

赛润 ELISA *classic* 衣原体 IgG/IgA

目录

1.应用范围

2.诊断意义

3.赛润 ELISA *classic* - 检测原理

4.试剂盒组成

5.检测所需物质，试剂盒未提供

6.储存和稳定性

7.赛润 ELISA *classic* 的检验步骤

7.1 注意事项

7.2 检验前的准备工作和储存

7.3 试剂盒反应试剂的准备工作和

7.4 检测程序概要

7.5 检测过程

8.检测结果评估

8.1 4PL 单点定量法

8.2 检验有效性标准

8.3 计算赛润 ELISA *classic* 衣原体 IgG/IgA (定量)

8.4 检测结果分析

9. 性能特性

9.1 重复性

9.2 敏感性和特异性

10.警告

10.1 警告和安全措施

10.2 废料处理

赛润 ELISA classic 衣原体 IgG/IgA
酶联免疫法测定人体抗体 (IgG/IgA)
只限于体外诊断

IgG 试剂盒 (定量) 编号 ESR137G

IgA 试剂盒 (定量) 编号 ESR137A

检测评估标准: Dade Behring BEP® III / BEP® 2000, DSX, 手动操作

1.应用范围

赛润 ELISA classic 衣原体 IgG/IgA 用于定性和/或定量检测血清或血浆中人类的特异衣原体抗体。IgG 及 IgA-ELISA 用于诊断急性或既往的感染。

2.诊断意义

衣原体属于衣原体目家族。在这一家族中目前可分衣原体和足衣虫属两个类型。在这个类型中有沙眼衣原体，肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体等三种人类病原种类。几乎所有鸟类和哺乳动物都遭到鹦鹉热衣原体的侵害，而人类往往是沙眼衣原体的主要宿主。家禽饲养员中也被观察到鹦鹉热衣原体的感染，这种鹦鹉热衣原体会导致在临床角度而言很难治愈的人类鸟疫。人类的“鹦鹉疫，也就是说鸟疫类似”的肺炎经常是由肺炎衣原体导致的。流行病学中调查证明，衣原体引起的这些疾病已在人类自主传播，与动物已无密切相关。人类的不同衣原体感染有以下不同的传染渠道：肺炎衣原体通过人与人之间的飞沫传染，沙眼衣原体的传染则是通过接触传染（围产期，性接触等），而鹦鹉热衣原体的传染是通过吸入鸟粪或羽毛灰尘，也可以通过接触传染（如实验，分泌物等）。

衣原体是在膜状空泡中繁殖活性细胞的革兰氏阴性球杆细菌。它们具有自身的新陈代谢，但不能合成 ATP。这一情况决定其需要在细胞内存活。

在衣原体感染过程中，出现高度传染性的微体和不传染网状微体等两个形式。衣原体的感染过程经常不带明显的临床症状，但会导致严重的连锁疾病。沙眼衣原体的感染可能导致非典型尿道炎，子宫颈炎和结膜炎。在感染严重的情况下年

轻男人首先会得表皮炎和前列腺炎，女人会得子宫附件炎，宫外孕或不孕症。沙眼衣原体除了性接触传播之外，更严重的是围产期母亲对婴儿的传染。已感染母亲的 60-70% 会传染给其婴儿。如此会导致新生儿的结膜炎或肺炎。沙眼衣原体的感染也会导致男女反应性关节炎。

衣原体肺炎的感染在大多数情况下没有症状或仅有嗓子嘶哑，干咳和疲乏无力等轻度症状。但它可导致慢性的和严重的肺炎。最新的血清病理研究表明慢性肺炎感染和动脉硬化症的血管变化有并发现象。病原体免疫学的分析似乎显示了随之而来的更危险的冠状心脏病心和肌梗塞的出现。这一推理有待于通过更进一步的研究得以证实。

