



全国高等医学院校检验专业试用教材

免疫学及免疫学检验实验技术



王钦富 主编

尹学念 主审



中国医药科技出版社

全国高等医学院校检验专业试用教材

免疫学及免疫学检验实验技术

王钦富 主编

尹学念 主审

中国医药科技出版社

登记证号:(京)075号

内 容 提 要

本书作为免疫学检验实验技术的专业书籍,是供高等医学院校检验专业本、专科共用教材。是全国近20所高等院校长期从事免疫学检验教学工作的教师和技术人员协作完成的,既反映了各院校教学经验、适于免疫学检验发展的需要,又与即将出版的卫生部统编理论教材相匹配。全书共计三十九项实验内容,系统、完整、科学、可行,技术类别全。

本书适于高等医学院校检验专业本、专科学生使用,也可供研究生、临床工作者和教师参考。

图书在版编目(CIP)数据

2W2A/06

免疫学及免疫学检验实验技术/王钦富主编.-北京:
中国医药科技出版社,1995.7
ISBN 7-5067-1415-9

I.免… II.王… III.①医药学:免疫学-医学院
校-教材②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(95)第 11071 号

*

中国医药科技出版社 出版
(北京海淀区文慧园北路甲 22 号)
(邮政编码 100088)

河北省满城县印刷厂 印刷
全国各地新华书店 经销

*

开本 787×1092mm $\frac{1}{16}$ 印张 8
字数 150 千字 印数 2001—5000
1995 年 9 月第 1 版 1997 年 5 月第 2 次印刷

定价:12.00 元

主 编 王钦富

副主编 刘 辉 许化溪

主 审 尹学念

编著者(按姓氏笔画为序)

马 杰 王爱兰 王 静 王钦富 王贤蕙

尹学念 宁淑香 吕世静 许化溪 刘恭植

刘 辉 刘慧彬 纪传珍 孙惠华 成 宏

成 雯 张金堂 张 丹 张逢春 张翠玲

严 俊 李忠花 吴水河 陈松涛 陈建华

杨 光 郑明忠 罗 红 胡 倩 南景一

桂炳东 高海玲 殷素岚 陶志华 曾常茜

鲁迎年 强美华 韩 慧 廖伟娇 翟登高

赛 红

编者的话

免疫学及免疫学检验教学在全国各高等医学院校检验专业已开展十余年,各院校积累了较丰富的理论及实验教学经验,其教学体系和教学内容开始从探索走向成熟。

1995年春,卫生部教材工作会议在上海召开,《免疫学和免疫学检验》本、专科理论教材纳入统编计划,实验教材暂未列入。急需一本能反映各院校成功教学经验、适应免疫学检验发展需要、并与即将出版的统编理论教材相匹配的实验教材。本书是在全国近20所高等院校同道们大力支持下,协作完成的。

参加本书编写的作者都是长期从事免疫学检验教学的教师和技术人员。其特点及使用说明如下:

1. 本书是高等医学院校检验专业本、专科共用教材。内容选材上以检验专业本、专科培养目标为依据。各院校根据本、专科不同特点(见下表)进行选用。每项实验的实验目的按此特点确定,正文中不再赘述。

	本科	专科
培养目标	检验医师(医学士)	检验技师(无学位)
理论	(1)成熟和较公认理论 (2)进展性、倾向性理论和结论	(1)成熟和较公认理论
技术	(1)技术理论 (2)当代技术为主,技术工艺条件,设计新技术能力	(1)成熟的技术原理 (2)熟练代表性方法
临床医学	(1)内外科疾病为主 (2)内科学疾病临床实习	(1)代表性疾病概述
实验诊断	(1)实验诊断技术评价 (2)实验诊断临床评价 (3)质控	(1)实验诊断技术评价 (2)质控
实验课	(1)项目多,技术类别全 (2)系统性强 (3)手动、半自动为主 (4)设计性实验 (5)病例讨论	(1)项目略少,技术类别全 (2)系统性强 (3)手动、半自动为主 (4)熟练常规方法

