱假单胞菌	＋	＋	＋/－	－	－	＋	－	－	＋	＋/－	＋/－	＋/－	＋/－	－	>1
腐败假单胞菌	＋	＋/－	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－	＋	1
斯氏假单胞菌	＋	＋	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	1
产碱假单胞菌	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	1
食酸假单胞菌	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	＋	＋/－	>1
睾丸酮假单胞菌	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋/－	>1
鼻疽假单胞菌	＋	＋	－	－	－	＋/－	－	－	－	－	－	－	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性（或发酵糖）；－表示90％以上的菌株阴性（或不发酵糖）；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性（或发酵糖），少数菌株阴性；－/＋表示多数（90％以下）阴性（或不发酵糖），少数菌株阳

性；＊铜绿假单胞菌的绿脓素鉴定，是用氯仿提取液提取色素后，加入1mol/L 盐酸溶液，呈粉红色即为绿脓素，此为铜绿假单胞菌所特有

表6－8－50　产荧光素的3 个假单胞菌的主要生物学特性鉴别

菌名	42℃生长	硝酸盐产气	明胶液化	乙酰胺水解
铜绿假单胞菌	＋	＋/－	＋/－	＋
荧光假单胞菌	－	－	＋	－
恶臭假单胞菌	－	－/＋	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－/＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性

二、窄食单胞菌属

窄食单胞菌属目前仅有嗜麦芽窄食单胞菌1 种。嗜麦芽窄食单胞菌广泛存在于自然界，常定植于人呼吸道及肠道中。该菌为条件致病菌，可引起呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎、泌尿道感染及伤口感染等。由于该菌对碳青霉烯类抗生素天然耐药，有别于其他革兰阴性杆菌。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，极端鞭毛。最适生长温度为35℃，在血琼脂平板上形成圆形、光滑、湿润、灰白色菌落，经48h 培养菌落增大呈黄色，β－溶血，有草绿色色素扩散在溶血区内，菌落旦“双圈状”或“牛眼状”。氧化酶试验阴性，葡萄糖O/F 试验为氧化型（缓慢）。分解葡萄糖、麦芽糖，不分解木糖和甘露醇，赖氨酸脱羧酶、明胶和硝酸盐还原试验均阳性，精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶、尿素酶和枸橼酸盐试验均阴性。在O/F 培养基中，该菌氧化麦芽糖能力比葡萄糖强。

2．鉴定

氧化酶试验阴性，O/F 试验为氧化型（或在双糖铁琼脂上不发酵葡萄糖），半固体动力试验呈阳性，则考虑本菌。与有关菌种的主要生物学特性鉴别见表6－8－51

表6－8－51　嗜麦芽窄食单胞菌与相关菌的主要生物特性鉴别

菌名	氧化酶	菌落颜色	动力	ONPG	DNA 酶	七叶苷	赖氨酸	鸟氨酸
洋葱假单胞菌	＋	－/淡黄	＋	＋	－	＋	＋	＋
嗜麦芽窄食单胞菌	－	淡黄	＋	＋	＋	＋	＋	－
黄杆菌属	＋	橙黄色	－	＋/－	＋	＋/－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性

三、不动杆菌属

不动杆菌属细菌为不发酵糖类、氧化酶试验阴性、动力试验阴性及硝酸盐还原试验

阴性的革兰阴性球杆菌，，属奈瑟菌科。本属为条件致病菌，广泛分布于自然界，近年来临床感染有增加的趋势。可从尿液、脓汁、分泌物、痰、咽拭子、血液和脑脊液等标本，尤其是从烧伤创面分泌物及老年性慢性支气管炎患者呼吸道标本中分离到该菌。

1．生物学特性

革兰阴性球杆菌，单个或成双排列，涂片分布均匀，革兰染色不易脱色，称之谓“浓染”，易误认为革兰阳性菌。无芽胞及鞭毛。需氧，在普通培养基上生长良好，最适温度35 ℃，有些菌株在42 ℃可生长。血琼脂平板上培养18 ～24h 可见圆形、白色、光滑、边缘整齐、直经约1.5 ～2.0㎜ 的菌落，有时可见β－溶血。

2．鉴定

该属细菌氧化酶、吲哚、硫化氢、甲基红、动力和VP 试验均阴性，不发酵葡萄糖，可利用不同的有机酸。常见不动杆菌的主要生物学特性鉴别见表6 －8 －52 。

表6 －8 －52　常见不动杆菌的主要生物学特性鉴别

菌种	35 ℃生长	硝酸盐还原	10 %乳糖	明胶液化	葡萄糖氧化	绵羊血琼脂溶血	反乌头酸盐利用	DL －4β－丙氨酸利用	氨基西酸盐利用	L －精氨酸利用	壬二酸盐利用	枸橼酸盐利用	戊二酸盐利用	L －组氨酸利用	DL 乳酸盐利用	D －苹果酸盐利用	丙二酸盐利用
醋酸钙不动杆菌	100	0	100	0	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	
鲍曼不动杆菌	100	0	0	0	95	0	99	95	100	98	90	100	100	98	100	98	98
溶血不动杆菌	100	0	100	96	52	100	52	0	100	96	0	91	0	96	0	96	0
琼氏不动杆菌	100	0	0	0	0	0	0	0	88	95	0	82	0	100	100	100	0
约翰逊不动杆菌	0	0	0	0	0	0	0	0	35	35	0	100	0	0	100	22	13
洛菲不动杆菌	100	0	0	0	0	0	0	0	40	0	100	0	0	0	100	76	0
耐放射线不动杆菌	100	0	0	0	33	0	0	100	100	100	0	100	0	100	0	100	

注：表中数值为实验菌株的阳性百分率

四、产碱杆菌属

产碱杆菌属细菌是一群有动力、专性需氧、不分解糖类的革兰阴性杆菌。本属菌在

自然界分布广泛，水和土壤中均有存在，为肠道正常菌群，是医院感染重要的条件致病菌。可从人血液、呼吸道、尿液及脑脊液等标本中分离到。粪产碱杆菌是其代表菌株。

1．生物学特性

革兰阴性短杆菌，有时呈弧形，成对或链状排列。具有周身鞭毛，多数无荚膜，需氧，营养要求不高，最适生长温度为25～35℃，能在普通培养基上生长，除木糖氧化亚种外，均不氧化葡萄糖，血琼脂平板上可形成灰色、扁平、边缘菲薄的较大菌落。在蛋白胨肉汤中产氨，并使pH 上升至8.6 以上，为本菌的特点。

氧化酶和触酶试验阳性，石蕊牛乳培养基和O/F 培养基中产碱，脲酶、靛基质、硫化氢、明胶、VP、甲基红、苯丙氨酸脱氨酶和精氨酸双水解酶试验阴性。

2．鉴定

产碱杆菌属菌具周身鞭毛，在O/F 培养基中葡萄糖产酸为木糖氧化亚种，不产酸的为其他产碱杆菌。产碱杆菌属菌种的主要生物学特性鉴别见表6－8－53。

表6－8－53　产碱杆菌属菌种的主要生物学特性鉴别

菌种	硝酸盐还原	丙二酸盐	葡萄糖酸盐	O/F	
				木糖	葡萄糖
脱硝产碱杆菌木糖氧化亚种	＋	－	－	0	0
脱硝产碱杆菌脱硝亚种	＋	＋/－	＋	－/－	－/－
粪产碱杆菌	－	＋	－	－/－	－/－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；0 表示O/F 试验氧化糖；－/－表示O/F 试验均不氧化和发酵糖

五、黄杆菌属

本属细菌存在于水、土壤、植物中，是引起医院感染的常见菌之一，常引起手术后感染或败血症等。脑膜败血黄杆菌可引起新生儿脑膜炎，且死亡率高。近几年黄杆菌属感染有增加的趋势，对广谱抗菌药物耐药程度高，但对利福平、红霉素、氯林可霉素及复方新诺明等抗菌药物仍较敏感。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，无动力，无荚膜和芽胞。菌落圆形光滑、透明或半透明、亮黄色。脑膜炎败血黄杆菌的菌落直径为1.0～1.5㎜，其他为2.0～3.0㎜。在固体培养基上大多数菌株产生淡黄或橙黄色脂溶性色素，氧化酶、DNA 酶和β－半乳糖苷酶试验大多阳性。营养要求不高，个别菌种培养需要添加辅助生长因子。在普通营养琼脂和麦康凯琼

脂平板上生长，血琼脂平板上不溶血，最适生长温度为25～30℃，需氧。

2．鉴定

黄杆菌属主要菌种间的生物学特性鉴别见表6－8－54。黄杆菌属细菌做吲哚试验时，细菌应培养48h后用二甲苯提取，再加入吲哚试剂。通常微弱发酵葡萄糖，产酸量少且时间长。大多数菌水解七叶苷，液化明胶。

表6－8－54　黄杆菌属主要菌种的生物学特性鉴别

菌种	O/F						尿素酶	吲哚	明胶液化	七叶苷水解
	葡萄糖	木糖	甘露醇	蔗糖	乳糖	麦芽糖				
脑膜炎败血黄杆菌	＋	－	＋	－	－	＋	－	＋	＋	＋
短小黄杆菌	＋	－	－	－	－	＋	－	＋	＋	－
芳香黄杆菌	－	－	－	－	－	－	＋	－	＋	－
嗜糖黄杆菌	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	－	－	＋
嗜醇黄杆菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	＋

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性

六、莫拉菌属

莫拉菌属分为布兰汉亚属和莫拉亚属2个亚属。本属菌为条件致病菌，引起人类肺炎、脑脓肿或脑膜炎、心内膜炎、败血症、中耳炎、眼结膜炎等。

1．生物学特性

莫拉亚属为革兰阴性球杆菌，有时可呈多形性，成双或短链状。无芽胞和鞭毛，但有些菌株有荚膜。需氧，多数菌在普通培养基上能生长，少数菌株需在培养基中加入兔血清才能生长，如缺陷莫拉菌不能在SS琼脂平板上生长。在血琼脂平板上生长成光滑的直径为0.1～0.5㎜半透明菌落，48h后菌落直径可达1.0㎜，不溶血。其特点是氧化酶和触酶试验阳性，不分解任何糖类，不产生吲哚，在65g/L氯化钠肉汤中不生长。

2．鉴定

莫拉菌属的主要生物学特性鉴别见表6－8－55。

表6－8－55　莫拉菌属的主要生物学特性鉴别

表6－8－55　莫拉菌属的主要生物学特性鉴别

菌种	动力	触酶	生长 麦康凯培养基	生长 42℃	生长 基础培养基醋酸盐	尿素酶	苯丙氨酸脱氨酶	明胶液化	硝酸盐还原	氮气产生	DNA酶
缺陷莫拉菌	－	＋	－	－	－	－	D	d	＋	－	－
非液化莫拉菌	－	＋	－	v	－	－	－	－	＋	－	－
犬莫拉菌	－	＋	＋	／	＋	－	－	－	＋	v	＋
林肯莫拉菌	－	＋	－	－	／	－	／	－	－	v	－
奥斯陆莫拉菌	－	＋	v	D	＋	－	－	－	v	－	－
亚特兰大莫拉菌	－	＋	＋	v	v	－	－	－	－	v	－
苯丙酮酸莫拉菌	－	＋	v	v	v	＋	＋	－	v	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；D 表示数据分散；／表示无统计资料；v 表示不定；d 表示迟缓反应

第八节　革兰阴性小杆菌

革兰阴性小杆菌指的是一些无动力、无芽胞、菌体小的革兰阴性球杆菌，其对营养要求苛刻。主要包括嗜血杆菌属、布鲁菌属、弗朗西斯菌属、鲍特菌属、巴斯德菌属和军团菌属。

一、嗜血杆菌属

嗜血杆菌属与医学有关的有流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌和杜克嗜血杆菌等8种。流感嗜血杆菌为上呼吸道的正常菌群，有荚膜的b 型株很少，可引起人急性咽炎、喉炎、气管炎、肺炎、中耳炎、脑膜炎、心包炎以及骨髓炎等。有荚膜的流感嗜血杆菌主要引起全身性感染，无荚膜的菌株主要引起局部的上呼吸道邻近部位感染。

副流感嗜血杆菌、嗜沫嗜血杆菌、溶血性嗜血杆菌和副溶血性嗜血杆菌栖居人的上呼吸道，可引起呼吸道感染、心内膜炎、菌血症、败血症和脑脓肿等。副嗜沫嗜血杆菌可引起亚急性心内膜炎，其可从尿液及脓液中分离到。杜克嗜血杆菌可引起软性下疳，有时与淋病奈瑟菌同时感染。

1．生物学特性

嗜血杆菌属营养要求较高，在培养基中必须加入新鲜血液（含有X 和V 因子）才能生长，因而名嗜血杆菌。属内许多流感嗜血杆菌株有荚膜（多见于b 血清型），并有较强的毒力。

需氧或兼性厌氧，接种万古霉素巧克力琼脂，初次培养于5％～10％二氧化碳环境中生长良好，可见直径0.5～1.0㎜ 小菌落，灰白色、圆形、光滑、半透明。流感嗜血杆菌荚膜株培养18～24h 后可形成较大、黏稠的菌落，流感嗜血杆菌与产生V 因子的金黄色葡萄球菌同时培养时可见卫星生长现象。血琼脂平板上生长不良。

2．鉴定

凡血琼脂平板上发育迟缓，经35℃24h 培养，菌落仅针尖大小，氧化酶试验阳性，涂片为革兰阴性卵圆形或点状小杆菌，普通琼脂平板上不生长，首先考虑嗜血杆菌属。嗜血杆菌属菌种主要生物学特性鉴别见表6－8－56。

表6－8－56　嗜血杆菌属菌种主要生物学特性鉴别

菌种	生长因子		需二氧化碳生长	溶血性	氧化酶	触酶	吲哚	尿素	水解脱羧酶			硝酸盐还原	糖发酵							英膜
	X 因子	V 因子							鸟氨酸	精氨酸	赖氨酸		葡萄糖	乳糖	木糖	甘露醇	蔗糖	果糖	山梨醇	
流感嗜血杆菌	＋	＋	＋	＋	v	v	v	－	v	＋	＋	－	＋	＋／－						
副流感嗜血杆菌	－	＋	＋	v	－	v	v	－	v	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋／－				
溶血嗜血杆菌	＋	＋	－	＋	＋	＋	v	＋	－	－	－	＋	＋	－	v	－	－	v	－	－
副溶血嗜血杆菌	－	＋	－	＋	＋	v	－	＋	v	－	－	＋	＋	－	－	－	＋	＋	－	－
嗜泡沫嗜血杆菌	＋	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	－
副嗜泡沫嗜血杆菌	－	＋	＋	－	＋	－	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	－
杜克嗜血杆菌	＋	－	－	v	＋	－	－	－	－	－	－	＋	v	－	－	－	－	－	－	－
埃及嗜血杆菌	＋	＋	－	－	＋	＋	－	＋	－	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；v 表示不定

根据吲哚、尿素酶及鸟氨酸脱羧酶试验结果可将流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌分为8 个生物型。见表6－8－57。

二、布鲁菌属

布鲁菌属是一类革兰阴性短小杆菌，包括6 个种。布鲁菌病为人畜共患病，可以通过人的皮肤、呼吸道、消化道进入人体而感染。感染人群常与皮毛及食品加工工作有关，临床表现为波浪热。

表6 —8 —57　流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌各生物型生物学特点

菌 种	生物型	吲哚	尿素酶	鸟氨酸脱羧酶
流感嗜血杆菌	Ⅰ	＋	＋	＋
	Ⅱ	＋	＋	－
	Ⅲ	－	＋	－
	Ⅳ	－	＋	＋
	Ⅴ	＋	－	＋
	Ⅵ	－	－	＋
	Ⅶ	＋	－	－
	Ⅷ	－	－	－
副流感嗜血杆菌	Ⅰ	－	－	＋
	Ⅱ	－	＋	＋
	Ⅲ	－	＋	－
	Ⅳ	＋	＋	＋
	Ⅴ	－	－	－
	Ⅵ	＋	－	－
	Ⅶ	＋	＋	－
	Ⅷ	＋	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的茵株阴性

1．生物学特性

革兰阴性小球杆菌，无动力，无芽胞和荚膜。革兰染色复染时间应适当延长，需要3㎜in。需氧，牛布鲁菌在初分离时需5％～10％二氧化碳，培养基中宜含硫胺、烟酸和生物素等。最适生长温度为35℃。在血琼脂平板上培养5～7d 可形成微小、灰色、凸起的菌落，不溶血。除绵羊和犬布鲁菌菌落为粗糙型外，其他为光滑型，在液体培养基中可形成轻度混浊并有沉淀。

2．鉴定

急性期感染血液培养阳性率较高，骨髓、尿液、关节液、乳汁、脑脊液等也能分离

到布鲁菌。该菌能利用葡萄糖，但产酸量少，吲哚、甲基红、VP 试验阴性。不分解甘露醇，尿素酶试验和硝酸盐还原试验阳性，产生硫化氢。布鲁菌属种间的主要生物学特性鉴别见表6 －8 －58 。

表6 －8 －58　布鲁菌属种间的主要生物学特性鉴别

菌种	触酶	氧化酶	糖分解			精氨酸脱羧酶	硝酸盐	尿素酶	产生硫化氢	对染料耐受	
			葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖					硫堇(40 μg)	复红(20 μg)
羊布鲁菌	＋	＋	＋	－	－	－	＋	v	－	＋	＋
牛布鲁菌	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	＋
猪布鲁菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－／＋	＋	－
森林鼠鼠布鲁菌	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	－
绵羊布鲁菌	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－／＋
犬布鲁菌	＋	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	－	＋	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；－／＋表示多数（90 %以下）菌株阴性，少数菌株阳性；v 表示不定

三、鲍特菌属

鲍特菌属是一群革兰阴性小杆菌，有7 个种。临床上以百日咳鲍特菌最为重要。百日咳鲍特菌是百日咳的病原菌，3 岁以下儿童易感。近30 年来红霉素对百日咳鲍特菌的最低抑菌浓度一直未见升高。红霉素仍被选作治疗和预防用药。其他可选用氨苄西林、阿莫西林、利福平或复方新诺明等抗菌药物。

1．生物学特性

革兰阴性小杆菌，无芽胞，有荚膜。陈旧培养物菌体可呈多形性。在液体培养基中菌体可呈短链状排列。除支气管败血鲍特菌和鸟鲍特菌外，其他菌无鞭毛。专性需氧，最适生长温度为35 ℃。百日咳鲍特菌营养要求最高，常用鲍－金（Bordet －Gengou）培养基，其中含有血液、马铃薯及甘油等。在鲍－金培养基上经2 ～3d 培养后，可形成细小、光滑、凸起、灰色的不透明露滴状菌落，菌落周围有狭窄的溶血环。菌落经多次传代后变为粗糙型。在生长过程中产生大量的脂肪酸、重金属离子、过氧化物等可影响此菌的生长，活性炭、树脂、淀粉等可以吸附脂肪酸或使抑制物失去活性而有利于细菌的生长。在Regan －Lowe 培养基（即活性炭－马血琼脂）上35 ℃培养3 ～5d 才能检出菌落。百日咳鲍特菌培养时不需二氧化碳。

2．鉴定

百日咳鲍特菌不发酵糖类，不产生硫化氢，吲哚试验、明胶液化试验，硝酸盐还原

试验和枸橼酸盐利用试验阴性。鲍特菌属菌种主要生物学特性鉴别见表6 —8 —59 。

表6 —8 —59　鲍特菌属菌种主要生物学特性鉴别

菌种	触酶	氧化酶	动力	硝酸盐还原	尿素酶	生长情况					棕色
						Regan —Lowe 琼脂	血琼脂	麦康凯琼脂	SS 琼脂	蛋白陈琼脂	
百日咳鲍特菌	+／—	+	—	—	—	3 ～6d	—	—	—	—	—
副百日咳鲍特菌	+	—	—	—	+	2 ～3d	+	+	—	+	+
支气管败血鲍特茵	+	+	+	+	+	1 ～2d	+	+	+	+	—
鸟鲍特菌	+	+	+	—	—	1 ～2d	+	+	+	±	—

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；+／－表示多数（90 %以下）菌株阳性，少数菌株阴性；±表示生长不良

四、巴斯德菌属

巴斯德菌属为革兰阴性球杆菌。与放线杆菌属相同，均为动物感染性疾病的病原菌，当人被动物咬伤或抓伤时，可感染该病原菌。主要引起肺部感染、脑膜炎、脑脓肿、腹膜炎、关节炎及伤口感染等。

1．生物学特性

革兰阴性球杆菌，菌体长1 ～2 μm ，无动力，无芽胞，有些菌株有荚膜。兼性厌氧。最适生长温度35 ℃，在含有血液的培养基上生长良好。能分解蔗糖，不液化明胶，甲基红和V —P 试验均为阴性，氧化酶和触酶试验阳性，硝酸盐还原试验阳性。

2．鉴定

巴斯德菌属主要生物学特性鉴别见表6 —8 —60 。

表6 —8 —60　巴斯德菌属和放线杆菌属主要生物学特性鉴别

菌种	L —阿拉伯糖	纤维二糖	D —乳糖	乳糖	麦芽糖	D —甘露糖	鼠李糖	D —海藻糖	D —木糖	触酶	七叶苷水解	麦康凯生长	吲哚	需要NAD	氧化酶	尿素酶
产气巴斯德菌	+／—	—	+	—／+	+	+	v	—	+	+	—	+	—／+	—	v	+
犬巴斯德菌	—	—	+	—	—	+	—	v	—／+	+	—	—	v	—	+	—
溶血巴斯德菌	+	—	+	v	+	—／+	v	—	+	+	v	+	—	—	+	—
多杀巴斯德菌	v	—	+	—	—／+	+	—	v	d	+	—	v	+／—	—	+	—
嗜肺巴斯德菌	—／+	—	+	v	v	+	v	+／—	v	+	—	v	+	—	+	+
P.downotia	—	—	+	—	+	+	+[w]	+	—	+	—	—	+	—	+	+
P.trehalosi	—	v	—	—	+	+	—	+	—	—	v	+	—	—	+	—

续表

菌种	L－阿拉伯糖	纤维二糖	D－乳糖	乳糖	麦芽糖	D－甘露糖	鼠李糖	D－海藻糖	D－木糖	触酶	七叶苷水解	麦康凯生长	吲哚	需要NAD	氧化酶	尿素酶
P.volantium	－	／	／	v	＋	／	／	＋	v	＋	／	－	－	＋	＋	－
P.bettyae	－	－	－	－	v	v	－	－	－	v	－	v	－	－	－	－
口腔巴斯德菌	－	－	＋	－	－	＋	－	＋	－	＋	－	－	＋w	－	＋	－
马放线杆菌	－／＋	－	v	＋	＋	＋	＋	＋	＋	v	－	＋	－	－	＋／－	＋
人放线杆菌	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	v	－	－	－	＋	＋
猪放线杆菌	＋／－	＋	＋／－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	＋／－	＋
脲放线杆菌	－	－	－	－	＋／－	v	－	－	－	v	－	v	－	－	＋／－	＋

注：＋表示90％以上的酉株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性；v 表示不定；／表 示未进行试验；w 表示弱反应

五、弗朗西斯菌属

弗朗西斯菌属只有1 个种，即土拉弗朗西斯菌，是引起土拉热的病原菌，本菌能引起一些野生动物感染，常见于野兔中，又称野兔热杆菌病。人类感染土拉弗朗西斯菌的传播途径很多，可因动物咬伤，食人污染食品而感染，亦可经空气传播引起呼吸道感染。潜伏期一般为3～5d，发病急，临床表现多样，高热伴有剧烈头痛，肌肉、关节酸痛及食欲不振等。除肺型外，一般预后良好。

1．生物学特性

土拉弗朗西斯菌为球杆状小杆菌，有时呈多形性。大小为0.20μm × (0.2～0.)μm，无芽胞和动力，在动物组织中有荚膜。本菌为需氧菌，在普通培养基上不生长，常用卵黄培养基或胱氨酸血琼脂培养基，最适生长温度35℃。在卵黄培养基上培养24～48h 可长出1.0～1.5mm 菌落，呈圆形、光滑、灰白色。对碳水化合物及醇类发酵能力很弱。可分解葡萄糖、麦芽糖产酸不产气。本菌可产生少量硫化氢，能分解尿素，不产生吲哚。

本菌对热敏感，56℃5～10min 即死亡；对低温有较强的耐受力，在20～25℃水中可存活1～2 个月。

2．鉴定

临床采集患者血液、淋巴结穿刺液等标本应立即接种培养基；如不能及时接种，可将标本置于10℃以下的环境中。此外，野生动物、家畜或尸体、污染的食品或水均可

作检查材料，进行显微镜检查及分离培养。只有标本含有大量细菌时，才能获得阳性结果，一般标本均不适合直接镜检。

用培养物制备涂片时可先制成3％甲醛菌悬液，干燥后用3％盐酸乙醇溶液固定5min，干燥后染色。

本菌的分离培养阳性率不高，皮肤溃疡物和穿刺液培养成功率也很低。标本可接种于卵黄培养基或Francis 培养基，同时也接种于普通平板。当普通培养基不生长，而在卵黄培养基上生长，可结合镜检和反相血凝试验结果判断。

本菌的生化反应对鉴定无意义，如上述不能确定时，可作动物试验确定之。方法是将穿刺液、脓液等标本混匀于1ml 肉汤中，取0.2～0.4ml 注射小白鼠的腹腔及皮下，一般注射两只小白鼠，通常在10d 内死亡（1～2d 死亡多为其他细菌感染所致）。小白鼠死亡后立即在无菌条件下进行解剖，取心、肝、脾组织直接接种在卵黄培养基中，并用印片镜检，可发现大量的土拉弗朗西斯菌。

六、军团菌属

军团菌于1976 年首次在美国费城一次退伍军人集会后的呼吸道感染标本中分离到，故称作军团菌，是一种具有高度爆发性、流行性的呼吸道感染病原菌。军团菌可引起军团菌病，最主要是由嗜肺军团菌引起的一种全身性疾病，可分为轻型和重症型。轻型类似流感，患者有发热、头痛、无力等症状，称为庞地亚克热（Pontiac fever）。重症型是以肺部感染为主的多器官损害，发病初起时有胸痛、咳嗽、发热等症状，最终导致呼吸衰竭死亡。军团菌亦是医院感染的病原菌之一，患有慢性疾病的住院患者以及各种原因导致机体免疫功能低下的患者更易感染。

1．生物学特性

革兰阴性杆菌，大小为（2.0～3.0）μm ×（0.3～0.4）μm，无芽胞，无荚膜。革兰染色可见菌体有空泡。多形性，可出现丝状体，具有极端鞭毛或侧鞭毛，能运动。苏丹黑、碱性沙黄染色可见菌体内有蓝黑色或蓝灰色脂滴。氧减少时不生长或生长缓慢，初次分离在含有2.5％～5.0％二氧化碳环境中生长良好。最适生长温度为35℃，最适pH为6.9～7.0。营养要求较为苛刻，且生长缓慢，半胱氨酸和铁为其特殊营养需要。在活性碳酵母浸膏培养基（CYE 琼脂）上经35℃培养4～5d 可生长出很小的菌落，数日后菌落直径可增大至4～5mm，有光泽、灰白色、具粘性。在Feeley－Garman 培养基中培养3～5d 可见针尖大小菌落，菌落在紫外线照射下可发出黄色荧光。触酶试验阳性，尿素酶试验阴性，液化明胶，不分解糖类，硝酸盐还原试验阴性，部分菌株氧化酶试验阳性，多数菌株产生β－内酰胺酶。

2．鉴定

在普通营养琼脂或血琼脂平板上不生长，在含有铁和半胱氨酸的CYE 和F －G 琼脂培养基上才能生长。军团菌属种间的主要生物学特性鉴别见表6 －8 －61 。

表6 －8 －61　军团菌属种间的主要生物学特性鉴别

菌种	CYE 琼脂上产生荧光	血琼脂平板及普通琼脂平板上生长	F －G 琼脂上产生褐色素	β－内酰胺酶	明胶酶	氧化酶	马尿酸水解
嗜肺军团菌	暗黄	－	＋	＋	＋	＋	＋
米克戴德军团菌	暗黄	－	－	－	＋	－	
长滩军团菌	暗黄	－	＋	＋／－	＋	＋	－
华兹沃思军团菌	暗黄	－	＋	＋	＋	＋／－	－
约旦军团菌	－	－	＋	＋	＋	＋	－
伯兹曼军团菌	淡蓝	－	＋	＋／－	＋	＋／－	－
杜莫夫军团菌	淡蓝	－	＋	＋	＋	－	－
戈尔曼军团菌	淡蓝	－	＋	＋	＋	－	－
阿尼斯军团菌	淡蓝	－	＋	＋	＋	－	－
辛辛那提军团菌	－	－	＋	＋	＋	－	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90 %以下）菌株阳性，少数菌株阴性

七、加德纳菌属

加德纳菌属仅有1 个菌种，即阴道加德纳菌。本菌存在于人体泌尿生殖道，系条件致病菌。常引起非特异性阴道炎，偶见产后感染、流产及经尿道切除前列腺后败血症。亦可引起新生儿脓毒血症、分娩后败血症及膀胱菌尿症等。

1．生物学特性

革兰染色阴性或染色性不定（含血清的新鲜培养物可染成阳性），具多形性的杆菌，两端呈钝圆形。无鞭毛，无荚膜，无芽胞。营养要求较高，在普通琼脂平板上不生长。多数为兼性厌氧，接种在含5 %人血琼脂平板上（含3 %～5 %二氧化碳），35 ～37 ℃孵育24h，形成针尖大小菌落；48h 后菌落直径0.4 ～0.5 ㎜，呈圆形，不透明，光滑，形似露滴状。在人血和兔血琼脂培养基上形成狭窄β－溶血环。

2．鉴定

根据该菌的生物学特性和生化试验进行鉴定。加德纳菌氧化酶试验和触酶试验均阴性；水解马尿酸盐，发酵葡萄糖和麦芽糖，不发酵甘露醇、肌醇和棉子糖；赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、VP 、靛基质、明胶液化等试验均阴性；不还原硝

酸盐，不产生硫化氢。在人和兔血琼脂平板上生长可产生溶血，在羊血琼脂平板上则否。

第九节　厌氧菌

厌氧菌是一大类对氧敏感，只能在厌氧条件下生长繁殖和生存的细菌。因此，在人工培养厌氧菌时，必须提供一个无氧环境。厌氧菌种类繁多，已发现的厌氧菌有30 多属，计200 余种。厌氧菌分布广泛，存在于土壤、沼泽、湖泊、海洋、河流的沉渣、污水、食物及人和动物体内，如正常人的肠道、口腔、阴道、尿道、上呼吸道和皮肤等处均有大量厌氧菌寄居，它们与需氧菌一起共同组成人体的正常菌群。

人体各部位存在的厌氧菌种类并不一样。如皮肤主要是丙酸杆菌属菌；口腔中主要是产黑色素普雷沃菌、拟杆菌、梭杆菌、消化球菌和消化链球菌，其次也存在放线菌、双歧杆菌、真杆菌和乳酸杆菌等；肠道内主要有脆弱拟杆菌、消化球菌、消化链球菌、双歧杆菌、梭状芽胞杆菌和乳酸杆菌等；阴道内主要是乳酸杆菌、双歧杆菌，其次也存在拟杆菌、丙酸杆菌、消化链球菌和消化球菌等。

在正常情况下，寄居在人体内的正常厌氧菌群对人体是无害的，厌氧菌代谢产生的乙酸、乳酸等能抑制病原菌生长。如长期大量使用广谱抗生素、激素、免疫抑制剂等，在发生菌群失调或机体免疫力下降或细菌进入非正常寄居部位时，厌氧菌即可作为条件致病菌导致内源性感染。

一、厌氧菌感染的临床及细菌学指征

1）感染组织分泌物发出恶臭。

2）病变组织内含有气体。如产气荚膜梭菌引起的感染，感染局部产生大量气体，造成组织肿胀和坏死，皮下有捻发音。

3）感染部位位于粘膜附近。口腔、鼻咽腔、肠道、阴道等黏膜均有大量厌氧菌寄生，这些部位及附近有损伤，极易发生厌氧菌感染。

4）外伤及枪伤的闭锁性深部感染或人、动物咬伤后的继发感染，均可能是厌氧菌感染。

5）感染组织的分泌物或脓汁中有硫磺样颗粒，可能为放线菌感染。

6）感染组织脓性分泌物呈暗血红色，并在紫外光下发出红色荧光，可能有产黑色素普雷沃菌或不解糖卟啉单胞菌感染。

7）常规血培养阴性的细菌性心内膜炎。

8）胃肠道和女性生殖器官手术后发生的感染。

9）分泌物直接涂片革兰染色，镜检有细菌，而常规培养阴性者。

10）普通培养阴性，而在液体及半固体培养基深部长有细菌者。

二、厌氧菌检验方法

（一）直接检查

取各种送检标本（血液除外）涂片，行革兰染色，镜检，观察细菌形态与染色结果，结合标本来源和气味，可以对标本中可能有的细菌作出估计，便于选择培养基和做进一步检查。标本发出腐臭味，镜检染色不均，菌体形态奇特者常为有厌氧菌的表现。脆弱拟杆菌在染色标本中常表现为长短不一，两端钝圆着色深，中间着色浅，不均匀，有空泡的革兰阴性杆菌；菌体细长、两端尖、呈梭形的革兰阴性杆菌，有时有紫色颗粒沿菌体长轴排列，菌体尖端相对，成对排列，并有丁酸臭味者，常为核梭杆菌；菌体长短不一，高度多形性，中部肿胀或呈圆球者，可能是坏死梭杆菌或死亡梭杆菌；标本有琥珀酸味，发恶臭，在紫外光照射下发砖红色荧光，涂片染色镜检，见有革兰阴性球杆菌，间或有长短不一的多形性，可能为产黑色素普雷沃菌；涂片中发现极小的革兰阴性球菌者，可能是韦荣球菌；在脓汁中发现硫磺颗粒，菌体分枝，呈网状、栅状或X、Y、V状排列，有琥珀酸气味者，大多是放线菌；有醋酸气味的革兰阴性杆菌可能是双歧杆菌；涂片染色呈革兰阳性无芽胞杆菌，有乳酸气味者，可能是乳酸杆菌；涂片染色见有革兰阳性芽胞杆菌，则可能为梭状芽胞杆菌属菌。

（二）分离培养

1．培养基的选择

1）强化血琼脂平板（BAP）：这是一种非选择性培养基，几乎能培养出所有的厌氧菌。

2）七叶苷胆汁琼脂平板（BBE）：耐胆汁的脆弱拟杆菌群细菌与变形和死亡梭杆菌可在其上生长，菌落较大，可水解七叶苷，菌落周围形成棕黑色的晕（部分普通拟杆菌和变形梭杆菌除外）。

3）卡那霉素－万古霉素冻溶血琼脂平板（KVLB）：可抑制大多数兼性厌氧菌生长，绝大多数拟杆菌属和普雷沃菌属菌在此培养基上生长良好，梭杆菌和厌氧球菌不能生长。不解糖卟啉单胞菌和牙龈卟啉单胞菌也不能生长。本培养基是分离头颈部、口腔、上呼吸道常见的产黑色素普雷沃菌常用的选择性培养基。所加血液以兔血效果最好。

4）卵黄琼脂平板（EYA）和兔血琼脂平板：用于选择分离产气荚膜芽胞梭菌。该菌在兔血琼脂平板上产生双溶血环，内环是与菌落一样大小的透明环，外环是宽的α溶血区，在室温中放置30min，可见菌落变绿色或褐色，同时接种卵黄琼脂平板，进行卵磷脂酶试验及聂格尔试验以鉴定产气荚膜芽胞梭菌。

5）其他选择培养基：如苯乙醇血琼脂平板，可以抑制变形杆菌和其他肠道杆菌，有利于厌氧菌生长。用乳酸钠培养基选择韦荣球菌；改良FM 培养基选择梭杆菌；CCFA 培养基选择艰难梭菌等。

6）液体培养基：有庖肉培养基、硫乙醇酸钠肉汤培养基等。庖肉培养基可用于所有厌氧菌的培养，特别适用于梭状芽胞杆菌的增菌培养。硫乙醇酸钠肉汤最适于缓慢生长的放线菌和丙酸丙酸杆菌的培养。

以上培养基在接种标本前必须处于无氧状态，各种琼脂平板要求当天配制或放在充以二氧化碳的容器内，置4℃冰箱保存，1～2d 内用完。培养基使用前24h 必须置于无氧环境使其预还原或使用预还原灭菌法制作的培养基。液体培养基，用前煮沸10min，驱除溶解氧，并迅速冷却，立即接种。

2．标本的接种

用无菌注射器抽取标本，在选择性培养基和血琼脂平板上各接种2～3 滴，分区划线。液体培养基培养需将1～2ml 标本接种到培养基的底部。接种后立即放入厌氧装置中进行培养。按需要可同时作需氧、兼性厌氧和微需氧培养。因为兼性厌氧菌对甲硝唑不敏感，为了便于在混合培养物中发现厌氧菌，一般将标本分3 区划线接种于平板上，在第1，2 区交界处，贴1 张含5μg／片的甲硝唑纸片。如纸片周围出现抑菌圈，表明有厌氧菌存在。对于组织或其他固体标本，可在厌氧手套箱内研碎标本，无此条件者应尽快处理标本：用1ml 硫乙醇酸钠肉汤或其他液体培养基与标本混匀后用于接种。

3．厌氧培养方法

厌氧培养法有多种多样，但都必须降低氧化还原电势而构成无氧环境。常用方法有厌氧罐法、气袋法、转管法、厌氧手套箱培养法。前两种方法比较简便，不需特殊设备，适用于小型实验室。后两种方法设备较为昂贵，但效果较佳。在小型实验室进行单个标本培养，可用厌氧袋系统替代厌氧手套箱。其他尚有一些不需特殊设备，并能在有氧环境中进行培养的更为简单的方法。如平皿焦性没食子酸法、生物耗氧法、高层琼脂培养法等。初代培养在35℃至少培养48h，如疑似放线菌应延长至72～96h。

㈢ 鉴定

可根据厌氧菌的菌体形态、染色反应、菌落性状以及对某些抗生素的敏感性等作出初步鉴定，最后鉴定则要通过生化反应及终末代谢产物检查。

菌落性状主要包括菌落形态、色素产生、溶血、在紫外线下检查发出的荧光等。抗菌药物敏感性诊断试验有卡那霉素、万古霉素、甲硝唑和多粘菌素等。聚茴香脑磺酸钠（SPS）敏感试验可用于厌氧消化链球菌与其他革兰阳性球菌的区别，前者对50g/L 的SPS 溶液敏感，而后者耐药。

生化反应主要包括多种糖、醇类发酵试验，硫化氢和吲哚产生，硝酸盐还原、七叶苷、触酶、卵磷脂酶、脂肪酶、蛋白溶解、明胶液化、胆汁肉汤生长等试验。

终末代谢产物检查，是通过气液相色谱分析仪，分析待检菌在蛋白胨－酵母浸膏－葡萄糖（PYG）或庖肉、碳水化合物（CMC）肉汤培养基中代谢产生的终产物如挥发性脂肪酸（VFA）、非挥发性脂肪酸（NVFA）和醇类等，从而鉴定厌氧菌到种。

三、各类厌氧菌检验

㈠ 厌氧革兰阳性球菌

厌氧革兰阳性球菌是人体正常菌群的组成部分，部分菌种可引起厌氧菌感染。包括消化球菌属和消化链球菌属等。消化球菌属仅有1 个种，即黑色消化球菌；消化链球菌属有11 个种，以厌氧消化链球菌最常见。

1．生物学特性

革兰阳性球菌，圆形或卵圆形，成堆或成双，长短链。生长温度25～38℃，最适生长温度35～37℃。生长比较缓慢，往往需要孵育48h 后，才能形成肉眼可见的菌落。营养要求高，新鲜脑、心浸汁，血消化汤，Tween －80 可促进生长。孵育24～48h 菌落光滑、凸起细小，粗糙型菌落可呈车轮状，较大，一般不溶血，液体培养基中呈絮状或沉淀生长，但不混浊。分解碳水化合物产酸或产气。酸产物主要有乙酸、甲酸、丙酸、丁酸、异丁酸、乳酸等，但产量很少。

2．鉴定

黑色消化球菌在血琼脂平板上可形成灰褐色或黑色菌落。涂片染色显微镜下可见成堆排列，触酶试验阳性。消化链球菌属菌落灰白或微黄色，细小、边缘整齐、圆形、光滑、凸起、不透明、不溶血。本菌对SPS 特别敏感，用纸片法测定，若抑菌圈直径大于12mm 可快速鉴定本菌。大消化链球菌和微小消化链球菌生化反应相似，可根据形态区分，前者菌体大，后者小。消化球菌和消化链球菌生物学特性鉴别见表6－8－62。

表6－8－62　消化球菌和消化链球苗生物学特性鉴别

菌种	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	纤二糖	硝酸盐	吲哚	尿素	七叶苷	明胶	凝固酶	触酶	在PYG 中生长产生的脂肪酸
黑色消化球菌	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	＋	B，C，iv，a
厌氧消化链球菌	＋w	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	A，IC，ib，b，iv
大消化链球菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	v	－	－	A，（1），（s）
微小消化链球菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	A，（1），（s）
不解糖消化链球菌	－	－	－	－	－	－	v	－	－	－	－	＋	A，B，（1），（p），（s）
产吲哚消化链球菌	－	－	－	－	－	＋	＋	－	－	－	＋	－	A，B，P，（1），（s）
普氏消化链球菌	＋w	－	＋w	－	－	－／＋	－	－／＋	－	－	－	v	B，C，iv，a
四联消化链球菌	＋	－	＋	＋	－	－	－	＋	－	－	－	v	B，L，（a），（p）

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；－／＋表示多数菌株（90％以下）阴性，少数菌株阳性；v 表示不定；＋w 表示弱阳性；A：乙酸；B：丁酸；IB：异丁酸；C：己酸；IC：异己破；L：乳酸；P：丙酸；S：琥珀酸；IV：异戊酸；脂肪酸缩写中，大写字母表示主要代谢产物，小写字母表示次要代谢产物，圆括号内表示可变反应

（二）厌氧革兰阴性球菌

厌氧革兰阴性球菌包括韦荣球菌属、氨基酸球菌属和巨球菌属，临床上以韦荣球菌属多见，韦荣球菌属包括细小韦荣球菌和产碱韦荣球菌2 种。韦荣球菌是口腔、咽部、胃肠道和女性生殖道的正常菌群，为条件致病菌，细小韦荣球菌可引起上呼吸道感染，产碱韦荣球菌多见于肠道感染。

1．生物学特性

韦荣球菌属（Veillonella）为革兰阴性球菌，细小韦荣球菌直径0.3～0.5 μm，成双、成簇或短链，菌落细小，呈圆形而整齐，浅黄或粉红色，不溶血。初次分离时可能为革兰阳性，过夜后即变为阴性。新鲜培养物置紫外线下照射，菌落发出红色荧光，接触空气后荧光消失。无动力，专性厌氧，最适生长温度30～37 ℃，氧化酶试验阴性，触酶试验大多为阴性。不分解糖类，还原硝酸盐。

2．鉴定

临床标本中主要为细小韦荣球菌，由于韦荣球菌属内各菌种的生化反应基本一致，故无法利用生化反应试验鉴别。常规工作中，分离出韦荣球菌，常报告其代表性菌种或报告菌属便可。细小韦荣球菌与其相关菌的鉴别见表6－8－63。

表6－8－63　细小韦荣球菌与其相关菌的鉴别

菌种	硝酸盐	触酶	葡萄糖发酵	菌体直径（μm）
细小韦荣球菌	＋	－／＋	－	0.3～0.5
发酵氨基酸球菌	－	－	－	0.6～1.0
埃氏巨球菌	－	－	＋	1.2～1.9

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性

㈢ 厌氧革兰阳性芽胞杆菌

厌氧革兰阳性芽胞杆菌是一群革兰阳性、厌氧或微需氧的粗大芽胞杆菌，现有130种，归属梭菌属。与临床关系密切的致病菌有引起破伤风芽胞梭菌、产气荚膜梭菌、肉毒梭菌和艰难梭菌等。

1．生物学特性

这是一群革兰阳性、厌氧或微需氧的粗大芽胞杆菌。但有些菌种，如多枝芽胞梭菌和梭形芽胞梭菌经过夜培养后往往呈革兰阴性。芽胞圆形或椭圆形，直径大于菌体，位于菌体中央、次极端或顶端。多数菌具周鞭毛，部分菌种产生脂酶、卵磷脂酶，而触酶试验阴性。属内各菌在代谢上存在明显差异，对糖、蛋白、脂类分解各不相同。某些菌种能产生外毒素，可引起严重疾病。

2．鉴定

先确定待检菌有无芽胞和芽胞的位置，一般在疱肉培养基中培养2d 才能产生芽胞，但某些菌种要在室温孵育5～7d。经芽胞染色仍不见芽胞者，可采用加温试验证实：于70℃水浴10min 后，移入疱肉培养基中仍能生长，提示该菌确有芽胞存在。

1）破伤风芽胞梭菌：幼稚细菌呈细丝状，在血琼脂平板上呈迁徙性生长，可被特异性抗毒素所抑制，涂片观察呈多形性，芽胞位于菌体末端，细菌呈鼓槌状。不分解糖和蛋白质，明胶酶试验阳性。

2）产气荚膜芽胞梭菌：革兰阳性粗大杆菌，有荚膜，芽胞位于次极端，血琼脂平板上菌落有双溶血环，在牛乳培养基中产生汹涌发酵现象，卵磷脂酶试验阳性。

3）肉毒芽胞梭菌：革兰阳性粗大杆菌，芽胞位于菌体次极端，菌体呈网球拍状，血琼脂平板上菌落发丝状，疱肉培养基表面有乳油状浮渣，脂肪酶试验阳性。

4）难辨芽胞梭菌：革兰阳性粗长杆菌，芽胞位于菌体次极端。不凝固牛乳，发酵

葡萄糖和果糖，水解七叶灵和液化明胶，不发酵乳糖、麦芽糖和蔗糖，不产生吲哚。

常见芽胞梭菌的生物学特性鉴别见表6－8－64。

㈣ 厌氧革兰阳性无芽胞杆菌

厌氧革兰阳性无芽胞杆菌种类较多，包括双歧杆菌属、真杆菌属、丙酸杆菌属、放线菌属和乳杆菌属等7个属。放线菌属、丙酸杆菌属和真杆菌属是最常检出的菌属，以痤疮丙酸杆菌在临床标本中最多见，其次为衣氏放线菌、迟缓真杆菌等。

1．生物学特性

革兰阳性，菌体类似白喉杆菌，两端可粗大，排列不规则，多呈X、Y、人、卅等形状，大小、长短不等，有的出现分枝或分叉状，尤其在含糖的PY培养液内，多形性更明显。除乳杆菌属、蛛网菌、放线菌属的某些种能在微氧或普通环境生长外，其余多为严格厌氧菌。pH6.5～7.8生长良好，但乳杆菌最适pH5.5左右，甚至pH3.0亦能生长。本群各菌生化反应不一，多数发酵葡萄糖，触酶、吲哚试验阴性。

2．鉴定

在染色形态上要特别注意与需氧的李斯特菌、奴卡菌、棒状杆菌及分枝杆菌属鉴别。本群细菌用常规方法鉴别相对较难，有些菌株需要借助气液相色谱分析仪，通过分析糖代谢终产物来鉴别。各属间生物学特性见表6－8－65。

表6－8－64　常见芽胞梭菌的生物学特性鉴别

菌种	芽胞	卵磷脂酶	脂酶	明胶	牛乳	吲哚	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	水杨素
产气荚膜芽胞梭菌	OS	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	v
肉毒芽胞梭菌	OS	−	+	+	+	−	+	−	+	−	−	v
双酶芽胞梭菌	OS	+	−	+	+	−	+	−	+	−	−	v
丁酸芽胞梭菌	OS	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+
尸毒芽胞梭菌	OT	−	−	v	−	+	+	−	−	−	−	−
肖氏芽胞梭菌	OS	−	−	+/−	−	−	+	+	+	+	−	−
梭形芽胞梭菌	OS	−	−	−	−	−/+	+	v	+	+	−	v
难辨芽胞梭菌	OS	−	−	v	−	−	+	−	−	−	+	v
溶组织芽胞梭菌	OS	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
无害芽胞梭菌	OT	−	−	−	−	−	+	−	−	v	+	+
泥渣芽胞梭菌	OS	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−
诺氏芽胞梭菌	OS	+	+/−	+	−/+	−	+	−	v	−	−	−
副产气芽胞梭菌	OT	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+
多枝芽胞梭菌	R/OT	−	−	−	−	−	+	+	+	+	v	+
败毒芽胞梭菌	OS	−	−	+	−	−	+	+	+	+	−	+
索氏芽胞梭菌	OS	+/−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	
楔形芽胞梭菌	RS/OT	−	−	−/+	−	+/−	+	v	+	+/−	+	+

续表

菌种	芽胞	卵磷脂酶	脂酶	明胶	牛乳	吲哚	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	水杨素
产芽胞芽胞梭菌	OS	－	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	－	－	v
次端芽胞梭菌	OS	－	－	＋	＋	－	－	－	－	－	－	－
第三芽胞梭菌	OT	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋
破伤风芽胞梭菌	RT	－	－	＋	－	v	－	－	－	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性；v 表示不定；O 表示呈卵圆形；R 表示呈圆形；S 表示位次端；T 表示位极端

表6－8－65　厌氧革兰阳性无芽胞杆菌各属生物学特性鉴别

菌属	严格厌氧生长	触酶	硝酸盐还原	菌体两侧平行	动力	吲哚	在PYG 中生长产生的脂肪酸
丙酸杆菌属	v	v	v	－／＋	－	－	A，P，iv，s，l
放线菌属	v	－／＋	v	－	－	－	S，L，a
真杆菌属	＋	－	v	＋／－	v	－	A，B
双歧杆菌属	＋	－	－	－	－	－	A，L，[A＞L]
乳杆菌属	v	－	－	＋	－	－	L，(a)，(s)
丙酸丙酸杆菌	－		＋	－／＋	－	v	A，P，l，s
莫比兰克斯菌属	＋	－	v	－	＋	－	A，S，(1)

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性；v 表示不定；A 表示乙酸；B 表示丁酸；L 表示乳酸；P 表示丙酸；iv 表示异戊酸；S 表示琥珀酸；大写字母表示主要代谢产物；小写字母表示次要代谢产物；圆括号内表示可变反应

(1) 丙酸杆菌属：革兰阳性棒状杆菌，陈旧培养物菌体呈长丝状，菌落一般细小，部分菌株有溶血。痤疮丙酸杆菌幼龄菌菌落呈白至灰白色，培养时间长则常常变成黄色，触酶和吲哚试验均阳性。吲哚试验阴性者为其他丙酸杆菌。丙酸丙酸杆菌触酶试验阴性。常见丙酸杆菌的主要生物学特性鉴别见表6－8－66。

表6－8－66　常见丙酸杆菌的主要生物学特性鉴别

菌名	触酶	吲哚	明胶	七叶苷	硝酸盐	麦芽糖	鼠李糖	蔗糖	乳糖
痤疮丙酸杆菌	＋	＋／－	＋	－	＋	－	－	－	－
贪婪丙酸杆菌	＋	－	＋	＋	－	＋	－	＋	＋／－
颗粒丙酸杆菌	＋	－	－	－	－	＋／－	－	＋	－
丙酸丙酸杆菌	－	－	v	－	＋	＋	－	＋	v

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定；水表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性

2）放线菌属：革兰阳性不规则的细长杆菌，菌体成分枝的丝状体，部分菌株有溶血。衣氏放线菌菌落可呈蛛网状。分泌物中常有硫磺颗粒，镜下可见丝状体及棒状体。衣氏放线菌与丙酸丙酸杆菌非常相似，用常规生化试验很难区别，可通过气液相色谱分析仪分析碳水化合物代谢终产物而将二者区别开来。丙酸丙酸杆菌产生丙酸，而衣氏放线菌则否。常见放线菌种的生物学特性鉴别见表6－8－67。

表6－8－67　常见放线菌种的主要生物学特性鉴别

菌种	触酶	硝酸盐	明胶	硫化氢(TSI)	七叶苷	粉红色素	尿素	木糖	棉子糖	蕈糖	甘露醇	厌氧	微需氧	兼性厌氧
衣氏放线菌	－	v	－	＋	＋	－	－	＋	＋	－	v	＋	＋	
奈氏放线菌	－	＋	－	＋	＋	－	＋	v	＋	＋	－	＋		
化脓放线菌	－	－	＋	－	－	－	－	v	－	v	－	＋	＋	
迈氏放线菌	－	－	－	－	－	－	v	＋	－	－	－	＋	＋	
龋齿放线菌	－	＋	－	＋	v	＋*	－	v	－	－	－	＋	＋	
粘性放线菌	＋	v	－	＋	v	－	v	－	＋	v	－	＋		

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定；*表示需培养7～10d

3）真杆菌属：革兰阳性多形性或球杆菌，呈单、双或短链状排列，专性厌氧，触酶试验阴性，无动力，在37℃和pH7.0 生长最好。发酵糖，主要产生丁酸。迟缓真杆菌呈球杆状，菌落圆形，直径0.5～2.0mm，凸或扁，半透明，不溶血，生化反应除能还原硝酸盐外，其余均阴性。常见真杆菌生物学特性鉴别见表6－8－68。

