

全国高等学校医学规划教材（供医学检验等专业用）



临床检验免疫学 实验指导

主编 季育华



高等教育出版社
Higher Education Press

全国高等学校医学规划教材

(供医学检验等专业用)

临床检验免疫学实验指导

主 编 季育华



高等教育出版社

Higher Education Press

内容提要

本书是《临床检验免疫学》的配套教材,在与理论教材总体保持一致的前提下,具体叙述内容作为互补,注重本教材的系统性与完整性;结合临床医学免疫学发展的需要,扩充介绍新实验、新技术,注重本书的新颖性与实用性。本书共5章,包括传统且经典的抗原抗体反应,新颖且实用的各类免疫学检测技术,如标记免疫测定、细胞免疫功能测定和其他免疫学相关测定,还有适用于基础科研的抗原抗体制备技术等。全书内容系统、完整、新颖,既保留传统且经典的精华部分,又结合目前临床的实际需要删除与现状不协调部分,补充临床免疫学诊断的新知识、新技术。

本书供高等医药院校医学检验本科及相关专业的学生和临床检验工作者以及研究生使用。

图书在版编目(CIP)数据

临床检验免疫学实验指导/季育华主编. —北京:
高等教育出版社,2006.12

ISBN 7-04-020076-7

I. 临... II. 季... III. 免疫学-医学检验-医
学院校-教材 IV. R446.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第122899号

策划编辑 刘晋秦 冯娟 责任编辑 冯娟 封面设计 张楠 责任绘图 朱静
版式设计 张岚 责任校对 俞声佳 责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街4号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司
印 刷 北京鑫海金澳胶印有限公司

开 本 850×1168 1/16
印 张 6.75
字 数 180 000

购书热线 010-58581118
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>
网上订购 <http://www.landrace.com>
<http://www.landrace.com.cn>
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2006年12月第1版
印 次 2006年12月第1次印刷
定 价 10.40元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 20076-00

《临床检验免疫学实验指导》编写委员会

主 编 季育华

主 审 孔宪涛 陶义训

编 者(按姓氏拼音为序)

艾金霞 北华大学

陈婷梅 重庆医科大学

陈章权 广东医学院

高春芳 第二军医大学

季育华 上海交通大学

罗 红 大连医科大学

彭奕冰 上海交通大学

王 辉 新乡医学院

全国高等学校医学规划教材(供医学检验等专用)

编写指导小组名单

组 长	涂植光	重庆医科大学
成 员	(排名不分先后)	
	樊琦诗	上海交通大学医学院
	刘新光	广东医学院
	刘 辉	大连医科大学
	邹 雄	山东大学医学院
	徐克前	中南大学湘雅医学院
	刘运德	天津医科大学
	李 萍	四川大学华西临床医学院
	毕胜利	北华大学医学院
	许文荣	江苏大学医学技术学院
	周 新	武汉大学医学院
	张进顺	河北北方学院
	刘成玉	青岛大学医学院
	张学宁	昆明医学院
	童明庆	南京医科大学
	杨国珍	贵阳医学院
	章 尧	蚌埠医学院
	尹一兵	重庆医科大学
	钱士匀	海南医学院
	蒲晓允	第三军医大学
	吕建新	温州医学院
	胡建达	福建医科大学
	陈芳梅	广西卫生干部管理学院
	张纯洁	四川省卫生干部管理学院
	宁 勇	湖北中医学院
秘 书	尹一兵	

编者的话

医学检验(laboratory medicine)又称检验医学,是细胞病理学、化学病理学、分子病理学与临床医学有机结合,以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、细胞学技术、生物信息学等为技术支撑的交叉学科。其任务是为疾病诊断、病情判断和治疗决策提供信息,为临床和科研提供实验室方法和数据。我国高等医学检验教育始于1983年,到2006年为止,已有70余所高等院校相继建立了医学检验本科专业。23年的探索发展历程中,其培养目标和要求已趋统一。教育部本科专业目录中对该专业的培养目标是:“具有基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识和基本能力,能在各级医院、血站及防疫部门从事医学检验及医学类实验室工作的医学高级专门人才。”业务培养要求为:“本专业学生主要学习基础医学、临床医学、医学检验等方面的基本理论知识,受到医学检验操作技能系统训练,具有临床医学检验及卫生检验的基本能力。”

作为特殊的知识载体和教学基本要素的教材,必须体现服务于培养目标,遵循其培养人才的业务要求的基本属性。由国内18所影响的院(校)医学检验系(学院)参与,进行的国家“十五”重点立项课题——“21世纪中国高等学校人才培养体系的创新与实践”子课题“21世纪中国高等学校医学检验专业课程体系与教学内容的创新与实践”中,将教材建设作为主要内容之一。在此教学改革研究的基础上,经过全国高等医学检验教育界同仁的努力,在高等教育出版社的大力支持下,编写出版了此套体现上述教学改革研究成果的高等医学检验专业教材。该套教材有以下特点:

