

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验等专业使用

# 临床免疫学检验 实验指导

主 编 李永念



科学出版社

教育部高等学校医学检验类专业教学指导委员会 医学检验学类课程教材系列

教育部高等学校医学检验类专业教学指导委员会 医学检验学类课程教材系列

# 临床免疫学检验 实验指导

王 斌 主编

人民卫生出版社

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

供医学检验、卫生检验等专业使用

# 临床免疫学检验实验指导

主 编 李永念

副主编 蒋红梅 渠 巍 曾 浩

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

程 萍(贵阳医学院)

何应中(遵义医学院)

黄 山(贵州省临床检验中心)

蒋红梅(贵阳医学院)

李永念(贵阳医学院)

刘杰麟(贵阳医学院)

渠 巍(贵阳市妇幼保健院儿童医院)

桑圣刚(海南医学院)

汤建中(宁夏医科大学)

王永霞(海南医学院)

曾 浩(第三军医大学)

张 华(贵州省人民医院)

张学宁(昆明医学院)

周 艳(贵阳医学院)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

## 内 容 简 介

本书是全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材之一,由国内6所高等医药院校和3所临床教学实习医院参与编写而成。本教材在强调医学检验专业基本实验技术和操作的基础上重视综合性实验和创新性实验的开展。全书共分基本实验技术及验证性实验、综合性实验和创新性实验三篇。通过基本实验技术和经典验证性实验的教学可以达到验证理论和培养学生的基本免疫学实验技能的目的。综合性实验的教学一方面可以训练学生组织和驾驭大型综合实验的能力,另一方面可以使学生提前了解临床实验室使用的仪器和开展的实验项目,为临床实习和从事临床免疫学检验工作打下基础。创新性实验设计可为医学检验学生进一步开展科研工作奠定基础。

本书可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用,并可用做临床医学、医学影像学、麻醉学、法医学、预防医学以及药学等专业实验教学的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

临床免疫学检验实验指导 / 李永念主编. —北京:科学出版社,2012.2

全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-033519-7

I. 临… II. 李… III. 临床医学-免疫学-实验-医学院校-教学参考资料  
IV. R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 020310 号

责任编辑:李国红 王 颖 / 责任校对:刘小梅

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2012年2月第一次印刷 印张:11 1/2 插页:2

字数:266 000

定价:32.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》 编写指导委员会

顾 问 郑铁生  
主 任 杨国珍  
副主任 李永念  
委 员 (按姓氏笔画排序)  
王正荣 王良宏 王豫萍 李 兴  
肖 芸 谷俊莹 张亚莉 罗昭逊  
费 樱 莫 非 夏曙华 黄 海  
黄韵祝 蒋红梅 曾小菁 潘 卫  
秘 书 潘 卫 谷俊莹

# 序

医学检验是临床医学与实验医学的有机结合,是运用物理学、化学、分子生物学、免疫学、病原生物学、生物信息学、细胞学等技术,为疾病预防保健、疾病诊断、治疗及科研等提供客观依据的一门学科。医学检验专业的培养目标是培养既具有基础医学、临床医学和检验医学理论知识,又具有实验室基本技能和一定创新能力的高级医学检验人才。

按照《教育部关于“十二五”普通高等教育本科教材建设的若干意见》(教高〔2011〕5号)“充分发挥高等学校在教材建设中的主体作用……高等学校要根据学校特色,促进教材建设与人才培养相结合,与专业建设、课程建设、科研工作、教学方式方法改革和教学辅助资源建设相结合,形成良性互动,建设高质量教材”的精神,我们以贵阳医学院为主体,联合第三军医大学、湖北医药学院、北京大学医学部、湖南师范大学、宁夏医科大学、遵义医学院、昆明医学院、海南医学院、徐州医学院、贵阳中医学院、贵阳护理职业学院等高等医药院校和贵州省临床检验中心、贵州省人口计生科研所、贵州省人民医院、贵州省血液中心、贵阳市妇幼保健院儿童医院、广州军区总医院以及贵州省肿瘤医院的专家教授共同编写了这套《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》。这套教材包括了医学检验专业课程的七本实验教材,分别是《临床基础检验学实验指导》、《临床生物化学检验实验指导》、《临床微生物学检验实验指导》、《临床免疫学检验实验指导》、《临床血液学检验实验指导》、《分子诊断学实验指导》及《临床输血学检验实验指导》。本教材可供高等院校医学检验、卫生检验等专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。