4）双歧杆菌属：本届细菌是肠道正常菌群，在维持人体肠道微生态平衡方面起重要作用。在口腔和阴道中也可寄居。除住齿双歧杆菌外，均不致病。革兰阳性多形性杆菌，长短不等，有分叉，末端棒状，呈单、双或短链状排列。老龄菌革兰染色可变阴性，专性厌氧，触酶和吲哚试验均阴性，不还原硝酸盐，能分解葡萄糖和乳糖。在PYC肉汤中发酵糖产生大量乙酸和乳酸，且乙酸量至少大于乳酸量两倍。常见双歧杆菌生物学特性鉴别见表6－8－69。

表6－8－68　常见真杆菌生物学特性鉴别

菌种	葡萄糖	甘露醇	阿拉伯糖	蔗糖	乳糖	水杨素	七叶苷	硝酸盐	吲哚
产气真杆菌	＋	＋	－	－	＋	＋	＋/－	－	－
不解乳真杆菌	＋	－	－	－	－	－	－	－	－
短真杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－
扭曲真杆菌	＋	v	＋	＋	＋/－	＋	＋	－	－
迟缓真杆菌	－	－	－	－	－	－	－	＋	－
粘液真杆菌	＋	－/w	－/＋	－	－	－	＋	－	－
念珠状真杆菌	＋	＋	－	－	－	－	－/w	v	－
缠结真杆菌	＋/w	－	－	＋	－/＋	w/－	＋	v	－
沙真杆菌	＋/w	－/＋	－	－	－	＋	－	＋	
胆怯真杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－
大腹真杆菌	＋/w	＋	－	v	－/＋	－	＋	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株，Pi；－/＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性；v 表示不定，w 表示弱阳性反应

表6－8－69　常见双歧杆菌生物学特性鉴别

菌种	甘露糖	甘露醇	阿拉伯糖	水杨素	淀粉	菊粉	Tween－80 刺激生长
青春双歧杆菌	v	v	＋	＋	＋	v	－
长双歧杆菌	v	－	＋	－	－	－	＋
短双歧杆菌	＋	v	－	＋	－	v	－
双歧双歧杆菌	－	－	－	－	－	－	－
婴儿双歧杆菌	v	－	－	－	－	－	＋
角双歧杆菌	－	－	＋	＋	＋	＋	－
小链双歧杆菌	－	v	＋	＋	－	v	－
假小链双歧杆菌	＋	－	＋	＋	＋	－	－
住齿双歧杆菌	＋	＋	＋	＋	＋	－	－

注：＋表示90％以上的茼株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定

5）乳杆菌属：广泛分布在自然界，是人类口腔、肠道及阴道的正常菌群，一般不致病，偶尔可引起人类感染，如胸腔、肺部感染、尿道炎、菌血症、心内膜炎、局部化脓性感染和绒毛膜羊膜炎等。革兰阳性较大杆菌，可有多形态，菌体长短不一，成双或短链状。厌氧或兼性厌氧，最适pH5.5～6.2，在pH3.0 时仍能生长，发酵糖类产生大量乳酸等。菌落大小不一，表面粗糙，边缘不整齐。所有菌株都能发酵葡萄糖，大部分菌株能发酵乳糖、蔗糖。触酶试验阴性，不产生吲哚，不还原硝酸盐，不液化明胶。常见乳杆菌生物学特性鉴别见表6－8－70。

6）莫比兰克斯菌属：仅有柯氏莫比兰克斯菌和缪氏莫比兰克斯菌2 种，非人体正常菌群，可能与细菌性阴道病有关。虽然细胞壁含有革兰阳性菌成分，但革兰染色不定，专性厌氧，血琼脂平板上培养48h 菌落直径小于1.0mm，连续培养5d 则可达2.0～3.0mm。菌落无色，半透明，光滑，凸起，似水滴状。氧化酶、触酶和吲哚试验均阴性，动力试验阳性。发酵糖能力弱，最终产生琥珀酸和乙酸，有或无乳酸。2 种菌的鉴别见表6－8－71。

表6－8－70　常见乳杆菌生物学特性鉴别

菌种	木糖	水杨素	七叶苷	麦芽糖	甘露醇	棉子糖	蕈糖
嗜酸乳杆菌	－	＋	＋	＋	－	v	v
卷曲乳杆菌	－	＋	＋	＋	－	－	－
格氏乳杆菌	－	＋	＋	v	－	v	v
詹氏乳杆菌	－	＋	＋	v	v	－	＋
植物乳杆菌	v	＋	＋	＋	＋	＋	＋
发酵乳杆菌	＋	－	－	＋	－	＋	v
短乳杆菌	v	－	v	＋	－	v	－
乳酪乳杆菌	－	＋	＋	＋	＋	－	＋

注：＋表示90％以上菌株阳性；－表示90％以上菌株阴性；v 表示可变反应

表6－8－71　2 种奠比兰克斯苗生物学特性鉴别

菌种	菌体长度（μm）	革兰染色反应	马尿酸钠	α—D －半乳糖苷酶	精氨酸水解酶	脯氨酸氨肽酶	α—D －葡萄糖苷糖	β—D －葡萄糖苷酶
缪氏莫比兰克斯菌	2.9	－	－	－	－	＋	＋	＋
柯氏莫比兰克斯菌	1.7	v	＋	＋	＋	＋	＋	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定

㈤ 厌氧革兰阴性无芽胞杆菌

厌氧革兰阴性无芽胞杆菌是人类和动物口腔、上呼吸道、肠道及泌尿生殖道正常菌群的一部分。种类较多，拟杆菌属、普雷沃菌属、梭杆菌属和卟啉单胞菌属为临床常见菌属，是条件致病菌，可引起内源性感染。

1．生物学特性

本群细菌共同特点为淡染的革兰阴性杆菌，不形成芽胞，拟杆菌、卟啉单胞菌、普雷沃菌等为短小的规则杆菌，两端圆；而梭杆菌为细长的梭形杆菌，菌体呈多形性，坏死梭杆菌两端圆。在固体培养基上培养物的形态较规则，而在液体培养基，尤其是在含糖的培养基中，菌体形态不规则，表现为长短不一，无动力。脆弱拟杆菌群菌株在血琼脂上菌落直径1～3㎜，光滑，白到灰白色，不溶血；多形拟杆菌菌落比脆弱拟杆菌白，卵形拟杆菌菌落常呈粘液状。卟啉单胞菌和普雷沃菌属某些种可产棕色、棕黄或黑色的色素。梭杆菌菌落形态不规则，血琼脂平板上培养物暴露于空气中后，在菌落周围可形成轻微溶血，使琼脂培养基呈绿色。核梭杆菌菌落类似面包屑，凸起，有反光的斑点；变形梭杆菌菌落中央厚，不透光，边缘不整齐，类似油煎蛋。

严格厌氧，特别是初次分离更需氧化还原电势能较低的环境。梭杆菌对氧更为敏

感，若在分离和移种过程中，暴露于空气时间过长，会促使细菌死亡。

细菌在无氧条件下发酵葡萄糖，产生各种短链的可挥发性脂肪酸。不同菌种产生的脂肪酸种类各不相同，可作为生物种鉴定的依据。

2．鉴定

根据细菌对20％胆汁和特定含量的抗菌药物诊断纸片的敏感性以及色素形成等试验，可将拟杆菌、普雷沃菌和卟啉单胞菌属初步分群。诊断纸片包括：含1mg 卡那霉素、5μg 万古霉素、10μg 粘菌素纸片等。抑菌圈直径≥10mm 为敏感。拟杆菌、卟啉单胞菌、普雷沃菌和梭杆菌主要生物学特性与初步分群见表6－8－72。

1）耐胆汁拟杆菌：包括脆弱拟杆菌群和2 种不常见的拟杆菌（艾格斯拟杆菌和内脏拟杆菌）。临床厌氧菌感染标本中，1/3 以上是由脆弱拟杆菌群菌引起的，其中脆弱拟杆菌分离率占第1 位，第2 位是多形拟杆菌。该群菌均发酵葡萄糖。耐胆汁拟杆菌的生物学特性鉴别见表6－8－73。

表6－8－72　拟杆菌、卟啉单胞菌、普霉沃菌和梭杆菌主要生物学特性与初步分群

菌群和菌种	色素	卡那霉素*	万古霉素*	粘菌素*	20％胆汁生长	需要F/f**	硝酸盐	吲哚	触酶	脂酶	尿毒	动力
脆弱拟杆菌群	－	R	R	R	R	－	－	v	v	－	－	－
解脲拟杆菌群	－	S	R	S	S	＋	＋	－	－/＋	－	v	v
条形拟杆菌	－	S	R	S	v	＋	＋	－	－	－	－	－
解脲拟杆菌	－	S	R	S	S	＋	＋	－	－/＋	－	＋	－
梭杆菌	－	S	R	S	v	－	－	v	－	v	－/＋	－
坏死梭杆菌	－	S	R	S	S	－	－	＋	－	＋	－	－
核梭杆菌	－	S	R	S	S	－	－	＋	－	－	－	－
死亡/变形梭杆菌	－	S	R	S	R	－	－	v	－	－	－	－
卟啉单胞菌	＋	R	S	R	S	－	－	＋	－	－	－	－
产色素普雷沃菌	＋	R	R	v	S	－	－	v	－	v	－	－
中间普雷沃菌	＋	R	R	S	S	－	－	＋	－	＋	－	－
其他普雷沃菌	－	R	R	v	S	－	－/＋	－/＋	－/＋	－/＋	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；－/＋表示多数菌株（90％以下）阴性，少数菌株阳性；v 表示不定；S 表示敏感；R 表示耐药；*表示卡那霉素1mg，万古霉素5μg，粘菌素10μg；F/f**表示甲酸盐/延胡索酸盐

表6－8－73　耐胆汁拟杆菌的生物学特性鉴别

菌种	20％胆汁生长	吲哚	触酶	七叶苷	蔗糖	麦芽糖	鼠李糖	水杨素	蕈糖	阿拉伯糖	在PYG中生长产生的脂肪酸
脆弱拟杆菌群											
脆弱拟杆菌	＋	－	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	A，p，S，pa，ib，iv，l)
普通拟杆菌	＋	－	－／＋	－／＋	＋	＋	＋	－	－	＋	A，p，S
吉氏拟杆菌	＋	－	＋／－	＋	＋	＋	v	＋	＋	－／＋	A，p，S，(pa，ib，iv，l)
默迪拟杆菌	＋	－	－／＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－／＋	A，p，S，ib，iv)
可可拟杆菌	＋	－	－	＋	＋	＋	－／＋	＋	＋	A，p，S，iv)	
多形拟杆菌	＋	＋	＋／－	＋	＋	＋	＋	－／＋	＋	＋	A，p，S，pa，ib，iv，l)
规则拟杆菌	W＋	＋	－／＋	＋	＋	＋	－／＋	＋／－	－	＋	A，p，l，S，ib，iv)
卵形拟杆菌	＋	＋	－／＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	A，p，S，pa，ib，iv，l)
粪拟杆菌	＋	＋	－	＋／－	＋	＋	＋	－／＋	－	－／＋	A，p，S，ib，iv)
其他											
艾格斯拟杆菌	＋	＋	－	＋	－	＋	＋／－	－	－	＋	A，P，S，ib，iv，l)
内脏拟杆菌	W＋	＋	－	＋	－	－	－	－	－	＋	A，P，ib，b，iv，S，l)

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性；W＋表示大多数菌株弱阳性，少数菌株阳性；A：乙酸；P：丙酸；;IB：异丁酸；B：丁酸；IV：异戊酸；L：乳酸；S：琥珀酸；PA：苯乙酸；大写字母表示主要代谢产物，小写字母表示次要代谢产物，圆括号内表示可变反应

（2）胆汁敏感、产色素普雷沃菌和卟啉单胞菌：本群菌触酶试验均阴性，在分离培养基上培养2～21d，可产生从浅黄到棕色到黑色的色素。在紫外线下可见培养物发出砖红色荧光，但也可有粉红色、橙色或黄绿色荧光。在色素形成后则检测不到荧光。色素形成的速度及颜色深浅与使用的血液有关。在溶解的兔血琼脂平板上，细菌形成色素的结果最好、最可靠。

产色素的卟啉单胞菌与产色素的普雷沃菌的区别在于对糖的利用上，前者不分解糖类，而后者能分解。在表型相似的卟啉单胞菌中，牙龈卟啉单胞菌可产生苯乙酸、N－乙酰－β－氨基葡萄糖苷酶和胰蛋白酶等，可与其他卟啉单胞菌相区别；不解糖卟啉单胞菌产生α－岩藻糖苷酶，可与牙髓卟啉单胞菌相区别。七叶苷水解、吲哚和脂酶的产

生及碳水化合物的发酵等试验，可用于产色素普雷沃菌种的区别。胆汁敏感、产色素卟啉单胞菌和普雷沃菌的生物学特性鉴别见表6 —8 —74 。

表6 —8 —74　胆汁敏感、产色素卟啉单胞菌和普雷沃菌的生物学特性鉴别

菌种	吲哚	脂酶	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	纤维二糖	七叶苷	α—FUC★	NAG★	胰蛋白酶	苯乙酸	在PYG中生长产生脂肪酸
卟啉单胞菌												
不解糖卟啉单胞菌	+	−	−	−	−	−		+	−	−	−	A，p，ib，B，IV，S
牙髓卟啉单胞菌	+	−	−	−	−	−		−	−	−	−	A，p，ib，B，IV，S
牙龈卟啉单胞菌	+	−	−	−	−	−		−	+	+	+	A，p，ib，B，IV，s，pa
普雷沃菌												
中间普雷沃菌	+	+／−	+	+	−	−						A，iv，S，f，p，ib)
人体普雷沃菌	−	−	+	+	−	−						A，ib，iv，S，l)
产黑色素普雷沃菌	−	−／+	+	+	+	−	−					A，S，f，ib，iv，l)
住齿普雷沃菌	−	−	+	+	+	−	+					A，S，f，ib，iv，l)
劳艾奇普雷沃菌	−	v	+	+	+	+	v					A，S，f，l)

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋／－表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株阴性；－／＋表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株阳性；v 表示不定；A：乙酸；P：丙酸；F：甲酸；IB：异丁酸；B：丁酸；IV：异戊酸；L：乳酸；S：琥珀酸；PA：苯乙酸；大写字母表示主要代谢产物，小写字母表示次要代谢产物，圆括号中表示可变反应；*α—FUC 表示α－岩藻糖苷酶；NAG 表示N －乙酰－β－氨基葡萄糖苷酶

(3) 胆汁敏感、不产色素拟杆菌和普雷沃菌：这群菌又可进一步分成4 个亚群：①分解糖类；②分解糖和蛋白类；③弱分解或不分解糖类；④不分解糖类，且生长需甲酸盐和延胡索酸盐类。胆汁敏感、不产色素拟杆菌及普雷沃菌生物学特性鉴别见表6 —8 —75 。

第一亚群可进一步分成发酵和非发酵戊糖两类。发酵戊糖类包括口普雷沃菌、颊普雷沃菌、解肝素普雷沃菌和菌胶团普雷沃菌4 种，前2 种是人类口腔正常菌群中的成员，可引起头、颈、胸膜及肺部感染和坏死性牙根管感染等。两者区别可用N －乙酰－β－氨基葡萄糖苷酶和α－岩藻糖苷酶试验。后2 种菌在肉汤中培养可产生粘性沉淀物，是其独有现象。菌胶团普雷沃菌临床上少见，两者区别可用吲哚试验，其中解肝素普雷沃菌吲哚试验阳性，另一菌则阴性。

非发酵戊糖类也包括4 种，即口腔普雷沃菌、口颊普雷沃菌、真口腔普雷沃菌和龈普雷沃菌，是口腔中的正常菌群，临床标本中少见。这几种菌易与延迟产色素的劳艾奇普雷沃菌、产黑色素普雷沃菌和住齿普雷沃菌相混淆。

表6 －8 －75　胆汁敏感、不产色素拟杆菌及普霄沃菌生物学特性鉴别

亚群及种	葡萄糖	蔗糖	乳糖	阿拉伯糖	木糖	水杨素	纤维二糖	木聚糖	七叶苷	生长需F／F	α－FUC＊	NAC＊	吲哚	明胶	在PYG中生长产生的脂肪酸
分解戊糖(发酵)															
口普雷沃菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	＋	－	－	A，S，(p，ib，iv)
颊普雷沃菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－	－	－	A，S，(p，ib，b，iv，l)
解肝素普雷沃菌	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋		＋	－	＋	＋	＋	－	A，S，(p，iv)
菌胶团普雷沃菌	＋	＋	＋	v	v	v	＋	－	＋	－	＋	＋	－	－	A，P，S，(ib，iv)
分解戊糖(非发酵)															
口腔普雷沃菌	＋	＋	＋	－	－	＋	＋	－	＋	－	＋	＋	－	－	A，f，S，(l)
口颊普雷沃菌	＋	＋	＋	－	－	－	＋	－	＋	－	＋	＋	－	－	A，iv，S
真口腔普雷沃菌	＋	＋	＋	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	－	－	A，S
龈普雷沃菌	＋	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	－	－	A，S
分解糖和蛋白类															
双向普雷沃菌	＋	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	－	＋	A，iv，S，(f，ib)
两向普雷沃菌	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	A，S，(f，p，ib，iv)
弱分解或不分解糖类															
多毛拟杆菌	W－	－	－	－	－	－	－		＋	－			－	－	a，s，(f，p，l)
腐败拟杆菌	－	－	－	－	－	－	－						＋	＋	a，P，ib，b，IV，S，(l)
生长需F／F															
条形拟杆菌	－	－	－		－	－		－	＋				－	－	a，S
解脲拟杆菌	＋	－	－		－	－		－	＋				－	－	a，S

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；v 表示不定；W－表示大多数弱阳性，少数阴性；F/f 表示甲酸盐/延胡索酸盐；＊表示α－岩藻糖苷酶；NAC 表示N －乙酰－β－氨基葡萄糖苷酶；A ：乙酸；P ：丙酸；F ：甲酸；IB ：异丁酸；B ：丁酸；IV ：异戊酸；L ：乳酸；S ：琥珀酸；大写字母表示主要代谢产物，小写字母表示次要代谢产物，圆括号内表示可变反应

第二亚群包括2 种，即双向普雷沃菌和两向普雷沃菌，是女性生殖道重要病原菌。均可发酵葡萄糖，通过明胶试验阳性可与第一亚群相区别。双向普雷活菌还可发酵乳糖，α－岩藻糖苷酶和N －乙酰－β－氨基葡萄糖苷酶试验阳性，这可与两向普雷沃菌区别。

第三亚群包括2 种，在临床标本中很少见。其中多毛拟杆菌弱发酵葡萄糖，七叶苷试验阳性，而腐败拟杆菌吲哚和明胶试验阳性，藉此可以区别两者。

第四亚群有条形拟杆菌和解脲拟杆菌2 种，生长需补充甲酸盐和延胡索酸盐，藉此可与其他3 个亚群相区别。种间的区别可用尿素酶试验，解脲拟杆菌尿素酶试验阳性，条形拟杆菌为阴性。条形拟杆菌可以引起脑脓肿、肺部感染、腹膜炎、腹内脓肿、伤口感染和软组织感染等。

4） 梭杆菌属：通常栖居在人和动物的口腔、上呼吸道、肠道及泌尿生殖道。可引起口腔、泌尿道、肺、副鼻窦和腹腔等感染。临床标本中以核梭杆菌、坏死梭杆菌、变形梭杆菌和死亡梭杆菌最常见。常见种间生物学特性鉴别见表6 －8 －76 。

表6 －8 －76　梭杆菌属常见菌种的生物学特性鉴别

菌种	吲哚	葡萄糖	果糖	甘露醇	七叶苷	脂酶	20％胆汁生长	从乳酸盐产生丙酸盐	从苏氨酸产生丙酸盐
核梭杆菌	＋	－/W	－/W	－	－	－	－	－	＋
坏死梭杆菌	＋	－IW	－/W	－	－	＋	－	＋	－
变形梭杆菌	＋	＋/W	＋/W	＋/W	－	－	＋	－	＋
死亡梭杆菌	－	＋/W	＋/W	＋/W	＋	－	＋	－	＋
微生子梭杆菌	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋
舟形梭杆菌	＋	W/－	－	－	－	－	－	－	－
拉氏梭杆菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－

注：＋表示90％以上的菌株阳性；－表示90％以上的菌株阴性；＋/W 表示多数（90％以下）菌株阳性，少数菌株弱阳性；－/W 表示多数（90％以下）菌株阴性，少数菌株弱阳性；W/－表示多数（90％以下）菌株弱阳性，少数菌株阴性

第十节　支原体

支原体是一类无细胞壁、呈高度多形性，在人工培养基上能生长繁殖，并能通过滤

菌器的最小原核型微生物。支原体隶属于柔膜体纲、支原体目下的支原体科。支原体科内包括支原体属（Mycoplasma）和脲原体属（Ureaplasma）2 个属，共70 余种，常见与人类感染有关的有肺炎支原体、解脲脲原体、人型支原体和生殖道支原体。

一、生物学特性

支原体无细胞壁，呈多形性，有球状、杆状、丝状、分枝状、球杆状、棒状、环状等，其基本形态为球状和丝状。电镜下观察，支原体的细胞壁由3 层膜组成，内、外层为蛋白质及糖类，中层为脂类（主要为磷脂）。胆固醇位于磷脂分子之间，对保持细胞膜的完整性起一定作用。凡能与胆固醇作用的物质如两性霉素B、皂素、毛地黄苷等，均可破坏支原体细胞膜，使其死亡。胞浆内含有环状双股DNA 和数量较多的核糖体。无鞭毛，有些菌株呈现滑动或旋转运动。革兰染色为阴性，但不易着色，常用吉姆萨染色，呈淡紫色。

支原体可在人工培养基上生长繁殖，对营养要求较高，需在基础营养培养基中加入10％～20％人或动物血清（主要提供胆固醇和长链脂肪酸）。大部分支原体最适生长pH7.6～8.0，温度35～37℃；而解脲脲原体最适生长pH5.5～6.5，由于在培养基中其分解尿素，产生氨气，使pH 值升高，可导致死亡。支原体一般在需氧或兼性厌氧情况下均可生长，但某些株在初分离时无需提供5％二氧化碳、95％氮气。支原体主要以二分裂方式繁殖，此外，还有分节、断裂、出芽或分枝等方式。繁殖速度较细菌慢，但解脲脲原体在适宜环境下生长较快，只需24～48h。生长速度中等的需7～14d，生长慢的需21～30d。

在液体培养基中生长呈轻度混浊，有时呈小颗粒样生长粘附于管壁或沉于管底。在固体培养基上培养7d 左右，可形成直径约为10～600μm 的细小菌落，解脲脲原体菌落更小，直径仅15～25μm。菌落为圆形、光滑、透明，边缘整齐，菌落中心致密凸起，四周扁平。在低倍镜下观察，菌落似“油煎蛋”状、乳头状或桑椹状。

某些支原体能利用葡萄糖或精氨酸作为能源，如肺炎支原体、生殖道支原体和发酵支原体等能发酵葡萄糖产酸不产气，使酚红指示剂变黄。而另一类支原体如人型支原体、唾液支原体、口腔支原体、颊支原体、咽支原体、嗜脂支原体和发酵支原体等能水解精氨酸，使培养基pH 值升高，酚红指示剂变红。解脲脲原体不发酵葡萄糖，也不水解精氨酸，但能分解尿素，使培养基pH 值升高，酚红指示剂变红。临床常见支原体生物学特性鉴别见表6－8－77。

表6－8－77　部分支原体生物学特性鉴别

支原体	红细胞吸附	过氧化氢酶产生	葡萄糖发酵	精氨酸水解	尿素水解	原始定植部位
肺炎支原体（M.pneumoniae）	＋	＋	＋	－	－	口咽部，呼吸道
唾液支原体（M.salivarium）	－	－	－	＋	－	口咽部
口腔支原体（M.orale）	－	－	－	＋	－	口咽部
颊支原体（M.buccale）	－	－	－	＋	－	口咽部
咽支原体（M.faucium）	－	－	－	＋	－	口咽部
嗜脂支原体（M.lipophilum）	－	－	－	＋	－	口咽部
发酵支原体（M.fermentans）	－	－	＋	＋	－	泌尿生殖道，口咽部
人型支原体（M.hominis）	－	－	－	＋	－	泌尿道，阴道，子宫颈
生殖道支原体（M.genilalium）	＋	＋	＋	－	－	泌尿生殖道，口咽部
灵长类支原体（M.primatum）	－	－	－	＋	－	泌尿生殖道，口咽部
解脲脲原体（U.urealyticum）	＋／－		－	－	＋	泌尿道，阴道，子宫颈

注：＋表示90％以上阳性；－表示90％以上阴性；＋／－表示多数（90％以下）阳性，少数阴性

支原体有许多特性与细菌L型相似，如形态多形性、对低渗敏感、可通过滤菌器、菌落呈“油煎蛋”样。但细菌L型在去除诱导因素情况下，可返祖为原细菌，支原体则不能返祖。

二、鉴定

（1）分离培养：目前分离培养支原体大部分采用液体、固体两步法，先接种选择性液体培养基，再转种于固体培养基，根据生长和菌落特征、菌落染色、生化反应及特异性分型血清生长抑制试验等对分离得到的支原体进行鉴定。菌落染色是用含美蓝和天青Ⅱ的Diene’s染液染色，染色后支原体菌落中心为翠蓝色，边缘浅蓝色，不易褪色。其他细菌菌落不着色，细菌L型菌落着色后易褪色，藉此可鉴别。培养法鉴定支原体需时较长。

（2）血清学试验：支原体血清学试验包括特异性血清学试验（如补体结合试验、代谢抑制试验、生长抑制试验、间接血凝试验、免疫荧光试验和ELISA等）和非特异性血清学方法（如诊断肺炎支原体的冷凝集试验）。当前测定支原体患者血液中抗体仍以补体结合试验为主，ELISA可测定IgG和IgA抗体，特异性较高，比补体结合试验和代谢抑制试验更敏感。

（3）聚合酶链反应：本法检测标本中支原体核酸敏感性好、特异性强，且快速。

（一）肺炎支原体

肺炎支原体通过呼吸道传播引起原发性非典型肺炎、咽炎和支气管炎。多发于儿

童、青年，秋冬季较多见。此外，肺炎支原体还可引起肺脓肿、胸膜炎等。

1．生物学特性

基本形态呈球形与丝状。革兰染色为阴性，但不易着色，吉姆萨染色3h 以上呈淡紫色，在支原体固体培养基上，5％二氧化碳或5％二氧化碳、95％氮气环境中，35℃培养1～2 周，可形成桑椹形菌落，无明显边缘，多次传代后，生长较快，菌落呈“油煎蛋”状。发酵葡萄糖，不利用精氨酸及尿素，产生过氧化氢，还原美蓝，在有氧条件下能还原氯化三苯四氮唑。对热和干燥敏感，56℃很快灭活，冻干后可长期保存。对石炭酸、甲醛等敏感，对青霉素、美蓝、醋酸铊等不敏感。

2．鉴定

（1）分离培养和鉴定：将标本接种于支原体液体和固体培养基上，置5％二氧化碳或5％二氧化碳、95％氮气环境中，35℃孵育1～2 周观察。液体培养基中生长的支原体应转种于固体培养基，出现菌落后，观察菌落形态与菌落染色特性，并结合生化反应、血细胞吸附和溶血性等试验进行鉴定。

（2）血清学试验：冷凝集试验是一种简易的非特异性方法，33％～76％患者该试验结果阳性。冷凝集效价大于1∶32 以上有诊断意义。特异性血清学试验包括补体结合试验、ELISA 和间接荧光抗体试验等。单次补体结合试验血清抗体效价≥1∶128，提示有近期感染。恢复期比急性期效价升高4 倍以上，有诊断价值。

（3）聚合酶链反应：可直接从标本中快速检测肺炎支原体。

（二）解脲脲原体

解脲脲原体常寄居在人、牛、犬等的泌尿生殖道粘膜，主要通过性行为传播，引起非淋病性尿道炎，潜伏期1～3 周。解脲脲原体感染还可并发附睾炎、慢性前列腺炎、宫颈炎、阴道炎、自发性流产、死胎及早产、低体重胎儿、中枢神经系统感染及败血症，其次可致男性不育等。

1．生物学特性

解脲脲原体呈球形，直径0.3～0.5μm，单个或成对排列，革兰染色阴性，不易着色，吉姆萨染色3h 呈紫蓝色。在固体培养基上5％二氧化碳、95％氮气环境下，培养1～2d 后可长出直径15～30μm 菌落，中心致密隆起，深入琼脂中，菌落形态似“油煎蛋”状。解脲脲原体不分解糖类与精氨酸，不还原TTC，但能分解尿素，由此与肺炎支原体和人型支原体鉴别。

2．鉴定

分离培养是实验室诊断的金标准。将标本（0.1～0.2ml）接种于含尿素的液体培养

基中，在37 ℃培养1 ～2d ，解脲脲原体分解尿素，酚红指示剂由桔黄色变为粉红色，液体轻微混浊，提示解脲脲原体生长，立即取0.2ml 培养物转种于固体培养基上，在5 % 二氧化碳、95 % 氮气环境下，培养1 ～2d 后，可形成微小的菌落，显微镜下观察呈“油煎蛋”状，然后进行生化反应、锰盐氧化试验等作初步鉴定，进一步鉴定用特异性抗血清作生长抑制试验 （GIT） 和代谢抑制试验 （MIT）。若72h 仍无菌落生长可视为阴性。GIT 是将吸有型特异血清的滤纸片置于种有解脲脲原体的固体培养基上，孵育后，如有抑制生长现象出现，表示该解脲脲原体与所采用的血清同型；MIT 是将解脲脲原体接种在含有抗血清与酚红的尿素培养基中，若抗体与解脲脲原体相应，则可抑制解脲脲原体生长，酚红不变色。

㈢ 人型支原体

人型支原体是泌尿生殖道的一种支原体，可引起人类的非淋病性尿道炎，主要通过性行为传播，还可引起盆腔炎、宫颈炎、慢性前列腺炎、羊膜炎、产后感染、肾盂肾炎、肺炎、脑膜炎、菌血症、脓肿等。

人型支原体在形态结构、染色性等方面与解脲脲原体相似。在固体培养基上生长的菌落呈典型的“油煎蛋”状，直径40 ～60 μm ，个别菌落直径达100 ～200 μm 。人型支原体可分解精氨酸，使培养基pH 值上升，酚红指示剂变红。人型支原体不分解葡萄糖和尿素。分离培养和鉴定方法与解脲脲原体相同。

㈣ 生殖道支原体

生殖道支原体基本形态为烧瓶状，能发酵葡萄糖，使培养基变酸，不分解尿素和精氨酸。与发酵支原体一样对营养要求高，在普通支原体培养基中不生长，需在不含醋酸铊的SP －4 培养基上生长，生长缓慢，菌落可呈典型“油煎蛋”状。

鉴定与解脲脲原体相同。由于生殖道支原体生长缓慢且难培养，因此不适宜常规实验室分离培养。近年来，国外通过PCR 法检测临床标本中生殖道支原体的DNA 来诊断生殖道支原体感染。生殖道支原体感染可能与持续性复发性非淋病性尿道炎、急性盆腔炎、尿道炎、阴道炎、慢性前列腺炎等有关。

第十一节　细菌L 型

细菌L 型是细菌因变异而产生的细胞壁缺陷型，1935 年由Klieneberge 首先在Lister 研究院发现，故取Lister 的第一个字母“L ”命名。目前发现细菌L 型与许多慢性反复感染有关。在临床上可引起肾盂肾炎、骨髓炎、心内膜炎等病。

根据其细胞壁的缺陷程度不同可分为两类：

原生质体（protoplast）：革兰阳性菌细胞壁主要成分是肽聚糖，在溶菌酶或作用于细胞壁合成的青霉素、头孢菌素等因素作用下，易使细胞壁完全缺失，而原生质仅被一层细胞膜所包裹，称为原生质体。由于原生质体内部的渗透压较高（达20～5 个大气压），故在高渗环境中（如10％～20％的蔗糖溶液）原生质体可保持完整性而存活，而对低渗非常敏感。

圆球体（spheroplast）：革兰阴性菌细胞壁肽聚糖含量少，虽然肽聚糖被破坏，但仍有其他成分如外膜等保护，且胞浆内渗透压（5～6 个大气压）也较低，在非高渗环境如普通培养基中仍能存活。这种部分缺失细胞壁的细菌称为圆球体。

1．生物学特性

细菌L 型呈杆状、丝状、圆形或卵圆形等多种形态，大小差别很大，最小球形颗粒仅0.05～0.50 μm，称原生小体，1 μm 左右的称圆柱体，1.5～30.0 μm 的称巨形体。因细胞壁缺失，革兰染色常发生改变，革兰阳性菌变为L 型后，可变成阴性。因此在同一张片子上可同时见到革兰阳性及阴性菌，着色不均。细胞壁染色，菌体呈深紫色。

细菌L 型需在高渗和营养丰富的条件下才能生长。培养基中需加入10％～20％的人或马血浆，0.8％～1.0％的琼脂。此外，尚需加入大量蔗糖（15％）与氯化钠（3％～5％），以维持其环境中的渗透压。对温度及气体的要求与原菌相同。细菌L 型生长缓慢，培养2～7d 才见生长。在液体培养基中，细菌L 型呈颗粒状生长，颗粒可粘附于管壁或沉淀于管底。在固体培养基中，菌落有3 种类型：

（1）“油煎蛋”样（L 型）：其核心部分致密，透光度差，嵌入培养基中，不易刮下，周围呈透明的颗粒状。

（2）颗粒状（G 型）菌落：无核心部分。

（3）丝状（F 型）菌落：中心致密，边缘或整个菌落由长丝构成。在同一标本中，以上3 种类型菌落可同时存在。有时也可与原菌菌落同时存在。

当抑制物去除后，细菌L 型仍可回复至原来形态，此为L 型的返祖。L 型的返祖与培养基的物理性状及营养条件有密切关系。此外，还与细菌L 型的种类等有关。细菌L 型有返祖特性，这是与支原体区别的要点。有些较稳定的细菌L 型不易返祖。

细菌L 型因细胞壁缺陷，其生化特性（如酶的产生、糖的酵解及溶血反应等）可发生改变。因细胞壁缺失程度不同，同种细菌的生化反应也不尽相同。返祖后生化反应则可恢复。因此，对细菌L 型的鉴定通常在其返祖后进行。细菌L 型对抗生素的敏感性往往与原菌有所不同。其对青霉素及头孢菌素等主要作用于细菌细胞壁的抗生素常耐药。庆大霉素、链霉素及卡那霉素等干扰细菌蛋白质合成的氨基糖苷类抗生素，对原菌及细

菌L 型均有抑制作用。红霉素、四环素等虽能抑制细胞质内蛋白质合成，但不易透过细胞壁，故对细菌L 型的抑制作用比原菌强。氯霉素作用机制与红霉素和四环素相似，但易透过细胞壁，故对细菌L 型及其原菌均有较好的抑制作用。

2．鉴定

⑴ 标本采集与分离培养：血液、骨髓、胸腹水、尿液及其他穿刺液，先接种于高渗增菌液及一般增菌液（枸橼酸钠肉汤）内，每瓶各接种1.5～2.0ml。35℃孵育，逐日观察有无细菌生长。有细菌生长时，再分别用棉拭子点种于细菌L 型琼脂平板及血琼脂平板上，尔后用接种环做放射状划线。置35℃孵育2～7d，逐日观察菌落生长情况。

脓及痰液标本可直接挑取标本，点种于细菌L 型琼脂平板及血琼脂平板上，再做放射状划线后置35℃孵育。

⑵ 鉴定：首先确定细菌L 型，然后返祖定种。根据血琼脂平板上不长，而在L 型琼脂平板上生长，并形成典型的L 型、G 型或F 型菌落，再结合细胞壁染色，菌体形态的多形性，革兰染色多变性、不均一性等多方面资料进行综合分析后确定。若在血琼脂平板及细菌L 型琼脂平板上同时生长，并证明是L 型菌落者，报告细菌和L 型同时存在。但应注意某些葡萄球菌在高渗环境下也可生长。

⑶ 返祖定种：将细菌L 型直接转种血琼脂平板，每1～3d1 次，必要时先转种普通肉汤后再转种血琼脂平板。多数菌株1～2 代后即可返祖，返祖后按常规方法鉴定。

第十二节　螺旋体

螺旋体是一类细长、柔软、弯曲呈螺旋状，运动活泼的原核细胞型微生物。广泛存在于自然界和动物体内，种类很多，某些种能使人和动物致病。在分类学上，隶属于螺旋体目，包括螺旋体和钩端螺旋体2 科。前者有脊膜螺旋体属（Cristispira）、螺旋体属（Spirochaeta）、密螺旋体属（Treponema）和疏螺旋体属（Borrelia）等4 属；后者仅有钩端螺旋体（Leptospira）1 属。医学上重要的螺旋体主要是钩端螺旋体、密螺旋体、疏螺旋体3 属。

一、钩端螺旋体属

钩端螺旋体因菌体一端或两端弯曲呈钩状而得名。钩端螺旋体属有2 种，即问号钩端螺旋体和双曲钩端螺旋体，前者是致病性钩端螺旋体，能引起人类或动物的钩端螺旋体病；后者是腐生性钩端螺旋体。钩端螺旋体病可引起心、肝、肾和肾上腺等多器官损伤。

1．生物学特性

钩端螺旋体呈细长丝状圆柱形，长短不等，大约6～20μm，平均6～10μm；直径0.1～0.2μm。螺旋盘绕细密而规则，菌体一端或两端弯曲成钩状，无鞭毛，但运动活泼，其运动方式主要是沿长轴旋转，或两端扭转伸屈，或匍匐运动。革兰染色阴性，一般染色法较难着色，常用镀银染色法和荧光抗体染色法染色。

专性需氧对营养要求不高，是致病性螺旋体中惟一可以人工培养的螺旋体。常用柯少夫（Korthof）或切尔斯培养基，含10％新鲜灭活兔血清或血清白蛋白加长链脂肪酸。最适pH7.2～7.4，最适温度28～30℃。钩端螺旋体生长缓慢，大部分钩端螺旋体需培养1～2周，有些需6周或更长时间。在液体培养基中培养1周左右，一般在液面下1cm处生长最旺盛，可见培养基由透明变成半透明云雾状。在含10g/L琼脂的适宜固体培养基上，培养约2周后，可形成圆形、扁平、无色半透明的菌落。菌落大小不等，大的可达4.0～5.0mm，且透明；小的约0.5～1.0mm，不透明。菌种保存可使用半固体，每2～6个月转种1次。长期保存使用液氮。

2．鉴定

（1）标本的采集和制备：发病1周内的败血症期可采取血液标本，2周后的菌尿期可取尿液标本，有脑膜炎症状者采取脑脊液标本。

对血液标本，取血液5ml注入含10％草酸钠溶液0.5ml试管抗凝，1000r/min离心10min，取血浆再4000r/min离心30～60min，取沉淀物待检；尿液或脑脊液标本则3000r/min离心60min、取沉淀物待检。

（2）显微镜检查：利用暗视野显微镜直接检查患者各种经离心沉淀标本中的钩端螺旋体，方法简便、快速，有早期诊断意义，但检出率较低。亦可制成干片用镀银染色法或直接荧光抗体或免疫酶染色法检查。用直接荧光抗体染色法检查标本中相应钩端螺旋体抗原，在荧光显微镜下可见发出荧光的抗原抗体复合物。该方法快速，特异性和敏感性高。

改良镀银染色时，钩端螺旋体呈棕褐色，背景淡黄色。

（3）分离培养：可为临床提供确切诊断，并可鉴定群和型。

血液标本：应采集发病早期（1周内）未用药治疗前的血液，每份标本同时接种3支Korthof培养基，每支5ml培养基接种2～3滴为宜。置28～30℃需氧环境培养5～7d，即可用暗视野显微镜检查有无钩端螺旋体生长。一般7～10d为繁殖高峰，培养基可呈云雾状混浊。如有钩端螺旋体生长，移种固体培养基，分离培养出菌落后，即可采用标准免疫血清作显微镜凝集试验来鉴定和分型。如连续培养1个月仍未发现钩端螺旋体生长，才能发出结果阴性的报告。

尿培养：发病2 周后可留取中段尿或用无菌法导尿，取0.5ml 尿接种2 ～3 管Korthof 培养基进行培养，其余步骤同血培养。

问号钩端螺旋体与双曲钩端螺旋体从形态上很难区别。可用下述试验区别：前者在13 ℃或含有225 μg／ml8 －氮杂鸟嘌呤条件下不生长，而后者能生长；前者在1mol／L 氯化钠环境下能迅速转变成圆球形，而后者则不能。

4） 动物接种：动物接种是分离钩端螺旋体的一种敏感方法。将待检标本注入动物（豚鼠或金地鼠） 腹腔，接种量血液和脑脊液均为1.0 ～2.0ml、尿液沉渣为0.5ml，脏器组织悬液为0.5 ～1.0ml。一般动物于3 ～7d 内发病。自第1 周起，取心腔内血液及腹腔液镜检和培养；尸体解剖检查，可见皮下和肺部有出血斑，内脏中有大量钩端螺旋体。

5） 血清学检查：利用已知抗原检测血清标本中抗体效价，也可用已知抗体鉴定钩端螺旋体的群和型。常用血清学试验方法如下。①显微镜凝集试验：该试验有较高的特异性及敏感性，是目前应用最广的钩端螺旋体血清学试验方法。当待检血清中有相应抗体存在时，则与已知型钩端螺旋体发生凝集。②间接免疫荧光试验：是用荧光素标记抗球蛋白抗体 （抗抗体） 来检测抗原或抗体。③间接凝集试验：将钩端螺旋体的属特异性抗原吸附于绵羊红细胞、活性炭、聚苯乙烯乳胶载体颗粒上，然后用此抗原致敏颗粒，在微量塑料凹孔板上与不同稀释度的待检血清作间接血凝、炭凝和乳胶凝集试验。若待检血清中有相应抗体，则出现肉眼可见的凝集现象。④协同凝集试验：钩端螺旋体特异性抗体的Fc 段能与葡萄球A 蛋白发生结合，若与相应抗原相遇，则暴露在葡萄球菌表面的抗体Fab 段与抗原结合，即可出现肉眼可见的协同凝集反应，从而鉴定出钩端螺旋体和相应群别。⑤酶联免疫吸附试验：用钩端螺旋体抗原包被于聚苯乙烯微量反应板凹孔中，检测待检血清中相应抗体。本法敏感性与特异性均高，如同时检测特异性IgM ，则具有早期诊断意义。

二、密螺旋体属

密螺旋体属现有13 种，对人类致病的主要是苍白密螺旋体 （T.Pallidum） 和卡拉登密螺旋体 （T.carataum）2 种。其中苍白密螺旋体又可分成3 亚种：

1） 苍白密螺旋体苍白亚种 （T.pallidum ssp.pallidum）：即梅毒螺旋体，是引起梅毒的病原体。

2） 苍白密螺旋体极细亚种 （T.pallidum ssp.pertenue）：即雅司螺旋体，是引起雅司病的病原体，常见于热带地区，接触传播。

3） 苍白密螺旋体地方病亚种 （T.pallidum ssp.endemicum）：可引起非性病的地方病梅毒，接触传播，发生于非洲及中东等地区。卡拉登密螺旋体，即品他密螺旋体，引起品他病 （Pinta），主要发生在中、南美洲的一种慢性皮肤病。目前，品他病和非性病的

地方病梅毒发病率均较低。

(一) 梅毒螺旋体

梅毒螺旋体是梅毒的病原体，主要通过性接触传播，也可通过胎盘垂直传播。临床过程可分硬下疳期、梅毒疹期、晚期。

1．生物学性状

梅毒螺旋体体型纤细，长5～15μm，宽0.1～0.2μm，两端尖直，有8～15个呈锐角弯曲而规则的螺旋。在暗视野显微镜下观察，运动活泼。运动有3种形式，即沿纵轴旋转、前后运动或蜿蜒前进。梅毒螺旋体用一般染色法不易着色，用吉姆萨染色呈淡红色。

梅毒螺旋体在体外不易培养。有毒力Nichols株只能在家兔睾丸和眼前房内繁殖并保持毒力，但繁殖缓慢，30～35h才分裂1次。

梅毒螺旋体对外界环境抵抗力很弱，对干燥和热尤为敏感。在体外干燥环境下1～2h或加热50℃5min即死亡。10～20g/L苯酚溶液中数分钟可死亡。对四环素、青霉素、红霉素等敏感，砷、汞、铋、碘等制剂可消除其活力。

2．鉴定

(1) 直接镜检：此法主要适用于初期梅毒的检查，因下疳病灶中有大量螺旋体存在，可取下疳或其他病灶组织渗出液制成涂片。在暗视野显微镜下检查，若见菌体细长、两端尖锐、呈弹簧状螺旋、折光率强、并可沿纵轴旋转伴有轻度前后运动的密螺旋体，结合临床症状，可初步判为梅毒螺旋体，也可经镀银染色、吉姆萨染色后用光镜检查，或用直接免疫荧光技术检查。

(2) 血清学检查：可分为非特异性试验和特异性试验。前者用正常牛心肌类脂提取物测定待检血清中的反应素，常用方法有：性病研究实验室试验（venerel disease research laboratory，VDRL）、不加热血清反应素试验（unheated serum reagin test，USR）和快速血浆反应素试验（rapid plasma reagin，RPR）。此类试验操作简单，敏感性高，但可出现假阳性，一般作为常规筛查试验。后者用梅毒螺旋体作为抗原，检测待检血清中的梅毒螺旋体特异性抗体，为确证试验，包括荧光密螺旋体抗体吸收试验（fluorescent treponemal antibodyabsorption，FTA－ABS）、梅毒螺旋体血凝试验（treponemal pallidum hemagglutination，TPHA）和梅毒螺旋体制动试验（treponema pallidum immobilization，TPI）。

(二) 雅司螺旋体

极细密螺旋体（treponema pertenue）亦称雅司螺旋体，是雅司病（yaws）的病原体。生物学性状与梅毒螺旋体极相似，两者的形态、染色性和血清学试验结果均相似。

雅司病常见于温暖潮湿的热带地区的乡村，多侵犯儿童。主要通过直接传染，或由苍蝇作为传播媒介间接传染。迄今尚未证实有先天性感染。其临床表现与梅毒很相似，也有反复隐伏和再发的特点，对骨和皮肤有破坏性的损害。与梅毒的区别主要靠临床和流行病学特征。微生物学检验与梅毒相同。

三、疏螺旋体属

疏螺旋体属又称包柔氏螺旋体属（Borrlia），现有20 种，均由节肢动物（蜱或虱）携带，其中对人类致病的主要为伯氏疏螺旋体、回归热疏螺旋体和杜通疏螺旋体3 种。

（一）伯氏疏螺旋体

伯氏疏螺旋体又称伯氏包柔氏螺旋体，是引起莱姆病（Lyme disease）的病原体，传播媒介为蜱，是一种全球性分布的自然疫源性疾病，流行范围广。莱姆病主要引起皮肤损害，表现为游走性红斑，同时可伴有发热、头痛、颈硬、肌痛和关节痛等症状，数月后可出现神经系统损害和精神异常等。

1．生物学特性

伯氏疏螺旋体是疏螺旋体属中最长和最细的螺旋体，长20 ～30 μm，直径0.2 ～0.3 μm。螺旋稀疏不规则，菌体两端尖，有7 ～10 根鞭毛，运动活泼，革兰染色阴性，吉姆萨染色呈紫色。微需氧，最适生长温度30 ～35 ℃，在改良的Kelly’s 培养基上，该螺旋体生长缓慢，需培养7 ～14d。

2．鉴定

（1）直接镜检：取标本直接用暗视野显微镜查螺旋体，或用吉姆萨染色后镜检。

（2）分离培养：将标本接种在改良的Kelly’s 培养基上，33 ℃微需氧条件下培养14d 后，取培养物在暗视野显微镜下检查有无螺旋体生长。

（3）血清学检查：临床对莱姆病的实验诊断主要靠血清学检查，包括间接免疫荧光试验（FA）、ELISA 等检测患者血清中的IgM 或IgG 抗体。

（4）聚合酶链反应：检测标本中伯氏疏螺旋体DNA。

（二）回归热疏螺旋体和杜通疏螺旋体

回归热疏螺旋体以人类体虱或头虱携带并为传播媒介，人类是惟一储存宿主，引起人类流行性回归热，又称虱传播型回归热；杜通疏螺旋体以蜱携带为传媒和宿主，引起人类地方性回归热，又称蜱传播型回归热。

1．生物学特性

两种螺旋体的形态相同，长3 ～20 μm，直径0.2 ～0.5 μm，菌体呈波浪形，有3 ～10

个不规则的疏螺旋。革兰染色阴性，用吉姆萨或瑞特染色呈紫色。

在含有天然动物蛋白质的特殊培养基上，于微需氧环境下培养才能生长。培养温度28～30℃，繁殖速度较慢，每繁殖1代约需18h。接种于动物和鸡胚绒毛尿囊膜则繁殖较快。

2．鉴定

(1) 直接镜检：采集血、尿或脑脊液等标本，制成厚涂片直接暗视野显微镜检查，或经吉姆萨染色后镜检。如见有卷发样，长约为红细胞直径2～5倍的疏螺旋体，即可诊断。

(2) 动物接种：将标本（抗凝血1～2ml）分别注入幼龄小白鼠腹腔内和豚鼠腹腔内，于2～5d取血检查，可见大量螺旋体。因豚鼠对虱传播型病原体不敏感，而对蜱传播型病原体敏感，故在豚鼠血中检出疏螺旋体则为蜱传播型病原体，即杜通氏疏螺旋体。

(3) 血清学检查：回归热恢复期患者血清中的抗体对螺旋体有制动作用，故可用制动试验来测定血清中相应抗体，作为辅助诊断。

第十三节　衣原体

衣原体是一类能通过滤菌器，严格真核细胞内寄生，有独特发育周期的原核细胞型微生物。属动物病原菌，也可引起人类感染。行二分裂方式繁殖，大小0.2～1.5μm，无动力，革兰染色阴性，呈球形或椭圆形。共同特征是有独特发育周期，在宿主细胞浆内能形成光学显微镜下可见的细胞内包涵体；具有粘肽所组成的细胞壁，且含胞壁酸；含DNA和RNA两种类型核酸，有独立的酶系统，能分解葡萄糖释放二氧化碳，但不产生代谢能量，必须依靠宿主细胞产生的ATP提供能量；含有核糖体；对多种抗生素敏感。

属内有4种，即沙眼衣原体（C.trachomatis）、鹦鹉热衣原体（C.psittaci）、肺炎衣原体（C.pneumoniae）和家畜衣原体（C.pecorum）。沙眼衣原体有沙眼生物变种、性病淋巴肉芽肿生物变种（LGV）和鼠生物变种3个变种。其中沙眼生物变种有A～K 12个血清型，LGV可分L_1～L_3 3个血清型，鹦鹉热衣原体至少有8个血清型。家畜衣原体的病原性作用还不清楚，鉴定需特殊试剂。

在光学显微镜下可见到衣原体有大小两种形态，小的称原体，有感染性；大的称为始体，无感染性。衣原体生活周期按发育过程大体上可分为原体吸附、侵入，始体再生和分裂及原体释放3阶段。衣原体有3种抗原，即属共同性抗原、种特异性抗原和型特

异性抗原。衣原体能产生内毒素，其化学成分为脂多糖。3 种衣原体的主要生物学特性见表6 —8 —78 。

表6 —8 —78　3 种衣原体的主要生物学特性

衣原体	宿主	原体形态	包涵体形态	包涵体中糖原	对磺胺药敏感性	DNA 同源性	质粒DNA
沙眼衣原体	人，鼠	圆形	圆形，空泡	有	敏感	10 %	有
鹦鹉热衣原体	鸟类，人，低等动物	圆形	可变，紧密	无	耐药	10 %	有
肺炎衣原体	人	梨形	圆形，紧密	无	耐药	10 %	无

一、沙眼衣原体

沙眼衣原体可引起沙眼、包涵体性结膜炎、性病淋巴肉芽肿、泌尿生殖系疾病、直肠炎、新生儿肺炎等疾病。1956 年我国科学家汤飞凡教授等应用鸡胚卵黄囊接种法，首次成功地分离培养出该病原体。

1．生物学特性

沙眼衣原体原体呈圆形，具有坚韧的细胞壁，中央致密，核质周围的原浆区狭窄，原体中有质粒DNA 。吉姆萨染色呈紫红色。始体形状不规则，核质分散。沙眼衣原体在宿主上皮细胞的胞浆内形成的包涵体，由密集的原体和始体颗粒组成，呈卵圆形空泡，吉姆萨染色呈深紫色，包涵体中含有糖原，碘染色呈棕褐色斑块。

沙眼衣原体接种鸡胚卵黄囊中生长繁殖，使鸡胚死亡，卵黄囊膜涂片可见散在衣原体，病理切片可见细胞内包涵体。也可接种动物。小白鼠对LGV 变种是敏感的，脑内感染后，病死率可达30 %。细胞培养可使用McCoy 细胞或Hela229 细胞。

2．鉴定

⑴ 直接涂片染色查包涵体：取标本涂片，自然干燥后用无水甲醇固定5 ～10 min ，用吉姆萨染色液染色1h ，在光学显微镜下观察细胞内有无包涵体。此法阳性率低

⑵ 分离培养：①组织细胞培养：用HeLa229 或McCoy 单层细胞培养，经37 ℃培养3d 观察细胞病变 (肿大、变性、脱落) 。经吉姆萨染色或直接荧光染色镜检细胞内有无包涵体。②鸡胚卵黄囊培养：将链霉素处理后的标本1 ml ，接种7 日龄鸡胚卵黄囊内35 ℃孵育。取3d 后死亡的鸡胚卵黄囊膜行吉姆萨染色，镜检包涵体。