2. 本书力求系统性、完整性、科学性和可行性。技术类别全,兼顾疾病的免疫学检验,实验方法切实可行,提供数据准确可靠,方法评价中肯实际。

3. 实验顺序是按照实验技术的性质分类。每项技术每项实验单独分开,便于各层次选

用;由于各项实验之间的内在联系,教学组织者可将相关实验组合成一个系统实验进行教学。

4. 和即将出版的《免疫学和免疫学检验》统编教材相匹配,理论及实验内容衔接一致。

5. 本书吸收各院校实验教学改革科研成果,注重对学生各种能力的培养。

6. 本书实验项目共 39 项。其中免疫血清制备、直接凝集试验、间接凝集试验、间接凝集抑制试验、单向琼脂扩散试验、双向琼脂扩散试验、对流电泳、免疫转印技术、间接免疫荧光技术、ELISA 或 ABC-ELISA、酶标免疫组化技术、 CH_{50} 测定、E 花环形成试验、T 淋巴细胞 CD 亚群检测、补体依赖微量细胞毒试验或 MLC、IL-2 检测等 16 项为一级实验,其余 23 项为二级实验。按教学大纲规定,一级实验为必做项目,二级实验为选择性项目,各院校可根据具体条件取舍。

本书适于高等医学院校检验专业本、专科学生使用,也可供研究生、临床工作者和教师参考。

本书承蒙吉林医学院尹学念教授主审。大连医科大学杨廷彬教授、镇江医学院刘恭植教授、上海第二医科大学沈霞教授和大连大学医学院樊宝金教授也为本书提出了宝贵的意见。中国医药科技出版社为本书的出版给予了大力支持。在此一并表示衷心的感谢。

限于水平,书中定有不妥之处,望广大师生给予批评指正。

编者

1995 年 4 月

目 录

实验一	免疫血清制备	(1)
实验二	直接凝集试验	(7)
实验三	胶乳凝集试验	(10)
实验四	间接血凝试验	(12)
实验五	反向间接血凝试验	(14)
实验六	胶乳凝集抑制试验	(16)
实验七	协同凝集试验	(17)
实验八	单向琼脂扩散试验	(19)
实验九	双向琼脂扩散试验	(21)
实验十	对流免疫电泳	(23)
实验十一	单向火箭免疫电泳	(25)
实验十二	免疫电泳	(27)
实验十三	免疫转印技术	(29)
实验十四	速率散射浊度测定技术	(32)
实验十五	间接免疫荧光显微镜技术	(34)
实验十六	酶联免疫吸附试验——双抗体夹心法	(38)
实验十七	斑点酶免疫结合试验(斑点 ELISA)——直接法	(40)
实验十八	酶标免疫组化技术——间接法	(42)
实验十九	生物素-亲和素系统免疫酶技术——ABC-ELISA 法	(44)
实验二十	放射免疫测定技术	(46)
实验二十一	斑点免疫金渗滤试验	(48)
实验二十二	总补体溶血活性测定(CH ₅₀ 测定)	(51)
实验二十三	补体结合试验	(53)
实验二十四	溶菌酶测定	(57)
实验二十五	循环免疫复合物检测——PEG 比浊法	(59)
实验二十六	E 花环形成试验	(61)
实验二十七	T 淋巴细胞转化试验	(64)
实验二十八	T 淋巴细胞 CD 亚群测定	(68)
实验二十九	NK 细胞活性测定——乳酸脱氢酶测定法	(70)
实验三十	溶血空斑试验(PFC 测定)	(72)
实验三十一	巨噬细胞吞噬功能测定	(75)
实验三十二	中性粒细胞吞噬功能测定	(77)
实验三十三	硝基蓝四氮唑试验(NBT 试验)	(78)
实验三十四	补体依赖微量细胞毒试验	(80)
实验三十五	混合淋巴细胞培养	(83)

