



全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

王晓娟 徐军发 徐 霞 ◆ 主编



临床免疫学检验实验

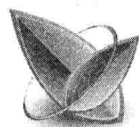
..... · . :.....: ..

LINCHUANG MIANYIXUE JIANYAN SHIYAN



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材

供医学检验等专业使用

临床免疫学检验实验

主 编 王晓娟 徐军发 徐 霞

副主编 高荣升 刘晓斌 张从胜 林向阳

编 者 (以姓氏笔画为序)

于敬达	包头医学院
王晓娟	佛山科学技术学院医学院
刘晓斌	延安大学医学院
刘晓霞	河北工程大学医学院
李 波	佛山科学技术学院医学院
李海侠	南方医科大学附属南方医院
李慧玲	佳木斯大学检验医学院
汪光蓉	川北医学院
张从胜	河北北方学院
林向阳	温州医科大学
钟志宏	湖南师范大学医学院
徐 霞	广州医科大学
徐军发	广东医学院
高荣升	佳木斯大学检验医学院
郭婷婷	内蒙古自治区血液中心
梁 一	广东医学院



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 提 要

本书是全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。

全书共分验证性实验、综合性实验、设计创新性实验与免疫学检测系统方法学评价及常用诊断实验效能评价四篇。本书的编写以医学检验专业本科培养目标和最新教学大纲为依据,密切结合医院检验科的实际,选择免疫学检验基本实验技术和常用的实验项目,与本系列理论教材相呼应,满足医学检验专业本科“临床免疫学检验”实验教学的需要。实验项目和内容编写以岗位需求为原则,注重实用性和应用性,强调学生基本操作技能、综合素质以及创新能力的培养。

本书主要供本科医学检验等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

临床免疫学检验实验/王晓娟,徐军发,徐霞主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.9
ISBN 978-7-5609-9442-0

I. ①临… II. ①王… ②徐… ③徐… III. ①免疫学-医学检验-医学院校-教材 IV. ①R446.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 238218 号

临床免疫学检验实验

王晓娟 徐军发 徐 霞 主编

策划编辑:柯其成

责任编辑:柯其成

封面设计:范翠璇

责任校对:于 涛

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中理工大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:10

字 数:236 千字

版 次:2014 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

定 价:25.00 元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

全国高等医药院校医学检验专业 “十二五”规划教材

编委会

主任委员 尹一兵 徐克前

委员(按姓氏笔画排序)

王庆林 湖南师范大学医学院
王晓娟 佛山科学技术学院医学院
尹一兵 重庆医科大学
刘永华 包头医学院
刘晓斌 延安大学医学院
权志博 陕西中医学院
邢 艳 川北医学院
阮 萍 绍兴文理学院医学院
吴俊英 蚌埠医学院
吴晓蔓 广州医科大学
张 展 郑州大学第三附属医院
李 艳 吉林医药学院
肖露露 南方医科大学附属南方医院
陈昌杰 蚌埠医学院

陈育民 河北工程大学医学院
郑 芳 武汉大学医学院
姜 恺 中山大学中山医学院
胡志坚 九江学院临床医学院
赵建宏 河北医科大学
夏 薇 北华大学
徐克前 中南大学湘雅医学院
贾天军 河北北方学院
陶元勇 潍坊医学院
陶华林 泸州医学院
高荣升 佳木斯大学检验医学院
梁 统 广东医学院
曾照芳 重庆医科大学

总序

ZONGXU

2011年《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》的颁发宣告新一轮医学教育改革的到来。教育部要求全面提高高等教育水平和人才培养质量,以更好满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要。近年来,随着科学技术的进步,大量先进仪器和技术的采用,医学检验也得到飞速发展。医学检验利用现代物理的、化学的、生物的技术和方法,为人类疾病的预防、诊断、治疗以及预后提供重要的信息。它在临床医学中发挥着越来越重要的作用。据统计,临床实验室提供的医学检验信息占患者全部诊疗信息的60%以上,因此医学检验已成为医疗的重要组成部分,被称为临床医学中的“侦察兵”。基于此,国家教育部2012年颁布的专业目录将医学检验专业人才培养定位于高水平医学检验技术人才的培养。

这些转变都要求教材的及时更新,以适应新形势下的教学要求和临床实践。但是已经出版的医学检验教材缺乏多样性、个性和特色,不适应新的教学计划、教学理念,与临床实践联系不够紧密。已出版的相关教材与新形势下的教学要求和人才培养不相适应的矛盾日益突出,因此,加强相关教材建设已成为各相关院校的目标和要求,新一轮教材建设迫在眉睫。