⑶ 免疫学检验：用胶体金、荧光素或酶标记的抗沙眼衣原体的单克隆抗体来检查标本中的沙眼衣原体抗原，方法快速，已有试剂盒供应。也可用间接血凝试验、荧光抗体试验和ELISA 法等查患者血清中的抗体，IgM 效价≥1 ∶128 提示近期感染。

⑷ 分子生物学检验：用沙眼衣原体质粒中重复4 次的226bp 核苷酸为探针，可特

异、快速检测出标本中沙眼衣原体DNA。现已有同位素和酶标记及化学发光等多种探针，也用聚合酶链反应检测标本中沙眼衣原体DNA。

二、鹦鹉热衣原体

鹦鹉热衣原体天然引起大多数鸟类和许多非灵长类动物感染。人类主要是与患病鸟和动物接触或吸人含菌气溶胶后而获得感染。主要引起人类呼吸道疾病。初发症状很象流感，典型病例临床表现为非典型性肺炎，表现为干咳、少量粘液，粘液有时呈铁锈色，白细胞数可减少。鹦鹉热衣原体包涵体密度大，不含糖原，碘液染色为阴性，原体形态呈圆形，核质周围的原浆区狭窄，有质粒DNA。鉴定参见沙眼衣原体检查。

三、肺炎衣原体

肺炎衣原体主要导致青少年急性呼吸道感染，以肺炎症状多见，常呈地方性、散发性流行，症状较轻，可以自愈；其次为支气管炎、咽炎等。代表株为TW －183、AR －39。在组织细胞和鸡胚中可对肺炎衣原体进行培养。在HeLa 细胞中其包涵体形态与鹦鹉热衣原体十分相似，用吉姆萨染色，包涵体呈深密度的卵圆形，不含糖原，碘染色阴性。肺炎衣原体原体形态呈梨形，可与沙眼衣原体和鹦鹉热衣原体典型的圆形原体形态相区别。核质周围的原浆区很宽区内有电子致密小体，无质粒DNA。鉴定参见沙眼衣原体检查。

第十四节　立克次体

立克次体是一类微小的杆状或球杆状、革兰染色阴性、绝大多数只能在宿主细胞内繁殖的原核细胞型微生物。归属于立克次体目、立克次体科，对人类致病的立克次体主要包括立克次体属、罗沙利马体属、柯克斯体属、埃立克体属、库里克体属和新立克次体属等属中的20 余种。立克次体属又分为斑疹伤寒、斑点热和恙虫病等3 群。人类感染立克次体主要通过虱蚤、蜱等节肢动物的叮咬或其粪便等传播。引起人类感染的立克次体种类很多，临床上较为常见的病原性立克次体主要有普氏立克体、恙虫病立克次体和伯氏考克斯体 （又称Q 热立克次体）。我国存在斑疹伤寒、恙虫病、斑点热等病，也有埃立克次体感染。

1．生物学特性

立克次体呈球杆状或多形态，如球形、长杆状、丝状等，大小为 （0.3～0.6） μm × （0.8～2.0） μm ，成双排列或呈短链状。革兰染色阴性，但不易着色。常用吉姆萨和Macchiavello 法染色，前者立克次体染成紫色或蓝色，后者染成红色。立克次体的结构

和化学组成与革兰阴性菌相似。在感染的宿主细胞内排列不规则。各种立克次体在细胞内存在部位有所不同，普氏立克次体分散于胞质中，恙虫热立克次体在胞浆近核处堆积，Q 热立克次体在胞浆空泡内繁殖，罗沙利马体粘附于细胞外表面。

除罗沙利马体属能在无细胞培养基中生长外，大多数立克次体只能寄生在活细胞内。以二分裂方式繁殖，繁殖1 代需时约9 ～12h。培养立克次体的常用方法有动物接种、鸡胚接种和细胞培养。细胞培养中，要在培养3 ～4d 后方可证明立克次体繁殖。一般对细胞培养的选择性不高，可在鸡胚、哺乳动物和节肢动物的多种类型的细胞中生长，如骨髓细胞、血单核细胞和中性粒细胞等，最适生长温度为32 ～35 ℃。罗沙利马体可在血琼脂平板及含氨基酸、酵母提取物、胎牛血清或羟高铁血红素的肉汤中生长。

立克次体属病原体所含脂多糖（LPS）为属特异抗原，与变形杆菌OX 株及军团菌属LPS 有交叉反应。

2．鉴定

立克次体易引起实验室感染，其分离与鉴定必须在安全防护的条件下进行。

（1）标本的采集：主要采集患者的血液，以供病原体分离或作免疫学检测。一般在发病初期或急性期，尽量在抗生素使用前采血，否则难以获得准确结果。采集急性期与恢复期双份标本作血清学试验，以观察抗体效价变化。

（2）分离培养：将标本（血液、血块或其他组织悬液）直接接种至易感动物腹腔。除恙虫病立克次体用小鼠、小蛛立克次体用豚鼠和小鼠分离外，其他立克次体的初代分离均用豚鼠。若接种后豚鼠体温高于40 ℃，同时有阴囊红肿，表示有立克次体感染，应进一步将分离的毒株接种鸡胚或细胞培养，然后通过免疫学检测加以鉴定。

（3）检测：①免疫荧光检测。本法多用于脏器标本的检查。将标本切开、固定后用荧光抗体染色或常规染色镜检。必要时作切片检查。荧光显微镜下可见脾、肺及心瓣膜赘生物中有立克次体，也可在肝、肾及皮疹活检组织中检出。②PCR 和核酸探针检测。用PCR 直接从临床标本快速诊断立克次体感染，如斑点热。用PCR 扩增立克次体的特异性片段，然后用DNA 探针证实其感染，如立氏立克次体。③血清学试验。常用外－斐反应、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验，还有补体结合试验、微量凝集试验、间接血凝试验及胶乳凝集试验。

一、普氏立克次体

普氏立克次体是流行性斑疹伤寒和复发型斑疹伤寒的病原体，它常以人虱为媒介在人群中传播，往往引起大流行。

1．生物学特性

为革兰阴性类球形小杆菌，大小为（0.3 ×0.6）μm ～（0.7 ×2.0）μm，单个或呈双

球状、链状排列。吉姆萨染色呈紫红色，并有两极浓染。可用鸡胚卵黄囊或细胞进行培养。加热56 ℃30 min 可以灭活，紫外线照射数分钟即死亡。对一般消毒剂均敏感。

2．鉴定

(1) 外－斐反应：一般斑疹伤寒患者能产生高效价的OX_{19}凝集素及低效价的OX_2凝集素，但不与OX_k发生凝集。若与变形杆菌OX_{19}及OX_2抗原的效价在1 ∶160 以上，或恢复期血清抗体效价比早期增高24 倍或以上者 (排除假阳性结果)，有诊断意义。

(2) 补体结合试验：补体结合试验用于斑疹伤寒及其他立克次体病的检验均有很高的特异性和敏感性。补体结合抗体在第2 周阳性率可达90 %以上。抗体效价以第3 周最高。

二、伯氏柯克斯体

伯氏柯克斯体又称Q 热立克次体，是Q 热的病原体。经壁虱传播给野生啮齿动物及家畜 (如绵羊、山羊和牛等)，在动物间通过蜱传播，并可经卵传代。动物感染后多无症状，但排泄物中可长期带有病原体。感染动物的尿、粪排出体外，污染环境，人类经接触或呼吸道、消化道等途径受感染。乳牛感染可引起乳房慢性感染，人类饮用未经彻底消毒的乳制品可感染。

1．生物学特性

大小为 (0.2～0.4) μm × (0.4～1.0) μm，呈多形性，如短杆菌或球杆菌状，成对排列，亦往往聚集成堆，位于细胞质内。Q 热立克次体耐热，60 ℃存活1h ；牛乳中煮沸1h 才可被杀死。耐干燥，在蜱的干粪中可存活500d ；干燥血迹中可存活约半年。

2．鉴定

发病早期采取患者血接种豚鼠腹腔，在动物发热时取脾涂片检查。亦可用鸡胚卵黄囊或小鼠成纤维细胞培养分离。

Q 热患者的外－斐反应阴性，主要通过补体结合试验、凝集反应及间接免疫荧光技术测定抗体以辅助诊断。

三、恙虫病立克次体

恙虫病立克次体是恙虫病的病原体，在自然界中寄居于恙螨体内，具有典型的自然疫源性。人、家畜、野生动物被含恙虫病立克次体的恙螨叮咬后感染。

1．生物学特性

恙虫病立克次体为多形性，多呈球杆菌状或短杆菌状，大小为 (0.3～0.5) μm × (0.8～2.0) μm，成对分布。吉姆萨染色呈红色。抵抗力弱，加热56 ℃数分钟死亡。能在广泛的宿主细胞内生长。

2．鉴定

可通过外－斐氏反应、补体结合试验、免疫荧光技术和病原体培养等作出鉴定。恙虫病患者血清与OX_k抗原有强的凝集反应，对OX_{19}、X_2原反应弱或无反应。患者血清中OX_k抗体在2～4周达高峰，5周后开始下降，一般认为效价1∶160有参考价值，效价达1∶320或以上，才能排除其他疾病。最好在早晚期各检查1次，效价增高4倍有助于确诊。

四、杆菌性血管瘤－杆菌性紫癜病和猫抓病立克次体

罗沙利马体属微生物能在人工培养基上生长。本属代表株是五日热罗沙利马体，为革兰阴性短杆状，无鞭毛，无荚膜。在血琼脂或含高铁血红蛋白的脑心组织浸液的人工培养基中生长繁殖，初次37℃下分离12～14d，传代后3～5d可生长。在琼脂平板上可见圆形、凸起半透明、粘液状菌落。是战壕热（五日热）的病原体，也可导致杆菌性血管瘤－杆菌性紫癜。主要传播媒介是体虱。临床表现为发热及皮疹。

本属中新发现的汉赛罗沙利马体可引起杆菌性血管瘤－杆菌性紫癜和猫抓病。

杆菌性血管瘤－杆菌性紫癜常发生于免疫功能低下者，临床表现为皮肤损伤和内脏发生紫癜。病变处可见杆菌状小体。任何实质性器官可发生杆菌性血管瘤，难与分枝杆菌和真菌感染或恶性肿瘤鉴别。而杆菌性紫癜则多见于肝和脾，患者有发热、体重减轻、腹胀或腹痛、脾或肝大。

猫抓病多发于儿童。起先在被猫狗抓咬部位形成丘疹或脓疱，继而发生局部淋巴结炎，或出现发热、全身不适等症状。病原体除汉赛罗沙利马体外，还有可能为猫抓病杆菌（Afipiafelis）。

五、埃立克次体

埃立克次体属包括腺热埃立克次体、查菲埃立克次体和人粒细胞埃立克次体。腺热埃立克次体引起腺热。临床症状为发热、头痛、肌痛、关节痛和淋巴结肿大。淋巴细胞数增加，有非典型淋巴细胞出现。红细胞沉降系数增加，C反应蛋白阳性，血清中转氨酶活性升高。外－斐反应和Paul－Bunnell嗜异性凝集反应呈阳性。

查菲埃立克次体和人粒细胞埃立克次体为人埃立克次体病的病原体。患者因蜱咬而感染，出现发热、头痛、全身不适等症状，也有肌痛、关节痛，白细胞和血小板数明显减少，肝功能异常。需与斑点热和莱姆病鉴别。患者血清与腺热埃立克次体有交叉凝集反应。

第十五节　病毒

一、分离培养和鉴定

1．分离培养

病毒只能在活细胞内生长繁殖，根据宿主细胞对动物的敏感性和病毒的嗜性，选用敏感动物、组织或离体细胞进行分离和培养。

⑴ 动物接种：常用动物有小鼠、大鼠、豚鼠、兔和猴等。接种部位为鼻内、皮内、皮下、脑内、腹腔内、静脉等。根据病毒种类不同，选择敏感动物和合适的接种部位。如嗜神经性病毒接种于小鼠脑内，柯萨奇病毒可接种于乳鼠（1～2 日龄）腹腔或脑内。接种后，每天观察并记录动物发病情况。若动物死亡，则取病变组织制成悬液，继续接种传代以增殖。

⑵ 鸡胚接种：鸡胚对多种病毒敏感，常用于疱疹病毒、粘液病毒、痘类病毒等的原代分离。根据病毒种类，可将标本接种于鸡胚的羊膜腔、尿囊腔、卵黄囊或绒毛尿囊膜上。如流感病毒和腮腺炎病毒在羊膜腔和尿囊腔中增殖；疱疹病毒、痘病毒在绒毛尿囊膜上增殖。

⑶ 组织培养：将人或动物离体的活组织块或分散的活细胞加以培养，统称组织培养。广义的组织培养包括器官培养、组织块培养和细胞培养。最常用于病毒培养的是细胞培养，根据细胞的来源、染色体的特性及传代次数，可将培养产物分为以下3 种：①原代和次代细胞：无菌操作采取动物、鸡胚等的新鲜组织器官，将组织洗净剪碎后，用胰蛋白酶消化，制成分散的单个细胞悬液。加入营养液后，分装于培养管中培养。活细胞贴附于管壁并开始生长，当与相邻细胞相碰，则生长即停止，数天后形成单层细胞，即称原代细胞。将原代细胞培养物用胰蛋白酶或EDTA 等轻微消化洗下后，分装至含新鲜培养液的培养管中继续培养，得到的为次代细胞。②二倍体细胞株：原代细胞经多次传代仍能保持二倍体特性者称为二倍体细胞株，广泛用于病毒分离和疫苗生产。但连续传代后，二倍体细胞逐渐衰老，至停止分裂。用人胚肺建立的二倍体成纤维细胞株，可用于分离人类病毒和制备疫苗。③传代细胞系：能在体外持续增殖传代的细胞系，大多由肿瘤细胞和二倍体细胞突变而成。常用的传代细胞系有HeLa（人子宫颈癌）细胞、Hep－2（人喉上皮癌）和KB（鼻咽上皮癌）细胞等。可用于选择性地分离和鉴定病毒及其他研究，不能用于制备疫苗。

2．鉴定

分离培养得到病毒后，根据患者临床症状、标本来源、易感动物、细胞病变特征及病毒生物学特性、理化性质，可初步确定病毒。

1）细胞病变：病毒在细胞内生长增殖，可引起细胞不同程度病变，有的细胞被完全破坏，有的仅轻微病变或无可见的变化。细胞病变随病毒种类和所用细胞类型的不同而异，此变化在一定条件下比较恒定，如细胞变圆、肿大、坏死、溶解和脱落等；腺病毒使细胞肿大、颗粒增多、并聚集成葡萄状；肠道病毒使细胞圆缩、分散、不聚集并全被破坏；疱疹病毒使细胞融合形成多核巨细胞；而狂犬病病毒仅引起细胞轻微病变。

2）动物感染范围及潜伏期：依据感染动物的范围和动物发病的潜伏期不同，可初步推断是哪种病毒。

3）对鸡胚的敏感性：如B 组柯萨奇病毒仅对新生乳鼠有致病性。小鼠脑内接种乙型脑炎病毒后潜伏期为4d 。

4）红细胞吸附：由于受染的细胞膜中侵入病毒的血凝素，使受染细胞能够吸附红细胞，又称血吸作用，为病毒的增殖指标。若有相应的病毒特异性抗体，则可中和病毒抗原，是为血吸抑制试验，亦可用来鉴定病毒。

5）干扰现象：某些病毒感染细胞后，不一定引起细胞的可见变化，但能干扰以后进入病毒的增殖。

6）理化性质：通过观察和测定病毒的形态和大小、测定核酸类型、观察乙醚敏感试验和耐酸试验可检出病毒的种类。

7）其他方法：在初步鉴定的基础上，用血清学方法进行最后鉴定，如将分离到的病毒和已知病毒的参考血清作补体结合试验、中和试验、血凝抑制试验和酶联免疫吸附试验、间接免疫荧光检测，以及分子生物学的鉴定 （见第七篇分子生物学检验）。

二、显微镜检查

1．光学显微镜检查

光学显微镜可直接观察痘类病毒的单个病毒体。某些病毒感染后的细胞内，可见胞核或胞浆内出现的嗜酸或嗜碱性染色、大小和数量不同的圆形或不规则的团块结构，称包涵体。因此，也可直接检查受病毒感染的组织或细胞中的特征性包涵体，从而作出辅助诊断。

2．电子显微镜检查

1）负染色法：利用重金属盐溶液浸染病毒悬液标本，电镜下呈现病毒颗粒图像反差，即病毒是亮的、背景是暗的，与超薄切片的正染色法相反。

⑵ 免疫电镜检查法：将病毒抗原和特异性抗体结合形成免疫复合物，在电镜下观察。包括抗原抗体细胞化学和抗原抗体作用的直接电镜观察。

⑶ 超薄切片法：要求切片厚度在100nm 以下。检查保存良好的感染了病毒的细胞，可清晰观察到细胞的超微结构变化和病毒在细胞内复制的部位和形态特点、病毒大小和排列等。

第十六节　真菌

真菌为真核细胞型微生物，属于真菌界。具有典型的细胞核，不含叶绿素，单细胞或多细胞，以腐生或寄生方式摄取营养，细胞壁含几丁质和纤维素，有性或无性繁殖。真菌在自然界分布十分广泛，已知有20 万种以上，其中许多对人类是有益的，对人类、动植物致病的有百余种。按真菌侵犯人体组织和器官的不同，临床上将真菌分为浅部真菌和深部真菌两大类。前者主要侵犯机体皮肤、毛发和指（趾）甲等，引起浅部真菌病，又称为癣；后者感染深部组织和内脏，导致全身性感染，严重时可致死。

临床上最多见的浅部真菌为皮肤癣菌，包括毛癣菌属、表皮癣菌属和小孢子菌属。引起全身性感染的病原菌有念珠菌、隐球菌、曲霉菌、毛霉菌及其他酵母菌等。隐球菌感染的死亡率较高。念珠菌性败血症在院内感染中较常见。

皮下真菌病主要为着色芽生真菌病、足菌肿、孢子丝菌病等，我国较少见，患者一般都有皮肤外伤史，然后发生皮下结节或形成溃疡等，血行播散极为罕见。

真菌的原发性感染较细菌和病毒少，大多数浅部真菌可导致健康人原发性感染。当滥用抗生素引起机体菌群失调或使用免疫抑制剂、化疗以及患艾滋病等造成机体抵抗力下降时会导致机会真菌感染。因食入真菌性毒素导致急性或慢性中毒，多表现有肝、肾、神经系统、造血组织病变。有些真菌毒素还有致癌作用，如黄曲霉素等。

一、生物学特性

真菌在生长和发育过程中有多种多样的形态特征。根据其是单细胞或多细胞分为酵母菌（yeasts）或霉菌（molds）。

酵母菌菌体为圆形或卵圆形，以细胞发芽方式繁殖，菌落类似于细菌菌落。酵母样真菌也是发芽方式繁殖，其不脱离母细胞的延长芽体称为假菌丝。

霉菌比较复杂，呈丝状，菌落疏松。从功能上可分为营养体和繁殖体两种，营养体即菌体，由真菌增殖和蔓延在培养基表面或内部的菌丝所构成；繁殖体通常以菌丝片段进行繁殖，方式多种多样，大多数真菌通过有性和无性繁殖，繁殖能力较强。菌丝形态

包括单纯菌丝、球拍状菌丝、破梳状菌丝、螺旋状菌丝、结节状菌丝、鹿角状菌丝、关节状菌丝、蜡肠状菌丝等。

无性繁殖是不经过细胞核融合而形成孢子，无性孢子包括叶状孢子（芽生孢子、厚膜孢子和关节孢子）、分生孢子（大分生孢子及小分生孢子）和孢子囊孢子等。有性繁殖是由二个核的合并或接合而形成的不同类型孢子，如卵孢子、接合孢子、子囊孢子和担子孢子等。

大多数真菌对营养要求不高，在含葡萄糖或麦芽糖的沙保罗培养基上生长良好。适宜生长pH4.0～6.0，最适生长温度为22～28℃，需要较高的湿度和氧气含量。某些深部病原性真菌在37℃生长较好。真菌对常用的抗菌药物耐药，在含放线酮的培养基上（5℃），一般腐生真菌不生长而致病真菌却能够生长。

二、鉴定

丝状真菌主要根据其形态学特征进行鉴定，而某些深部真菌如酵母样真菌等，还必须进行生化性状及血清学检查，近年来分子生物学技术的发展为真菌鉴定提供了新的手段。

1．直接镜检

用显微镜直接观察经革兰染色或印度墨汁染色的标本或培养物，浅部真菌感染的标本（如毛发、指甲等）需先加100～200g/L氢氧化钾溶液1滴处理，再加盖玻片并微加热，使标本溶解后检查，也可用荧光素染色镜检。结合形态特征和临床表现可快速作出初步的诊断。

2．培养法

（1）大培养法：常用的培养基有沙保罗培养基、血琼脂平板、硫乙醇酸盐肉汤等，各培养基分别置25℃和35℃两种温度培养。在血培养中，有时仪器不能测出真菌生长，需通过血琼脂平板接种或直接涂片镜检。

（2）小培养法：小培养法有玻片法、钢圈法和方块法3种。①玻片法：在无菌玻片上滴数滴真菌培养基，凝固后种上标本，置平皿中保温保湿培养，加上盖玻片见有真菌生长后，置显微镜下观察。②钢圈法：先将固体石蜡加热熔化，取直径2cm、厚度0.5cm、有孔口的不锈钢小钢圈，经火焰消毒后浸入石蜡油，随即取出小钢圈，并置于玻片上固定，加上盖玻片后用无菌注射器经小钢圈的小孔注入培养基，最后接种标本。培养后见有真菌生长可置显微镜下观察。③方块法：在消毒平皿内倾注10～15ml无菌培养基，待凝固后切成小方块，将菌株接种于培养基的任何一边，盖上盖玻片置湿盒培养。待真菌生长后取出盖玻片并覆于载玻片上置显微镜下观察。观察培养物时注意真菌生长速度、菌落大小、表面形态、色素边缘的差别，尤其是真菌的菌丝和气中孢子的特

殊形态，有利于真菌的鉴定。

3．血清学试验

近年来，用于检测真菌抗原、抗体及代谢产物的血清学试验已在临床微生物学实验室中应用，如主要针对真菌胞壁或胞内成分的烯醇化酶、β－葡聚糖、甘露糖和 Cand－Tec 抗原等。

4．生化反应

如酵母样真菌等可以利用其对糖、醇发酵和同化试验结果的不同进行区别和鉴定。

三、常见真菌检验

㈠ 念珠菌属

念珠菌属种类繁多，与临床有关的念珠菌主要有白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌和光滑念珠菌等，主要导致念珠菌性肠炎、支气管炎、肺念珠菌病、念珠菌性膀胱炎或肾盂肾炎等。如心瓣膜术后发生的念珠菌性心内膜炎，因长期静脉留置管而引起全身性念珠菌病。浅部念珠菌病包括鹅口疮、阴道炎、角膜炎、甲沟炎等。口腔念珠菌病与艾滋病也较为密切，有时导致艾滋病性食管念珠菌病。

上呼吸道的念珠菌感染有时临床上停用抗生素，感染即可控制。若中性粒细胞数减少引起的感染，应及时纠正免疫功能及抗真菌治疗。

1．生物学特性

念珠菌可在许多培养基上生长，包括沙保罗培养基、血琼脂平板、中国蓝琼脂平板等。由于生长缓慢，往往被一些快速生长的革兰阴性菌所抑制。白色念珠菌在室温及 37 ℃均能生长，形成奶油色酵母样菌落，目前实验室广泛采用的酵母菌显色培养法是基于不同念珠菌具有不同的特异性胞外酶，可分解复合底物（如糖苷、氨基酸、肽类等化学或荧光显色基团）释放出显色基团的原理，从而根据不同颜色的菌落快速判断白色念珠菌、热带念珠菌等的一种方法。常用的荧光显色底物为4－甲基伞形酮（显蓝色），化学显色基团有硝基苯或邻硝基苯（黄色）、β－萘胺（粉红或红色）、5－溴－4－氯－3－吲哚（蓝色）等。

2．鉴定

1）直接镜检：用于浅部念珠菌病的诊断，也可检查血、尿、脑脊液等标本。显微镜下观察圆形或卵圆形的芽生孢子、假菌丝，革兰染色阳性。

2）芽管形成试验：白色念珠菌在动物血清中可形成芽管，常用的有人、兔、鸡、

牛、豚等血清。①玻片法：在载玻片上加血清1 滴，接种少量待检真菌后盖上盖玻片，置湿盒35 ℃孵箱，每隔1h 显微镜下观察1 次，共观察3 ～4 次。②试管法：在无菌试管中加血清0.2ml，接种少量待检真菌，混匀后置35 ℃孵箱，每隔1h 用接种环取出试管内的血清置载玻片上用显微镜观察，共3 ～4 次。

3） 厚膜孢子形成试验：玻片中薄层倾注已经灭菌的10g/L Tween －80 玉米培养基（或大米培养基），待表面凝固后，用接种针在培养基表面划线接种，同时穿刺点种。用经消毒后的盖玻片盖于其上，轻轻按压后室温培养24 ～72h。由于盖玻片下部处于相对厌氧状态，可促进假菌丝的形成。显微镜下观察厚膜孢子及假菌丝。

4） 糖同化或发酵试验：念珠菌的主要生物学特性鉴定可用糖发酵和同化试验。几种常见念珠菌的主要生物学特性鉴别见表6 －8 －79。

表6 －8 －79　几种常见念珠菌的主要生物学特性鉴别

菌种	糖发酵				糖同化					芽管形式	TTC还原	表面生长	厚膜孢子	糯米琼脂上的其它生长特点
	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	海藻糖	蔗糖	乳糖	半乳糖					
白色念珠菌	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	－	－	＋	菌丝分枝少，芽生孢子少
热带念珠菌	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	＋	－	菌丝分枝，芽生孢子多
假热带念珠菌	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	－	－	菌丝分枝，芽生孢子少
克柔氏念珠菌	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋	－	菌丝对称分枝，芽生孢子少
近平滑念珠菌	＋	－	－	－	－	＋	＋	－	＋	－	＋	－	＋	菌丝交叉分枝芽生孢子侧生，较多
类星形念珠菌	＋	＋	－	－	－	－	－	－	＋	＋	d	－	＋	菌丝旁芽生孢子丛生
季也蒙念珠菌	＋	－	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	－	d	－	－	菌丝分枝少，芽生孢子少
皱折念珠菌	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	＋	－	－	

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；d 表示迟缓反应；TTC 表示氮化三苯四氮唑

（二） 隐球菌属及其他医学上重要的酵母菌

隐球菌属中新型隐球菌为人类致病菌，嗜中枢神经系统，常在脑脊液涂片中检出该菌。在脑室或脑膜中生长的新型隐球菌可形成胶质团状物，有时临床易误认为占位性病变。感染后预后不良。一般认为经呼吸道侵入人体，从血液播散至脑及脑膜。也可侵犯皮肤而形成难愈合的溃疡，系统性红斑狼疮、白血病、淋巴瘤、艾滋病等可继发隐球菌性脑膜炎。新型隐球菌分A 、B 、C 、D4 个血清型。A 型和D 型多呈世界性分布，A 型在热带和亚热带国家较多见。B 型比C 型普遍。

酵母菌属真菌在临床标本中检出较少，检出时往往是污染造成的，可引起院内感染。

1．生物学特性

新型隐球菌菌体呈球形、较大，直径5 ～20 μm ，周围有肥厚的荚膜，菌细胞常有出

芽，但无菌丝或假菌丝。在血琼脂平板、沙保罗或巧克力平板上均能生长，适宜温度为35 ℃，在25 ℃生长缓慢，其他非致病性隐球菌仅在25 ℃生长，在35 ℃不生长。新型隐球菌在沙保罗培养基中生长后荚膜可消失，菌落白色或奶白色、粘稠、不透明；在血琼脂平板上生长荚膜变狭窄或消失，在有血液的葡萄糖肉汤培养基中可恢复荚膜。随培养时间的延长在沙保罗培养基中可产生淡棕色色素，脲酶试验阳性。

酵母菌属为小卵形细胞，直径3～4 μm，无荚膜，不产生菌丝及假菌丝，脲酶试验阴性。酵母菌属细菌多呈乳白色光滑的小菌落，而隐球菌为粘液状菌落。

2．鉴定

1）标本直接镜检：取离心过的脑脊液沉淀物1 滴与等量的印度墨汁在玻片上混合，加盖玻片镜检，在黑色背景上见圆形或椭圆形外有一宽带粘多糖荚膜的双层厚壁孢子，即要考虑新型隐球菌的可能。荚膜通常比菌体宽1～2 倍，折光性强。菌细胞有出芽，但无假菌丝和菌丝，应与白细胞区别。常用染色剂还有黑色素、爱尔辛兰，但以印度墨汁为最佳。

2）常见隐球菌的主要生物学特性鉴别：新型隐球菌能同化蔗糖、麦芽糖、半乳糖，但不能同化乳糖。常见隐球菌的主要生物学特性鉴别见表6－8－80。常见酵母菌属及相关种的生物学特性鉴别见表6－8－81。

表6－8－80　常见隐球菌生物学特性鉴别

菌种	糖发酵						糖同化					硝酸钾还原	荚膜	酚氧化酶	35 ℃生长
	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	海藻糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	棉子糖	卫矛醇				
新型隐球菌	－	－	－	－	－	－	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋
指甲隐球菌	－	－	－	－	－	－	＋	－	d	＋	－	－	＋	－	－
浅白隐球菌白色变种	－	－	－	－	－	－	＋	＋	v	＋	＋	＋	＋	－	d
罗伦隐球菌	－	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	－
浅黄隐球菌	－	－	－	－	－	－	＋	－	＋	＋	＋	－	－	－	－
浅白隐球菌分流变种	－	－	－	－	－	－	＋	－	v	＋	＋	＋	＋	－	d
地生隐球菌	－	－	－	－	－	－	d	v	v	－	－	＋	＋	－	d
胃隐球菌	－	－	－	－	－	－	d	－	＋	－	－	－	＋	－	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；d 表示迟缓反应；v 表示不定

表6 —8 —81　常见酵母菌及相关种的生物学特性鉴别

菌种	糖发酵						糖同化					硝酸钾还原	荚膜	酚氧化酶	35 ℃生长
	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	海藻糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	棉子糖	卫矛醇				
光滑球拟酵母菌	＋	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋
埃切球拟酵母菌	＋	＋	－	－	－	－	＋	－	－	＋	－	－	＋	－	－
星形球拟酵母菌	＋	－	＋	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－
白色球拟酵母菌	＋	－	＋	－	－	＋	＋	＋	d	－	＋	＋	－	－	＋
平常球拟酵母菌	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	＋
酿酒酵母菌	＋	＋	＋	－	＋	d	＋	4－	－	＋	－	＋	－	＋	＋

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－表示90 %以上的菌株阴性；d 表示迟缓反应

㈢ 毛孢子菌属

毛孢子菌属中常见的有白杰尔毛孢子菌、出芽毛孢子菌、帚状毛孢子菌、头状毛孢子菌和皮瘤毛孢子菌等5 个种。本属菌也是医院感染的病原菌之一，尤其近年来，毛孢子菌属感染有增多的趋势，可在危重病或免疫功能低下患者的痰液和尿液中分离出该菌。

1．生物学特性

芽生酵母细胞形态多样，假菌丝生长旺盛，存在分隔菌丝和关节孢子，通常在Tween —80 玉米培养基上生长很丰富。沙保罗培养基上菌落多呈白色，随菌龄增加颜色逐渐加深，最后可呈棕褐色，边缘整齐。不产生子囊孢子、担孢子和性孢子，但可形成无性的内生孢子。与临床感染有关的主要是白杰尔毛孢子菌，该菌在沙保罗琼脂上为快速生长的酵母样菌落，25 ℃和35 ℃为最适生长温度。幼龄菌落光滑，呈奶白色或米色，柔软如糊膏状，中心隆起，衰老菌落变成脑回状、呈褐色。18d 后可液化明胶。

2．鉴定

本菌属的共同特点为芽生酵母细胞，有假菌丝和丰富的带有关节孢子的真菌丝，可形成天性的内生孢子。属于担子菌纲的一些菌种脲酶试验阳性。几种常见毛孢子菌及相关种的主要生物学特性鉴别见表6 —8 —82 。白杰尔毛孢子菌与念珠地丝菌的区别在于本菌有芽生孢子，与念珠菌属的区别在于本菌属有关节孢子。

表6 -8 -82　几种常见毛孢子菌及相关种的主要生物学特性鉴别

菌种	糖发酵						糖同化					硝酸钾还原	荚膜	酚氧化酶	35 ℃生长
	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	海藻糖	蔗糖	乳糖	半乳糖	棉子糖	卫矛醇				
白杰尔毛孢子菌	－	－	－	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	v	－	＋	v
出芽毛孢子菌	－	－	－	－	－	－	＋	＋	v	v	v	＋	＋	＋	v
帚状毛孢子菌	＋	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	＋	－	－	＋	＋
头状毛孢子菌	＋	－	－	－	＋	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	＋
皮瘤毛孢子菌	＋	＋	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	＋	＋
念珠地丝菌	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋	－	－	－	－

注：＋表示90 %以上的菌株阳性；－ 表示90 %以上的菌株阴性；d 表示迟缓反应；v 表示不定

㈣ 曲霉菌属

曲霉菌在自然界分布广泛，多半存在于土壤、腐败有机物、粮食和饲料中，可产生多种真菌毒素，人食入后引起真菌毒素中毒。目前已知的曲霉菌有100 多种，约20 种可引起人或动物感染，其中烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、杂色曲霉、构巢曲霉和土曲霉菌为最常见的曲霉菌。

曲霉菌是医院感染中仅次于念珠菌的真菌。病原性曲霉菌可引起人类的肺炎、皮肤曲霉菌病，也可引起外耳道及副鼻窦感染，以及眼科各种真菌感染等。因曲霉菌对大多数抗真菌药物耐药，因此，治疗比较困难，目前治疗曲霉菌感染首选氟康唑。

1．生物学特性

曲霉菌属菌在一般培养基上均能生长，最适生长温度为25 ℃，35 ℃也能生长。35 ℃未生长的标本，必须经过25 ℃再培养后方能作出报告，以防止漏检。菌落形成开始呈白色，表面如羊毛或天鹅绒状，随着培养时间的延长不同的种可显蓝绿色、褐色、黑褐色等不同颜色。

曲霉菌特征为菌丝体由横隔的分支菌丝组成。分生孢子产生于由菌丝分化出来的分生孢子梗顶部。曲霉的分生孢子梗多不分支，有或无横隔，顶端膨大形成顶囊，表面直接产生瓶梗，为单层；先产生梗基或再由梗基上生出瓶梗，即为双层，瓶梗顶端生成分生孢子。有的种直接生于菌丝一侧或菌丝小突起的次生孢子，比瓶梗生出的分生孢子大。有性型的菌种产生封闭式的子囊果。有些曲霉菌还产生壳细胞。在琼脂平板上切取整个菌落，用盖玻片压碎后在低倍镜和高倍镜下观察，能看到曲霉菌的完整分生孢子头及其他结构。

2．鉴定

一般根据曲霉菌分生孢子头的结构和菌落特征差异来区别和鉴定曲霉菌。

1）烟曲霉菌鉴定要点：顶囊烧瓶状，小梗为单层，排列成木栅状，布满顶囊表面3/4，顶端有链形孢子。本菌45 ℃生长良好，菌落生长快，呈棉花样，开始为白色，2～3d 转为绿色，数日后变为深绿色，呈粉末状，可与棒曲霉菌、灰绿曲霉菌等鉴别。

2）黑曲霉菌鉴定要点：顶囊球形，小梗双层，布满顶囊表面，排列呈放射状，第一层粗大，第二层短小，顶端有链形孢子。菌落生长快，表面黑色，粉末状，可与黄曲霉菌鉴别。

3）黄曲霉菌鉴定要点：顶囊球形，小梗双层，布满顶囊表面，第一层粗长，第二层短小，顶端有链形孢子。可与单层小梗的烟曲霉菌、棒曲霉菌、灰绿曲霉菌等鉴别。菌落生长快，呈黄色，表面粉末状，可与黑曲霉菌鉴别。

4）杂色曲霉菌鉴定要点：顶囊椭圆形，小梗双层，第一层长，布满顶囊4/5；第二层短，顶端有链形孢子。可与单层小梗的烟曲霉菌、灰绿曲霉菌、棒曲霉菌等鉴别。菌落生长慢，呈圆形而紧密，绒毛状，颜色从青绿到红绿有数环（层）。分生孢子表面有小棘，可与土曲霉菌鉴别，分生孢子柄浅色或无色，可与构巢曲霉菌区别。

5）构巢曲霉菌鉴定要点：顶囊半球形，小梗双层，第一层短，第二层长，布满顶囊1/2；顶端有链形孢子。菌落暗绿色，中央呈粉末状，边缘绒毛状。

6）土曲霉菌鉴定要点：顶囊半球形，小梗双层，第一层短，分布顶囊表面2/3；第二层长，顶端有链形孢子。菌落生长快，形态小，呈圆形，淡褐色或褐色。

（五）毛癣菌属

毛癣菌属有20 余种，临床上常见的有红色毛癣菌、须癣毛癣菌、许兰毛癣菌和紫色毛癣菌等。该属菌可引起各种癣病。

1．生物学特性

红色毛癣菌在沙保罗培养基上25 ℃时生长较快。菌落形态有多种表现，镜检也不完全一样，据此将其分为羊毛状、绒毛状、粉末状、沟纹状和颗粒状等5 种类型。大分生孢子呈棒状或腊肠状，有3～10 个分隔，壁薄，光滑；小分生孢子侧生，棒状或梨形。可见球拍状菌丝、结节状菌丝。

须癣毛癣菌（又称石膏样毛癣菌）在沙保罗培养基上25 ℃时生长较快。菌落呈白色、黄色或淡红色，粉末状、羊毛状、绒毛状或颗粒状，扁平，菌落中心部有结节状小隆起，有时有不规则、较粗大的放射状沟纹。在菌落边缘有黄白色的粉末。大分生孢子呈棒状或腊肠状，有2～8 个分隔；小分生孢子多见，可呈葡萄串状排列。可见螺旋状

菌丝、结节状菌丝和破梳状菌丝。

许兰毛癣菌（又称黄癣菌）在沙保罗培养基上25 ℃时生长较快，菌落呈球形隆起，似蜡样，淡黄色或棕色，表面有皱褶，下沉现象明显。菌丝粗细不一，可见肥胖菌丝、结节状菌丝、鹿角状菌丝及厚膜孢子，无大分生孢子。

紫色毛癣菌在沙保罗培养基上25 ℃时生长较慢，数周之后菌落直径可达1cm，开始为圆形、白色、光滑发亮、表面湿润的菌落，以后中央产生紫色色素，逐渐向外围扩大，边缘呈淡紫色，外周有1 圈无色环，菌落表面有皱褶，下沉不明显。少数菌种不产生紫色色素，称之为无色的紫色毛癣菌。菌丝粗细不一，可见较多不规则分支或突起的结节状菌丝和较多的厚膜孢子。

2．鉴定

（1）直接镜检：参见本节概述。

（2）菌株鉴定：主要根据菌株生物学特性（如菌落和显微镜下菌体形态特征）进行鉴定和区别。

（六）表皮癣菌属

表皮癣菌属目前仅有1 个种，即絮状表皮癣菌。可引起股癣、足癣和甲癣等。

1．生物学特性

在沙保罗培养基上25 ℃或28 ℃培养，生长较快，初为蜡状，稍凸起，表面有不规则的皱褶，上覆有菌丝，呈黄绿色，周围有放射沟纹，最外围有不整齐的平滑圈。3～4 周后中央部分可有成团白色菌丝，日久后这种白色菌丝逐渐增多，变为羊毛状，后期菌落呈深黄棕色，也有表面呈黄、黄棕或白色变异，菌落背面为草绿色。显微镜下可见典型的杵状大分生孢子，0～4 个分隔，壁光滑，单个或成群排列，无小分生孢子，可见厚膜孢子。

2．鉴定

（1）直接镜检参见本节概述。

（2）菌株鉴定：主要根据菌株生物学特性（如菌落和显微镜下菌体形态特征）进行鉴定和区别。早期需与许兰毛癣菌鉴别，许兰毛癣菌无分生孢子，主要侵犯头发；后期需与须癣毛癣菌和羊毛状小孢子菌鉴别，须癣毛癣菌有大量球形小分生孢子，羊毛状小孢子菌有棒状小分生孢子。

（七）小孢子菌属

小孢子菌属约有15 个种，有8 个种可侵犯人体组织，引起头癣与体癣。其中对人类致病的有铁锈色小孢子菌、石膏状小孢子菌、犬小孢子菌和奥杜盎小孢子菌等。

1．生物学特性

铁锈色小孢子菌在沙保罗培养基上25 ℃时生长较慢。4 ～5d 后，产生淡黄色或红黄色条状菌落，稍高出培养基表面。中心见不规则皱褶，外围为有圈短的放射状沟纹，下沉不明显。随菌株不同，菌落可有差异。镜检菌丝分隔，较粗而规则，可见球拍状菌丝和破梳状菌丝。菌丝顶端或中间可着生厚膜孢子，很少见到大、小分生孢子。

石膏状小孢子菌在沙保罗培养基上25 ℃时生长快。3 ～5d 后，可见中心隆起有一小环，其上覆以白色绒毛状气生菌丝的菌落，随后表面颗粒状、粉末状，颜色转为棕黄色，中心颜色较深，边缘色浅，背面红棕色。有的菌株菌落中心有一小环，而外围有少数极短的沟纹，边缘不整齐。镜检可见多数大分生孢子呈纺锤状，有4 ～6 个分隔，壁薄，粗糙有刺。小分生孢子棒形，侧生，数量少。可见球拍状菌丝、破梳状菌丝、结节状菌丝。有时可见厚膜孢子。

犬小孢子菌 （又称羊毛状小孢子菌） 在沙保罗培养基上25 ℃时生长较快，起初为白色至黄色绒毛状生长，2 周后菌丝较多，像羊毛状，中央趋向粉末化，表面呈黄白色，有少数同心圆，背面红棕色，中央显著，边缘较浅。镜检可见呈纺锤状的大分生孢子，厚壁，带刺，有4 ～6 个分隔，末端常呈“帽”样肥大；小分生孢子为单细胞呈棒状。菌丝有隔，可见球拍状菌丝、破梳状菌丝、结节状菌丝。可见厚膜孢子。

奥杜盎小孢子菌在沙保罗培养基上25 ℃时生长较快，菌落为绒毛状，中心有突起，表面有少数整齐的放射状沟纹，边缘不整齐，棕黄色，背面棕红色。镜检在菌落中心部位有梭形大分生孢子及少数小分生孢子，可见球拍状菌丝及破梳状菌丝。晚期可见厚膜孢子。

2．鉴定

（1） 直接镜检：参见本节概述。

（2） 菌株鉴定：主要根据菌株生物学特性 （如菌落和显微镜下菌体形态特征） 进行鉴定和区别。铁锈色小孢子菌需与许兰毛癣菌鉴别，后者为发内菌丝型感染，有鹿角状菌丝，菌落生长较慢，无色或淡褐色；与犬小孢子菌鉴别要点为后者菌丝较多，呈羊毛状，中央趋向粉末化。石膏状小孢子菌菌落需与断发毛癣菌的早期菌落鉴别，后者为扁平状粉红色；大分生孢子应与犬小孢子菌的大分生孢子鉴别，犬小孢子菌大分生孢子壁厚粗糙带刺，末端呈“帽”样肥大。犬小孢子菌还应与奥杜盎小孢子菌鉴别，前者在米粉培养基上生长旺盛，产生较多的大、小分生孢子，而后者生长不良，孢子少；在沙保罗培养基上犬小孢子菌产黄色色素，奥杜盎小孢子菌产褚色色素。

第 七 篇

分子生物学检验

第一章　概述

自然科学尤其是生命科学各个学科的发展和相互交叉、渗透，使医学分子生物学在研究和认识人体的生理、病理现象，揭示疾病的病因、发病机制等领域发挥了越来越重要的作用。人类基因组计划的顺利进行、人类基因组学和蛋白组学研究的日益深入，使我们从分子生物学水平对人体生理和病理现象有了更为确切的了解。目前，国内各大医院都在积极开展各种分子生物学的研究，基因诊断日益普及，某些疾病的基因治疗也在积极研究之中。分子生物学检测手段在临床医学领域中展示出广阔的应用前景。

当前，分子生物学检验的主要对象为两类生物大分子：核酸和蛋白质。本篇主要论述有关核酸的分子生物学检验，即基因诊断。有关蛋白质的分子生物学检验，请参阅本书其它有关章节。

第一节　分子生物学检验的临床意义

核酸的分子生物学检测（即基因诊断）是通过直接探查基因的存在状态或缺陷对疾病作出诊断的方法。基因诊断的探测目的物可以是DNA或RNA，前者反映基因的存在状态，而后者反映了基因的表达状态。探查的基因又分为内源基因（即机体自身的基因）和外源基因（如病毒、细菌等）两种，前者用于诊断基因有无病变，而后者用于诊断有无病原体感染。故基因诊断的临床意义也就表现在两方面：内源性基因的诊断——根据基因的缺失或突变以分析和诊断各种遗传性疾病，进行HLA基因的多态性分析，以用于器官移植的配型，肿瘤相关基因的分析以了解肿瘤的发生、发展、转移及复发等生物学性状，进行其他疾病相关基因的检测以了解疾病的发生及转归等；外源性基因的诊断——主要应用于各种感染性疾病病原体的基因诊断，对其进行基因型别和同源性比较，以分析病原体的地区分布、基因变异和耐药性变化，发现新的病原体。

关于各项基因诊断的临床意义参见本篇第三章。

第二节　分子生物学实验室配置与要求

一、临床基因扩增检验实验室的建立

按照卫生部《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》规定，临床基因扩增检验实验室建立的范围和程序如下：各二级以上医院依据卫生部《临床基因扩增检验实验室基本设置标准》筹建实验室，然后由其法定代表人向卫生部临检中心提出技术验收申请，经由卫生部临检中心和省临检中心共同组织的专家组技术验收合格，并向省级卫生行政部门备案。在将符合规定的全部材料送达省级卫生行政部门备案后15 日内，未收到省级卫生行政部门不同意见者，方可开展专家组技术验收合格的临床基因扩增检验项目。

二、临床基因扩增检验实验室配置与要求

目前国内临床基因扩增检验实验室应用的实验方法有：各种基因扩增技术（以PCR为主）、各种核酸杂交技术、限制性内切酶分析技术、核苷酸序列测定和生物芯片分析等。临床基因扩增检验实验室的配置按照卫生部《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》和《临床基因扩增检验实验室基本设置标准》的要求进行；有条件的单位还应配置核苷酸序列分析专用实验室、生物芯片分析专用实验室等。

1．临床基因扩增检验实验室区域设置原则

临床基因扩增检验实验室原则上分为4 个分开的工作区域：①试剂贮存和准备区；②标本制备区；③扩增反应混合物配置和扩增区；④扩增产物分析区。

如使用全自动分析仪，区域可适当合并。各工作区域必须有明确的标记，避免不同工作区域内的设备、物品混用。

各个工作区域必须严格按照单一方向进入，即试剂贮存和准备区→标本制备区→扩增反应混合物配置和扩增区→扩增产物分析区。

不同的工作区域使用不同的工作服（例如不同的颜色）。工作人员离开各工作区域时，不得将工作服带出。

2．各工作区域仪器设备配置标准

（1）试剂贮存和准备区：2～8 ℃和－15 ℃冰箱；混匀器；微量加样器（覆盖1～1000 μl）；可移动紫外灯（近工作台面）；一次性手套、一次性吸水纸、耐高压处理的离心管和加样器吸头（带滤心）等消耗品；专用工作服和工作鞋；专用办公用品等。

（2）标本制备区：2～8 ℃和－20 ℃或－80 ℃冰箱；高速台式冷冻离心机；混匀器；

水浴箱或加热模块；微量加样器（覆盖1～1000μl）；可移动紫外灯（近工作台面）；超净工作台；一次性手套、一次性吸水纸、耐高压处理的离心管和加样器吸头（带滤心）等消耗品；专用工作服和工作鞋；专用办公用品等。如需处理大分子DNA，应备有超声波水浴仪。

3）扩增反应混合物配置和扩增区：核酸扩增仪；微量加样器（覆盖1～1000μl）；可移动紫外灯（近工作台面）；一次性手套、一次性吸水纸、耐高压处理的离心管和加样器吸头（带滤心）等消耗品；专用工作服和工作鞋；专用办公用品等。

4）扩增产物分析区：视检测方法不同而定。基本仪器设备如下：微量加样器（覆盖1～1000μl）；可移动紫外灯（近工作台面）；一次性手套、一次性吸水纸、加样器吸头（带滤心）等消耗品；专用工作服和工作鞋；专用办公用品等。

三、临床基因扩增检验实验室技术人员的资质要求

临床基因扩增检验实验室技术人员必须经卫生部临检中心或省级卫生行政部门指定，并经卫生部临检中心认定的机构、使用规定的统一教材进行上岗培训。培训合格者，由培训单位发给合格证书。培训合格人员名单报卫生部临床检验中心备案。获得培训合格证书者方可从事临床基因扩增检验工作。

四、临床基因扩增检验项目和检测试剂

临床基因扩增检验实验室开展的检验项目，须经由卫生部临检中心和省临检中心共同组织的专家组技术验收合格，并报省级卫生行政部门备案。临床基因扩增检验实验室，必须使用经国家药品监督管理局批准的临床检验试剂。

第三节　分子生物学检验的质量控制

临床基因扩增检验实验室的质量控制涉及到整个基因检测的所有阶段，即测定前的标本采集处理、测定中的核酸提取、基因测定和分析以及测定后的结果报告等。

一、测定前质量控制

1．标本的采集

常用于基因诊断的临床标本包括全血或骨髓、血清或血浆、痰液、脑脊液、尿液以及分泌物等。采样容器最好是密闭的、一次性的，如真空采血管等。一次性塑料容器使用时无需进一步预处理。当使用非密闭采样系统时，如尿液、分泌物和骨髓的采样，必须注意防止来自采样者的皮屑或分泌物的污染。采样者采样时起码要戴一次性手套。

采样时可重复使用的玻璃器皿应经高压处理，因为玻璃器皿常含有不易失活的RNA 酶。最好是热灭菌，250 ℃烘烤4h 以上可使RNA 酶永久失活。

全血和骨髓标本必须进行抗凝处理。通常EDTA 和枸橼酸钠是首选的抗凝剂，但高浓度的EDTA 对基因扩增有抑制作用。不能使用肝素抗凝，因为肝素是Taq 酶的强抑制剂，而且在其后的核酸提取步骤中很难去除肝素。临床用于RNA 测定的血标本最好进行抗凝处理，并尽快（8h 以内）分离血浆，以避免RNA 的降解。如未作抗凝处理，则抽血后必须在1h 内分离血清。

2．标本的稳定化处理

由于RNA 易于降解，因此，用于RNA 测定的标本应进行稳定化处理。方法是将标本加入含有异硫氰酸胍盐（Guanidine thiocyanate，GITC）的试管中，GITC 可使DNase 和RNase 立即失活。GITC 可使RNase 不可逆失活的合适浓度为5 mol／L。

3．标本的运送

标本采集后应尽快送至实验室。经过恰当稳定化处理的标本可在常温下通过邮局运送，但较长时间在室温贮存会导致灵敏度降低。

4．标本的贮存

临床体液标本可于－70 ℃下长时间贮存。用于DNA 测定的核酸标本应置TE 缓冲液（10 mmol／L Tris，1 mmol／LEDTA，pH7.5～8.0）中4 ℃保存。用于RNA 测定的核酸标本应在缓冲液中－80 ℃或液氮中贮存；若贮存时间较长，则RNA 测定敏感性可略有下降。

二、测定中质量控制

1．标本中核酸的提取

详见本篇第二章第一节核酸样品制备。

2．防止假阳性和假阴性

有多种因素可引起基因扩增的假阳性或假阴性结果，如抑制剂的存在或酶失活、退火温度不当、镁离子浓度不适、临床标本或试剂受污染等。反应孔中热传导的均一性也极为重要，循环仪的温度控制和加热块中热传导的一致性必须有常规的检查，以避免假阴性结果。

3．防止污染

实际工作中常见有以下几种污染类型：PCR 片段的污染（产物污染）、天然基因组DNA 的污染、试剂污染（贮存液或工作液）以及交叉污染（如气溶胶从一个阳性标本扩散到原本阴性的标本）等。一旦发生了污染，实验就必须停止，直到发现了污染源为止。一般来说，在前三个工作区中，不当的实验操作会引起所使用的试剂、消耗品或实

验设备的污染；而在产物分析区，当吸取PCR 产物用于检测时，也容易造成污染，因此，必须制定并严格执行标准操作程序。

为避免扩增产物被污染，可采取以下措施：在扩增反应中用dUTP 取代部分dTTP；扩增前在反应混合液中加入尿嘧啶糖苷酶 (UNG)；通过持续的长波紫外线照射，使发生异补骨脂光化学反应而产生DNA 加合物等。

此外，还必须定期采取有效的去污染措施，包括用100 mg/L 次氯酸钠溶液清洁工作台面和实验器材表面；实验后长时间紫外线照射实验操作台和其他表面；某些器材的高压灭菌等。

4．选择合适的质控物

(1) 用无逆转录靶RNA 的阴性质控物作为RT－PCR 的污染质控指标。

(2) 在测定病原体如HBVDNA、HCVRNA 等时，应使用已知的弱阳性血标本作为质控样品，与待测临床标本等同处理提取核酸，以判断扩增检测的有效性。使用弱阳性质控样品，不但可检测扩增反应液的质量，还可获得有关PCR 检测下限和特异性的信息。

