

菏泽医学专科学校实验系列教材

病原生物学与免疫学 实验指导

主编 张业霞 吴继海 李 睿

北京大学医学出版社

菏泽医学专科学校实验系列教材

病原生物学与免疫学 实验指导

主 编 张业霞 吴继海 李 睿

副主编 王宗军 张海燕 李 莉

主 审 台凡银

编 委 (按姓氏拼音排序)

成少娥 (山东菏泽医学专科学校)

贾昌亭 (山东菏泽市立医院)

李 睿 (山东菏泽医学专科学校)

任崇伟 (山东菏泽医学专科学校)

王文国 (山东菏泽市立医院)

吴继海 (山东菏泽市立医院)

张海燕 (山东菏泽医学专科学校)

张秀华 (山东菏泽市立医院)

赵体灵 (山东菏泽市立医院)

侯翠萍 (山东菏泽市立医院)

李 莉 (山东菏泽医学专科学校)

李桂霞 (山东菏泽市立医院)

台凡银 (山东菏泽医学专科学校)

王宗军 (山东菏泽医学专科学校)

闫德华 (山东菏泽医学专科学校)

张佳伦 (山东菏泽医学专科学校)

张业霞 (山东菏泽医学专科学校)

朱树国 (山东菏泽市立医院)

北京大學醫學出版社

BINGYUANSHENGWUXUE
YU MIANYIXUE SHIYAN ZHIDAO

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学与免疫学实验指导/张业霞, 吴继海, 李睿主编. —北京:
北京大学医学出版社, 2011.8

ISBN 978-7-5659-0235-2

I. ①学… II. ①张…②吴…③李… III. ①病原微生物—实验—
医学院校—教学参考资料②免疫学—实验—医学院校—教学参考资料
IV. ①R37—33②R392—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 164274 号

病原生物学与免疫学实验指导

主 编: 张业霞 吴继海 李睿

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100191) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 莱芜市圣龙印务有限责任公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 许立 杰丽 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 10 字数: 255千字

版 次: 2011年8月第1版 2011年8月第1次印刷 印数: 1-8000册

书 号: ISBN 978-7-5659-0235-2

定 价: 20.00元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

菏泽医学专科学校实验系列教材 建设编写指导委员会

主任委员 付章丽

副主任委员 于信民 孔晓霞

委 员 (按姓氏拼音排序)

冯 瑜 高尚举 高曰超 李 琳 刘观昌

刘心臣 邵 军 田 健 王海祥 王克志

尹祥敏 袁志勇

前 言

《病原生物学与免疫学》是医学院校一门重要的基础学科，为促进职业医学教育的发展，培养高素质适用型人才，适应社会及教学改革的需要，我校决定在其专科教材出版的基础上，编写一本与此教材相配套的实验教材，即《病原生物学与免疫学实验指导》。

为了编好本实验教材，我们就本书的指导思想、编写原则、内容的编排模式等内容经过慎重思索，提出了建议。与此同时，我们还参考了其他院校写得较好的实验指导教材。这些教材各有特色、互为补充，为编好本教材提供了良好的条件。

本实验教材的内容和顺序基本上依照理论教材编排，除绪论外，全书共分4个部分，即医学免疫学实验、细菌与真菌学实验、病毒学实验和人体寄生虫学实验，其中免疫学实验13个，细菌与真菌学实验19个，病毒学实验6个，寄生虫学实验6个。为方便学生的学习，我们在本教材的编写中力求基本理论与基本操作技术有机结合，过去将寄生虫学技术操作全部写于书后附录中，现在改为把技术操作分别写入相关的实验中，以便于学生理论与实验操作紧密结合，巩固所学内容。为了使学生通过相关实验获得对理论更深层次的理解，培养科学严谨的工作态度，本书中在每次实验后均附有相应的思考题。另外，在相关的实验后还附加了常用试剂的配制等内容，可作为学生今后临床工作和科学研究的参考。