实验三十六	白细胞介素 I (IL-2)检测——生物学检测法	(85)
实验三十七	肿瘤坏死因子(TNF)检测——生物学检测法	(87)
实验三十八	人嗜碱粒细胞脱颗粒试验	(89)
实验三十九	病案讨论	(91)
附录一	免疫学试验常用溶液	(93)
附录二	离心力及其换算	(99)

实验一 免疫血清制备

【 实验原理 】

将抗原物质接种动物,可刺激机体发生免疫应答,产生抗体。经多次复种后,抗体效价高,持续时间长,通过免疫动物血清的分离即可获得高效价的特异免疫血清。制备高特异性、高效价的免疫血清是实验免疫学技术的基础。包括抗原制备、免疫动物、试血、放血、分装保存、抗体鉴定、分离与纯化等步骤。

【 试剂与器材 】

1. 实验动物 2~3kg 健康雄性家兔。
2. 菌种、SRBC 和人全血清等抗原物质。
3. NaN_3 、碘酒及酒精棉球等。
4. 手术台架、止血钳、大剪刀、小剪刀、纱布、胶布、大镊子、干棉花、柯氏瓶、毛细滴管、离心管、注射器、针头等。

【 操作方法 】

1. 抗原制备

(1) 细菌细胞抗原制备

① O(菌体)抗原(菌液)制备

a. 取伤寒杆菌标准菌株的光滑型菌落,接种于普通培养基(或 SS 琼脂平板培养基),均匀涂布,37℃ 温箱培养 24h,取出培养瓶,用适量生理盐水洗下菌苔,移入含无菌玻璃珠的三角烧瓶中,充分振摇使菌体均匀分布,置 100℃ 水浴 2~2.5h 杀菌及破坏 H 抗原,把菌悬液移入离心管,4000r/min 离心 10min,弃去上清液,菌体用无菌生理盐水洗涤,4000r/min 离心 10min,弃上清液,菌液做无(活)菌试验合格后,用无菌生理盐水稀释成 10 亿/ml,加 5% 石炭酸,即成 O 抗原。

b. 麦氏比浊管制备

试剂 1% BaCl_2 溶液, 1% H_2SO_4 溶液。

方法 按表 1-1 所示配制标准比浊管,封固,注明管号,备用。

表 1-1 麦氏标准比浊管的配制

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1% BaCl_2 (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1% H_2SO_4 (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

c. 稀释方法 取一定量制成的原菌液置于与标准比浊管口径相等的试管中,与标准比浊管比浊,可通过滴加稀释液(生理盐水)调整其浊度与某标准管相当。则原菌液细菌数/ml = 稀释倍数 × 标准比浊管相当菌数。例:取原菌液 0.5ml 加稀释液 9.5ml,浊度与 2 号

比浊管浊度相当,则原菌液细菌数=20×6亿/ml=120亿/ml。可进一步按免疫用菌液所需浓度算出应该加入稀释液量,以无菌生理盐水稀释。

②H(鞭毛)抗原的制备 在鞭毛典型的伤寒杆菌标准菌株划线接种培养的平板上,挑选典型光滑型菌落接种于普通培养基,均匀涂布,置37℃培养24h,取出培养瓶,用适量0.4%甲醛生理盐水洗下菌苔,移入无菌三角烧瓶,置37℃水浴24h(或4℃3~5d固定杀菌),将处理过的菌液进行无(活)菌试验,确证无活菌存在,用生理盐水稀释成10亿/ml的菌悬液,即成H抗原。于冰箱4℃保存备用。

(2)绵羊红细胞(SRBC)抗原制备 取抗凝或脱纤维蛋白的绵羊血液加倍量生理盐水,经2000r/min离心5min,吸去上清,再加2~3倍生理盐水,用毛细滴管反复吹吸混匀,以2000r/min离心5min,吸去上清,如此一共连续洗涤3次。最后一次可离心10min,红细胞密集管底,上清液呈无色透明,弃去上清液,管底即为洗涤过的红细胞(100%浓度)。根据需要配成不同浓度的红细胞悬液。