本书的顺利出版,是各位编者辛勤劳动的结果,也得到各参编单位的大力支持,尤其得到教育部国家级教学团队、高等学校特色专业建设点、贵州省高等学校教学内容和课程体系改革重点项目、贵州省教育厅省级实验教学示范中心和贵州省卫生厅、贵阳医学院及贵阳医学院附属医院专项资金的资助,在此一并致谢。

敬请各位读者在使用中多提宝贵意见,以利修改再版。

《全国高等院校医学检验专业实验教学规划教材》编写指导委员会

2012年元月

# 前 言

实验教学作为高等医学教育的重要组成部分,是学生实践能力和创新能力培养的重要途径。目前,传统实验教学以验证理论为主,缺少现代医学实验内容,医学生学习的积极性、主动性不强,不利于大学生创新意识和实践能力的培养,难以培养出高素质、创新型的医学人才。改革传统医学实验教学模式,最大限度地整合有限资源,优化重组教学实验内容,以培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力为目的,在科学出版社的大力支持下,我们联合贵阳医学院、第三军医大学、宁夏医科大学、遵义医学院、昆明医学院、海南医学院6所高等医药院校和贵州省临床检验中心、贵州省人民医院以及贵阳市妇幼保健儿童医院的专家教授共同编写了这本教材。全书分基本实验技术及验证性实验、综合性实验和创新性实验三篇。通过基本实验技术和经典验证性实验的教学可以达到验证理论和培养学生的基本免疫学实验技能的目的。综合性实验的教学一方面可以训练学生组织和驾驭大型综合实验的能力,另一方面可以使学生提前了解临床实验室使用的仪器和开展的实验项目,为临床实习和从事临床免疫学检验工作打下基础。创新性实验设计可为医学检验学生进一步开展科研工作奠定基础。本教材可供高等院校医学检验专业、卫生检验专业学生实验使用,也可供从事临床检验工作和医学研究的技术人员参考使用。敬请各位读者在使用中多提宝贵意见,以利修订再版。

本书的顺利出版,是各位编者辛勤劳动的结果,也得到各参编单位的大力支持,尤其得到教育部国家级教学团队(贵阳医学院医学检验系)建设资金和贵州省卫生厅、贵阳医学院及贵阳医学院附属医院专项资金的资助,在此一并致谢。

编 者

2012年元旦

# 目 录

序  
前言

## 第一篇 临床免疫学检验基本实验技术及验证性实验

<b>第一章 免疫凝集类实验</b> .....	(1)
实验一 直接凝集试验 .....	(1)
实验二 间接凝集试验 .....	(6)
实验三 间接凝集抑制试验 .....	(8)
实验四 抗球蛋白试验 .....	(9)
<b>第二章 免疫沉淀类试验</b> .....	(13)
实验一 单向免疫扩散试验 .....	(13)
实验二 双向免疫扩散试验 .....	(15)
实验三 对流免疫电泳试验 .....	(17)
实验四 火箭免疫电泳 .....	(19)
实验五 免疫电泳试验 .....	(20)
<b>第三章 免疫标记技术</b> .....	(23)
实验一 酶联免疫吸附试验 .....	(23)
实验二 酶免疫印迹技术 .....	(30)
实验三 荧光免疫染色技术 .....	(32)
实验四 胶体金免疫层析技术 .....	(34)
实验五 斑点金免疫渗滤技术 .....	(35)
<b>第四章 免疫细胞分离技术</b> .....	(39)
实验一 外周血单个核细胞分离 .....	(39)
实验二 外周血 T、B 细胞的分离 .....	(41)
实验三 外周血中性粒细胞分离 .....	(43)
<b>第五章 固有免疫功能检测</b> .....	(47)
实验一 中性粒细胞趋化功能测定 .....	(47)
实验二 中性粒细胞吞噬杀菌功能测定 .....	(49)
实验三 巨噬细胞吞噬功能测定 .....	(52)
实验四 NK 细胞功能测定 .....	(53)
实验五 溶菌酶测定 .....	(55)
<b>第六章 获得性免疫功能检测</b> .....	(58)
实验一 T、B 细胞数量测定 .....	(58)
实验二 T 细胞亚群分析 .....	(62)