为适应新的教学改革的需要，很多院校都对实验内容作了较大的调整，造成各院校的实验课程安排各异。在使用本教材的过程中，可根据本校的教学实际，选定、删减或合并实验内容，并根据内容调整实验次数。也正因为如此，我们在内容的编写上考虑得比较细致，以适应专科院校其他专业的需要。本书也可以作为临床检验人员、进修人员及卫生防疫人员的专业参考书。

本书为菏泽医学专科学校与菏泽市立医院的协编教材。

本书中很多图片引自北京大学医学出版社出版的高兴政教授主编的《医学寄生虫学》教学光盘，在此对原作者和出版社致以衷心的感谢。

在本教材的编写中，各位作者本着对学生严肃认真的负责态度，仔细地编写每一节实验内容，付出了辛勤的劳动。但由于时间紧张，水平有限，缺点和错误在所难免，恳请广大师生和读者提出宝贵意见。

编 委

2011年5月

目 录

绪 论

一、病原生物学和免疫学实验目的要求	1
二、实验室规则	1
三、实验室意外的紧急处理	2

第一部分 医学免疫学实验

实验一 抗原与免疫血清的制备	4
实验二 凝集反应	7
实验三 沉淀反应	11
实验四 补体测定技术	14
实验五 酶免疫标记技术	16
实验六 免疫荧光技术	19
实验七 免疫胶体金斑点试验	21
实验八 放射免疫分析法	24
实验九 外周血中淋巴细胞的分离纯化	26
实验十 免疫细胞数量检测	28
实验十一 免疫细胞功能检测	32
实验十二 CTL 细胞株法测定 IL-2	38
实验十三 免疫病理及检测	39

第二部分 细菌与真菌学实验

实验一 细菌形态结构观察	44
实验二 常用培养基制备	46
实验三 细菌的分布及消毒灭菌	49
实验四 细菌的培养及生长现象观察	51
实验五 细菌涂片标本的制备及革兰染色法	56
实验六 药敏试验	58
实验七 细菌的变异	60
实验八 机体的抗感染免疫	63
实验九 细菌的致病性	65
实验十 病原性球菌	68
实验十一 肠道杆菌	74
实验十二 细菌的生化反应	78
实验十三 弧菌与弯曲菌	83

实验十四	厌氧性细菌	85
实验十五	分枝杆菌与放线菌	88
实验十六	动物源性细菌	90
实验十七	其他细菌	92
实验十八	支原体、衣原体、立克次体、螺旋体	95
实验十九	真菌	98

第三部分 病毒学实验

实验一	病毒的形态观察与培养	101
实验二	流行性感胃病毒的检测	106
实验三	乙型肝炎病毒抗原抗体系统的检测	109
实验四	乙型肝炎病毒 DNA 的检测 (PCR 法)	112
实验五	EB 病毒 VCA - IgA 检测	114
实验六	HIV 抗体检测	116

第四部分 人体寄生虫学实验

实验一	线虫	120
实验二	吸虫	128
实验三	绦虫	134
实验四	溶组织内阿米巴	137
实验五	鞭毛虫	139
实验六	孢子虫	143
附录一	微生物学实验室常用仪器的使用	148
附录二	动物实验技术	151
附录三	玻璃器皿的准备	153

绪 论

一、病原生物学和免疫学实验目的要求

实验室是供学生进行实验的重要场所。在实验室内，学生通过实验观察和技术操作，使学生进一步理解、巩固和掌握理论课内容，掌握病原生物体的检验、鉴定等基本技术及其免疫学检验技术，为今后的临床实践及科研工作打下坚实的基础。

为达到上述实验目的，要求学生做到以下几点：

1. 实验前应做好预习，明确每次实验的目的、内容、理论依据，尽量避免或减少错误发生。
2. 认真听取指导老师的课前讲解、示教，观摩实验课中形象、多媒体等电化教材。
3. 在实验中要按实验指导认真操作，独立思考，仔细观察并做好记录。有关基本技能的训练，要按照操作程序反复练习，以达到一定的熟练程度。
4. 在病原生物学的实验中，尤其是在微生物学的实验过程中，学生应建立无菌概念，掌握无菌操作技术。
5. 实验报告要强调科学性，实事求是地记录、绘制。如实验结果与理论不符，应认真分析和探讨其原因，培养自己的分析能力和解决问题的能力，不断提高实验质量。