(3)免疫球蛋白G(IgG)抗原制备

①SPA菌稳定液制备 将No:1800株或Cowan I株金黄色葡萄球菌接种在大型扁形瓶的琼脂斜面上(NaCl 3g、Na₂HPO₄·12H₂O 2g、葡萄糖 1g、蛋白胨 10g、琼脂 25g、牛肉浸液 1000ml,调pH7.8),放37℃温箱中培养18~24h。次日用少量生理盐水洗下菌体,以4000r/min离心30min,将沉淀的菌体再用生理盐水洗2次,然后用0.5%福尔马林-pH7.4 0.01mol/LPBS制成10%(v/v)菌悬液,在室温下作用3h(或4℃冰箱中过夜)。将菌悬液加热56℃30min,迅速冷却,再用PBS洗3次,最后用含0.05~0.1%NaN₃的PBS制成10%(V/V)菌悬液,此液即为SPA菌稳定液,放4℃冰箱保存备用。

②人血清IgG致敏SPA菌液的制备 取正常人血清1ml加入10%SPA菌稳定液4ml混合后,置室温作用30min(中间振摇3~5次),然后用生理盐水洗菌液7~8次,沉淀菌体用生理盐水制成100亿/ml菌液,4℃下保存,以备免疫动物用。

(4)人全血清抗原制备 人全血清作为抗原免疫动物时,因其是可溶性抗原,常需加佐剂,提高免疫反应。

弗氏佐剂的制备与应用 先将羊毛脂与石蜡油按比例(羊毛脂1份,液体石蜡2~4份)混合,0.055MPa(8磅/英寸²)20min,冰箱保存备用。临用前与等量抗原混合,乳化后即成为弗氏不完全佐剂乳化抗原;若在其中加入2~4mg/ml卡介苗,则称为弗氏完全佐剂乳化抗原。乳化方法 为将佐剂与等量抗原混合,吸入一支5ml注射器,用约6cm塑料管连接,推动针管,使液体进入塑料管直至距开口端1cm处,另一人再连接一支5ml注射器于另一开口端,左手固定塑料管与注射器的连接处,右手交替推动针管。检查乳化情况可将佐剂乳化抗原滴于冷水表面,如完整而不散即为乳化完全。

2. 免疫方案

免疫方案因抗体种类不同而异。对各种抗体制备的免疫方案,众说纷纭,尚无固定格式。本文考虑教学实际诸多因素,力图操作时间统一,提出如下方案,所得免疫血清效价均较理想,仅供参考。

(1)细菌免疫血清制备方案

抗原 已制备的伤寒杆菌O抗原或H抗原(10亿/ml)。

动物 2~3kg 健康雄性家兔。

免疫程序 见表 1-2。

表 1-2 制备细菌免疫血清的免疫程序

日期	1	15*	22
途径	颈背部多点皮内注射	耳缘静脉注射	耳缘静脉注射
抗原剂量(ml)	1.5	1.0	1.5

*注 在第二次免疫(15d)时,为防止动物过敏死亡,可采取少量多次注射方法。

(2)SRBC 免疫血清(溶血素)制备方案

抗原 20%SRBC 悬液

动物 2~3kg 健康雄性家兔。

免疫程序 见表 1-3。

表 1-3 制备 SRBC 免疫血清的免疫程序

日期	1	15*	22
途径	颈、背部多点皮内注射	耳缘静脉注射	耳缘静脉注射
抗原剂量(ml)	1.5	1.0	1.5

*注 易发生过敏而死。脱敏方法:可以在静脉注射前先以少量抗原注入腹腔,1h 后再缓慢注入静脉。

(3)人 IgG 免疫血清制备方案

抗原 人血清 IgG 致敏 SPA 菌液(100 亿/ml)。

动物 2~3kg 健康雄性家兔。

免疫程序 见表 1-4。

表 1-4 制备人 IgG 免疫血清的免疫程序

日期	1	15	22
途径	皮下多点注射	耳缘静脉注射	耳缘静脉注射
抗原剂量(ml)	1.5	1.0	2.0

(4)人全血清免疫血清制备方案

抗原 人全血清

动物 2~3kg 健康雄性家兔。

免疫程序 见表 1-5。

表 1-5 制备人全血清免疫血清的免疫程序

日期	1	15	22
途径	背部多点皮内注射	耳缘静脉注射	耳缘静脉注射
抗原	弗氏完全佐剂乳化抗原	人全血清	人全血清
抗原剂量(ml)	1.5	1.0	1.5