实验三 T 细胞增殖功能测定 .....	(63)
实验四 细胞因子测定 .....	(65)
实验五 淋巴细胞抗体生成能力测定 .....	(67)
<b>第七章 免疫自动化检测技术 .....</b>	<b>(69)</b>
实验一 流式细胞术 .....	(69)
实验二 化学发光免疫分析 .....	(73)
实验三 时间分辨荧光免疫分析技术 .....	(76)
实验四 酶联免疫自动化分析技术 .....	(78)
实验五 免疫比浊分析技术 .....	(80)

## 第二篇 综合性实验

<b>第八章 抗体的制备 .....</b>	<b>(83)</b>
实验一 溶血素的制备及效价测定 .....	(83)
实验二 人全血清抗体的制备 .....	(85)
实验三 单克隆抗体的制备 .....	(86)
<b>第九章 超敏反应的免疫学检测 .....</b>	<b>(92)</b>
实验一 青霉素皮肤试验 .....	(92)
实验二 血清总 IgE 测定 .....	(93)
实验三 血清特异性 IgE 测定 .....	(95)
实验四 过敏原特异性 IgE 筛查试验 .....	(96)
实验五 结核菌素试验 .....	(97)
<b>第十章 自身免疫性疾病的免疫学检测 .....</b>	<b>(100)</b>
实验一 类风湿因子测定 .....	(100)
实验二 抗环瓜氨酸肽抗体测定 .....	(101)
实验三 抗核抗体测定 .....	(103)
实验四 抗核抗体谱分析 .....	(106)
实验五 抗双链 DNA 抗体测定 .....	(109)
实验六 抗中性粒细胞胞质抗体测定 .....	(112)
<b>第十一章 感染相关免疫学检测 .....</b>	<b>(119)</b>
实验一 抗链球菌溶血素“O”抗体测定 .....	(119)
实验二 乙型肝炎病毒抗原抗体测定 .....	(120)
实验三 TORCH 抗体测定 .....	(121)
实验四 EBV 相关抗体测定 .....	(123)
实验五 梅毒螺旋体血清学检测 .....	(125)
<b>第十二章 肿瘤免疫学检测 .....</b>	<b>(127)</b>
实验一 甲胎蛋白定量测定 .....	(127)
实验二 癌胚抗原测定 .....	(128)
实验三 糖类抗原 125 测定 .....	(130)
<b>第十三章 移植免疫相关检测 .....</b>	<b>(132)</b>
实验一 微量淋巴细胞毒试验 .....	(132)

实验二	双向混合淋巴细胞培养 .....	(133)
实验三	群体反应性抗体测定 .....	(135)
实验四	HLA 基因分型 .....	(136)
<b>第十四章</b>	<b>临床免疫学检验质量控制 .....</b>	<b>(139)</b>
实验一	移液器的校准 .....	(139)
实验二	酶标仪性能评价 .....	(143)
实验三	ELISA 法乙肝表面抗原检测试剂盒评价 .....	(150)