(3) 外加几种阴性质控 (污染质控)，用来指明扩增过程中污染出现的阶段，包括在样品制备的整个过程中所带的空白反应管、含有样品制备时所用的所有反应液，但不包含可扩增的模板的反应管等。模拟质控可以评价PCR 实验的综合质量。

(4) 用水质控样品代替核酸样品加入反应管，反应管中应含有所有的反应成分。但要注意水仅可作为扩增试剂的质控。

(5) 在板上杂交和斑点杂交时，阳性和阴性质控样品应该在同一板或膜上与测定标本平行进行分析，以排除不同反应中因杂交条件的不同而造成的对结果的错误解释。

三、实验室间质量评价

所有开展临床基因扩增检验的实验室都应参加由卫生部临检中心组织的室间质量评价。

第二章　分子生物学检验基本技术

第一节　核酸样品制备

一、靶核酸的释出

因靶核酸可以与宿主细胞整合、在核内游离以及在胞浆内各种形式存在于细胞内，故样品处理的第一步，就是要将靶核酸从细胞内释放出来。一般使用去垢剂（如Triton X-100，SDS等）裂解细胞，用一种蛋白裂解酶（如蛋白酶K）消化结合于核酸的蛋白质，从而将靶核酸从细胞内释放出来。

二、核酸分离纯化

核酸的分离纯化是将蛋白等干扰核酸分析的物质去除。当核酸从细胞内释放出来后，使用有机溶剂如酚－氯仿等提取，以去除残留的蛋白和其他细胞成分，然后用乙醇沉淀核酸，最后去除有机溶剂。现已有不少商品化核酸提取试剂盒，但临床实验室在使用这些试剂盒前，必须对其核酸提取纯度和效率进行评价。

除了用有机溶剂提取外，也可使用固相吸附的方法提取核酸。如使用二氧化硅或硅藻颗粒吸附，可得到纯度很高的核酸样品。

三、核酸样品制备中的抑制物和干扰物

1）临床样品中，许多成分可以通过与酶反应成分的相互作用而抑制基因扩增。如血红蛋白及其代谢产物均为DNA聚合酶的抑制物，不同来源的聚合酶受血红蛋白影响的程度也不同。

2）脑脊液、尿液和痰液中也含有TagDNA聚合酶的抑制物，但其确切成分尚不清楚。作为聚合酶的抑制物，还有痰液中酸性粘多糖和糖蛋白成分等。

3）临床标本中也可能含有会降解靶核酸的核酸酶。

4）在传统的核酸提取方法中所用的许多试剂如乙二胺四乙酸（EDTA）、去垢剂如SDS以及盐酸胍、乙醇等，如果在核酸提取中最后未完全去除干净，则会抑制聚合酶的活性。

四、靶核酸提取的质量控制

检测对DNA 提取效果的最常用手段是琼脂糖凝胶电泳。用适合PCR 的DNA 提取试剂盒制备的细胞总DNA 的长度平均为30 ～40kb 。然而，明显出现降解的DNA （在1 ～10kb 的低分子量范围内） 在经琼脂糖凝胶电泳分离和用溴化乙锭染色后也可见有强荧光信号。用对甲基化不敏感的限制性内切酶 （如EcoRI） 消化DNA ，然后电泳分离，能够对酶活性的抑制剂进行质控 （在抑制剂存在的情况下，高分子量的片段不被酶切）。潜在抑制剂的存在通常用260nm 和280nm 的分光光度测定来估计，好的DNA 提取物，波长在260nm 和280ｍｍ 处的吸光度值之比应该在1.75 ～200 之间；否则，污染 （残留的蛋白或酚） 可能会很高。不过，仅用光度计比色方法检测的结果不能对DNA 的完整性下结论。

对总RNA 提取效果的检测最简单的方法是在非变性条件下作琼脂糖凝胶电泳，这一点跟DNA 分离相同。如果对电泳结果产生怀疑，就应该在变性的条件下再作琼脂糖凝胶电泳，以检测RNA 的完整性。在理想情况下，3 种主要的核糖体 （28S 、18S 和5S） 在凝胶电泳上出现的带相对较窄。如发生RNA 的降解，则带被拖向低分子量或出现带的缺失。各核糖体RNA 带的相对密度数可作为对RNA 制备的质量评价的实验室内标准；对向低分子量拖尾的、不对称性的峰的评估也是评价RNA 完整性的合适指标。另外，琼脂糖凝胶电泳还能显示出在RNA 的制备中被DNA 污染的程度。

第二节　核酸电泳

琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳是分离鉴定和纯化DNA 片段的标准方法。该技术操作简便快速，可以分离用其他方法 （如密度梯度离心法） 所无法分离的DNA 片段。用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙啶 （ethidium bromide，EB） 染色，在紫外光下至少可以检测出1 ～10ng 的DNA 条带，从而可以确定DNA 片段在凝胶中的位置。此外，还可从电泳后的凝胶中回收特定的DNA 条带，用于以后的克隆操作。

琼脂糖和聚丙烯酰胺可以制成各种形状、大小和孔隙度。琼脂糖凝胶分离DNA 片段大小范围较广，不同浓度琼脂糖凝胶可分离长度200 ～50000bp 的DNA 片段。琼脂糖通常用水平装置在强度和方向恒定的电场下电泳。聚丙烯酰胺分离小片段DNA （5 ～500bp） 效果较好，分辨力极高，能将相差1bp 的DNA 片段分开。聚丙烯酰胺凝胶电泳速度快，可容纳较大量的DNA ，但制备和操作比琼脂糖凝胶困难。聚丙烯酰胺凝胶采用垂直装置进行电泳。目前，一般实验室多用琼脂糖水平平板凝胶电泳装置进行DNA

电泳，而聚丙烯酰胺凝胶主要用于序列测定。

一、琼脂糖电泳

电场中，在中性pH 下带负电荷的DNA 向阳极迁移，其迁移速率由下列因素决定。

1）DNA 分子大小：线性双链DNA 分子在一定浓度的琼脂糖凝胶中的迁移速率与DNA 分子量对数成反比，分子越大则所受阻力越大，越难在凝胶孔隙中移行。

2）琼脂糖浓度：一个给定大小的线状DNA 分子，其迁移速度在不同浓度的琼脂糖凝胶中各不相同。DNA 电泳迁移率的对数与凝胶浓度成线性关系。凝胶浓度的选择取决于DNA 分子的大小。分离小于500bp 的DNA 片段所需凝胶浓度为1.2％～1.5％；分离大于10kb 的DNA 分子所需凝胶浓度为0.3％～0.7％；若DNA 片段大小为前两者之间，则所需凝胶浓度为0.8％～1.0％。

3）DNA 分子构象：当DNA 分子处于不同构象时，它在电场中移动的距离不仅与分子量有关，还与其本身构象有关。相同分子量的线状、开环和超螺旋DNA 在琼脂糖凝胶中移动的速度是不一样的，超螺旋DNA 移动最快，而线状双链DNA 移动最慢。如作电泳鉴定质粒纯度时发现凝胶上有数条DNA 带，难以确定其是由质粒DNA 不同构象引起还是因为含有其他DNA 引起时，可从琼脂糖凝胶上将DNA 带逐个回收，再用同一种限制性内切酶分别水解后电泳，此时如在凝胶上出现相同的DNA 图谱，则为同一种DNA。

4）电源电压：在低电压时，线状DNA 片段的迁移速率与外加电压成正比。但是随着电场强度的增加，不同分子量的DNA 片段迁移率将以不同的幅度增长；片段越大，因场强升高引起的迁移率升高幅度也越大，因此，电压增加，琼脂糖凝胶的有效分离范围缩小。要使大于2000bp 的DNA 片段的分辨率达到最大，所加电压不得超过5V／cm。

5）嵌入染料的存在：荧光染料溴化乙啶用于检测琼脂糖凝胶中的DNA，染料会嵌入堆积的碱基对之间，并拉长线状和带缺口的环状DNA，使其刚性更强，还会使线状DNA 迁移率降低15％。

6）缓冲液的离子强度：在没有离子存在时（如误用蒸馏水配制凝胶），电导率很小，DNA 几乎不移动。在高离子强度的缓冲液中（如误加10 倍浓缩电泳缓冲液），电导率很大并明显产热，严重时会引起凝胶熔化或DNA 变性。

对于天然的双链DNA，常用的几种电泳缓冲液有TAE（Tris－醋酸－EDTA（pH8.0））、TBE（Tris－硼酸－EDTA）、TPE（Tris－磷酸－EDTA），一般配制成浓缩母液，储于室温。

【试剂和材料】

1）5×TBE 电泳（贮存）缓冲液：每升内含Tris54g，硼酸27.5g，0.5mol／L EDTA

溶液（pH8.0）20ml。

2）6×电泳上样缓冲液：每升内含溴酚蓝2.5g，蔗糖400g，贮存于4℃。

3）溴化乙锭（EB）溶液母液：将EB配制成10mg/ml，用铝箔或黑纸包裹容器，室温下储存。

4）不同分子量DNA标准品。

5）其他：包括水平式电泳装置，微波炉，紫外透射仪，照相支架、照相机及其附件等。

【操作步骤】

1）稀释缓冲液的制备：取5×TBE缓冲液20ml加水至200ml，配制成0.5×TBE稀释缓冲液。可用于制备胶液或置入电泳槽内。

2）胶液的制备：取琼脂糖0.4g于200ml锥形瓶中，加入0.5×TBE稀释缓冲液50ml，放入微波炉（或电炉上）加热至琼脂糖全部熔化，取出摇匀。

3）胶板的制备：将有机玻璃胶槽两端分别用胶带纸（宽约1cm）紧密封住。将封好的胶槽置于水平支持物上，插上样品梳子，注意观察梳齿下缘，使与胶槽底面保持1mm左右的间隙。

向冷却至50～60℃的琼脂糖胶液中加入EB溶液，使其终浓度为0.5μg/ml（也可不将EB加入凝胶中，而是电泳后再用0.5μg/ml的EB溶液浸泡染色）。用移液器吸取少量融化的琼脂糖凝胶封于胶带纸内侧，待琼脂糖溶液凝固后将剩余的琼脂糖小心地倒入胶槽内，使胶液形成均匀的胶层。倒胶时的温度不可太低，否则凝固不均匀；速度不可太快，否则容易出现气泡。待胶完全凝固后拔出梳子，注意不要损伤梳底部的凝胶，然后向槽内加入0.5×TBE稀释缓冲液至液面恰好没过胶板上表面。因边缘效应，样品槽附近会有一些隆起，阻碍缓冲液进入样品槽中，所以要注意保证样品槽中注满缓冲液。

4）加样：取酶解液10μl与6×上样液2μl混匀，用微量移液器小心加入样品槽中。若DNA含量偏低，则可依上述比例增加上样量，但总体积不可超过样品槽容量。每加完一个样品要更换吸头，以防止互相污染。注意上样时要小心操作，避免损坏凝胶或将样品槽底部凝胶刺穿。

5）电泳：加完样后，合上电泳槽盖，立即接通电源。控制电压在60～80V、电流在40mA以上。当溴酚蓝指示带移动到距凝胶前沿约2cm时，停止电泳。

6）染色：未加EB的胶板在电泳完毕后移入0.5μg/ml的EB溶液中，室温下染色20～25min。

7）观察和拍照：在波长254nm的紫外灯下观察染色后的或已加有EB的电泳胶板。DNA存在处显示出肉眼可辨的橘红色荧光条带。注意：在紫外灯下观察时应戴上防护眼镜或有机玻璃面罩，以免损伤眼睛。将照相机镜头加上近摄镜片和红色滤光片后

固定于照相架上，采用全色胶片，光圈5.6，曝光时间10～120s（根据荧光条带的深浅选择）。

（8）DNA 分子量标准曲线的制作：在放大的电泳照片上，以样品槽为起点，用卡尺测量λDNA 的EcoRI 和Hind III酶切片段的迁移距离，以厘米为单位。以核苷酸数的常用对数为纵坐标，以迁移距离为横坐标，在坐标纸上绘出连接各点的平滑曲线，即为该电泳条件下DNA 分子量的标准曲线。

（9）DNA 酶切片段大小的测定：在放大的电泳照片上，用卡尺量出DNA 样品各片段的迁移距离，根据此数值，在DNA 分子量标准曲线上查出相应的对数值，进一步计算出各片段的分子量大小（若用单对数坐标纸来绘制标准曲线，则可根据迁移距离直接查出DNA 片段的大小）。反之，若已知DNA 片段的大小，亦可在标准曲线上查出其预计的迁移距离。

（10）DNA 酶切片段排列顺序的确定：根据单酶切、双酶切和多酶切的电泳分析结果，对照DNA 酶切片段大小的数据进行逻辑推理，然后确定各酶切片段的排列顺序和各酶切位点的相对位置，并以环状图或直线图表示，即成该DNA 分子的限制性内切酶图谱。

【注意事项】

（1）观察DNA 离不开紫外透射仪，但紫外光对DNA 分子有切割作用。因此从胶上回收DNA 时，应尽量缩短光照时间并采用长波长（300～360nm）紫外灯，以减少紫外光切割DNA。

（2）EB 是强诱变剂，具有中等毒性，配制和使用时都应戴手套，并且不要将EB 洒到桌面或地面上。凡是沾污了EB 的容器或物品，必须经专门处理后才能清洗或丢弃。

（3）当EB 太多、胶染色过深、NA 带看不清时，可将胶用蒸馏水冲泡，30min 后再观察。

（4）在电泳槽和凝胶中，务必使用同一批次的电泳缓冲液，不同离子强度或pH 值的电泳缓冲液会使凝胶形成前沿，大大影响DNA 片段的迁移率。

二、聚丙烯酰胺凝胶电泳

丙烯酰胺是一单体，通常由过硫酸铵提供并可被TEMED（N，N，N′，N′－四甲基乙二胺）所稳定的自由基引发一个链式反应，使丙烯酰胺单体聚合成长链。双功能基团N，NN′－亚甲双丙烯酰胺参与聚合反应时，链与链之间交联成凝胶，其孔径由链长和交联度所决定。

DNA 在不同浓度的聚丙烯酰胺非变性凝胶的有效分离范围见表7－2－1。

表7－2－1　DNA 在不同浓度的聚丙烯酰胺非变性凝胶的有效分离范围

丙烯磺胺　(%)	有效分离范围　(kp)	二甲苯青FF[b]	溴酚蓝[b]
3.5	100～2000	460	100
5.0	80～500	260	65
8.0	60～400	160	45
12.0	40～200	70	20
15.0	25～150	60	15
20.0	6～100	45	12

注：a.N，N′－亚甲双丙烯酰胺占丙烯酰胺的1/30；

b 给出的数字是迁移率与染料相同的双链DNA 片段的粗略大小（核苷酸对）

聚丙烯酰胺凝胶的制备和电泳都比琼脂糖凝胶更费事。但是，与琼脂糖凝胶相比，聚丙烯酰胺凝胶具有以下优点：①分辨力很强，DNA 长度相差0.2％即可分开；②所能装载的DNA 量远远大于琼脂糖凝胶：多达10 μg 的DNA 可以加样于聚丙烯酰胺凝胶的一个标准样品槽（1cm ×1mm）而不致明显影响分辨力；③从聚丙烯酰胺凝胶中回收的DNA 纯度很高，适用于最高级的实验。

常用于核酸电泳的聚丙烯酰胺凝胶有以下两种：

1）用于分离和纯化双链DNA 片段的非变性聚丙烯酰胺凝胶：大多数双链DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率大致与其分子量大小的对数值成反比。但迁移率也受DNA 碱基组成和序列的影响，以致大小完全相同的DNA，其迁移率可相差达10％。所以，非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳不能用于确定双链DNA 的大小。

2）用于分离、纯化单链DNA 的变性聚丙烯酰胺凝胶：这些凝胶在一种可以抑制核酸中的碱基配对的试剂（如尿素或甲醛）存在下聚合。变性DNA 在这些凝胶中的迁移率几乎与其碱基组成及序列完全无关。

因临床上使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的机会较少，本节仅介绍非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

（一）非变性聚丙烯酰胺凝胶的制备

【试剂和材料】

1）300g/L 丙烯酰胺溶液：丙烯酰胺29g，N，N′－甲双丙烯酰胺1g，加水至100ml。可将溶液加热至37℃助溶。

注意：丙烯酰胺是强烈的神经毒素，可经皮肤吸收。丙烯酰胺的作用具有累积性。称取粉末状丙烯酰胺及亚甲双丙烯酰胺时，必须戴手套和面具。取用含上述化学药品的溶液也要戴手套。尽管可以认为聚丙烯酰胺无毒，但鉴于其中可能含有少量未聚合的丙

烯酰胺，故仍应小心处理。

贮存期间，丙烯酰胺和双丙烯酰胺缓慢转化为丙烯酸和双丙烯酸，这一脱氨反应是光催化和碱催化的。应检查丙烯酰胺溶液的PH 值是否在7.0 或更低，并应在室温下避光保存。每隔数月应重新配制溶液。

2）1 ×TBE 应用液：用5 ×贮存液稀释 （见前）。用于聚丙烯酰胺凝胶电泳的TBE 应用液浓度为1 ×，这一浓度要比通常用于琼脂糖凝胶电泳时大1 倍。用于聚丙烯酰胺凝胶电泳的垂直电泳槽内的缓冲液池一般较小，故所通过的电流量通常相当大。要用1 ×TBE 才能保证适当的缓冲容量。

3）100g／L 过硫酸铵溶液。

【操作步骤】

1） 准备好用于灌胶的玻璃板和间隔片，依次用去污剂温溶液、自来水、去离子水彻底洗净；再用乙醇冲洗玻璃板，晾干。每块玻璃板的一面都须用聚硅氧烷溶液处理，以防止凝胶与两块玻璃板贴紧及电泳完毕后，从胶模中卸出凝胶时凝胶发生破裂。

2） 商品化的电泳装置有多种类型，而玻璃板与间隔片的配置也因制造厂商的不同而略有差异。目的是在玻璃板与间隔片之间形成不透水密封，以免未聚合的凝胶溶液漏出。一般两块玻璃板的大小略有差别，其中一块带有凹口。将较大 （或不带凹口） 的玻璃板平放在实验桌上，并将两块间隔片沿玻璃板边缘放置妥当，用凡士林轻涂间隔片可使其在以后步骤中保持原位。再将较小 （或带凹口） 的玻璃板在间隔片上放置妥当。

3） 间隔片的厚度0.5 ～2.0ｍｍ。凝胶越厚，电泳时产生的热量就越多。过热会出现“微笑”DNA 条带或其他问题。因此，凝胶薄一点较好。因为这些凝胶所获得的DNA 条带最清晰。

4） 确知玻璃板的大小和间隔片的厚度后，便可以计算所需丙烯酰胺溶液的体积（有关100ｍl 不同浓度凝胶的制备，参见表7 －2 －2）。

表7 －2 －2　制备不同浓度聚丙烯酰胺凝胶所用试剂的容量 （ml）

浓度 （%）	300g／L 丙烯酰胺溶液	水	5 ×TBE	100g／L 过硫酸铵溶液
3.5	11.6	67.7	20.0	0.7
5.0	16.6	62.7	20.0	0.7
8.0	26.6	52.7	20.0	0.7
12.0	40.0	39.3	20.0	0.7
20.0	66.6	12.7	20.0	0.7

5）戴上手套，在一托盘上进行下列操作，以免溅出的丙烯酰胺溶液洒在工作台上。①每100ml 丙烯酰胺凝胶溶液加35 μlTEMED，旋动容器以混匀溶液；②用50ml 注射器吸取上述溶液。倒置注射器，排出针管内的空气。将注射器嘴插入两块玻璃板的空隙处，再将丙烯酰胺注入其中，几乎注满至顶部。剩下的丙烯酰胺溶液保存在4℃以减缓聚合速度。若有气泡产生则将凝胶倒出，把平板彻底清洗干净后重新灌胶；③将玻璃板斜靠在试管架上大约成10°，可以减少发生泄漏的机会，并可最大限度地减少凝胶的变形。

6）立即插入适当的梳子，小心勿使梳齿下留有气泡。梳齿顶端应略高于玻璃板上端。用纸夹将梳子夹紧，使其就位。必要时，将剩余的丙烯酰胺溶液完全充满胶模。检查一下丙烯酰胺是否从胶模里漏出。

7）丙烯酰胺于室温聚合60min。如果凝胶明显收缩，应补加丙烯酰胺溶液。聚合完后，在梳子下方可以看见折射率不同的纹线。用经1 ×TBE 浸过的纸巾盖住梳子及凝胶的顶端，然后用保鲜膜将整个凝胶封好，贮于4℃。

8）小心取出梳子，并立即彻底用水冲洗加样孔。否则梳子所留存的少量丙烯酰胺溶液会在加样孔中聚合，产生不规则的表面，引起DNA 条带变形。用剃须刀片修去凝胶顶端的绝缘胶带。

9）将凝胶夹在电泳槽里。带凹口的平板应朝里，面向缓冲液槽。

10）用1 ×TBE 灌满电泳槽的缓冲液模，用一根弯头巴斯德吸管或注射器针头排除藏匿在凝胶底下的气泡。在缓冲液槽和凝胶中务必使用同一批次的电泳缓冲液，离子强度或pH 值的微小差异会形成缓冲液前沿，从而使DNA 片段的迁移发生严重的扭曲。

11）用巴斯德吸管吸取1 ×TBE 冲洗加样孔。如果未聚合的丙烯酰胺残留在加样孔内，则可观察到扩散状的波浪形DNA 条带。

12）将DNA 样品与适量6 ×凝胶加样缓冲液混合。将所有的样品吸进加样器里，然后将该装置的吸头插入加样孔内。这一操作要快，应一气呵成。因为当吸头浸入电泳缓冲液后，DNA 样品可能会从加样器弹淌出。

13）接上电极（正极接下槽）。非变性聚丙烯酰胺凝胶一般以1～8V／cm 电压进行电泳。若在高压下进行电泳，因凝胶中部的产热不同，可能会引起DNA 带弯曲，甚至导致小片段DNA 解链。

14）电泳至标准参照染料迁移至所需位置，切断电源；取出导线，弃去缓冲液槽内的电泳缓冲液；卸下玻璃板，用刀片割去绝缘胶带，将玻璃板置于工作台上（硅烷化的玻璃板向上），用薄钢勺将上面的玻璃板从一角撬起。检查一下凝胶是否仍附在下面的板上，将上面的板平稳地移开，去掉间隔片。

15）用下面介绍的方法之一检测聚丙烯酰胺凝胶中DNA 的位置。

(二) 聚丙烯酸胺凝胶中DNA 的检测

1．溴化乙锭染色法

【试剂和材料】

1) 0.5μg/ml 溴化乙锭染液 (用1 ×TBE 配制)。

2) Saran 包装膜或保鲜膜。

【操作步骤】

1) 将凝胶及其附着的玻璃板轻轻地浸入染液中，染液正好将凝胶全部没住。于室温染色30～45min，以玻璃板作支物将凝胶取出。用一叠Kimwipes 纸 (无尘精密擦拭纸，但不要用吸水纸，因凝胶会粘在上面) 揩去凝胶表面过多的液体。用一张Saran 包装膜覆盖在凝胶上、尽量避免产生气泡或皱折。

2) 摄影时，在紫外透射光源的表面上放一块Saran 包装膜，将凝胶倒置过来放在透射光源上。去掉玻璃板，让凝胶粘在Saran 包装膜上，按前文介绍的方法进行摄影。由于聚丙烯酰胺会熄灭溴化乙锭的荧光，所以不能检出小于10ngDNA 左右的条带。

2．放射自显影法

未固定的湿凝胶法

【材料】

Saran 包装膜或保鲜膜、放射性墨水、胶片盒、增感屏、X 感光片。

【操作步骤】

1) 用Saran 包装膜将凝胶连同支撑玻璃板包好，尽量避免产生气泡或皱折。在Saran 包装膜表面贴上有放射性墨水制作的粘性圆点标签，以便将来对准胶片与凝胶的位置；用Scotch 胶带盖上标签，以防放射性墨水污染胶片盒和增感屏。

2) 将凝胶倒置过来，按以下步骤对X 感光片曝光：在暗室里，将密封好的凝胶与裁成玻璃板一样大小的X 感光片粘在一起。玻璃的重量可以保证Saran 包装膜与X 感光片保持良好接触。不要用金属胶片盒 (防止压破玻璃板而使凝胶破裂)，要用铝铂将凝胶和胶片包好，于室温曝光适当时间。此法适用于从凝胶中回收放射性的DNA 条带。

固定的干凝胶法

【试剂和材料】

70 %醋酸溶液、Saran 包装膜或保鲜膜、凝胶干燥机。

【操作步骤】

1) 将凝胶连同支撑玻璃板于70 %醋酸溶液中浸5min，小心地从液体中提起玻璃板，将凝胶取出。(固定时要尽量避免固定液在凝胶表面晃动，目的是使凝胶保持粘在

玻璃板上。如果凝胶完全脱离玻璃板，通常用大玻璃板捞出，转移至浅水浴中。多数情况下，可以将凝胶小心地展开，恢复原有的形状。）

（2）将凝胶放在去离子水中短暂漂洗。用一叠Kimwipes纸而不是吸水纸（凝胶会粘附于其上）揩去凝胶表面过多的液体。

（3）将凝胶和玻璃板包在Saran包装膜中，如上所述进行放射自显影。另一种方法是将凝胶置于Whatman3号滤纸上，用凝胶干燥机进行干燥。仅当凝胶中含有用诸如^{35}S等发射弱β射线的同位素进行标记的DNA或由于所含^{32}P标记的DNA量很少，必须进行长时间的曝光（长于24h）才能得到适当的放射自显影影像时，方有必要对凝胶进行干燥。

3．银盐染色法

【试剂】

50％甲醇、10％醋酸混合液，50％甲醇、7％醋酸混合液，10％戊二醛溶液，1g/L硝酸银溶液，30g/L碳酸钠（含50μl甲醛）溶液，2.3mol/L拘橼酸溶液，0.3g/L碳酸钠溶液。

【操作步骤】

（1）凝胶在50％甲醇、10％醋酸混合液中浸泡30min。

（2）再在50％甲醇、7％醋酸混合液中浸泡30min。

（3）凝胶置10％戊二醛中固定30min，用水洗去多余的固定剂。

（4）在1g/L硝酸银溶液中浸泡30min。

（5）在30g/L碳酸钠溶液100ml中显影，直到获得满意结果为止。

（6）加入2.3mol/L构橼酸溶液5ml于上述碳酸钠溶液中，搅动持续10min，终止反应。

（7）用蒸馏水洗涤30min。

（8）在0.3g/L碳酸钠溶液中浸泡10min。

（9）置于封闭口袋中保存。银盐染色法灵敏度很高，适用于聚丙烯酰胺凝胶中DNA或RNA的染色。

第三节　限制性内切酶分析

限制性内切酶能特异地结合于一段被称为限制性酶识别序列的DNA序列之内或其附近的特异位点上，并切割双链DNA。限制性内切酶可分为三类：Ⅰ类和Ⅲ类酶在同

一蛋白质分子中兼有切割和修饰（甲基化）作用，且依赖于ATP 的存在。Ⅰ类酶结合于识别位点并随机地切割识别位点不远处的DNA，而Ⅲ类酶在识别位点上切割DNA 分子，然后从底物上解离。Ⅱ类酶由两种酶组成：一种为限制性内切核酸酶（简称限制酶），它切割某一特异的核苷酸序列；另一种为独立的甲基化酶，它修饰同一识别序列。Ⅱ类酶中的限制性内切酶在分子克隆中得到了广泛应用，它们是重组DNA 的基础。

绝大多数Ⅱ类限制酶识别长度为4～6 个核苷酸的回文对称特异核苷酸序列（如EcoRI 识别6 个核苷酸序列：5′—G ↓AATTC —3′），有少数酶识别更长的序列或简并序列。Ⅱ类酶切割位点在识别序列中，有的在对称轴处切割，产生平末端DNA 片段（如Sma Ⅰ：5′—CCC ↓GGG —3′）；以这种方式产生的平端可用T4 噬菌体DNA 连接酶连接。平端之间的连接效率比黏端之间的连接效率要低，但因平端连接具有普适性，故极其有用。平端连接不仅能与相同或不同限制性内切酶产生，而且能与补平后的3′凹端或削平后的3′及5′突出端相连接。平端连接还可应用于将合成的DNA 接头（含一个或多个限制性内切酶切割位点）连接到DNA 的末端。

如果切割位点在对称轴一侧，产生带有单链突出末端的DNA 片段，称黏性末端。在5′侧切割的产生带突出的5′黏端的DNA 片段。例如EcoRI 切割序列后产生两个互补的黏性末端：

5′—G ↓AATTC —3′　　3′—CTTAA ↓G —5′

如果限制酶在二重对称轴的3′侧切割每条DNA 链，则产生带突出的3′黏端的DNA 片段。例如，PstI 识别双链DNA 的这样一段序列：

5′—CTGCA ↓G —3′　　3′—G ↓ACGTC —5′

由产生黏端的限制酶产生的片段都能与带相同突出端的片段相连接。

DNA 纯度、缓冲液、温度条件及限制性内切酶本身都会影响限制性内切酶的活性。大部分限制性内切酶不受RNA 或单链DNA 的影响。当微量的污染物进入限制性内切酶贮存液中时，会影响后者进一步使用，因此，在吸取限制性内切酶时，每次都要用新的吸头。如果采用两种限制性内切酶，必须注意分别提供各自的最适盐浓度。若两者用同一缓冲液，则可同时水解。若需要不同的盐浓度，则低盐浓度的限制性内切酶必须首先使用，随后调节盐浓度，再用高盐浓度的限制性内切酶水解。也可在第一个酶切反应完成后，用等体积酚－氯仿抽提，加0.1 倍体积3mol/L 醋酸钠溶液和2 倍体积无水乙醇，混匀后置—70 ℃低温冰箱30min，离心、干燥并重新溶于缓冲液后进行第二个酶切反应。

DNA 限制性内切酶酶切图谱又称DNA 的物理图谱，它由一系列位置确定的多种限制性内切酶酶切位点组成，以直线或环状图式表示。在DNA 序列分析、基因组的功能图谱绘制、基因文库的构建等工作中，建立限制性内切酶图谱都是不可缺少的环节。近年来发展起来的RFLP（限制性片段长度多态性）技术更是建立在它的基础之上。

构建DNA 限制性内切酶图谱有许多方法。通常结合使用多种限制性内切酶，通过综合分析多种酶单切及不同组合的多种酶同时切割所得到的限制性片段大小来确定各种酶的酶切位点及其相对位置。酶切图谱的使用价值依赖于它的准确性和精确程度。

在酶切图谱制作过程中，为了获得条带清晰的电泳图谱，一般DNA 用量约为0.5～1.0μg。限制性内切酶的酶解反应最适条件各不相同，各种酶有其相应的酶切缓冲液和最适反应温度（大多为37℃）。对质粒DNA 酶切反应而言，限制性内切酶用量可按标准体系1μg DNA 加1U 酶，消化1～2h。但要完全酶解则必须增加酶的用量，一般增加2～3 倍，甚至更多，反应时间也要适当延长。

不同的限制酶生产厂家往往推荐使用不同的反应条件，因此，应按相应的说明书进行操作。不同限制酶缓冲液的主要差别在于其中所含氯化钠的浓度。当要用两种或两种以上限制酶切割DNA 时，如果这两种酶在同种缓冲液中作用良好，则两种酶可同时切割；如果这些酶所要求的缓冲液有所不同，则可采用以下两种替代方法：①先用在低离子强度的缓冲液中活性最高的酶切割DNA，然后加入适量氯化钠及第二种酶，继续温育，②使用实际上所有限制酶均可作用的单种缓冲液，如某些内切酶产品会同时提供通用的缓冲液及在该缓冲液中不同酶的切割活性。

【试剂和材料】

λDNA：购买或自行提取纯化、重组pBS 质粒或pUC19 质粒、EcoRI 酶及其酶切缓冲液（购买成品）、Hind III酶及其酶切缓冲液（购买成品）、其他（如台式高速离心机，恒温水浴锅，微量移液器）。

【操作步骤】

1．限制性内切酶酶切

以下是对0.2～1.0μg DNA 进行消化的典型反应步骤，如要对更大量的DNA 进行消化，则反应的各个成分须相应放大。

1）将清洁干燥并经灭菌的离心管（最好0.5ml）编号，用微量移液器将1μgDNA 溶液加入一灭菌的微量离心管中并与适量水混匀，使总体积为18μl。

2）加入2μl 适当的10×限制酶消化缓冲液（对溶液体积作相应调整），轻敲管外壁以混匀之。

3）加入1～2U 限制酶，轻弹管外壁以混匀之；也可用微量离心机甩一下，使溶液集中在管底。此步操作是整个实验成败的关键，故要防止错加、漏加。

4）将上述装有混合反应物的离心管置于适当的支持物上，在适当温度下并按所需的时间进行温育，使酶切反应完全。

5）加入0.5mol/L EDTA 溶液（pH=8.0）使终浓度达10mmol/L，混匀以终止反应，

置于冰箱中保存备用。

6）如果消化后DNA 直接进行凝胶电泳分析，可在加入6μl 凝胶电泳加样缓冲液振荡混合后，即加样进行电泳。

2．不同分子量DNA 标准的制备

λDNA 为长度约50kb 的双链DNA 分子，其商品溶液浓度为0.5mg/ml，酶解反应操作如上述。Hind III切割DNA 后得到8 个片段，长度分别为23.1、9.4、6.6、4.4、2.3、2.0、0.56 和0.12kb。EcoRI 切割λDNA 后得到6 个片段，长度分别为21.2、7.4、5.8、5.6、4.9 和2.5kb。

【注意事项】

1）限制酶的价格比较昂贵，使用时应尽量遵循操作规则以最大限度节省开支。酶活性通常用酶单位（U）表示。酶单位的定义是：在最适反应条件下，1h 完全降解1μgλDNA 的酶量为1U。但是许多实验制备的DNA 不象λDNA 那样易于降解，需适当增加酶的使用量。反应液中加入过量的酶是不合适的，不仅增加成本，且酶液中的微量杂质可能干扰随后的反应。

2）浓缩的限制酶可在使用前用1×限制酶缓冲液稀释，但切勿用水稀释以免酶变性。

3）限制酶通常保存在50%的甘油中，实验中应将反应液中甘油浓度控制在1/10 之下，否则酶活性将受影响。

4）酶切时所加的DNA 溶液体积不能太大，否则DNA 溶液中其他成分会干扰酶反应。

第四节　核酸杂交技术

核酸杂交技术应用于定性、定量和定位检测DNA 或RNA 序列片段，在生物化学、分子生物学和细胞生物学研究中应用广泛。根据碱基配对的原则，将样品RNA 单链或DNA 双链经变性处理，在低于变性温度20～25℃条件下，加入已知的标记DNA 或RNA 探针，与样品中具有互补序列的DNA 单链或RNA 形成双链结构，可以形成稳定的DNA－cDNA、NA－RNA、NA－RNA 或RNA－cDNA 的异质性双链分子，通过显示标记物来检测特定的核酸片段。

目前常用的核酸杂交技术有斑点分子杂交、Southern 印迹杂交、Northern 印迹杂交和原位杂交技术等。斑点分子杂交是鉴定DNA 的杂交，杂交的受体一般是完整的基因组DNA，探针可用DNA 或RNA，DNA 不经消化和电泳直接点样在固相支持滤膜上与探针

进行杂交。Southern 印迹杂交是鉴定DNA 的另一类杂交，杂交的受体是DNA 片段，探针可用DNA 或RNA，受体从琼脂糖凝胶转移到固相支持滤膜上与探针进行杂交。Northern 印迹杂交是鉴定RNA 的杂交，杂交的受体是RNA 片段，探针可用DNA 或RNA，也需将受体从琼脂糖凝胶转移到固相支持滤膜上与探针进行杂交。原位杂交是将分子杂交与组织化学相结合的一项技术，是鉴定组织、细胞及染色体上特异的DNA 或RNA 序列的杂交，杂交的受体是DNA 或RNA 片段，探针可用DNA 或RNA。若受体DNA 是从转化的菌落释放，则原位杂交又称菌落杂交，用于鉴别阳性重组体。这些技术一般包括以下几个主要过程：用同位素或非同位素标记DNA 或RNA 作为探针，制备待检核酸样品（核酸提取、变性、结合于硝酸纤维膜或制备组织、细胞标本），预杂交、杂交，杂交后处理，杂交后结果的判定和分析等步骤。

一、核酸探针制备及标记

核酸探针（nuclear magnetic probe）核酸序列发生特异性互补的已知核酸片段，因而可检测样品中特定的基因序列。根据核酸探针的来源及性质分双链DNA、单链DNA、单链RNA 和人工合成的寡核苷酸探针等。在选择探针时，应依据不同目的，选择不同类型的具有高度特异性的一段核酸片段作为探针。用于分子杂交的核酸探针均须进行示踪物标记，与靶基因杂交后，才能检测显示出杂交体信号。标记物有放射性同位素和非放射性同位素两大类。^{3}H、^{35}S 和^{32}P 是三种较常用的放射性同位素标记物，非放射性同位素标记物较常用的是生物素（biotin）、地高辛（digoxigenin，DIG）和荧光素等。本节介绍常用的探针体外标记方法。

（一）缺口平移标记法

【原理】

缺口平移标记法（nick translation）是在未标记的DNA 探针溶液中加入一定量的胰DNA 酶Ⅰ（DNase Ⅰ），DNA 聚合酶Ⅰ和标记的三磷酸核苷。DNase Ⅰ在DNA 双链上随机切开若干个带有3′－OH 末端的单链缺口，而DNA 聚合酶Ⅰ发挥5′→3′核酸外切酶活性从5′－末端切除单核苷酸；同时又具有从5′→3′的聚合作用，将标记的三磷酸核苷按5′→3′方向重新修补缺口，此新合成DNA 的两条链均匀地被掺人标记物。该法适合于各种环状或线性双链DNA 探针标记。

【试剂】

1）10×缺口平移缓冲液：含Tris－盐酸0.5mol/L（pH7.2），硫酸镁0.1 mol/L，二硫苏糖醇（DTT）1.0 mmol/L，牛血清白蛋白（BSA）500，μg/ml。

2）未标记脱氧三磷酸核苷（dNTP）混合液：dTTP、dCTP、dGTP 溶于50mmol/L

Tris－盐酸缓冲液（pH =7.2），终浓度为20mmol/L。

3）DNaseⅠ（10ng/ml）：溶于含50μg/ml 的BSA、1mmol/L 的DTT 的50%乙二醇溶液。

4）DNA 聚合酶Ⅰ（5U/μl）：溶于50mmol/L 的Tris－盐酸缓冲液（pH =7.2）。

5）[α－^{32}P）dATP：111（10^{13}Bq/mmol、37×10^{4}Bq/μl。

【操作步骤】

1）加样：冰浴下依次加入下列试剂并混匀：10×缺口平移缓冲液2.5μl，未标记的dNTP 混合液1.0μl，DNA（0.5～1μg）5.0μl，[α－^{32}P] dATP 5.0μl，DNase Ⅰ（振荡混匀）2.5μl，DNA 聚合酶Ⅰ（振荡混匀）0.5μl，双蒸去离子水加至体积25μl。

2）反应：于14～16℃水浴2～3h，加1μl 浓度为0.5mol/L 的EDTA 溶液（pH8.0），终止反应。

3）分离：标记完毕的反应液加至TE 缓冲液平衡的Sephadex G－50 柱上（柱床为0.7×30mm）。加样完毕后，用TE 缓冲液洗脱，分管收集洗脱液，每管约200μl。再每管取5μl 点样于滤纸上液闪计数。主峰为纯化的标记探针，尾峰为未被结合的游离标记核苷酸。将主峰部分收集，－20℃储存。

4）结合率的计算：

$$\text{结合率}=\frac{\text{主峰计数（cpm）}}{\text{主峰计数（cpm）}+\text{尾峰计数（cpm）}}\times 100\%$$

一般结合率在20%～30%。

【注意事项】

1）DNase Ⅰ的浓度要适当，过高会导致DNA 链上形成的切口过多，从而使探针过短；过低则不足以形成适量的缺口，使标记效率下降。因此，每换用新批号的DNase Ⅰ时，应进行预试验，摸索适当的DNase Ⅰ的用量。

2）DNA 聚合酶的量与标记率成正比关系。一般以1μg DNA 加入5～20U DNA 聚合酶。

3）缺口平移标记试剂盒可以从Promega 或Amersham 公司购得。

（二）5′末端标记法

【原理】

DNA5′末端的磷酸根用碱性磷酸酶去磷酸化，再用T4 多核苷酸激酶将[γ－^{32}P] ATP 的γ－$_{32}$P 转移到DNA5′端的羟基上。

【试剂】

1）5×T4 多核苷酸激酶缓冲液：内含Tris－盐酸（0.5mol/L），pH =7.6，氯化镁

0.1mol/L），DTT　50mmol/L），精脒　spermidine，1mmol/L）。

2）T4 多核苷酸激酶溶液　1U/μl）。

3）碱性磷酸酶溶液　2～5U/ml）。

【操作步骤】

1）DNA 去磷酸化：在离心管内加DNA5μl，50mmol/L 的Tris－盐酸缓冲液　pH＝8.0）25μl 和碱性磷酸酶溶液20μl，在37℃下下反应30～60min。然后用酸液变性碱性磷酸酶，用乙醚提取。再加1/10 体积的浓度为3.0mol/L 的醋酸钠溶液，用乙醇沉淀。

2）将37×105Bq　[γ－^{32}P] ATP 放入小离心管，冻干。

3）转^{32}P 到DNA 上：在含有　[γ－^{32}P] ATP 的小离心管内，依次加入去磷酸的DNA38μl、多核苷酸激酶缓冲液10μl、多核苷酸激酶3μl，在37℃下反应30～40min。

4）分离：加等体积饱和酚，离心5～10min，取上清液到另一个小离心管内；再加500μl 乙醚，混匀，离心，弃去上层含有残留酚溶液，加1/10 体积的浓度为3.0mol/L 的醋酸钠溶液；然后加双倍体积冷乙醇混合在－70℃中15min，或－20℃中2h，沉淀DNA。

【注意事项】

1）短链DNA 或（人工合成的）寡核苷酸探针可使用此法。

2）铵离子是多核苷酸激酶的强烈抑制剂。故DNA 样品接受激酶处理之前不应溶于含铵盐的缓冲液中。

3）5′末端标记试剂盒可以从Promega 或Amersham 公司购得。

㈢ 随机引物标记法

【原理】

随机引物是指含有各种可能排列组合顺序的寡核苷酸混合物。目前实验室中常用的随机引物多是人工合成，其长度为6 个核苷酸。标记的方法是将双链DNA 变性成单链DNA，再与随机引物退火杂交，在四种脱氧三磷酸核苷存在下，由大肠埃希菌DNA 聚合酶大片段（Klenow 片段）催化，从引物的3′末端开始按5′→3′方向合成与模板DNA 互补的DNA 链，如有　[α－^{32}P] dNTP 或其他示踪物掺入，就可产生标记的DNA 探针。

【试剂】

1）10×Klenow 缓冲液：内含Tris－盐酸0.5mol/L　pH7.2），硫酸镁　0.1mol/L），DTT　1mmol/L），BSA　0.5mg/ml）。

2）随机六聚核苷酸：按说明书使用。

3）10×dNTP　（不含dCTP）：各5mmol/L。

4）Klenow 片段：5U/μl。

5）　[α—^{32}P] dCTP：111 ×10^{12}Bq／mmol，37 ×10^{4}Bq／μl。

【操作步骤】

1）　在离心管中，将TE 溶解的30 ～100ng 纯化的双链DNA 与1 ～5ng 随机引物混合（总体积不超过14 μl），置沸水中变性3 min，再立即置冰浴中冷却。

2）　迅速离心10s，使溶液聚集于试管底部，冰浴中放置。

3）　冰浴中在一微量离心管中，依次加入下列试剂并混匀：

10 ×Klenow 缓冲液	2.5 μl	Klenow 片段	1.0 μl
10 ×dNTP	2. μl	[α—^{32}P] dCTP	5.0 μl

4）　将上述混合液加入到变性模板DNA 随机引物溶液中。

5）　室温放置3h 以上。

6）　加1 μlEDTA 溶液（0.5mol／L，PH8.0）终止反应，并用TE 缓冲液稀释反应液至100 μl，—20 ℃保存备用。

【注意事项】

1）　探针的比活度与模板量有关，模板越少，比活度越高。

2）　反应产物的长度与加入随机寡核苷酸引物的量成反比。标准方法得到的标记产物长度平均为200 ～400bp。需要较长片段的探针时，可适当减少引物的量。

3）　由于反应缓冲液p 为6.6 时，Klenow 的3 →5 '外切酶活性被抑制，因此，延长反应时间也不会使DNA 降解，必要时可将反应时间延长到12 ～16h。

（四）　光化生物素标记法

【原理】

光化生物素是一种化学合成的生物素衍生物，分子中含有可光照活化的叠氮代硝苯基，生成活泼N 基团，后者易与DNA 或RNA 中的伯胺基发生结合反应，生成光化生物素标记核酸探针。

【材料和试剂】

1）　光化生物素：在暗室中用灭菌双蒸水按1mg／ml 配制。分装后，避光下—20 ℃可稳定保存4 ～6 个月。

2）　正丁醇或仲丁醇。

3）　特种光源：LYQ12 —100 卤钨灯。

【操作步骤】

1）　暗室安全灯下，在离心管中加入待标记核酸1 ～25 μg，2 倍量的光化生物素（即2 ～50 μg），补水至50 μl。将反应管敞开插入冰模中，距卤钨灯光源10cm，强光照射30 min。加TE 缓冲液100 μl。此后操作在正常光线下。

2）加正丁醇（或仲丁醇）100μl，抽提2次，去上层正丁醇。

3）加1/10体积的醋酸钠溶液（3mol/L，PH5.2）和2倍体积冷无水乙醇，混匀后置－20℃过夜。

4）离心的沉淀物经干燥后，溶于适量的EDTA（0.1mol/L）或灭菌双蒸水中，浓度为50μg/ml，分装后－20℃避光保存。

【注意事项】

1）避光下准备反应体系。

2）用作标记探针的核酸应高度纯化，不用Tris缓冲液溶解，因Tris缓冲液含有伯胺基，可干扰标记。

3）一般1μg的DNA用1～2μg光化生物素。

（五）DIG标记探针

DIG标记是一种非放射性标记方法。Digoxigenin－11dUTP可以通过随机引物标记结合到DNA探针或通过DNA体外转录标记到RNA探针，或通过3′－尾端标记结合到寡聚核苷酸探针。然后与碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体进行免疫反应，通过化学呈色检测。DIG标记法与前述同位素酶促标记法基本相同。

二、斑点杂交技术

【原理】

将DNA或RNA变性后直接点样吸附于固相支持滤膜上，然后用标记探针与之杂交，洗涤去除未反应探针，采用放射自显影或显色反应检测杂交信号，分析结果。

这里主要介绍用α－^{32}P标记DNA探针及光化生物素标记DNA探针检测DNA与RNA的斑点杂交方法。

【材料和试剂】

1）器材：同位素探测仪，自动光密度扫描仪，真空抽滤加样器，感光胶片盒（带增感屏）。

2）20×SSC：氯化钠（3mol/L）、枸橼酸钠溶液（0.3mol/L）：取氯化钠175.32g，加双蒸水700ml，充分溶解后加枸橼酸钠88.2g，溶解后加双蒸水至1L，在55.16kPa高压下灭菌15min。

3）去离子甲酰胺：取离子交换树脂（Bio－BadAG501－X8，20～25目）11g与甲酰胺110ml混合，室温下搅拌30min，用Whatman滤纸过滤2次，分装后－20℃保存。

4）硫酸葡聚糖（1mg/ml）：取硫酸葡聚糖1mg，溶于1ml灭菌水，－20℃保存。

5）50×Denhardt溶液（1%BSA、1%PVP－40、1%Ficoll－400）：分别取BSA1g，

PVP －40（聚乙烯吡咯烷酮）1g，Ficoll －400（水溶性聚蔗糖）1g，用少量双蒸水溶解混合，加双蒸水至100ml。过滤除菌，－20℃保存。

6）变性鲑鱼精DNA（10mg/ml）：取鲑鱼精DNA（Sigma 公司，III型，钠盐）10mg放入灭菌管中，加入Tris（100mmol/L）－盐酸－EDTA（5mmol/L）缓冲液1ml，用超声波处理至液体透亮，完全溶解，分装后－20℃保存。临用前置沸水浴中3min，然后迅速在冰浴中冷却。预杂交液中应含DNA（100μg/ml）经变性并打断的鲑鱼精DNA。

7）卵白素－碱性磷酸酶（Avidin －AKP，100U/100μl）：以0.4%TritonX －100PBS液配制。应用液中Avidin －AKP 浓度为1～2U/ml。

8）底物缓冲液：内含Tris －盐酸（100mmol/L，pH9.5），氯化钠（1mol/L），氯化镁（5mmol/L）。

9）底物显色液：准备50mg/ml 的BCIP（BCIP10mg 溶于二甲基酰胺200μl）、5mg/ml 的NBT（NBT15mg 溶于70%二甲基酰胺200μl），再配成底物显色液（底物缓冲液5ml＋BCIP10μl＋NBT10μl）。

[操作步骤]

（一）α－$_{32}$P 标记DNA 探针的斑点杂交

1．样膜的制备

1）核酸样品的预变性：所取DNA 或RNA 样品的量视情况而定，一般可加10～20μg。

①DNA 样品：样品DNA 溶于水或TE 缓冲液，先置沸水浴5～10min，再于冰浴中迅速冷却，使其变性。

②RNA 样品：在离心管中加入RNA 样品10μl、20×SSC2μl、甲醛7μl、甲酰胺20μl，混匀置68℃下温育15min，再迅速人冰浴中至少5min。

2）尼龙膜的预处理：戴上干净手套，取尼龙膜按需要剪成合适大小，并剪掉一角作为点样顺序标记。如采用手工点样，用铅笔在尼龙膜上按0.8～1cm^2 的面积标上小格。用蒸馏水浸湿，再浸入6×SSC 溶液中至少30min，将膜取出自然晾干后待用。

3）点样：可根据情况选用手工直接点样或用真空抽滤加样器点样。

1）手工直接点样：用微量移液器将经变性处理的核酸样品依次点到尼龙膜的标记点上。斑点直径不要过大，应控制在0.5cm^2 以内。单个样品分少量多次点样，边点样边风干。

2）斑点（狭缝）真空抽滤加样器点样：①常规方法清洗加样器后，用0.1mol/L 的氢氧化钠溶液清洗点样器，再用灭菌三蒸水充分冲洗，如为RNA 样品还应用DEPC 处理的水充分冲洗；②将尼龙膜湿润后覆盖在加样器支持垫上（或为预先湿润的滤纸），

小心排除气泡，尼龙膜覆盖不到的部分需用Parafilm 膜封闭；重新安装好加样器，接通真空泵；③加样孔内加满10 ×SSC，真空抽滤至所有液体被抽干；关闭真空泵，然后重复抽滤1 次；④上述经预变性处理的样品中加入2 倍体积的20 ×SSC，分别加至各孔，真空抽滤；⑤待全部液体抽干后，再加10 ×SSC 抽滤2 次，待10 ×SSC 抽干后再维持真空5min，使尼龙膜干燥。

4）固定：点样后的样膜，置滤纸上，室温自然干燥，然后80 ℃烘烤2h 固定核酸样品。固定的样膜封存于塑料袋内待用（—20 ℃可保存若干月）。

2．预杂交

1）配制预杂交液：终浓度为6 ×SSC、50 %的去离子甲酰胺、5 ×Denhardt 液、0.5mg/ml 的鲑鱼精DNA 和0.5 %的SDS。

2）将封存样膜的塑料袋剪一斜角开口，加少量的2 ×SSC 使其湿润，弃余液。按每平方厘米膜面积加入150 ～200μl 预杂交液，去除袋内气泡，熔封塑料袋斜角开口处。将此塑料袋置恒温摇床或杂交炉中，42 ℃温育2 ～4h。

3．杂交

1）探针变性：α—^{32}P 标记的探针如为双链DNA，则需经变性处理。将标记好的探针置沸水浴中5min，然后迅速置冰浴中。

2）配制杂交液：终浓度为6 ×SSC、50 %的去离子甲酰胺、5 ×Denhardt 液、0.1mg/ml 的鲑鱼精DNA、0.5 %SDS 和放射性同位素探针0.5ng/μl。

3）杂交：从水浴中取出塑料袋，剪去一角，弃预杂交液，加入上述杂交液（按80μl/cm^2 膜）及α—^{32}P 标记探针。小心排除气泡，重新封好口。为防止污染，应将塑料袋外再套另一塑料袋。将杂交袋置恒温摇床或杂交炉中，42 ℃温育16 ～20h。

4．洗膜

杂交温育结束后，剪开杂交袋一角，将杂交液倒人放射性废物容器中，剪开袋取出膜，放进装有2 ×SSC、0.1 %的SDS 的盘中，室温摇晃漂洗5min。根据需要选择不同方法洗膜，去除非特异性的同位素。

1）高严谨漂洗：依次按下列条件漂洗：2 ×SSC、0.1 %的SDS 室温，2 ×15min；0.1 ×SSC、0.1 %的SDS 室温，2 ×15min；0.1 ×SSC、0.1 %的SDS55 ℃，2 ×15min。