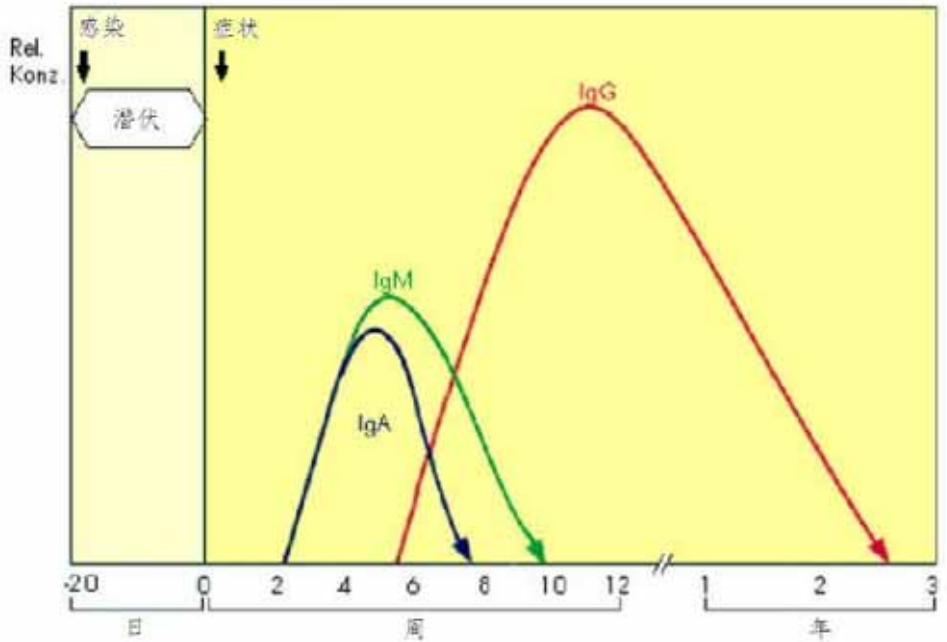


插图 1: 衣原体感染的典型抗体纵剖面图。来源:[2]

初感染第一次症状出现约 2 周后将发生 IgA 和 IgM 抗体的上升，约 5 周后达到高峰，第 10 周时逐渐下降。正是在 IgA 和 IgM 抗体活性达到高峰的那段时间内，也开始

产生 IgG 抗体，然后在出现症状后的第 12 周达到高峰，并在几年之内都有可能被检测出来。当发生再传染后往往会出现 IgA 和 IgG 抗体在 IgM-答案阴性情况下迅速上升的现象。

3. 赛润 ELISA classic - 检验原理

用**抗原**包被微量板孔，制成**固相载体**。加患者血清到板孔中，其所含的抗体特异性地与固相载体中现存抗原结合，形成免疫复合物。除去多余物质后，加入**结合了碱性磷酸酶的 IgG、IgA 或 IgM 抗体**，使之与上述免疫复合物反应。洗板，除去多余的结合物，加入**底物（对硝基苯磷酸盐）**。其与酶结合的免疫复合物反应，产生有颜色产物，颜色强度与特异性抗体含量成正比。

4. 试剂盒的组成

试验成分	IgG 试剂盒 数量	IgA 试剂盒 容积
微孔条 (此微孔条可拆下单独使用,每条有 8 孔,共 96 孔,已经包被了抗原) 1 个微孔条框架 包被的抗原为灭活抗原	12	12
标准血清（立即可用） 人血清溶于含蛋白的磷酸盐缓冲液；抗 HIV 抗体、抗乙肝病毒（HBV）表面抗原和抗丙肝病毒（HCV）抗体均为阴性； 防腐剂：< 0.1% 叠氮化钠 染色剂：紫红色 O	2 × 2 毫升	2 × 2 毫升
阴性对照血清（立即可用） 人血清溶于含蛋白的磷酸盐缓冲液；抗 HIV 抗体、抗乙肝病毒（HBV）表面抗原和抗丙肝病毒（HCV）抗体均为阴性； 防腐剂：< 0.1% 叠氮化钠 染色剂：里沙明绿 V	1 × 2 毫升	1 × 2 毫升
酶标记的抗人 IgG, IgA, IgM（立即可用） 羊抗人 IgG, IgA, IgM（多克隆），标记碱性磷酸酶后在蛋白稳定剂中储存。 防腐剂：0.01% 甲基异噻唑啉酮 0.01% 溴化硝基二巯烷	13 毫升	13 毫升