### 第三篇 创新性实验

<b>第十五章</b>	<b>创新性实验概述 .....</b>	<b>(153)</b>
<b>第十六章</b>	<b>创新性实验的实施原则和方法 .....</b>	<b>(154)</b>
<b>第十七章</b>	<b>创新性实验示例 .....</b>	<b>(160)</b>
<b>参考资料</b>	.....	(163)
<b>附录</b>	.....	(164)
附录一	免疫学实验常用试剂及配制方法 .....	(164)
附录二	××大学大学生创新性实验计划项目申请书 .....	(169)
<b>彩图</b>		

# 第一篇 临床免疫学检验基本 实验技术及验证性实验

## 第一章 免疫凝集类实验

凝集试验(agglutination)是指细菌、红细胞等颗粒性抗原或可溶性抗原(或抗体)与载体颗粒结合成致敏颗粒后,再与相应抗体(或抗原)在适当电解质存在下,形成肉眼可见的凝集现象。凝集试验分为直接凝集试验(direct agglutination test)和间接凝集试验(indirect agglutination test)。凝集试验可用于抗原或抗体的检测,方法简便,但灵敏度不高,多用于定性检测,如血型鉴定、细菌鉴定与分型等,也可用于半定量检测,如抗体效价的检测。

### 实验一 直接凝集试验

直接凝集试验是将颗粒性抗原直接与相应抗体相互作用,在操作方法上分为玻片凝集法和试管凝集法两种。

#### 一、玻片凝集试验

玻片凝集试验指在玻片上直接将红细胞悬液、受检细菌等颗粒性抗原与相应抗体混匀,若两者对应则出现肉眼可见的凝集块,即为阳性;若两者不对应则无凝集块出现,即为阴性。玻片凝集试验主要用于细菌鉴定与分型、ABO血型鉴定等定性试验。本实验以人类红细胞 ABO 血型鉴定试验(正定型, direct typing)为例,即用已知特异性抗体(标准血清)检测红细胞上的抗原。

##### 【实验目的】

1. 掌握 ABO 血型鉴定(正定型玻片法)的操作方法及结果判定。
2. 熟悉玻片凝集试验的原理及用途。

##### 【实验原理】

在室温条件下、盐水介质中,将受检者红细胞分别与已知的抗 A 血清、抗 B 血清、抗(A+B)血清混合,观察有无红细胞凝集现象,判断受检者红细胞膜表面有无 A 抗原和(或)B 抗原,据此,将人类红细胞 ABO 血型分为:A 型、B 型、O 型、AB 型 4 种。

##### 【实验器材】

1. 抗原(待检标本) 受检者 5%红细胞盐水悬液。

2. 抗体(标准血清) 标准抗 A、抗 B、抗(A+B)分型血清。
3. 生理盐水。
4. 其他 一次性采血针、载玻片、小试管、75%乙醇、消毒棉签、牙签、记号笔、消毒缸、显微镜等。