2）低严谨漂洗：依次按下列条件漂洗：6 ×SSC、0.1 %的SDS 室温，2 ×15min；2 ×SSC、0.1 %的SDS 室温，2 ×15min；1 ×SSC、0.1 %的SDS55 ℃，2 ×15min。

5．放射性自显影

样膜经漂洗后，置干净滤纸上，吸去膜上多余水分，外面裹一层保鲜膜。暗室安全灯下，在胶盒中压上2 张X 感光胶片，样膜上下各1 张，盖上胶片盒，置—80 ℃下放射

自显影。时间视杂交强度而定，24h ～10d 不等。取出胶片盒，恢复至室温。按常规冲洗X 感光片：显影1 ～5min，停显1min，定影5min，流动水冲洗10min，自然干燥。

6．结果观察

根据曝光点（或狭缝）的有无、强弱，可以判断目的基因的有无及量的多少。利用“自动灰度扫描仪”扫描曝光点（狭缝），计算积分光密度值，可以进行半定量分析。

（二）光敏生物素标记DNA 探针的斑点杂交

1．样膜的制备

按α—^{32}P 标记DNA 探针的斑点杂交方法进行。

2．预杂交

按α—^{32}P 标记DNA 探针的斑点杂交方法进行。预杂交液中各组分的终浓度如下：5 ×SSC、50 % 去离子甲酰胺、5 ×Denhardt 液、磷酸氢二钠50mmol/L（pH7.0）、EDTA5mmol/L、鲑鱼精DNA0.5mg/ml。

3．杂交

（1）探针变性：将标记的光化生物素DNA 探针加入0.5mlEppendorf 管中，置沸水中5 ～10min 后即置于冰浴中，使保持单链状态。

（2）配制杂交液：各组分终浓度为5 ×SSC、50 %去离子甲酰胺、1 ×Denhardt 液、磷酸氢二钠20mmol/L（pH =7.0）、5 %硫酸葡聚糖、鲑鱼精DNA0.1mg/ml、光敏生物素标记DNA 探针20 ～100ng/ml 组成。

（3）杂交：参见α—^{32}P 标记DNA 探针的斑点杂交。

4．洗膜

取出样膜置含2 ×SSC、0.1 %SDS 溶液中漂洗5min。再按下列条件洗膜：2 ×SSC、0.1 %SDS100ml，室温，3 ×20min；0.1 ×SSC、0.1 %SDS100ml，65 ℃，3 ×30min。将样膜置干净滤纸上，室温自然干燥，封入塑料袋内（不立即显色可存放于－20 ℃至少1 个月）。

5．显色

（1）封闭：将3 %BSA 溶液加入塑料袋内，于42 ℃温育封闭1h。

（2）酶联显色反应：弃封闭液，再加入适当稀释的Avidin －AKP，置室温15 ～30min，不时轻微振荡。随后依次按下列条件洗膜：100mmol/LTris －盐酸缓冲液（pH =7.5）、1mol/L 氯化钠溶液、100mmol/LTris －盐酸缓冲液（pH =9.5）、1mol/L 氯化钠溶液、5mmol/L 氯化镁溶液。将膜转入新塑料袋中，加入新配制的底物显色液，在暗环境中室温下显色，时间15 ～60min。

6．结果判断

出现蓝紫色斑点（狭缝）者为阳性，未着色为阴性。根据着色的深浅判断目的基因的多少。

【注意事项】

（一）固相支持膜的选择

用作杂交载体的固相支持膜的种类较多。理想的膜应符合以下要求：①具有较强的结合核酸分子的能力；②与核酸分子结合后，应不影响其与探针分子的杂交反应；③与核酸分子的结合稳定牢固，能经受杂交、洗膜等操作过程而不脱落或脱落极少；④非特异吸附少，在漂洗过程中能洗脱非特异性吸附在其表面的探针分子；⑤具有良好的机械性能，如柔软性好、韧性强等，以便于操作。

1．硝酸纤维素膜

在高盐浓度下，具有较强的吸附单链DNA 和RNA 的能力。吸附的核酸经80 ℃烘烤后，依靠疏水性相互作用而结合到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜具有对蛋白质非特异性吸附作用较弱、产生的杂交本底较低等特点，此有利于进行非同位素杂交。其缺点是结合核酸能力的大小取决于转印条件和高浓度盐，结合小片段核酸（<200bp）效率低，质地脆弱，不易操作，不能进行反复杂交。

2．尼龙膜

这是目前较理想的一种核酸固相支持膜，经过正电荷基团修饰的尼龙膜更佳。核酸经烘烤后，可牢固地与膜共价结合。尼龙膜可与小至10bp 的片段结合，在低盐条件下也能较好地结合核酸。它的韧性较强，操作方便，可重复用于杂交。尼龙膜的缺点是对蛋白质有一定的吸附作用，产生的杂交本底较高，但可用加大预杂交液中封闭试剂的方法克服。

（二）杂交体系的选取

1．杂交液组分

杂交液内除含一定浓度的标记探针外，还含有较高浓度的盐、甲酰胺、硫酸葡聚糖、牛血清白蛋白及非特异性DNA，各有其作用。高浓度的Na^+可增加杂交率，还可减低探针与组织标本的静电结合；甲酰胺可使T_m 值降低，如甲酰胺浓度增加1 %可分别使RNA ：RNA、NA ：DNA 和DNA ：DNA 的T_m 值下降0.35 ℃、0.50 ℃和0.65 ℃。杂交温度降低，可避免长时间高温处理导致液体蒸发或其他一些不良影响，在较低的温度下探针也更稳定。硫酸葡聚糖能与水结合，从而减少杂交液的有效容积，提高探针有效浓

度，提高杂交率。牛血清白蛋白及非特异性DNA 是为了阻断探针与组织结构成分之间的非特异性结合，减低杂交背景。

2．杂交温度

杂交温度应低于杂交体的融解温度（t_m）20～30 ℃。当杂交液含有50％甲酰胺、盐浓度为0.75 mol/L 左右时，DNA 探针的杂交温度约为42 ℃，RNA 探针约为50～55 ℃，寡核苷酸探针约为37 ℃。

3．杂交时间

杂交反应时间可能随着探针浓度的增加而缩短，但在一个相当大的范围内，杂交反应应在4～6h。实际操作时，为稳妥及方便，可将杂交液和标本孵育过夜，但要注意杂交反应时间不要超过24h。反应时间过长，形成的杂交体会自动解链，杂交信号反而减弱。

㈢ 操作过程中应注意的问题

1．点样

采用手工点样，原则上应少量多次，每次点样量不能过多，控制在1 μl 左右，待干燥后再重复点样。斑点的直径应控制在0.5cm 之内，而且所有的斑点应尽可能一致。应用真空抽滤加样器点样时，样品的体积不能少于50 μl。往点样孔加样时，顺一侧壁慢慢加入，以避免气泡产生。

2．烤膜固定

80 ℃干烤2h 可能更有助于核酸样品与膜的牢固结合。

3．去除核酸酶

所有杂交用的器皿、工具及反应体系，应尽量做到无菌化处理，以减少外源性核酸酶对目的基因及探针的不良影响。特别当样品为RNA 时，更应注意无RNA 酶的处理。

4．预杂交的作用

杂交前进行预杂交的目的是将滤膜上非特异性DNA 结合位点封闭。常用的封闭物有两类：一类是变性的非特异性DNA，大多采用鲑鱼精DNA 或小牛胸腺DNA；另一类为一些生物大分子化合物，一般多采用Denhardt 液。

5．杂交后样膜的漂洗

其目的是除去未参与杂交体形成的过剩探针及非特异性杂交的探针。漂洗条件应尽可能严格，一般遵守的共同原则是盐浓度由高到低，温度由低到高。要根据目的基因的丰度、标记探针的要求来选择下列方法。

1）低严谨漂洗条件（高盐低温）：目的基因含量较少、与探针杂交效率低。可以

提高敏感度，但相应会产生非特异性和高本底。

(2) 高严谨漂洗条件 (低盐高温)：目的基因含量较丰富，与探针杂交效率高。可最大限度地降低本底、提高特异性。

(四) 常见问题及分析

1．杂交信号比预期低

可能原因有：①固相支持膜预处理欠妥当；②标记的双链探针没有变性或变性不完全；③杂交和/或漂洗条件太严格，以致杂合体根本没有形成或形成后被解离；④探针比活性太低；⑤杂交时间和/或自显影 (或染色) 时间太短；⑥探针被降解。

2．滤膜放射性自显影结果到处是黑点

其原因有：①在杂交和漂洗期间的某些阶段滤膜变干；②探针太“脏”，如探针在分离纯化过程中可能被琼脂糖残迹污染；③杂交和/或漂洗温度太低。

3．放射性自显影结果中部分变黑色

可能原因有：①样膜在漂洗过程中部分变干；②由于滤膜用赤手触摸而使转至膜上的油脂粘附了探针。

4．放射性自显影结果在随机位置上有黑点

可能原因有：①未结合的放射性前体没有完全从探针中除去；②杂交期间气泡没有从塑料袋中完全除去；③滤膜上有灰尘或污物。

5．放射性自显影结果在随机位置上出现空白点

主要由于X 线片盒自 −80 ℃取出后回温时间不够，冷凝水未完全去除，因而在显影过程中影响局部X 线片的显影。

三、Sourthern 印迹杂交技术

【原理】

Sourthern 印迹杂交是分析DNA 的一种方法。它是从细胞或组织中提取高分子量的DNA，用一种或多种限制性内切酶消化，再通过琼脂糖凝胶电泳按大小分离所得片段，从凝胶中按原来位置和顺序吸印转移到固相支持膜 (硝酸纤维素膜或尼龙膜) 上，然后再与同位素或非同位素标记探针杂交，最后经放射自显影或显色反应进行检测。以下以 α−^{32}P 标记DNA 探针检测DNA 为例，介绍Sourthern 印迹杂交方法。

【试剂和材料】

(1) 0.2 mol/L 的盐酸溶液。

(2) 变性液：0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液、1.5 mol/L 的氯化钠溶液。

3）中和液：1mol/L 的Tris－盐酸缓冲液（pH =7.4）、1.5mol/L 的氯化钠溶液。

4）转移液：20 ×SSC 或20 ×SSPE。

5）1mol/L 的Tris－盐酸（pH =7.5）、0.5mol/L 的氯化钠混合液。

6）同位素探测仪，自动光密度扫描仪，真空核酸转移装置，紫外照相置，装X 感光胶片盒（带增感屏）。

【操作步骤】

（一）琼脂糖凝胶电泳分离基因组DNA 限制性酶切片段

1）在灭菌离心管中依次加入下列试剂并混匀（以常用的30μl 反应体积为例）：0.5μg/μl 基因组DNA20μl，双蒸去离子水5μl，10 ×缓冲液3μl，限制性内切酶（10U/μl）2μl。

2）12000r/min 下离心数秒，使管壁上的液珠离心至管底，以保证反应体系体积准确。

3）置37 ℃水浴保温3 ～6h。

4）加入1/5 体积的EDTA（0.5mol/L）溶液终止反应。

5）依常规方法进行DNA 的琼脂糖凝胶电泳。

（二）DNA 的转移与固定

基因组DNA 经限制性内切酶消化和琼脂糖凝胶电泳后，可将DNA 从凝胶中转移至固相支持膜上，方法主要有毛细管洗脱法及真空转移法。

1．毛细管洗脱法

1）电泳结束后照相，然后切去凝胶的边角作为标记。

2）将胶置于盐酸溶液（0.2mol/L）中处理10min，如果检测的DNA 片段＜1kb，可省略此步骤；如果DNA 片段＞1kb，可适当延长处理时间（10 ～20min）。当胶中溴酚蓝由蓝色转成桔黄色时，说明胶已处理完成。

3）弃去盐酸溶液，用去离子水漂洗2 次。随后浸泡于数倍体积的变性液中15 ～45min 后（此时溴酚蓝重新变为蓝色），换用中和液处理15 ～30min。

4）取一瓷盘，加入转移液，上置一块略大于凝胶的玻璃板作为平台，玻璃板表面铺一张新华二号滤纸，滤纸的两边浸没在转移液中，去除玻璃板与滤纸之间的所有大小气泡。

5）根据胶的大小裁剪固相支持膜及滤纸片（3 ～5 张），同样剪去膜的一角作标志（也可用铅笔在膜下端写上有关资料，如时间、样品及所用酶等）。

6）将膜平铺在去离子水表面，直到滤膜从下到上湿透为止，然后将其转至转移液

中，至少浸泡5min。操作时戴手套，用平头镊子。

（7）将经转移液浸泡的滤纸片1～2张铺在转移台上，驱逐气泡。倒上少许转移液，用大小合适的薄塑料板将胶从中和液中托起，将加样孔先接触转移台，自一端起将胶滑放到滤纸上，注意不要留下气泡。将浸泡好的膜放在胶上，使膜的上端对齐加样孔。放上2～3层预先浸泡过转移液的滤纸片，再放上吸水纸堆至10～15cm高，上面加一块平板，然后压上0.5kg左右的重物（重物可使滤纸片与吸水纸之间有较好的接触而发挥毛细虹吸作用，可在转移完后用紫外灯检查转移效果。）。

（8）转移持续8～24h，每当纸巾浸湿后更换新的纸巾。小片段转移快，大片段转移需时较长。

（9）转移完毕，移去吸水纸，用平头镊将膜取出，在6×SSC溶液中浸泡滤膜5min，用滤纸印吸干后，夹在两层干净滤纸片中，置于80℃烤0.5～2h。封人塑料袋中保存备用。

2．真空转移法

（1）安装真空转移装置：①根据胶的大小做好塑料膜窗口，其大小略小于凝胶，每边应有3～10mm的重合，让胶将窗口严密地封住。但不能大于10mm，否则加入液体后，胶容易漂起来。②将多孔滤板安放在装置的下槽内，4边套紧气密圈，再放上塑料膜窗口。③将上框放上，压住窗口塑料膜的4边，夹紧四角上的锁定夹。

（2）依次放上转移膜及琼脂糖凝胶：将硝酸纤维素膜或尼龙膜裁剪成每边小于窗口边缘0.5～1.0mm。①用水浸湿，再用20×SSC漂浮转移膜20～30min，尼龙膜可不预处理；②将膜放在窗口内，务使每边留下1mm左右的空隙；③用一张大小合适的薄塑料片托住凝胶，将加样孔与窗口对齐平放，然后使胶滑落在膜上，覆盖住窗口；④启动真空泵，使凝胶吸压在膜和塑料窗口上，检查密封效果。

（3）脱嘌呤处理：用巴氏吸管加盐酸溶液（0.2mol/L）于凝胶上，覆盖整个凝胶，使真空泵负压在20～30Mbar维持10～20min，至溴酚蓝完全变色为止。吸去凝胶上面的盐酸。

（4）变性处理：同法加入变性液覆盖整块凝胶，使真空泵负压在20～30Mbar维持10～20min，至溴酚蓝颜色完全复原为止。吸去凝胶上面的变性液。

（5）中和处理：同法加入中和液覆盖整块凝胶，使真空泵负压在20～30Mbar维持10～20min，吸去凝胶上面的中和液。

（6）转移：从凝胶中央小心加入20×SSC溶液，直至覆盖住整块凝胶，液面最好达2倍凝胶的厚度。使真空负压为50～55Mbar，转移时间依照凝胶的厚度、浓度而定。凝胶的厚度和浓度越高，所需时间越长，一般持续转移30～60min。

(7) 固定：转移结束，依次移去上框、剩余的20×SSC、凝胶及真空垫圈，取出转移膜，不要浸泡或冲洗，转移面朝上放在滤纸上晾干。将膜夹在两层滤纸中间，80℃干烤固定1～2h，封人塑料袋中保存备用。

(三) 预杂交、杂交、洗膜、放射自显影和结果分析

按α—^{32}P标记DNA探针的斑点杂交方法进行。

【注意事项】

(1) DNA样品浓度不能太高，以0.4～0.6μg/μl为宜，经酶切的DNA量在10μg左右。

(2) 酶切反应体系的体积一般为20～30μl，为以后的电泳加样提供方便。考虑到加样误差和保温过程中水分蒸发的影响，可适当增大反应体积，但总体积最好不超过50μl。

(3) DNA转移到尼龙膜上的效率，直接影响杂交的成功。以下一些因素可影响转膜效率：①在铺放转移膜和放置凝胶时留有气泡。预防方法可在铺放转移膜和放置凝胶时事先加少量转移液。②转移方法。目前效率较高的转移方法为真空转移法，几乎能将所有的DNA转移到膜上。③选择适当的真空压力。真空压力太小转移效率下降，真空压力太大，又容易使凝胶破碎。④密封不良和凝胶渗漏可使真空压力不足，影响转移效率。

(4) 消除非特异本底。由于用尼龙膜杂交本底较高，故适当延长预杂交时间，对非特异位点的封闭有利。预杂交液及杂交液中的大分子物质（Denhardt液中的聚蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮、牛血清白蛋白和鲱鱼精ssDNA等）能较好占据尼龙膜上除固定的待检DNA以外的位点，阻止杂交反应中的非特异结合。

四、Northern印迹杂交技术

【原理】

Northern印迹杂交的基本原理是将RNA样品通过变性琼脂糖凝胶电泳进行分离，再转移到尼龙膜等固相膜载体上，用放射性同位素标记的DNA或RNA特异探针对固定于膜上的mRNA进行杂交，洗膜去除非特异性杂交信号，经放射自显影，对杂交信号进行分析。将杂交的mRNA在电泳中的迁移位置与标准分子量进行比较，即可知道细胞中特定的基因转录产物的大小；对杂交信号的强弱比较，可了解该基因表达mRNA的强弱。

本节以甲醛琼脂糖变性胶电泳分离RNA为例，介绍RNA Northern印迹杂交方法。

【试剂和材料】

(1) 5×甲醛电泳缓冲液：称MOPS 20.9g溶于800ml经0.1%焦炭酸二乙脂（DEPC）

处理的水中，加醋酸钠（3mol/L）溶液8.3ml，EDTA（5mol/L）溶液（pH8.0）20ml，用DEPC处理的水定容至1L，0.2μm微孔滤膜过滤除菌，避光于4℃下保存。溶液见光变为深黄色则不再用。

2）甲醛凝胶加样缓冲液：含甘油50%，EDTA（1mmol/L，pH8.0），溴酚蓝（2.5g/L），二甲苯青FF（2.5g/L）。用0.1%的DEPC于37℃下处理过夜，高压灭菌，保存于室温。

3）溴化乙锭溶液：含溴化乙锭（0.5μg/ml）、醋酸铵（0.1mol/L）。

4）器材：同位素探测仪，自动光密度扫描仪，真空核酸转移装置，紫外照相装置，X感光胶片盒（带增感屏）。

[方法]

（一）甲醛变性电泳分离RNA样品

1）电泳槽的无RNA酶处理：电泳槽用去污剂洗干净，蒸馏水冲洗，无水乙醇漂洗干净，3%过氧化氢溶液处理10min，最后用DEPC处理过的三蒸水冲洗数遍。

2）配制10g/L琼脂糖变性胶：取5×甲醛电泳缓冲液20ml，0.1%DEPC 80ml，琼脂糖1g，加热至胶完全溶化后，冷却至60℃，加入37%甲醛5.4ml，混匀并置通风橱内，将凝胶倾倒人电泳槽上，于室温放置30min或更长时间，使凝胶凝固。

3）RNA样品处理：在离心管中加入RNA样品9μl，5×甲醛电泳缓冲液4μl，甲醛7μl，甲酰胺20μl。混匀后65℃温育15min，并迅速置冰浴中至少5min。在5000r/min下离心5s，使管内所有液体集中于管底。加4μl甲醛凝胶加样缓冲液混合待用。

4）电泳：制备的凝胶先预电泳5min，再将样品加至凝胶加样孔中，同时加入已知大小的RNA混合物作为分子量标准参照物，按3～4V/cm电压进行电泳。待溴酚蓝迁移出约7～8cm时结束电泳。电泳过程中，每隔1～2h将正负极槽内液体混合后继续电泳。

5）电泳结果观察：切下分子量标准参照物的凝胶条，浸入溴化乙锭溶液中染色30～45min。在凝胶旁放置一透明尺，在紫外灯下照相，便于以后测量照片上每个RNA条带至加样孔的距离。以RNA片段大小的对数值对RNA条带的迁移距离作图，绘制标准曲线，根据标准曲线计算杂交后所检出的RNA分子的大小。

（二）变性RNA转移至尼龙膜

上述经甲醛琼脂糖变性凝胶电泳分离的RNA样品，应尽快转移至尼龙膜上，方法主要有毛细管洗脱法及真空转移法。

1．毛细管洗脱法

1）凝胶的预处理：将凝胶移至一个干烤过的平皿内，将边缘多余部分用眼科解剖

刀切去，在加样孔一侧切去一角作凝胶方位标记，并用经DEPC 处理的三蒸水淋洗数次，除去甲醛。

1） 取一瓷盘，加入20 ×SSC 溶液，上置一块略大于凝胶的玻璃板作为平台，玻璃板表面铺一张新华二号滤纸，滤纸的两边浸没在20 ×SSC 溶液中，去除玻璃板与滤纸之间的所有气泡。

2） 把凝胶底向上翻转覆盖在滤纸上，去除两层之间出现的气泡。用保鲜膜围绕在凝胶周边，但不覆盖凝胶，作为屏障以阻止液体自池边直接流至凝胶上方的纸巾中。

3） 裁剪一张尼龙膜，其长与宽大于凝胶1 ～1.5cm ，并剪下一角做记号以定滤膜方位。先将膜在20 ×SSC 中至少润湿20min ，然后放置在凝胶表面上，两层之间不可有气泡存在。

4） 将两张与尼龙膜一样大小经20 ×SSC 溶液润湿过的滤纸，覆盖在尼龙膜上，去除气泡。

5） 把一叠约5 ～10cm 高、同滤纸大小一样的吸水纸放置在滤纸上，在吸水纸上再放一块玻璃板和约500g 的重物。

6） 上述程序就绪，RNA 转移即开始，需持续18 ～24h 。如果吸水纸过于潮湿，应换新的吸水纸。

7） 转移结束后，揭去凝胶上方的吸水纸和滤纸，取出尼龙膜，不必冲洗、浸泡，转移面朝上置一张滤纸上晾干。将膜夹在两张滤纸中间，80 ℃干烤固定1 ～2h ，封人塑料袋中保存待用。

2．真空转移法

1） 凝胶的预处理：同毛细管洗脱法。

2） 真空转移槽预处理：常规去污剂清洗，三蒸水漂洗数次，再用DEPC 处理的三蒸水冲洗数次后备用。

3） 在转移槽的支持网上置放经2 ×SSC 湿润过的新华2 号滤膜二张，去除支持网与滤膜间的气泡。

4） 裁剪一张尼龙膜，每边应比凝胶大1 ～1.5cm ，于2 ×SSC 中浸泡20min ，平放在滤纸上，去除所有气泡。

5） 选取合适大小的真空垫圈 (每边略小于凝胶1 ～1.5cm），覆盖住尼龙膜，调整尼龙膜的位置，使其处于真空垫圈的中间。

6） 将凝胶放置到真空垫圈上，检查凝胶四边，要与垫圈严密重叠。排除所有气泡。

7） 加上上框，固定真空垫圈。打开真空泵，调整到6 ～13kPa 的压力。

⑻ 小心加入20 ×SSC 溶液覆盖凝胶，持续转移3h 。

⑼ 转移结束，依次移去上框、剩余的20 ×SSC 、凝胶及真空垫圈，取出尼龙膜，不要浸泡或冲洗，转移面朝上放在滤纸上晾干。将膜夹在两层滤纸中间，80 ℃干烤固定1 ～2h ，封人塑料袋中保存待用。

㈢ 预杂交、杂交、洗膜和放射自显影

按α—^{32}P 标记DNA 探针的斑点杂交方法进行。

㈣ 分析结果

根据曝光显示的条带，对照RNA 分子量标准参照物条带的迁移距离图，即可查出凝胶电泳中相应的RNA 位置，从而知道基因转录的RNA 的大小。利用自动光密度扫描仪扫描曝光的条带，计算条带的积分光密度值，以内参照RNA 条带的积分光密度为校正值，可以确定不同样品基因转录的表达强度。

【注意事项】

1．避免RNA 酶污染

RNA 稳定性远较DNA 为差，RNA 酶的灭活或抑制却较DNA 酶困难，因此，所有杂交用器皿、工具及反应体系，尽量做到无菌，以减少外源核酸酶造成的污染。特别是在RNA 变性胶电泳及转移过程中必须防止RNA 降解，避免RNA 酶的污染。

2．甲醛、甲酚胺质量

甲醛、甲酚胺易氧化，甲醛的pH 值要求在4.0 以上，低于此值应弃之不用；甲酰胺最好用混合床树脂处理或新开瓶的甲酰胺小量分装后—20 ℃保存备用。

3.RNA 加样量

电泳分离RNA 时，一般RNA 加样量为10 ～30 μg ，检测的RNA 为低丰度时，加样量增大1 倍或混入1 ～3 μg poly （A） RNA 。

4．溴化乙锭染色

制备RNA 电泳琼脂糖变性凝胶时，如要检测RNA 的完整性，可在凝胶中加入溴化乙锭，这样电泳结束后，可以直接观察电泳结果。但是，在Northern 印迹杂交时，溴化乙锭可导致杂交的效率下降，特别是当被检测的RNA 为低丰度时，最好不要先加入溴化乙锭。

5.RNA 转膜效率

RNA 转移到尼龙膜上的效率，直接影响杂交的成功，所以应选择满意的转移方法。目前效率较高的转移方法为真空转移法，几乎能将所有的RNA 转移到膜上。

6.RNA 分子大小的测定

判定RNA 分子的大小，也可以将总RNA 中28S 及18S 的rRNA 在电泳中产生的两条较明显的条带作为分子量标准。28S rRNA 相当于4.5kb ，而18S rRNA 相当于2.1kb ，以此两种RNA 的迁移距离对比待检RNA 杂交后条带的位置，计算分子大小。

7.RNA 分子的定量检测

选取组织细胞中含量恒定的一种基因，设为内参照，与样品膜进行二次杂交。放射自显影后，测定杂交条带的积分光密度。以内参照为修正值，比较待检RNA 的杂交条带积分光密度，即可定量分析特异RNA 。

8．尼龙膜的多次杂交

杂交与放射自显影后，结合了待检核酸的样膜与第一种探针杂交后经碱或热变性方法可将探针洗去，然后反复与其他探针杂交。去除膜上结合的探针，可以选择下面两种方法：

1）将尼龙膜浸泡于大量含Tris－盐酸（1mmol/L，pH8.0）、EDTA（1mmol/L，pH8.0）、1 ×Denhardt 溶液中，置75 ℃保温2h 。室温下于0.1 ×SSPE 溶液中漂洗5min ，用滤纸吸除大部分液体，但注意勿使滤膜干燥。

2）尼龙膜浸泡于大量含50 %甲酰胺、2 ×SSPE 溶液中，置65 ℃保温1h 。室温下于0.1 ×SSPE 溶液中漂洗5min ，用滤纸吸除大部分液体，但注意勿使其干燥。

经漂洗的湿润的滤膜用保鲜膜包裹，置－80 ℃中放射自显影，检查探针是否已被洗掉。如果X 光片无曝光的条带，可使杂交膜干燥，用塑料袋封好，直接用于杂交或置室温下保存备用。特别需注意的是，如果尼龙膜在保存过程中干燥，探针将与膜呈不可逆性结合，则不能再洗脱下来。因此，在洗膜、放射自显影和保存过程中，均应保持其湿润，并密封在塑料袋中。

9．常见问题及分析

1）杂交结果出现几条杂交带：可能是样品中RNA 含几个不同的基因编码同一种蛋白的RNA ；也有可能是同一基因转录出的mRNA 在生物体内的加工造成了不同长度的存在形式；或者是洗膜不严格，使同源性较高的不同mRNA 分子发生非特异性结合。

2）杂交条带呈弥散状：表示RNA 样品在电泳前就已降解。如在一条带的下方有弥散状的杂交信号，表明RNA 样品有部分降解；连明显的条带都没有，全部杂交信号为弥散状，则说明RNA 的降解十分严重，样品必须重新制备。

五、原位杂交技术

【原理】

原位杂交（in situ hybridization，ISH）是将分子杂交与组织化学相结合的一项技术，也称原位杂交组织化学（in situ hybridization histochemistry，ISSH）。它是利用标记的DNA或RNA为探针，在组织、细胞及染色体上检测特异的DNA或RNA序列的杂交技术。其基本原理是含互补顺序的标记DNA或RNA片段即探针，在适宜的条件下与细胞内特定的DNA或RNA形成稳定的杂交体。根据所用的探针和靶核酸的不同，原位杂交可分为DNA－DNA杂交、DNA－RNA杂交和RNA－RNA杂交3类。根据探针的标记物是否能直接被检测，原位杂交又可分为直接法和间接法两类。直接法指用放射性同位素、荧光素或一些酶标记的探针与组织细胞内靶核酸所形成的杂交体可分别通过放射自显影、荧光显微术或显色的酶促反应等直接检测。间接法指用半抗原标记探针，而探针与组织细胞内靶核酸形成的杂交体则可通过免疫组织化学法间接检测。

本节主要介绍用α－^{32}P标记DNA探针检测冰冻组织切片中DNA及以地高辛标记DNA探针检测石蜡包埋组织切片中DNA的原位杂交方法。

【试剂】

1）盐酸溶液（0.2mol/L）：浓盐酸1.72ml，加双蒸水至100ml。

2）0.2%Triton X－100－PBS（0.1mol/L）：0.1mol/L PBS液1L中加入Triton X－100 2ml，混匀，高压灭菌。

3）蛋白酶K溶液：Tris－盐酸缓冲液（1mol/L，pH8.0）10ml，EDTA溶液（0.5mol/L，pH8.0）10ml，加灭菌水至100ml。使用前加入蛋白酶K储存液（0.5mg/ml，－20℃保存），使蛋白酶K的终浓度为1μg/ml。

4）多聚甲醛（40g/L）－PBS（0.1mol/L，pH7.4）：取40g多聚甲醛，置于三角烧瓶中，加入PBS（0.1mol/L，pH7.4）500～800ml，加热至60℃左右，持续搅拌使粉末完全溶解，滴加少许1mol/L氢氧化钠溶液使溶液清亮，再加PBS（0.1mol/L）至1L，充分混匀。

5）预杂交液：含50%去离子甲酚胺、2×SSC，硫酸葡聚糖100g/L、5×Denhardt溶液，变性鲑鱼精DNA（0.5mg/ml）。

6）α－^{32}P标记的DNA探针。

7）地高辛标记的DNA探针。

8）缓冲液Ⅰ：含顺丁烯二酸马来酸（0.1mol/L）、氯化钠（0.15mol/L），用氢氧化钠（10mol/L）溶液将pH调至7.5（20℃），高压灭菌后备用。

9）缓冲液Ⅱ：先制备阻断剂贮存液。取试剂盒中阻断剂按10%加入缓冲液Ⅰ，混匀，用微波炉加热使其完全溶解，高压灭菌后4℃或－20℃保存。取上述10%的阻断剂贮存液用缓冲液Ⅰ按1∶10稀释。

10）缓冲液Ⅲ（pH9.5，20℃）：含Tris－盐酸100mmol/L、氯化钠100mmol/L，氯

化镁50mmol/L。

(1) 缓冲液IV (pH8.0，20℃)：含Tris－盐酸 (100mmol/L)、EDTA (1mmol/L)。

(2) 底物显色液：缓冲液III 5ml＋BCIP 52.5μl＋NBT67.5μl。

【操作步骤】

(一) α—^{32}P 标记DNA 探针的原位杂交

1．冰冻切片预处理

(1) 新鲜取材组织置液氮冷冻的异戊烷中。

(2) 恒冷箱切片 (2～15μm)，置预处理的玻片上。

(3) 多聚甲醛 (40g/L) 溶液室温下固定15～60min。

(4) PBS 洗2×10min，43℃烤片过夜。(5) 盐酸 (0.2mol/L) 溶液室温作用10min，Triton X－100 (0.1%～0.3%) 作用15～30min。

(6) 含甘氨酸 (2g/L) 的PBS 室温作用10min。

(7) 加蛋白酶K (1μg/ml)，37℃孵育15～30min。

(8) 含甘氨酸 (2g/L) 的PBS 室温作用10min。

(9) 含氯化镁 (5mmol/L) 的PBS 洗2×10min。

(10) 逐级乙醇脱水，空气干燥或37℃烘干保存。

2．预杂交

(1) 切片用2×SSC 浸泡15min。再用4×SSC 配制的50%去离子甲酰胺溶液37℃孵育15min。

(2) 每张切片加预杂交液20μl，杂交温度下 (如42℃) 孵育30min 至2h。

3．杂交

吸弃预杂交液，每张切片加杂交液20μl (含0.5ng/μl 的α—^{32}P 标记DNA 探针)，加已硅化的盖玻片。玻片放置湿盒中，于95～100℃下变性10min。取出反应盒，立即入冷水中放置15min，再转入42℃温箱中杂交12～18h (不超过24h)。

4．洗涤

杂交完毕，于2×SSC 溶液中轻轻去除盖玻片。2×SSC 洗涤，室温，1～2min；50%去离子甲酰胺—1×SSC 溶液洗涤，37℃，2×10min；0.1×SSC 洗涤，40℃，2×30min。

5．同位素标记探针显色法

(1) 暗室中将分装的核乳胶溶液 (约10ml) 小瓶置45℃水浴中浸泡至少1h，使核乳胶完全熔成液态。

(2) 组织切片垂直浸入熔化的核乳胶液中1min，使核乳胶均匀流布在标本上 (垂

直进入和垂直提出的速度要均匀，提出后拭去背面及下端的核乳胶）。

3）暗室中切片于45 ℃电热板上，干燥1～2h。

4）切片装人暗盒内，周围以胶带封固，4 ℃曝光（^{3}H 标记探针2～8 周，35S 标记探针1～4 周，^{32}P 标记探针7～10d）。

5）取出切片暗盒，室温放置至少1h（勿启封），使其缓慢回升至室温。

6）在暗室中（可留安全灯）将切片置入柯达19 显影液3～5min，水冲洗片刻后，置柯达F24 定影液中3～5min（水、显影液及定影液的温度最好为18～20 ℃）。

7）自来水冲洗载片15～20min 后，以10g/L 的苏木精染液染5～10min。

8）盐酸乙醇中提插2 下，再用自来水冲洗5～10min。

9）5～10g/L 的伊红染液复染1min；70 %、80 %、95 %、100 %系列乙醇脱水；二甲苯透明，树脂胶封片，光镜检查。

6．观察结果

阳性标记物呈黑色颗粒位于蓝染的细胞核或红染的细胞质内。

（二）地高辛标记DNA 探针的原位杂交

1．石蜡组织切片预处理

1）43 ℃烤片过夜，75 ℃烤10min 熔化石蜡。趁热浸入37 ℃二甲苯中30min，再转入新鲜二甲苯中10min。逐级乙醇人水（100 %、95 %、90 %、80 %、70 %各5min），再用甲醇洗2 ×5min。

2）0.2mol/L 的盐酸溶液室温下作用10min，Triton X —100（0.1 %～0.3 %）作用15～30min，含2g/L 甘氨酸的PBS 室温作用15min。

3）蛋白酶K（1μg/ml）37 ℃下孵育15～30min，2g/L 甘氨酸的PBS 室温作用10min，含5mmol/L 氯化镁的PBS 洗2 ×10min。

4）多聚甲醛（40g/L）室温下固定15min，含5mmol/L 氯化镁的PBS 洗2 ×15min。

5）逐级乙醇脱水（70 %、80 %、90 %、95 %、100 % 各5min），空气干燥或37 ℃烘干保存。

2．预杂交、杂交

参见α—^{32}P 标记DNA 探针的原位杂交，其中地高辛标记探针的浓度为2.5ng/μl。

3．洗涤

杂交完毕，于2 ×SSC 溶液中轻轻去除盖玻片。2 ×SSC 洗涤，室温，1～2 min；2 ×SSC 洗涤，40 ℃，4 ×5min；0.1 ×SSC 洗涤，40 ℃，2 ×30min；缓冲液Ⅰ洗涤，室温2min，振摇；缓冲液Ⅱ洗涤，室温30min，振摇。

4．信号检测

（1）擦去组织周围的缓冲液，加碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体（先用缓冲液Ⅱ作1∶500～1∶5000稀释），室温下孵育2h。某些公司提供的抗体，在稀释时须加1％的正常羊血清。

（2）缓冲液Ⅰ洗涤，室温，2×15min。

（3）缓冲液Ⅲ洗涤，室温，3min。

（4）擦去组织周围的缓冲液，加显色液，室温下避光显色2h至过夜。在显微镜下检查显色反应，阳性反应呈深蓝色。当获得满意的反应结果后，即可终止反应。

（5）缓冲液Ⅰ洗涤，室温，5min。

（6）缓冲液Ⅳ洗涤，室温，2min。

（7）封片、光镜检查。

5．观察结果

在细胞核或细胞浆内出现蓝紫色杂交信号为阳性。

【注意事项】

1．载玻片与盖玻片的处理

所用液体及器材均需高压或干烤灭菌后使用。由于组织细胞原位杂交主要在载玻片上进行，因此，载玻片的处理（特别是去除玻片上可能存在的核酸酶）至关重要。一般处理方法如下：用热肥皂水洗刷玻片，自来水淋洗干净。将玻片浸入清洁液24h，自来水洗净、烘干。置95％乙醇中浸泡24h，蒸馏水淋洗、烘干。180～200℃干烤2～4h或103.43kPa高压灭菌20min。

盖玻片硅烷化也非常重要。一般按下列步骤进行：将清洁玻片于70％乙醇中浸泡1min，丙酮中浸泡1min，2％硅烷丙酮液（硅烷2ml＋三氯乙烷98ml）中浸泡10s，丙酮中浸泡10s，蒸馏水浸泡1min后，37℃过夜或50℃1h。

2．黏附剂的使用

使用黏附剂的目的是防止组织或细胞标本在杂交过程中脱落。常用的粘附剂有多聚赖氨酸、明胶液及近年推出的APES（Sigma公司）、Vectobond（Vector公司）等。用2％的APES作粘附剂，效果较为理想。其使用方法是：载玻片于2％APES 5ml氨丙基三乙氧基硅烷（APES）＋245ml丙酮液中浸1min，1L蒸馏水浸洗5次，再置2％APES中浸泡1min，空气中自然干燥，铝箔包后置室温下备用。

3．组织取材及固定

常用的原位杂交标本有石蜡切片、冰冻切片和细胞培养标本。原位杂交方法显示细胞内DNA或RNA，故无论是制备组织切片还是细胞涂片，注意取材尽可能新鲜，且要

避免外源RNA 酶引起靶组织中RNA 的降解。取材后最好在30min 内固定。固定的目的是保持组织细胞原有的形态结构及细胞内DNA 或RNA 的原有水平。多聚甲醛是目前较常用的交联固定剂。

4．组织处理

为增强组织细胞通透性和核酸探针的穿透性，组织尚须进行稀酸或酸酐处理（常用0.2mol/L 的盐酸溶液或0.25％的醋酸酐溶液处理10min）、去污剂的应用（常用含0.1％～0.3％的Triton X－100 处理10min）和蛋白酶处理（常用1μg/ml 蛋白酶K37℃下孵育15～30min）等；在杂交前还要对标本进行脱脂，使标记探针更易穿透细胞膜。

5．探针和靶核酸的变性

进行杂交反应时，探针和靶核酸序列都必须是单链。以双链DNA 探针检测DNA，则探针和靶核酸都必须先经变性处理：将含有双链探针的杂交液加在组织标本上，再将载玻片加热95℃处理10min。以单链探针检测DNA，则靶核酸必须先经变性处理：将玻片置于70～80℃变性液（70％去离子甲酰胺－2×SSC 溶液）中10min 以双链DNA 探针检测RNA，则探针必须先经变性处理：将10 倍浓度的探针加热95℃处理5～15min，随即将探针置于冰浴中5min，再用变性后的探针按要求的浓度加入杂交液中进行杂交反应。

6．探针的浓度及长度

探针浓度的选择以达到与靶核酸的最大饱和结合度为目的，通常建议的探针浓度为：放射性标记探针（0.5ng/μl），非放射性标记探针（2ng/μl）。探针长度一般在50～100 碱基之间。200～500 个碱基的探针其杂交时间需20h，超过500 个碱基的探针，杂交前最好先用碱或水解酶进行水解，使成短的片段，达到需要碱基数再进行杂交。

7．结果分析

（1）定性分析：原位杂交的阳性信号并非都是特异的，为便于判定原位杂交实验操作的准确性和结果的特异性，必须设置对照试验。对照的设置应根据核酸探针、靶核酸的种类和现有的条件去限定。通常包括组织对照、探针对照、杂交反应对照和检测系统对照。①组织和细胞对照：用探针在已知含靶核酸序列的阳性组织和不含靶核酸序列的阴性组织标本上进行原位杂交，应分别得到阳性结果和阴性结果；②探针对照：同时用未标记的探针进行杂交后，应该出现阴性结果；③方法对照：省去标记探针、杂交前DNA 酶或RNA 酶处理、标记探针与未标记探针的竞争试验、放射自显影检测对照和非放射性原位杂交检测系统对照等。

（2）定量分析：放射自显影可利用人工或计算机辅助的图象分析仪检测银粒的数量和分布的差异。非放射性核酸杂交的细胞和组织可利用酶检测系统显色，再利用显微分

光光度仪或图像分析仪对不同类型和数量的核酸的显色强度进行检测。

六、菌落杂交技术

【原理】

采用放射性标记的探针与含有质粒的细菌菌落杂交方法的基本程序是：在硝酸纤维薄膜上接种转化细胞，长出菌落（或空斑）并溶解释放DNA，通过变性和干燥，使DNA在原有位置固定。作为杂交的受体DNA，以后的杂交和放射自显影与前述方法基本相同。原位杂交是鉴别阳性重组体的精确和快速方法，一张硝酸纤维薄膜上筛选的菌落可达到上百个。

【试剂】

1）SDS（100g/L）溶液。

2）变性液：含氢氧化钠（0.5mol/L）、氯化钠（1.5mol/L）。

3）中和液：含Tris－盐酸（0.5mol/L，pH7.4）、氯化钠（1.5mol/L）。

4）2×SSC、6×SSC。

5）初洗液：含Tris－盐酸（50mmol/L，pH8.0）、氯化钠（1mol/L）、EDTA（1mmol/L）、SDS（1g/L）。

6）预杂交液：含50%去离子甲酰胺—6×SSC溶液、1×Denhardt液、鲑鱼精DNA（0.1mg/ml）、SDS（1g/L）。

7）α—^{32}P标记的双链DNA探针。

【操作步骤】

1．菌落转移

1）将灭菌的硝酸纤维薄膜（NC膜）平铺于合适的琼脂培养皿表面，皿底背面铺坐标纸，标出培养皿方位。以同样方式准备另一个没有硝酸纤维薄膜的琼脂培养皿。再挑取待检菌落同时接种在两个平板的同一位置，并接种一个仅含载体质粒的菌落作为阴性对照。

2）将两种平皿置37℃培养箱倒置培养10～14h，无NC膜的平皿置4℃冰箱保存待用。取下NC膜进行以下处理。

2.DNA的释放与固定

1）准备4张与NC膜同样大小的Whatman滤纸，将NC膜放到浸有100g/L SDS溶液的第一张滤纸上面，使菌落面向上，室温放置5min。

2）将NC膜移至变性液饱和的第二张滤纸上，室温放置5min。

3）将NC膜移至中和液饱和的第三张滤纸上，室温放置5min。

4）将NC膜移至2×SSC饱和的第四张滤纸上，室温放置5min。

5）将NC 膜置80 ℃烘箱干烤2h。

3．杂交

1）将NC 膜在6 ×SSC 溶液中浸泡5min，再移至初洗液中，42 ℃振摇洗涤1 ～2h。

2）将NC 膜移至装有预杂交液的预杂交袋中，仔细封口，42 ℃水浴摇床预杂交4 ～6h。

3）将α—^{32}P 标记的DNA 探针置100 ℃水浴变性5min，迅速冰浴冷却后，加入到预杂交袋中，仔细封口，42 ℃水浴摇床杂交过夜。

4）将NC 膜移至2 ×SSC —SDS（1g/L）溶液中，室温洗涤3 ～4 次，每次5 ～10min；再在1 ×SSC —SDS（1g/L）溶液中，68 ℃洗1.0 ～1.5h。

5）将NC 膜移到干的滤纸上，室温晾干或37 ℃烘干。

6）用保鲜膜将NC 膜包好，置暗盒中，在暗室中压片。—80 ℃放射自显影24 ～72h。

7）显影后，根据X 感光片黑色显印斑点位置判断保留的培养皿中所对应菌落。并将其挑出，进一步扩增，制备质粒，酶切鉴定。

【注意事项】

1）NC 膜严禁用手直接接触，以免影响检测结果。

2）转移菌落时，必须同时将待检菌落接种在无NC 膜的琼脂培养皿上，并做好位置标记。

第五节　聚合酶链反应

聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）是一种体外快速扩增DNA 片段的方法。自1985 年美国Mullis 等人发明以来，PCR 技术发展飞速，在遗传性疾病、肿瘤、感染性疾病等临床研究中发挥了极其重要的作用，并已在临床基因扩增检验中显示巨大优越性。目前，它已成为临床基因扩增检验实验室最常用的检验手段之一。

本节对PCR 的原理和常用的几种PCR 作一介绍。按照卫生部《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》的规定，临床基因扩增检验实验室必须使用经国家药品监督管理局批准的临床检验试剂，开展临床基因扩增检验项目，故在实际工作中应按各检验试剂所要求的操作步骤进行。

一、标准PCR 技术

【原理】

PCR 的原理很简单，主要是利用DNA 变性、复性可逆的特点。在模板DNA 、引物、4 种dNTP 和Taq DNA 聚合酶都存在的情况下，在一定条件的缓冲液中，就可以使反应在高温（94 ℃）下变性，使双链模板DNA 解链为2 条单链，再在低温（37 ～55 ℃）下退火，使引物与模板链3 ′端形成部分双链DNA ，然后在72 ℃，通过Taq DNA 聚合酶使引物从5 ′端向3 ′端延伸，随着4 种dNTP 的掺合成新的DNA 互补链，完成第一轮变性、退火和聚合反应循环。模板DNA 扩增1 倍。如此反复进行变性、退火和聚合反应循环，由于每一轮循环扩增的产生可作为下一轮扩增反应的模板，因此，理论上每一轮循环可使DNA 数量增加1 倍。最终由两种引物限定范围的DNA 序列以指数形式扩增，从而使极其微量的DNA 经过PCR 扩增后，可以通过凝胶电泳后肉眼直接观察。

【试剂和材料】

（1） 双蒸水。

（2）10 ×扩增缓冲液：Tris － 盐酸（100mmol/L，pH8.5）、氯化钾（500mmol/L）、氯化镁（15mmol/L）。

（3）dNTP 混合液：dATP（25mmol/L），dCTP（25mmol/L），dGTP（25mmol/L），dTTP（25mmol/L）。

（4） 寡核苷酸引物（20pmol/μl）。

（5） 模板DNA ：1μg 哺乳动物基因组（DNA/10μl）或0.1ng 质粒DNA 。

（6）Taq DNA 聚合酶（5U/μl）。

（7） 石蜡油。

（8） 一次性吸头、离心管。

（9）6 ×电泳上样缓冲液：溴酚蓝（2.5g/L）、蔗糖（400g/L）。

（10） 溴化乙锭（10mg/ml），用铝箔或黑纸包裹容器，储于室温。

（11） 移液器。

（12）PCR 自动热循环仪。

【操作步骤】

（1） 模板预变性：将模板置反应管中煮沸变性，染色体DNA 10min，质粒DNA5min。迅速置于冰水中。

（2） 冰上操作：向一微量离心管中依次加入：双蒸水33μl，10 ×PCR 缓冲液5μl，dNTP（25mmol/L）5μl，上下游引物各1μl，Taq DNA 聚合酶（2.5U），充分混匀后，离心15s 使反应成分集于管底。

（3） 加石蜡油50 ～100μl 于反应液表面以防蒸发。

（4） 吸取5μl 模板加入上述混合液中，确保滴头穿过石蜡油层直接加在混合液内。

（5） 立即进行PCR 循环。标准的程序是95 ℃预变性2min，然后进行循环：94 ℃变

性1min，54℃退火1min，72℃延伸1min，共30 个循环。最后72℃充分反应8min。

6） 用琼脂糖凝胶电泳分析PCR 产物。

7） 紫外线灯下直接观察结果。

【注意事项】

1） 以上程序为一般PCR 操作程序，实际工作中应对每一PCR 检验项目进行条件优化。

2） 除了Taq DNA 聚合酶和dNTPs 混合物必须新鲜配置外，其余成分可先按上述比例配好，小量分装。

3） 每次实验均要设阳性对照和阴性对照。

二、逆转录PCR （RT-PCR） 技术

【原理】

mRNA 携带有编码蛋白质的密码。mRNA 含量为细胞总RNA 的1%～5%，其分子大小和核苷酸序列各不相同，从数百至数千碱基不等。大多数mRNA 在其3′末端有一聚腺苷酸残基组成的尾。利用这个特性，设计15 聚至18 聚的胸腺嘧啶寡核苷酸，以此为引物，以mRNA 为模板，加入逆转录酶进行逆转录反应，可以合成一条与mRNA 互补的DNA 链，即cDNA 第一链。然后以cDNA 为模板进行PCR，最终可以检测到极微量的mRNA。对其他微生物的RNA 组分，如RNA 病毒的基因组RNA，可设计其序列特异的寡核苷酸引物进行逆转录反应，然后以合成的cDNA 为模板进行PCR，可检测到极微量的RNA。

【试剂和材料】

1） RNase 抑制剂（40U/μl）。

2） M-MLV 逆转录酶（200 U/μl）。

3） 5×RT 反应混合液：Tris-盐酸（250mmol/L，pH8.3）、氯化钾（375mmol/L）、氯化镁（15mmol/L）。

4） dNTP 混合物：dATP（25mmol/L），dCTP（25mmol/L），dGTP（25mmol/L），dTTP（25mmol/L）。

5） Oligo（dT）18 聚引物（100pmol/μl）或随机六聚引物。

6） PCR 反应试剂参见标准PCR。

7） 琼脂糖凝胶电泳试剂参见凝胶电泳章节。

8） 石蜡油。

9） 一次性吸头、离心管。

10） 水浴箱。

(11) 移液器。

(12) PCR 自动热循环仪。

【操作步骤】

1) 将抽提的总RNA 溶于焦磷酸二酯 (DEPC) 处理过的双蒸水中，70 ℃水浴孵育10min，离心15s，置于冰上。

2) 在冰上依次加入下列试剂：Oligo (dT) 或六聚随机引物1μl、5 ×反应混合物5μl、Nase 抑制剂1μl、dNTP 混合物2μl、M －MLV 逆转录酶1μl。

3) 在混合液中加入RNA 模板5μl，用DEPC 处理过的双蒸水补足至总体积25μl。

4) 4 ℃离心15s，使所有液体聚集离心管底，42 ℃下水浴1h。

5) 94 ℃下水浴2min 终止反应。4 ℃下离心15s，使所有液体聚集离心管底。

6) 加80μl DEPC 处理过的双蒸水，使cDNA 稀释5 倍，振荡混匀。稀释可使PCR 反应时吸量准确。

7) 每个50μl 体积的PCR 反应可用5μl 稀释好的cDNA 作为模板。剩下的cDNA 可于－70 ℃冰箱保存几个月，或－20 ℃冰箱保存1 周。

8) 按照标准PCR 反应配制PCR 反应混合液45μl，滴加20μl 石蜡油后，加入cDNA5μl。

9) 立即进行PCR 循环。标准的程序是95 ℃预变性2min，然后进行循环：94 ℃变性1min，54 ℃退火1min，72 ℃延伸1min，共30 个循环。最后72 ℃充分反应8min。

10) 用琼脂糖凝胶电泳分析PCR 产物。

11) 紫外线灯下直接观察结果。

【注意事项】

1) RNA 极易降解，整个RNA 逆转录过程都必须注意对RNA 酶采取严格防护措施。

2) cDNA 贮存于－70 ℃冰箱，最好小量分装，避免反复冻融。

3) 注意使用管壁厚薄一致的离心管使反应时均匀导热。

4) 镁离子的作用浓度取决于PCR 反应。一些螯合分子，如cDNA、EDTA、dNTP 等可以降低镁离子的作用浓度，因此，如果PCR 反应失败，可以考虑降低dNTPs 或其他螯合物的浓度，或升高镁离子的浓度。

三、荧光定量PCR 技术

这是新近才出现的一种定量PCR 检测方法，可采用外参照的定量法，也可采用内参照的定量方法，后者是在竞争性PCR 基础上发展起来的。扩增后产物采用荧光显示，定量方法多样化，算法更为精确。荧光定量PCR 的基本特点是：①用产生荧光信号的

指示剂显示扩增产物的量；②荧光信号通过荧光染料嵌入双链DNA，或双重标记的序列特异性荧光探针，或能量信号转移探针等方法获得。大大提高了检测的灵敏度、特异性和精确性；③动态实时连续荧光监测避免了标本和产物的污染，且无复杂的产物后续处理过程，高效而快速。

由于方法学上的诸多优点，本方法已广泛应用于基因表达、点突变检测、抗病毒药物筛选及其他临床研究和病理学研究等方面，但由于本方法应用时间不长，其缺陷与局限性仍有待进一步观察发现。