浓缩洗液（可稀释至 1000 毫升） 氯化钠溶液，含吐温 20 和 30mM Tris 防腐剂：< 0.1% 叠氮化钠	1 × 33.3 毫升	1 × 33.3 毫升
稀释缓冲液 磷酸盐缓冲液，内含蛋白和吐温 20 防腐剂：< 0.1% 叠氮化钠 0.01 克/升的溴酚蓝钠盐	2 × 50 毫升	2 × 50 毫升
终止液 1.2N 氢氧化钠	15 毫升	15 毫升
底物（立即可用） 对硝基苯磷酸盐，不含其它溶剂的缓冲液 防腐剂：< 0.1% 叠氮化钠 （未开封瓶子中的底物可能会轻微变黄，但不会影响其质量）	13 毫升	13 毫升
带有标准曲线和评估表的质量控制文件 （抗体以 IU/毫升或 U/毫升计量）	1	1

5.其它检测所需物质

- 普通实验室所需的仪器装置
- IgM 检测：另需赛润含对照抗原的类风湿因子 Rf—吸附剂（Z200/20ml）
- 分光光度计，波长 405 纳米，建议参考波长范围 620 纳米- 690 纳米（例如 650 纳米）
- 37 温箱
- 湿盒
- 蒸馏水。

6.储存及稳定性

试剂	储存	稳定性
微孔条（抗原）	开封后放在 2-8 装有干燥剂的密封铝箔袋中。	4 星期
对照血清 / 标准血清	开封后保存于 2-8 。	有效期内；
酶标记抗体	立即可用的溶液于 2-8 储存。 避免污染（使用无菌枪尖）。	有效期内
稀释缓冲液	开启后于 2-8 储存。	

	有絮状沉淀时丢掉 未开封	有效期内
洗涤液	浓缩液开封后保存于 2-8℃。 工作液在 2-8℃。 工作液在室温下。 盛过工作液的瓶子应按常规方法清洗，并丢弃混浊溶液。	有效期内 2 星期 1 星期
底物	2-8℃ 储存，避光。 避免污染（使用无菌枪尖）。当溶液变为黄色时应予以丢弃（水作空白，吸光度大于 0.25 时）。	有效期内
终止液	开封后保存于室温下。	有效期内

7. 赛润 ELISA classic 的检验步骤

7.1 注意事项

只有全部使用赛润 ELISA classic 试剂才能保证检测效果，因为所有试剂都是有关联的，不能混用其他制造商的产品。尤其是标准血清，对照血清以及酶标记物，必须使用试剂盒配备的，不要使用其它批号产品。稀释缓冲液，洗液，终止液和底物溶液可用于所有赛润 ELISA classic 试剂盒。

对于不同的免疫球蛋白，有三种不同浓度的结合物：低，中，高并注明于试剂瓶的标签上：

例如

- IgG + lowly concentrated IgG conjugate
- IgG ++ medium concentrated IgG conjugate
- IgG +++ highly concentrated IgG conjugate

在特殊的情况下，我们需要生产特殊的酶标记物。这种结合物没有“+”号的标志。此结合物不可与其他结合物互换使用。

请特别注意瓶子标签上的标示。

ELISA *classic*试剂盒内所有试剂均必须正确地存放。应在未开封的情况下，保存于2-8℃，并在有效期（见标签说明）内使用。详细的稳定性和储存资料在“6. 储存及稳定性”内将加以详述。

每一种试剂都是经过校准以保证最佳的检测结果。这些试剂如果未经规定被稀释或改动都会导致检测的敏感性的降低。

在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，避免试剂受到微生物污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。

请从标记处剪开密封袋。如果铝袋破损或者已开启装有干燥剂的铝袋而未以夹子封紧的，则不要继续使用微孔条。

开始试验前，将所有试剂置于室温。

从试剂管中吸取试剂的时候，应注意使用无菌技术以防污染。为避免假阳性结果，吸加酶结合物时，吸头应确保不接触孔壁或喷洒于小孔的外面，注意不要盖错瓶盖或管盖。

试验中试剂的充分混合，对于检测结果的重复性至关重要。在取用对照品和酶标记物之前应摇动容器使其充分混匀，加样前，使用单向振荡器充分混匀稀释过的标本。

小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 对照血清，酶结合物或底物时，第一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果长，将会导致不同的“预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。只有严格遵守赛润ELISA *classic*试剂的试验说明才会得到最佳的检测结果。