1. 适应现代教育思想和观念,突出调动学生主动学习积极性,培育学生应用所学知识解决问题能力和创新精神。充分体现教学改革研究课题形成的办学模式、课程体系、教学内容和手段的改革成果。

2. 应用现代化教学手段,坚持教材的一体化建设,使教材成为教学全过程的资源库。该套教材除文字教材外,每本均附包括教学大纲、多媒体教案、模拟试题、案例分析、扩展知识和参考材料、典型实验规范化实验操作的视频材料等的教学光盘。既有利于教师组织教学,亦可为学生主动学习,进一步发展提供帮助,是一套真正的立体化教材。

3. 基于医学检验是以生物分析化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、遗传学、细胞学技术、生物信息学等技术为支撑,而上述技术在各亚专业中均交叉应用。因此,本套教材单独编写了《基本检验技术及仪器学》一书,将医学检验涉及的通用性基本技术集中介绍。这既符合教育部对实验教学改革的要求,有利于学生在掌握基本技术后举一反三,也避免了各亚专业肤浅地重复介绍,更有利于学生能力和技能的培养。

4. 在借鉴国内外同类教材基础上,除坚持基本理论、基本知识、基本技能,思想性、科学性、先进性、启发性、适用性原则外,本套教材注重突出医学检验专业教材的特点。与现有同类教材相比,内容上除根据学科发展,进行了必要的增、减调整外,尤其注意避免片面追求理论系统性而大量、系统重复已学知识的弊病,根据专业特点,重点介绍检验项目的依据、怎样做和做好、项目的临床意义等。力求重点突出、深入浅出、图文并茂。每章前以Key Points概括了该章的知识要点,章末客观介绍了存在问题与发展趋势,并附有主要参考资料及网站,有利于学生主动学习,培养创新能力。这是本套教材的又一鲜明特点。

本文完成之际,欣悉本套教材有10本遴选入“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”,这是对本套教材的充分肯定和认可,也是对广大编写人员的鞭策和鼓励。

前 言

本书是由高等教育出版社组织编写的医学检验(本科)教材《临床检验免疫学》的配套教材。内容分为5章11节,近40个检测实验项目,其中包括经典、实用与和检验领域新近发展又符合临床需要的项目。作为配套实验教材,本书坚持与理论教材在编写原则上保持一致,在内容上互为补充,避免不必要的重复,突出培养学生实际动手能力以为临床实验室输送有用人才。

临床检验免疫学的迅猛发展,带动了检验技术的改革与发展。许多以设备为载体的新型免疫学检测技术,以及与其相配套的诊断用试剂(盒)的大量出现,使得目前大多数临床免疫学检测试验在很大程度上减少了对技术人员的依赖。为此有许多医学院校已经将某些以手工操作为主的相对经典的免疫学检测项目等的教学内容做了不同程度的削减。本书面对使用对象,结合现实需要,经过精心的构思与编写,力争做到:(1)参考先前的几本专业教材,保留其精华部分,调整与现状不协调部分,如将补体结合试验完全剔除,并对内容的次序等做了大调整;(2)调整以往大量教材中验证用的试验项目,尽可能选择目前临床上常用且所用试剂材料容易获得的项目,使得学生在课堂学的能与临床实际用的保持一致;(3)在内容、表述形式和程度的安排方面,力争做到使本书既适用于高等医药院校医学检验本科及相关专业的学生,又可供从事临床免疫学检验的专业人员和研究生等使用。

本教材编写的难点在于国家尚没有统一的指导大纲,对培养对象的要求(水准)、师资力量以及学校设施等全国各地间存在显著差异。编者的初衷是尽可能满足众多需求,仍有不足之处请多多谅解。在编写过程中,本书还得到了孔宪涛教授、陶义训教授以及其他有关人员的支持与帮助,在此一并表示感谢。

最后,衷心希望广大师生和医学检验工作人员在使用过程中对本书提出宝贵的意见和建议。

编 者

2006年5月

郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010) 58581897/58581896/58581879