定量PCR 技术的发展具有以下趋势：①从粗略定量、半定量到精确定量、绝对定量；②从单纯外参照非竞争性定量到多种参照定量；③从扩增样本终点一次检测到扩增过程中动态连续检测进行定量；④检测方法也由手工、半自动发展到成套设备检测，且检测效率及自动化程度越来越高。

因为不同厂家生产的定量PCR 试剂盒的试剂组成有所不同，其操作步骤亦不同。因此，应严格按照说明书要求进行操作。

第六节　基因芯片

DNA 芯片技术是近年出现的DNA 分析技术，其突出特点在于高度并行性、多样性、微型化和自动化。高度的并行性不仅可大大提高实验的进程，并且有利于DNA 芯片技术所展示图谱的快速对照和阅读。多样性是指在单个芯片中可以进行样品的多方面分析，从而大大提高分析的精确性，避免因不同实验条件产生的误差。微型化是当前芯片制造中普遍的趋势，其好处是可以减少试剂用量和减小反应液体积，从而提高样品浓度和反应速率。高度自动化则可以降低制造芯片的成本和保证芯片的制造质量不易波动。由于这些优点，它成为后基因组时代基因功能分析的最重要技术之一。

【原理】

所有的DNA 芯片技术都包含四个基本要点：DNA 方阵的构建、样品的制备、杂交和杂交图谱的检测及读出。

1.DNA 方阵的构建方法

DNA 方阵的构建一般有三种方法：光蚀刻法合成寡核苷酸或肽核酸（PNA）、压电印刷法、预先合成寡核苷酸或PNA 后再通过机械接触组成方阵。其中第一、第二种方法都属于原位合成范畴。

2．样品DNA 或mRNA 的制备

从血液或组织中获取的病毒或基因组DNA/mRNA 样品在标记以前，通常都要加以

扩增以提高灵敏度，从某种病毒感染的细胞中特异性地扩增目的片段（通常为病毒基因）而避免成千上万个正常基因的干扰。美国Mosaic Technology 公司发展了一种固相PCR 系统。此系统包含两套引物，每套都可以从靶基因两头延伸。当引物和DNA 样品及PCR 试剂相混合时，如果样品包含靶序列，DNA 就从引物两头开始合成，并在引物之间形成双链DNA 环或“桥”。由于上述反应在固相中产生，因而避免了引物竞争现象，并可减少残留物污染和重复引发。

3．杂交

（1）杂交条件的选择：杂交是DNA 芯片技术中除DNA 方阵构建外最重要的一步，其复杂的程度和具体条件的控制由芯片中DNA 片段的长短和芯片本身的用途而定。如果是表达检测，杂交时需要高盐浓度、低温和较长的时间（往往要求过夜），但严谨性要求则比较低。如果要检测病毒基因组是否有突变，由于涉及单个碱基的错配，故要在短时间内（几小时）采用低盐、高温条件进行高严谨杂交。

影响基因芯片杂交的因素很多，如DNA 片段的长度、DNA 分子的带电情况以及探针分子本身的结构等。解决杂交中诸多问题的最好方法就是用PNA 代替DNA 制成芯片。

（2）PNA 的结构及其优越性：其基本骨架由重复的N－（2－氨乙）－甘氨酸通过酰胺键相连构成，碱基则通过甲叉碳酰基与骨架相连。由于它不象DNA 那样在核糖磷酸骨架中存在带负电的磷酸基团，因而杂交时不需盐离子以抵消DNA 之间的静电排斥。这样，DNA 与PNA 更易靠近而形成杂交分子，不会因静电斥力形成自身二级、三级结构，并且形成的DNA－PNA 杂交分子的稳定性和碱基配对的特异性也大大提高。由于上述显著优点，虽然PNA 的制造比DNA 要麻烦一些，但仍大有替代DNA 而成为芯片制造首选材料的趋势。

4．杂交图谱的检测和读出

目前DNA 探针大多采用荧光标记法，并根据各杂交点的荧光信号强弱用扫描同焦显微镜读出。它的优点是重复性好，缺点是灵敏度相对较低。为此，人们正在研究多种替代方法，如质谱法、化学发光和光导纤维、二极管方阵检测、乳胶凝集反应、直接电荷变化检测等等。其中最有前途的当推质谱法，因为它可以在各DNA 方阵点上提供更多、更快、更精确的信息以供读出。用质谱法不仅可以准确地判断是否存在基因突变，还可精确地判断它位于序列的哪一位置上。但由于探针的化学合成还存在一些问题，所以目前质谱法不如荧光标记法用得普遍。

由于杂交时产生序列重叠，会有成百上千的杂交点出现在图谱上，形成极为复杂的杂交图谱，因而需要由计算机来完成阅读。

【试剂和材料】

商品化的基因芯片及其配套试剂。

【操作步骤】

按照基因芯片及其配套试剂盒的说明书要求进行操作。通常基因芯片的检测可分为以下几个步骤：①RNA 或DNA 标本的制备；②基因芯片预杂交；③探针制备（荧光标记）、纯化；④杂交；⑤洗片；⑥激光扫描；⑦应用软件进行分析。

【临床应用】

1．测序

这是DNA 芯片技术最早的用途，是美国的几个科研小组于20 世纪80 年代末各自独立研究出来。具体做法如下：将八聚体核苷酸的全组合，即所有可能的65536 种组合的八聚合体，按只差一个碱基的顺序固定到一小片载体上。将未知序列的DNA 探针与之杂交，得到特定的杂交图谱，进而分析出DNA 顺序。

2．转录情况分析

将不同条件下从某生物体中转录出来的所有mRNA 经标记成为探针后，再与代表它所有基因而制成的寡核苷酸/PNA 方阵杂交。通过分析杂交位点及其信号强弱，就可了解不同情况下病毒或细胞中每个基因是否表达及表达多少。在病毒的检测及研究中，常常需要了解病毒基因的表达状况及对细胞表达谱的影响。

由于转录情况分析直接涉及到功能基因（表达基因），它已成为DNA 芯片研究中的一个重点和热点。众所周知，在人类基因组中只有大约3％的序列能表达，直接通过测序等手段来了解功能基因的情况相当费时、费力。改用功能基因转录出来的mRNA 与微方阵杂交以研究功能基因，其效率可提高30 倍以上。据估计，一个由100000 个不同cDNA 构成的微方阵可通过一次杂交对整个人类基因组的表达情况进行检测。

3．基因诊断

从正常人的基因组中分离DNA 并与DNA 芯片上方阵杂交，可得到标准图谱。从患者基因组中分离DNA 并与方阵杂交可得到病变图谱。通过这两种图谱的比较、分析，就可以得出病变的DNA 信息：病毒是否存在、病毒基因是否表达、细胞受病毒感染后表达谱发生了哪些变化等等，从而作出诊断。

4．感染性疾病病原的检测

目前在病毒性疾病诊断方面已经有DNA 芯片产品问世。包括检测逆转录酶基因的艾滋病病毒（HIV）诊断芯片、肝炎病毒（HBV、HCV 等）诊断芯片。理论上，一片高密度芯片可以覆盖绝大多数人类病毒基因。但真正实现这一目标，尚需解决许多具体的技术问题。

基因芯片在人类病毒性疾病的诊断和研究中的意义非常巨大。但由于目前基因芯片技术尚不够完善，还在不断发展之中，特别是其价格昂贵，对操作的要求较高，其应用范围受到很大的限制。相信在不远的将来，随着现代分子生物学技术的迅速发展，基因芯片必将在医学领域中发挥越来越大的作用。

第七节　核酸序列测定

核酸序列测定技术从20 世纪60 年代早期提出设想至今，已经日臻完善，测定序列的技术越来越简化，在临床诊断和研究工作中的地位也日趋重要。如测定癌基因突变、病原体的核酸变异等。

【原理】

传统的序列测定技术有两种：Sanger 等（1977）提出的酶法及Maxam 和Gibert（1977）提出的化学降解法。Sanger 双脱氧链终止法使用特异引物在DNA 聚合酶作用下进行延伸反应，在DNA 合成反应混合物的4 种普通dNTP 中，加入少量的一种双脱氧核苷酸（ddNTP）作为链终止剂。由于ddNTP 在脱氧核糖的3’位置缺少一个羟基，不能与后续的dNTP 形成磷酸二酯键，从而使DNA 链中断。反应产物是一系列的核苷酸链，它们将分别终止模板链的每一个A，每一个C，每一个G 或每一个T 的位置上。化学降解法原理是一个末端标记的DNA 片段在5 组互相独立的化学反应中分别得到部分降解，其中每一组反应特异地针对某一种或某一类碱基，因此，生成5 组放射性标记的分子，从共同起点（放射性标记末端）延续到发生化学降解的位点。这两种方法虽然其原理大相径庭，但都同样生成互相独立的若干组带放射性标记的寡核苷酸，每组寡核苷酸都有固定的起点，但随机终止于特定的一种或者更多种残基上。由于DNA 上的每一个碱基出现在可变终止端的机会均等，因此，上述每一组产物都是一些寡核苷酸的混合物。这些寡核苷酸的长度由某一特定碱基在原DNA 全片段上的位置决定。然后在可以区分长度仅差一个核苷酸的不同DNA 分子的条件下，对各组寡核苷酸进行电泳分析，只要把几组寡核苷酸加样于测序凝胶中若干个相邻的泳道上，即可从凝胶的放射自显影片上直接读出DNA 上的核苷酸顺序。近年来，随着PCR 技术和M13 噬菌体及噬菌体载体的发展，也由于现成的合成引物及测序反应日臻完善，双脱氧链终止法得到广泛应用，多数厂家生产的测序试剂盒和测序仪器均按此原理设计，标记物的种类也日益增多。除了放射性标记外，还有多种荧光标记；除了标记在特异的引物上，还可标记在ddNTP 上，或同时将4 种不同的荧光分别标记在A，C，G，T 上。在一个反应中完成测序，各种核酸混合物在通过荧光检测系统时，可根据四种不同的荧光一次性将测序阅读完毕。而化

学降解法目前已不多用。本节根据临床检验需要，主要介绍荧光标记在引物上的质粒测序及荧光标记在ddNTP 上的PCR 产物直接测序。

一、PCR 产物直接测序

【试剂和材料】

1）反应缓冲液：含Tris－盐酸150mmol/L（pH9.5）、氯化镁35mmol/L。

2）对照DNA：0.15μg/μl 双链pUC 19 质粒。

3）对照引物：2pmol/μl －40M13forwand（23 聚体）：5’－GTTTCCCAGTCAC－GACGTTGTA－3’

4）ddA 混合物：含dATP、dCTP、dGTP 和dTTP 各150μmol/L，标记ddATP 3μmol/L。

ddC 混合物：含dATP、dCTP、dGTP 和dTTP 各150μmol/L，标记ddCTP 3μmol/L。

ddG 混合物：含dATP、dCTP、dGTP 和dTTP 各150μmol/L，标记ddGTP 3μmol/L。

ddT 混合物：含dATP、dCTP、dGTP 和dTTP 各150μmol/L，标记ddTTP 3μmol/L。

5）10U/μl 测序DNA 聚合酶：内含Tris－盐酸50mmol/L（pH8.0），DTT（1mmol/L），EDTA（0.1mmol/L），Tween－20 0.5%，NP－40 0.5%，甘油5%。

6）7.5mol/L 醋酸铵溶液。

7）甲酰胺上样缓冲液。

8）0.2ml 薄壁离心管。

9）PCR 自动热循环仪。

【操作步骤】

1）取4 支0.2ml 薄壁离心管，分别标记A、C、G、T，置于冰上。

2）分别加ddA、ddC、ddG、ddT 混合物2μl 至标记的A、C、G、T 管内，须盖紧以防蒸发。

3）准备反应混合液：PCR 产物（最大体积可到19.5μl），反应缓冲液3.5μl，引物（1μmol/L）2.01μl，测序酶（10U/μl）2.0μl，加水至总体积27.0μl。

4）混匀后在标记好的各管内分别加入6μl 反应混合液，混匀，加10～20μl 石蜡油。为减少特异性条带的产生，可先将PCR 自动热循环仪加热至85～95℃或预冷至4℃。

5）进行PCR 循环。退火温度主要依赖于引物的特异序列，以及模板纯度，下面仅介绍一般程序：95℃30s，60℃30s，72℃60～120s，共30 循环。

6）瞬时离心，将反应液集聚管底，置于冰上。

7）加醋酸铵（7.5mol/L）2μl 至每个反应管，加30μl 预冷无水乙醇，振荡混匀后

置于冰上沉淀20min。

8）室温或4℃下，以12000r/min 离心20～30min，弃上清液，加70%乙醇洗涤沉淀物。

9）以7500r/min 离心5min，弃上清液，在真空干燥器中干燥2～3min。干燥时间切勿太长，以免DNA 难以溶解。

10）每管内加6μl 甲酰胺上样缓冲液。充分振荡混匀，使所有DNA 溶解。

11）产物于70℃温浴2～3min，置于冰上。

12）取产物1.5～2μl 电泳。

13）如果为荧光标记，可由测序仪自动分析测序结果；如果标记物为放射性，则凝胶电泳结束后用胶片放射自显影，然后从胶片上读测序结果。

二、质粒测序

【试剂和材料】

1）33U/μl 测序DNA 聚合酶。

2）酶稀释缓冲液。

3）反应缓冲液。

4）ddATP 混合物：含dATP、dCTP、dGTP、dTTP（各150μmol/L），ddATP（3μmol/L）。

ddCTP 混合物：含dATP、dCTP、dGTP、dTTP（各150μmol/L），ddCTP（3μmol/L）。

ddGTP 混合物：含dATP、dCTP、dGTP、dTTP（各150μmol/L），ddGTP（3μmol/L）。

ddTTP 混合物：含dATP、dCTP、dGTP、dTTP（各150μmol/L），ddTTP（3μmol/L）。

5）甲酰胺上样缓冲液。

6）标记引物（2pmol/μl）。

7）0.2μl 薄壁离心管。

8）PCR 自动热循环仪。

【操作步骤】

1）取4 个0.2μl 薄壁离心管，分别标记A、C、G、T，置于冰上。

2）分别加入ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP 混合物3μl 至标好的A、C、G、T 管内，盖好盖子，以防蒸发。

3）用酶稀释液稀释测序DNA 聚合酶：5 个反应需用7μl 稀释缓冲液加3μl 测序DNA 聚合酶，从而得到10μl 浓度为10U/μl 的测序DNA 聚合酶。

4）配制反应混合液20μl：反应缓冲液3μl，标记引物（2pmol/μl）1μl，待测质粒DNA（0.2μg/μl）1μl，水13μl，稀释好的酶2μl。

5） 混匀后在标好的A、C、G、T 管内分别加入5μl 反应混合液，混匀后加10～20μl 石蜡油。

6） 进行PCR 循环。退火温度主要依赖于引物的特异序列，以及模板纯度。

7） 加8μl 甲酰胺上样缓冲液，混匀。

8） 产物于70℃温浴2～3min，置于冰上。

9） 取2μl 产物电泳。

10） 如果是荧光标记，可由测序仪自动分析测序结果；如果标记物为放射性，则凝胶电泳结束后用胶片放射自显影，然后从胶片上读结果。

第三章　分子生物学检验临床应用

随着分子生物学技术的发展和人类对疾病的深入了解，分子生物学技术被逐渐应用于临床进行疾病诊断，从而产生了崭新的研究领域——基因诊断。目前在一些发达国家，对一些主要的遗传病如珠蛋白生成障碍性贫血、进行性肌营养不良、苯丙酮尿症、血友病、α1 抗胰蛋白酶缺陷症等的基因诊断已成为临床检测的常规手段，并且对感染性疾病和肿瘤等的分子生物学检测也成为临床诊断的直接依据或辅助手段。

第一节　遗传性疾病

基因诊断是在分子遗传学的基础上发展起来的，最早用于遗传病的诊断。现在已经知道许多遗传病的致病基因及其突变类型，许多遗传标志可用于基因连锁分析。

一、血红蛋白病

血红蛋白病是第一个成功地进行产前基因诊断的遗传病。该病可分为异常血红蛋白病与珠蛋白生成障碍性贫血两类；珠蛋白生成障碍性贫血又可分为α、β珠蛋白生成障碍性贫血；此外还有少见的δβ和γβ珠蛋白生成障碍性贫血，其基因诊断的方法略有不同。

㈠ α珠蛋白生成障碍性贫血

大多数的α珠蛋白生成障碍性贫血是由于α珠蛋白基因缺失或缺陷，最终导致α珠蛋白mRNA 含量减少所致，因此，目前常用的分子生物学检测项目主要有以下两大类。

1．检测α珠蛋白基因有无缺失

⑴ 液相杂交：是由用放射性核素标记的α珠蛋白DNA 探针和从羊水细胞提取的DNA 进行液相杂交。

⑵ 限制性内切酶酶谱分析法。

⑶ PCR 法。

2．检测α珠蛋白基因的数目

用RT－PCR 法检测标本内α珠蛋白mRNA 的含量。

(二) β珠蛋白生成障碍性贫血

β珠蛋白生成障碍性贫血存在基因突变或个别核苷酸的丢失或插入，这些突变往往不涉及基因的限制酶识别位点，因此，可用PCR－RFLP 连锁分析和杂交法直接检测。

二、进行性肌营养不良

进行性肌营养不良（Duchenne muscular dystrophy，DMD）是常见的性连锁隐性遗传病，由X 染色体X_p21 区抗肌萎缩蛋白基因的不同突变形式所致。由于多数DMD 缘于基因缺失，因此，对于该疾病的诊断主要是该基因缺失的诊断。

1）基因组探针法：用从X_p21 区不同部分分离到的多种DNA 探针，如P84、XJ1.1、P87、Jbir 、P20 等，直接进行相应的内切酶酶谱分析。

2）cDNA 探针法。

3）PCR 法：用多重PCR 检测热点区DNA 片段。

对于非缺失型患者，则可以采用基因内及其旁侧的探针进行RFLP 连锁分析。

三、苯丙酮尿症

苯丙酮尿症（phenylketonuria，PKU）是一种常见的常染色体隐性遗传性氨基酸代谢病。现已查明，约3/4 的典型PKU 是由约11 种不同的苯丙羟化酶基因点突变所致。目前主要采用的DNA 分析技术，有PCR/ASO 探针法和PCR－RFLP 连锁分析法，也可采用PCR－SSCP 或直接测序法检测未知的点突变。

四、脆性X 综合征

脆性X 综合征（fragile－X syndrome，Fra－X）因与X 染色体上的脆性位点有连锁而得名。目前认为，Fra－X 的分子学基础是FMR－1 基因的5′端CGG 的重复序列过度增加和相临区域的异常甲基化。

对于Fra－X 的基因诊断，用探针St B12XX 与Bcl Ⅰ酶解物杂交，可检测到CGG 的扩充程度，正常人为12kb 和1.0kb，突变基因表现为1.0kb 片段增大。与EcoR Ⅰ、Eag Ⅰ双酶解物杂交，可检测到异常甲基化，正常个体2.8kb，甲基化时Eag Ⅰ位点消失，片段为5.2kb，突变基因长度增加。也可用PCR 法检测CGG 重复序列的长度，用变性序列凝胶电泳检测。正常个体的扩增片段为239～383bp（6～54 个重复），以308hp 为多见（约占30％），杂和频率为0.3。

五、血友病

血友病是一种遗传性凝血功能障碍的出血性疾病，是一组X 染色体连锁遗传的凝

血缺陷疾病，可分为甲、乙、丙型与血管性假血友病四种类型。

甲型血友病是由于血浆凝血因子Ⅷ（FⅧ）的缺陷所致，FⅧ基因定位于X染色体长臂的远端。因为不同的甲型血友病家系都具有独特的突变类型，因此主要依赖PCR－RFLP连锁分析。

乙型血友病是由于凝血因子Ⅸ（FⅨ）缺失或失活而导致的凝血障碍，也可以用PCR－RFLP连锁分析进行产前诊断和携带者检测。

六、性别发育异常

性分化过程包括生殖腺转化、内外生殖器官的发育及成熟和性别特征的表达。哺乳动物胚胎发育中，雌性表型不需任何调节，而雄性表型的形成则由多因素决定。其中SRY（sex－determining region of Y chromosome）基因是重要因素。SRY基因的缺失或易位导致46，XY核型个体发育成女性，有SRY序列的46，XX核型个体发育成男性表型，可以应用PCR或SSCP技术进行检测。

七、α1－抗胰蛋白酶缺陷症

α1－抗胰蛋白酶缺陷症是一种常染色体隐性遗传病，是α1－抗胰蛋白酶（α1－antit－rypsin，α1－AT）缺陷所致。α1－AT基因位于14q31～31.2，长12.2kb。该基因具有很高的多型性，设计不同的引物，用PCR技术可对其进行检测并分型。

第二节　肿　　瘤

肿瘤是一类与多种因素有关、发病过程复杂、表现多样的疾病。但从根本上讲，肿瘤的发生发展和演变均与基因的变化密切相关，因此，基因诊断在肿瘤学中具有广阔的应用前景。基因诊断已在临床应用方面显示了潜在的价值。

一、肿瘤染色体易位及融合基因检测

肿瘤细胞中染色体数目和结构的改变是一种非常重要的细胞遗传学及分子生物学的表现。在淋巴造血系统肿瘤中，染色体易位及由此产生的融合基因可能更具有普遍意义及应用价值。临床对白血病的诊断有时单凭组织形态学和组织化学染色很难确定，而融合基因作为一种较特异的标记物，对白血病的诊断和分型很有帮助，有时甚至是确诊的依据。分子生物学检测不仅可以用于肿瘤的诊断、分型和微小残留病变的检测，对于发病机制及预后判断也有重要意义。

1．慢性髓细胞白血病（CML）

95％的CML 患者会出现一种异常的染色体——Ph 染色体，其产生是由于染色体易位t（9；22）（q34；q11），产生bcr/abl 融合基因。该融合基因表达后产生一个嵌合8.5kb 的转录子。人工合成一对引物，一条位于abl 基因，一条位于bcr 基因，用PCR 技术进行检测。只有存在异常的易位染色体时，其扩增产物为阳性。该诊断方法对CML 诊断具有重要作用。

2.Burkitt 淋巴瘤

90％左右的患者出现t（8；14）（q24；q32），是8 号染色体长臂的myc 基因易位至14 号染色体长臂的免疫球蛋白重链（gH）基因附近。其余10％为t（8；22）（q24；q12）或t（8；2）（q24；q11），分别为myc 基因易位至免疫球蛋白κ轻链、λ轻链基因附近。这些改变也可以用上述的类似PCR 技术进行检测。

二、癌基因和抗癌基因检测

1．癌基因

致癌原因很多且很复杂，包括化学的、物理的及生物的因素，但其本质都是引起基因的突变而致癌。原癌基因是存在于正常细胞内、发生恶变后转变为癌基因的基因序列。据估计，原癌基因约占人体全部基因的0.1％～1.0％，迄今为止，已分离和鉴定出100 多种原癌基因。

原癌基因的产物可在细胞膜、细胞质、细胞核及细胞外对生长核分化进行调控。根据其产物作用不同，原癌基因可分五类：生长因子、生长因子受体、蛋白激酶、ras 基因产物和核蛋白。

癌基因是指能参与或直接导致正常细胞发生恶性变的任何基因序列。癌基因形成于如下原因。

（1）原癌基因的点突变：如ras 基因点突变常见于12，13，61 密码子。由于点突变，引起P21 蛋白肽链中氨基酸被替换，影响P21 蛋白的主体构象，因而不能伴随GTP 水解成GDP 而出现激活的失活，使其始终处于激活状态，导致细胞过度增殖，形成肿瘤。点突变也可导致蛋白变短，如src 基因点突变可导致C－终末蛋白的部分缺失，结果导致酪氨酸激酶活性增加。

（2）原癌基因扩增：人类细胞有23 对染色体，每一个基因均是双拷贝，一个来自父亲，一个来自母亲。在一定条件下，一个拷贝可以增加到几千倍，这种现象称为基因扩增（geneamplification）。基因扩增可导致转录mRNA 增多，其编码的蛋白质水平增加，原癌基因一旦扩增，便以其超量拷贝数占优势，充分在细胞内表达，其结果是不受控制

地生长，并且向异常方向转化。如恶性神经胶质瘤的表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）基因、乳腺癌的erbB 基因和神经母细胞瘤的N－myc 基因均出现基因扩增。基因扩增通常是晚期事件，患者预后差。

3）染色体（基因）易位：染色体易位是指染色体的一部分转位到另一染色体上。肿瘤细胞最常见的染色体异常就是染色体易位。如慢性粒细胞白血病90％～95％患者9号和22 号染色体发生易位，9 号染色体abl 原癌基因易位到22 号染色体，产生一种异常的融合蛋白，此蛋白可使酪氨酸激酶活性增加，且具有转化能力，此种易位称为Ph易位。同样，在Burkitt 淋巴瘤也发现8 号和4 号染色体，以及其他B 细胞淋巴瘤14 号和18 号染色体均发生易位。由于染色体易位，其编码产物异常，产生一种异常蛋白质。

4）原癌基因缺失：肿瘤细胞中常发现有原癌基因DNA 片断缺失（deletion），可以是单个碱基对的缺失，也可以是基因的一部分，甚至整个基因缺失。若整个基因缺失，则无法进行基因转录及产生蛋白。原癌基因内小的缺失，在正常情况下抑制蛋白活性的那一部分蛋白缺失或诱导产生类似于正常刺激信号，就可导致细胞的过度增生。此现象研究最透彻的是脑瘤EGFR 基因，在多形性神经胶质瘤，EGFR 基因扩增是常见的晚期事件，但多数病例不仅有基因扩增，而且在扩增的基因内也有缺失现象出现，缺失常常发生在2～7 密码子，这样就产生较短的EGFR 蛋白，进一步激活此蛋白。

5）病毒摄取原癌基因：DNA 病毒如乙肝病毒，RNA 病毒如逆转录病毒、Rous 肉瘤病毒，能使其感染的细胞转化。这些病毒主要导致动物肿瘤而很少引起人类肿瘤，已知可引起人类肿瘤的病毒如EB 病毒、乙肝病毒、乳头瘤状病毒、HIV 和人类T 细胞白血病病毒。这些病毒摄取的原癌基因又称病毒癌基因（v－onc）。常见的人类肿瘤癌基因谱见表7－3－1。

表7－3－1　常见的人类肿瘤癌基因谱

肿瘤	癌基因
肝癌	N－ras、c－myc、c－ets2、c－fos、igf II、c－fms
膀胱癌	H－ras、K－ras
乳腺癌	erbB2、H－ras、myc
结直肠癌	H－ras、K－ras、myb、myc
胃癌	erbSl、hst、myb、myc、N－ras、yes
肺癌	erbBl、H－ras、K－ras、myc、mycl、mycn
黑色素物	H－ras
神经母细胞瘤	Mycn

续表

肿瘤	癌基因
脑瘤	erbBl、sis
卵巢癌	erbB2、K—ras
胰腺癌	K—ras、myc
前列腺癌	Myc
睾丸癌	Myc
宫颈癌	Myc

2．抗癌基因

1986 年，Sanger 认为可抑制肿瘤生长和发展的因素均可称为抗癌基因，并将其分为四类：①癌基因产物的拮抗物；②干扰素；③生长抑素；④控制染色体稳定性的因素。目前认为抗癌基因是一大类可抑制细胞生长并能潜在抑制癌变作用的基因群，它仅在某一种特定的细胞内起作用。

抗癌基因必须具备以下条件：

（1）在该癌的相应正常组织中必须有正常的表达；

（2）在该种恶性细胞中，该基因理应有所改变，如点突变、NA 片段或全基因的缺失或表达缺陷；

（3）导人该基因缺陷的恶性肿瘤细胞可部分或全部抑制其恶性表型。

抗癌基因主要有以下功能：①诱导终末分化；②维持基因稳定；③触发衰老，诱导细胞程序性死亡；④调节细胞生长；⑤抑制蛋白酶活性；⑥改变DNA 甲基化酶活性；⑦调节组织相容性抗原；⑧调节血管生长；⑨促进细胞间联系。

目前已发现的抗癌基因有Rb、P53、WT1、NF1、DCC、MCC、PTP、Krev—1、APC。见表7—3—2。

表7—3—2　常见人类肿瘤抗癌基因

名称	染色体位点	肿瘤种类	编码蛋白与功能
Rb 1	13q14	视网膜母细胞瘤、成骨肉瘤、乳腺癌、膀胱癌、肺癌等	核内磷蛋白
P 53	17q12—13.3	星状细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、胃癌、肺癌等	核蛋白，调节DNA 的合成
WT 1	11p13	肾母细胞瘤	核蛋白，转录调控
DCC	18q21	结肠癌	细胞粘附分子
NF 1	17q11.2	Ⅰ型神经纤维瘤	GTP 酶、激活蛋白，信号传导
FAP	5q21—22	结肠癌	
MEN 1	11q13	甲状旁腺瘤	

3．癌基因和抗癌基因的检测

癌基因的活化或抗癌基因的失活原因不外乎点突变、缺失、片段的插入或易位等，可通过下列方法进行诊断检测。

1）核苷酸探针杂交法：可以点突变为中心设计出一条长19～20bp 的标记的寡核苷酸链作探针，根据完全配对的碱基比有单个碱基错配的杂交稳定的原理，采用严格的杂交和洗涤条件，就可以明确待测DNA 样本是否存在突变的碱基。该技术有高度特异性和敏感性，是分子生物学研究中常用的重要技术。

2）限制性酶切片段长度多态性（RFLP）技术：由于基因的突变，导致限制性酶识别位点的消失、改变，而产生与正常等位基因不同长度的片段，据此可以判断基因的改变。

3）PCR－RFLP 技术：以C－Ha－ras 基因为例，引物设计在点突变位点上游区和下游区不同链上第31～50 个核苷酸互补，经PCR 扩增出100bp 长的片段，由于第12 密码子的点突变使限制性内切酶Hpal 的识别位点被破坏。若将扩增产物经Hpal 消化后，正常组织的DNA 片段被切为50bp，而发生突变基因的患者DNA 的产物为100bp，经电泳就可以区别开来。

4）RNA 酶A 错配清除法：RNA 酶A 能识别单碱基错配的RNA：RNA 或RNA：DNA 双体。这时可用体外合成与正常序列互补的RNA 探针。将探针和变性的肿瘤DNA 或RNA 杂交，然后用RNA 酶A 处理，可以在RNA：RNA 或RNA：DNA 错配部位切断RNA，使之形成两个片段，正常组织DNA 经相同处理后就不会形成两个片段，据此可以互相区别开来。

5）单链构型多态性分析法。

6）核酸序列分析法：目前大多数癌症都是在瘤组织块形成后才被诊断出来。体液或活检组织的细胞学分析均可较早作出诊断，但这些方法都依靠形态学分析，灵敏度不高。一些肿瘤血清学标志也常用于辅助诊断、判断疗效和预后，但所有血清学肿瘤标志物都不是某一种癌症所特有，其来自于血清无组织定位特异性，且有些指标出现相对较晚，而这些因素均不利于临床对肿瘤的特异性诊断和早期发现。在肿瘤的演变和恶性转化过程中，基因改变可能潜在出现，比任何形态学变化都早，因此，最早的基因改变可以作为筛选和早期诊断癌症的指标。以快速PCR 技术为基础的新的分子生物学技术，具有检测10^4 个正常细胞中一个突变细胞的潜在能力，故可以用于各种体液中突变基因的检测，而不需取材于活组织。它属于非创伤性检查，而且灵敏度高，假阳性率低，对癌症的早期诊断具有极为重要的意义。

三、肿瘤相关病毒检测

与肿瘤相关的病毒有多种，包括DNA 病毒和RNA 病毒。但是到目前为止，真正被证实与人类肿瘤直接相关的病毒并不多。对这些基因的检测，将有助于肿瘤的临床诊断。目前，常用的检测病毒核酸方法是核酸杂交和PCR 。常见的肿瘤相关病毒见表7 －3 －3 。

表7 －3 －3　常见的肿瘤相关病毒

病毒	相关疾病
EBV	传染性单核细胞增多症、鼻咽癌、非Burkitt 淋巴瘤、霍奇金病及一些淋巴细胞增生性疾病
HPV	子宫癌、尖锐湿疣等
HTLV HTLV －1	成人T 细胞白血病/淋巴瘤 (ATLL)
HBV	肝细胞肝癌
HCV	肝细胞肝癌

四、其他

1．瘤细胞多药耐药基因的检测

耐药引起的肿瘤化疗失败是肿瘤患者面临的严重问题。多药耐药 (multi －drug resis－tance) 即肿瘤细胞一旦对某种药物产生耐受，对其他结构各异、作用机制不同的化疗药物也交叉耐受。MDR1 基因位于7 号染色体，其表达产物与细胞耐药有关。采用RT －PCR 定量研究肿瘤细胞化疗前后，MDR 基因表达的变化可为临床提供非常有益的信息。

2．微卫星不稳定性的检测

微卫星是遍布于基因组DNA 中的以1 ～4 个核苷酸为单位的简单重复序列。微卫星不稳定性 (microsatellite instability，MI) 是指由于复制错误引起的简单重复序列的改变。肿瘤细胞的MI 明显高于正常细胞。这种变化可通过特定微卫星引物经PCR 扩增、电泳分离来检测。

3．端粒酶活性检测

端粒是位于真核生物染色体末端，由许多简单重复序列 (含TTAGGG) 及相关蛋白质组成的复合结构组成，具有防止染色体末端降解、融合及重组的作用。而端粒酶可以弥补细胞分裂造成的端粒序列丢失。因此，目前认为端粒和端粒酶的存在与调节细胞衰老、死亡及肿瘤发生有密切关系。

肿瘤组织中的端粒酶活性比正常组织明显增高，可通过PCR 或PCR －ELISA 技术进

行检测。

第三节　感染性疾病

病原体的检测方法包括病原微生物的分离培养、免疫学检测和分子生物学方法检测。病原体的分离培养大多费时，阳性率也较低，而免疫学方法虽较敏感，但有些微生物可能会有共同抗原导致出现假阳性或者假阴性。部分抗体检测难以辨别是现行感染还是既往感染，而利用分子生物学技术进行诊断具有高度灵敏性和特异性，且操作简便、快速，因此，广泛应用于病毒、细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体以及寄生虫感染等感染性疾病的诊断。

一、病毒感染

可以引起人类感染性疾病的病毒种类很多，它们均可造成相应的病毒血症并侵入特定脏器。应用分子生物学技术可以在疾病早期检测到病毒，为早期诊断提供依据。目前，常用的技术是核酸杂交和PCR 技术。临床上应用PCR 技术诊断病毒感染须遵守国家有关法规，购买有批号的检测试剂，并严格按照说明书进行操作。以下简单例举常见的几种病毒检测方法。

1．人乳头瘤病毒

人乳头瘤病毒是双链DNA 病毒，迄今难以用传统的病毒培养及血清学方法检测，只能采用分子生物学技术来诊断。主要方法是核酸杂交和PCR 或两者相结合。

2．肝炎病毒

部分可用基因诊断的肝炎病毒见表7 —3 —4 。

表7 —3 —4　部分可用基因诊断的肝炎病毒

病毒	标　本	目　的	方　法	用　途
HAV	粪便、污染物及可疑食品	检测病原体及其亚型	核酸杂交、PCR	临床诊断、流行病学调查
HBV	血清、组织	检测病原体及其亚型、变异	核酸杂交、定量PCR 、原位PCR	临床诊断、流行病学调查
HCV	血清、组织	检测病原体及其亚型、变异	RT —PCR 、原位PCR	临床诊断、流行病学调查

续表

病毒	标　本	目　的	方　法	用　途
HEV	粪便、污染物及可疑食品	检测病原体及其亚型	核酸杂交、PCR	临床诊断、流行病学调查
TTV	血清、组织	检测病原体及其亚型、变异	核酸杂交、原位PCR	临床诊断、流行病学调查
HGV	血清、组织	检测病原体及其亚型、变异	核酸杂交、原位PCR	临床诊断、流行病学调查

3.HIV

人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus）HIV是艾滋病的病原体。HIV－DNA可整合到宿主基因组中，因此，在相当长的时期内HIV处于潜伏状态。整合的HIV－DNA以很低的拷贝数存在，故需要用非常灵敏而又特异的方法进行检测和研究。体外培养法、逆转录酶法、外周血中抗原直接测定等方法费时、费力、稳定性较差。原位杂交可直接检测细胞内病毒核酸；Southern印迹法可对淋巴细胞中的HIV－DNA进行分析；PCR技术敏感、特异，可对多种标本的HIV进行检测。这些基因诊断技术可用于追踪HIV的自然感染史，可在其他血清学和病毒学标志出现前检出HIV序列，因此，可用于判定无症状且血清学检测阴性患者潜在的HIV传播，并可用于检测长潜伏期患者。在婴儿出生后最初的6～9个月期间，基因诊断可判定婴儿是否真正被HIV感染。此外，基因诊断在血制品的检测中具有重要意义。

4．人类巨细胞病毒

人类巨细胞病毒（human cytomegalovirus，HCMV）是双链DNA病毒。由于该病毒感染的严重性和治疗药物的出现，临床上迫切需要敏感、特异、快速的诊断方法。传统的快速细胞培养技术的敏感性非常低，ELISA法不够敏感，并容易受到干扰因素的影响。

核酸杂交和PCR技术成为临床上HCMV感染诊断的重要方法。尤其是PCR技术检测HCMV的敏感性很高，可直接从0.1～5.0μl患者的尿液标本中测到HCMV序列，具有重要的临床应用价值。由于感染病毒后体液中HCMV DNA的出现早于临床症状或血清学标记的出现，故可作为早期诊断指标。利用PCR进行产前诊断，有利于优生优育。对器官和组织移植物进行检测，便于及时治疗和处理。

5．单纯疱疹病毒

单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）是一种有囊膜的双股DNA病毒，分为Ⅰ

型和II型，能引起多种人类疾病，如单纯疱疹性脑炎、疱疹性角膜炎、皮肤疱疹、生殖器疱疹等，并与宫颈癌的发生有关。核酸杂交和PCR 方法能对潜伏期低复制的HSV 特异性DNA 进行鉴定，并可同时分型。

6.EB 病毒

EB 病毒（Epstein－Barr virus，EBV）是线性双链DNA 分子，包括A、B 两型。临床上可引起传染性单核细胞增多症，与鼻咽癌、Burkitt 淋巴瘤密切相关。用核酸杂交和PCR 技术可从少量的细胞中测出低滴度的EBV 感染，适用于大多数标本的检测。

7．水痘－带状疱疹病毒

水痘－带状疱疹病毒（varicella－zoster virus，VZV）为疱疹病毒科成员，是引起水痘和带状疱疹这两种疾病的病原。用核酸杂交和PCR 法从疱液中检测VZV，不仅快速、敏感性高，而且特异性强。此外，还从患者口腔分泌物、外周血单核细胞以及脑脊液中检出VZV DNA 序列。VZV 检测在无菌性脑膜炎鉴别诊断中也起重要作用。

二、细菌和真菌感染

细菌和真菌仍是临床感染性疾病的重要病原体，及时、准确地诊断对预防、治疗均十分重要。基因诊断在早期诊断及分型鉴定等方面均有优越性。部分可用基因诊断的细菌和真菌见表7－3－5。

表7－3－5　部分可用基因诊断的细菌和真菌

细　菌	标　本	目　的	方　法
呼吸道致病菌			
结核分枝杆菌	痰液	病原体检测、分型、突变检测	PCR、核酸杂交、PCR－RFLP
嗜肺军团杆菌	痰液、支气管灌洗液	病原体检测	PCR、核酸杂交
绿脓杆菌	痰液、支气管灌洗液	病原体检测	PCR、核酸杂交
肺炎克雷伯杆菌	痰液、支气管灌洗液	病原体检测	PCR、核酸杂交
耐甲氧西林葡萄球菌	血液	检测PBP2α	PCR、核酸杂交
肠道致病菌			
伤寒杆菌	血液	病原体检测	PCR、核酸杂交
霍乱弧菌	粪便、直肠拭子	病原体检测、分型	PCR、核酸杂交
产毒性大肠埃希菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交
致病性大肠埃希菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交

续表

细　菌	标　本	目　的	方　法
侵袭性大肠埃希菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交
肠出血大肠埃希菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交
产志贺样毒素大肠埃希菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交
志贺菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交
沙门菌	粪便、直肠拭子	病原体检测	PCR、核酸杂交
脑膜致病菌			
脑膜炎奈瑟菌	脑脊液	病原体检测、分型	PCR、核酸杂交、PCR—RFLP
新型隐球菌	脑脊液	病原体检测	PCR、核酸杂交
结核分枝杆菌	脑脊液	病原体检测、分型、突变检测	PCR、核酸杂交、PCR—RFLP
白色念珠菌	脑脊液、血液	病原体检测	
泌尿生殖道致病菌			
淋病奈瑟菌	分泌物、尿液	病原体检测	

三、螺旋体感染

1．钩端螺旋体

钩端螺旋体感染是一种危害野生动物、家禽和人类的传染性疾病，既往主要以ELISA 或凝集诊断实验为准，一般在感染后8～10d 才能被检出，而且其培养耗时长，因此，早期诊断较为困难。PCR 技术等分子生物学技术可用于该病的早期诊断。

2 梅毒螺旋体

梅毒螺旋体不能进行体外培养。血清诊断对确定感染和指导治疗很有意义，但亦不能进行早期诊断，并且母亲的IgG 型抗体可传给胎儿，故对先天性及神经性梅毒的诊断特异性高。

应用PCR 法检测梅毒螺旋体非常敏感，对患有梅毒的孕妇和可疑新生儿的羊水、血清、脑脊液进行测定，有重要临床价值。但是，由于梅毒螺旋体被抗生素杀灭后，其DNA 仍能在脑脊液中存在一段时间，在实际评价中要考虑这一因素。

四、支原体感染

1．肺炎支原体

肺炎支原体除引起人类呼吸道感染外，还会引起中耳炎、消化系统及中枢神经系统感染，治疗上与其他微生物感染也不相同。因此，早期快速、准确的检测具有实际的临床和流行病学意义。核酸杂交具有较高的敏感性和特异性。目前，PCR 法针对P1 粘附因子、16SrRNA 等，可测出≥102cfu／ml 的肺炎支原体，能够满足临床需要。

2．解脲脲原体

解脲脲原体较难培养，并需特殊的培养基，因此，用核酸杂交或PCR 进行诊断有实用价值。引物或探针多设计于解脲脲原体的脲酶基因区，用核酸杂交或PCR 加分子杂交的方法可以方便地进行检测和鉴定。尤其对已经使用过抗生素治疗的解脲脲原体感染，意义更大。

五、衣原体感染

衣原体属包括沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体、肺炎衣原体和家禽衣原体四种。应用核酸杂交和PCR 检测衣原体，敏感而且特异。探针和引物可选自衣原体16SrRNA 基因区，该区序列为衣原体属特异，其中PCR 的检测敏感性可达到1 个拷贝的衣原体分子，故适用于沙眼衣原体生殖泌尿道感染的早期诊断，尤其是无症状携带者或轻症患者的诊断。

六、寄生虫感染

人类寄生虫病的诊断，通常采用血涂片和其他被检物的光学显微镜检查及免疫学方法检测可取得比较满意的结果。但是，光镜检查费时费力，难以胜任现场大量标本检测的要求，有时也可能发生漏检；用免疫学方法检测抗体则不能鉴别是既往感染还是现行感染，这对于治疗方案制定及预后判断不利。分子生物学技术则可能弥补这些缺陷。

寄生虫基因组DNA 大部分序列为非编码区，其中含中度和高度重复序列。这些重复序列具有明显的种特异性；且高度重复序列在个体发育过程中保持恒定，不受生活周期的影响。因此，用这些重复序列作为探针，可达到特异性检测的目的。在实际应用中，已证实现有的许多探针只与待检寄生虫的DNA 杂交，而不与别种寄生虫及宿主的DNA 杂交，所以DNA 诊断技术是判断现行感染的可靠方法。从杂交结果的信号强弱可判断感染程度，感染程度高者其信号强，反之则弱。根据寄生虫种属间在基因型和分子核型上的差异，还可对其进行分类。一般来讲，探针序列在虫体内为多拷贝，故DNA 诊断灵敏度很高，比血清学检查高1000 倍以上。这对于早期诊断和流行病学研究有重

要作用，部分可用基因诊断的寄生虫见表7－3－6。

表7－3－6　部分可用基因诊断的寄生虫

寄生虫	标本	方法
疟原虫	血液	
恶性疟原虫		核酸杂交、PCR
间日疟原虫		核酸杂交、PCR
三日疟原虫		核酸杂交、PCR
卵形疟原虫		核酸杂交、PCR
利什曼原虫	骨髓、血液、脾穿刺物、皮肤	核酸杂交、PCR
阿米巴原虫	粪便、肝穿刺物	核酸杂交、PCR
鼠弓形虫	脑脊液	核酸杂交、PCR
卡氏肺孢子虫	痰液	核酸杂交、PCR
旋毛虫	肌肉	核酸杂交、PCR
肠内贾第虫	粪便、十二指肠引流液	核酸杂交、PCR

第 八 篇

临床检验正常参考值

第一章　常用检验报告及正常参考值

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____血_____

请检查_____血常规＋血小板_____

_____

临诊医师_____日期_____

采取时间_____午_____时

标本收到时间_____午_____时

血红蛋白 男 130～170 g/L

女 110～150 g/L

白细胞（4～10）×10^9/L

中性 0.50～0.70　酸性 0.01～0.05

碱性 0.00～0.01　淋巴 0.20～0.40

单核 0.03～0.08

血小板（100～300）×10^9/L

报告日期_____检查者_____

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____凝血酶原_____

请检查_____

_____

临诊医师_____日期_____

采取时间_____午_____时

标本收到时间_____午_____时

PT（凝血酶原时间）12～14 s

AT（凝血酶原活动度）0.80～1.20

PIR（时间比值）1 ±0.15

INR（国际标准化比值）0.8～1.5

报告日期_____检查者_____

日本东亚全自动血细胞计数分类仪报告单

(Sysmex KX—21 血细胞分析仪报告)

检验项目	英文缩写	正常参考值	计量单位
白细胞计数	WBC	4.0～10.0	$\times10^9$/L
红细胞计数	RBC	男4.0～5.5	$\times10^{12}$/L
		女3.5～5.0	
血红蛋白	HCB	男130～170	g/L
		女110～150	
红细胞比积	HCT	男0.40～0.50	L/L
		女0.35～0.45	
平均红细胞体积	MCV	82.0～96.0	fL
平均红细胞血红蛋白含量	MCH	27.0～31.0	pg
平均红细胞血红蛋白浓度	MCHC	290～340	g/L
血小板计数	PLT	100～300	$\times10^9$/L
淋巴细胞百分比	LYM%	0.20～0.40	
淋巴细胞绝对值	LYM#		$\times10^9$/L
单核细胞百分比	MXD%		
嗜中性细胞百分比	NEUT%	0.50～0.70	
单核细胞绝对值	MXD#		
嗜中性细胞绝对值	NEUT#		
红细胞体积分布宽度	RDW	0.116～0.148	
血小板分布宽度	PDW	0.150～0.180	%
平均血小板体积	MPV	6.8～13.0	fL
大型血小板比率	P—LCR	13～43	%

17 项血液细胞分析报告

编号	英文缩写	中文	单位	正常参考值
1	WBC	白细胞计数	$\times10^9$/L	4.0～10.0
2	Lymph	淋巴细胞百分比		0.20～0.40
3	Mono	单核细胞百分比		0.03～0.08
4	Gran	粒细胞百分比		0.50～0.75
5	Eos	嗜酸性白细胞	个/μl	<700

续表

编号	英文缩写	中文	单位	正常参考值
6	Baso	嗜碱性白细胞	个/μl	<200
7	BBC	红细胞计数	$\times10^{12}$/L	男4.0～5.5
				女3.5～5.0
8	Hb	血红蛋白	g/L	男130～170
				女110～150
9	HCT	红细胞压积	L/L	男0.40～0.50
				女0.35～0.45
10	MCV	平均红细胞体积	fL	82.0～96.0
11	MCH	平均红细胞血红蛋白含量	pg	27.0～31.0
12	MCHC	平均红细胞血红蛋白浓度	g/L	320～360
13	RDW	红细胞分布宽度	%	11.6～14.8
14	PLT	血小板计数	$\times10^{9}$/L	100～300
15	MPV	平均血小板体积	fL	6.8～13.5
16	PDW	血小板分布宽度	%	15.0～18.0
17	PCT	血小板压积	%	男0.108～0.272
				女0.114～0.282

华珊全自动血球计数分类仪报告

（CELL－DYN3500 型血球分析仪）

检验项目	英文缩写	正常参考值	计量单位
红细胞计数	RBC	男4.0～5.5	$\times10^{12}$/L
		女3.5～5.0	
红细胞比积	HCT	男0.40～0.50	L/L
		女0.35～0.45	
平均红细胞体积	MCV	82.0～96.0	fL
平均红细胞血红蛋白含量	MCH	27.0～31.0	pg
平均红细胞血红蛋白浓度	MCHC	290～340	g/L
血小板计数	PLT	100～300	$\times10^{9}$/L
平均血小板体积	MPV	6.8～13.5	fL

续表

检验项目	英文缩写	正常参考值	计量单位
血小板压积	PCT	男0.108～0.272 女0.114～0.282	%
血小板分布宽度	PDW	15.0～18.0	%
红细胞体积分布宽度	RDW	11.6～14.8	%
白细胞计数	WBC	4.0～10.0	$\times10^9$/L
血红蛋白	Hb	男130～170 女110～150	g/L
淋巴细胞绝对值	LYM #		
淋巴细胞百分比	LYM %	20～40	%
嗜中性细胞绝对值	NEU #		
嗜中性细胞百分比	NEU %	50～70	%
单核细胞绝对值	MONO #		
单核细胞百分比	MONO %	3～8	%
嗜酸性细胞绝对值	EOS #	0.05～0.30	$\times10^9$/L
嗜酸性细胞百分比	EOS %	1～5	%
嗜碱性细胞绝对值	BASO #		
嗜碱性细胞百分比	BASO %	0～1	%

化 验 报 告 单

编号＿＿＿＿＿＿

门诊号＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

住院号＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

姓名＿＿＿＿性别＿＿＿＿年龄＿＿＿＿

科别＿＿＿＿病室＿＿＿＿床号＿＿＿＿　　蛋白　(—)

临床诊断＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　　白细胞0～5/HP　红细胞0～1/HP

检查物＿＿＿＿尿常规＋酮体＿＿＿＿　　上皮细胞 少量　结晶＿＿＿＿

请检查＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　　尿糖　(—)　　其他＿＿＿＿

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

送检医师＿＿＿＿日期＿＿＿＿　　酮体　(—)

采取时间＿＿＿＿午＿＿＿＿时

标本收到时间＿＿＿＿午＿＿＿＿时　　报告日期＿＿＿＿检查者＿＿＿＿

广州华鑫行尿10 项检验结果报告

Ames CLINITEK —200 型尿分析仪

检验项目	英文缩写	正常结果
葡萄糖 (Glucose)	GLU	NEGATIVE (阴性)
酮体 (Ketones)	KET	NEGATIVE (阴性)
红细胞 (Blood)	BLO	NEGATIVE (阴性)
蛋白 (Protein)	PRO	NEGATIVE (阴性)
亚硝酸盐 (Nitrite)	NIT	NEGATIVE (阴性)
胆红素 (Bihrubin)	BIL	NEGATIVE (阴性)
尿比重 (Specific Gravity)	SC	1.002 ～1.030
酸碱度pH	pH	4.5 ～8.0
尿胆原 Urobihnogen	URO	0.2E.U. ＊/dl
白细胞Leucocytes	LEU	NEGATIVE (阴性)

尿液10 项检验报告单

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____

临床诊断_____

送检医师_____日期_____

检验者_____

报告日期_____

检验号

检验项目	结果	正常参考值	检验项目	结果	正常参考值
葡萄糖 (GLU)		(—)	蛋白质 (PRO)	μmol/L	(—)
胆红素 (BIL)		(—)	尿胆原 (URO)		3.2 ～32
酮体 (KET)		(—)	亚硝酸盐 (NIT)		(—)
比重 (SG)		1.002 ～1.030	红细胞 (BLO)		(—)
pH		4.50 ～8.00	白细胞 (LEU)		(—)

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____　　异常外观 正常

临床诊断_____　　白细胞 (—)　红细胞 (—)

检查物 大便常规　　虫卵 (—)

请检查_____　　其他_____

_____

送检医师_____日期_____　　潜血试验 (—)

采取时间_____午_____时

标本收到时间_____午_____时　　报告日期_____检查者_____

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____　　量2～10 ml 色灰白，浅黄色

临床诊断_____　　稠度粘稠状畸形＜0.2

检查物 精液　　活动率0.5～1h ＞0.70

请检查 常规　　精子数1～1.5 亿/ml

_____　　WBC ＜5 个/HP

送检医师_____日期_____　　RBC 无

采取时间_____午_____时

标本收到时间_____午_____时　　报告日期_____检查者_____

血骨髓细胞学检验报告

细胞名称			血片	骨　髓	
			%	严常范围%	%
原始血细胞				0～0.5	
粒细胞系统	原始粒细胞			0～1.0	
	早幼粒细胞			0.04～2.5	
	中性粒细胞	中幼		3.18～13.2	
		晚幼		5.22～20.2	
		带状核		8.47～24.4	
		分叶核		6.12～24.9	
	嗜酸粒细胞	中幼		0～1.1	
		晚 幼		0～2.0	
		带状核		0～1.1	
		分叶核		0～3.4	
	嗜碱粒细胞	中幼		0～1.1	
		晚幼		0～0.1	
		分叶核		0～0.4	
红细胞系统	原始红细胞		个	0～0.5	
	早幼红细胞		个	0～2.0	
	中幼红细胞		个	3.77～13.0	
	晚幼红细胞		个	0	
	中巨红细胞		个	0	
	晚巨红细胞		个	0	
淋巴细胞系统	原始淋巴细胞			0	
	幼稚淋巴细胞			0～0.6	
	淋巴细胞			8.4～32.4	
单核细胞系统	原始单核细胞			0	
	幼稚单核细胞			0	
	单核细胞			0～2.9	
其他细胞	网状细胞			0～0.9	
	内皮细胞			0～0.2	
	吞噬细胞			0～0.4	
	浆细胞			0～1.2	
	组织细胞			0～0.5	
	退化细胞		个		个

