

萨卫亚™肺炎支原体抗体 IgM 检测试剂盒 (ELISA) 说明书

【产品名称】

通用名称: 肺炎支原体抗体 IgM 检测试剂盒
(ELISA)

英文名称: SeroMP™ IgM

【包装规格】

96 人份/盒、192 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒采用酶联免疫吸附分析法(ELISA), 用于半定量检测人血清中肺炎支原体特异性 IgM 抗体。

本试剂盒通过确定 IgM 抗体来早期诊断现症感染。仅用于体外诊断。

肺炎支原体是一种普遍的社区获得性肺炎, 通常的表示特征是逐进的头痛发作、发烧、不舒服和最大的特征是干咳。肺炎支原体在所有的年龄群都很普遍, 然而, 最普遍的是在二十岁以下尤其是在四岁以下的儿童。已有报道指出由支原体引起的肺炎占所有的肺炎的近 30%。

肺炎支原体同样与非呼吸道疾病有关, 如脑膜炎、脑炎、胰腺炎、感觉神经听力受损和急性脑干综合症。

由于发病普遍, 在所有肺炎的病例中都应该考虑肺炎支原体, 但是由于不同的疾病也有相同的病症, 所以将血清学检测作为附加的诊断工具是必要的。ELISA 技术是灵敏的、特异的, 并且能区分测定特定的 IgG、IgA 和 IgM 抗体。

肺炎支原体特异性 IgM 抗体在疾病发作初期即升高, 1 至 4 周内达到最高峰, 然后在几个月之内衰退到非显著水平 (诊断上)。由于 IgM 抗体早出现和相对较短的半衰期, 因此允许在急性感染期采用单个血清样本诊断。年轻患者与成年患者相比往往有较高的 IgM 水平。IgG 水平比 IgM 水平升高较慢, 但维持异常水平的时间较长, 因此分开至少两周检测样本会有显著意义的增高, 能在即使缺乏 IgM 的情况下指示现症感染或者再次感染。IgA 抗体在老年患者中常见有较高水平, 并且比 IgM 检测成人现症感染的诊断更加有用。

Savyon® 公司已经开发出半定量 IgG、IgA 和 IgM 酶免试剂盒, 可用于跟进入血清中的抗体水平的改变。SeroMP™ 试剂盒所采用的抗原是一种肺炎支原体的膜制备, 包含了 P1 膜蛋白 (一种主要免疫原)。

SeroMP™ 试剂盒可用于肺炎支原体特异性 IgG、IgA 及 IgM 抗体的早期和急性测定。

【检验原理】

- SeroMP 微孔板用纯化的肺炎支原体膜蛋白片断包被。
- 稀释待测血清并在 SeroMP 微孔板内孵育。样本中的肺炎支原体特异性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)结合物加入后与预先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 450/620nm 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: A262-01M

1. 肺炎支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): 可直接使用的缓冲液, 含有抗人类血清 IgG 抗体和少于 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, 含有少于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。1 瓶, 40ml
5. 阳性质控: 可直接使用的阳性 IgM 肺炎支原体人类血清, 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶, 0.75ml
6. 阴性质控: 可直接使用的阴性 IgM 肺炎支原体人类血清, 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶, 0.75ml
7. P10-标准: 可直接使用的低阳性 IgM 肺炎支原体人类血清, 含有 IgG 的 10BU/ml (规定的结合单位), 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶, 0.75ml
8. P50-标准: 可直接使用的低阳性 IgM 肺炎支原体人类血清, 含有 IgG 的 50BU/ml (规定的结合单位), 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶, 0.75ml
9. P100-标准: 可直接使用的低阳性 IgG 肺炎支原体人类血清, 含有 IgG 的 100BU/ml (规定的结合单位), 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。1 小瓶, 0.75ml
10. 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)。含有少于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。1 小瓶, 0.2ml
11. 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
12. 终止液: 可直接使用的溶液, 含 1M 的 H_2SO_4 。1 瓶, 15ml
13. 板盖: 1 块
14. 说明书: 1 本