为了更好地适应医学检验专业的教学发展和需求,体现最新的教学理念,突出医学检验的特色,在认真、广泛调研的基础上,在医学检验专业教学指导委员会相关领导和专家的指导和支持下,华中科技大学出版社组织了全国40所医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材。本套教材由国家级重点学科的教学团队引领,副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占70%。教材编写过程中,全体参编人员进行了充分的研讨,各参编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,各主编及参编人员付出了辛勤的劳动,这确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各院校的教学改革成果和研究成果,教材编写体系和内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材定位准确,体现最新教学理念,反映最新教学成果,紧密联系最新的教学大纲和临床实践,注重基础理论和临床实践相结合,体现高素质复合型人才的要求。

(2) 适应新世纪医学教育模式的要求,注重学生的临床实践技能、初步科研能力和创新能力的培养。突出实用性和针对性,以临床应用为导向,同时反映相关学科的前沿知识和发展趋势。

(3) 实验课程教材内容包括基础实验(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究创新型实验(以问题为导向性的实验)等,所选实验项目内容新、代表性好、实用性强,反映新技术和新方法。



(4) 实现立体化建设,在推出传统纸质教材的同时,很多教程立体化开发各类配套电子出版物,打造为教学服务的共享资源包,为学校的课程建设服务。

本套教材得到了医学检验专业教学指导委员会相关领导专家和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校医学检验教学及人才培养作出应有的贡献。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

全国高等医药院校医学检验专业“十二五”规划教材
编写委员会

前言

QIANYAN

本书的编写以医学检验专业本科培养目标和最新教学大纲为依据,密切结合医院检验科的实际,选择免疫学检验基本实验技术和常用的实验项目,与本系列理论教材相呼应,以满足医学检验专业本科“临床免疫学检验”实验教学的需要。本书充分反映 21 世纪医学检验和免疫学检验发展的现状和趋势,充分体现“三基”即基本理论、基本知识和基本技能,力求突出“五性”即思想性、科学性、先进性、启发性和实用性。实验项目和内容编写以岗位需求为原则,注重实用性和应用性,强调基本操作技能培养,和临床岗位无缝接轨,注重学生综合素质以及创新能力培养。

全书共分验证性实验、综合性实验、设计创新性实验与免疫学检测系统方法学评价及常用诊断实验效能评价四篇。验证性实验主要由经典的免疫学实验组成,另增编了酶联免疫斑点试验、时间分辨荧光免疫测定、荧光偏振免疫测定、电化学发光免疫测定等临床免疫学检验技术。综合性实验主要包括抗体的制备和临床免疫学检验内容。设计创新性实验主要介绍临床免疫学检验创新实验设计的一般过程,并列举了部分创新实验选题,以有利于培养学生的综合能力和科研思维,为医学检验专业学生进一步开展科研工作奠定基础。第四篇主要内容为检验系统的方法性能评价和临床免疫学实验的诊断效能评价,有助于提高学生分析问题和解决问题的能力。实验方法尽量详尽,并设附录介绍常用动物的接种和采血方法、常用试剂配制、常用免疫学检测检验基本操作技能考核与评价体系,以便于学生、实验技术人员与教师操作和查阅。每个实验项目后均附有思考题,以帮助学生提高学习效果。

免疫学和免疫学检验技术的发展日新月异,由于编者学识和水平所限,本书难免会有不妥或不足,恳切希望广大师生和同仁们指正。

编者

2014 年 1 月

目录

MULU

第一篇 验证性实验	/ 1
第一单元 免疫凝集类技术	/ 3
实验一 直接凝集试验	/ 3
实验二 间接凝集试验	/ 6
第二单元 免疫沉淀类技术	/ 13
实验三 单向免疫扩散试验	/ 13
实验四 双向免疫扩散试验	/ 15
实验五 火箭免疫电泳试验	/ 17
实验六 对流免疫电泳试验	/ 19
实验七 免疫固定电泳试验	/ 20
第三单元 免疫标记技术	/ 24
实验八 酶免疫技术	/ 24
实验九 荧光免疫技术	/ 37
实验十 化学发光免疫分析技术	/ 43
实验十一 胶体金免疫技术	/ 52
第四单元 免疫细胞检测技术	/ 56
实验十二 外周血单个核细胞的分离	/ 56
实验十三 T 淋巴细胞亚群的流式细胞仪检测	/ 57
实验十四 淋巴细胞增殖实验	/ 61
实验十五 细胞毒性 T 淋巴细胞活性测定	/ 65
实验十六 细胞因子的测定	/ 66
第二篇 综合性实验	/ 71
第五单元 免疫血清制备技术	/ 73
实验十七 多克隆抗体的制备	/ 73
实验十八 抗体的纯化及鉴定	/ 75
第六单元 临床免疫学检验	/ 79
实验十九 感染性疾病免疫学检验	/ 79
实验二十 自身免疫性疾病的免疫学检验	/ 84
实验二十一 肿瘤标志物的检测	/ 87
实验二十二 超敏反应及其检验	/ 90