传 真：(010) 82086060

E - mail：dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

目 录

第一章 体外抗原与抗体反应测定

技术 1

第一节 凝集反应 1

一、直接凝集试验 1

二、间接凝集试验 3

三、协同凝集试验 4

四、间接凝集抑制试验 5

第二节 沉淀反应 6

一、液相沉淀试验 6

二、凝胶扩散试验 8

三、免疫电泳试验 11

第三节 补体与补体参与的反应 14

一、血清总补体活性测定 14

二、补体各成分的测定 17

三、补体参与反应的测定 17

思考题 20

第二章 免疫标记技术 22

第一节 酶免疫技术 22

一、酶联免疫吸附试验 22

二、酶免疫组化试验 32

三、免疫印迹试验 35

第二节 其他免疫标记技术 37

一、荧光免疫技术 37

二、胶体金标记免疫测定技术 40

三、发光免疫分析技术 42

四、放射免疫测定技术 42

思考题 45

第三章 细胞免疫测定技术 46

第一节 免疫细胞的分离与分类 46

一、PBMC 的分离 46

二、单个核细胞中淋巴细胞的纯化 47

三、不同淋巴细胞的分离 48

四、T 细胞亚群的测定 51

第二节 免疫细胞功能检测 53

一、免疫细胞功能非特异检测 53

二、免疫细胞功能特异检测 59

三、细胞因子的检测 59

思考题 61

第四章 其他免疫学检测试验 62

第一节 变态反应的测定 62

一、皮肤试验 62

二、血清 IgE 测定 64

第二节 移植免疫相关检测 65

一、混合淋巴细胞反应 65

二、HLA 配型 (血清定型法) 67

思考题 67

第五章 抗原抗体的制备技术 68

第一节 抗原的制备与鉴定 68

一、血清免疫球蛋白 IgG 的提取 68

二、免疫球蛋白 IgG 的鉴定 69

三、免疫球蛋白 IgG 的纯化 71

第二节 抗体的制备与鉴定 74

一、多克隆抗体的制备 74

二、单克隆抗体的制备与鉴定 76

思考题 78

参考文献 79

附录一 免疫学实验常用试剂及配制

方法 80

附录二 微量移液器的使用方法 85

附录三 思考题参考答案 88

第一章 体外抗原与抗体反应测定技术

体外的抗原抗体反应又被统称为血清学反应,临床常采用人血清作为抗体或抗原的检测标本。根据反应现象和试验方法等不同,可分为凝集反应、沉淀反应和溶血反应等类型。随着免疫学研究的迅速发展,高纯度、强特异性的抗原或抗体的获得以及灵敏且稳定的方法学的问世,免疫学检测含义有较大的扩充。但血清学技术仍为其基础与核心。

第一节 凝集反应

凝集反应是指颗粒性抗原(如完整的细菌、细胞)与相应的抗体,在适当浓度的电解质存在下,经过一定时间出现肉眼可见的凝集现象。根据检测凝集反应的条件可将其分为玻片凝集和试管凝集;也可根据试验中抗原抗体的检测方式,分为直接凝集反应、间接凝集反应、间接凝集抑制反应等。

一、直接凝集试验

细菌、螺旋体和红细胞等颗粒抗原,在适当电解质参与下可直接与相应抗体结合出现凝集,称为直接凝集反应(direct agglutination)。常用的凝集试验有玻片法和试管法两种。

(一) 玻片凝集试验

例. ABO 血型定型试验

【原理】

人类 ABO 血型抗原有 A 和 B 两种。A 型红细胞膜上有 A 抗原, B 型红细胞膜上有 B 抗原, AB 型红细胞膜上则有 A 和 B 两种抗原,而 O 型红细胞膜上却没有 A 和 B 抗原。将已知的抗 A 或抗 B 血清(抗体)与受试者红细胞混合,根据抗 A 抗体和(或)抗 B 抗体与红细胞表面上的相应抗原结合是否引起红细胞凝集,可以判定受试者的血型。

【试剂与器材】

1. 标本 待检人红细胞。
2. 试剂 抗 A 和抗 B 标准血清。
3. 器材 载玻片、毛细吸管、生理盐水、试管、牙签、光学显微镜等。

【操作步骤】

1. 取载玻片一张,将抗 A 血清、抗 B 血清各一滴分别滴于玻片两端。
2. 用酒精棉球消毒无名指指端皮肤或者耳垂,再用无菌采血针刺破表皮,用毛细吸管取血一滴,放入 1 ml 生理盐水中,混匀,即成待检红细胞悬液(约 2%)。
3. 用毛细吸管取受检者红细胞悬液,于抗 A 和抗 B 血清中各加一滴,然后分别用牙签将血清与红细胞混匀,静置数分钟后观察凝集现象。如果肉眼观察不够清楚,可以用光学显微镜低倍镜观察。

【结果判断】

加生理盐水的对照点不发生凝集,呈均匀的乳状液,判为阴性结果。在已知诊断血清端,细胞与相应抗体反应出现可见的凝集块,判为阳性结果。

【参考范围】

只与抗 A 血清凝集者,则为 A 型;只与抗 B 血清凝集者,则为 B 型;如与抗 A 和抗 B 血清都发生凝集者,则为 AB 型;相反,与抗 A 和抗 B 血清都不发生凝集现象者,则为 O 型。

【临床意义】

玻片凝集法可用于人类红细胞 ABO 血型的鉴定。如果被鉴定的抗原物质为细菌,通过其与相应抗血清(抗体)反应,根据是否出现凝集现象可鉴定细菌的种和型。

【注意事项】

1. 做 ABO 血型鉴定时要注意反应时温度不宜过低(不应低于 10℃),否则可出现冷凝集而造成假阳性。遇此情况,需用 37℃ 预温的生理盐水洗涤受检红细胞 2~3 次,除去吸附在红细胞上的冷凝集素,然后再鉴定血型。