续表

细胞名称		血片	骨　髓	
		%	严常范围%	%
巨核细胞系统	原始型		0	个
	幼稚型		0～0.05	个
	无血小板型		0～0.27	个
	有血小板型		0.44～0.60	个
	裸核		0.08～0.30	个
间裂		个		个
接细		个		个
分胞		个		个
粒细胞系统：有核红细胞　3～5 1				
血片共数白细胞				个
骨髓片共数有核细胞				个
骨髓有核细胞总数　×10^9/L				

意见：

检验者签字_____

回报日期_____年_____月_____日

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____脑脊液_____

请检查_____

_____

送检医师_____日期_____

采取时间_____午_____时

标本收到时间_____午_____时

色及透明度；无色、透明

蛋白（潘氏法）（-）

细胞计数（0～10）×10^6/L

白细胞计数（0～8）×10^6/L

报告日期_____检查者_____

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____乙型肝炎二对半_____

请检查_____

_____

送检医师_____日期_____

采取时间_____年_____时

标本收到时间_____午_____时

乙型肝炎表面抗原（HBsAg） 阴性

乙型肝炎表面抗体（抗—HBs） 阴性或阳性

乙型肝炎e 抗原（HBeAg） 阴性

乙型肝炎e 抗体（抗－HBe） 阴性

乙型肝炎核心抗体（抗－HBc） 阴性

报告日期_____检查者_____

生化检验报告单（肝功能检查报告）

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____血_____

请检查_____肝功能_____

_____

送检医师_____

日　期年　月　日

报告日期_____检验者_____

检验号

	项目	结果	正常参考值
1	丙氨酸氨基转移酶（ALT）	U／L	＜40U／L
2	总蛋白　　TP	g／L	60～80g／L
3	白蛋白　　Alb	g／L	30～50g／L
4	球蛋白　　Glb	g／L	20～30g／L
5	总胆红质　　TBil	μmol／L	2.0～20.0μmol／L
6	直接胆红质DBil	μmol／L	0.0～6.0μmol／L

生化检验报告单 (血脂检查报告)

门诊号_____
住院号_____
姓名_____性别_____年龄_____
科别_____床号_____
临床诊断_____
检查物_____血_____
请检查血脂二项1～2　(　)
　　血脂四项1～4　(　)
　　脂蛋白5～6　(　)
送检医师_____
日　　期_____年　月　日　　报告日期_____检验者_____

检验号

	项目	结果	正常参考值
1	总胆固醇TC	mmol/L	2.60～6.50mmol/L
2	甘油三酯TG	mmol/L	0.22～1.65mmol/L
3	高密度脂蛋白－胆固醇HDL－C	mmol/L	1.16～1.55mmol/L
4	低密度脂蛋白－胆固醇LDL－C	mmol/L	<3.38 mmol/L
5	载脂蛋白－Al Apo－Al	g/L	1.00～1.60g/L
6	载脂蛋白－B100Apo－B100	g/L	0.60～1.10 g/L

生化检验报告单 (肾功能检查报告)

门诊号_____
住院号_____
姓名_____性别_____年龄_____
科别_____床号_____
临床诊断_____
检查物_____血_____
请检查电解质三项1～3　(　)
　　生化六项1～6　(　)
肾功肾功四项5～8　(　)
　　肾功八项1～6　(　)
送检医师_____
日　　期_____年　月　日　　报告日期_____检验者_____

检验号

	项 目	结果	正常参考值
1	钾K	mmol/L	3.6～5.5 mmol/L
2	钠Na	mmol/L	135～145mmol/L
3	氯Cl	mmol/L	96～110 mmol/L
4	二氧化碳CO_2	mmol/L	22.0～31.0 mmol/L
5	葡萄糖GLU	mmol/L	3.4～6.1 mmol/L
6	尿素氮BUN	mmol/L	2.5～7.1 mmol/L
7	肌酐CRE	μmol/L	53～133 μmol/L
8	尿酸UA	μmol/L	90～420 μmol/L

生化检验报告单 (无机盐检验报告)

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____血_____

请检查无机元素三项1～3

无机元素二项4～5

送检医师_____

日　　期__年__月__日　　报告日期_____检查者_____

检验号

	项目	结果	正常参考值
1	钙　Ca	mmol/L	2.10～2.60mmol/L
2	磷　P	mmol/L	0.87～1.61mmol/L
3	镁　Mg	mmol/L	0.68～1.20mmol/L
4	铁　Fe	μmol/L	7.1～28.6 μmol/L
5	总铁结合力	μmol/L	44.7～71.2 μmol/L

生化检验报告单 (心肌酶检查报告)

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____床号_____

临床诊断_____

检查物_____血_____

请检查心肌酶三项1～3　(　)

心肌酶六项1～6　(　)

送检医师_____

日　　期__年__月__日　　报告日期_____检验者_____

检验号

	项 目	结 果	正常参考值
1	天冬氨酸氨基转移酶　(AST)	U/L	<40 U/L
2	乳酸脱氢酶LDH－L	U/L	109～245 U/L
3	肌酸激酶CK－NAC	U/L	24～195 U/L
4	羟丁酸脱氢酶HBDH	U/L	95～250 U/L
5	乳酸脱氢酶同功酶Ⅰ　(LD－1)	U/L	10～50 U/L
6	肌酸激酶同功酶　(CK－MB)	U/L	<25 U/L

生化检验报告单

(其他生化指标检验报告)

门诊号_____
住院号_____
姓名_____性别_____年龄_____
科别_____床号_____
临床诊断_____
检查物　血　(尿)
请检查　酶测定

送检医师_____
日　期　年　月　日　　报告日期_____检验者_____
检验号

	项目	结果	正常参考值
1	碱性磷酸酶 ALP	U/L	39～130U/L
2	γ－谷氨酰转酞酶 GGT	U/L	7～50U/L
3	乳酸脱氢酶 LDH	U/L	109～245U/L
4	总酸性磷酸酶 TACP	U/L	<6.5U/L
5	前列腺酸性磷酸酶 PACP	U/L	<2.6 U/L
6	血淀粉酶 AMY －S	U/L	<90 U/L
7	尿淀粉酶 AMY －U	U/L	<490 U/L
8	胆碱酯酶 CHE	U/L	>3500 U/L

血气分析报告

门诊号_____
住院号_____
姓名_____
性别_____年龄_____
科别_____床号_____
临床诊断_____血气

检查物　动脉血□
　　静脉血□
Hb _____g/L
FiO_2 _____%
T _____℃
送检医师_____报告日期_____检验者_____

结　果	正常参考值
pH	7.35－7.45
PCO_2　kPa	4.66～5.98　kPa
PO_2　kPa	10.6～13.3　kPa
HCO_3^-　mmol/L	22～26　mmol/L
TCO_2　mmol/L	23～31　mmol/L
BE　mmol/L	－3～＋3　mmol/L
SBC　mmol/L	22～26　mmol/L
BBecf　mmol/L	－3～＋3　mmol/L
$SatO_2$　%	90 %～100 %
$AaDO_2$　kPa	1.33～0.67　kPa

化 验 报 告 单

编号_____

门诊号_____

住院号_____

姓名_____性别_____年龄_____

科别_____病室_____床号_____

临床诊断_____

检查物　　胸腹水常规　　

请检查_____

_____

送检医师_____日期_____

采取时间_____午_____时

标本收到时间_____午_____时

色　淡黄　透明度　清晰或微混

蛋白　(－)　(李凡它法)

细胞计数＜0.1 ×10^6/L

比重　漏出液＜1.018

　　渗出液＞1.018

白细胞计数＜0.1 ×10^6/L

报告日期_____检查者_____

阴道分泌物检查清洁度指标

清洁度	阴道杆菌	上皮细胞	球菌	血（脓）细胞/HP
Ⅰ	＋＋＋＋	＋＋＋＋	－	05
Ⅱ	＋＋	＋＋	－	6～15
Ⅲ	＋	＋	＋＋	16～30
Ⅳ	－	－	＋＋＋	＞30

Ⅰ～Ⅱ为正常；Ⅲ～Ⅳ为异常

阴道清洁度是以阴道杆菌、上皮细胞和杂菌多少来衡量为阴道炎症和生育期妇女卵巢激素分泌功能的判断指标。

动态红细胞沉降率报告单及正常参考值：<20mm/h

检验报告单

姓名：

性别：男 年龄：25

病人ID ：

科室：

病区：　　床号：

标本种类：血

标本说明：动态血沉

送检日期：2002 —04 —18

采样时间：2002 —04 —18

费别：　　自费

临床诊断：

检验编号：C00091

编号	项目	结果	参考值
1	动态红细胞沉降率	9	<20mm/h
2	红细胞最大沉降速度	3	mm/10min
3	终末时间	30	min

注：H —偏高，L —偏低

糖尿病及胰岛功能检查

项目	简写	正常参考值
血清胰岛素	INS	空腹：14.0 ±8.7mU/L
		馒头试验1h：75.8 ±43.6mU/L
		2h：58.2 ±38.1 mU/L
		3h：22.4 ±20.6 mU/L
血清C 肽		空腹：0.4 ±0.2pmol/L
		馒头试验1h：1.68 ±0.98pmol/L
		2h：1.22 ±0.83pmol/L
		3h：0.65 ±0.42pmol/L
血清胰高血糖素	GR	空腹：81.56 ±32.4ng/L

续表

项目	简写	正常参考值
		馒头试验1h：68.62±28.99ng/L
		2h：66.99±30.0ng/L
		3h：73.23±32.0ng/L
血清胰多肽	PP	20～29岁　12.9±1.0pmol/L
		30～39岁　27.4±2.9pmol/L
		40～49岁　39.3±3.1pmol/L
		50～59岁　43.1±6.7pmol/L
		60～69岁　49.3±6.7pmol/L
胰岛素原		50～400ng/ml（RIA法）
胰岛素抗体	A－INS	阴性（RIA法）
抗胰岛素抗体		阴性（EIA法）
胰岛细胞抗体	KA	阴性
胰岛细胞受体抗体		阴性
谷氨酸脱羧酶抗体	GAD	阴性
糖化血红蛋白	HbALc	4.5%～5.7%（免疫比浊法）
糖化血清蛋白	GSP	1.6～2.6mmol/L（NBT法）
葡萄糖耐量试验	GTF	空腹：3.89～6.1mmol/L
		馒头试验30min：≤13.85mmol（250mg/dl）
		60min：7.78～8.89mmol/L
		2h：达正常水平，每次测
		尿糖均为阴性

第二章　常用检验项目正常参考值

血液学检验项目正常参考值

序号	检验项目	正常参考值
1	白细胞（WBC）	成人（4～10）×10^9/L
		儿童（5～12）×10^9/L
		新生儿（15～20）×10^9/L
2	白细胞分类（DC）	
	中性粒细胞	
	杆状核	0.01～0.05
	分叶核	0.50～0.70
	嗜酸性粒细胞	0.01～0.05
	嗜碱性粒细胞	0.00～0.01
	淋巴细胞	0.20～0.40
	单核细胞	0.03～0.08
3	嗜酸性粒细胞计数（EOS）	（50～300）×10^6/L
4	血红蛋白（Hb 或HGB）	男130～170g/L
		女110～150g/L
		新生儿170～200g/L
5	红细胞（RBC）	男（4.0～5.5）×10^{12}/L
		女（3.5～5.0）×10^{12}/L
		新生儿（6～7）×10^{12}/L
6	红细胞比积（HCT）	男0.40～0.50L/L
		女0.35～0.45L/L
7	平均红细胞体积（MCV）	82～96fL
8	平均红细胞血红蛋白含量（MCH）	27～31pg
9	平均红细胞血红蛋白浓度（MCHC）	320～360g/L
10	红细胞体积分布宽度（RDW）	<0.15（<15%）

续表

序号	检验项目	正常参考值
11	血小板计数（PLT）	（100～300）×10^9/L
12	平均血小板体积（MPV）	6.8～13.5fL
13	血小板比积（PCT）	男0.108～0.272
		女0.114～0.282
14	血小板体积分布宽度（PDW）	15.0～18.0
15	血小板粘附试验（PAdT）	
	玻珠柱法	62.5%±8.6%
	玻璃滤器法	31.9%±10.9%
16	血小板聚集试验（PAgT）	ADP浓度为6×10^{-6}mol/L时，MAR（最大聚集率%）：35.2%±13.5%
		坡度：63.9±22.2%
17	血小板释放试验	
	血浆β-血小板球蛋白（β-TG）	16.4±9.8ng/ml
	血小板第4因子（PF4）	3.2±2.3ng/ml
18	全血凝固时间（CT）	
	试管法	4～12min
	硅管法	15～30min
	塑料管法	10～19min
19	出血时间（BT）	
	测定器法	6.88±2.08min
	Duke	1～3 min
20	红斑狼疮细胞（LE）	阴性：未找到LE细胞
21	网织红细胞（RC）	
	百分计数	成人0.005～0.015
		新生儿0.03～0.06
	绝对计数	（24～84）×10^9/L
22	嗜碱性点彩红细胞计数	<0.01%
23	骨髓有核细胞计数	（10～180）×10^9/L
24	骨髓巨核细胞计数	7～35个/单位面积
	原巨核细胞	0
	幼巨核细胞	0～0.05

续表

序号	检验项目	正常参考值
	颗粒型巨核细胞	0.10～0.27
	产板型巨型巨核细胞	0.44～0.60
	裸核型巨核细胞	0.08～0.30
25	活化部分凝血活酶时间测定（APTT）	男37.0±3.3s
		女37.5±2.8s
26	血浆凝血酶原时间测定（PT，一期法）	比值为0.82～1.15
27	肝促凝血酶原激酶试验（HPT）	90.6±13.4
28	蝰蛇毒时间测定（RVVT）	13～14s
29	凝血因子Ⅷ（Ⅷ：C）活性（一期法）	103±25.7
30	凝血因子Ⅸ（Ⅸ：C）活性（一期法）	98.1±30.4
31	凝血因子Ⅺ（Ⅺ：C）活性（一期法）	100±18.4
32	凝血因子Ⅻ（Ⅻ：C）活性（一期法）	92.4±20.7
33	凝血因子Ⅱ（Ⅱ：C）活性（发色底物法）	150～200μg/ml
34	凝血因子Ⅱ抗原（Ⅱ：Ag 免疫火箭电泳法）	98.5±15.5
35	凝血因子Ⅷ：C 抗原（Ⅷ：C Ag 免疫火箭电泳法）	96.5±28.3
36	抗凝血酶Ⅲ抗原（ATⅢAg，免疫火箭电泳法）	290±30.2mg/L
37	抗凝血酶Ⅲ活性（ATⅢ：C，凝胶空斑法）	90.3%±13.2%
38	蛋白C 抗原（PC：Ag，免疫火箭电泳法）	102.5%±20.1%
39	蛋白C 活性（PC：A，发色底物法）	100.24%±13.18%
40	优球蛋白溶解时间（ELT，加钙法）	>120min
41	组织纤溶酶原激活物（t-PA：A，发色底物法）	1.9±0.71 U/ml
42	纤溶酶原活性（PLG：A，发色底物法）	94.5%±9.0%
43	纤溶酶原激活抑制物活性（PAI：A，发色底物法）	6.4±2.6U/ml
44	α2－纤溶酶抑制物活性（α-PI：A）	0.8～1.2 抑制单位/ml
45	D－二聚体（ELISA 法）	<400μg/L
46	凝血酶时间（TT）	超过正常对照3s 以上者为异常
47	蕲蛇酶时间（AT）	14.8±1.5s
48	红细胞渗透脆性试验	
	开始溶血	71.8～78.6mmol/L
	完全溶血	54.7～58.1 mmol/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
49	血红蛋白H 包涵体 (HbH)	0％～5％
50	高铁血红蛋白还原试验	75％
51	红细胞谷胱甘肽 (GSH) 含量	2230 ±350 tanol/L 压积红细胞 (690 ±110 mg/L 压积红细胞) 6.57 ±1.04 /anol/g Hh
52	HbF 碱变性试验	成人1.0％—3.1％ 新生儿55％—85％
53	血浆游离血红蛋白	<40mg/L
54	丙酮酸激酶活力	1.2～2.2U/mi 红细胞 (37℃)
55	血清结合珠蛋白 (Hp)	731 ±420mg/L
56	红细胞沉降率 (ESR)	男<15mm/1h 女<20mm/1h

一般临床体液检验项目正常参考值

序号	检验项目	正常参考值
1	尿液比重 (SG)	任意尿1.003～1.030 晨尿>1.020 新生儿1.002～1.004
2	尿液渗量	600～1000mOsm/kgH_2O
3	酸碱度 (pH)	均值约为6.5
4	尿蛋白定性	阴性
5	尿液蛋白质定量 (U—Pro)	
	双缩脲比色法	0～120mg/24h 尿量
	丽春红S 法	46.5 ±18.1mg/L
6	尿葡萄糖 (U—Clu)	阴性 定量0.56～5.00mmol/24h 尿
7	尿酮体 (U—Ket)	阴性
8	隐血 (OB)	阴性
9	尿胆红素 (U—BiL)	阴性

续表

序号	检验项目	正常参考值
10	尿胆原（URO）	弱阳性
11	尿亚硝酸盐（NIT）	阴性
12	尿沉渣：（OS 或 Ni）	
	红细胞（RBC）	0～1/HP
	白细胞（WBC）	0～5/HP
	管　型	偶见透明管型（无其他管型）
13	尿三杯	三杯均清晰，镜检阴性
14	l h 尿沉渣计数	
	红细胞	男<3 万/h
		女<4 万/h
	白细胞	男<7 万/h
		女<14 万/h
	管型	<3400/h
15	酚红排泌试验（$P5）	15 min：25%～50%；30 min：40%～60%
		60 min：50%～75%；120 min：55%～85%
16	精液精子计数	（0～130）×10^9/L
17	精液精子活动率	>70%
18	精子形态观察	异常精子<20%
19	精液pl－1	7.2～8.0
20	基础胃酸分泌量（BAO）	0～5 mmol/h
21	最大胃酸分泌量（MAO）	15～20 mmol/h
22	胃液pH	0.8～1.8
23	本周氏蛋白试验（B－J pro）	阴性
24	含铁血红素定性	阴性
25	乳糜尿定性（CHY）	阴性

临床化学检验项目正常参考值

序号	检验项目	正常参考值
1	血清总胆红素	
	1) 改良J－G 法	5.1～19 μmol/L
	2) 胆红素氧化酶法	10.26 ±4.10 μmol/L
2	血清结合胆红素	
	1) 改良J－C 法	1.7～6.8 μmol/L
	2) 胆红素氧化酶法	2.57 ±2.56 μmol/L
3	α—L 岩藻糖苷酶 (AFu)	221 ±114nmol/ml/h
4	血清总蛋白 (T)	60～80S/L
5	血清白蛋白 (A)	35～55S/L
6	血浆纤维蛋白原	
	1) 双缩脲比色法	2～4g/L
	2) 热沉淀比浊法	2.22～4.22g/L
7	血清蛋白电泳 (丽春红S 染色)	
	A	0.57～0.68
	al	0.01～0.06
	α_2	0.05～0.12
	β	0.07～0.13
	γ	0.10～0.18
8	丙氨酸氨基转移酶 (ALT)	
	1) 连续监测法	底物不含p－5′－p 成人5～40U/L (37 ℃)
	2) 赖氏法	5～25 卡门单位
9	天冬氨酸氨基转移酶 (AST)	
	1) 连续监测法	底物不含p－5′－p 成人8～40U/L
	2) 赖氏法	8～28 卡门单位
10	碱性磷酸酶 (ALP)	
	1) 连续监测法	37 ℃，女性1～12 岁<500U/L >15 岁40～150U/L 37 ℃，男性1－12 岁<500U/L 12～15 岁<750U/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
		>25 岁40～150U/L
	2) 比色法	成人3～13 金氏单位
		儿童5～28 金氏单位
11	血清葡萄糖	空腹，3.40～6.10mmol/L
12	葡萄糖耐量试验	口服葡萄糖后30min 至1h 血清葡萄糖水平升高达峰值，在7.78～8.89mmoVL。2h 后，恢复至空腹时血糖值，每次尿糖检测阴性
13	脑脊液葡萄糖	儿童2.8～4.5mmol/L
		成人2.5～4.5mmol/L
14	乳酸	
	1) 全血乳酸分光光度法	0.5～1.7mmol/L
	2) 血浆乳酸比色法	<2.4mmol/L
15	血清总胆固醇	3.12～5.72mmol/L
16	血清甘油三酯	0.44～1.65mmol/L
17	血清高密度脂蛋白胆固醇	男性1.10～1.60mmol/L
		女性1.29～1.55mmol/L
18	血清低密度脂蛋白胆固醇	中、老年人平均：2.7～3.1 mmol/L
19	血清载脂蛋白	
	apoAl	1.20～1.60g/L
	apoB	中青年人0.80～0.90g/L
		老年人0.95～1.05g/L
	脂蛋白 a)	120～180mg/L
20	血清粘蛋白	
	以蛋白计	0.71～0.87g/L
	以酪氨酸计	33.8±2.7mg/L
21	脑脊液总蛋白	150～450mg/L
22	糖化血红蛋白	占总血红蛋白的7.0%±0.9%
23	糖化血清蛋白	1.9±0.25mmo/L
24	全血丙酮酸	空腹休息状态下 静脉血：03～0.1mmol/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
25	钾测定（K）	
	血清钾	3.5～5.3mmol/L
	尿钾排泄量	25～100mmol/24h
26	钠测定（Na）	
	血清钠	136～145mmol/L
	尿钠排泄量	130～260mmol/24h
27	氯化物（Cl）	
	血清（浆）氯化物	96～108mmol/L
	脑脊液氯化物	120～132mmol/L
	尿液氯化物	170～250mmol/24，h
28	血浆（清）碳酸氢根及总二氧化碳（CO_2）	
	1）酶法	HCO_3^- 22～34mmol/L
	2）滴定法	HCO_3^- 成人20～29mmol/L
		儿童18～27mmol/L
	3）电极法	总二氧化碳22～29mmol/L
29	血清总胆汁酸	成人1～10μmol/L
30	血浆氨	18～72μmol/L
31	血清尿素	2.86～8.2mmol/L（以尿素为计）
32	血清肌酐	
	1）去蛋白终点法	男性44～133μmol/L
		女性70～106μmol/L
	2）速率法	男性53～97μmol/L
		女性44～80μmol/L
33	内生肌酐清除率	男性105±20 ml/min
		女性95±20ml/min
34	清尿酸	
	1）磷钨酸还原法	男性149～416μmol/L
		女性89～357μmol/L
	2）尿酸酶－过氧化物酶偶联法	成人90～420μmol/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
35	血气及酸碱分析	
	酸碱度（pH）	7.35～7.45
	动脉血二氧化碳分压（$PaCO_2$）	4.65～5.98kPa
	动脉血氧分压（PaO_2）	10.64～13.3kPa
	氧饱和度（$SatO_2$）	91.9%～99%
	二氧化碳总量（TCO_2）	24～32mmol/L
	实际碳酸氢根（AB）	21.4～27.3mmol/L
	标准碳酸氢根（SB）	21.3～24.8mmol/L
	血浆缓冲碱（BBp）	41～42mmol/L
	全血缓冲碱（BBb）	46～50mmol/L
	剩余碱（BE）	－3～＋3mmol/L
	阴离子隙（AG）	8～16mmol/L
36	尿液中17 酮类固醇	男性28.5～61.8μmol/24h
		女性20.8～52.1μmol/24h
37	尿液中17 羟皮质类固醇	男性27.88±6.6μmol/24h
		女性23.74±4.47μmol/24h
38	尿液中香草扁桃酸	
	1）分光光度法	成人10～35μmol/24h
		儿童<25μmol/24 h
	2）重氮比色法	成人17.7～65.6μmol/24h
39	唾液酸（SH）	1.29～2.42mmol/L
40	血清总钙	
	1）邻－甲酚酞络合酮比色法	成人2.03～2.54mmol/L
		儿童2.25～2.67mmol/L
	2）甲基麝香草酚蓝比色法	成人2.08～2.60mmol/L
		儿童2.23～2.80mmol/L
	3）乙二胺四乙酸二钠滴定法	成人2.25～2.75 mmol/L
		婴儿2.5～3.0mmol/L
41	离子钙	成人1.10～1.34mmol/L
42	血清无机磷	

续表

序号	检验项目	正常参考值
	1）硫酸亚铁磷钼蓝比色法	成人0.%～1.62mmol/L
		儿童1.45～2.10mmol/L
	2）紫外光度法	0.9～1.34mmol/L
43	血清镁	
	1）甲基麝香草酚蓝比色法	0.67～1.04mmol/L
	2）Calmagite 染料比色法	0.7～1.10mmol/L
	3）原子吸收分光光度法	成人0.6～1.1 mmol/L
		儿童0.5～0.9mmol/L
44	清铁	男性11～30 μmol/L
		女性9～27 μmol/L
45	血清总铁结合力	男性50～77 μmol/L
		女性54～77 μmol/L
46	血清铜	
	1）原子吸收分光光度法	男性11.0～22.0 μmol/L
		女性12.6～24.4 μmol/L
		儿童12.6～29.9 μmol/L
	2）比色法	男性10.99～21.98 μmol/L
		女性12.56～23.55 μmol/L
47	血清锌	
	1）原子吸收分光光度法	11.6～23.0 μmol/L
	2）单扫描示波极谱法	12.24～18.36 μmol/L
	3）吡啶偶氮酚显色法	9.0～20.7 μmol/L
48	酸性磷酸酶（ACP）	成人0.5～1.9U/L
49	乳酸脱氧酶	
	1）连续监测（D－L 法）	109～245U/L
	2）连续监测（D－P）法	200～380U/L
	3）比色法	190～437 金氏单位
50	γ－谷氨酸转肽酶（GGT）	
	1）连续监测法（含羧基底物）	男性11～50U/L（37℃）
		女性7～32U/L（37℃）

续表

序号	检验项目	正常参考值
	2）重氮反应比色法	男性3～17U/L
51	淀粉酶（AMS）	
	1）碘－淀粉比色法	血清80～180U/L
		尿液100～1200U/L
	2）对－硝基苯麦芽庚苷法	血清参考值上限220U/L（37℃）
52	血清胆碱酯酶	
	1）比色法	130～310U/L
	2）连续监测法	5000～12000U/L（37℃）
53	葡萄糖－各磷酸脱氢酶	8.34±1.59U/gHb（37℃）
54	血清脂肪酶	
	1）滴定法	酶促反应4h为0.06～0.89U/ml
		酶促反应16～24h为0.2～1.5U/ml
	2）比浊法	<7.9U/L
55	血清单胺氧化酶	
	1）苄醛偶氮萘酚法	12～40U/ml
	2）醛苯腙法	<36U/ml
56	血清5’－核苷酸酶	2～17U/L
57	血清肌酸激酶	
	1）肌酸显色法	8～60U/L
	2）酶偶联法	男性：38～174U/L（37℃）
		女性：26～140U/L（37℃）
58	血清腺苷脱氨酶	0～25U/L
59	α－羟丁酸脱氢酶	
	1）比色法	61～155U/L（37℃）
	2）连续监测法	72～182U/L（37℃）
60	β－N－乙酰氨基葡萄糖苷酶	
	1）对硝基酚比色法	血清21.54±6.4U/L
		尿<16.10U/g肌酐
	2）荧光光度法	血清7～20U/L
		尿6.39±3.19U/g肌酐

续表

序号	检验项目	正常参考值
61	肌钙蛋白I（cTnI）	3 ng/L 以下
62	血清α-氨酸氮	2.1～3.9nmol/L
63	同型半胱氨酸（HoMo）	3～6mg/dl
64	无机元素参考值	
	血清钾（K）	3.8～5.4mmol/L
	尿钾	51.15～102.31 mmol/d
		（依摄人量而异）
	血清钠（Na）	136～145mmol/L
	尿钠	130.5～217.5mmol/d
		（依摄入量而异）
	血清氯化物（Cl）	95～106mmol/L
	尿氯	282.1～423.1mmol/d
		（依摄入量而异）
	血清总钙（Ca）	2.10～2.63mmol/L
	血清离子钙（Ca^{2+}）	1.18～1.38mmol/L
	尿总钙	2.50～7.49mmol/L
	血清无机磷	
	成人	0.97～1.45mmol/L
	儿童	1.29～2.26mmol/L
	尿无机磷	3～42mmol/L
	全血铁（Fe）	
	男	7.9～10mmol/L
	女	7.3～8.4mmol/L
	血清铁（Fe）	
	男	10.7～26.9μmol/L
	女	9.0～23.3μmol/L
	血清总铁结合力（TIBC）	45～77μmol/L
	血清未饱和铁结合力（UIBC）	25.1～37.4μmol/L
	血清铁饱和度	0.20～0.55
	血清铜（Cu）	14.2～20.5μmol/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
	尿铜（Cu）	0～1.6 μmol/L
	血清硒（Se）	1.52 μmol/L
	血清硼（B）	0～116 μmol/L
	血液铅（Pb）	<2.4 μmol/L
	尿液铅（Pb）	<0.483 μmol/d
	血清镁（Mg）	0.78～1.0 mmol/d
	尿液镁（Mg）	3.0～4.3 mmol/d
	血清锌（Zn）	7.65～22.95 μmol/L
	尿液锌（Zn）	2.1～11.0 μmol/L
	血清镉（Cd）	12.4～38.5 nmol/L
	血液汞（Hg）	<0.25 μmol/L
	尿液汞（Hg）	<0.1 μmol/L
		中毒时>0.75 μmol/L
	血液砷（As）	<0.40／μmol/L
	尿液砷（As）	<0.07 μmol/L
	血清锂（Li）	0
	治疗水平	0.5～1.5 mmol/L
	血清铬（Cr）	0.285～0.396 μmol/L
	尿液铬（Cr）	0.195～0.240 μmol/d
	血清铝（Al）	5.8～7.0 μmol/d
	血液锰（Mn）	
	比色法	<3.65 μmol/L
	原子吸收法	0.129～0.208 μmol/L
	血清锰（Mn）	
	比色法	<1.82 μmol/L
	原子吸收法	22～46 nmol/L
	尿液锰（Mn）	3.64～25.5 nmol/d
	血液钴（Co）	5.94 nmol/L
	血清钴（Co）	4.92 nmol/L
	血液钼（Mo）	0～0.092 μmol/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
	尿液钼（Mo）	0～0.445 μmol/L
	血液氟化物（F）	<26.3 μmol/L
	尿液氟化物（F）	<52.6 μmol/d
	血清硫酸盐	52～156 μmol/L
	血清二氧化硅（SiO_2）	58～218 μmol/L
	血清镍（Ni）	1.4～13.6nmol/L
65	维生素检验参考值	
	血清视黄素（Vit A）	0.7～2.6 μmol/L
	血清胡萝卜素（Vit A 原）	1.12～3.7 μmol/L
	血浆生育酚（Vit E）	13～41 μmol/L
	血浆泛醌（辅酶Q）	0.4～1.15mg/L
	血浆钙化醇（Vit D）	45～201 nmol/L
	血液硫胺素（Vit B_1）	94～271pmol/L
	血液核黄素（Vit B_2）	0.27～1.33nmol/L
	血浆吡哆醇（Vit B_6）	177～473nmol/L
	血浆钴胺素（Vit B_{12}）	0.07～0.59nmol/L
	血液泛酸（Vit B_3）	游离：0.09～0.37 μmol/L
		总量：1.74～2.49 μmol/L
	血浆抗坏血酸（Vit C）	23～91 μmol/L
	血液生物素（Vit H）	0.49～1.73nmol/L
	血浆叶酸（Vit B_{11}）	11～54nmol/L
	血液尼克酸（Vit PP）	28～57 μmol/L
	血清25－维生素D_3	
		成人：20.6±1.7 μg/L
		5～6 岁：13.3±1.1 μg/L
		7～9 岁：11.9±0.7 μg/L

临床免疫学检验项目正常参考值

序号	检验项目	正常参考值
1	溶菌酶含量（琼脂平板法）	血清5～30mg/L
		尿液：0mg/L
2	C 反应蛋白（ELISA 法）	成人0.42～5.2mg/L
		孕妇4.4～46.8mg/L
3	纤维结合蛋白（Fn）	231±46mg/L
4	免疫球蛋白含量	
	1）IgG（RID 法）	12.87±1.35g/L
	2）IgA（RID 法）	2.35±0.34g/L
	3）IgM（RID 法）	1.08±0.24g/L
	4）IgD（RID 法）	0.11～578.3μg/L
	5）IgE（ELISA 法）	男31～5535μg/L
		女31～2000μg/L
5	总补体溶血活性（CH_{50}）	50～100CH_{50}/ml
6	补体旁路活化溶血	21.7±5.4U/ml
	活性（AP－H_{50}）	
7	Cl 含量	0.197±0.048g/L
8	C3 含量	1.14～0.27g/L
9	C4 含量	0.553±0.109g/L
10	B 因子含量	0.10～0.40g/L
11	循环免疫复合物（CIC）	
	1）PEG 沉淀比浊法	4.3±2.0A 以≥8.3 为免疫复合物阳性
	2）SPA 夹心FLISA 法	以>28.4mg/L 为阳性
12	T 细胞花环试验	
	1）EtRFC	64.4%±6.7%
	2）EaRFC	23.6%±3.5%
	3）EsRFC	3.3%±2.6%
13	B 细胞测定	
	1）红细胞花环试验	EA－RFC 及EAC－RFC：8%～12%
		M－RFC：8.5%±2.8%
	2）酵母菌花环试验	AB 型血清：11.6%±4.3%

续表

序号	检验项目	正常参考值
		自身血清：11.1％±3.6％
	(3) 细胞膜表面免疫球蛋白(SmIg) 测定SmIg⁺细胞总数	21％
14	T 细胞亚群	
	(1) CD_3^+ (T_3) 细胞阳性率	71.5％±6.2％
	(2) CD_4^+ (T_4) 细胞阳性率	45.7％±5.3％
	(3) Cq_8^+ (T_8) 阳性率	27.9％±5.0％
	(4) CD_4/CD_8 (T_4/T_8) 比值	1.66 ±0.33
15	抗核抗体 (ANA)	≤1 ∶5 阴性
16	甲胎蛋白异质体	LCA 结合型AFP ≥25％提示为原发性肝细胞癌
17	人绒毛膜促性腺激素 (hCG)	2.3～13.6 μg/L 非妊娠妇女血清
18	血清CiQ 含量测定	0.197 ±0.4g/L (单扩散法) (19.7 ±4.0mg/dl)
19	白细胞移动抑制试验 (WTT)	白细胞移动指数 成人：3～3.5　　儿童2～2.5
20	细胞移动抑制试验 (MTT)	以移动指数MI 示： MI =1 表示该抗原对巨噬细胞无明显抑制作用 MI ≥1 表示有刺激作用 可能为机体存在一特异性细胞 免疫反应的表现
21	C_3 裂解产物 (C_3SP)	阴性 (电泳法)
22	白细胞粘附试验 (LAT)	阴性
23	植物血凝素皮内试验 (PHH)	阴性　　小于5mm
24	纤维结合蛋测定 (Fn)	231 ±46mg/L
25	T 淋巴细胞转化试验 (LTT)	转化率 (60.1 ±7.0)％ (0.601 ±0.076) ^3H -TdK 参人法：一般在刺激 指数 (SI) 72 时有意义
26	TORCH 感染参考值	

续表

序号	检验项目	正常参考值
	To（弓形虫抗体）	阴性
	R（风疹病毒IgM）	阴性
	CMV（巨细胞病毒IgG）	阴性
	（巨细胞病毒IgM）	阴性
	H（单纯疱疹病毒IgM）	阴性
27	艾滋病病毒（HIV）IgG	阴性
	（人类免疫缺陷病毒）	
	艾滋病病毒（HIV）IgM	阴性
	（人类免疫缺陷病毒）	
28	血浆特种蛋白正常参考值	
	1）免疫球蛋白（g）	
	ISA（血清）	0.69～3.82g/L
	ISC（血清）	7.32～16.85g/L
	IgM（血清）	0.63～2.77g/L
	IgM（CSF）	5～61 mg/L
	2）C－反应蛋白（CRP）	<8mg/L 或<8 μg/ml
	3）类风温因子（RF）	<30IU/ml 或阴性
	4）抗链球菌溶血素O（ASO）	<200IU/ml
	5）转铁蛋白（TRF）	2.55～429g/L（速率散射）
	6）β$_2$－微球蛋白（β$_2$－MG）血清	1.0mg～2.6mg/L（RIA）
	7）铜兰蛋白（CP）、血清	15.6g/L（速率散射）
	8）触珠蛋白（HP）	0.5～2.2g/L
	9）α$_1$－酸性糖蛋白（AAG）	0.55～1.48/L
	10）α$_1$－抗胰蛋白酶（AAT）	2.0～4.0g/L
	11）前白蛋prea（lbumin）	170～4mg/L
	12）抗凝血酶－III（AT－III）	250～330mg/L
	13）载脂蛋白I（apoA－1）	男性0.96～1.76g/L
		女性1.07～2.03g/L
	载脂蛋白B$_{100}$	男性0.43～1.28g/L
		女性0.42～1.12g/L

续表

序号	检验项目	正常参考值
	apoA－Ⅰ/apoB$_{100}$	平均值男性1.0 女性1.3
	(4) α－微球蛋白 (α－M)	血清10～30mg/L 尿6mg 以下/日

男性比女性高，小儿比老人比成年人高，妊娠未期比妊娠初期高

29　血液流变学检测正常参考值

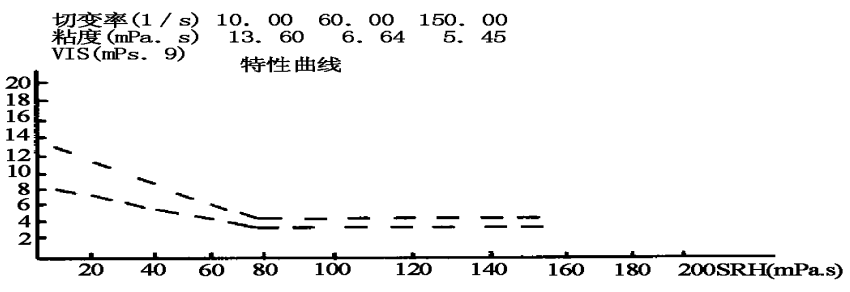
血液滤变学测试报告　　1998 年　月　日

姓　名：刘　　性别：男　　年龄：65　　病历号：0

实验编号：　　科别：内　　检验医生：

检验项目	数据	提示	参考正常值
全血粘度：低切=10	13.30	↑	8.23－－－10.78
全血粘度：中切=60	6.64	↑	5.33－－－6.59
全血粘度：高切=150	5.45	↑	4.12－－－5.01
血浆粘度=120	1.74	↑	1.13－－－1.64
红细胞压积 (%)	55.00	↑	42.52－－－48.44
全血还原粘度：低切	12.39		8.29－－－20.08
全血还原粘度：中切	5.12		4.64－－－11.36
全血还原粘魔：高切	3.88		3.12－－－8.08
血沉 (MM/H)	20.00	↑	0.110－－－15.00
血沉方程K 值	135.28	↑	0.00－－－93.00
红细胞聚集指数	2.50		1.95－－－2.99
红细胞刚性指数	3.88		3.12－－－8.08
红细胞变形指数	0.67		11.64－－－1.06
胆固醇 (MMOL/L)	7.14	↑	2.32－－－6.10
甘油三脂 (MMOL/L)	1.98	↑	0.49－－－1.95
高密度脂蛋白 (MMOL/L)	1.23	↑	0.89－－－1.17
血糖 (MMOL/L)	5.63		4.00－－－6.00
纤维蛋白元 (G/L)	5.64	↑	2.00－－－4.00
红细胞电泳指数	4.54	↓	4.59－－－6.17

附：粘度实验数据



续表

序号	检验项目	正常参考值	
30	自身抗体测定参考值		
	1) 抗核抗体（ANA）	≤1∶5（阴性）	免疫荧光法
	2) 抗心肌抗体（AMA）	≤1∶5（阴性）	免疫荧光法
	3) 抗平滑肌抗体（SMA）	≤1∶10（阴性）	免疫荧光法
	4) 抗胃壁细胞抗体（PCA）	≤1∶10（阴性）	免疫荧光法
	5) 抗线粒体抗体（AMF）	≤1∶5（阴性）	免疫荧光法
	6) 抗双链DNA 抗体	≤1∶5（阴性）	免疫荧光法
	7) 抗甲状腺微粒体抗体（ATMA）	阴性	免疫荧光法
	8) 抗精子抗体（ASA）	阴性	免疫荧光法
	9) 可提取核抗原抗体（抗ENA）	阴性	免疫荧光法
	10) 心磷脂抗体	阴性	免疫荧光法
	11) 抗肾上腺皮质抗体	阴性	免疫荧光法
31	血清补体免疫测定参考值		
	1) 血清总补体（H_{50}）	75～160kU/L	单扩法
	2) 补体Ig（Clg）	0.197±0.04g/L	单扩法
	3) 补体C_3（C_3）	0.85～1.93g/L	速率散射
	4) 补体C_4（C_4）	0.12～0.36g/L	速率散射
	5) 补体C_5（C_5）	0.07～0.09g/L	速率散射
	6) 补体C_6（C_6）	0.04～0.065g/L	速率散射
	7) 补体C_7（C_7）	0.048～0.055g/L	速率散射
	8) 补体C_8（C_8）	0.042～0.06g/L	速率散射
	9) 补体C_9（C_9）	0.05～0.062g/L	速率散射
32	细胞因子测定		
	1) 血清肿瘤坏死因子（TNF）	0.88±0.12μg/L	
	2) 白细胞介素-2（IL-2）	5.0±1.5μg/L	
	3) 白细胞介素2 受体（SIL-2R）	247.2±77U/ml	
	4) 白细胞介素-3（IL-3）	<0.1μg/ml	
	5) 白细胞介素-6（IL-6）	<0.1μg/ml	
	6) 血清胰蛋白素生长因子	男1.65±5.8nmol/L	
		女24.2±7nmol/L	

33．常用抗生素药敏判断值

抗生素及其他抗菌药物	菌名	纸片含量(μg/片)	抑菌环直径判断标准(mm)			质控ATCC株抑菌直径界值(mm)			
			耐药	中介	敏感	大肠25922	金葡25923	铜绿27853	淋病49226
β－内酰胺类									
氨卡西林	革兰阴性杆菌	10	≤13	14～16	≥17	16～22	27～35		
（氨苄青霉素）	葡萄球菌		≤28	—	≥29				
	肠球菌		≤16	—	≥17				
	β－溶血链球菌		≤18	19～25	≥26				
	其他链球菌		≤21	22～29	≥30				
阿洛西林	假单胞菌属	75	≤17	—	≥18			24～30	
（苯噻唑青霉素）									
卡比西林	假单胞菌属	100	≤13	14～16	≥17	23～29	—	18～24	
（羧苄青霉素）	其他革兰阴性杆菌		≤19	20～22	≥23				
苯唑西林	葡萄球菌	1	≤10	11～12	≥13	—	18～24	—	
苄星青霉素	葡萄球菌	10U	≤28	—	≥29	—	26～37		
（青霉素G）	肠球菌		≤14	—	≥15				
	非肺炎链球菌		≤19	20～27	≥28				
	肺炎链球茁	1	—	—	≥20				
哌拉西林	假单胞菌屑	100	≤17	—	≥18	24～30		25～33	
（氧哌嗪青霉素）	其他革兰阴性杆菌		≤17	18～20	≥21				
β－内酰胺类／酶抑制剂									
氨苄西林／青霉烷砜	肠杆菌科、葡萄球菌	10／10	≤11	12～14	≥15	20～24	29～35		
阿莫西林／棒酸	葡萄球菌	20／10	≤19	—	≥20	19～25	28～36	—	
（轻氨苄青霉素／棒酸	其他菌		≤13	14～17	≥18				
替卡西林／棒酸	假单胞菌属	75／10	≤14	—	≥15	25～29	29～37	20～28	
（羧噻吩青霉素／棒酸	其他革兰阴性杆菌		≤14	18～20	≥21				
	葡萄球菌		≤22	—	≥23				
头孢菌素类及其他头胞类									
头孢噻吩		30	≤14	15～17	≥18	15～21	29～37	—	
头孢唑啉		30	≤14	15～17	≥18	23～29	29～35	—	
头孢呋肟	淋病奈瑟菌	30	≤25	26～30	≥31				33～41
	其他菌		≤14	15～17	≥18	20～26	27～25	—	
头孢哌酮		75	≤15	16～20	≥21	28～34	24～33	23～29	
头孢噻肟		30	≤14	15～17	≥23	29～35	25～31	18～22	

续表

抗生素及其他抗菌药物	菌名	纸片含量(μg/片)	抑菌环直径判断标准(mm)			质控ATCC株抑菌直径界值(mm)			
			耐药	中价	敏感	大肠25922	金葡25923	铜绿27853	淋病49226
头孢他啶	淋病奈瑟菌	30	—	—	≥28				35～43
	非肺炎链球菌		≤25	20～27	≥28				
	其他茁		≤14	15～17	≥18	25～32	16～20	22～29	
头孢三嗪	淋病奈瑟菌	30	—	—	≥35				39～51
	非肺炎链球菌		≤24	25～26	≥27				
	其他菌		≤13	14～20	≥21	19～25	22～28	17～23	
卡巴配能类									
亚胺硫霉素		10	≤13	14～15	≥～16	26～32	—	20～28	
单酰胺类									
氨曲南(噻肟单酰胺菌素)		35	≤15	16～21	≥22	28～36	—	23～29	
多肽类									
万古霉素	肠球菌	30	≤10	11～13	≥14		17～21		
	肺炎链球菌		—	—	≥16				
	其他革兰阴性杆菌		≤9	10～11	≥12				
氨基糖甙类									
丁胺卡那		30	≤14	15～16	≥17	19～26	20～26	18～26	
庆大霉素		10	≤12	13～4	≥15	19～26	19～27	16～21	
庆大霉素(高剂量)	肠球菌	120	≤6	7～9	≥10	19～26	19～27	16～21	
链霉素		10	≤11	12～14	≥15	12～20	14～22	—	
链霉素(高剂量)	肠球菌	300	≤6	7～9	≥10				
妥布霉素		10	≤12	13～14	≥15	18～26	19～29	19～25	
大环内酯类									
红霉素		15	≤13	14～22	≥23		22～30	—	
	肺炎链球菌		≤15	16～20	≥21				
四环素类									
四环素		30	≤14	15～18	≥19	18～25	24～30	—	
	肺炎链球菌		≤17	18～21	≥22				
	非肺炎链球菌		≤18	19～22	≥23				
	淋病奈瑟菌		≤30	31～37	≥38				
喹诺酮类									
诺氟沙星		10	≤12	13～16	≥17	28～35	17～28	22～29	
氧氟沙星	淋病奈瑟菌	5	—	—	≥31				43～51

续表

抗生素及其他抗菌药物	菌名	纸片含量（μg/片）	抑菌环直径判断标准（mm）			质控ATCC株抑菌直径界值（mm）			
			耐药	中介	敏感	大肠25922	金葡25923	铜绿27853	淋病49226
	其他菌		≤12	13～15	≥16	29～33	24～28	17～21	
环丙沙星	淋病奈瑟菌	5	—	—	≥36				
	其他菌		≤15	16～20	≥21	30～40	22～30	25～33	
其他类									
氯霉素		30	≤12	13～17	≥18	21～27	19～26		
	非肺炎链球菌		≤17	18～20	≥21				
利福平		5	≤16	17～19	≥20	8～10	26～34		
	脑膜炎奈瑟菌		≤24	—	≥25				
磺胺类		250或300	≤12	13～16	≥17	18～26	24～34	—	
甲基苄氨嘧啶/磺胺甲基异恶唑		1.25/23.75	≤10	11～15	≥16				
	肺炎链球菌		≤15	16～18	≥19				

注：1. 肺炎链球菌对苄星青霉素的敏感试验，用1μg/片的苯唑西林代替青霉素纸片报告肺炎链球菌对青霉素的敏感性。测脑脊液、血、无菌区体液中分离的肺炎链球菌时，如抑菌环直径≤19mm，应测试青霉素、头孢噻肟、头孢三嗪的MIC值。当青霉素的MIC为中介或耐药时，也应报告头孢噻肟、头孢三嗪的MIC值

2. 从正常无菌部位（如脑脊液、血、骨髓等）分离的草绿色链球菌，应用MIC法测试其对青霉素的敏感性

3. 检测耐苯唑西林的凝固酶阴性葡萄球菌（MRSCON）的方法是琼脂筛选法。培养其为MueUer—Hinmn琼脂+40g/LNaCl+6mg/L苯唑西林。30～35℃温育48h读结果

4. MRS（耐苯唑西林葡萄球菌）也应同时报耐其他青霉素类、头孢菌素类、配能类（carbacephems，carbapenems）和其他加有β—内酰胺酶抑制剂的抗生素。尽管MRS株在体外敏感试验中，对它们呈“敏感”结果，但这些菌引起的感染对β—内酰胺类抗生素疗效不佳。大多数MBS株通常也耐氨基糖甙类、大环内酯类、四环素类、克林霉素类

部分肿瘤标记物及正常值结果报告

序号	检验项目	英文缩写	正常参考值	计量单位
1	甲胎蛋白	AFP	<25 μg/L	ng/ml
2	癌胚抗原	CEA	<5 μg/L	ng/ml
3	β—癌胚抗原	β—CEA	49.5～115	ng/ml
4	癌抗原15—3	CA15—3	<28 μg/L	ng/ml
5	糖类抗原19—9	CA19—9	<37 μg/L	ng/ml
6	糖类抗原72	CA72	<6 μg/L	ng/ml
7	癌抗原125	CA125	<35 μg/L	ng/ml
8	鳞癌相关抗原	SCC	<1.5 μg/L	ng/ml
9	糖类抗原50	CA50	<40 μg/L	ng/ml
10	细胞角质素片断19	CYFRA21—1	<3.3 μg/L	ng/ml
11	组织多肽特异抗原	TPS	<55 μg/L	U/L
12	组织多肽抗原	TPA	<120	U/L
13	前列腺特异抗原	PSA	<4.0	μg/L
14	前列腺酸性磷酸酶	PAP	<2.7	μg/L
15	肿瘤基因P53 抗体	P53—Ab	阴性	
16	神经原特异性烯醇化酶	NSE	<18	μg/L
17	黄体生成激素	LH	男：2～12 F2～15 M22～105 L0.6～19 PM 16～64	IU/L
18	促卵泡成熟激素	FSH	男：1～12 F 3～20 M9～26 L 1～12 PM 18～153	IU/L
19	雌二醇	E_2	男：0～70 F9～221 M 83～690 L26～408	pg/ml

续表

序号	检验项目	英文缩写	正常参考值	计量单位
			PMO～86	
20	绒毛膜促性腺激素	HCG	<5	IU/L
21	肿瘤组蛋白表达		7～10	%
22	胰癌相关抗原	DC－PAN－2	600U/ml	
23	胰胚抗原	PCA	742±25μl/ml	
24	地高辛免疫活性物质		血浆<0.3pmol/L	

第三章　常用检验标准采集及正常参考值

常用化验标准采集及正常参考值

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
血细胞18 项		10μl7.5％EDTAK_2 加血0.5		最好用静脉血
红细胞计数	RBC	静脉血或指血	男：（4.5～5.5）×10^{12}/L（400～550 万/mm^3）女：（3.5～5.5）×10^{12}/L（350～500 万/mm^3）	
血红蛋白	Hb	静脉血或指血	男：130～170g/L（13.0～17.0g/dl）女：110～150g/L（11.0～15.0g/dl）	
白细胞计数	WBC	静脉血或指血	4～10×10^9/L（4000～10000/mm^3）	
白细胞分类	DC	静脉血或指血	杆状：0.01～0.05 分叶：0.50～0.70 嗜酸：0.01～0.05 嗜碱：0.00～0.01 淋巴：0.20～0.40 单核：0.03～0.08	

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
血小板计数	PLT	静脉血或指血	（100～300）×10^9/L	
网织红细胞计数	RCT	静脉血或指血	0.005～0.015 （0.5%～1.5%）	
嗜酸性粒细胞计数		静脉血或指血	（50～300）×10^9/L （50～300/mm^3）	
出血时间	BT		1～3 min	
凝血时间	CT		2～7 min	
脑脊液常规检查	CSF		蛋白：阴性 红细胞：阴性 白细胞：（0～8）×10^6/L	
Rouse 试验		新鲜尿液10	阴性	
尿糖检查		新鲜尿液	阴性	
快速血糖		指血	3.4～6.1 mmol/L	空腹
早早孕		尿液	阴性	
血沉	ESR	0.4 3.8%枸橼酸钠加血1.6	男<15mm/h 女<20mm/h	抗凝剂及血量必须准确，混匀，无凝块
凝血酶原时间	PT	0.1 3.8%枸橼酸钠加血1.9	PT（凝血酶原时间）：11～14 s 活动度：80%～120%PTR（凝血酶原时间比值）：1±0.15 INR：0.8～1.5	抗凝剂及血量必须准确，混匀，无凝块
红细胞比积	HCT	肝素抗凝血2.0	男：40%～50% 女：35%～46%	
红斑狼疮细胞	LK	不抗凝血3.0	未找到红斑狼疮细胞	
尿沉渣3小时计数		晨5∶30～8∶30尿	BBC<100×10^2/h WBC<200×10^2/h	替代爱迪氏计数，要求收集尿量准确