附 家兔接种方法

接种前选择家兔的适当部位,去毛,碘酒或酒精消毒,接种后针头刺进处,应以酒精棉球轻轻按压片刻,以防注射物外溢。

(1)皮内接种法 去毛消毒后将皮肤绷紧,用 1ml 注射器接上最小针头,针头尖端斜面向上,平刺于皮肤内,缓缓注入接种物,此时皮肤应出现小圆丘形隆起,否则表示不在皮内。注射量一般为 0.1~0.2ml。

2ml。

(2)皮下接种法 注射部位多选择腹股沟、腹壁中线或背部。去毛消毒后,以左手拇指和食指将局部皮肤提起,右手将注射器刺入提起的皮下,然后左手放松,将接种物缓缓注入。此时,在注射局部皮肤出现片状隆起。

(3)腹腔接种 在家兔耻骨上缘约二指宽沿腹中线处,去毛消毒,抓住前后肢,使其头部向下,肠向横隔处垂下。接种者右手持注射器,左手绷紧注射处皮肤,然后刺入腹腔。回抽针心,无液体或气体抽出时,则将接种物注入。

(4)耳静脉接种 以两耳外缘静脉为宜。若作多次注射,应先从耳尖开始,以免因注射造成血栓,下次不能再使用该条血管。注射时,先将家兔固定,轻弹兔耳,并以酒精棉球涂擦,此时耳静脉怒张。接种者以左手拇指和中指夹住家兔耳部,以食指垫于耳外缘静脉下,右手持注射器刺入血管,缓缓注入接种物,可见血管颜色变白,还可见到接种物沿血管向近心端流动。如发现局部有片状隆起,接种物不易推入时,提示针头未刺入血管,应重新注射。注射完毕,针头拔出时,应先用酒精棉球按住刺入处,再拔出针头,继续压迫刺入处,并将兔耳竖起,以免溢血。

3. 试血及加强注射

在末次免疫后 5d,用相应抗原检测血清抗体效价。方法见相关试验。如细菌免疫血清效价大于 1:1600、人 IgG 和人全血清等可溶性抗原的免疫血清效价大于 1:1000、SRBC 免疫血清效价大于 1:10000,即可在第 7~10d 放血。如效价过低,可再加强注射。

试血时用量少,可从家兔耳静脉采血。方法是先摩擦刺激局部,使其充血,消毒后再涂少量凡士林以防止血液粘于皮毛而不易收集,用小刀将耳静脉割一小口,血液收集于小试管中,最后用干棉球压迫止血。

4. 放血和分离血清

一般采用颈动脉放血法。放血前为防止乳糜血形成应在 1d 前禁食。方法是先将家兔仰卧固定在解剖台上,让兔头下垂,使整个颈部伸直露出。不须麻醉,将毛剃净,局部以碘酒和酒精消毒后,沿正中线从下颌到胸骨柄切开皮肤约 10cm,将皮肤和皮下组织剥离,并且在切口上下作横切开,然后将两侧皮外翻掀开,钝性分离皮下组织,直至暴露气管前面的胸锁乳突肌,轻轻分开胸锁乳突肌,在肌束下面,靠气管两侧可明显暴露颈动脉,将颈动脉完全分离露出。在颈动脉近心端、远心端用二把止血钳钳住(近心端止血钳头部用细塑料管包裹,避免损伤动脉),再用一把止血钳在靠近远心端止血钳位置钳住血管,在远心端二个止血钳间用剪刀剪断,然后翻转中间止血钳使血管呈弧形,用小剪刀在靠近中间止血钳处剪去一块血管皮,手持中间止血钳将颈动脉切口引入无菌烧瓶或柯氏瓶中,放开近心端止血钳,血液即喷入容器内。将动物固定架后端抬高,轻轻按压胸腹部,以提高放血量。2.5kg 家兔可放血 80ml。室温血液凝固后,用无菌毛细滴管沿瓶壁边缘将血块与瓶壁分离,先放在 37℃ 2h,再放 4℃ 过夜,使血清充分析出。然后用无菌毛细滴管收集血清。若最后部分血清混有红细胞,应离心除去。

