

医学检验诊断试剂的制备与应用

唐伟国 主编

医学 检验诊断试剂的 制备与应用



上海科学技术文献出版社

医学检验诊断试剂的制备与应用

主 编 唐伟国
副主编 巫向前 韩 松
主 审 陶义训

编/写者 (按姓氏笔划为序)

尹 行 古鑫松 吴长龙 杨振修 周润琦
张丽民 胡天喜 倪信忠 黄贞华

上海科学技术文献出版社



医学检验诊断试剂的制备与应用

唐伟国 主编

*

上海科学技术文献出版社出版发行
(上海市武康路2号 邮政编码 200031)

全国新华书店经销

上海科技文献出版社昆山联营厂印刷

*

开本 787×1092 1/16 印张 11.75 字数 290,000

1996年10月第1版 1996年10月第1次印刷

印数: 1—1 000

ISBN 7-5439-0915-4/R · 264

定价: 20.00 元

目 录

第一篇 总 论

第一章 绪 论	1
第 1 节 历 史	1
第 2 节 分 类	1
一、临床化学试剂	1
二、免疫学诊断试剂	2
三、微生物学诊断试剂	2
四、肿瘤诊断试剂	2
五、其他	3
第二章 诊断试剂制备规范	4
第 1 节 概 述	4
第 2 节 定 义	4
第 3 节 人 员	5
第 4 节 厂 房	6
一、基本要求	6
二、生产厂房	6
三、专用厂房	7
四、仓储厂房	7
五、低温厂房	7
第 5 节 环境卫生	8
一、内环境卫生要求	8
二、外环境卫生要求	8
第 6 节 原材料	8
一、来源与采购原则	8
二、原材料的质量控制	9
第 7 节 生产操作	9
一、生产前的准备与计划	9
二、设备、器材及容器	9
三、防止污染和混批的措施	9
四、生产人员的配置	10
五、生产工艺规程	10
六、生产记录	10
七、生产记录的保存	10

第8节 包装和贴签	10
第9节 使用说明书	11
第三章 诊断试剂的质量要求	12
第1节 诊断试剂的质量标准	12
一、灵敏度	12
二、特异性	13
三、精密性	13
四、稳定性	13
五、简便性	14
六、安全性	14
七、经济性	15
八、评价诊断试剂试验的标准	15
九、主要免疫诊断试剂质量标准	16
第2节 检定实验室的基本要求	17
一、人 员	17
二、实验室及其装备	18
三、生产过程中的质量检定	18
四、成品检定	18
第3节 检定实验室职责范围与权限	18
第4节 检定实验室的管理	19
第5节 检定实验室人员培训与要求	19
一、人员鉴定管理	20
二、仪器及设备	20
三、技术资料及其保存	20
第四章 试剂生产的标准化	21
第1节 原材料的质量控制	21
第2节 半成品和最终产品的质量控制及检定	22
一、批内差异	22
二、批间差异	22
第3节 试剂检定的标准	22
第五章 开发新诊断试剂的依据	24
第1节 HIV 感染的血清学检测	24
第2节 HIV 感染的血清学标志物	25
第3节 过筛试验的试剂	25
第4节 确证试验的试剂	26
第六章 诊断试剂生产许可的申报	27
第1节 生产许可的申请程序	27
第2节 体外诊断试剂生产企业验收标准	27
一、人 员	27

二、厂 房	28
三、设 备	28
四、卫 生	28
五、质 检	29
六、生产和质量管理文件	29
七、销 售	29
第3节 诊断试剂的申报过程与要求	29
一、新诊断试剂审批办法	29
二、新制品申请资料内容	30
三、其 他	30
第4节 诊断试剂申报品种范围及程序	31
一、申报品种范围	31
二、申报时间及步骤	31
附件一：临床检验体外诊断试剂生产申请表	32
附件二：临床检验体外诊断试剂检定申请表	36
附件三：临床检验体外诊断试剂技术暂行要求	37
第七章 诊断试剂的销售	44
第1节 销售方法与渠道	44
第2节 销售记录	44
第八章 诊断试剂发展前景	45
第1节 分子生物学技术的应用	45
第2节 放射性同位素的替代	45
第3节 生物工程技术的应用	46
第二篇 临床化学检验试剂	
第九章 标准参考物质	47
第1节 标准参考物质的分类	47
一、决定性方法及一级参考物质	48
二、参考方法和二级参考标准	49
三、常规测定方法和质控物质	50
第2节 标准参考物质的制备	51
一、临床化学标准液的配制	51
二、定值质控血清的制备	53
三、酶参考物质的制备	53
四、质控血清的制备	57
五、高脂质控血清和胆红素质控血清的制备	58
第十章 临床化学试剂盒	59
第1节 临床化学试剂盒的质量控制	59
第2节 常用临床化学试剂盒的制备	60