### 【实验方法】

#### 1. 配制 5%红细胞悬液

(1) 采血部位以左手无名指为宜,轻轻按摩采血指端,使其自然充血,用 75%乙醇棉签消毒采血部位皮肤,待干。

(2) 操作者用左手拇指和示指紧捏刺血部位两侧,右手持无菌采血针自指尖腹内侧迅速穿刺组织,深 2~3mm,立即出针。

(3) 待血液自行流出后,用消毒干棉签擦去第 1 滴血(因含组织液),如出血不畅,可在针刺四周稍稍加压(勿用力挤压,以免组织液混入影响检测结果)。

(4) 取 1 滴血放入装有 0.5ml 生理盐水的小试管内混匀,制成红细胞悬液(约为 5%)备用。

(5) 采血完毕,立即用消毒干棉签压迫止血。

#### 2. 血型鉴定(正定型玻片法)

(1) 标记玻片:取清洁载玻片 1 张,用记号笔划分为 3 等份,在每格的左上角标明抗 A、抗 B、抗(A+B)。

(2) 加标准抗血清:用毛细滴管分别取抗 A、抗 B 和抗(A+B)分型血清各 1 滴,滴于相应标记区内。

(3) 加受检红细胞悬液:于上述抗血清小格内分别滴加受检者 5%红细胞悬液各 1 滴。

(4) 混匀:分别用牙签搅拌或不断轻轻转动载玻片,使血清与红细胞充分混匀,连续 1~5min,静置 10min 以上。

(5) 观察结果:肉眼观察有无凝集(或溶血)现象,如肉眼观察不清,可将载玻片置于低倍显微镜下观察结果。

### 【实验结果】

#### 1. 定性

(1) 阳性:液体变清亮,出现大小不等的红细胞凝集块(或溶血)。

(2) 阴性:液体仍然混浊,红细胞呈均匀分布,无凝集块出现。

#### 2. 血型判断 按表 1-1 判断受检者红细胞 ABO 血型。

表 1-1 ABO 血型正向定型及结果判定

受检者血型	标准血清 + 受检者红细胞		
	抗 A	抗 B	抗(A+B)
A 型	+	-	+
B 型	-	+	+
O 型	-	-	-
AB 型	+	+	+

注:“+”表示凝集(或溶血);“-”表示不凝集

3. 报告方式 正定血型(玻片法)X型。

### 【注意事项】

1. 除特殊情况外,不要在耳垂取血。应避免在炎症、水肿、冻疮等部位采血。
2. 严格按无菌技术操作,防止采血部位感染,做到一人一针一管,避免交叉感染。皮肤消毒后,须待酒精挥发、干燥后采血,否则血细胞被乙醇破坏,且血液会四处扩散,不易成滴而造成采血困难。
3. 针刺皮肤应快进快出,穿刺深度一般以2~3mm为宜。
4. 所用分型血清必须在有效期内使用,实验结束后应放置冰箱保存,以免细菌污染,使用前应平衡至室温。
5. 试管、滴管、玻片等必须清洁干燥,防止溶血。
6. 用牙签混匀时,勿混用牙签,以免产生错误结果。
7. 反应时间不得少于10min,以免较弱的凝集不易出现,造成假阴性。
8. 试验结果要及时观察,仔细核对、准确记录。

## 二、试管凝集试验

试管凝集试验为半定量试验方法,一般均以标准定量抗原(已知抗原)与一系列倍比稀释的免疫血清或患者待检血清混合,经静置保温后,根据试管中颗粒性抗原的凝集程度,判断血清中是否有相应的抗体及其效价。临床上常用的直接试管凝集试验有肥达试验(Widal test)、外斐试验(Weil-Felix)和输血前的交叉配血试验等。现以肥达试验为例介绍试管凝集试验。

### (一) 肥达试验(传统试管法)

#### 【实验目的】

1. 掌握肥达试验的操作方法(血清连续倍比稀释)及结果的判定。
2. 熟悉肥达试验的原理及用途。

#### 【实验原理】

人类感染伤寒或副伤寒沙门菌后,经1~2周后可在血清中出现相应的菌体(O)抗体和鞭毛(H)抗体,以伤寒沙门菌O、H抗原和甲、乙、丙型副伤寒沙门菌H抗原,与一系列倍比稀释的患者血清作试管凝集试验,在适当电解质参与下,可出现肉眼可见的凝集现象,借以检测患者血清中是否存在相应的伤寒沙门菌或甲、乙、丙型副伤寒沙门菌的抗体及其效价,用于伤寒、副伤寒的辅助诊断。

#### 【实验器材】

1. 抗原(诊断菌液) 伤寒沙门菌菌体抗原(TO)及鞭毛抗原(TH),甲型副伤寒沙门菌鞭毛抗原(PA),乙型副伤寒沙门菌鞭毛抗原(PB),需要时可增加丙型副伤寒沙门菌鞭毛抗原(PC)。
2. 抗体 待检血清,已知伤寒、副伤寒沙门菌诊断血清。
3. 生理盐水。
4. 其他 小试管、中试管、大试管、1ml吸管、5ml吸管、试管架、水浴箱等。