二、实验室规则

病原生物包括微生物和寄生虫两个部分。根据这种特有的实验对象，尤其是对其中的病原微生物，任何疏忽都会导致严重的后果。不仅自身有可能招致感染，且有可能导致环境污染，并将病原生物传给他人。因此必须严格贯彻“无菌概念”，必须遵守病原生物学实验室规则：

1. 进入实验室前必须穿好白大衣，离开实验室脱下反折，白大衣应经常清洗消毒。
2. 书包、衣物等物品勿带入实验室。必要的文具、实验用具、笔记等物带入后，应放在指定位置。
3. 在实验室不做与实验无关的事情。不能高声呼叫、谈笑、喧哗或随意走动，禁止随地吐痰，并严禁饮食、吸烟，保证实验室的良好秩序。
4. 注意安全、保护环境。使用危险品或具有感染性的病原体时，应严格按照操作规程进行。严禁随意丢弃具有感染性的病原体、感染性材料、培养物、污染物、动物尸体及排泄物。正确使用各种消毒容器。
5. 必须小心避免有菌材料的溅出，若不慎污染了工作台、手、眼、衣物和地面等处，应立即报告老师，以便及时作出适当处理。
6. 注意节约，爱护设备和仪器，如不慎损坏了实验仪器或实验标本，应及时报告指导老师，按照学校规定处理。
7. 每次实验后均应用肥皂洗手，必要时用消毒液泡手，如实验中使用了致病性较强的微生物，则需用消毒液擦洗工作台面，并用紫外线灯照射。

8. 实验完毕后, 清理台面、检查标本、器材, 并按原位放好或送还标本室; 将需培养的标本及时放入培养箱。值日生应做好实验室清洁, 关好门、窗、水、电后方可离开。

三、实验室意外的紧急处理

在实验的过程中, 要严防事故的发生, 如发生意外伤害事故, 应及时报告, 并采取一些紧急处理, 办法如下:

1. 皮肤伤害 先除去异物, 用蒸馏水或生理盐水洗净后, 涂 2% 红汞或 2% 碘酒。

2. 烧伤 局部涂凡士林、5% 鞣酸或 2% 苦味酸。

3. 化学药品腐蚀伤

(1) 强酸: 先用大量清水冲洗, 再用 5% 碳酸氢钠溶液洗涤中和。

(2) 强碱: 先用大量清水清洗, 再用 5% 醋酸或 5% 硼酸溶液中和。若受伤部位是眼部, 经上述步骤处理后, 再用橄榄油或液状石蜡 1~2 滴滴眼。

4. 菌液误入口中 立即将菌液吐出消毒容器内, 并用 1:10000 高锰酸钾溶液或 3% 过氧化氢水漱口, 并根据菌种不同, 服用抗菌药物预防感染。

5. 菌液污染桌面 将适量的 2%~3% 甲酚皂溶液或 0.1% 苯扎氯铵倒在污染处, 浸泡 30min 抹去。若手上沾有活菌, 亦应浸泡上述消毒液 3min 后, 然后用肥皂和清水洗净。

6. 火警 如发生火警时须沉着、冷静处理, 切勿慌张, 应立即关闭电闸或煤气阀门。如酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火, 切忌用水扑救, 可用沙土等物扑灭。

实验一 抗原与免疫血清的制备

【目的】

1. 了解抗原与免疫血清的制备程序。
2. 通过试验进一步理解什么是抗原和抗体。

【内容】

一、常用抗原的制备

1. 细菌悬液的制备 细菌悬液可作诊断试剂，如肥达反应中的诊断菌液。也可用来免疫动物制备诊断血清，如沙门菌 A-F 多价血清、志贺菌诊断血清等。细菌悬液制备程序大致如下：

选择标准菌种→细菌培养→刮取菌苔→用无菌生理盐水洗涤→革兰染色镜检，验证无杂菌→无菌生理盐水稀释至适当浓度→加温处理细菌→检查合格→分装、保存备用。

制备各种细菌悬液，常需按不同要求将细菌配制成不同的浓度。应用稀释菌液与标准比浊管比浊的方法，可判断每毫升菌液中所含细菌数量。现介绍经典的麦克法兰 (Mc Farland) 标准比浊法 (表 1-1-1)。