2. 做细菌种和型鉴定时,每次均需做生理盐水对照以避免细菌自凝。同时注意操作顺序,即应先涂布对照端,后涂测试端,避免抗血清被携带而出现假性凝集现象。

(二) 试管凝集试验

例. 肥达反应

【原理】

将已知伤寒沙门菌的菌体“O”抗原和鞭毛“H”抗原,以及引起副伤寒的甲、乙和其他型副伤寒沙门菌的“H”抗原作为诊断菌液与受检人血清在试管内反应,根据各反应试管内凝集现象出现与否,来测定受检者血清中是否有相应抗体以及抗体的效价。

【试剂与器材】

1. 标本 待测人血清。
2. 试剂 生理盐水、伤寒杆菌“H”抗原和“O”抗原、副伤寒杆菌甲“H”抗原、副伤寒杆菌乙“H”抗原。
3. 器材 试管、试管架、吸管、恒温水浴箱等。

【操作步骤】

1. 取洁净试管 28 支,分 4 排置于试管架上,每排 7 支,并依次做好标记。
2. 于每排的 1~7 管内加入生理盐水 0.5 ml。

3. 另外准备 1 支空试管,内加生理盐水 4.5 ml,再加入待检血清 0.5 ml,使之成为 1:10 待检血清。然后按图 1-1 进行倍比稀释。即取 7 支空试管,每管内加入生理盐水 3 ml,再吸取 1:10 稀释待检血清 3 ml 加入第 1 管内,充分混匀后吸取 3 ml 液体移入第 2 管中,充分混匀后再吸取 3 ml 液体移入第 3 管中,以此类推直至第 6 管,最后弃去 3 ml,这样每管内液体均为 3 ml。此时每管中待检血清的稀释度依次为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320 及 1:640。第 7 管不加血清的为抗原对照管。操作如图 1-1:

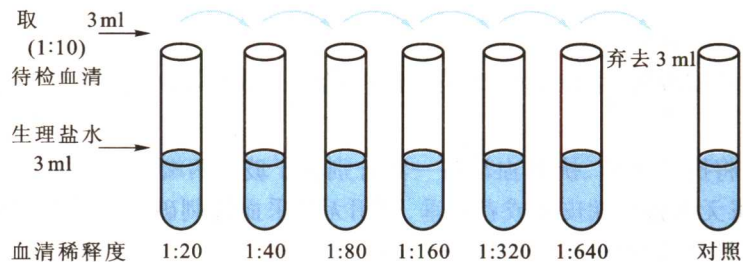


图 1-1 血清稀释法

4. 将已稀释的待检血清按每一稀释度,逐一加入试管架上每排的对应管内,每管 0.5 ml。

5. 用吸管加入伤寒杆菌“H”菌液 0.5 ml 于第 1 排各管中,加伤寒杆菌“O”菌液 0.5 ml 于第 2 排各管中,以及副伤寒杆菌甲“H”菌液 0.5 ml 于第 3 排各管中和副伤寒杆菌乙“H”菌液 0.5 ml 于第 4 排各

管中。

6. 将各管振荡混匀,放置于 37℃ 恒温水浴箱中过夜。由于等量细菌菌液抗原的添加,实际各试管中的血清稀释度应为 1:40 ~ 1:1 280。

【结果判断】

观察每支试管的底部有无凝集物、凝集物的质地和上清液的浊度,然后轻轻摇动,观察凝集物颗粒的大小和松软度以及液体的浊度变化。以生理盐水组为对照,如试管底部的沉淀物呈圆形,边缘整齐,轻轻振荡,细菌即分散而呈混浊现象,判为不凝集。与此相反则可判为凝集,并以“+”号表示凝集程度:

“++++”表示细菌全部凝集,液体澄清,试管底部有大量凝集块。

“+++”表示绝大部分细菌凝集,液体轻度混浊,凝集块小。

“++”表示部分细菌凝集,液体半澄清,凝集物比前两者少,呈颗粒状。

“+”表示仅有少量凝集,液体混浊,凝集不明显。

“-”表示不凝集,与对照管相同。

最终以凝集效价报告结果,即出现“++”凝集的最终血清稀释度为待检血清的抗体效价。

【参考范围】

正常人伤寒沙门菌“O”抗原凝集效价 < 1:80,伤寒沙门菌“H”抗原凝集效价 < 1:160,副伤寒甲、乙及其他“H”抗原凝集效价 < 1:80。

【临床意义】

1. 肥达试验可用于伤寒和副伤寒的辅助诊断。当肥达试验结果为阳性时,即针对某些抗原的抗体效价超出参考值范围,还应考虑因沙门菌的隐性感染或预防接种,使血清中存在一定量的有关抗体,必须结合临床表现、病程、病史及地区的流行病学情况做出判断。

