

临床检验学讲座

R446
SDS
2-029

山东省人民医院编

1078

PDG

目 录

甲种胎儿蛋白(AFP)放射免疫火箭电泳在临床的应用	(1)
绒毛膜促性腺激素的测定及临床应用	(9)
电子血球计数器使用情况	(16)
心导管检查实验分析的临床意义	(27)
碱性磷酸酶染色检查的临床应用及有关实验室影响因素 的探讨	(36)
高脂类血症	(39)
血清蛋白分类区带电泳法在临床上的应用	(57)
浆膜腔积液之检验	(69)

甲种胎儿蛋白(AFP)放射免疫 火箭电泳在临床的应用

山东省人民医院检验科 李景存

近几年来甲种胎儿蛋白在血清中的浓度变化,已是诊断原发性肝细胞癌不可缺少的实验,因为非癌肝脏疾患患者,血清中AFP也有增加,所以不是肝癌的特异性试验。但其专一性。目前临床诊断肝癌对血清中AFP的改变越来越被重视。自从1944年pedersen氏先在胚胎和新生动物血清中发现胚胎特异蛋白。这种蛋白质在薄膜电泳、元盘电泳分析中位于白蛋白与 α_1 球蛋白之间。但 α_2 球蛋白也在这个位置,所以必须用免疫的办法加以肯定。

自从1957年 Bergstirond 在人胚胎中也发现有这种蛋白是胎儿血清的正常组织成份。所以这种蛋白质称为AFP是比较正确的。但是于1965年在原发性肝癌血清中发现AFP增加,经过研究等电点4.75,分子量为65,000—70,000紫外吸收高峰在278m μ ,其他理化指标(包括沉淀系数、免疫化学的活性、热失活动力学等)的测定与胎儿血清中的AFP性质完全相同。但有人说肝癌血清中AFP在免疫电泳中比胎儿血清中AFP泳动稍慢。后来在男女生殖细胞中都被检出,所以AFP是卵黄囊细胞产生的一种蛋白质,是胎儿血清中的正常组成部分,约6周的胎儿血清中AFP开始出现,以后逐渐增加直至16周左右达到高峰以后又逐渐下降。天津人民医院报道10例3—5月的妊娠妇女,AFP含量为72—1000Ng/1ml,7例足月妊娠妇女AFP水平为65—226Ng/1ml,用放射免疫火箭电泳法测定21例1—9月妊娠妇女其中11例AFP浓度在60—1000Ng/1ml,另10例则在50Ng/1ml以下。文献报道婴儿出生后一般在2周左右降至正常人水平。我们在工作曾取过足月分娩新生儿脐带血清5例,则其含量在30000—60000Ng/1ml,如果AFP半衰期在3—5天,婴儿出生后5周才可降至正常水平。

一、临床意义

1. AFP与原发性肝癌的诊断价值:原发性肝癌细胞产生AFP已被公认,肝癌病人血清中AFP检出已成为诊断原发性肝癌不可缺少的一种方法。琼脂扩散法,对流电泳法阳性率在70.0%放射免疫电泳法提高到85%以上,而同位素放射免疫测定法又比放射免疫火箭电泳法阳性率更高。

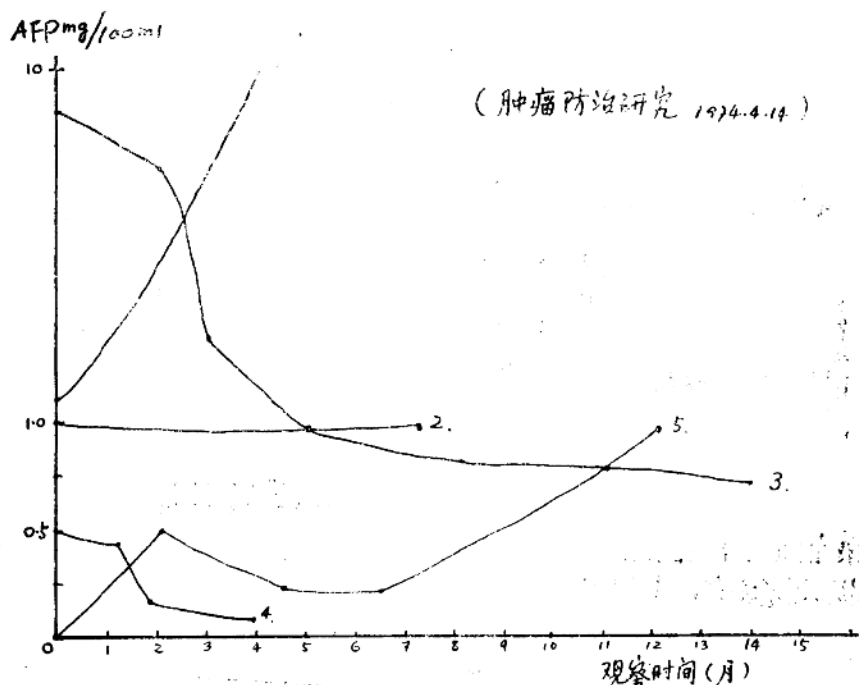
根据肝癌病人血清中AFP动态变化大致可以分为5种类型:

- (1)持续上升型:占53.3%——病情逐渐恶化。
- (2)相对稳定型:占13.3%——持续增高。

(3) 持续下降型: 占14.7%。

(4) 迅速下降型: 为手术治疗后病例。

(5) 马鞍型: 占10.7%。无肝病症状普查中AFP阳性, 未经治疗转为阴性6个月



后又转为阳性, 病情恶化。所以AFP浓度与病程发展及疗效有密切关系, 手术或化疗疗效明显, AFP下降有的可达正常, 药物治疗一般不明显。目前用放射免疫火箭电泳法, 普查可发现早期原发性肝癌, 已确诊的病人不仅无临床症状, 同位素扫描仍为正常。这是因为瘤体甚小之缘故, 由于同位素定位技术上发展较慢, 尚未能证实血清AFP浓度与肿物大小的确切关系。但结节型肝癌的血清AFP浓度最高, 其次为块状型, 肥大型较低。按组织细胞分类: I级肝癌细胞分化接近正常细胞, 血清AFP检出率较低, II级者则由于分化极差已失去类似胚胎肝细胞的机能, 血清中AFP检出率也较低, 所以临床发现严重肝癌病人, 死前2月内AFP突然下降病例。我院内科医生的邻居典型的肝癌AFP正常, 1个月死亡。III级癌细胞可以认为是和胚胎肝细胞相似的幼稚细胞, 产生AFP较多检出率最高。