一、丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒	60
二、尿素测定试剂盒	61
三、葡萄糖测定试剂盒	62
四、胆固醇测定试剂盒	62
五、甘油三酯测定试剂盒	62
六、肌酐测定试剂盒	63
七、总胆红素测定试剂盒	63
八、总蛋白测定试剂盒	64
九、白蛋白测定试剂盒	64
十、尿酸测定试剂盒	64
十一、肌酸激酶测定试剂盒	65
十二、 γ -谷氨酰转肽酶测定试剂盒	65
十三、钙测定试剂盒	65
第十一章 工具酶的制备	66
第1节 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的制备	66
一、提 取	66
二、纯 化	67
三、活力测定	68
第2节 葡萄糖氧化酶	68
一、黑曲霉制备法	68
二、点青霉制备法	69
第3节 胆固醇氧化酶	70
一、提 取	70
二、纯 化	70
三、活力测定	70
第4节 甘油-3-磷酸氧化酶	71
一、提 取	71
二、纯 化	71
三、活力测定	71
第5节 胆红素氧化酶	72
一、提 取	72
二、纯 化	72
三、活力测定	72
第6节 谷氨酸脱氢酶	72
一、提 取	72
二、纯 化	73
三、活力测定	73
...第7节 肌氨酸氧化酶	73
一、提 取	73

二、纯 化	74
三、活力测定	74
第 8 节 尿酸酶	75
一、提 取	75
二、纯 化	75
三、活力测定	75
第 9 节 维生素 C 氧化酶	76
一、提 取	76
二、纯 化	76
三、活力测定	76
第 10 节 过氧化物酶	77
一、提 取	77
二、纯 化	77
三、活力测定	77
第 11 节 己糖激酶	78
一、提 取	78
二、纯 化	78
三、活力测定	79
第 12 节 甘油激酶	79
一、发 酵	79
二、纯 化	79
三、活力测定	80
第 13 节 胆固醇酯酶	80
一、提取及纯化	80
二、活力测定	80
第 14 节 脂蛋白酯酶	81
一、提 取	81
二、纯 化	81
三、活力测定	81
第 15 节 脲酶	82
一、大豆提取	82
二、用变形杆菌生产	83
第 16 节 肌酐酶	83
一、提 取	83
二、纯 化	84
三、活力测定	84
第 17 节 肌酸酶	85
一、提 取	85
二、纯 化	85

三、活力测定	85
第十二章 生物传感器	86
第 1 节 生物活性物质的固定化方法	86
一、载体	86
二、固定化方法	86
第 2 节 酶膜的制备	87
一、尿素传感器及脲酶膜的固定化	87
二、葡萄糖氧化酶膜的制备	87
三、白蛋白与葡萄糖氧化酶共同固定的酶膜及葡萄糖传感器	87
四、醇氧化酶膜	87
五、乳酸氧化酶的尼龙网膜	88
第十三章 发光分析技术的试剂制备	89
第 1 节 虫荧光素酶发光法测定 ATP	89
一、试剂制备	89
二、操作	90
三、注意事项	90
第 2 节 黄嘌呤氧化酶发光体系测定 SOD 的活性	90
一、试剂制备	91
二、操作	91
第 3 节 T_3 的酶联标记及发光酶免疫测定	91
一、试剂制备	92
二、测定方法	92
第十四章 基因诊断试剂的制备	94
第 1 节 分子探针试剂的制备	94
一、样品前处理	94
二、探针的制备和标记	94
三、杂交	94
四、放射自显影	95
第 2 节 聚合酶链式反应试剂的制备	95
一、用于 PCR 的 DNA 样品制备	95
二、DNA 扩增	96
三、产物的分析	96
第十五章 色原底物的应用	97