2. 临床检验中还有许多病原体的检测诊断也是采用试管凝集法,如外斐试验则可用于斑疹伤寒、恙虫病或立克次体病的鉴别诊断,还有嗜异性凝集试验为传染性单核细胞增多症的辅助诊断指标等。

【注意事项】

1. 试管凝集反应时应注意,当抗原抗体比例合适时形成中等略偏大分子的凝集物,方能肉眼可见。当血清抗体起始浓度过高时,反而不出现凝集,此结果为前带现象,原因是此反应中抗体的浓度过高,导致抗原抗体比例不合适。解决的办法是加大待检血清抗体的稀释度后重新试验。

2. 抗原抗体加入后应充分摇匀,以增加彼此间的接触。同时反应的温度、电解质等的离子强度均可影响试验结果。

【评价】

1. 玻片凝集试验操作简单,反应迅速,设备器材要求不高,易被临床接受。但此方法仅能定性,且灵敏度较低,适用于细菌的分型和 ABO 血型鉴定等。

2. 试管凝集试验为经典的定量凝集试验,虽然灵敏度不高,但其操作简便且对实验条件要求低,尤其用微量反应板替代试管后,目前仍在临床应用。

间接凝集试验

例. 类风湿因子测定

【原理】

可溶性抗原分子比较小,与相应抗体形成抗原抗体复合物一般用肉眼难以辨别。如类风湿因子(rheumatoid factor, RF)是类风湿性关节炎患者血清中出现的一组异常的免疫球蛋白,能与变性的人 IgG 的 Fc 部分发生结合。由于 RF 为可溶性小分子蛋白,直接凝集试验用肉眼难以判定。本试验是将变性的人 IgG 结合在载体乳胶颗粒上,然后与待检血清反应,如遇到患者血清中 RF 就会出现凝集现象。通过稀释被检血清了解其中 RF 存在的量。

【试剂与器材】

1. 人 IgG 致敏乳胶颗粒。
2. RF 阳性血清、阴性血清及待检血清。

【操作步骤】

1. 取载玻片(或者黑色玻璃板)一张,将 RF 阳性血清(或待检血清)、RF 阴性血清分别滴加在玻片的两端。
2. 将人 IgG 致敏乳胶颗粒分别滴加在上述两端的血清中,轻轻晃动玻片,使之充分混匀。
3. 室温静置 5 min 后,观察结果。

【结果判断】

在黑色背景下,出现细砂状的乳白色颗粒则为阳性;不出现凝集,仅出现白色悬浮物则为阴性。如果 RF 检测结果为阳性,可进一步通过血清的稀释再做试验,根据出现明显凝集的最高血清稀释度,判定其 RF 的凝集效价。

【参考范围】

正常人 RF 检测结果呈阴性。

【临床意义】

RF 检测阳性,主要见于类风湿性关节炎、硬皮病或系统性红斑狼疮等,其阳性程度或被检出量的多少与病情有关,尤其是被检出 RF 的类型如 IgG 型、IgA 型或 IgM 型等分别具有不同临床参考意义,请参考相关书籍。

一些其他自身免疫性疾病、慢性炎症和少数健康人群中也偶有 RF 阳性者,判断时要注意结合临床表现。

【注意事项】

1. 测试时血清与乳胶试剂应充分混匀。
2. 应在黑色背景下观察结果,最好用黑色玻璃板做试验。

【评价】

间接凝集试验利用非相关颗粒作载体,人为地偶联抗原或抗体,引申出正向间接凝集即利用已知抗原检测未知抗体,或反向间接凝集即利用已知抗体检测未知抗原。此方法操作简便、快速,成本低廉,一般适用于临床初筛的定性试验。

三、协同凝集试验**例. 脑膜炎球菌的快速鉴定****【原理】**

协同凝集试验(coagglutination)与间接凝集反应的原理类似,但所用的载体是金黄色葡萄球菌。该菌体的细胞壁中含有 A 蛋白(staphylococcus protein A, SPA)。SPA 可与人和多种哺乳动物的 IgG Fc 段发生结合而不影响其 Fab 段的功能,用表达 SPA 的金黄色葡萄球菌吸附某种特异性 IgG 制成致敏载体颗粒,可与相应的抗原结合,导致细菌凝集。

【试剂与器材】

1. 标本 流行性脑膜炎患者脑脊液。
2. 试剂 金黄色葡萄球菌 Cowan I 株、A 群脑膜炎球菌家兔免疫血清(56℃ 30 min 灭活)、普通肉汤及普通琼脂平板、甲醛、0.01 mol/L pH7.1~7.4 PBS、无菌生理盐水等。
3. 器材 玻璃棒、离心机、水浴箱、载玻片、无菌滴管、吸管及试管等。

【操作步骤】

1. SPA 细菌稳定液的制备 将金黄色葡萄球菌 Cowan I 菌株经过普通琼脂斜面 37℃ 培养 18~24 h

后,用玻璃棒刮适量细菌菌苔加入0.01 mol/L pH7.1~7.4 PBS中,经3 000 r/min离心15 min,洗涤3次,用含0.5%甲醛的PBS稀释成 1×10^9 /ml细菌悬液,分装后保存备用。