肝外癌肝内转移癌: 有报道消化系肿物, 尤以胃胰的转移性肝癌中有部分病人血清AFP含量升高。肿瘤研究(74·4·20)报道41例转移性肝癌, 37例AFP<20Ng/1ml 4例在20—300Ng/1ml。

关于原发性肝癌的诊断标准: 确切的标准很难规定, 目前一般按AFP400Ng/1ml作

为诊断界线,但是正常人仅小于 $25\text{Ng}/1\text{ml}$, $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 以下的检出者结合临床不是不可作出诊断,而在 $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 以上的结合临床及其他检查仍可排除原发性肝癌。动态观察AFP的变化对鉴别急性肝炎,慢性肝炎活动等肝脏疾患具有重要的意义。而且对肝癌病人判断疗效和予后尤其手术效果观察都有很大帮助。

关于原发性肝癌患者血清中AFP最高浓度问题:一般对临床诊断仅用浓血清作放射免疫火箭电泳,只要片子上出现蘑菇阴影,报告 $1000\text{Ng}/1\text{ml}$ 以上满足临床诊断而已。我们曾作过5例血清稀释后再做测定所谓求得其“真值”,最低为 $3500\text{Ng}/1\text{ml}$,最高的为 $5920\text{Ng}/1\text{ml}$ 。如属观察动态变化的血清,以求出真正含量为好。尤其对疗效及予后观察更为重要。

2. 非肝癌性肝内疾患AFP变化:

(1) 急性肝炎:急性肝炎血清中AFP可以增高,而且“一过性增高”,1971年艾贝尔夫提出急性肝炎患者AFP的消失大约需要2个月左右时间,但与病情变化有关。1973年重田辛二郎认为急性肝炎AFP上升最高的时期也是谷丙转氨酶开始下降肝细胞转入修复的时期。1974年西尔弗氏也发现急性肝炎常在血清谷丙转氨酶达到高峰后的5—16天出现AFP高峰,随后下降。1977年山医学报奚氏译文中:急性肝炎血清中AFP与G.P.T、AKP的最高浓度无关。乙型肝炎抗原阳性者AFP增高检出率88.9%,乙型肝炎抗原阴性的AFP检出率仅36.8%。乙型肝炎病毒(HBV)或称丹氏(Dane)颗粒是在肝细胞中产生,有人设想肝癌细胞与HBV的存在有关。肝癌细胞产生AFP。所以这些说法似乎互相支持的论调。并说:肝病患者血清中AFP出现和卵圆形样细胞增生的时间一致,通过荧光抗体在肝脏患者的活检组织的卵圆形样细胞中看到存在AFP。肝细胞变性坏死继续再生时出现的卵圆形样细胞,所以,AFP在肝病中一过性增高是由于卵圆形样细胞增生的关系。我们在工作中用G.P.T $82-400\text{u}$ 血清20例,作放射免疫火箭电泳测定AFP含量 $100\text{Ng}/1\text{ml}$ 以上的仅有4例,2例 $40\text{Ng}/1\text{ml}$,16例 $20\text{Ng}/1\text{ml}$ 以下。所以G.P.T增高的血清,AFP并没有平行关系。上海瑞金医院同位素室用放射免疫法测定2例急性肝炎病人血清AFP变化,每月测定一次,AFP随病情的好转逐渐下降,而复发后再次上升,因此对低水平含量的AFP肝病患者特别是 $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 以下的多次测定结合临床症状体征进行动态观察对肝癌鉴别诊断、疗效观察、判断予后都有价值。

(2) 慢性肝炎和肝硬化:上海瑞金医院同位素室用放射免疫法测定AFP,报道慢性肝炎60例仅有一例在 $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 以上,42例在 $25\text{Ng}/1\text{ml}$ 以下,其他在 $25\text{Ng}/1\text{ml}$ 至 $200\text{Ng}/1\text{ml}$ 。肝硬化60例,38例 $25\text{Ng}/1\text{ml}$ 以下, $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 以上仅有一例,100到 $300\text{Ng}/1\text{ml}$ 的有7例。所以60—70%慢性肝病患者AFP在正常水平,而少部分虽增高仍在低水平,很少超过 $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 界线。个别病历特别是慢性肝病有活动时可能增高超过 $400\text{Ng}/1\text{ml}$ 。我们在工作中有记录2例,住院号214105第一次 $530\text{Ng}/1\text{ml}$ 随着病情好转半月复查一次,第三次转为正常水平。另一例住院号217557第一次 $470\text{Ng}/1\text{ml}$ 仍是第三次复查AFP转为正常水平。说明慢肝活动时AFP可增高,并随病情好转而恢复正常。

1974年肿瘤防治研究用放射免疫火箭电泳法普查发现7例非恶性肝脏病,AFP高于正常值通过一定时期的追踪检查都在2—4周内转为阴性。所以慢性肝病少数病例可以

放射免疫法对各种肝病AFP阳性检出率%

作 者	正常值	肝 炎			肝 硬 化	原发性肝细胞性肝癌
		急 性		慢性或迁延性肝炎		
		无黄疸性	黄 疸 性			
瑞金医院	≤25	16.7(10/60)	11.7(7/60)	30(19/60)	35.7(22/60)	88.9(40/45)
户泽辰雄		38.8(21/54)		31(25/81)	27(38/41)	93(108/115)
重田辛二郎	≤15	34(18/53)		41.2(14/34)	41.3(18/39)	100(31/31)
Silver·H·K·B 1973	≤20	54.5(6/11)		0(0/5)	10(1/10)	94.5(18/19)
Silver·H·K·B 1974	≤20	31.2(40/128)				