192 人份/盒: 货号: B262-01M

1. 肺炎支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): 可直接使用的缓冲液, 含有抗人类血清 IgM 抗体和少于 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, 含有少于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。 **1 瓶, 80ml**
5. 阳性质控: 可直接使用的阳性 IgG 肺炎支原体人类血清, 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 **1 小瓶, 1.25ml**
6. 阴性质控: 可直接使用的阴性 IgG 肺炎支原体人类血清, 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 **1 小瓶, 1.25ml**
7. P10-标准: 可直接使用的低阳性 IgG 肺炎支原体人类血清, 含有 IgG 的 10BU/ml (规定的结合单位), 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 **1 小瓶, 1.25ml**
8. P50-标准: 可直接使用的低阳性 IgG 肺炎支原体人类血清, 含有 IgG 的 50BU/ml (规定的结合单位), 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 **1 小瓶, 1.25ml**
9. P100-标准: 可直接使用的低阳性 IgG 肺炎支原体人类血清, 含有 IgG 的 100BU/ml (规定的结合单位), 含有少于 0.05% 的 Proclin 和少于 0.1% 的叠氮化钠作为防腐剂。 **1 小瓶, 1.25ml**
10. 浓缩的 HRP-结合物(300X): 辣根过氧化物(HRP)结合抗人 IgG (特异的 γ 链)。含有少于 0.05% 的 Proclin 作为防腐剂。 **1 小瓶, 0.2ml**
11. 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**
12. 终止液: 可直接使用的溶液, 含 1M 的 H_2SO_4 。 **1 瓶, 30ml**
13. 板盖: **2 块**
14. 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 (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、650nm 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 (高度建议加入 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, 避免反复冻融。

【检验方法】

1. 需自备的材料:
 - 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) 可调的微量移液器和多通道的移液器 (范围在 5-50, 50-200 和 200-1000 μ l), 并有移液器吸嘴。
 - 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) 带 450nm 和 620nm 波长的酶标仪。
 - 11) 蒸馏水或双蒸去离子水。
2. 试剂的准备:
 - 1) 实验前将所有测试成份和待测临床样本置于室温下, 使用前摇匀标准(P10, P50, P100), 阴性质控, 阳性质控和临床样本。
 - 2) 确定待测样本的数目, 除样本外, 每个测试须包括以下检测: 1 个空白孔, 1 个阴性质控孔, 阳性质控孔和 3 个标准测试孔(P10, P50, P100)。
 - 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孔条 (根据待测样本的数量)。
 - 4) 用双蒸去离子水或蒸馏水以 1/20 稀释浓缩冲洗液。如 50ml 浓缩缓冲液加 950ml 双蒸去离子水或蒸馏水。
3. 孵育血清样本和质控:
 - 1) 用血清稀释液以 1: 105 的比例稀释病人血清, 稀释按以下所述: 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。
 - 2) 在相应孔中加入 50 μ l 的空白 (血清稀释液), 阳性质控, 阴性质控, 3 个标准(P10, P50, P100) 和 1: 105 稀释的血清样本。
 - 3) 盖上板盖在湿气室内 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 IgG 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 IgG。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 IgG 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。

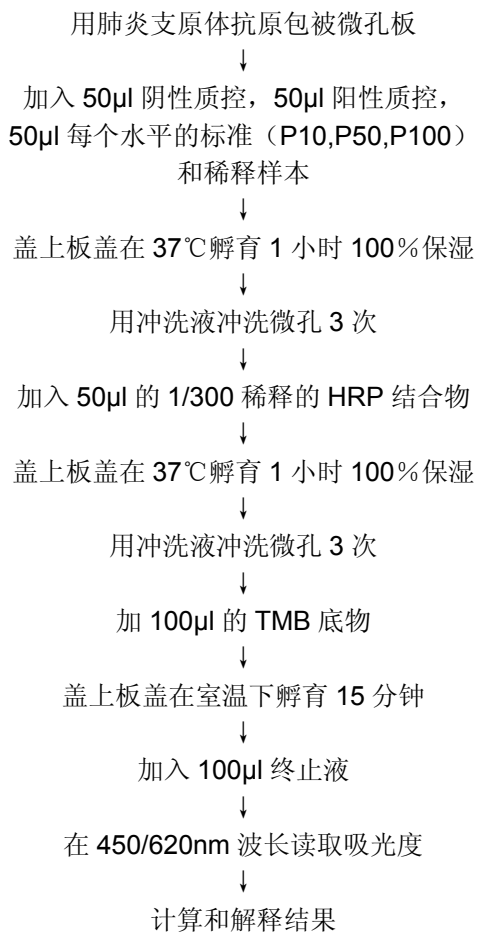
- 3) 盖板上盖在湿气室内 37℃下孵育 1 小时。
- 4) 除去液体并按上述 9-10 步骤清洗微孔板。
5. 孵育 TMB 底物液
 - 1) 每个孔中加入 100μl TMB-底物液，盖板上盖，室温下孵育 15 分钟。
 - 2) 每孔中加入 100μl 终止液 (1M H₂SO₄) 以停止反应。