5. 免疫血清特异性鉴定、吸收和效价滴定

用相应的已知抗原鉴定待检标本。可溶性抗原的抗体鉴定常采用双向琼脂扩散试验和免疫电泳技术;细菌抗体采用凝集试验。方法见相关试验。

如免疫血清特异性不纯,可用适当抗原吸收,除去其它抗体,提高免疫血清的特异性。吸收时先在免疫血清中加入适当抗原物质,混合后置 37℃ 作用 30~60min,再置 4℃ 24~

48h, 离心沉淀, 吸取上清液即可。

免疫血清于吸收前后均应滴定效价, 尤其吸收后更应滴定效价并加以注明, 供用时参考。

6. 分装与保存

同种免疫血清混匀, 无菌操作分装到无菌青霉素小瓶中, 每瓶 3~5ml。贴好标签, 注明免疫血清种类(全称)、效价、班级、学号、年月等。

抗血清保存方法 ①冷冻干燥, 制品内水份不高于 0.2%; ②低温保存, 放在 -20℃~-40℃, 防止反复冻融; ③4℃保存, 加 0.1%~0.2%NaN₃防腐。

每 2 人为一组, 制备一种免疫血清, 自行保存抗原与接种用具, 利用业余时间, 按免疫程序进行免疫。

作业 每位同学在学习资料检索、论文写作的基础上, 写出一篇免疫血清制备的论文。进行一次科研能力的综合锻炼。

【 讨论 】

1. 方法评价

以抗原免疫动物制备的免疫血清, 其实质是由多种抗体所组成的混合物。因每种抗原分子常有多个抗原决定簇, 可刺激动物产生多种性质不同的抗体。另外动物本身血清中也含有多种抗体, 所以称之为多克隆抗体制剂。其特异性是相对于某些抗原而言, 应用时不出现交叉反应, 即为合格。其临床应用难以实行严格的质量控制。但多克隆抗体制剂的免疫血清制备方法简单易行, 一般实验室均能制备。如有条件, 可制备单克隆抗体, 其特异性、效价及产量都好于多克隆抗体。

2. 临床意义

免疫血清在临床免疫学检验方面应用十分广泛。以诊断为目的的免疫学检验实质上是抗原抗体反应, 以已知抗原检测未知抗体, 以已知抗体检测未知抗原, 因此免疫血清是不可缺少的。虽然临床诊断用免疫血清大多有商品供应, 但部分诊断血清和用于科学研究工作的免疫血清常常需自行制备。

3. 注意事项

(1) 选择合适的动物进行免疫极为重要。要求抗原和动物种系差异较远, 动物健康适龄, 最好雄性。由于个体差异较大, 所以每次免疫最好选择 2~4 只家兔。绝大部分抗原都可用家兔制备免疫血清, 而胰岛素和酶类多用豚鼠制备免疫血清。

(2) 颗粒性抗原一般不加佐剂, 可溶性抗原可以加佐剂, 效价可提高 5 倍, 但也要考虑到如果抗原中有微量杂蛋白存在, 即使是 0.005mg 氮, 亦可由于使用了佐剂而产生非特异抗体。另外佐剂易使接种部位溃烂, 易使动物发生实验性自身免疫病(佐剂病)。为防止感染, 有时在佐剂中加抗生素, 但抗生素有免疫抑制作用, 如能注意无菌操作, 就不必加人。