第三篇	设计创新性实验	/ 95
	第七单元 创新性实验的选题、设计、实施与总结	/ 97
	第八单元 创新性实验选题参考	/ 102
第四篇	免疫学检测系统方法学评价及常用诊断实验效能评价	/ 109
	第九单元 检测系统的方法学性能评价	/ 111
	实验二十三 精确度评价	/ 111
	实验二十四 可报告范围验证实验	/ 113
	实验二十五 参考区间评价实验	/ 115
	实验二十六 分析灵敏度评价	/ 116
	实验二十七 检测系统干扰实验	/ 118
	实验二十八 检测系统间结果比对实验	/ 120
	第十单元 临床免疫学实验的诊断效能评价	/ 123
	实验二十九 临床免疫学定性实验的诊断效能评价	/ 123
	实验三十 临床免疫学定量实验的诊断效能评价	/ 125
	附录 A 常用实验动物的接种和采血方法	/ 128
	附录 B 常用试剂配制	/ 132
	附录 C 常用免疫学检验基本操作技能考核与评价体系	/ 138

第一篇

验证性实验

Yanzhengxing Shiyan

第一单元 免疫凝集类技术

凝集试验(agglutination test)是指细菌、红细胞等颗粒性抗原与相应抗体或表面覆盖抗原(或抗体)的颗粒状物质(如红细胞、聚苯乙烯胶乳等)与相应抗体(或抗原)结合,在一定条件下,形成肉眼可见凝集现象的试验技术。其在临床检验中已经成为常用的免疫学试验。由于凝集试验方法简单、结果直观、无需特殊仪器,目前临床仍在应用。常用的技术类型有直接凝集试验和间接凝集试验等。



实验一 直接凝集试验

天然的颗粒性抗原与相应抗体在适当条件下发生反应,出现肉眼可见的凝集现象,称为直接凝集试验。在操作方法上有玻片法和试管法两种。

一、玻片凝集试验

【实验目的】

掌握玻片凝集试验的原理、试验方法、结果判断;熟悉应用范围及方法学评价。

【实验原理】

在玻片上,当颗粒性抗原与相应抗体在适宜条件下反应,出现肉眼可见的凝集物,即为玻片凝集试验。玻片法属于定性试验,常用已知抗体直接检测未知的细胞性抗原。

【实验材料】

1. 待检样品 OX₁₉变形杆菌 18~24 h 琼脂斜面培养物。
2. 诊断血清 OX₁₉变形杆菌诊断血清,用时按说明书用生理盐水作适当稀释。
3. 其他 生理盐水、载玻片、接种环、滴管、酒精灯等。

【操作程序】

1. 于洁净玻片一端加诊断血清 1 滴,另一端加生理盐水 1 滴作对照。
2. 用无菌接种环挑取 OX₁₉变形杆菌培养物,分别混于生理盐水和诊断血清中,充分混匀。
3. 室温下静置数分钟,观察结果。

【结果与报告】

生理盐水对照不发生凝集,为均匀混浊的乳状液。在诊断血清中,如混悬液由混浊变澄清并出现肉眼可见的凝集物为阳性结果;如与生理盐水对照相同,则为阴性结果。



【注意事项】

1. 玻片应洁净、干燥,以防止和减少非特异性凝集。
2. 每一待检菌检测均需作生理盐水对照,如对照凝集则表示细菌(粗糙型)发生自凝,试验结果无效。
3. 在载玻片两端涂布混合细菌时,应先将细菌与生理盐水中涂布混合,然后再将细菌与诊断血清中涂布混合,以免将血清带入生理盐水中。
4. 试验后的细菌仍有传染性,应将载玻片及时放入消毒缸内。

【方法学评价】

玻片法操作简便,反应迅速,为定性试验,但敏感性较低。

【临床应用】

该方法主要用于细菌的鉴定和分型,也是 ABO 血型鉴定的基本方法。

【思考题】

玻片凝集试验一般是检测抗原还是抗体?