6. 结果确定
在 450nm/620nm 波长下检测吸光度并记录结果。检测应在终止颜色产生的 30 分钟内进行。

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。

7. 测试的确认：
- 以下标准是检测中必须遇到才被认为有效。如没有遇到这些标准，该检测被认为是无效且需重做。
- 1) O.D._{P100} > 1.2
 - 2) 比率：O.D._{P10}/O.D._{NC} > 1.5
 - 3) 比率：O.D._{P50}/O.D._{NC} > 4
 - 4) 比率：O.D._{P100}/O.D._{NC} > 7
 - 5) PC 应 ≥ 40 BU/ml

操作程序



【参考值（参考范围）】

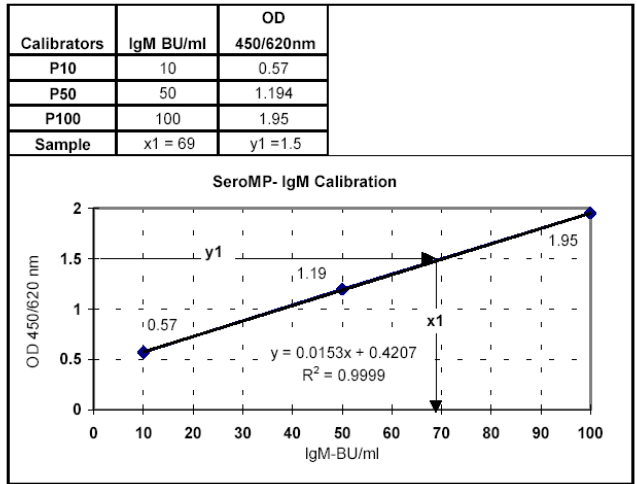
正常结果为阴性。

【检验结果的解释】

1. 计算测试结果：
手工方法，使用正方图纸：

- 1) 在 Y 轴上绘制 3 个标准 (P10, P50, P100) 吸光度 (OD) 值，对应的浓度 (BU/ml) 绘制在 X 轴。
- 2) 通过这几个点绘制最适合的直线。
- 3) 应用标准曲线，从每个测试的样本吸光度中求出未知血清样本中抗体的浓度值 (BU/ml)。看图 1 图 1：求结果

在 Y 轴上读取样本吸光度值并绘制水平线至标准曲线。从截点拉水平线到 X 轴。读取样本的 BU/ml 浓度。



2. 结果解读：

IgM BU/ml	结果	诊断解释
<10BU/ml	阴性 检测不到 IgM 抗体	没有肺炎支原体感染
≥10BU/ml ≤20BU/ml	临界值	在 2-3 周后重新取样与第一个样本进行平行检测。如果第二次检测的结果也是临界值则可视作阴性。
>20BU/ml	阳性值 有相应的 IgM 抗体	提示现症感染肺炎支原体

为获得全面的抗体情况，IgG和IgA须一同检测。

基于IgM、IgG和IgA抗体联合检测对结果进行解读。

肺炎支原体抗体水平			
IgG	IgM	IgA	
阴性	阴性	阴性	没有检测到肺炎支原体
阴性或阳性	阳性	阴性或阳性	表示现症感染肺炎支原体
阳性	阴性	阴性	表示过往或现症感染
阳性或阴性	阴性	阳性	表示现症或再次感染。

3. 交叉反映：

住院患者，被呼吸道的病原菌感染：肺炎衣原体，流感病毒A，流感病毒B，副流感病毒1、2和3，腺病毒

和EBV病毒已用血清诊断试剂盒进行确诊的，同样用SeroMP™试剂盒检测进行检测，大部分的血清是阴性的，没有发现明显的交叉反应。

【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。如果怀疑有支原体感染则在2-4周后重取样本检测并与第1个样本进行平行检测。
3. 妨碍物质：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前离心或过滤使其澄清。