表中括号内数据为检出例数/总例数

1975年放射免疫年会资料

AFP增高，特别有活动性慢性肝病为一过性增高，只要动态观察即可与肝癌鉴别。并有指示予后价值。

3. 肝外肿瘤疾患AFP变化:用荧光抗体法在卵巢胚胎性癌的组织中可发现AFP,目前已肯定男女生殖系统的肿瘤如睾丸瘤卵巢瘤等。文献报道患者血清中AFP可以升高。特别畸胎瘤及性腺胚胎性癌患者血清中AFP浓度升高。肿瘤被全部切除后一月内消失,倘若以后重现则有转移或瘤体复发。我们在工作中接受妇科住院病人2例诊断为卵巢畸胎瘤。一例纵膈肿瘤畸胎瘤,一例卵巢癌消化系统转移,一例双侧卵巢畸胎瘤变性术后。用放射免疫火箭电泳测定血中AFP皆为正常水平。天津人民医院报道二例畸胎瘤,一例恶性畸胎瘤肝转移患者血清中AFP也在正常水平。7例卵巢癌中有一例血清AFP 200Ng/1ml。关于这类疾病患者血清中AFP的增高阳性率临床资料不多。

另外消化道肿瘤如胃癌、胰腺癌等也有报道血清中AFP增高。天津人民医院报道一例胰腺癌肝转移其AFP含量为500Ng/1ml,胰头癌一例血清中AFP1000Ng/1ml以上手术后转为正常。本实验室检查2例胃癌病人血清中AFP皆为正常。总之肝外肿瘤病人血清AFP可以增高尤其肝内转移者,但是AFP增高的阳性率如何有待今后共同总结。

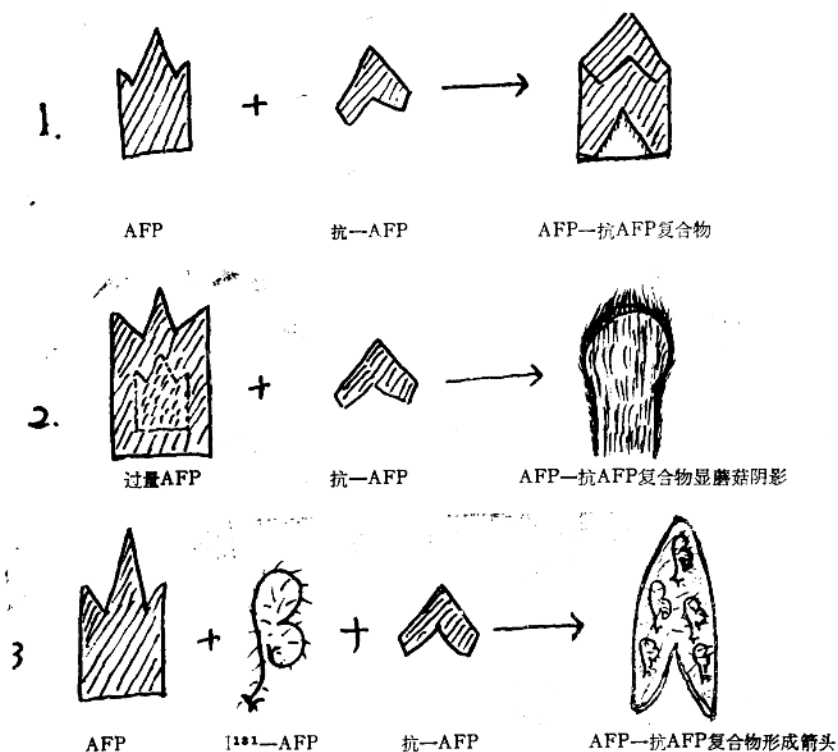
二、放射免疫火箭电泳技术

放射性同位素参于免疫反应的分析方法,是目前生物化学及免疫学应用在临床的新技术。此法根据标记抗原特异性参入原理结合放射免疫火箭电泳术形成的方法。因为有其简便稳定微量特异性强灵敏度高等独特优点,从而成为医学基础中进行研究的有力工具。放射免疫火箭电泳术作为临床诊断原发性肝癌已是不可缺少的诊断方法。1971年 Sizaret等氏报告双抗体放射免疫火箭电泳定量测定甲胎蛋白,灵敏度为15—20Ng/ml。所谓双抗体就是在测定样品琼脂板上加入适量兔抗人甲胎蛋白抗体,电泳后,再向琼脂板上涂布一层I¹²⁵I标记的羊抗兔丙种球蛋白抗体放置一定时间形成三种蛋白质相结合的抗原抗体复合物。我们实验室采用I¹²⁵I标记AFP抗原单抗体法放射免疫火箭电泳。最小检出量为12.5Ng/ml。但一般条件下25Ng/1ml以下呈影欠佳。此种方法灵敏度比

琼脂扩散法高100—500倍，我们在扩散，免疫对流电泳阴性血清28份中用放射免疫火箭电泳方法测得一例800Ng/ml。也有报道扩散法，对流电泳法阳性血清最低浓度为500—700Ng/1ml。所以放射免疫火箭电泳若用于普查，能发现早期肝癌患者。

(一) 基本原理:

1. AFP 为高分子蛋白质是完全抗原，刺激机体可以产生抗体，并能在体外与相应抗体发生特异性结合反应。所以AFP 与抗AFP 在一定的比例等条件下发生反应产生新的免疫复合物的沉淀。示意图



2. 在放射免疫火箭电泳术中AFP浓度高时，和定量的抗AFP比例不适合，不能形成清晰的免疫复合物新生物。过量的AFP抗原使免疫复合物发生一定程度的复溶，过量的游离抗原在电场中继续前进直至达到抗原抗体合适比例时形成清晰的免疫复合沉淀物。而游离抗原消失，沉淀峰的高度和抗原浓度呈比例关系，故可同样方法处理标准计算定量。在实际操作时，因电泳载体及时间的限制不能达到抗原抗体合适比例时，出现冲刷现象，呈现边缘模糊的蘑菇阴影。欲求其AFP最终浓度必须将未知标本稀释不同比例重新操作电泳，所得含量乘以稀释倍数求得最终结果。