二、试管凝集试验

【实验目的】

掌握试管凝集试验的原理、试验方法、结果判断;熟悉应用范围及方法学评价。

【实验原理】

试管凝集试验是将已知的颗粒性抗原悬液定量地与一系列倍比稀释的待检血清等量混合,在适宜条件下,静置一定时间后,根据各管的凝集程度,判断待检血清中抗体的效价,常用于抗体的半定量检测。1896 年,Widal 利用伤寒病人的血清能与伤寒杆菌发生特异性凝集的现象,诊断了伤寒病。

【实验材料】

1. 待检血清 用生理盐水 1:10 稀释(1 份血清加入 9 份生理盐水)。
2. 诊断菌液 伤寒沙门菌 H 或 O 菌液,10 亿/mL(用 Mcfarland 标准比浊管测定细菌含量)。
3. 其他 生理盐水、37 °C 水浴箱、试管、1 mL 吸管、吸球等。

【操作程序】

1. 取洁净试管 8 支,排列于试管架上,依次编号。
2. 各管均加入 0.5 mL 生理盐水。
3. 吸取 1:10 稀释的待检血清 0.5 mL 加入第 1 管,充分混匀后吸出 0.5 mL 加入第 2 管,混匀,从第 2 管吸出 0.5 mL 加入第 3 管;同法依次稀释至第 7 管,混匀后从第 7 管吸出 0.5 mL 弃去。第 8 管不加血清作为生理盐水对照。至此,第 1~7 管的血清稀释度依次为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280。这种稀释方法称为连续倍比稀释法(表 1-1)。
4. 每管各加诊断菌液 0.5 mL,此时每管内血清稀释度又增加 1 倍,分别为 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560。
5. 各管摇匀后置于室温或 37 °C 18~24 h,观察结果。操作程序见表 1-1。

【结果与报告】

表 1-1 试管凝集试验操作程序

单位/mL	1	2	3	4	5	6	7	8
生理盐水	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
稀释血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃 0.5
诊断菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清终 稀释度	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	对照

判断凝集试验的结果,要有良好的光源和黑暗的背景。从温箱或水浴箱中轻轻取出试管架,不要摇动试管。观察管底凝集物和上清浊度。然后轻摇或用手指轻弹管壁使凝集物悬浮,观察凝集块的松软、大小、均匀度和悬液浊度。

1. 先观察生理盐水对照管,应无凝集现象。管底沉积呈圆形、边缘整齐,轻摇则沉积菌分散,均匀混浊。

2. 再观察试验管,伤寒沙门菌 O 抗原凝集物呈颗粒状,轻摇时不易升起和离散,往往黏附于管底。H 抗原凝集物呈棉絮状,沉于管底,轻摇易升起和离散。根据凝集的强弱程度,可将试验结果划分为以下等级。

“4+”:很强,细菌全部凝集,管内液体澄清,可见管底有大片边缘不整的白色凝集物,轻摇时可见有明显的颗粒、薄片或絮状。

“3+”:强,细菌大部分凝集,液体轻度混浊,管底有边缘不整的白色凝集物,轻摇时可见较明显的颗粒、薄片或絮状。

“2+”:中等强度,细菌部分凝集,液体较混浊。

“+”:弱,细菌仅少量凝集,液体混浊。

“—”:不凝集,液体混浊度与管底沉集物与对照管相同。

3. 以出现“2+”凝集强度的血清最大稀释度作为待检血清的凝集效价(滴度)。

4. 若第 1 管仍无凝集现象应报效价 $< 1 : 40$ (为第 1 管稀释度);若第 7 管仍呈“++”或更强凝集现象应报效价 $> 1 : 2560$ (为第 7 管稀释度)。

【注意事项】

1. 抗原、抗体在比例适当时,才出现肉眼可见的凝集现象。如抗体浓度过高,出现前带现象,此时须加大抗体稀释度重新试验。

2. 判断结果时,应在暗背景下透过强光逐管观察。

3. 注意温度、pH、电解质、振摇对试验结果的影响。水浴箱的水面不要高出试管内液面,以利于试管内液体的对流,增加抗原与抗体的接触。在放入水浴前振摇,可使抗原、抗体充分混匀,增加抗原、抗体的接触。