**【实验方法】**

1. 编号标注 取 28 只小试管,在试管架上 4 排 7 列排放,编号标明。

2. 倍比稀释待检血清 先将待检血清做 1:20 稀释,方法是取中试管 1 支,加入生理盐水 3.8ml 及待检血清 0.2ml,充分混匀,总量 4ml。然后取 2ml 1:20 稀释血清按每管 0.5ml 分别加入第 1 列的 4 个试管中。再在剩余 2ml 稀释血清的中试管中加生理盐水 2ml,混匀,此时血清由 1:20 稀释为 1:40,再取此稀释度的血清 2ml,按每管 0.5ml 分别加入第 2 列的 4 个试管中。如此将中试管中剩余血清做倍比稀释,并依次将稀释血清加至第 3 至第 6 列各试管中,则第 1 列至第 6 列试管的血清稀释度依次为 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640。第 7 列各管只加 0.5ml 生理盐水,不加血清,作为抗原对照。

3. 稀释诊断菌液 取 4 支大试管,分别标记 TO、TH、PA、PB,以生理盐水将相应诊断菌液稀释成每毫升含 7 亿个菌的悬液备用(具体稀释倍数参考试剂说明书)。

4. 加诊断菌液

第 1 排各管加入 TO 稀释菌液 0.5ml。

第 2 排各管加入 TH 稀释菌液 0.5ml。

第 3 排各管加入 PA 稀释菌液 0.5ml。

第 4 排各管加入 PB 稀释菌液 0.5ml。

此时,各管的血清因加入等量的诊断菌液又被稀释 1 倍,第 1 列至第 6 列血清最终稀释度为 1:40~1:1280。

5. 温育观察 振荡混匀,置 37℃ 温箱或水浴 18~24h(或 56℃ 2~4h),观察记录结果见表 1-2。

表 1-2 肥达试验方法(试管法)

(单位:ml)

	试验管(每管稀释血清 0.5)						对照管
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	生理盐水(0.5)
TO 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
TH 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PA 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PB 抗原	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清最终稀释浓度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	抗原对照
放置时间	振荡混匀,置 37℃ 温箱或水浴 18~24h(或 56℃ 2~4h)						

**【实验结果】**

1. 观察方法 从孵箱或水浴箱中取出试管架后,不要振荡试管,先观察第 7 列各对照管,应均不发生凝集,再依次逐排观察各试验管凝集情况。观察时将试管举起仔细观察试管内上清液的透明度和下沉凝集块的大小、性状,然后再轻轻晃动试管使凝集块从管底升起,最后根据上清液的透明度和凝集块的大小,即反应强度记录结果。

2. 凝集现象 “O”凝集呈颗粒状,以较坚实凝集片沉于管底,轻摇试管不易荡起,且不易散开。“H”凝集呈絮状,以松散大团沉于管底,轻摇试管即荡起,且极易散开。

3. 凝集强度 以 4+、3+、2+、+、- 等符号表示。

4+：上清液完全透明，细菌全部凝集成块沉于管底。

3+：上清液透明度达 75%，大部分细菌凝集成块沉于管底。

2+：上清液透明度达 50%，约 50% 细菌凝集成块沉于管底。

1+：上清液混浊，透明度仅达 25%，仅小部分细菌凝集成块沉于管底。

—：液体均匀混浊，无凝集块形成。若静置时间较长，部分细菌沉于管底呈圆点状，边缘整齐，轻轻摇动后细菌分散呈云雾状升起，但很快即消失。

4. 凝集效价 一般以出现 2+ 凝集的血清最高稀释倍数作为该血清的凝集效价（表 1-3）；也可取 0.25ml 试验菌液加 0.75ml 生理盐水混匀，制备与 50% 透明度相当的比浊管，有助凝集效价的判定。