第三篇 免疫学诊断试剂

第十六章 免疫沉淀反应测定	99
第 1 节 免疫浊度法	99
一、基础知识	100

二、试剂的制备	100
第2节 凝胶内免疫沉淀反应	101
一、单向扩散法	101
二、双向扩散法	101
第十七章 免疫吸附剂	102
第1节 固相载体	102
一、载体的基本要求	102
二、载体的性质	102
三、载体的选择	103
四、载体的质量检定	103
第2节 配 体	104
一、配体的纯度	104
二、配体的活性	105
第3节 配体的固相化	105
一、物理吸附法	105
二、化学交联法	106
三、间接包被法	107
四、洗涤和封闭	107
第4节 免疫吸附剂的稳定化	108
一、稳定剂	108
二、稳定化处理	108
三、包装处理法	108
第十八章 固相酶免疫测定	109
第1节 酶结合物的制备	109
一、HRP-IgG 结合物的制备	109
二、ALP-IgG 结合物的制备	111
第2节 酶结合物的稳定化	112
一、基本要求	112
二、稳定化处理方法	112
第3节 底物的稳定化	113
第十九章 快速酶免疫测定	114
第1节 浸测式试剂条法	114
一、原 理	114
二、试剂的制备	114
三、测定操作	116
四、发展前景	116
第2节 酶免疫渗滤法	116
一、酶免疫浓缩法	116
二、试剂制备	116

三、内在质控	118
第3节 直接过滤法	119
一、试剂的制备	119
二、测定操作	119
第二十章 均相酶免疫测定	120
第1节 酶扩大免疫测定技术(EMIT)	120
一、原理	120
二、试剂制备	121
三、测定操作	122
四、应用	122
第2节 克隆化酶供体免疫测定(CEDIA)	122
一、原理	123
二、试剂制备	123
三、测定操作	124
四、应用	124
第二十一章 粒子免疫测定	126
第1节 间接血凝试验	126
一、采血	126
二、红细胞的固化	126
三、致敏红细胞的制备	127
第2节 自身红细胞凝集试验	128
一、原理	128
二、试剂的制备	128
三、测定操作	129
第3节 免疫胶乳测定	129
一、胶乳的合成	129
二、胶乳的性质	133
三、免疫胶乳的制备	133
四、影响免疫胶乳质量的因素	134
五、测定方法	135
六、发展前景	137
第4节 免疫胶体金测定	138
一、胶体金的性质和制备	138
二、免疫胶体金的制备	139
三、测定方法	140
第5节 其他粒子标记免疫测定技术	142
一、非金属溶胶免疫测定法	142
二、明胶粒子免疫测定法	143
三、脂质体免疫测定法	143

四、染料免疫测定法	144
-----------------	-----

第四篇 微生物学诊断试剂

第二十二章 细菌染色	145
第1节 染色液的配制	145
一、常用染料种类及其溶剂	145
二、染色液配制原则及基本过程	146
三、常用染色剂原液的配制	146
四、常用的单染色染色液	146
五、特殊染色的染色液	147
六、染色液配制的注意事项	147
七、染色液的质量控制	147
第2节 染色技术及在细菌检验中的应用	147
一、染色的基本步骤	147
二、细菌染色操作的注意点	149
三、染色技术及其用途	149
第二十三章 细菌培养	153
第1节 培养基的制备	153
一、培养基的主要成分	153
二、原料的选择与规格	154
三、培养基制备的基本过程	154
四、几种常用基础培养基的制备	154
五、营养培养基的制备	155
六、干燥培养基的制备	155
七、制备培养基的注意事项	156
八、质量控制	156
第2节 特殊培养基的制备及其应用	157
一、增菌培养基	157
二、选择增菌培养基	157
三、鉴别培养基	158
四、专用培养基	158
第二十四章 细菌检验中的生物化学反应试剂	160
第1节 试剂制备	160
一、试剂制备的基本过程	160
二、生化试剂的制备	160
三、制备的注意事项	161
四、试剂的质量控制	161
五、生化试验的质控菌株	162
第2节 试剂在细菌检验中的应用	163

一、呼吸酶类试验	163
二、糖类代谢试验	163
三、蛋白质及氨基酸代谢试验	164
四、有机酸盐利用试验	165
五、抑制生长试验	165
六、其他试验	166
第二十五章 药敏试验的试剂及应用	167
第1节 试剂制备	167
一、药物原液的制备	167
二、稀释液的制备	168
三、干燥抗菌药物滤纸片的制备	168
四、培养基的选择	168
五、菌液的制备	169
六、制备过程中的注意事项	169
七、质量控制	170
第2节 药敏试验及其应用	171
一、药敏试验中选用的抗菌药物	171
二、药敏试验的操作	171
三、药敏试验的质量控制	172
第二十六章 细菌检验鉴定系统	173
第1节 概 述	173
第2节 制 备	173
一、系统的形式	173
二、培养基及试剂的制备	173
三、装载培养基的容器	173
四、干 燥	174
五、附件配备	174
六、系统制备的注意事项	174
七、系统制备的质量控制	174
第3节 商品系统试剂及其应用	174
一、被检菌的预检	174
二、选择检验鉴定系统种类	174
三、系统使用方法	176
四、系统应用的注意事项与质量控制	176