如果实验中未严格遵守质量控制认证文件上的有效性特异准则，则试验结果无效。

洗涤不充分将影响试验结果：

应该小心进行洗涤。洗涤步骤应遵守相关洗涤器（平底孔，孔直径 7 毫米，深 10.9 毫米）指导手册进行，所有的孔内均应加入相同体积的洗涤缓冲液。洗涤结束时，应将微孔板倒扣于纸巾上并轻轻敲打，以确保所有孔内均无洗涤缓冲液。避免产生泡沫！如果使用自动洗板机，注意正确操作。

7.2 检验前的准备工作和储存

避免使用高血脂、溶血或黄疸的标本，尽管在我们的检测中没有发现有副影响。明显被污染的标本（血清或血浆）不能用于检测。依照标准实验室方法采集血清或血浆标本(EDTA、柠檬酸盐、肝素抗凝)

标本不应加热灭活。

7.2.1 样品准备

开始试验前，患者的待测样品必须以稀释缓冲液稀释如下（V1+V2）：

赛润 ELISA classic 衣原体 IgA:

V1+V2=1+100	加	10 微升	患者待测样品
	于	1000 微升	稀释缓冲液

赛润 ELISA classic 衣原体 IgG:

V1+V2=1+20	加	10 微升	患者待测样品
	于	200 微升	稀释缓冲液

稀释后及加入微孔板前，样品必须充分混匀。

类风湿因子的干扰的排除

类风湿因子抗体是IgM型的自身抗体，可与IgG免疫复合物结合。非特异性类风湿因子抗体的存在将导致IgM检测的假阳性结果。另外，也存在弱结合的病原体特异性IgM抗体被强结合的IgG抗体取代的可能性。在这种情况下，IgM的检测将得到假阴性的结果。因此，在进行IgM检测前应用类风湿因子吸附剂对血清作预处理。（赛润类风湿因子吸附剂，产品编号Z200 (20ml/100 样品)。

7.2.2 样品储存

密封的患者样品可在冰箱中 2-8℃ 保存 7 天。 -20℃ 可保存更久。

避免样品反复冻融。

已稀释的样品可在 2-8℃ 保存一星期。

7.3 试剂盒反应试剂的准备工作

7.3.1 微孔条

微孔条排列于板中，并与干燥剂一同封于铝袋内。未使用的微孔条重新放入铝袋，密封好，确保铝袋的密封性。

7.3.2 对照血清 / 标准血清

对照和标准血清可直接使用，不必进一步稀释

每次试验或是试验体系，无论检测用的微孔板数目多少，均应包括空白对照孔，阴性对照孔和标准血清孔，且标准血清应加两孔。

不要用 RF 吸附剂处理对照血清！

7.3.3 抗人 IgG, IgA 或 IgM 抗体，用 AP 标记（备用）

禁止将不同试剂盒的酶标抗体混合使用。同一试剂盒才能达到最佳检测效果。

为了避免酶标记物的污染（请使用时先一次性取出实验所需量置于一容器中，避免反复从试剂瓶中吸取试剂。）

7.3.4 洗液

以 1 : 30 稀释浓缩洗涤缓冲液 (V1) 至终体积 V2。

例如：

浓缩缓冲液 (V1)	终体积 (V2)
33.3 毫升	1000 毫升
1.0 毫升	30 毫升

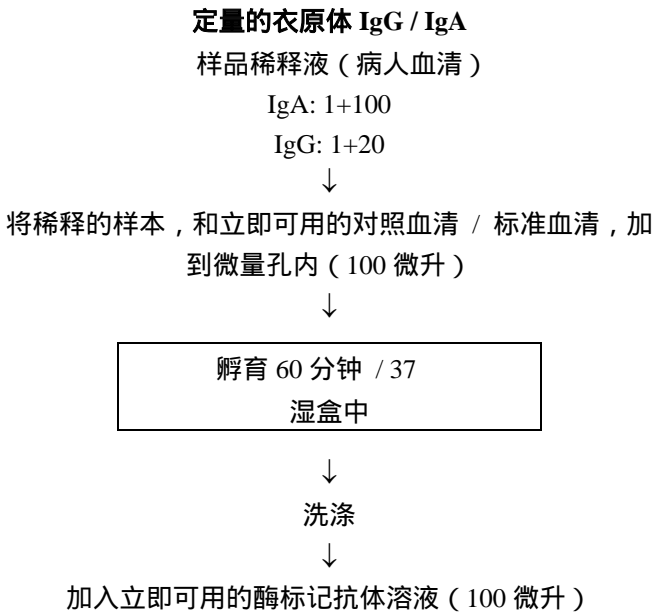
7.3.5 样品的稀释缓冲液 (即用)