表 1-1-1 Mc Farland 标准比浊管的组成其相当的菌数表 (系指中等大小细菌)

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1%氯化钡溶液 (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1%硫酸溶液 (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当菌数 (亿/ml)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

(1) 按表 1-1-1 制备一套标准比浊管：正确混合不同量的 1%硫酸 (化学纯) 溶液和 1%氯化钡 (化学纯) 溶液于一系列色泽口径一致的试管中。用经酸碱处理的橡胶塞塞紧管口，用石蜡密封。置试管架上，保存于暗处。

(2) 取 0.5ml 待测细菌盐水悬液 (去除粗渣)，用 9.5ml 生理盐水稀释，与标准比浊管比较。所得标准管的细菌浓度乘以稀释倍数，即为该菌液所含细菌的近似值。

(3) 这套标准比浊管，只适用于测定细菌在盐水悬液中的浓度。如要测定肉汤悬液的细菌浓度，则须用肉汤配制无菌的硫酸和氯化钡混合液。

2. 红细胞悬液的制备 红细胞悬液可作为抗原免疫动物制备溶血素；在一些血清学试验中也常用到红细胞悬液，如 CH50 测定、抗“O”试验等。

制备红细胞悬液的程序一般是：用生理盐水洗涤红细胞，除去其表面的附着物，然后配成所需要的浓度。洗涤红细胞的方法是：先将抗凝血以 2000r/min 离心 5min，吸去血浆层。在管中加 2~3 倍的生理盐水，用毛细滴管轻轻地反复吹吸混匀，再以 2000r/min 离心 5min，弃上清液，如此反复 3 次。最后一次可适当延长离心时间至 10min。这样压积后的红

细胞，上清液透明无色。弃上清液后，用压积红细胞配成实验要求所需的浓度备用。红细胞洗涤次数不宜太多，以三次为宜，否则红细胞脆性增加，影响试验结果。若是用于制备溶血素的红细胞，应无菌操作。

二、常用免疫血清的制备

1. 兔抗羊免疫血清的制备。

【材料】

家兔、绵羊血清、无菌生理盐水、注射器及针头、无菌试管及吸管等。

【方法】

(1) 用无菌注射器从绵羊颈静脉采血并分离血清。

(2) 选择体重为 2~3kg 的健康雄性家兔，按表 1-1-2 剂量和程序进行免疫：

表 1-1-2 兔抗羊免疫血清的制备

日期	抗原及剂量	免疫途径
第 1 天	羊血清 1ml	耳静脉
第 3 天	羊血清 2ml	耳静脉
第 5 天	羊血清 3ml	耳静脉
第 7 天	羊血清 3ml	耳静脉
第 9 天	羊血清 3ml	耳静脉

(3) 末次注射 7 天后，由耳静脉采血并分离血清，滴定效价在 1 : 500 以上即可心脏无菌采血并分离血清置冰箱备用。

2. 抗菌血清的制备

【原理】

用抗原免疫动物可刺激其 B 细胞分化增殖为浆细胞，进而分泌特异性抗体，这种含有特异性抗体的血清即为免疫血清。

【材料】

家兔、乙型副伤寒杆菌、琼脂斜面培养基、0.3% 甲醛盐水、无菌生理盐水、无菌注射器及针头、试管等。

【方法】

(1) 将生物学性状典型的肖氏沙门菌接种于琼脂斜面培养基上，置 37℃ 恒温箱中培养 16~18h 后，用 0.3% 甲醛盐水将菌苔洗下，制成浓悬液，再置 37℃ 恒温箱中 24h 以杀菌；