3. 电泳载体为琼脂板在一侧打成元孔，加入一定量的未知血清或标准抗原，并加

入 I^{131} AFP, 在电场中同时向阳极泳动。因加入极微量的保持原有抗原活性及放射性的标记抗原引入被测样品孔内, 在电场作用下一起泳动共同与抗体组成免疫复合沉淀物。这种沉淀物内的标记抗原只能有选择地掺入到相应的免疫体系内形成相对的集中, 因此具有高度的特异性, 此种现象称为“品格”参入。

4. 抗原抗体免疫沉淀反应中, 所生成的抗原抗体复合物太少, 肉眼看不见, 采用掺入放射性同位素标记抗原。借放射性使感光胶片上的卤化银感光后经显影剂作用生成黑色暗影, 而未感光的卤化银被定影剂脱去, 因此黑色的火箭头暗影代表免疫复合沉淀物的形状和所在的位置。这就是放射免疫火箭电泳术的基本原理。

(二) 方法简介

取 6×13 厘米玻璃板置水平位。沸水溶化 1% 的琼脂巴比妥缓冲半固体, 再冷至 $54 \sim 56^{\circ}\text{C}$, 取 25 毫升加 1% 抗体巴比妥缓冲液 0.25 毫升, 混匀制板, 在已凝固的琼脂板长边一侧打成 12 孔, 孔径为 4 毫米, 间隔 4 毫米, 封底。抗体总稀释度为 1:10000, 每孔加入 25 微升待查血清或标准 AFP 液, 随即加入约 1 微升 I^{131} AFP, 含 AFP 约 0.2 毫克, 放射性约 4000cpm (脉冲)。在电压 5 V/厘米电场强度下, 电泳 3 小时左右。巴比妥缓冲液 pH8.6, 离子强度 0.025, 不漂洗, 在 80°C 干燥后冷却, 使琼脂面和感光片紧贴包好。曝光 8 小时以后, 显影 5 分钟, 定影 15 分钟, 自来水洗 15 分钟后观片。

(三) 观片

观察结果读片是作出准确诊断报告的关键。首先观察片子显影是否清楚。要求火箭头暗影边缘清晰, 高浓度标准和低浓度标准的火箭头高度比例合适。否则应重操作或重新感光显影。

1) 在样品孔前沿有半月型的致密黑影, 见此情况可报告为 20Ng 以下/ml, 正常水平, 不必计算出真实微克数。

2) 显影有冲刷现象出现蘑菇阴影, 即可报告 1000Ng/ml 以上 (浓血清) 结合临床作出实验室诊断。必要时将浓血清稀释 5 倍、10 倍后重新操作, 计算出最高含量。这对疑难病历动态观察, 正确诊断或疗效观察很有价值。

3) 计算报告含量时, 有报告从样品孔前沿量起。我们按照元孔中心点到火箭头峰尖锐减处清晰点, 测其高度与标准高度开比例计算。

4) 有异常图形, 如上部增宽但不呈蘑菇阴影, 或火箭头后部空白区大而明显, 有指示含量较高, 可能与操作技术条件不佳之影响有关, 必要时复查。

5) 实验室诊断: 应结合临床症状、体征其他检查情况下诊断或动态观察后作出诊断。

(四) 方法学中的若干技术问题

1. 关于重复性问题:

抗原抗体复合物沉淀峰的高度与抗原浓度, 琼脂板中抗体浓度有关。在固定抗体浓度, 电场强度, 琼脂浓度琼脂板厚度及样品孔位置等因素。按同位素样品标准计算法所得结果重复性好, 我们多次实验证明最大误差不超过 $\pm 10\%$ 。1974 (4, 16 页) 肿瘤防治研究介绍总的误差 $\pm 20\%$ 。他是按标准曲线法计算。我们随机统计 8 次, 400Ng/ml 火

箭头清晰，标准在琼脂的边孔测定和在中间孔测定其火箭头的高度最大相差40毫米，平均相差20.2毫米，若以平均值作为计算基础，误差最大的20毫米，误差最小的2.5毫米，总平均误差占总平均值的10.1%。这一误差的主要原因是琼脂板边缘电压比中间电压大，同条件下，边缘形成的火箭头高度比中间火箭头形成的高度大，所以曲线计算法误差大。

2. 测定过程中影响因素：

①琼脂浓度品种选择及琼脂板厚度：目前我们采用日本进口琼脂配成1%浓度，以巴比妥缓冲液离子强度0.025的为溶剂。这是比较好的琼脂，好溶化，在沸水中煮20分钟，溶化透亮即可。市场售的食用琼脂（俗称洋菜）纯度不同，必须净化，除去灰尘盐类低分子化合物及含氮化合物。净化方法：将琼脂剪碎自来水浸洗过夜，再用蒸馏水洗两次倒掉洗液，配成3%左右水溶液，放水浴中加热溶化再冷却凝固，去掉下层杂质再溶化，冷却凝固，切成3—5立方毫米小块，蒸馏水中浸泡三天，每天换水数次，清洁后可放入封蔽瓶中，加入0.01%抑硫汞延长冰箱保存时间。用时配成1%琼脂巴比妥缓冲液。如上海出品的琼脂粉可按3%浓度水溶液溶化凝固去杂质同样处理。据我们试验后两种国产琼脂可以应用。但电泳速度比日本的稍慢，有反方向移动现象。目前虽然琼脂的化学结构尚不清楚，但据说它含有醚基硫酸根，遂使琼脂成为一种强酸性的物质，一方面造成严重的电渗现象，另一方面硫酸根又能与某些蛋白质相互作用，使电泳速度受到很大影响。可能降低琼脂浓度。琼脂在净化过程中最后用弱碱性磷酸盐缓冲液冲洗，这样对电渗现象及电泳速度有所改善。