【产品性能指标】

1. 灵敏度和特异性：

本试剂盒的灵敏度和特异性使用血清来计算，并已经由2个市售的ELISA分析（一致结果），22个有肺炎的样本和21个健康人的血液进行检测和通过。

		一致的结果	
		阳性	阴性
SeroMP IgM	阳性	21	0
	阴性	1	21

灵敏度： $21/22 \times 100 = 95\%$

特异性： $21/21 \times 100 = 100\%$

整体一致性： $42/43 \times 100 = 98\%$

2. 精密度

批内测定：

样本	重复次数	平均值	CV%
阳性	10	1.341	3.4%
阴性	10	0.243	4.3%

批间测定：

样本	重复次数	平均值	CV%
阳性	10	1.302	4.4%
阴性	10	0.330	8.6%

【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。如接触眼睛，立即用大量水冲洗并咨询医生。

【参考文献】

1. Liberman D., Schlaffer F., Boldur I., Liberman D., Horowitz S.,

- Friedman, M.G., Leioninen M., Horowitz O., Manor E. and Porath A. (1996) Multiple pathogens in adult patients admitted with Community - acquired pneumonia, a one year prospective study of 346 consecutive patients Thorax 1996 51: 179-184.
2. Okada T., Kato I., Miho I., Minami S., Kinoshita H., Akao I., Kemmochi M., Miyabe S. and Takeyama I (1996) Acute Sensorineural Hearing Loss Cause by *M. Pneumoniae* Acute Otolaryngol (Stockh) 1996 522: 22-25
3. Lieberman, D., Shvartzman, P., Lieberman, D., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Hoffman, S., Mosckovitz, R., Ohana, B., Leinonen, M., Luffy, D. and Boldur I. (1998) Etiology of Respiratory Tract Infection in Adults in a General Practice Setting. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17: 685-689.
4. Raisanen S.M. Suni J.I. and Leinikki P.O.: (1980) "Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections by enzyme immunoassay": J.Clin. Pathol. 33, 836-840.
5. Seggav J.S., Sedmark G.V. and Krup V., (1996) Isotype-specific antibody responses to acute *M. pneumoniae* infection Ann Allergy Asthma Immuno. 77: 67-73.
6. Samra Z., and Gadba R., (1993) "Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by specific IgM antibodies using a new capture-enzyme-immunoassay; Eur. J. Epidemiol. 9: 97-99.
7. Lieberman, D., Lieberman, D., Printz, S., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Ohana, B., Friedman, M.G., Dvoskin, B., Leinonen, M. and Boldur, I. (2003) Atypical Pathogen Infection in Adults with Acute Exacerbation of Bronchial Asthma. Am J Respir Crit Care Med. 167: 406-410.
8. Lieberman, D., Leiberman, D., Ben-Yaakov, M., Shmarkov, O., Gelfer, Y., Varshavsky, R., Ohana, B., Lazarovich, Z. and Boldur, I. (2002) Serological evidence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in acute exacerbation of COPD. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 44: 1-6.
9. Lieberman, D., Leiberman, D., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Ohana, B., Friedman, M.G., Dvoskin, B., Leinonen, M. and Boldur, I. (2003) Age and Ageing 32: 95-101.- 61 -
10. Lieberman, D., Leiberman, D., Koronsky, I., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Friedman, M.G., Dvoskin, B., Leinonen, M., Ohana, B., and Boldur, I. (2002). A comparative study of the etiology of adult upper and lower respiratory tract infections in the community. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 42: 21-28.
11. Lim, T.H., Muhlestein, J.B., Carlquist, J.F., Ohana, B., Lipson, M., Horne, B.D., Anderson, J., L. (2002). *Mycoplasma Pneumoniae* High IgA Titer but Not IgG Predicts Increased Hazard of Death or Myocardial Infarction Among Patients with Angiographically Defined Coronary Artery Disease. Abstract presented at the 51st Annual Scientific Session of the American College of Cardiology, March 17-20, 2002. Atlanta, Georgia.

【生产企业】

Savyon Diagnostics Ltd（以色列）

地址：3 Habossem St. Ashdod 77610 ISRAEL

电话：+972. 8. 8562920 传真：+972. 8. 8523176

E-mail: support@savyondiagnostics.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路88号长银大厦12层

B12室

电话：010-58895646 传真：010-58895611

电子邮箱：info@rz-biotech.com

网址：www.rz-biotech.com

【医疗器械注册证书编号】

国食药监械（进）字2011第3402738号

【产品标准编号】YZB/ISR 3266-2011

【说明书批准及修改日期】2011年8月24日