(2) 上述菌液进行无菌试验后用无菌生理盐水稀释至浓度为 9 亿/ml；

(3) 选择体重为 2~4kg 的健康雄性家兔，用上述菌液按表 1-1-3 剂量和程序进行耳静脉注射免疫。

表 1-1-3 抗菌血清的制备程序

日期 (天)	1	5	10	15
剂量 (ml)	0.25	0.5	1.0	2.0

(4) 末次注射后 4~6 天, 耳静脉采血 1ml 分离血清, 用上述菌液作试管凝集试验, 确定抗菌血清的效价, 一般凝集效价在 1:2000 以上即可放血, 分离血清后分装保存。

3. 免疫球蛋白的分离提取与纯化 盐析法 (salt fractionation)

【原理】

蛋白质在不同浓度的盐溶液中相对溶解度不同。血清 γ 球蛋白在一定浓度盐溶液中易于沉淀, 而白蛋白则不易沉淀, 据此可将二者分离。

【材料】

硫酸铵, 正常人血清, 28% 氨水, 生理盐水。

【方法】

(1) 配制饱和硫酸铵溶液: 取 500ml 蒸馏水, 加热至 70~80°C, 将 400g 硫酸铵溶于水中, 搅拌 20min, 冷却。硫酸铵结晶沉于瓶底, 上清即饱和硫酸铵。用 28% 氨水调节 pH 为 7.0。

(2) 用 5% 饱和硫酸铵提取血清中 β 、 γ 球蛋白: 方法是 1 份血清加 1 份生理盐水加 2 份饱和硫酸铵, 混匀后静置 30min, 离心 10000r/min, 10min, 将上清液 (含白蛋白) 去掉, 取沉淀物 (含 β 、 γ 球蛋白), 溶于少量生理盐水中。

(3) 用 33% 饱和硫酸铵提取 γ 球蛋白: 方法是将上述提取物 2 份加 1 份饱和硫酸铵, 其余操作同上。

(4) 将提取物再用饱和硫酸铵提取 2 次。

(5) 将提取物装入透析袋, 在生理盐水中透析, 也可用 Sephadex - G50 凝胶过滤, 以除去其中所含的硫酸铵。

【注意事项】

饱和硫酸铵必须逐滴加入, 边加边搅拌, 以防止形成团块或降低沉淀的特异性。

【结果】

经盐析法提取的蛋白质为粗提的免疫球蛋白, 若要获得纯化的免疫球蛋白, 必须经凝胶过滤或离子交换层析提纯。

【思考题】

1. 通过本试验你能否加深对抗原抗体概念的理解?
2. 以上试验在医学上有何用途?

(王宗军)

实验二 凝集反应

一、直接凝集试验

【目的】

1. 通过细菌与其相应抗体的反应，掌握玻片法和试管法凝集试验的原理。
2. 熟悉凝集试验的方法和临床意义。

【原理】

颗粒性抗原与相应抗体在适当的条件下相混合，直接出现可见的凝集小块，称为直接凝集反应。

【内容】

有玻片法和试管法两种操作技术。

(一) 玻片凝集试验

【材料】

1. 标本 任一常见细菌的平板或斜面培养物。
2. 试剂 与细菌对应的诊断血清（可用生理盐水作适当稀释以免发生前带现象）、生理盐水等。
3. 器材 玻片、接种环等。

【方法】

1. 于洁净玻片的一端加生理盐水 1 滴，另一端加诊断血清 1 滴。
2. 用接种环挑取待检细菌分别涂于生理盐水和待检血清中，充分混匀。
3. 室温下静置数分钟观察结果。

【结果】

生理盐水对照应不发生凝集，为均匀混浊的乳状液。在诊断血清中，细菌与相应抗体反应则出现肉眼可见的凝集块，为阳性结果。如与对照相同则为阴性。

本方法为定性试验，敏感性较低。但操作简便，反应迅速，目前仍然是细菌菌种鉴定和 ABO 血型鉴定的常规实验。

【注意事项】

1. 每一待检菌均需作生理盐水对照，当细菌发生 (S/R) 变异时，可发生自凝。对照发生凝集，试验结果无效。
2. 在玻片两端涂布细菌时，注意一定要先在生理盐水中涂布，后在诊断血清中涂，以免将血清误代入盐水中。
3. 试验后的细菌仍有传染性，应将玻片放入消毒缸内。
4. 做 ABO 血型鉴定时，室温过低（低于 10℃）可出现冷凝集，造成假阳性结果。