另外琼脂板的厚度也是影响因素之一，较厚电泳倾向慢，火箭头较低。较薄倾向快，但加样品太少，火箭头形成欠佳，并易破碎，灵敏度降低等弊病。本室采取25ml溶化琼脂液，6×13厘米玻璃板制成厚约1.5厘米琼脂板比较合适。

②打孔：在6×13厘米长边，距边缘5厘米处打成一排12孔，比平行沿宽边打成两排孔优越，试验证明同条件下前者电泳速度快。火箭头形成仍然清晰，显影没有互相干扰的可能。

③电泳：琼脂板放在电泳槽内，边缘以双层纱布搭在缓冲液内，以1V/1cm平衡20—30分钟。然后以4V/1cm电泳4小时即可。样品电泳长度约150mm。若在夏天3—3.5小时即可。这与槽内湿度温度有关。若按8V/cm电泳3小时，10V/cm电泳2.5小时，仍然形成良好的火箭头。如电压太高，虽然时间可以再缩短，但抗原抗体反应不完全，火箭头形成欠佳。

④漂洗干燥：琼脂板电泳后如放在生理盐水中漂洗过夜，可将不结合的游离 I^{131} 脱掉，显影更清晰，但费时太长。不漂洗直接放在烤箱内烘干，使温度逐渐升高到80℃—100℃，约1.5小时即可干燥。或放在电炉上部30—50公分高处烤干亦可。但是温度太高琼脂沸腾，琼脂板烤裂等。使 I^{131} 升华，降低放射性延长感光时间。火箭头断裂无法测量结果。

⑤包片曝光显影：在琼脂干膜面和X光片紧贴，（或核子乳胶）再加一片玻璃板压紧，用黑纸包好，用夹子夹在两边，或用X光暗盒更好。在包片时，感光片和琼脂干膜放在一

起,动作要迅速。如果加入的同位素稍浓,尤其是游离 I^{131} 高时,易于造成模糊的火箭头重影,致使试验前功尽弃。显影一般在 $18-20^{\circ}\text{C}$ 的显影剂中5分,定影 $15-20$ 分钟,冬天时显影延长到10分钟,或用温水将显影剂加热至 18°C 。夏天只要显影2分钟即可。曝光时间随着 I^{131} AFP的放射性减弱而曝光时间延长。一般一大头针,相当于 0.5 微升应用液。 I^{131} AFP放射性为 $4000-6000\text{cmP}$,曝光 $6-8$ 小时。但是标记 I^{131} AFP浓液一次不宜稀释成应用液。因为 8.1 天为一个半衰期,经过几个衰变期后加入 0.5 微升放射性不够。多加样品孔又盛不下,影响试验顺利进行。所以新标记的浓液拿来后不必稀释,用时可以根据总放射性计算,少加。一般新标的 $I^{131}\text{AFP}$ $0.1\text{Ng}\sim 4000\text{cpm}$ (脉冲)用微量注射器加 $0.2-0.3$ 微升,曝光 $4-8$ 小时以后即可。

关于抗体滴度及抗原标准化问题:

放射免疫火箭电泳,抗原抗体的合适比例直接影响检测方法的灵敏度,重复性,火箭头峰值的高低。抗体相对太多,火箭头矮,抗原太多时,有溶解火箭头的现象,有可能误认为假阴性。所以每批抗体开始用时应先找出抗体的滴度是提高试验准确性的关键问题。就是将稀释不同浓度的抗体与稀释不同浓度的AFP血清按照试验方法交叉试验,求出形成沉淀火箭头最清晰峰值最高而且AFP浓度最大的抗体稀释度作为合适抗体滴度。本室用北京生物制品所出品,将原抗体稀释成 1% 作为应用液。上海六院检验所出品,将原抗体稀释成五十分之一为应用液。标准抗原和抗体都可以买到,一般不需自造。也不必纯化。购买的抗原作为I级抗原标准,用来鉴定未知的脐血清。求出脐血清AFP的浓度作为II级标准,保存冰箱备用。

三、结 语

上述关于放射免疫火箭电泳测定,血清中AFP浓度及其正常人、孕妇在生理情况下AFP的产生和变化;原发性肝癌及肝内疾患,肝外肿瘤血清中AFP变化的临床意义;放射免疫火箭电泳新技术在应用中的若干问题。根据目前手头资料和实践经验综合写成本文。有些问题可能不正确,希同志们提出批评。另外关于抗原抗体的制造、提纯,放射性同位素的标记等有关技术乃是不同专业的工作分工,我们没有实践经验,故未有叙述。

绒毛膜促性腺激素的测定及临床应用

血凝抑制实验测定HCG的评价

山东省计划生育指导所 孙慧清
山东省人民医院中心实验室

妊娠时胎盘分泌绒毛膜促性腺激素(简称HCG)。测定HCG对诊断妊娠和鉴别生理或病理性妊娠,配合计划生育科研工作具有重大意义。目前国内测定HCG方法有四种:蟾蜍试验、胶乳试验、血凝抑制试验、放射免疫试验。现广泛采用的雄蟾蜍试验法,其准确率虽可达90—98%,方法亦较快速简便,但动物的反应性可受季节影响且可能发生自发排精或注射后动物死亡等情况影响实验的进行及其准确性,此方法仅限于做定性实验,不能定量测定尿中HCG的含量。胶乳试验敏感度在5000 iu/L,并且较多出现假阳性、假阴性,给临床带来诊断的困难。放射免疫试验是六十年代初发展起来的最理想测定法,可测量毫微克和微微克的水平,但要求设备人力技术较高,尚不能在临床上普遍使用。

近年来随着免疫学的进展,开始了蛋白质类激素的免疫学测定。而Swienlzyńska·Wide氏等运用血球凝集抑制试验测定HCG⁽¹⁾⁽²⁾。该方法作为妊娠诊断辅助方法:其阳性正确率为96.2—99.4%;阴性正确率为99.5—100%。在末次月经后33天即能得到阳性结果。雄蟾蜍试验阳性正确率为70—94.3%;阴性正确率为99.1—100%。故免疫学妊娠试验的正确性及敏感度较蟾蜍为高⁽³⁾。且在正常早期妊娠例中HCG含量较低时,免疫学妊娠试验的阳性率明显高于蟾蜍试验,故初步体会免疫学妊娠试验有以下优点:

