

肺炎衣原体抗体IgM检测试剂盒（ELISA）说明书

【产品名称】

通用名称：肺炎衣原体抗体 IgM 检测试剂盒
(ELISA)

英文名称：SeroCP™ IgM

【包装规格】

96 人份/盒、192 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒是一种酶联免疫吸附测定，用于定性检测人类血清中肺炎衣原体特异性 IgM 抗体。

本试剂盒可通过检测 IgM 抗体来早期诊断肺炎衣原体现症感染。仅用于体外诊断。

肺炎衣原体(TWAR)是一种新出现的有传染性的因子，可引起一系列临床表现，包括上呼吸道和下呼吸道感染。衣原体肺炎感染一般是温和的、无症状的，然而，肺炎衣原体感染可能会引起一些严重的疾病如：咽炎、肺炎、急性支气管炎和社区获得性肺炎。如果未检测出和未进行治疗，此感染可能会导致长期持久的疾病。最新的数据显示肺炎衣原体感染和慢性疾病的关联。

儿童感染肺炎衣原体的几率较低，到中年时感染率急剧增高，到老年时持续增高（>50%）。

样本采集的困难性和被感染部位的不易接近性严重影响直接检测方法的有效性。因此，在直接检测方法不是很有效的情况下，血清学检测作为远端和慢性衣原体感染鉴定的非入侵性工具，常规应用于临床。此外，特定的抗体类型的出现也能指示出疾病的状态。

早期衣原体感染的特征是在 2-4 周内出现 IgM 抗体，随后 6-8 周内才有 IgA 和 IgG 反应。在急性感染肺炎衣原体后，IgM 抗体在 2-6 个月内会消失而 IgG 抗体滴度会慢慢减少，而 IgA 抗体趋向于迅速消失。当怀疑衣原体初步感染时，IgM 的检测有高度的诊断意义。然而，重复和慢性感染时 IgM 水平是比较低的，因此如果没有检测到 IgM 并不排除正在感染的可能性。对于重复感染，IgG 和 IgA 水平升高较快，通常在 1 至 2 周内。

IgA 抗体是一个可靠的原发性、慢性和再感染性的免疫学标记物。这些抗体通常在治疗和根除衣原体感染之后快速下降并回复到基线水平。IgA 抗体滴度的维持一般被认为是慢性衣原体感染的标志。IgG 抗体维持长时间并下降较慢。因此，IgG 抗体的出现主要表示衣原体感染尚未解决。然而，IgG 抗体的四倍升高或其高水平可能指示慢性衣原体的正在感染。

SeroCP™是一种基于纯化的肺炎衣原体的基础结构体(TWAR-183)抗原的酶联免疫测定，用于检测人体内的抗体响应。如用于完整地诊断现症、慢性或过往感染，推荐测定肺炎衣原体 IgG、IgM 和 IgA 抗体。

【检验原理】

- SeroCP™微孔板用纯化的肺炎衣原体的基础结构体(TWAR-183)抗原包被。
- 稀释待测血清并在 SeroCP™微孔板内在 37℃下孵育 1 小时。此步骤样本中的肺炎衣原体抗体则与固定的抗原结合。
- 清洗去除非特异抗体。
- 抗人 IgM 的辣根过氧化物(HRP)结合物加入后在 37℃下孵育 1 小时。此步骤与之前形成的抗原抗体复合物结合。
- 洗去未结合物。
- 加入 TMB 底物，底物由过氧化物酶水解，减少底物的液体产生蓝色产物。
- 加入终止液，蓝色变为黄色，在酶标仪波长为 450nm 处读取吸光度。
- 吸光度与结合到包被抗原的特异性抗体的水平成正比关系。