(二) 试管凝集试验（见肥达试验的内容）

二、间接凝集试验

【目的】

本试验以诊断伤寒的间接血凝为例，掌握间接血凝试验的原理，熟悉其方法及临床意义。

【原理】

将可溶性抗原吸附于一种与免疫无关的、有一定大小的载体微粒表面，再与相应抗体在适宜的条件下相互作用，由于抗原抗体反应而使颗粒出现肉眼可见的凝集现象，这种方法称为间接凝集试验。如将抗体吸附于颗粒表面用以检测抗原，则称为反向间接凝集试验，试验方法与间接凝集试验相同。实验室常用的载体有红细胞、胶乳颗粒、活性炭、SPA 菌体等。以红细胞为载体颗粒的间接凝集试验称为间接血凝试验。

【材料】

伤寒沙门菌可溶性抗原、抗伤寒沙门菌 O901 免疫血清、 2×10^8 /ml 绵羊红细胞悬液、 0.01mol/L pH 7.2 PBS。

试管、吸管、 37°C 水浴箱等。

【方法】

1. O 抗原的制备 将伤寒沙门菌 O901 接种于普通琼脂培养基上，置 37°C 培养 18~24h，用无菌生理盐水洗下，配成 1×10^{10} /ml 的菌悬液，置 100°C 水浴 2h， 3500r/min 离心 30min，吸取上清液，置 4°C 冰箱备用。

2. 致敏 SRBC 的制备 取抗原与等量 2×10^8 /ml SRBC 混合， 37°C 水浴 2h（每 15min 振荡一次），取出后离心用生理盐水洗 3 次，最后用 PBS 缓冲液配成 1×10^8 /ml 的致敏 SRBC。

3. 试验操作程序 按表 1-2-1 将 O901 抗血清用 PBS 作连续倍比稀释，然后加入致敏 SRBC 悬液，混匀后置 37°C 水浴 2h 观察结果。

表 1-2-1 间接血凝试验操作程序 (单位: ml)

管号	1	2	3	4	5	6	7	8 (对照)
PBS	0.9 _γ	0.5 _γ	0.5 _γ	0.5 _γ	0.5 _γ	0.5 _γ	0.5 _γ	0.5
	└→	└→	└→	└→	└→	└→	└弃去	0.5
O901 抗血清	0.1 _┘	0.5 _┘	0.5 _┘	0.5 _┘	0.5 _┘	0.5 _┘	0.5 _┘	
1%致敏 SRBC	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释度	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	-

【结果】

根据红细胞凝集现象，分别以“+”多少表示强弱程度：

“4+” 红细胞成片状凝集，均匀布满孔底，边缘不整齐或折叠。

“3+” 红细胞成片状凝集，有卷边或缺口，面积略小于“4+”。

“2+” 红细胞成片状凝集，面积较小，边缘较松散。

“+” 红细胞沉于管底，周围有少量凝集。

“-”红细胞沉于管底呈小圆点，边缘清晰整齐。

对照管呈阴性，测定管以出现“2+”血凝稀释度为该血清效价。

【注意事项】

1. 本试验所用红细胞为 SRBC 或人 O 型红细胞，新鲜红细胞致敏不宜长时间保存。实际应用时最好用醛化红细胞致敏，致敏后冷冻干燥可长时间保存。

2. 试验时一定要要有阳性、阴性及空白对照，以保证结果准确可靠。必要时可做凝集抑制试验，以确定凝集的特异性。

本法快速、敏感、简便，而且是定量试验。但不同批的致敏血球之间重复性差；解决的方法是一次做大量的醛化红细胞备用，减少批次的转换，同时加强质量控制。间接凝集试验在临床检验中应用广泛，主要用于检测抗病原生物的抗体，例如抗脑膜炎球菌、沙门菌、志贺菌、结核杆菌、肝炎病毒、流感病毒、血吸虫等病原体的抗体；也可用于检测自身抗体。