(3) 免疫原剂量应根据抗原性强弱、分子量大小和动物大小等因素决定。如大动物, 蛋白质类抗原剂量约每只 0.5~1mg, 而小动物应为 0.1~0.6mg。剂量过大, 易造成免疫耐受而失败。有人认为小剂量多次免疫注射有助于提高抗体对抗原的亲合力。珍贵抗原可采用淋巴结或脾内注射法, 抗原只需 10~100μg。一般情况下采用多点注射, 可选择足掌、

膈窝淋巴结周围、颈背部、颌下、耳后等处皮内或皮下。其中皮内注射易引起细胞免疫反应,对提高效价极为有利。但天冷时皮内注射很困难,因佐剂乳化抗原粘度较大;用不加佐剂的抗原静脉注射,多次免疫后,抗体效价高,维持时间长。

(4)免疫间隔时间虽无固定格式,但一般首次免疫和第二次免疫间隔时间为10~20d,第二次免疫后,每次间隔7~10d;对半抗原的免疫间隔时间要求较长,达30~50d,免疫次数多为5~8次。较多次注射后,仍无抗体产生,则应更换动物。

(大连大学医学院 王钦富)

实验二 直接凝集试验

一、玻片凝集试验

【 实验原理 】

颗粒性抗原与相应抗体直接结合,在一定条件下,出现肉眼可见的凝集小块。玻片法是用一滴已知抗体的诊断血清和一滴待检菌液或红细胞悬液在玻片上混匀,短时间内用肉眼观察凝集结果。

【 试剂与器材 】

1. 诊断血清 用于细菌鉴定的诊断血清效价应在 1 : 1600 以上,使用时用生理盐水做 1 : 20 稀释,以免发生前带现象(prozone)。
2. 待检细菌 为琼脂斜面培养物。
3. 生理盐水(pH>6.0)、玻片、接种环。

【 操作方法 】

1. 于洁净玻片的一端加诊断血清一滴(约 25 μ l),另一端加生理盐水一滴(约 25 μ l)作对照。
2. 用接种环取待检菌琼脂斜面培养物分别涂于生理盐水和诊断血清中。
3. 轻轻转动玻片,使其充分混匀,静置 5min,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,如细菌抗原凝集成小块、周围液体澄清为阳性反应,说明抗原抗体相对应;如与对照相同,为阴性。

【 讨论 】

1. 方法评价
本方法简便、快速,多为定性检查。敏感性较低。
2. 临床意义
主要用于鉴定菌种和分型,也用于测定人类红细胞 ABO 血型。
3. 注意事项
 - (1)每一待检菌均须作生理盐水对照,如对照凝集则表示细菌(粗糙型)发生自凝,试验无效。
 - (2)判定结果时,必须防止干燥。混匀面积不要摊开过大。
 - (3)血型测定,室温要保持在 20 $^{\circ}$ C 左右,若低于 10 $^{\circ}$ C 以下,易出现冷凝集现象而造成假阳性的错误判断。
 - (4)鉴定沙门氏菌时,一般原则是先用多价诊断血清检测。如为阳性,再用单价因子诊断血清进行分群或定型。
 - (5)有些细菌表面常有一层表面抗原,如伤寒沙门氏菌的 Vi 抗原及志贺氏菌属的 K 抗原,能阻止菌体抗原与诊断血清的凝集,而导致错误的判定。此时,应将菌悬液煮沸 1h,以破坏其表面抗原,然后再作试验。若为伤寒沙门氏菌,亦可用伤寒杆菌 Vi 诊断血清直接

检测。

(7) 试验后的细菌仍有传染性，故在判定后应及时放入消毒缸内。

二、试管凝集试验

【 实验原理 】

颗粒性抗原与相应抗体直接结合，在一定条件下，会出现肉眼可见的凝集现象。试管法是用定量抗原悬液与一系列递倍稀释的待检血清混合，静置后，根据每管内颗粒抗原凝集的程度，以判定待检血清中有无相应抗体及其效价。