【主要组成成份】

- 96 人份/盒 货号：A192-01M
1. 肺炎衣原体抗原包被的微孔板：
96 孔(8x12) 1 块板
 2. 浓缩清洗缓冲液（20X）：PBS-Tween 缓冲液。
1 瓶，100ml
 3. IgM 血清稀释液(红色)：可直接使用的包含有抗人 IgG 抗体的缓冲液，含有浓度低于 0.05%的 Proclin 作为防腐剂。
1 瓶，60ml
 4. 结合物稀释液（绿色）：可直接使用的缓冲液，含有浓度低于 0.05%的 Proclin 作为防腐剂。
1 瓶，40ml
 5. 阴性质控：可直接使用的阴性 IgM 肺炎衣原体人类血清，含有浓度低于 0.05%的 Proclin 和浓度低于 0.1%的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶，1.25ml
 6. 阳性质控：可直接使用的阳性 IgM 肺炎衣原体人类血清，含有浓度低于 0.05%的 Proclin 和浓度低于 0.1%的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶，0.75ml
 7. 浓缩的 HRP-结合物（300X）：辣根过氧化物(HRP)结合抗人 IgM（特异的 μ 链）。含有浓度低于 0.05%的 Proclin 作为防腐剂。1 小瓶，0.2ml
 8. TMB 底物液：可直接使用，含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺色原体作为产和底物的过氧化物。
1 瓶，14ml
 9. 终止液：可直接使用的溶液，含 1M的H₂SO₄。
1 瓶，15ml
 10. 板盖：1 块
 11. 说明书：1 本

192 人份/盒 货号：B192-01M

1. 肺炎衣原体抗原包被的微孔反应板：
96 孔(8x12)，2 块板

2. 浓缩清洗缓冲液 (20X): PBS-Tween 缓冲液。
2 瓶, 100ml/瓶
3. IgM 血清稀释液(红色): 可直接使用的包含有抗人 IgG 抗体的缓冲液, 含有浓度低于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。
2 瓶, 60ml
4. 结合物稀释液 (绿色): 可直接使用的缓冲液, 含有浓度低于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。
1 瓶, 80ml
5. 阴性质控: 可直接使用的阴性 IgM 肺炎衣原体人类血清, 含有浓度低于 0.05% 的 Proclin 和浓度低于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 1 小瓶, 2.4ml
6. 阳性质控: 可直接使用的阳性 IgM 肺炎衣原体人类血清, 含有浓度低于 0.05% 的 Proclin 和浓度低于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 1 小瓶, 1.25ml
7. 浓缩的 HRP-结合物 (300X): 辣根过氧化物(HRP) 结合抗人 IgM (特异的 γ 链)。含有浓度低于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。 1 小瓶, 0.2ml
8. TMB 底物液: 可直接使用, 含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺色原体作为产和底物的过氧化物
1 瓶, 24ml
9. 终止液: 可直接使用的溶液, 含 1M 的 H_2SO_4 。
1 瓶, 30ml
10. 板盖: 2 块
11. 说明书: 1 本

【储存条件及有效期】

1. 所有试剂应在 2-8℃ 下保存, 未开启的试剂保存致试剂盒包装显示的有效期限 (12 个月)。原始的塞子塞住的或密封的试剂盒成份暴露在周围环境的温度下几小时将对试剂不受影响。不能冻结!
2. 一旦试剂开封后, 有效期为 90 天。
3. 不使用的微孔条要用内有干燥剂的铝袋重新密封, 由打开铝袋的末端开始滚动在袋子上长条的将开口紧紧封闭。
4. 在冻藏过程中, 20x 的浓缩清洗缓冲液会产生结晶; 这是很正常的。在稀释之前将在 37℃ 暖化缓冲液会使用结果溶解。一旦稀释, 溶液在 2-8℃ 下可保存 21 天。

【适用仪器】

适用于任何带有 450nm 波长的酶标仪。

【样本要求】

使用标准技术无菌收集血清样本。加热失活的血清不能使用。不推荐使用脂血、混浊或污染的血清。血清中有微粒物质和沉淀会影响检测结果, 这样的样本应在使用之前离心或过滤使其澄清。

样本应在 2-8℃ 下保存并在 7 天内进行检测 (极力推荐加入 0.1% 的叠氮化钠)。如预知需长期保存, 整个样本或部份样本在 -20℃ 下保存, 但避免反复冻融。

【检验方法】

1. 自备材料:

- 1) 干净的测试管用于稀释病人的血清样本。

- 2) 任意的塑料瓶用于浓缩的 HRP-结合物稀释。
- 3) 移液器和多通道移液器 (5-50, 50-200 和 200-1000 μ l), 移液器吸嘴。
- 4) 有测定 1L 体积的烧瓶。
- 5) 有测定 50ml 体积的量筒。
- 6) 洗瓶。
- 7) 吸水纸。
- 8) 旋涡混合器。
- 9) 带盖的 37℃ 水孵箱或在 37℃ 孵育的湿放置架。
- 10) 有 450nm 波长的酶标仪。
- 11) 蒸馏水或双蒸去离子水。