1. 方法简便反应迅速 2—4小时可以出结果。准确性敏感度高,适用于常规的妊娠试验。

2. 此方法能半定量的测定尿中HCG的含量。所以对临床上鉴别正常与异常妊娠,观察先兆流产治疗情况,以及滋养叶细胞疾病诊断及治疗的观察都具有独特优点。

3. HCG抗血清及HCG致敏羊血球一次处理妥善保存于冰箱内,可使用数月不需过多实验动物。

4. 免疫学妊娠实验反应恒定,不受季节气候的影响。标本加热后,免疫法结果不受影响。

血凝抑制试验测定HCG的方法

一、血凝抑制试验的原理

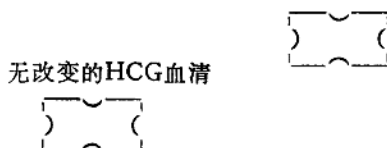
测定方法是应用抑制羊红血球的凝集反应。根据免疫学原理,某些蛋白质(抗原)注射至动物体内,可引起其血清内产生抗体,当这类抗体与抗原相遇时即可产生凝集反应,这种凝集不能观察到,但如将抗原吸附于血球上,则抗原抗体凝集时即能见到血球

凝集。如果在含抗体的血清内先加入抗原中和以后再加入致敏血球则不再发生凝集，此即称为血球凝集抑制反应。在此实验中抗原是人体绒毛膜促性腺激素，抗体是家兔经HCG免疫后的血清，致敏血球是羊红血球经鞣酸处理后吸附HCG的血球，用以中和抗体的抗原是孕妇的尿（内含HCG）。

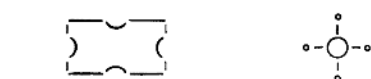
凝集和凝集抑制反应的图解：

血凝抑制试验：阴性

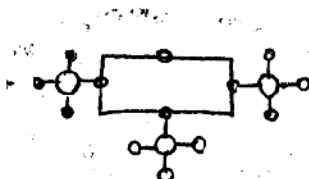
(1) 非妊娠尿（无HCG）+ 抗HCG血清 →



(2) 无改变的抗HCG血清 + HCG致敏血球 →



凝集反应



凝集反应的底部：

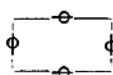


血凝抑制试验：阳性

(1) 孕尿（内含大量HCG）+ 抗HCG血清 →



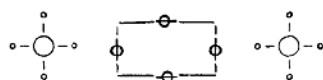
已中和的抗血清



(2) 已中和的抗血清 + HCG致敏血球 →



不起反应（凝集抑制）



凝集抑制反应的底部：



二、试剂配制：

1. pH6.4M/15生理盐水磷酸盐缓冲液。
2. pH7.2M/15生理盐水磷酸盐缓冲液。
3. 标准样品：需要进口绒毛膜促性腺激素用pH 6.4缓冲液配成4万iu/l的浓度。
4. 1%硫柳汞或10%叠氮钠。
5. 抗原（羊红细胞）的制备

在雄性绵羊颈部采血100ml立即放在等量血液防凝剂里慢慢摇动。在冰箱静放2—7天后做甲醛化血球，如有溶血不可用。

（1）甲醛化血球的处理

要求羊红细胞每mm³约含770万，压在35—39%。用pH7.2缓冲液（血球压积的20倍）700ml洗5次，避免溶血。第5次的上清液弃去，用pH7.2缓冲液450ml配成8%的悬液。在450ml悬液里加等量3%的甲醛。以上900ml溶液放水浴37℃20小时，每隔半小时摇动一次。在放置10小时的时候换液一次（液体同900ml）。20小时后取出冷却。用pH7.2缓冲液2400ml洗6次。第6次上清液弃去，用pH7.2缓冲液320ml配成10%悬液。隔2天换液后鉴定甲醛血球的质量。

（2）羊红细胞鞣酸化

取10%甲醛化羊红细胞20ml（2克）用50倍pH6.4缓冲液1000ml洗10次。第10次的上清液弃去。用pH6.4缓冲液100ml将沉淀洗入三角烧瓶，配成2%的悬液。在2%悬液里加入用pH6.4缓冲液配好的1/20000的鞣酸溶液100ml。混匀后放入56℃水浴箱半小时，并经常摇动，半小时后取出冷却。

（3）羊红细胞HCG致敏：

将上面200ml溶液分到离心管中，离心弃上清液。用pH6.4缓冲液洗2次，最后一次弃去。用50mlpH6.4缓冲液配成4%悬液放入三角烧瓶内并加HCG（500iu/安瓿）5支，用pH6.4缓冲液50ml溶解，共100ml溶液放在56℃水浴中2个半小时，经常的摇动。2个半小时后取出冷却，离心弃上清液。用pH6.4含兔血清的缓冲液（缓冲液内按0.2%的浓度加入正常雄兔血清）300ml洗3次，最后一次弃去。加入80mlpH6.4含兔血清的缓冲液，即成为2.5%悬液，需加入1/万硫柳汞防腐。放入冰箱，隔2天后测效价。效价必须在1:6400以上方可用，在1:3200以下不能用。

wide认为使HCG吸附血球上时用新鲜配制的pH6.4缓冲液为重要条件。致敏血球的浓度对抗血清的滴定度有很大影响。血球过多则易于下沉而滴定度下降。一般用计算

法确定浓度，但羊红血球经甲醛化后体积增加，故每次配成悬液后，当重新加以调整，我们体会每立方毫米2.5%的悬液内约含37万血球左右为宜。HCG吸附于血球上的量多则滴定度低，吸附量少则滴定度高，吸附量过少则丧失特异性。同样的HCG吸附量随pH不同也能改变滴定度，操作时须加以注意。