【 试剂与器材 】

1. 诊断菌液 伤寒杆菌 H 或 O 诊断菌液。
2. 待检血清 用生理盐水 1 : 10 稀释。
3. 生理盐水、小试管、试管架、吸管等。

【 操作方法 】

1. 取洁净小试管 8 只列于试管架上，依次编号，每管内加入 0.5ml 生理盐水。
2. 吸取待检血清 0.5ml 加入第 1 管，连续注吸 3 次，正确方法是：吸液时，吸管应深入液面下，以防止进空气。注液时应离开液面，以防产生气泡或使液体溢出试管。为此，可连续上下移动试管，以配合注吸的需要。充分混匀后，吸出 0.5ml 加入第 2 管，同法混匀后，再吸出 0.5ml 加入第 3 管。依次类推，连续稀释到第 7 管。最后，从第 7 管吸出 0.5ml 弃去。第 8 管不加血清为生理盐水对照管。这样从第 1 管至第 7 管血清的初始稀释度为 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，是免疫学实验中最常用的一种稀释法。
3. 每管加诊断菌液 0.5ml，此时每管内的血清稀释度又增加 1 倍，分别为 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320, 1 : 640, 1 : 1280, 1 : 2560。
4. 各管摇匀后，置室温或 37℃ 24h 后，观察结果。操作程序见表 2-1

表 2-1 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
1 : 10 待检血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	弃去 0.5
诊断菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释度	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	对照
室温或 37℃, 24h								
结果								

【 结果 】

判断凝集试验的结果，要有良好的光源和黑暗的背景。先不振摇，观察管底凝集物和上清浊度。然后，振动或用手指轻轻振击管壁使凝集物悬浮，观察凝块和悬液浊度。

1. 首先观察盐水对照管，应无凝集现象，管底沉积呈圆形，边缘整齐，轻轻摇则沉积菌

分散均匀混浊。

2. 再观察试验管 伤寒杆菌 O 抗原凝集物呈颗粒状, 轻摇时不易升起和离散, 往往粘附于管底。H 抗原凝集物呈棉絮状, 沉于管底, 轻摇即易升起和离散。根据凝集的强弱程度, 可将实验结果分为 5 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, 轻摇时也可见明显的颗粒、薄片或絮状。

“2+” 中等强度, 细菌部分凝集, 液体较混浊, 管底有少量凝集物呈颗粒状。

“+” 弱, 细菌仅少量凝集, 液体混浊, 管底凝集呈颗粒状, 细小不易观察。

“-” 不凝集, 液体混浊度与管底沉积物同对照管相似。

3. 血清抗体效价 以出现“2+”凝集反应的最大血清稀释度作为待检血清中的抗体效价。

4. 根据凝集效价的判定方法报告待检血清对伤寒杆菌 O 抗原(TO)或伤寒杆菌 H 抗原(TH)的凝集效价。如果第 1 管仍无凝集现象, 应报“ $<1:40$ ”; 第 7 管仍显“2+”或更强凝集, 应报“ $>1:2560$ ”。例如: 试管凝集试验 TO 1:160, TH 1:320。

【 讨论 】

1. 方法评价

本实验是一种经典的定量凝集试验。敏感度不高, 受诊断菌液的细菌种类和数量影响。特异性受诊断菌液不稳定, 易自凝的影响。本方法操作较简单, 在某些情况下仍使用。

2. 临床意义

本方法主要用以检测血清中是否有某种特异性抗体及其含量(效价), 以协助临床诊断或供流行病学调查研究。例如: 诊断伤寒和副伤寒的 Widal 反应(肥达氏反应)、诊断斑疹伤寒、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(瑞特氏反应)。

3. 注意事项

(1) 抗原抗体在比例适当时, 才能出现肉眼可见的反应。如果抗体浓度过高, 则无凝集物形成, 此为前带现象, 需要在判定结果时加以鉴别。

(2) 判定结果时, 应在暗背景下透过强光检查。

(3) 注意温度、pH、电解质、振摇对本试验结果的影响。水浴箱的水面勿高出试管内液面, 这样有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。

(大连大学医学院 张丹 王钦富)