第一篇 总 论

第一章 绪 论

第 1 节 历 史

医学史上最早的诊断试剂虽无确切的考证,但 1895 年意大利的 Sclavo 首先研制成抗炭疽血清,这种血清既可用于治疗,又可用于诊断。它可与热处理过的炭疽菌液滤过性抗原呈特异性沉淀反应。1896 年,Widal 利用伤寒病人恢复后血清与伤寒杆菌发生的凝聚反应,作为诊断伤寒病的方法,这种方法目前仍在使用。因此,19 世纪末是现代诊断试剂萌芽期。其后,随着不同新病菌的发现和细菌培养基的改进,各种新的诊断试剂不断出现。至本世纪 30 年代,各种用于细菌性感染的诊断试剂包括抗血清、菌液及诊断用噬菌体已逐步完善。

病毒学诊断试剂的发展稍后于细菌学诊断试剂。1965 年,Blumberg 发现乙型肝炎表面抗原,对病毒学诊断试剂的发展起了巨大的推动作用。肿瘤诊断试剂的发展更晚些。接着临床化学诊断试剂开始应用于临床检验。

试剂盒约诞生于本世纪 60 年代。诊断项目的检测一般需用多种试剂组份。商品的零星试剂组份制备标准不一,有些组份还需使用者自己准备,这不仅为使用者带来不便,更使测定结果误差很大,完整试剂盒的生产就应运而生。血液学诊断试剂如测定凝血因子的试剂盒较早出现于市场,其后免疫学、生物化学、病毒学等各种项目的检测试剂盒不断地涌入市场。很多厂家、实验室、研究所,乃至个人实验室都研制各种各样的试剂盒。这不仅大大推动了诊断试剂的研究,也为医疗卫生工作作出了显著贡献。

第 2 节 分 类

诊断试剂的品种繁多,用途各异,根据应用范围和本身的性质,大体上可以分为下列几大类。

一、临床化学试剂

这类试剂品种很多,它们是用于测定人体某些体液或排泄物(如血液、尿液等)中的某些化学成份的试剂。用这类试剂可测定人体的新陈代谢的生物化学过程正常与否,并可用于观察药物或其他治疗手段的疗效。常见的这类试剂有测定血清酶类试剂、葡萄糖和蛋白质试剂等。

二、免疫学诊断试剂

免疫学诊断试剂是指测定人体细胞免疫和体液免疫功能的诊断试剂,如测定人体免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 和 IgE 的试剂;测定血清中某些补体成份如 C3、C4 和 B 因子等含量或活性的试剂。各种 T、B 淋巴细胞功能的诊断试剂,以及自身免疫性疾病的诊断试剂,如类风湿因子、抗核抗体、抗甲状腺球蛋白抗体、抗心肌抗体的检测试剂等。那些利用免疫学原理和方法制备的诊断试剂并不包括在本类试剂中。

三、微生物学诊断试剂

病毒学诊断试剂

目前这类试剂大都利用免疫学方法检测病毒抗原或其相应抗体,视其存在与否来诊断病毒感染。例如乙型肝炎病毒表面抗原、e 抗原及核心抗体的诊断试剂、丙型肝炎抗体诊断试剂、鼻咽癌 EB 病毒(SIgA)及肾病综合征、出血热检测试剂,还有 HIV(人类免疫缺陷病毒)的抗体和其 P24 抗原诊断试剂等。

细菌学诊断试剂

这类试剂也是利用免疫学特异性抗血清与其相关抗原相结合的原理测定细菌或其代谢产物,或用已知细菌抗原或其分解产物测定相应的抗体,这类已知的抗血清(抗体)或细菌抗原就是细菌学诊断试剂。

用已知细菌或其抗原测定抗体的诊断试剂有(肥达氏反应的)伤寒“O”、“H”菌液和副伤寒甲、乙、丙型杆菌菌液,有外斐氏反应的变形杆菌 OX19、OX2、OXK 等诊断菌液,有凝集试验用的布氏杆菌诊断菌液。

用已知抗体血清诊断病原菌或相关抗原的试验有:沙门氏菌属诊断血清、志贺氏菌属诊断血清、霍乱弧菌诊断血清、脑膜炎奈瑟氏菌诊断血清、钩端螺旋体诊断血清、绿脓杆菌诊断血清等数十种。

四、肿瘤诊断试剂

肿瘤的实验室诊断即肿瘤标志物的检测试验。肿瘤细胞在其癌基因的作用下在癌变过程中常可表达或产生抗原物质或生物活性物质,这些抗原活性物质通常存在于患者体液或排泄物中,它们统称为肿瘤标志物。这种肿瘤标志物于正常或良性组织中几乎不存在或其含量极微,但在癌症患者体液或排泄物中含量甚高。

