维普资讯 http://www.cqvip.com



# 一种精子浅盘凝集试验简化法

计划生育系 生殖生理教研室
男性计划生育教研室
梁宪生 王增产 傅劲辛 何梓铭

**提 要** 精子浅盘凝集试验(TAT)是检查精子凝集抗体的方法之一，具有微量、敏感、能判断凝集类型等优点。但因传统的TAT法需借助倒置显微镜观察，使其在基层的应用受限。本文对TAT的方法进行改造，在保留其优点的前提下，以普通光镜代替倒置显微镜，并获得了同样良好的观察效果

**关键词** 抗精子抗体；浅盘凝集试验简化法

大量研究已经证实，人血清、精浆或宫颈粘液中自身或同种异体抗精子抗体的存在，与某些原因不明的不育症有密切关系[1]。用适当的方法检测患者体内的抗精子抗体水平，对于诊断这类不育症患者至关重要。同时，这方面的深入研究也将为通过免疫手段达到避孕目的提供新的信息和途径。抗精子抗体主要有精子凝集抗体和精子制动抗体两类。目前国内常用于检测精子凝集抗体的方法主要是两种经典方法：明胶凝集试验(GAT)和试管-玻片凝集试验(TSAT)[1]。七十年代，国外出现了浅盘凝集试验(Tray

快140—180次/min，血压下降，于入院后第六天死亡。

**例2** 男性，17岁，因哮喘反复发作9年，再发2天，胸痛7小时于87年5月18日入院。9年来患者无明确诱因反复出现气喘，多在4—5月发作。3年前并发过左侧气胸。2天前哮喘复发，7h前感胸骨后疼痛伴气喘加重。3h前颈部出现皮下气肿。胸片示左侧液气胸，纵隔及皮下气肿。

入院检查：T 38.2℃，P 132次，R 42次，Bp 18.7/12kPa。端坐，大汗，气管居中，胸前颈、颈部皮下气肿；双肺叩鸣，左上肺呼吸音减低，心脏无异常，白细胞 34.8×10⁹/L，中性 98%。入院后安置左侧胸腔闭式引流。4h后患者又出呼吸困难加剧，右肺呼吸音减弱，因病情危重，无法进行胸透，于右胸诊断性穿刺抽出气体5100ml，安置右胸腔闭式引流。给予吸氧，补液、氨茶碱、地塞米松每日10～20mg，后改用氢化可的松、强的松等治疗。在开始使用激素时即口服甲氰咪呱预防消化道出血，并予以抗感染治疗，病情逐渐好转，住院19天，痊愈出院。

**讨论** 双侧自发性气胸相对少见，特别发生在哮喘持续状态中，病情十分危重。本文例一是哮喘持续状态未能有效控制，因患者过去多次使用激素，停用激素后哮喘复发。此次入院后使用较大剂量激素，但未及时预防消化道出血，以致在入院两天后消化道反复出血不止，产生治疗矛盾，被迫停用激素。文献报道，凡哮喘状态患者，过去常使用激素，若再次发作，必须仍应用同等或较大剂量激素，哮喘始能控制，否则单靠静滴氨茶碱及舒喘灵哮喘难以控制。本例哮喘状态未能控制，气胸持续加重，以致昏迷、休克死亡。例二在用激素的同时即采用甲氰咪呱预防消化道应激性溃疡及出血，其后未发生消化道出血情况。气胸和哮喘并存时哮喘需用激素治疗，但激素还能影响胸膜破口愈合，治疗时亦应予以注意。只要哮喘和气胸得到控制，皮下气肿可以自愈。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Agglutination Test, TAT)[1]。因其具有较多优点，近年来被广泛采用。国内一些条件较好的实验室也用TAT取代了经典方法。但对于一般不具备实验条件的单位，尤其是基层医院，该方法的推广应用受到很大限制。针对这一情况，我们在保留TAT主要优点的前提下，对其进行改造，使之适用于基层实验室。

## 材料和方法

**1. 病人的待测标本：**

检查对象全部是经临床确诊为不明原因的不育症患者。分别采集夫妇双方的标本，包括男方的血清和精浆，女方的血清和排卵期宫颈粘液。收集的标本可立即送检，也可置－30℃低温保存。每次试验时，先将标本置56℃水浴中30min，灭活补体。每份标本用Baker缓冲液稀释成1:4，1:8，1:16，1:32四个稀释度后使用。

**2. 正常供者精液：**

由有生育能力的正常男性提供，要求精子浓度达到$7\times10^7$/ml，活动率70%以上，活力良好，细胞碎屑少。每批试验用同一供者的新鲜精液。将精液装入一支干净细试管中，轻轻叠加37℃Baker缓冲液1～2ml，在37℃水浴中静置0.5～1小时。然后小心收集上层清亮的部分（含活动精子最多），装入另一试管，混匀，将浓度调整到$3\sim4\times10^7$/ml使用。

**3. TAT法：**

按Friberg法[2,3]稍加改动。在组织培养板的小孔内加入适量液体石蜡，用微量注射器分别将5μl稀释待测血清（或精浆、宫颈粘液）和1μl供者精液加至液体石蜡下方，并将待测标本与精液混匀。每加一份样品，用Baker液洗注射器4次。加样完毕，将培养板置37℃水浴箱孵育2h。用倒置显微镜低倍镜（X100）观察有无凝集现象以及凝集程度，用高倍镜（X400）判断凝集类型。当至少两个稀释度发现凝集时判为阳性标本，其效价为出现凝集的最高稀释度。