表 1-3 肥达试验凝集效价判定

试管号	1	2	3	4	5	6	7	
血清稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	抗原对照	效价判定
TO 抗原	4+	3+	2+	2+	+	—	—	1:320
TH 抗原	4+	3+	3+	2+	2+	+	—	1:640
PA 抗原	2+	+	+	—	—	—	—	1:40
PB 抗原	+	+	—	—	—	—	—	<1:40

5. 参考区间 一般认为未经预防接种，具有诊断意义的凝集效价是：

TO>1:80、TH>1:160、PA>1:80、PB>1:80。

若取双份血清，效价≥4 倍更有诊断意义。

#### 【注意事项】

1. 血清倍比稀释应仔细、准确加量，勿跳管。
2. 观察结果时切勿先振荡试管，以免破坏试管内上清液的透明度及凝集块的大小和性状，影响结果判定。
3. 若对照管出现非特异性凝集，本试验无效。
4. 加诊断菌液时，应从对照管开始由后向前加入，以免影响稀释血清的浓度。

## （二）肥达试验（大孔反应板法）

实验目的、实验原理同肥达试验传统试管法。

#### 【实验器材】

1. 吸管、微量加样器、大孔 U 型孔反应板、振荡器、20.0g/L 亚甲蓝溶液、水浴箱等。
2. 诊断菌液、诊断血清、待检血清等同肥达试验传统试管法。

#### 【实验方法】

1. 编号标注 在 4 排×10 孔，孔径 15mm 的 U 型孔反应板上分别标以 TO、TH、PA、PB。

2. 倍比稀释待检血清 取 1 支试管加生理盐水 1.44ml，待检血清 0.16ml，先做血清 1:10 稀释；然后取 1:10 稀释血清 0.8ml 按每孔 0.2ml 加入第 1 列各孔中；再取生理盐水 0.8ml 加入试管中，使血清 1:20 稀释，取该稀释血清 0.8ml 按每孔 0.2ml 加入第 2 列各孔

中;按此法连续稀释到第7列的4孔中,则第1列至第7列试管的血清稀释度依次为1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640。第8列各孔加生理盐水0.2ml,不加血清,作为抗原对照。另设阳性血清对照。

3. 稀释诊断菌液 取 TO、TH、PA、PB 诊断菌液( $70 \times 10^8$  个/ml),分别用生理盐水稀释成  $10 \times 10^8$  个/ml。每10ml 稀释菌液中加 20.0g/L 亚甲蓝溶液  $5 \mu\text{l}$ ,便于观察。

4. 加诊断菌液 各排分别加相应的染色菌液 0.1ml,再补加生理盐水 0.1ml。使各孔液体总量为 0.4ml,各孔血清稀释度增加 1 倍,各排 1~7 孔血清最终稀释度为 1:20~1:1280。

5. 温育观察 于振荡器上混匀 1min,反应板加盖玻板,置  $37^\circ\text{C}$  水浴过夜,次日观察结果。

### 【实验结果】

阳性:液体澄清,蓝色细颗粒平铺于整个孔底。

阴性:蓝色菌体集中于一点,沉积于孔底,与抗原菌液对照相同。

效价:以出现 50%(2+)凝集,即凝集块明显,上清液半透明的血清最高稀释倍数为待检血清的凝集效价。

参考区间:与肥达试验试管法相同。

### 【注意事项】

1. 基本同肥达试验试管法。
2. 每排均需用诊断血清作阳性对照。

## 实验二 间接凝集试验

间接凝集试验是将可溶性抗原先吸附于一种与免疫无关、大小均匀的载体颗粒表面形成致敏颗粒(即免疫微球),再与待检标本中相应的抗体相互作用,在适宜的电解质参与下,出现肉眼可见的特异性凝集现象。同理也可将抗体吸附于载体颗粒,以检测标本中相应的抗原,此时称为反向间接凝集试验。间接凝集试验常用于检测针对细菌、病毒、螺旋体等病原微生物的抗体或某些自身抗体如类风湿因子、抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)等。现以胶乳凝集试验检测类风湿因子为例加以介绍。