肿瘤标志物有:

1. 特异性抗原或相关抗原:特异性抗原如甲胎蛋白(AFP)是原发性肝癌的特异性抗原,癌胚抗原(CEA)则是结肠癌的特异性抗原,还有胰癌胎抗原(POA)等;肿瘤相关抗原有关转铁蛋白、 α -2 微球蛋白及前列腺酸性磷酸酶等,虽然正常组织也含这种抗原,但一旦癌变则其含量超过正常值。

2. 能被特异性单克隆抗体所识别的肿瘤抗原:乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌和胃癌等,都能被相应的特异性抗体所识别。

3. 癌基因及其产物:利用分子生物学方法检测癌基因或其产物,目前采用 DNA 探针技术

已可检出 50 多种癌变基因及其编码的产物。

4. 酶和同功酶:正常细胞和组织恶变为癌细胞和肿瘤组织的生物学过程中,原有的特异酶和同功酶的活性大大降低乃至消失,代而出现一些胚胎型同功酶及异位酶,如消化系统的胰腺癌、结肠癌、胃癌和食道癌的患者血清谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性甚高,这种酶也是肿瘤标志物。肿瘤标志物诊断试剂通常采用分子生物学(DNA 探针)、免疫血清学、组织化学和体内定位等技术。

五、其 他

红细胞血型系统如 ABO、RH、MN 等分型试剂和白细胞 HLA 分型试剂,各种妊娠试剂及体内微量元素和 T3、T4、TSH 等检测试剂也广泛用于临床诊断。

第二章 诊断试剂制备规范

第1节 概 述

医用诊断试剂是在实验室内检测患者有无疾患的科学工具,检测结果正确与否直接影响到医师对患者的医治,而诊断试剂的质量包括试剂的灵敏度、特异性、稳定性、重复性、批间差异等,这些因素又将直接影响诊断结果,因此要保证诊断试剂生产过程中每道工序乃至每个微小环节都必须有全面的质量管理。70年代起,测定和分析人体体液的各种免疫试剂盒逐步问世,很多临床实验室的工作人员非常乐意采用这类试剂盒,因为这可避免各实验室自己制备试剂而造成测定结果的差异。很多药品生产厂家、研究所和私人试验室也积极研制出各类诊断试剂盒并使之逐步完善,以进行大规模商业化生产,这对医疗卫生事业作出不可忽视的贡献。

试剂盒是一组特定的试剂和材料,文明生产和组合是一个复杂的程序,需要有相当的专业知识和丰富的实践经验,现代诊断试剂的生产和质量管理应与常用药品生产的规范一致,整个生产过程中其操作必须按国家规范进行,决不允许无规范杂乱无章进行。

每种诊断试剂都必须有制造和检定规程,这种规程可以是国际组织(如WHO)颁布,也可以是国家规程(如中国生物制品规程二部——病毒类诊断试剂),此外,还可以有诊断试剂研制单位(工厂、公司、研究所)内部的规程。规程中应包括试剂制备的程序、原材料质控要求、半成品、成品的检定标准、保存条件及有效期等。

诊断试剂最终产品的质量必须在生产过程中建立,因为在整个生产周期内如能自始至终坚持试剂生产的规范,并按规定抽检半成品及成品,这对于每批试剂的质量必将起到保证作用。为此诊断试剂的生产和检定必须规范化操作,其人员、厂房、设备、原材料乃至环境卫生都有特定规范和要求。

第2节 定 义

诊断试剂

检测相关抗原、抗体或机体免疫状态的实验诊断试剂以及用化学方法检测机体代谢功能正常与否的化学试剂统称诊断试剂。简单地说:凡用于检测各种疾病或机体功能的试剂统称诊断试剂。试剂盒是一组试剂和材料,人们可按其说明书规定的程序进行操作。根据WHO的GMP规范,诊断试剂可用于人或兽的疾病检测,因而也属药品范畴。因此,它们在生产和销售过程中必须遵循药品生产管理规范。诊断试剂的生产指一种诊断试剂或试剂盒的全部操作,包括缓冲液配制、抗原抗体的提纯、标记、包被、最佳工作浓度的选择、检定、包装和贴标签等。

原材料

凡试剂生产过程中使用的物质统称原材料,它们可以是活性物质(如辣根过氧化物酶)或非活性物质(如酶标反应板),各种化学试剂乃至普通水等也可称为原材料。