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
胸腹水常规		抗凝标本100		5ml5%枸橼酸钠抗凝，及时送检
精液检查		新鲜精液	精子数： （100～150）×10^9/L （1～1.5亿/ml） 活动率：>70% 形态异常：<0.2% WBC <5个/HP	
尿液十项检查及镜检		新鲜尿液10		新鲜晨尿
便潜血		大便	阴性	
疟原虫检查		指血	未查出疟原虫	
一氧化碳血红蛋白定性		指血	阴性	
本周氏蛋白定性	B—J	晨尿	阴性	
酮体定性检查		尿	阴性	
血钾	K	不抗凝血1.0	3.6～5.5mmol/L （3.6～5.5mEq/L）	不得溶血，勿在输钾时抽血
血钠	Na	不抗凝血1.0	135～145mmol/L （135～145mEq/L）	
血氯	Cl	不抗凝血1.0	96～110 mmol/L （96～110mEq/L）	
血钙	Ca	不抗凝血1.0	2.1～2.6 mmol/L （8.4～10.4mg/dl）	
血镁	Mg	不抗凝血1.0	0.68～1.20 mmol/L （1.7～3.0mg/dl）	空腹取血，避免溶血，不要在输血后立即抽血

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
血清无机磷	IP	不抗凝血1.0	成人： 0.87～1.61mmol/L （2.7～5.0mg/dl） 儿童： 1.45～1.78mmol/L （4.5～5.5mg/dl）	
血清铁	Fe	不抗凝血2.0	成人男子： 8.95～28.6μmol/L （50～160μg/dl） 成人女子： 7.16～26.8μmol/L （40～150μg/dl）	不得溶血，试管要洁净
血清总铁结合力	TIBC	不抗凝血2.0	44.8～71.2μmol/L （255～425μg/dl）	不得溶血，试管要洁净
尿钾	U－K	24h尿10	26～102 mmol/24 h （1～4g/24h） （与饮食关系很大）	洁净容器内加甲苯5ml，准确留24 h尿，混匀送检
尿钠	U－Na	24h尿10	130～260 mmol/24 h （3～6g/24h） （与饮食关系很大）	洁净容器内加甲苯5ml，准确留24 h尿，混匀送检
尿氯	U－Cl	24h尿10	170～252 mmol/24 h （6～9g/24h）	洁净容器内加甲苯5ml，准确留24 h尿，混匀送检
尿钙	U－Ca	24h尿10	<6.2 mmol/24 h （<250mg/24h） （与饮食关系很大）	洁净容器内加甲苯5ml，准确留24 h尿，混匀送检
碳酸氢盐	HCO_3^-	不抗凝血1.5	20.2～31.0mmol/L	

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
总蛋白	TP	不抗凝血 1.0	60～80g/L（6.0～8.0g/dl）	
白蛋白	ALB	不抗凝血 1.0	35～50g/L（3.5～5.0g/dl）	
球蛋白	CLB	不抗凝血 1.0	20～30g/L（2.0～3.0g/dl）	
蛋白电泳		不抗凝血 1.0	A　0.54～0.69 α1　0.01～0.03 α2　0.05～0.09 β　0.07～0.125 γ　0.12～0.25	
总胆红质	TBil	不抗疑血 1.0	2.0～20.0/μmol/L（0.12～1.17mg/dl）	不得溶血，及时送检
直接胆红质	DBil	不抗凝血 1.0	0.0～6.0/μmol/L（0～0.35mg/dl）	不得溶血，及时送检
尿素氮	BUN	不抗凝血 1.0	2.5～7.1 mmol/L（7～20mg/dl）	
血肌酐	Cae	不抗凝血 1.0	35～133 μmol/L（0.4～1.5mg/dl）	
尿肌酐	U—Cre	24h 尿10	男： 7～18 mmol/24 h（0.8～2.0g/24 h） 女： 5.3～16 mmol/24 h（0.6～1.8g/24h）	洁净容器内加甲苯5ml，准确留24 h 尿，混匀送检
血尿酸	UA	不抗凝血 1.0	男： 202～417/μmol/L（3.4～7.0mg/dl） 女： 143～339 μmol/L（2.4～5.7mg/dl）	

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
血葡萄糖	Glu	不抗凝血1.0	3.4～6.1 mmol/L（60～110mg/dl）	空腹、不得在输糖时抽血，血样品及时送检
尿糖定量	U－Glu	24h 尿10		尿糖定性阳性时才测定
葡萄糖耐量	OGIT	不抗凝血1.0 同时留尿10	1 小时达最高值，<8.96 mmol/L（160mg/dl），两小时内恢复正常，尿糖阴性	抽血前与检验科联系
总胆固醇	TC	不抗凝血1.0	2.6～6.5 mmol/L（100～250mg/dl）	空腹12h 以上
高密度脂蛋白胆固醇	HDLC	不抗凝血2.0	1.16～1.55 mmol/L（44.6～59.6mg/dl）	空腹12h 以上
低密度脂蛋白胆固醇	LDL－C	不抗凝血2.0	<3.38 mmol/L（<130mg/dl）	空腹12h 以上
甘油三脂	TC	不抗凝血1.0	0.22～1.65 mmol/L（20～150mg/dl）	空腹12h 以上
载脂蛋白A1	ApoA1	不抗凝血1.0	1.00～1.60g/L	空腹12h 以上
载脂蛋白B100	Apo－B100	不抗凝血1.0	0.60～1.10g/L	空腹12h 以上
丙氨酸氨基转移酶	ALT（GPT）	不抗凝血1.0	<40 U/L	不得溶血
天门冬氨酸氨基转移酶	AST（GOT）	不抗凝血1.0	<40 U/L	不得溶血，急诊限心梗
乳酸脱氢酶	LDH	不抗凝血1.0	96～214 U/L	急诊限心梗
乳酸脱氢酶同工酶－1	LD－1	不抗凝血1.0	10～50 U/L	非急诊项目，晚上急诊第二天做

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
肌酸激酶同工酶-1（MB）	CK-MB	不抗凝血1.0	<25 U/L	非急诊项目，晚上急诊第二天做
γ-谷氨酰转肽酶	CCT（γ-GT）	不抗凝血1.0	7～50 U/L	
碱性磷酸酶	ALP（AKP）	不抗凝血1.0	39～130 U/L	
α-羟丁酸脱氢酶	α-HBDH	不抗凝血1.0	95～250 U/L	
肌酸激酶	CK	不抗凝血1.0	24～195 U/L	
胆碱酯酶	CHE	不抗凝血1.0	3 500～10 500 U/L	18～41岁孕妇或口服避孕药妇女3 000～7 400 U/L
血淀粉酶	Amy-S	不抗凝血1.5	<90 U/L	
尿淀粉酶	Amy-U	新鲜尿10	<490 U/L	
尿N乙酰葡萄糖苷酸	NAC	新鲜尿10	<20 U/L	
总酸性磷酸酶	TACP	不抗凝血1.0	<6.5 U/L	
前列腺酸性磷酸酶	PACP	不抗凝血1.0	<2.6 U/L	
脑脊液生化		脑脊液1.0	糖： 2.8～4.5 mmol/L （50～80mg/dl） 蛋白： 0.15～0.40g/L 氯： 120～130 mmol/L	

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
类风湿因子	nP	不抗凝血1.5	阴性<1∶20	
抗链球菌溶血素O	ASO	不抗凝血1.5	<1∶500	
C－反应蛋白	CRP	不抗凝血1.5	0.068～8.2mg/L	
免疫球蛋白	IgA	不抗凝血3.0	2.35±0.34g/L	
免疫球蛋白	IgG		12.87±1.35g/L	
免疫球蛋白	IgM		1.08±0.24g/L	
乙肝表面抗原	HBsAg	不抗凝血1.0	阴性S/N<2.1	
乙肝两对半	HBsAg 抗－HBs 抗－HBc 抗－HBe HBeAg	不抗凝血3.0	阴性S/N<2.1 阴性或阳性 阴性 阴性 阴性	
肥达氏反应		不抗凝血2.0	O<1∶40 H，A，B≤1∶80	
外斐氏反应		不抗凝血2.0	<1∶40	
冷凝集试验		不抗凝血2.0	<1∶32	
丙肝抗体	抗－HCV	不抗凝血2.0	阴性S/N<2.1	
嗜异性凝集试验		不抗凝血2.0	<1∶28	
血液，骨髓，脑脊液，胸腹水细胞培养		相应标本5～10	无菌生长	无菌操作取标本
尿细菌培养		导尿或中段尿10	无菌生长	无菌操作取标本

续表

项目	简写	标本（ml）	正常参考值	注意事项
咽分泌物细菌培养		咽拭子涂试	无致病菌生长	无菌操作取标本
痰细菌培养		晨痰	无致病菌生长	容器要洁净
大便细菌培养		大便	无肠道致病菌生长	容器要洁净
涂片找淋球菌		分泌物	未找到淋球菌	容器要洁净
快速血浆反应素梅毒试验	RPR	不抗凝血2.0	阴性	
涂片找抗酸杆菌		痰，　尿，胸腹水	阴性	
PCR 检测真菌		0.1ml 0.5 mol/L EDTA Na_2 加血1.5	阴性	最好于发热初期，用抗生素之前取血

第四章　卫生部检验快递项目及参考值

(北京东单大华路1 号北京医院内卫生部临检中心)

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
治疗药物监测TheraPeutic Drug Monitoring						
苯妥英	PEVY	血清 (冻) 0.3ml	抗癫痫	10～20mg/L	FPIA	下次服药前取血
苯巴比妥	PENO			15～40mg/L		
卡马西平	CBZ			4～12mg/L		
丙戊酸	VALP			50～100mg/L		
茶碱	THEO	血清 (冻) 0.3 ml	抗哮喘	10～20mg/L	FPIA	下次服药前取血
庆大毒素	GENT	血清 (冻) 0.3ml	氨基甙类抗生素	峰：5～10mg/L 谷：0.5～2mg/L	FPIA	峰：静滴后30分肌注后印分 谷：下次给药前
妥布霉素	TOBR					
利多卡因及代谢物	LIDO & MEGX	血清1ml	肝代谢功能评价		HPLC	
地高辛	DIG	血清 (冻) 0.4 ml	强心药	0.8～2.2μg/L	FPIA	下次给药前取血
胺碘酮	AD	血清 (冻) 0.6 ml	抗心率失常	0.5～1.5μg/L	HPLC	
环孢霉素	CSA	EDTA 抗凝全血1ml	免疫抑制剂	400～600，μg/L	FPIA	下次给药前取血 4～8℃保存7 天
成瘾药检测Abused Drugs Assay						
苯丙胺类		尿1ml (冻)	中枢兴奋剂	≤1 000ng/ml	FPIA	半定量
巴比妥类				≤200 ng/ml		
苯二氮卓类				≤200 ng/ml		
大　麻				阴性		
可卡因代谢物			中枢兴奋剂	≤300 ng/ml		
美沙酮			镇痛药	≤250 ng/ml		
鸦　片				≤300 ng/ml		
丙氧酚				≤300 ng/ml		

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
变应原检测 Allergens Detection						
吸入性过敏原过筛	Phadia	血清500 μl	过敏性疾病	阴性	UniCAP	混合抗原，含95%常见抗原
食物性过敏原过筛	fx5e					混合抗原，含常见抗原6 种
单价变应原	sIgE	血清500 μl	包括吸入性过敏原和食入性过敏原约100 种	0～1 级	UniCAP	请向“中心”咨询具体项目
嗜酸细胞阳离子蛋白	ECP	血清500 μl	哮喘炎症	<15 μg/L		SST 取血，60 分钟内分离血清
肿瘤标志物 Tumor Markers						
癌胚抗原	CEA	血清0.4 ml	结肠癌、胃癌、肺癌、胆管癌等	≤5 ng/ml	EIA	2～8 ℃保存2 天；长期保存需冰冻（-24 ℃）
甲胎蛋白	AFP		原发性肝癌	≤25 ng/ml		
前列腺特异抗原	PSA	血清0.4ml	前列腺痛	≤10 ng/ml	EIA	2 －8 ℃保存2 天；长期保存需冰冻（－24 ℃）
游离前列腺特异抗原	F －PSA		前列腺癌		TFIA	
肿瘤抗原15 －3	CA15 －3	血清0.4ml	乳腺癌	≤28 ng/ml	EIA	
糖类抗原19 －9	CA19 －9	血清0.4ml	胰腺癌，消化道肿瘤	≤37 ng/ml		
糖类抗原72 －4	CA72 －4	血清0.4ml	胃癌及消化道肿瘤	≤6.7ng/ml	ELISA	
糖类抗原50	CA50	血清0.4ml	恶性肿瘤	≤50 U/ml	RIA	
肿瘤抗原125	CA125		卵巢上皮癌、子宫颈癌	≤35 ng/ml	EIA	2～8 ℃保存24 小时
细胞角度素片段19	CYFRA21 －1		非小细胞肺癌	≤3.3 ng/ml	ELISA	
鳞癌相关抗原	SCC		食道癌、鳞状上皮癌	≤2.6 ng/ml	EIA	
神经原特异烯醇化酶	NSE		小细胞肺癌	≤18 ng/ml	ELISA	

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
5－羟吲哚乙酸	5－HIAA	24 小时尿 100ml	类　癌	≤10 mg/24h	柱荧光	加入12 ml25％盐酸，34 小时尿，避光保存
α－岩藻糖苷酶	AFU	血尿 0.2 ml	肝 癌		比色	
甲状腺功能Thyroid Function						
游离三碘甲状腺原氨酸	F－T_3	血清（冻） 0.3ml	甲亢及低T3 综合征	390～742 pg/dl	RIA	
游离甲状腺素	F－T_4		甲抗、甲减	8～2.4 ng/dl		
三碘甲状腺原氨酸	T_3	血清（冻） 0.3ml	甲　亢	90～190 ng/dl	RIA	
甲状腺素	T_4		甲抗、甲减	4.5～12.5 μg/dl		
反三碘甲状腺原氨酸	rT_3	血清（冻） 0.3 ml	甲亢、甲减低T_3综合征	10～40 ng/dl		
甲状腺素结合球蛋白	TBG		甲亢、甲减	15～34 μg/ml	RIA	
抗甲状腺抗体	ATA	血清（冻） 0.4 ml		阴性	荧光免疫	
抗甲状腺微粒体抗体	ATM		甲抗、慢性甲状腺炎	阴性	HIA	
抗甲状腺受体抗体	ATR					
抗甲状腺球蛋白抗体	ATG		甲状腺炎			
甲状旁腺功能Parathyroid Function						
甲状旁腺素	PTH	血清（冻） 0.4 ml	甲状旁腺功能	8～24 pg/ml	RIA	
降钙素	CT		恶性肿瘤	男：0～14pg/ml 女：0～28pg/ml		
性腺功能Sexual Gland Punction						

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
雌二醇	E_2	血清（冻）0.4 ml	经期、妊娠	男：0～65pg/ml 女：周期改变	RIA	2～8 ℃保存48小时
雌三醇	E_3		胎盘功能及胎儿发育	男：≤5 pg/ml 女：周期改变		
孕酮	P		异常妊娠、经期	男：≤1.0 ng/ml 女：周期改变		
睾酮	T		男性功能、女性男性化、肿瘤	男：260～1 250 女：2～94 (ng/ml)		
妇科六项组合		血清（冻）0.6 ml			RIA	FSH、LH、E_2、PRL、P、T
胎血功能Placental Function						
人绒毛膜促性腺激素	HCG	血清（冻）0.4ml	妊娠、绒癌葡萄胎	≤10 mIU/ml	EIA	
绒毛促性脖激素β亚基	β—HCG		早孕、宫外孕、绒癌		RIA	
垂体功能Pituitary Gland Function						
泌乳素	PRL	血清（冻）0.5ml	垂体肿瘤、妊娠、不孕	男：0～20ng/ml 女：2～25ng/ml	RIA	2～8 ℃ 保存48小时
黄体生成素	LH		经期、性腺功能异常、排卵	男：5～28 女：周期性改变 (mIU/ml)		
生长激素	GH	血清（冻）0.5ml	烧伤、巨人症、肢端肥大症、侏儒症	男：≤2 女：≤10 (ng/ml)		
卵泡刺激素	FSH	血清（冻）0.5ml	经期、性腺功能异常、排卵	男3～30 女：周期性改变 (mIU/m1)		
促甲状腺激素	TSH	血清（冻）0.5ml	甲减、甲亢	0.3～4.5 (uIU/ml)		
促甲状腺激素释放激素	TRH		甲减、下丘脑功能	5～60 ph/ml		
保肾上腺皮质激素	ACTH	血清（冻）0.5ml	Addison 氏病、肾上腺皮质肿瘤	5～50 pg/ml		EDTA 抗凝，使用塑料管
抗利尿激素	ADH		肿瘤、中枢神经系统病	1～1.5 pg/ml		EDTA (100 μg/ml) 抗凝

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
糖尿病及胰腺功能 Diabitis and Pancreatic Function						
糖化血红蛋白 Alc	HbALc	抗凝全血 0.5 ml	长期血糖监控	4.5～5.7 Ⅰ	免疫比浊	
糖化血清蛋白	GSP	血清 0.4ml	短期血糖监控	1.6～2.6 (mmol/L) NBT		
胰岛素	INS	血清 0.5ml	糖尿病	0～30 μU/ml	RIA	
C－肽 (空腹)		见说明	糖尿病分型	4.0 ng/ml		
胰高血糖素		抗凝血 2ml	糖尿病	30～210pg/ml		空腹，EDTA 抗凝
胰岛素及C肽释放		血清 0.5ml	糖尿病			空腹、1、2、3 小时取血
抗胰岛素抗体	A－INS	血清0.4ml		阴性	RIA	
抗胰岛细胞抗体					FIA	
传染性疾病 Contagious Diseases						
甲型肝炎抗体	HAV－IgG	血清0.5ml	甲肝病毒感染	阴 性	ELISA	
	HAV－IgG					
乙肝表面抗原	HBsAg	血清0.5ml	乙肝病毒感染	阴 性	EIA	
乙肝表面抗体	HBsAb					
乙肝c 抗原	HBeAg					
乙肝e 抗体	HBeAb					
乙肝核心抗体	HBcAb					
丙肝抗体	HCV－Ab	血清 0.5 ml	丙肝病毒感染	阴性	PCR	
H1V ⅠIgG	HIV Ⅰ			阴 性		
HIV ⅠIgM	HIV Ⅱ					

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
TORCH						
弓形虫	IgG	血清0.3ml	弓形虫	阴 性	ELISA	
	IgM					
风疹病毒IgM			病毒感染			
巨细胞病毒IgM						
单纯疱疹病毒IgM						
肾上腺皮质功能Adrenal Cortex Function						
17－酮类固醇	17－KS	24小时尿20ml	肾上腺肿瘤或皮质功能异常	男：8～15 女：6～12 (mg/24h)	化学法	在集尿瓶中加入浓盐酸5ml，常法收集尿液，记录总体积
17－羟类固醇	17－CS		肾上腺皮质功能异常，库欣综合征	男：4～11 女：3～9 (mg/24h)	化学法	
皮质醇		血浆、血清0.4 ml	肾上腺皮质功能异常	5～25 (μg/dl)	RIA	
免疫球蛋白Immunoglobulin						
免疫球蛋白A	IgA	血清0.4ml	体液免疫功能	76～390 mg/dl	RIA	49～269 IU/ml
免疫球蛋白C	IgG			600～1600 mg/dJ		90～209 lU/ml
免疫球蛋白E	IgE	血清0.4 ml	变态反应	≤113 IU/L	UniCap	
免疫球蛋白M	IgM	血清0.4ml	体液免疫功能	40～345 mg/dl	RIA	74～329 IU/ml
脂类代谢Lipids						
载脂蛋白A1	Apo－A1		Tangier病，心血管病	≤100 mg/dl		4℃保存3天
载脂蛋白B	Apo－B					
载脂蛋白(a)	Lp(a)		心脑血管病			

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
甘油三脂	TG	血清 0.4ml	糖尿病，肾病综合征，甲亢	50～150 mg/dl	酶法	0.56～1.70 mmol/L
总脂固醇	CHOL		动脉硬化，肾病综合征，贫血，甲亢	120～220 mg/dl		3.1～5.7 mmol/L
高密度胆固醇	HDL－C		动脉粥样硬化，冠心病	男：30～60 mg/dl 女：30～60 mg/dl		
低密度胆固醇	LDL－C			80～130 mg/dl		
血脂六项组合						ApoAl，B，TG，CHOL，HDL－C，LDL－C
补体测定Compliments						
补体c3	c3	血清 0.4ml	炎症，感染，肾病综合征	85～193 mg/dl		
补体c4	c4			12～36 mg/dl		
酶及同功酶 Enzymes and Isoenzymes						
肌酸激酶	CK	血清 0.4ml	心梗、心肌损伤	25～200 U/L	速率法	
肌酸激酶MB	CK－MB		心梗	≤5 (%) ≤25 U/L	电泳，免疫抑制	
乳酸脱氢酶		血清 0.4ml	心肌损伤、肝脏损伤、恶性肿瘤	94～250 U/L (℃)	速率法	取血后尽快分离血清，避免溶血，室温保存，尽快送检
LDH 乳酸脱氢酶同工酶	LDH－1		心肌损伤		电泳	
耐酒石酸酸性磷酸酶	TRACP	血清 0.4 ml	前列腺疾病、溶血，骨质疏松	U/L (℃)	终点法	凝血后立即分离血清，室温保存1 天，－70 ℃保存1 周
碱性磷酸酶	ALP	血清0.4ml	骨质疏松	U/L (℃)	速率法	
腺苷脱氨酶	ADA	血清或胸、腹水0.4ml	结核病	7.7～19.3 U/L	速率法	

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
α－淀粉酶	AMY	血清、尿 0.4ml	胰腺炎，腮腺炎		速率法	
无机离子 Metal						
钾	K	血清、尿 0.4ml	3.5～5.3 mmol/L		离子选择电极	可用低浓度肝素抗凝血，采样后1小时内测定
钠	Na		136～145 mmol/L			
氯	Cl					
钙	Ca	血清或尿 0.3ml	骨肿瘤、骨疏松、VD 缺乏、甲亢	8.5～11 ng/dl	AAS	
铜	Cu		肿瘤、肝硬化、感染性治疗	男：70～140 女：80～155 (μg/dl)		
锌	Zn		肝炎、肿瘤溃疡	50～140 μg/dl		
镁	Mg		肾功能不全、甲亢、甲减、糖尿病	1.6～2.4 2.mg/dl		
心血管系统 Cardiovascular System						
肌钙蛋白T	TnT		急性心梗	男：≤0.3 μg/ml 女：(0.2≤μg/ml)	EIA	
肌钙蛋白I	TnI					
血管紧张素 I	ATI	抗凝血 2ml	原发性高血压、肾脏疾病、肿瘤	11～88 pg/ml	RIA	特殊管
血管紧张素 II	AT II		高盐饮食、甲亢	10～60 pg/ml		
肾素活性			高血压、肾衰、心衰	1.0～2.5 ng/ml/h		
其它 Others						
总胆汁酸	TBA	血清0.4ml	肝功检测	≤3.9mg/ml	酶法	
铜兰蛋白	CP		肿瘤、炎症	1560mg/dl	速率散射	
β－微球蛋白	β－MG	血清、尿	肿瘤、自身免疫病	0.1～0.26 mg/dl	RIA	
转铁蛋白	TRF	血清0.4ml	妊娠、炎症、恶性肿瘤	252～429mg/ml	速率散射	

续表

项目名称	简写	样本要求	临床意义	参考值	测定方法	备注
流式细胞仪检测项目Flow Cellmeter						
	CD3	肝素抗凝血3ml	T 细胞	68 %～82 %		
	CD4		辅助/诱导T 细胞，单核细胞	35 %～55 %		
	CD8		细胞毒性/抑制性T 细胞，NK 细胞	20 %～36 %		
	CD16		NK 细胞	8 %～22 %		
	CD19		B 细胞	5 %～15 %		
	CD7		T 细胞和NK 细胞	75 % T－AIL ＞95 %		
	CD10		普通急性淋巴细胞性抗原，粒细胞不成熟的B 细胞	普遍 ALL ＞90 %		
	CD33		单核细胞，粒细胞，AML	单核细胞，粒细胞》90 %		
	CD44		BM 祖细胞，急性白血病	＜1 %		
	CD45RO		胸腺细胞，CD_4^+记忆性T 细胞亚群和分化T 细胞			
血液学检测 Hematology						
T 细胞亚群		全血3ml	细胞免疫功能			ElYrA 或肝素抗凝
血液粘稠度		全血2ml	血液流变学中风预测			EIYFA 或肝素抗凝
血小板粘附率		全血2ml				枸橼酸钠抗凝
血小板聚集率		全血2ml				枸橼酸钠抗凝
病理学检查Pathological Examination						
组织切片制做		组织标本				包埋、切片、常规及特殊染色
免疫组织化学染色及原位杂交						请向中心咨询具体项目
临床微生物检查Microbiological Testing						
细菌常规鉴定						请向中心咨询具体项目
抗生素敏感试验						

肿瘤标志物的组合检查

肿瘤部位	检查项目		肿瘤部位	检查项目	
	组合1	组合2		组合1	组合2
气管癌	SCC CEA	SCC	胃　癌	CA72 —4 CEA CAl9 —9	CA72 —4 CEA
结肠癌	CA72 —4 CA19 —9 CEA	CA72 —4	肝 癌		AFP
胆管痛	CA19 —9 CEA		胰腺癌		CA19 —9
胆道肿瘤	CA19 —9 CEA		乳腺癌	CA15 —3 CEA	
肿　痛	CYFBA21 —1 SCC		膀胱肿瘤		SCC
卵巢肿瘤	CAl25 CA72 —4		前列腺癌	psA PAp	

血清雌激素（孕期）参考值范围

(pg/ml)

怀孕周数	雌 酮	雌二醇	雌三醇
10 ～15	1000 ～8100	1800 ～9500	≤1200
16 ～20	3000 —13000	4400 ～17000	400 ～2800
21 ～25	5200 ～35000	6200 ～33000	1100 ～5700
26 ～30	8500 ～39000	11000 ～37000	2900 ～11000
31 ～35	9500 ～46000	13000 ～43000	3700 ～18000
36 ～42	9700 ～51000	1000 ～61000	5600 ～29000

血清雌激素（非孕期）参考值范目

（pg/ml）

性别	月经周期	雌 酮	雌二醇	雌三醇
女	卵泡期（早）	26～120	35～150	≤16
	卵泡期（晚）	39～130	37～370	≤18
	排卵期	68～180	70～580	≤19
	黄体期	51～140	30～370	≤16
男		23～83	≤65	≤5

第五章　临床常见致病菌感染的检验

第一节　球菌检验与感染

1　葡萄球菌属

金黄色葡萄球菌：引起局部化脓菌感染，疖、痈、皮下脓肿；外科伤口及伤创面的感染；可引起肺炎、伪膜肠炎、肾盂肾炎、心包炎等多系统的化脓性感染；尚可引起败血症等全身感染。

表皮葡萄球菌：可引起化脓性感染，致败血症、菌血症、感染性心内膜炎、静脉导管感染和尿路感染。

腐生葡萄球菌：主要引起青年人的泌尿道感染。

微球菌：机体抵抗力下降时，偶可引起的疾病，如软组织脓肿、关节炎、脑膜炎、肺炎及败血症。

2　链球菌属

甲型溶血性链球菌（草绿色链球菌）：引起亚急性细菌性心内膜炎、泌尿道感染等，以及食物中毒。

乙型溶血链球菌：可引起淋巴结炎、扁桃腺炎、产褥热、败血症及猩红热，尚可引起风湿热、急性肾小球肾炎。

B 型链球菌（无乳链球菌）：可造成临产妇女的感染、新生儿败血症和脑膜炎，亦可引发尿路感染。

肺炎链球菌：引起大叶肺炎、支气管炎、心内膜炎、胸膜炎、中耳炎、脑膜炎及关节炎等。

3　肠球菌属

粪肠球菌：可引起尿道炎、膀胱炎、肾盂炎、心内膜炎、胆囊炎、脑膜炎，同时也是医院感染的常见病原菌之一。

4　奈瑟菌属

脑膜炎奈瑟菌：主要引起流行性脑脊髓膜炎，其次可引起上呼吸道感染、菌血症和局部感染。

淋病奈瑟菌：引起前列腺炎、附睾炎、尿道周围脓肿、子宫颈和阴道炎，造成尿道感染、淋菌性咽炎及直肠炎。

5　莫拉菌属

卡他莫拉菌：引起中耳炎、鼻窦炎、支气管炎、结膜炎、肺炎、菌血症和泌尿生殖道感染或脑膜炎。

第二节　杆菌检验与感染

1　棒状杆菌属

白喉棒状杆菌：是造成白喉的病原菌，可引起毒血症，侵害眼结膜、外耳道、阴道和皮肤创口处的感染，并可在病变组织上形成假膜。

溃疡棒状杆菌：引起渗出性咽炎和白喉样病变，以及其他的组织感染。

2　加特纳菌属

阴道加特纳菌：引起非特异性阴道炎等。

3　芽孢杆菌属

炭疽芽孢杆菌：引起皮肤、肠、肺或纵隔炭疽，这3 型炭疽同时也可以造成败血症及炭疽性脑膜炎。

蜡样芽孢杆菌：可引起人的食物中毒。

4　李斯特菌属

产单核李斯特菌属性，常与EB 病毒所致的传染性单核细胞增多症一起感染，在成人主要引起脑膜炎，在新生儿主要引起脑膜炎，也可引起化脓性脑膜炎。

5　凡毒丝菌属

红斑毒丝菌可引起关节炎，也可以引起急性败血和心内膜炎等。

6　分支杆菌属

结核分支杆菌：引起肺内、外结核病。

麻风分支杆菌：可引起瘤型或结核样型麻风病。

7　埃希菌属

大肠埃希菌：多于机体抵抗力下降和发生定位转移时引起感染，主要见于尿道炎、膀胱炎、肾盂’肾炎。有时也可见于腹膜炎、胆囊炎、阑尾炎、术后感染等，偶见于引起新生儿脑膜炎和败血症。

产肠毒型大肠埃希菌：引起婴幼儿和 (或) 旅游时的霍乱样严重腹泻或败血症。

肠致病性大肠埃希菌：具有高度传染性，常引起流行性婴幼儿腹泻等。

肠出血大肠杆菌：可导致严重的肠出血或伴发溶血性尿毒综合征。

肠侵人性大肠杆菌：可引起细菌性痢疾样腹泻或食物中毒。

肠粘附性大肠杆菌：可引起小儿顽固性腹泻。

8　志贺菌属

痢疾志贺氏菌：能引起肠道传染病，如痢疾、急性胃肠炎，有时也可见于慢性病例。已有报道国内以福氏志贺菌最为常见，其次为宋内氏志贺菌和鲍氏志贺菌。

9　沙门氏菌

能引起伤寒、副伤寒或急性胃肠炎。

丙型副伤寒菌、猪霍乱沙门氏菌，可引起败血症，造成组织器官局部感染，导致胆囊炎、脑膜炎、骨髓炎、心内膜炎等。

10　变形杆菌属

普通变形杆菌：可引起尿路感染，产生菌血症；新生儿经脐带感染可引起菌血症和脑膜炎，以及食物中毒。以膀胱炎、肾盂肾炎、腹膜炎、心内膜炎、呼吸道炎症和伤口感染为常见。

此外，尚有奇异变形杆菌、产碱普罗菲登斯菌、雷普罗菲登斯菌和斯普罗菲斯菌。时常是一些比较重要的条件致病菌。

11　摩根菌属

摩根菌：它是医原性感染的重要病原菌，为继发性侵入感染菌之一。多引起泌尿道、呼吸道、手术和伤口感染，而造成败血症。

12　克雷伯菌属

这主要包括肺炎亚种、臭鼻亚种、鼻硬结亚种和催娩克雷伯菌等，能引起肠炎、肺炎、脑膜炎、败血症、臭鼻症、鼻咽部及喉部慢性肉芽肿、小儿感染与腹泻等。

13　肠杆菌菌

阴沟肠杆菌、产气肠杆菌都是条件致病菌，可引起继发性感染，如在机体抵抗力低下时引起泌尿道、呼吸道感染，也可引起脑膜炎、胆囊炎、创面感染和败血症等。

聚团肠杆菌、坂崎肠杆菌、日勾维肠杆菌，也能引起医院内感染与流行，导致早产儿、新生儿、烧创伤、手术操作与插管的继发感染，如在白血病和使用免疫抑制剂的患者更容易感染。

14　沙雷菌属

粘质和液化沙雷菌：常引起尿路感染、肺脓肿、支气管肺炎、胸膜炎、脑膜炎、心内膜炎、腹膜炎、中耳炎、淋巴结炎、创伤感染和败血症等。

普城沙雷菌：可引起灼伤感染、肺部感染、骨髓炎和败血症。

15　耶尔森菌属

小肠结肠炎耶尔森菌：这是近来发现的最常见肠道感染的病原菌，有以下5 种类型。①胃肠炎型，可致小肠结肠炎，表现有急性腹痛、腹泻和发热等主要症状，以婴幼儿、儿童多见；②末端回肠炎、阑尾，及肠系膜淋巴结炎型：本型有急腹症样发作，以学龄前和成人常见；③结节性红斑型，多见于成人；④败血症型：多在免疫功能低下时发生，如引起骨髓炎、肺炎、脑膜炎、腹膜炎、深部静脉炎、溶血性贫血、DIC 、肝肾功能衰竭和消化道出血等；⑤关节炎与腱鞘炎型：感染后主要表现为无肿胀的关节疼痛，以成年人多见。

鼠疫耶尔森菌：引起患者的烈性传染病鼠疫。

16　柠檬酸杆菌属

它包括费氏、异型、无丙二酸盐柠檬杆菌等，多为条件致病菌，同时也是血库存血与血浆的常见污染菌。当机体抵抗力低下时，可引起尿路感染、胆囊炎、脑膜炎、呼吸道感染、创面感染和败血症，还可引起婴儿和新生儿的暴发性脑膜炎、脓肿以及腹泻等。

17　西地西菌属

戴－西地西菌和拉－西地西菌：均为条件致病菌，可引起呼吸道、胆道、创伤后感

染。

18　弧菌属

有霍乱弧菌、非0 —1 群霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、创伤弧菌，可能分别引起胃肠道感染、霍乱、副霍乱。比如，河弧菌可引起霍乱样腹泻，创伤弧菌可引起伤口感染和败血症。

19　气单胞菌属

此菌属有嗜水、温和气单胞菌，以及邻单胞菌等，常可引起水样腹泻中的霍乱样腹泻，如果机体抵抗力下降时还可引起严重感染，如败血症、脑膜炎、骨髓炎、腹膜炎、胆囊炎、肺炎、支气管炎，以及伤口感染等。

20　奴卜菌属

有星形、巴西奴卜菌，主要通过呼吸道引起原发性、化脓性肺部感染，以及脑脓肿与腹膜炎等，有时可出现类似结核的症状，部分患者可发生足和腿部的分枝菌病。

21　不动杆菌属

此菌属包括醋酸钙、鲍曼、溶血、琼氏、约氏、溶菲等不动杆菌，均是条件致病菌，即一类医院内感染的主要致病菌。可导致脑膜炎、中耳炎、败血症、泌尿生殖系统感染等。

22　假单胞菌属

主要有铜绿、荧光、斯氏、产碱、腐败、类鼻疽、洋葱、嗜芽假单胞菌，是一大类的条件致病菌，可引起心内膜炎、新生儿败血症、肠道、泌尿道、呼吸道、伤口的感染，有时还可污染血制品和导管等。

23　产碱杆菌

此菌属包括粪、芳香、去硝产碱杆菌，可以污染医疗器械而引起医源感染，有时引起化脓性脑膜炎、败血症和呼吸道、泌尿道感染等。

24　莫拉菌属

主要包括腔隙、非液化、奥斯陆、苯丙酮酸、亚特兰大、尿道莫拉菌，其感染与假单胞、产碱杆菌相似。

25　嗜血杆菌属

它包括流感、副流感、杜克、埃及、溶血、副溶血杆菌等，可引起人类化脓性感

染，如急性咽喉炎、气管炎、肺炎、中耳炎、败血症、脑膜炎等，也可以继发于结核、病毒感染之后的感染。

26　弯曲菌属

有大肠、空肠、幽门、海鸥及胎儿弯曲菌等，可以引起肠道感染，造成人类腹泻。此外，也可引起比较严重的感染，如导致心内膜炎、败血症、脑膜炎。幽门弯曲菌还可引起胃炎和十二指肠溃疡等。

27　军团菌属

此菌属早年在美国发现，主要为嗜肺军团菌，而引起肺部的军团菌病。

28 布鲁菌属

主要有猪、羊、牛、马布鲁菌，均使人类普遍易感，可引起波状热。

29　巴斯德菌属

主要有多杀菌、溶血菌、产气菌、侵肺巴斯德菌，此属为动物的致病菌，对人类的感染，多因猫、狗咬伤或抓伤所致，即可以引起肺部感染、脑膜炎、腹膜炎、脊髓炎、产褥热等。

30　其他

木糖氧化无色杆菌与脱鞘金杆菌：可引起菌血症、化脓性脑膜炎、泌尿系统和外伤感染等。

侵蚀艾肯杆菌：这是一种条件致病菌，可引起心内膜炎、脑膜炎、骨髓炎、化脓性关节炎、及手术后软组织的化脓感染。

此外，还有许多的条件致病菌，如脑膜败血性黄色杆菌、紫色杆菌、蜂房哈夫尼亚菌、水拉因菌、抗坏血酸克吕沃尔菌、迟钝爱德华菌等，在不同机体条件下，均可以引起相应的器官和组织感染，如呼吸道、胆道、泌尿道、伤口感染。

第三节　厌氧菌检验与感染

1　韦荣球菌属

它包括小韦荣球菌和碱性韦荣球菌，两者均可产生口腔炎、牙周炎、组织炎、小儿腹泻或败血症等。

2　巨球菌属

埃氏巨球菌：引起肠道腹泻，患者有肠菌丛失调时，还可引起慢性腹泻。

3　消化链球菌属

本菌属包括黑色、厌氧、不解糖、普、大、微小、产生、四联等消化链球菌。可引起口腔炎、牙周炎、角膜炎、中耳炎、结肠炎、泌尿与生殖系统感染等。

4　氨基球菌属

发酵氨基酸球菌：可引起牙周炎、口腔炎，或败血症等。

5　拟杆菌属

此菌属分类繁多，见于脆弱、普通、吉氏、卵型、多型、规则、多酸、内脏、口腔、内生、双向、产黑素、菌胶团、两向、人体、伤肺、腐败等拟杆菌。主要引起口腔炎、牙周炎、腹膜炎、胆囊炎、结肠炎、蜂窝组织炎，呼吸道感染、泌尿与生殖系统感染。

6　梭杆菌属

此菌属种类繁多，主要包括核梭、微生子、坏死、死亡、坏疽、恶臭、普氏、拉氏等梭杆菌，主要引起口腔炎、胃肠炎、腹膜炎、胆囊炎，以及上呼吸道、泌尿生殖系统感染等。

7　丙酸杆菌属

包括痤疮、颗粒、贪婪丙酸杆菌等，主要引起鼻窦炎、皮肤痤疮与炎症等。

8　优杆菌属

此属有产气、不解乳、扭曲、念珠、沙氏等杆菌，可引起腹泻、胃肠炎、口腔炎、

泌尿道感染、败血症等。

9　乳杆菌属

有乳酸、发酵乳杆菌和植物乳杆菌等，可引起阴道炎、宫颈炎、膀胱炎、腹膜炎、胃肠炎和腹泻等。

10　放线菌属

此菌属有衣氏、奈氏、溶齿状、粘性、化脓性放线菌，可引发口腔炎、扁桃腺炎、口腔炎、牙周炎、牙龈炎、牙菌斑、胃肠道和女性生殖道炎。

11　双歧杆菌属

包括双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、短双歧杆菌、齿双歧杆菌和新双歧杆菌等，可引起成人和婴儿的腹泻、阴道炎和人龋齿病等。

第四节　真（霉）菌的检验与感染

1　小孢子菌属

铁锈色小孢子菌：此菌属主要引起头癣、体癣，患者感染时易形成白色鳞屑斑，脱落后传染性很大；其次还可引起肉芽肿、湿疹和癣菌疹等。

石膏样小孢子菌：可引起毛囊炎和脓肿，并可以产生深部损害而成为秃疮，此外还可引起湿疹和癣菌疹等。

头毛状小孢子菌：可以引起白癣、脓癣和体癣。

奥杜盎小孢子菌：可引起头癣和体癣等。

2　毛癣菌属

红毛癣菌：引起体癣、股癣、脓癣，有时也可引起皮肤肉芽肿、须癣和癣菌疹类等。

疣状癣菌：可引起四肢和躯干的水疱性红斑。

石膏样癣菌：可引起足癣、手癣、股癣、体癣、脓癣，以及皮肤肉芽肿损害和癣菌疹类病变。

黄癣菌：可引起头癣、体黄癣、甲黄癣、内脏黄癣和黄癣疹等。

紫色癣菌：可引起黑癣、体癣、甲癣和脓癣等。

断发癣菌：可引起脓癣、黑癣、体癣、甲癣，有时尚可导致癣菌疹和须癣。

3　表皮癣菌属

絮状表皮癣菌：可引起甲癣、手癣、足癣，以及其他部位的体癣等。

4　隐球菌属

新隐球菌：可致深部组织的感染，引起亚急性或慢性脑膜炎、肺炎，也可引起皮肤与皮下组织、肌肉、淋巴结和肠道的感染，而造成炎症与化脓；有时也可侵犯骨与关节；眼部感染时可引起瘀血性乳头，葡萄膜、视网膜和角膜炎症。

5　念珠菌属

白色假丝酵母菌（白色念珠菌）：此菌可引起皮肤、粘膜和内脏假丝酵母菌病。如甲床甲沟炎、尿布疹、肛门周围湿疹、鲤鱼口疮、阴道炎、口角炎，造成肺部感染时而引起支气管炎、食管炎及肝、肾、骨等组织的侵害，此外机体抵抗力低下时也可致使导管或移植术后的感染。

6　孢子菌属

森克孢子丝菌：可引起皮肤、皮下慢性结节性、或溃疡性孢子丝菌病。

7　曲霉菌属

黄曲霉菌：主要在于黄曲霉菌能产生直接感染，引起变态反应和食物中毒，另据报道其毒素还有致癌作用。

第五节　螺旋体检验与感染

1　钩端螺旋体属

问号钩端螺旋体：感染后可引起钩端螺旋体病。

2　疏螺旋体属

回归热螺旋体：此病原体可引起回归热。

奋森螺旋体：可引起奋森咽炎、齿龈炎、溃疡性口腔炎、口腔坏疽、肺脓肿等。

伯包氏螺旋体：能引起莱姆病，后期可引起播散性感染，而并发关节炎、骨骼与肌肉的游走性疼痛，有时还可引起脑膜炎、脑与周围神经病。

3　密螺旋体属

牙司病螺旋体：感染后可引起雅司病。

梅毒螺旋体温：可引起慢性传染性梅毒病，晚期可导致动脉瘤、脊髓痨或麻痹性痴呆等；患有先天性梅毒时，能引起流产、早产或死胎，以及胎儿先天性畸型。

第六节　其他细菌检验与感染

1　支原体

肺炎支原体：能引起原发性非典型肺炎。

人型支原体：可引起非淋病性尿道炎、慢性前列腺炎、子宫颈炎和盆腔炎。

生殖道支原体：能引起持续性复发性非淋病性尿道炎、前列腺炎、急性盆腔炎及阴道炎等。

解脲支原体：可引起非淋病性尿道炎、前列腺炎、附睾炎、男性不育、阴道炎、宫颈炎、自发性流产、死胎、早产、低体重胎儿，以及中枢系统感染与败血症。

2　立克次体

普氏立克次体：引起流行性斑疹伤寒。

莫氏立克次体：能引起鼠型斑疹伤寒。

Q 热立克次体：它又称为柯克斯体，可引起Q 热病。

恙虫病立克次体：此病原体感染引起恙虫病。

3　衣原体

沙眼衣原体：能引起沙眼、包涵体性结膜炎、性病淋巴肉芽肿、非淋病菌性尿道炎、宫颈炎、输卵管炎、附睾炎、直肠炎、新生儿肺炎、Reiten 氏综合征等。

鹦鹉热衣原体：可引起关节炎、肺炎、尿道炎、心内膜炎、脑膜炎、毒血症心肌炎等。

肺炎衣原体：主要在青少年中引起急性呼吸道感染，可表现有肺炎的症状，常呈地方性和散发性流行，患者可以自愈。

附录1　甲、乙、丙、丁、戊型肝炎血清学诊断指南

	抗－HAV IgG/IgM	HBsAg	抗－HBc IgG/IgM	HBeAg	抗－HBe	抗－HDV IgG/IgM	抗－HBs	抗－HCV	抗－HEV IgG/IgM
甲肝恢复期	+/－	－	－/－	－	－	－/－	－	－	－/－
急性HAV 感染	－/+	－	－/－	－	－	－/－	－	－	－/－
急性HBV 感染	－/－	+	－/+	+	－	－/－	－	－	－/－
慢性HBV 感染	－/－	+	+/－	+/－	+/－	－/－	－	－	－/－
急性HAV －HBV 同时感染	－/+	+	－/+	+	－	－/－	－	－	－/－
慢性HBV 感染，急性HAV 感染	－/+	+	+/－	+/－	+/－	－/－	－/－	－	－/－
HBV －HDV 同时感染	－/－	+	－/+	+	－	－/+	－	－	－/－
慢性HBV 感染、急性HDV 感染	－/－	+	+/－	+/－	+/－	－/+	－	－	－/－
慢性HBV 感染、慢性HDV 感染	－/－	+	+/－	+/－	+/－	+/－	－	－	－/－
乙型肝炎恢复期	－/－	－	+/－	－	－	－/－	+	－	－/－
注射乙肝疫苗	－/－	－	－/－	－	－	－/－	+	－	－/－
HBV 感染窗口期	－/－	－	+/－	－	－	－/－	－	－	－/－
HBV 慢性感染、HB －sAg 含量低于可测限	－/－	－	+/－	－	－	－/－	－	－	－/－
HBV 既往感染	－/－	－	+/－	－	－	－/－	－	－	－/－
抗－HBc 假阳性	－/－	－	+/－	－	－	－/－	－	－	－/－
HBV 病毒变异或不同亚型HBV 二次感染	－/－	+	+/－	+/－	+/－	－/－	+	－	－/－
急、慢性HCV 感染	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	+	－/－
急、慢性HCV 感染	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	－	－/－
急性HAV 感染、急慢性丙肝	－/+	－	－/－	－	－	－/－	－	+	－/－
抗－HCV 假阳性	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	+	－/－
丙型肝炎母亲的婴儿	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	+	－/－
急性丙肝恢复早期	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	+	－/－
乙肝恢复期、急慢性丙肝	－/－	－	+/－	－	－	－/－	+	+	－/－
慢性HBV 感染、急慢性丙肝	－/－	+	+/－	+/－	+/－	－/－	－	+	－/－
急性HEV 感染	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	－	－/+
戊肝恢复期	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	－	+/－
急性HAV －HEV 同时感染	－/+	－	－/－	－	－	－/－	－	－	－/+
慢性HBV 感染、急性HEV 感染	－/－	+	+/－	+/－	+/－	－/－	－	－	－/+
急慢性HCV 感染、急性HEV 感染	－/－	－	－/－	－	－	－/－	－	+	－/+
慢性HBV －HDV 感染、急性HEV 感染	－/－	+	+/－	+/－	+/－	+/－	－	－	－/+

注：+/－可能是阳性或阴性

附录2　流式细胞仪CD 系统检测正常参考值

检验名称	英文缩写	检验方法
细胞表面抗原系列测定（CD 系统检测参考值）	CD	流式细胞仪

名称	正常参考值	阳性表达细胞
CD_3	68 %～82 %	T 细胞
CD_4	35 %～55 %	T 辅助细胞、单核细胞
CD_5	65 %～79 %	T 细胞、B 细胞、慢性淋巴细胞白血病
CD_7	75 %	T 细胞、NK 细胞
CD_{16}	8 %～22 %	NK 细胞、嗜中性粒细胞
CD_{19}	5 %～15 %	B 细胞
cD_{33}	>95 %单核及粒细胞	单核细胞、粒细胞、急性粒细胞白血病
CD_{34}	<1 %	原始细胞
CD_{45}	>95 %	白细胞
CD_{56}	9 %～21 %	NK 细胞
CD_{71}	100 %原淋细胞和单核细胞	原淋巴细胞、单核细胞、有核红细胞

注：CD 系列检查用于判断病人细胞免疫状况及白血病免疫分型

附录3　卫生部淘汰35 项临床检验项目

1．淘汰的检测项目

①麝香草酚絮状试验；②硫酸锌浊度试验；③脑磷脂胆固醇絮状试验；④酚四溴酞磺酸钠潴留试验；⑤马尿酸试验；⑥高田氏反应试验；⑦尿兰母试验；⑧血清肌酸试验；⑨脑脊液胶金试验。

2．淘汰及相应替代的检测项目、方法

	淘汰项目，方法	可替代的项目，方法
1	血清蛋白结合碘、测定	T_3 T_4 及其甲状腺功能测定
2	黄疸指数测定	总胆红素测定
3	凡登白试验	直接胆红素测定
4	血清β—脂蛋白测定	甘油三脂总胆固醇高密度脂蛋白测定
5	血清非蛋白氮测定	血清尿素氮测定
6	血红蛋白硫酸铜比重	血红蛋白测定

续表

	淘汰项目，方法	可替代的项目，方法
	试验	
7	尿胆红素碘环试验	重氮法，尿试纸法，Harrison 法
8	血清（浆）葡萄糖酮还原测定法	葡萄糖氧化酶测定法，已糖激酶邻甲苯胺法测定
9	血清丙氨酸氨基转移酶（ALP/GPT）金氏测定法	赖氏比色法、酶法测定
10	血清丙氨酸氨基转移酶（ALP/GPT）酮体粉测定法	赖氏比色法、酶法测定
11	血清门冬氨酸氨基转移酶（AST/GOT）金氏测定法	赖氏比色法、酶法测定
12	血清白蛋白盐析测定法	溴甲酚绿结合法
13	血、尿淀粉酶温氏测定法	碘淀粉比色测定法、苏木杰比色测定法
14	血清梅毒克氏试验	性病研究实验室试验（VDRL）
15	血清梅毒康氏试验	不加热血清反应素试验（USR）
16	血清梅毒瓦氏补体结合试验	快速血浆反应素环状卡片试验（RPR）
17	尿妊娠蟾蜍试验	免疫学方法测（HCG）
18	血清钾四苯硼钠比浊测定法	火焰法、电极法测定
19	血清钠比浊、比色测定法	火焰法、电极法测定
20	血清甲胎蛋白对流免疫电泳法	酶标法
21	血清甲胎蛋白单扩散法	酶标法
22	乙型肝炎表面抗原对流免疫电泳法	酶标法
23	乙型肝炎表面抗原单扩散法	酶标法
24	国际上已废除的细菌名称	“全国临床检验操作规程”中规定的细菌名称
25	药敏试验中“轻度敏感”和“极度敏感”的报告方式	采用“耐药”、“中度敏感”、“中介度敏感”三个等级报告方式
26	血红蛋白沙利化目测法（县及县级以上医院淘汰）	氰化高铁血红蛋测定法

附录4　常用医学检验计量换算

酶活力　IU（国际单位）→mmol/s；（U）×16.67 =（nmol/s）

温度　℉→℃；（℉ −32）×0.5556 =（℃）

葡萄糖　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.0555 =（mmol/L）

尿素　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.1665 =（mmol/L）

尿素氮　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.375 =（mmol/L）

肌酐　mg/dl→μmol/L；（mg/dl）× 88.402 =（μmol/L）

血氨　μg/dl→μmol/L；（μg/dl）×0.5872 =（μmol/L）

胆红素　mg/dl→μmol/L；（mg/dl）×17.10 =（μmol/L）

胆固醇　mg/dl→mmol/L；（mg/dl ×0.259）=（mmol/L）

甘油三酯　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.0113 =（mmol/L）

二氧化碳结合力（血浆）　Vol%→mmol/L；（Vol%）×0.449 =（mmol/L）

血清钾　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.2558 =（mmol/L）

血清钠 mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.435 =（mmol/L）

氯化物　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.282 =（mmol/L）

血清钙 mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.2495 =（mmol/L）

血清镁　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×0.4 =（mmol/L）

血清无机磷　mg/dl→mmol/L；（mg/dl）×59.5 =（mmol/L）

血清铁　μg/dl→μmol/L；（μg/dl）×0.179 =（μmol/L）

尿酸　mg/dl→μmol/L；（mg/dl）×59.5 =（μmol/L）

红细胞计数　万/mm^3→$\times10^{12}$/L；（万/mm^3）×0.01 =（$\times10^{12}$/L）

血红蛋白　g/dl→g/L；（g/dl）×10 =（g/L）

白细胞计数　/mm^3→$\times10^9$/L；（/mm^3）×0.001 =（$\times10^9$/L）

血小板计数　/mm^3→$\times10^9$/L；（/mm^3）×10 =（$\times10^9$/L）