2. 致敏SPA菌液的制备 取前述已制备的SPA稳定菌液1 ml,加入A群脑膜炎球菌家兔免疫血清0.1 ml,充分混匀后置37℃水浴30 min,用PBS经3 000 r/min离心15 min,洗涤2次后,补充PBS至10 ml。

3. 将载玻片分成3格,第1格和第3格各加1滴流行性脑膜炎患者脑脊液,第2格中加1滴PBS。

4. 于第1格和第2格分别加1滴抗血清致敏的SPA菌液,第3格中加滴未经致敏的SPA菌液1滴。

5. 分别用牙签混匀,2~3 min后观察结果,出现颗粒状凝集者为阳性。

【结果判断】

第1格中应凝集成清晰可见的颗粒,液体澄清,为阳性反应结果;第2、3格为对照,应不出现凝集。根据凝集颗粒的大小及液体澄清的程度,可将凝集现象分成若干层次:

“++++”为液体迅速透明,出现粗大颗粒状凝集。

“+++”在2 min内液体透明,出现较大凝集颗粒。

“++”在2 min内液体稍透明,出现小颗粒状凝集。

“+”液体混浊,有细小颗粒。

“-”液体混浊,无凝集颗粒可见。

以“++”以上凝集为阳性。

【参考范围】

正常情况下测定值应为阴性。

【临床意义】

1. 协同凝集试验是常用的简易快速诊断法,可用于细菌的快速鉴定和分型,比直接玻片凝集的敏感性高50倍。可检测脑脊液、血液及尿液中的微量病原菌,例如脑膜炎球菌、志贺菌等。

2. 可用于病毒的鉴定与分型、细菌毒素等可溶性抗原的检测,亦可作为钩端螺旋体快速群体定型的方法之一。

【注意事项】

1. 协同凝集试验的特异性和反应的强弱取决于致敏SPA菌液的免疫血清,因此应选用特异性强和效价高的制剂。

2. SPA与IgG类抗体的结合虽无种属特异性,但对不同种属的IgG亲和力不一,故在制备致敏SPA菌液时要选择适当动物的抗血清。

3. 每次试验应同时设立阳性对照和阴性对照,以监控试验结果。此外还应设立未致敏SPA对照,以排除菌体的自行凝集现象。

【评价】

试验中以细菌的菌体为载体颗粒,与胶乳相比更加稳定,且不受试验体系中离子强度的影响。此外,此方法快速、方便、用途广、结果可靠,而且无需特殊仪器设备,易于普及。

四、间接凝集抑制试验

过去常用的乳胶妊娠试验是根据间接凝集抑制试验原理设计的(图1-2),即先将待测孕妇尿液与已

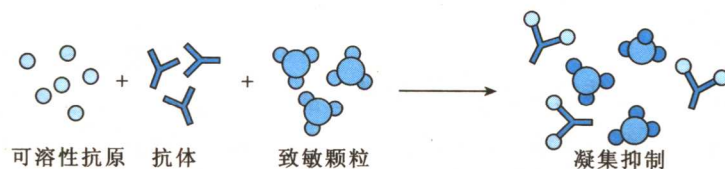


图1-2 间接凝集抑制反应原理示意图

知抗 HCG 抗体先反应,再添加致敏乳胶颗粒参与反应。由于孕妇尿液中含有人绒毛膜促性腺激素(HCG),能与已知抗 HCG 抗体结合形成复合物,从而抑制了抗 HCG 抗体与致敏乳胶颗粒表面上的 HCG 结合,不出现乳胶凝集。随着抗 HCG 单克隆抗体的出现,该试验已发展为直接凝集试验,结果直观,操作简便。新近,由于金标记技术的快速发展,由金标记试剂作为替代品已成为趋势。

(王 辉)

沉 淀 反 应

沉淀反应是指可溶性抗原与抗体结合后,在适宜条件下形成浊度或沉淀现象。由于参与反应的介质不同、检测方法不同,经典的沉淀反应已发展为许多不同类型的免疫沉淀类试验。本单元着重介绍其常用的试验方法。

一、液相沉淀试验

液相沉淀试验中可溶性抗原与抗体发生反应的介质是液体(含电解质)。由于试验的方法不同,抗原抗体复合物呈现的沉淀现象也不同,如可呈现絮状沉淀、环状沉淀以及免疫浊度等。前两者已逐步被淘汰,而免疫浊度法则在不断地发展。

(一) 循环免疫复合物测定

【原理】

浊度增强剂或促凝剂聚乙二醇(PEG)在一定浓度时可选择性析出一定分子大小的抗原抗体复合物而形成浊度,其浊度的程度与抗原抗体复合物的量呈正比。由于浊度的形成可导致反射、散射以及吸收入射光线,使原入射光衰减。此时,通过测定透射光衰减(以 A 值表示)可检测免疫复合物的量。