2. 试剂准备:

- 1) 实验前将所有的检测成份和待测临床样本置于室温下, 在使用前摇匀阳性质控, 阴性质控和临床样本。
- 2) 确定待测样本数目, 除样本外, 每个检测须包括以下以下检测: 2 个阴性质控孔, 1 个阳性质控孔。
- 3) 从铝袋切断封条的一端收回微量板, 在 96 孔支架中取出所需要的微量孔条 (根据检测样本的数量)。
- 4) 用双蒸去离子水或蒸馏水以 1/20 稀释浓缩冲洗液。例如 50ml 浓缩缓冲液加 950ml 双蒸去离子水或蒸馏水, 以准备一升冲洗液。

3. 孵育血清样本和质控:

- 1) 一步稀释: 用血清稀释剂按 1/105 稀释所有的病人血清, 如下: 加 5 μ l 血清到 520 μ l 血清稀释液。两步稀释: 用血清稀释剂按 1/105 稀释所有的病人血清, 如下: 加 10 μ l 血清到 200 μ l 血清稀释液 (1/21), 然后加 25 μ l 的 1/21 稀释液到 100 μ l 血清稀释液中。注意: 血清样本稀释中包括抗血清 IgG 抗体, 为去除人类血清中 IgG 抗体。
- 2) 在相应孔中加入 50 μ l 阳性质控, 阴性质控和 1/105 稀释的血清样本。阴性质控必须进行双孔检测。
- 3) 盖上班盖在湿气室内 37℃ 下孵育 1 小时。
- 4) 除去微孔中的液体。
- 5) 清洗步骤: 用清洗缓冲液注满微量孔 (300-350 μ l) 并丢弃液体, 重复这个步骤两次, 总共进行 3 次清洗步骤。
- 6) 在干净的吸水纸上轻轻拍打使微孔条干燥。

4. 孵育结合物

- 1) 浓缩的 HRP-结合物抗人 IgM 应有使用之前立即稀释成工作溶液。用结合物稀释液按 1/300 稀释浓缩的 HRP-结合物抗人 IgM。例如: 2 个微孔条准备至少 3ml 的结合物如下: 10 μ l 浓缩的 HRP-结合物抗人 IgM 与 3ml 结合物稀释液混合。
- 2) 每孔中加入 50 μ l 稀释后的结合物。
- 3) 盖上班盖在湿气室内 37℃ 下孵育 1 小时。
- 4) 除去液体并按上述 9-10 步骤清洗微孔板。

5. 孵育 TMB 底物液

- 1) 每个孔中加入 100 μ l TMB-底物液, 盖上班盖, 室温下孵育 15 分钟。
- 2) 每孔中加入 100 μ l 终止液 (1M H_2SO_4) 终止反应。

6. 结果确定

在加入终止液后的 30 分钟内测量吸光度（450nm 波长）并记录结果。

注意：在读取结果之前要去除空气的气泡。小心擦拭 ELISA 板底部。

检测程序：

加入2x50μl阴性质控，1x50μl阳性质控和
稀释样本到相应的肺炎衣原体抗原包被微孔中

↓
盖上车盖在 37℃ 孵育 1 小时，100% 保湿

↓
用冲洗液冲洗微孔3次(300-350μl)

↓
加入 50μl 的 1/300 稀释的 HRP 结合物

↓
盖上车盖在 37℃ 孵育 1 小时 100% 保湿

↓
用冲洗液冲洗微孔 3 次(300-350μl)

↓
加 100μl 的 TMB-底物

↓
盖上车盖在室温下孵育 15 分钟

↓
加入 100μl 终止液

↓
在 450nm 波长读取吸光度

↓
计算和解释结果

【参考值（参考范围）】

正常结果为阴性。

【检验结果的解释】

1. 以下的标准是检测中必需遇到才能被认为有效。如果检测中没有遇到这些标准，这个检测被认为是无效并且要重做。

- 1) 阳性质控：吸光度应在 450nm 波长下 ≥ 0.8 。
2) 阴性质控：阴性质控的吸光度平均值在 450nm 波长下为 $0.1 < NC \leq 0.4$