6. 抗体（抗血清）的制备：

选取白色雄性、幼年（1—2岁）未交配过的兔子体重2—3公斤。在冬末春初，干燥暖和气候时注射较好，同时注射3—5只兔子。免疫兔子的方法较多，我们选用如下法。

抗原：上海生物药厂出品的HCG。

佐剂：羊毛脂：石蜡油=1：4溶解后备用。

配制按：1毫升抗原加1毫升不完全佐剂加20毫克活卡介苗（不过期）充分混匀，可注射一只兔子。

要求每毫升抗原含蛋白质5毫克，国产HCG500iu/安瓿的含蛋白质1.47毫克。

方法：上面配好的免疫液分2次注射。第1次注射打兔子后脚掌，每只0.5毫升，相隔半月。第2次打兔子后腘窝，每只0.5毫升。于第2次注射后相隔半月，从兔耳静脉采血做效价滴定。效价在1:12800以上方可用，如效价较低，可再注射一次强化兔子，使效价提高。将效价合乎要求的兔子全部血采出，分离得血清经灭活后按1/万量加入疏柳汞或1/千叠氮钠防腐。

HCG纯度较差抗血清中必然会有非专一性抗体存在。经琼脂扩散分析有5条沉淀带，为了消除部分非专一性抗体上海第一医学院附属妇产科医院在抗血清中加等量正常人血清（灭活过的）用以饱和，饱和后的抗血清再经琼脂扩散分析剩下3条沉淀带⁽³⁾。

三、操作方法：

（一）一般稀释定量法：

（1）留取新鲜晨尿，放冰箱半小时，使尿中盐份及钙离子析出。

（2）将小便离心使杂质沉淀。

（3）在反应板上取5孔，自第2孔开始各加pH6.4含兔血清的缓冲液0.4毫升。

（4）在第1孔加原尿0.4毫升，第2孔加原尿0.4毫升后混匀吸0.4毫升移到第3孔，再混匀吸0.4毫升到第4孔，混匀吸0.4毫升到第5孔，第5孔吸0.4毫升弃去。如做定量可依此对倍稀释下去。

（5）在每孔内各加抗血清1滴混匀（45度角持吸管，以每毫升13滴左右为准）。

（6）在每孔中加致敏血球1滴（以每毫升约13滴为准），致敏血球需用pH6.4缓冲液换液后加入。混匀后在20—30℃环境下静放2小时看结果。

如果第1孔出圈即定为312iu/l，第2孔出圈定为625iu/l，第3孔出圈定为1250iu/l，以此对倍计算。312iu/l为阳性可疑，625iu/l以上为妊娠阳性。第1—5孔均不出圈为小于312iu/l

312iu/l的规定：用进口绒毛膜促性腺激素作为标准样品配成4万iu/l的标准液。在反应板上从第1孔——第10孔各加pH6.4含兔血清的缓冲液0.4毫升。在第1孔加0.4毫

升4万iu/l标准液混匀吸0.4毫升到第2孔,再混匀吸0.4毫升到第3孔。以此对倍稀释成:第1孔为2万iu/l,第2孔为1万iu/l,第3孔为5000iu/l,第7孔为312iu/l。我们选择的抗血清稀释的浓度和致敏羊红血球的效价要恰巧在第7孔312iu/l时出圈为宜。出圈在第7孔以前说明抗血清浓需再稀释,出圈在第7孔以后说明抗血清稀需配浓。抗血清稀释度和致敏羊红血球效价在312iu/l时比例适宜,就可用于试验。就此第1孔出圈就规定为312iu/l。

(二) 浓缩定量法:

(1) 晨尿(隔夜少饮水)放冰箱半小时以上。

(2) 将尿离心,吸3毫升慢慢滴入含有9毫升丙酮试管中,放冰箱2—24小时(最好24小时)。丙酮可使HCG沉淀。

(3) 取出离心弃上清液,待其干燥一会,加3毫升无水乙醇离心弃上清液,干燥一会加乙醚3毫升脱乙醇,离心弃乙醚,进一步干燥。干燥后加1毫升pH6.4缓冲液溶解(即浓缩3倍)。在室温下放10—15分钟后离心,如放冰箱则1—2小时。取上清液0.8毫升,第1孔第2孔各加0.4毫升后再如前对倍稀释。

(4) 如稀释法加入抗血清和致敏羊红血球混匀,2小时看结果。第1孔出圈为100iu/l,第2孔为200iu/l,以此倍增。

四、免疫法诊断妊娠的正确性较生物法为高,但这是一种微量测定,很多因素都能影响结果,下列几点必须加以注意:

1. 抗血清的适合浓度须经常测定,在使用不同批号的致敏血球时更不能忽略。抗血清的浓度过低则将出现假阳性,反之则出现假阴性。为了减少假阳性的发生临床应用时每将抗血清浓度调到能测出312iu—625iu/l。

2. 致敏血球在室温下极易变质,被细菌污染后滴定度下降,故当用小瓶分装。我们曾遇到过使用距失效期2个月的HCG致敏羊血球,结果这批羊血球效价虽较高但用这批血球测定结果出现假阴性较多,我们发现后重新用HCG致敏血球再未出现上述情况。

3. 尿液过淡比重低于1.005能出现假阴性,尿液过于浓缩杂质干扰也能出现假阳性。尿液被细菌污染或旦白尿;尿pH低于4或高于10均能发生干扰。

4. 用pH6.4缓冲液稀释尿较生理盐水为优,有时尿pH过低则亦可用pH8.0硼酸硼砂缓冲液。在缓冲液加正常兔血清使图形清楚。正常兔血清须经56℃30分钟灭活再与致敏羊血球试探有无自发性凝集,如无凝集方可应用。常用的正常兔血清浓度为1%,但Wide认为在缓冲液加1.2%为最合适。