### 【实验目的】

1. 掌握胶乳凝集试验检测类风湿因子的操作方法及结果判定。
2. 熟悉间接凝集试验的原理及应用。

### 【实验原理】

类风湿关节炎患者可产生一种抗变性 IgG 的自身抗体,即类风湿因子,多为 IgM 类,具有与人变性 IgG 结合的能力,利用人变性 IgG 和聚苯乙烯胶乳颗粒结合而成的致敏颗粒与患者血清直接反应,若血清标本中含有 RF,则与 IgG 致敏的胶乳颗粒作用出现凝集,结果为阳性;反之,若血清标本中无 RF,则不出现凝集,结果为阴性,用于类风湿关节炎的辅助诊断。

### 【实验器材】

1. 抗原 类风湿胶乳诊断试剂(人变性 IgG 胶乳颗粒),有商品出售。



2. 抗体 待检血清,类风湿因子阳性对照血清、阴性对照血清(试剂盒带有)。
3. 生理盐水。
4. 黑色分格反应板、微量加样器、牙签、污物桶等。

### 【实验方法】

#### 1. 定性试验

(1) 试剂自冰箱取出后预置至室温(18~25℃),轻轻混匀胶乳试剂,并核对阴性和阳性对照。

(2) 取反应板 3 孔,做好标记,分别加待检血清 20 $\mu$ l,阳性对照、阴性对照各 1 滴(50 $\mu$ l)。

(3) 分别向 3 格内加类风湿胶乳诊断试剂 1 滴,用牙签充分混匀,2min 后观察结果。

#### 2. 半定量试验

(1) 倍比稀释待检血清:定性试验阳性时,取 4 支小试管分别加生理盐水 100 $\mu$ l,在第 1 管中加入待检血清 100 $\mu$ l,混匀后取 100 $\mu$ l 加入第 2 管,混匀后取 100 $\mu$ l 加入第 3 管,如此稀释至第 4 管,各管稀释比例依次为:1:2、1:4、1:8、1:16(表 1-4)。

(2) 加待检血清:取反应板 6 孔,分别加入不同稀释度的血清各 20 $\mu$ l,阴性对照血清 1 滴,阳性对照血清 1 滴。

(3) 加胶乳试剂:于 6 孔中分别加入胶乳试剂各 1 滴,混匀,2min 后观察结果。

表 1-4 胶乳间接凝集半定量试验血清稀释方法 (单位: $\mu$ l)

稀释倍数	1:2	1:4	1:8	1:16
生理盐水	100	100	100	100
待检血清	100	100	100	100
标本用量	20	20	20	20
U/ml	40	80	160	320

### 【实验结果】

#### 1. 定性试验

阳性( $\geq 20$ U/ml):胶乳颗粒凝集(出现细小白色凝集颗粒)且液体澄清。

阴性( $< 20$ U/ml):胶乳颗粒不凝集,仍为白色均匀胶乳液。

待检血清:与对照比较判断结果,出现凝集为 RF 阳性,不出现凝集为 RF 阴性。

#### 2. 半定量试验

(1) 1:2 稀释血清出现凝集者滴度为 40U/ml;1:8 稀释血清出现凝集者滴度为 80U/ml;1:16 稀释血清出现凝集者滴度为 160U/ml;1:320 稀释血清出现凝集者滴度为  $\geq 320$ U/ml。

(2) 凝集效价:以出现凝集现象的血清最高稀释倍数为 RF 的效价。

3. 参考区间 正常人血清 RF:阴性( $< 20$ U/ml)。

### 【注意事项】

1. 血清标本应新鲜,储存于 2~8℃,48 小时内使用,时间过长须置 -20℃ 保存。不得使用血浆。

2. 牙签勿混用,以免出错。