4. 混合抗体时,需用吸管连续吸取数次。吸液时吸管应深入液面下,以防吸进空气。注液时应离开液面,以防产生气泡或使液面溢出试管。

【方法学评价】

本试验是一种经典的半定量凝集试验,操作简单,但敏感性不高,并受诊断菌液的细菌种类和数量影响,尤其诊断菌液不稳定、易自凝。

**【临床应用】**

本法主要检测血清中有无某种特异性抗体及其效价,以协助临床诊断或供流行病学调查。例如:诊断伤寒和副伤寒的 Widal 反应(肥达反应)、诊断斑疹伤寒和恙虫病等立克次体病的 Weil-Felix 反应(外-斐反应),诊断布氏菌病的 Wright 反应(瑞氏反应)。

【思考题】

1. 什么是前带现象? 如何判断。
2. 何谓效价? 决定血清凝集效价高低的因素是什么?
3. 引起非特异性凝集的因素有哪些?



实验二 间接凝集试验

将可溶性抗原(或抗体)吸附于一种与免疫无关的、适当大小的载体微粒表面,再与相应抗体(或可溶性抗原)在适宜条件下相互作用,经一定时间出现肉眼可见的凝集现象称为间接凝集试验。如将抗原吸附于载体微粒表面以检测抗体,称为正向间接凝集试验;如将抗体吸附于载体微粒表面以检测抗原,则称为反向间接凝集试验。以红细胞为载体的间接凝集试验称为间接血凝试验,以胶乳颗粒为载体的间接凝集试验称为间接胶乳凝集试验,以 SPA 菌体为载体的间接凝集试验称为协同凝集试验。

一、间接血凝试验

【实验目的】

掌握间接血凝试验的原理、试验方法、结果判断;熟悉应用范围及方法学评价。

【实验原理】

鞣化(或醛化)红细胞可牢固吸附蛋白类抗原,用已知蛋白质抗原致敏红细胞,检测样品中相应抗体,通过观察红细胞凝集现象,可以判断待检血清中有无相应抗体及其效价。

【实验材料】

1. 待检血清 待检抗人丙种球蛋白。
2. SRBC 悬液 1%鞣化 SRBC 悬液,1%鞣化致敏 SRBC 悬液。
3. 缓冲液 0.15 mol/L pH7.2 PBS,0.15 mol/L pH6.4 PBS。
4. 1%正常兔血清 56℃灭活 30 min,用 pH6.4 PBS 配制。
5. 阳性对照血清、阴性对照血清。
6. 温箱、微量振荡器、8×12 孔“V”型孔微量反应板、微量加样器、微量稀释棒、小吸头等。

【操作程序】

1. 将待检血清 56℃灭活 30 min。
2. 标记 每份样品 1 排,每排为 12 孔。横排上方依次标记为 1~9、NRS、阳性、阴性;纵列左侧标记为样本号。
3. 用微量加样器分别吸取 1%正常兔血清 25 μL,依次注入 96 孔“V”型微量反应板 1~10 孔中。11 孔加入 25 μL 阳性对照血清,12 孔加入 25 μL 阴性对照血清。

4. 用微量加样器或微量稀释棒吸取待检血清 25 μL 置于第 1 孔中,混合后,取出 25 μL 置于第 2 孔中,依次作倍比稀释,直至 9 孔,混合后吸出 25 μL 弃掉,见表 2-1。

表 2-1 间接血凝试验微量反应板法操作程序

单位/ μL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1%NRS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—
受检血清	25	25	25	25	25	25	25	25	25	弃 25	—	—
阳性对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25	—
阴性对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	25
1%SRBC	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血清终 稀释度	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	NRS	阳性	阴性

5. 每孔各加 1%鞣化致敏 SRBC 悬液 25 μL 。
6. 将反应板置微量振荡器上振荡 2~3 min,置于湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 2~3 h,观察结果。