【思考题】

1. 何谓间接凝集试验？
2. 怎样才能正确做间接凝集试验？

三、间接凝集抑制试验

【目的】

掌握凝集抑制试验的原理，熟悉其方法和临床意义。

【原理】

间接凝集抑制试验 (agglutination inhibition)，是利用已知抗原致敏的颗粒与待测标本中可溶性抗原 (包括半抗原) 竞争有限抗体的经典血清学方法。先在特异性抗体中加入标本，再加入抗原致敏的载体颗粒，若标本中含有相应抗原，则与抗体结合，阻断了载体颗粒表面的抗原与抗体的结合，故不出现凝集为阳性结果。以妊娠免疫试验为例：

【材料】

孕妇尿、人绒毛膜促性腺激素 (HCG)、致敏的乳胶颗粒、抗人 HCG 和生理盐水等。
反应板或玻片、滴管、玻棒或牙签等。

【方法】

1. 所有试剂使用前均先放室温下预温。
2. 选择一块清洁玻片，平均分成 3 个格，并分别标上阳性、阴性及待测标本记号，若使用反应板，则选择 3 个孔注上相应的记号。
3. 吸取尿标本 1 滴置于玻片的中央格或反应板的中央孔，两侧分别加 1 滴正常人尿或生理盐水 (阴性对照) 和孕妇尿 (阳性对照)。
4. 在玻片上的 3 个格或反应板的 3 个孔内均加抗人 HCG 1 滴，轻轻摇动玻片，使其充分混匀，反应 1min。
5. 1min 后各滴加入 HCG 致敏胶乳 1 滴。
6. 用牙签搅动混匀后，缓慢摇动玻片 2~3min，在较强光线下观察结果。

【结果】

参见表 1-2-2 生理盐水对照侧应出现明显凝集颗粒，而加入尿标本的试验侧若亦呈现凝集，表明 HCG 阴性，如仍呈均匀乳白状则为 HCG 阳性。

表 1-2-2 胶乳妊娠试验

样本	待检尿液		孕妇尿液	正常人尿 (或 NS)
现象	凝集	不凝集	不凝集	凝集
结果判定	非妊娠尿	妊娠尿	阳性对照	阴性对照

【注意事项】

1. 待测尿液以晨尿为好，此时 HCG 含量最高，若不及时检测应将标本置冰箱冷藏。冷藏超过 24h 则应置 -20℃ 冻存。在使用前先经 37℃ 水浴并充分混匀。标本中若含血细胞或较多蛋白和细菌污染则不宜使用。
2. 所用试剂均应保存于 4℃，切勿冻存，使用前应摇匀。
3. 做间接凝集抑制试验时应注意标本及各诊断试剂加入的先后次序，必须设立阳性和阴性对照。结果观察时可置黑色背景下，亦可倾斜反应板或玻片于液体流动时观察。
4. 若出现非均匀漂浮状白色颗粒，可能系非特异性凝集，此时应将尿液离心后取上清重复试验或重新留尿液检测。

用该法诊断妊娠，既简便、特异性又强，阳性和阴性的符合率高；但敏感性较低，一般在妊娠妇女停经后 40 天左右方可测出 HCG。若在试验中使用抗 HCG β 亚单位的单克隆抗体，一方面可以减少与其他激素（促黄体生成激素、促卵泡激素等）的交叉反应，同时亦可提高试验的敏感性。近年来，临床上多应用胶体金检测 HCG 作“早早孕”诊断。

本法的临床意义是：①妊娠免疫诊断试验是临床常用的经典胶乳凝集抑制试验，孕妇尿中含有 HCG，故呈阳性反应，人工流产或剖宫术后无胎盘组织残留者，HCG 转为阴性。②绒毛膜上皮癌、葡萄胎及睾丸畸胎瘤病人尿中，HCG 含量远较正常妊娠尿液为高，尿液作 1:200 稀释后仍可呈阳性反应，术后可转为阴性，若仍为阳性应考虑手术不彻底或肿瘤已有转移。

【思考题】

1. 凝集抑制试验可用于哪些类别抗原的测定？
2. 在胶乳凝集抑制试验时如何进行质量控制？

(张业霞)