2. 计算 COV 和 COI 值：

$COV = NC \times 2$

NC=在 450nm 波长下检测两个阴性质控吸光度的平均值

为在不同的检测中得到相应的结果，临界指数按以下的公式计算：

$COI = \text{样本吸光度} / COV$

COV:临界值 NC:阴性质控 COI:临界指数

3. 结果解释：

图 1：肺炎衣原体抗体与 450nm 下吸光度之间的关系

吸光度	COI	结果	解释
-----	-----	----	----

(450nm)			
$O.D < 1.4 \times COV$	< 1.4	阴性 没有检测 IgM 抗体	表明无肺炎衣原体现症感染。
$1.4 \times COV \leq O.D \leq 1.5 \times COV$	1.4-1.5	临界值 低水平的 IgM 抗体	提示有可能感染肺炎衣原体，应在 2-4 周后重检测样本。
$O.D > 1.5 \times COV$	> 1.5	阳性 可检测到一定浓度的 IgM 抗体	提示肺炎衣原体现症感染。

在临界值结果的样本应在 2-4 周后进行第二次检测，两次血清样本应同时检测。如果测得的结果仍为临界值，样本应该被认为是阴性的。

为获得全面的抗体情况，IgG和IgA须一同检测。

图2：基于IgM、IgG和IgA抗体联合检测对结果进行解读。

肺炎衣原体抗体水平			结果解释
IgM	IgG	IgA	
阴性	阴性	阴性	没有检测到肺炎衣原体
阳性	阴性或阳性	阴性或阳性	表示现症感染肺炎衣原体
阴性	阳性	阴性	表示过去或现症感染
阴性	阳性或阴性	阳性	表示现症或慢性感染。

【检验方法的局限性】

1. 单一的血清学检测测试不能作为最后的确诊。应结合所有临床和实验室的数据。
2. 样本在早期的感染可能还没有检测出抗体。如果怀疑有衣原体的感染则在2-4周后重取样本检测并与第1个样本进行平行检测。

【产品性能指标】

下图：SeroCP™ IgM 与 SeroFIA™ 衣原体 IgM（Savyon Diagnostics Ltd., 货号：512-01）进行对比。本研究在两个医学中心进行，采用113份血清样本（系统性症状（33）和健康儿童（80））。

SeroFIA™ SeroCP™	阳性	阴性	总数
阳性	30	4	34
阴性	3	76	39
总数	33	80	113

灵敏度： $30/33 \times 100 = 91\%$

特异性： $76/80 \times 100 = 95\%$

整体一致性： $106/113 \times 100 = 94\%$

精密度

批内测定：

样本	重复次数	平均值	CV%
阳性	10	1.469	2.3
阴性	10	0.236	4.7

批间测定:

样本	重复次数	平均值	CV%
阳性	10	0.605	5.4
阴性	10	0.163	6.0

【注意事项】

1. 本试剂盒所含人血清已通过FDA和CE认可技术的检测，并发现HBV，HCV和HIV（1和2）的抗体均为阴性。尚无已知方法可完全保证产品所来源的人类血不会传播感染，因此本试剂盒内的所有含人类血成份的必须按有潜在传染的血清或血液进行处理，参考出版的CDC/NIH手册中“微生物学和生物医学实验室的生物安全，1998”。
2. TMB-底物对皮肤和粘液膜有刺激作用。避免直接接触。
3. 试剂盒内的所有成份都经过同批的校正和测试。不推荐与不同批号的试剂混合使用，因为对测试结果有影响。
4. 稀释的硫酸(1M H₂SO₄)对眼睛和皮肤有刺激作用。如接触到眼睛，立即用大量水冲洗并咨询医生。

【参考文献】

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart

disease in the Helsinki heart study. Ann.Intern. Med. 116: 273-278.

3. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. And Makela, P.H. (1984). Chlamydia pneumoniae and its serodiagnosis in infants. J.Infect. Dis. 149: 598-604.
4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of Chlamydia pneumoniae In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A.(1994). Post-therapeutic evolution of serum chlamydia antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinonen, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtanen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel Chlamydia TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. Lancet. 2: 983-986.
7. Grayston, J.T., Campbell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P.(1989). A New Respiratory Pathogen: Chlamydia pneumoniae Strain TWAR. J. Inf.Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic Chlamydia pneumoniae Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.

售后服务机构:

公司名称: 北京科瑞美科技有限公司

联系电话: 010-56125083

网址: www.craymeibio.com