**4. 简化法：**

在一块长120mm，宽65mm，厚0.8～1mm的无毒有机玻璃板上钻6×12个孔，孔径为3mm。另准备一块稍大、厚0.8～1mm、有边沿（沿高5～7mm）的无毒透明有机玻璃板。将有孔板的四周涂少量氯仿后紧贴在另一块板内，待氯仿挥发后即制成一块72孔微量凝集反应板。使用时，先上板与倒入液体石蜡，将小孔全部浸没。加样、孵育步骤同上。弃去多余的液体石蜡，在普通显微镜下观察每个样品。用低倍镜（X100和X200）判断有无凝集现象，凝集程度及类型。若判断凝集类型有困难，可用一细滴管将孔内液滴轻轻吸出，滴在干净载玻片上，加盖玻片后用高倍镜（X400）判断。其余标准同上。

每批试验结果均由三名以上观察者判定。并以兔抗人精子血清为阳性对照，以处女血清或已知阴性血清作阴性对照。

## 结果与讨论

共检测73份不育症患者的标本（表1）。包括血清42份（男25，女17），精浆18份，宫颈粘液13份。检出阳性标本19例（26%），其中血清10例（男3，女7），精浆5例，宫颈粘液4例。经$\chi^2$检验，三项阳性率间无显著性差异（$P>0.10$）。两种方法所测得的凝集程度完全相同者占18例，抗体效价为1:8～1:32。其中，1:32 4例，1:16 11例，1:8 3例。另1例两种方法的凝集程度不同，

**表1 73例不育症患者精子凝集抗体检测结果**

| 检测标本 | 阳性数 | 阴性数 | 合计 | 阳性率*(%) |
|---|---|---|---|---|
| 血清 | 10 | 32 | 42 | 23.8 |
| 精浆 | 5 | 13 | 18 | 27.8 |
| 宫颈粘液 | 4 | 9 | 13 | 30.8 |
| 合计 | 19 | 54 | 73 | 26 |

* $\chi^2<4.61$，$P>0.10$

维普资讯 http://www.cqvip.com

TAT为1:16，简化法为1:8。另有3份标本仅一种方法观察到凝集现象（TAT2，简化法1），但效价仅为1:4，未达到阳性标准。两种方法所见凝集类型完全相同，包括头-头型凝集2例，尾-尾型12例，头-尾型5例。

以上结果表明，简化法与TAT法所测得的结果基本吻合，实验误差在精子凝集抗体测定方法允许的1～2个稀释度范围以内[2]。

TAT法具有微量、敏感、便于大样本筛选等优点。尤其是正常供者的精液用量甚微(1μl/孔)，检测者可以在几份供者精液标本中挑选质量最好的使用，而且一份精液标本即可供检测200～300孔待测样品，这些都是经典方法所无法比拟的。如常用的GAT法每管需耗精液100μl，TSAT法每管需耗精液50μl，精液耗量大造成正常精液来源紧张，是一个很棘手的问题。另外，由于TAT法可用同一供者精液检查大批样品，明显减少了因供者精液来源不同而造成的实验误差[2]。TAT法与经典方法相比的另一优点，是能清楚观察到精子头-头凝集、尾-尾凝集和头-尾凝集等几种凝集类型，这也是经典方法办不到的。然而，TAT的技术要求比较复杂，尤其是需用倒置显微镜，给推广应用带来困难。经我们改造后的简化法，保留了TAT法微量、敏感的优点，用普通光镜取代了倒置显微镜，并且获得了相同的观察结果，说明该方法是可靠的。这种简化法为基层开展免疫不育症实验室检查提供了新手段。

与TAT法比较，简化法的缺点是观察凝集类型比较困难，图象不够清晰。不过，随着操作经验积累，绝大多数样品能用低倍镜作出正确判断，其它少数样品可转移至玻片上用高倍镜判断。况且，对于基层医院，重要的是判断有无凝集与凝集程度，以确定采取相应的治疗措施，而判断凝集类型则是相对次要的。

根据我们的经验，简化法操作过程中需要注意以下问题：

1．整个操作过程中要注意保温，室温最好在20℃以上。精液要新鲜，精子活力良好。凝集反应板要清洁，经95%酒精浸泡后，用蒸馏水洗净，晾干备用。

2．微量凝集反应板的孔深（即钻孔板的厚度）要均匀一致，0.8～1mm范围内为宜。孔过深会给观察带来困难，孔过浅样品的水分容易蒸发。

3．样品加入微量凝集反应板后，注意检查样品是否全部浸在液体石蜡中，以免水分蒸发导致精子死亡。

4．观察时，将显微镜聚光器下移并适当关小进光量，以获得较大图象反差，增加清晰度。

5．用高倍镜观察凝集类型时，吸取样品动作要轻，切忌猛烈吹打、振摇，以免破坏凝集团块，影响观察效果。

6．每一批实验，先观察阳性、阴性对照孔，其结果符合要求才能继续观察其他样品。

（本文承蒙第二医院人工肾实验室、妇产科，检验系临床免疫学教研室支持，特此致谢）

## 参考文献

[1] Rose NR, et al. Clin exp Immunol 1976; 23:175—199

[2] Friberg J. Acta Obs Gyn Scand 1974; Suppl. 36:21—29

[3] 叶秀君，谢培珍．上海免疫学杂志 1984; 4(1):37—39

[4] Shulman S. Immunological Factors in Human Reproduction. Academic Press 1982:5—8