【结果与报告】

1. 红细胞的凝集强度可根据下面的标准划分为不同等级。

“4+”:红细胞形成片状凝集,均匀布满管底,凝集边缘不整齐或折叠。

“3+”:红细胞形成片状凝集,有卷边或缺口,面积略小于“4+”。

“2+”:红细胞形成片状凝集,面积较小,边缘较松散。

“+”:红细胞沉积于管底,周围有散在的少量凝集。

“—”:红细胞沉积于管底呈小圆点,边缘清晰整齐。

2. 效价判定 稀释液对照孔、阴性对照孔均为阴性;阳性对照孔应为阳性,如测定排不凝为阴性,如凝集,以出现“2+”凝集的血清最高稀释倍数判定其效价。

【注意事项】

1. 所用鞣酸必须优质(AR)。鞣酸浓度高,抗原致敏红细胞灵敏度高,但易发生自凝;鞣酸浓度低,灵敏度低。一般鞣酸浓度配制成 0.2‰~0.4‰为宜。

2. 鞣酸在 pH7.2 PBS 中易自凝,配制溶液水质要好,可防止自凝,又可保持凝集模式清晰。

3. 红细胞也可醛化后进行间接血凝试验(醛化方法见反向间接血凝试验)。

4. 如对照排阳性,必须用 SRBC 吸收待检血清,然后重新试验。

【方法学评价】

此法操作简单、快速,不需任何特殊设备,具较高特异性和灵敏度。但非特异性干扰严重,应严格设立对照。

【临床应用】

本试验主要用于传染病抗体、自身抗体、超敏反应性抗体的检测。

【思考题】

1. 试述间接血凝试验的原理。
2. 间接血凝试验在操作过程中应注意什么问题?



附 1%鞣化致敏 SRBC 悬液的制备

(一) 鞣化致敏

1. 用 pH7.2 PBS 将 SRBC 洗涤 3 次,前两次 2500 r/min 离心 5 min,第 3 次 2500 r/min 离心 10 min。用 pH7.2 PBS 按压力配成 2.5% SRBC 悬液。

2. 加等量 1:4000 鞣酸(用 pH7.2 PBS 配制,鞣酸不同批号,质量相差较大必须预试测定适宜浓度),充分混匀,置于 37 °C 水浴 10 min。

3. 取出,2500 r/min 离心 5 min,弃上清,用 pH7.2 PBS 洗 1 次,再用 pH6.4 PBS 配成 2.5% 鞣化 SRBC 悬液。

4. 将等量用 pH6.4 PBS 适当稀释的抗原(0.5 g/L 人丙种球蛋白)与鞣化 SRBC 悬液混合,置于 37 °C 水浴 30 min(每 5 min 振动一次)。抗原最适浓度需方阵滴定。

5. 取出,2500 r/min 离心 5 min,弃上清,用 1% 兔血清洗涤 2 次,前 2 次 2500 r/min 离心 5 min。

6. 2500 r/min 离心 10 min,弃上清,按压力用 1% 正常兔血清将致敏 SRBC 配制成 1% 细胞悬液。

(二) 最适致敏抗原浓度滴定

1. 用 pH6.4 PBS 将抗原配成 4 个稀释度(例如 1:25、1:50、1:100、1:150)。

2. 每个稀释度抗原按鞣化致敏 SRBC 悬液步骤 4、5、6 致敏 SRBC。

3. 用已知阳性血清和阴性血清按实验操作法进行方阵滴定。

4. 与最高稀释度抗血清反应(4+),而与已确定最高稀释度的阴性血清无反应的最低抗原滴度即为确定的最适致敏抗原的浓度。

附 非特异性凝集素吸收去除法

1. 取 56 °C 灭活 30 min 的血清 0.2 mL,加入生理盐水 0.6 mL。

2. 加入 10% 红细胞悬液 0.2 mL(用 pH7.2 PBS 洗涤 3 次,前 2 次 600 r/min 离心 5 min,第 3 次 600 r/min 离心 10 min,按压力配制成 10% 悬液)。

3. 混合后置室温 10 min,离心,留取上清液,该血清为 1:5 经吸收的血清。

二、胶乳凝集试验

【实验目的】

掌握胶乳凝集试验的原理、试验方法、结果判断;熟悉应用范围及方法学评价。

【实验原理】

类风湿因子(RF)是一组抗变性 IgG 的自身抗体,它能与人或动物的变性 IgG 结合,而不与正常人 IgG 发生凝集反应。根据这一特点,将处理过的人 IgG 与羧化聚苯乙烯胶乳共价交联,使其吸附于胶乳颗粒载体上,成为致敏的胶乳颗粒。当待检血清中有 RF 时,则致敏的胶乳颗粒上的变性 IgG 与相对应的抗体(RF)发生反应,出现凝集现象。

【实验材料】

1. 血清 待检血清、阳性血清、阴性血清。

2. 诊断试剂 人 IgG 致敏胶乳试剂。

3. 稀释液 生理盐水或 pH8.2 甘氨酸缓冲盐水。