5. 温度高低也能影响结果在20℃反应出现快,但2小时要看结果图形容易改变。在4℃反应慢要3小时以上,在16小时图形最清楚,能保持48小时。

6. 患盆腔炎等疾病或服用过含水杨酸制剂的药品有时也能使非孕尿出现假阳性,当重复试验⁽⁴⁾。

7. 实验用的反应板吸管等尽量清洁,尤其测定HCG很高的标本用过的反应板更须洁净。

血凝抑制实验测定HCG的临床意义

我们应用血凝抑制试验测定HCG共1091例，主要是协助临床对于诊断早孕及病理妊娠，以及滋养叶细胞疾病的动态观察。其中利用本法诊断妊娠共测了846例。正常妊娠417例，其中5例假阳性，故阳性正确率98.8%。非妊娠429例6例假阴性，阴性正确率为98.6%。阴性正确率较低。可能系有一批在处理血球时用的HCG接近失效期，致敏羊血球不合格而使阴性正确率降低。关于用本法与广泛应用的雄蟾蜍试验的比较，我们只对少数病例做了对照，举几例说明。

孙××停经32天胶乳试验阴性，本法测定为 $>2500\text{iu/l}$ 阳性，观察证实为妊娠。

王××患巨大卵巢肿瘤，本法测定 $>2500\text{iu/l}$ 阳性，肿瘤切除后刮宫证实为妊娠。

王××停经34天本法测定为 $>2500\text{iu/l}$ ，青蛙试验阴性，观察证实为妊娠。

经对照可看出本法较生物或胶乳法灵敏度高。

我们用本法测定了186例滋养叶细胞疾病术后或化疗后观察，测定结果基本上符合临床治疗趋势。在临床实验中我们认识到：滋养叶细胞疾病在治疗中，HCG水平刚降到 $<100\text{iu/l}$ 时还须继续治疗，经几次测定后均为 $<100\text{iu/l}$ 时方可暂停治疗随访观察。关于这方面的经验，上海瑞金医院用现代先进的灵敏度很高的放射免疫定量测定与本法测定HCG做了比较。当然方法不同，尿与血也不一定完全符合，但可以看出两方法测定结果的上升或下降趋势是一致的⁽⁵⁾。

仅举几例说明：

姓 名	诊 断	测 定 日	尿HCG iu/l	血HCG ng/ml
周××	恶 葡	11月17日	400	125
		12月31日	<100	7.5
朱××	恶 葡	11月12日	200	102
		11月17日	100	42.5
周××	葡萄胎	11月17日	<100	47
		12月3日	<100	<3.75

周××是葡萄胎随访病例，于11月17日及12月3日分别测定尿HCG均为 $<100\text{iu/l}$ ，而放射免疫则自 47ng/ml 下降到 $<3.75\text{ng/ml}$ 。另外也可以看出在上述测定中当病情好转，尿HCG刚刚下降到 $<100\text{iu/l}$ 时，血HCG值仍高。如继续治疗，血HCG将陆续下降到 10ng/ml 以下（即正常水平或为LH水平）。用放射免疫定量方法测定进一步说明葡萄胎经治疗后尿中HCG刚降到 $<100\text{iu/l}$ 时，血HCG还较高，需跟踪治疗一段才能降到相当于LH水平的正常水平。

滋养叶细胞疾病有转移灶者尿中的HCG排量不一定高，有时作浓缩试验呈阳性。有时甚至肺部阴影未完全消失，而浓缩试验已转阴。这可能由于激素分泌量减少或病灶因治疗为纤维结缔组织所包裹，激素不能释放至血循环，以致尿中排量极少，不足以引

起妊娠反应所致。

我们对59例临床疑为葡萄胎、先兆流产、宫外孕、死胎的标本进行了测定，测定情况不再详赘。

下面将血凝抑制方法测定HCG在正常异常情况下的变化数值归纳如下，供参考。

妊娠后原始绒毛的合体细胞即开始分泌HCG。亦即受精后20天在血清和尿中发现。妊娠6周HCG浓度升高。妊娠8周这种激素达高峰，以后下降，12周后迅速下降，妊娠18周后降到最低水平。

1. 正常妊娠HCG含量⁽⁶⁾：

最高滴定为16万iu/l，极个别情况可高达64万iu/l。最高滴度出现在妊娠50—80天，100天以后下降。

- (1) 妊娠40天时最高滴度为5000iu/l
- (2) 妊娠10周后最高滴度为16万iu/l
- (3) 妊娠14周后最高滴度为2万iu/l
- (4) 妊娠14—16周最高滴度为1万iu/l
- (5) 妊娠18周后最高滴度为<1万iu/l

在妊娠10周以前根据小便HCG含量的测定来鉴别正常妊娠与葡萄胎有一定困难，但在妊娠10周以后若超过相当于该妊娠周的最高滴度，则葡萄胎的可能性很大。

在正常妊娠中个体差异性很大。如双胎、初产妇或孕吐症可高达100—200万iu/l。亦有个别HCG很低2000iu/l而不流产的。

2. 病理情况。

- (1) 流产、死胎——HCG逐渐下降<2000iu/l

(2) 宫外孕——一般<1000iu/l 阳性率可达80%。如宫外孕破裂，HCG测不出，不能排除宫外孕。

(3) 葡萄胎、绒癌——HCG>50—64万iu/l(65%)。如HCG>64—128万iu/l葡萄胎可能性很大(79.26%可能性)。葡萄胎如不活动或将流产时HCG亦可能在正常范围，故不能单靠HCG测定，必须结合临床及其他辅助诊断，如超声波等。

在葡萄胎排出后40天以上，又经刮宫证实无残存水泡状胎块而妊娠试验持续阳性者，应高度怀疑为恶葡或绒癌。葡萄胎已排净或已因葡萄胎而切除子宫40天后，妊娠试验阳性，或在随诊过程中妊娠试验已转阴性后，又转阳性，或滴度下降后，又持续上升，均表示有恶葡或绒癌存在。但须注意：恶性葡萄胎之滴度并不比良性葡萄胎高，相反滴度低的例数较多。

(4) 恶葡或绒癌治疗的疗效指标：经治疗后HCG下降至<100iu/l以下为正常，用浓缩法测定。

3. 血凝抑制试验在计划生育科研中的应用。

此法测尿中HCG含量较灵敏，停经33—40天的早孕就可确诊，并且在测验的当天可以出结果，可以为“抗早孕”的计划生育科研提供先决条件。