【试剂与器材】

1. 标本 待检人血清。
2. 试剂 PEG(相对分子质量 6 000)、硼酸、硼砂、蒸馏水等。
3. 主要器材 分光光度计、比色杯、微量移液器、洁净玻璃试管、试管架、4℃ 冰箱等。

【操作步骤】

1. 配制硼酸缓冲液(0.1 mol/L pH 8.4) 取硼砂 4.6 g 和硼酸 5.1 g,加蒸馏水 1 000 ml 混匀,调整 pH 后分装,置 4℃ 冰箱中备用。
2. 配制 PEG 溶液(4.166%) 称取 PEG41.66 g 加硼酸缓冲液 1 000 ml 充分混匀,分装,置 4℃ 冰箱中备用。
3. 血清稀释 取洁净玻璃试管 3 支分别标记稀释管、测试管和对照管,并插入试管架中。用微量移液器吸取 0.4 ml 硼酸缓冲液加入稀释管,更换吸嘴吸加待检血清 0.2 ml,混匀。
4. 反应 在测试管中加入 PEG 溶液 2 ml,在对照管中加入硼酸缓冲液 2 ml,然后分别加入已稀释血清各 0.22 ml,充分混匀后置 4℃ 冰箱 60 min。
5. 预温 将原置于 4℃ 冰箱中的反应试管连同架子取出,置室温 30 min 以上待测。
6. 测定 用分光光度计测定时波长选择 450 nm,先以生理盐水调节“0”点,然后分别测试对照管和测试管,并记录所读的 A 值(图 1-3)。

【结果判断】

测试管 A 值 - 对照管 A 值 = 待检血清中 CIC 的量

【参考范围】

测定波长为 450 nm 时,数值为 0.015 ~ 0.05。

【临床意义】

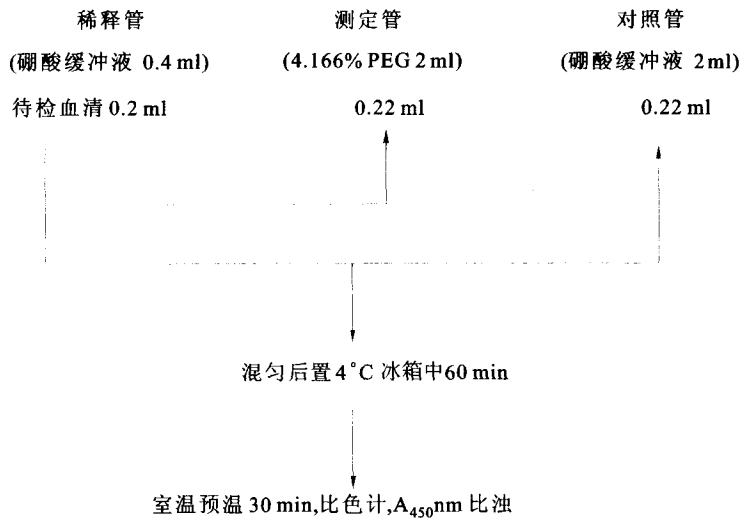


图 1-3 循环免疫复合物检测流程示意图

1. CIC 指体内游离的抗原抗体复合物。形成复合物的抗原抗体性质不同、彼此间浓度比例不同,所形成免疫复合物分子大小也各不相同。大分子免疫复合物(大于 19S)可被吞噬细胞吞噬清除;极小分子免疫复合物则易透过血管基底膜,对疾患影响较小;中等大小分子的免疫复合物则与许多临床疾病的发生发展密切相关。

2. CIC 的量增高,反映血清中免疫复合物量增多。已知 CIC 增多与许多疾病相关,包括自身免疫性疾病、传染性疾病、肿瘤以及某些超敏反应性疾病等。

3. 此方法中凡是相当分子大小的免疫复合物均可被检测出,故无特异性。况且,影响测定结果的因素较多,故其结果仅作为参考指标,趋于被淘汰。

【注意事项】

1. 促聚集剂或浊度增强剂的浓度 不适当加大其浓度易造成伪浊度。PEG 的终浓度过高,也可使得血清 IgM、 α_2 微球蛋白、脂蛋白等析出沉淀,更甚的还会有 IgG、清蛋白等的析出。掌握恰当的浊度增强剂浓度对检测的相对准确性至关重要。

2. 样本自身因素 血脂,尤其是高浓度的脂蛋白微颗粒也会影响浊度,使之升高。另外,乳糜微粒或反应体系中混杂微颗粒都会产生杂散射光。建议,所用缓冲液等可经滤过(0.22 μm)。同时,尽可能多设对照管。

3. 其他 影响抗原抗体反应的诸因素如 pH、离子强度、温度等皆可影响浊度形成。比浊样品杯的洁净度也对浊度有影响。

【评价】

1. 特异性 测定 CIC 的方法大致分两类:① 测定总的免疫复合物,无特异性,临床仅作为参考;② 测定特异性复合物,要求操作特殊,即将测得的总免疫复合物经专门洗涤后,再用特异性抗体等做鉴定。可提高临床的诊断价值,但较繁琐。

2. 灵敏度 该方法仅用于定性或半定量,且无明确标准。利用浊度增强剂可增强其反应性,但也增加其影响系数。随之的改良方法如补体 C3 结合法、放射性核素标记 C1q 测定法等,因为繁琐且试剂要求严格趋于被淘汰。

(二) 免疫球蛋白定量测定

血清或其他体液中免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 等含量测定可为许多临床疾病的诊断提供有力依据。快速、精确的结果报告至关重要。免疫浊度测定,包括透射比浊法和散射比浊法。透射比浊法可用各种商品试剂在各种开放式的生化自动分析仪上测定,适用于各级医院;散射比浊法所需的仪器比较特殊,并且必须用其配套试剂等。下面仅列举透射比浊法进行介绍。

【原理】

抗原与抗体在特殊缓冲液中快速形成抗原抗体复合物,使反应液变得有浊度。当反应液中保持抗体过量,形成的复合物随抗原量增加而增加,反应液的浊度亦随之增加。在光源的光路方向为 0° 角,即在直射角度测定入射光和透射光的比率,以吸收光度 A 值表示。

【试剂与器材】

1. 标本 待检人血清、脑脊液等。
2. 试剂 抗人 IgG、IgA、IgM 相应抗体,校正品,缓冲液,稀释液和清洗液。
3. 仪器 Beckman CX4/5/7 及 LX20 等生化自动分析仪。

【操作步骤】

1. 试剂配制 将抗血清按要求用稀释液进行稀释后即为抗血清应用液,在 $2\sim 8^\circ\text{C}$ 可短期保存(2~4周)。若血清略浑浊,可经 $4\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 $10\ \text{min}$,或用孔径为 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后使用。
2. 上机测定操作可参见 Beckman SYNCHON LX systems 操作手册。

【结果判断】

测定样品的增加值,与一系列标准品对照后报告受检物的含量。

【参考范围】

1. 血清 IgG:723~1 685 mg/dl, IgA:69~382 mg/dl, IgM:63~277 mg/dl。
2. 脑脊液 IgG:0.5~6.1 mg/dl。

【临床意义】

1. 人血清中免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM 等)含量增高,可分为多克隆增高和单克隆增高,前者多见于感染、肿瘤及某些自身免疫病;后者则多见于免疫增殖性疾病。
2. 人血清中免疫球蛋白(IgG、IgA、IgM)含量减低,临床上多见于免疫缺陷病,包括先天性和获得性免疫缺陷病,体液免疫缺陷和联合免疫缺陷以及长期使用免疫抑制剂等。

【注意事项】

1. 采血后应在 $2\ \text{h}$ 内分离血清,避免溶血影响结果。血清标本 $8\ \text{h}$ 内不测者应置 4°C 冰箱内($2\sim 8^\circ\text{C}$); $72\ \text{h}$ 内不测的标本,应当冻存于 -20°C 以下。已被冻存的标本只能复融一次,禁止反复冻融。
2. 脑脊液标本测定 IgG 前需离心以去除可能含有的细胞或细菌。标本不立刻检测的应置 4°C 冰箱($2\sim 8^\circ\text{C}$)或 -20°C 冻存。
3. 免疫球蛋白量的增加或减少与其他血浆蛋白不同,往往是成倍甚至数十倍改变,利用透射免疫浊度测定必须考虑测定过程中标本中的抗原超量可引发钩状效应。

【评价】

免疫浊度测定的校正曲线比较稳定,操作简便快速,易于自动化,适合批量检测。但非特异的交叉反应、浊度增强剂的浓度和反应时间等都会影响检测结果。Beckman Coulter 的 IMMAGE 等免疫浊度测定系统设置了抗原过剩校正、实时质控,测定时可得到准确而具有可比性的结果。

二、凝胶扩散试验**【原理】**

体外可溶性抗原抗体反应以凝胶为介质。根据操作方式不同可将其分为凝胶双扩散试验和凝胶单扩散试验。前者是将对应的抗原与抗体分别放在琼脂凝胶板的相对应孔内,由其缓慢自由扩散。当二者相遇则发生结合,在比例合适处出现白色沉淀线,肉眼可见。后者是将一定量抗体混合于琼脂凝胶并浇注琼脂板,在琼脂板的指定孔内加入抗原,在抗原向四周扩散的过程中与板中抗体相遇、结合,并在比例合适处产生肉眼可见白色沉淀线。凝胶扩散试验可根据沉淀线的数量、位置及形状判定彼此的浓度、纯度以及比例等。许多实验室采用鸡卵黄作为抗原,并自制抗卵黄抗体,试验效果好,成本低廉。