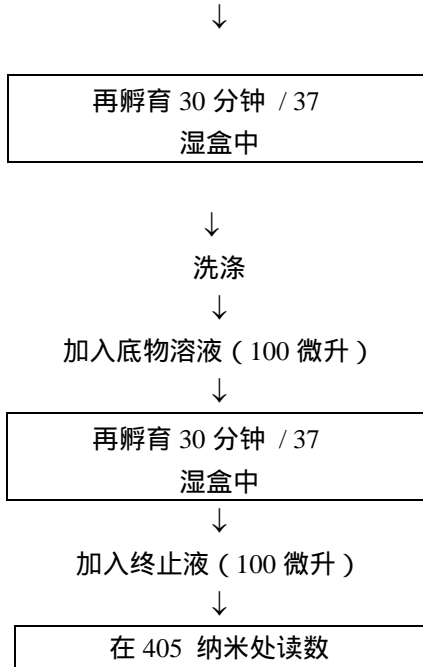
7.3.6 底物 (即用)

试验时戴手套以避免污染。必须以无菌枪尖吸取底物溶液。

7.3.7 终止液 (即用)

7.4 检测程序概要





7.5 检测过程

- 7.5.1 将检测所需数目的微孔条放到微孔板框上并准备好一张标签。
- 7.5.2 在微量孔内分别加入 100 微升的已稀释¹样本或立即可用的对照血清。留一个孔为底物空白使用，例如：

定量的 IgG / IgA 微量孔	
孔 A1	底物空白
孔 B1	阴性对照
孔 C1	标准血清
孔 D1	标准血清
孔 E1	标本 1.....

- 7.5.3 将样品于湿盒内 37 (±1) 孵育 60 分钟 (±5 分钟)。

* 注意：根据各实验室条件的特殊性，有必要对孵育时间进行调整。

7.5.4 孵育后以洗液缓冲液洗涤板孔（使用自动洗板机或手工洗板）：

- 吸去或甩去洗液
- 每孔内加入 300 微升洗液
- 吸去或甩去洗液
- 重复洗涤过程 3 次（共 4 次！）
- 将微孔板翻转过来在纸巾上拍打，使微孔中不再含有液体

7.5.5 加入酶标记抗体。

于适当孔内（底物空白除外）加入 100 微升 IgG / IgA 酶标记抗体

7.5.6 湿盒内 37（±1）孵育 30 分钟（± 1 分钟）*。

7.5.7 孵育后，以洗液清洗板孔（洗涤见上）

7.5.8 加入底物

于每孔内加入 100 微升底物溶液（包括底物空白孔）

7.5.9 湿盒内 37（±1）孵育 30 分钟（±1 分钟）*。

7.5.10 终止反应

每孔内加入 100 微升终止液，轻微振荡微孔板以混合溶液。

7.5.11 读取消光度

以底物空白为空白对照液，60 分钟内读取 405 纳米的 OD 值，建议参考波长范围为 620 纳米-690 纳米（例如 650 纳米）。

8. 检测结果评估

赛润 ELISA classic 衣原体 IgG（定量）

8.1 4PL 单点定量法

通过应用一非线性方程，消光信号数值的最佳分配得以保证，该方程可在不对 OD 值作任何改动的情况下调整 S 型曲线。

赛润 ELISA classic 抗体浓度的确定是通过逻辑对数模型（4PL, 4 数）计算得出的，此模型可精确适用于相关曲线。它是基于以下公式：

$$OD = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{conc.})}}$$

参数 A,B,C,D 分别代表曲线的准确形状：

1. 下端渐近线 参数 A
2. 曲折斜率 参数 B
3. 转折点 参数 C
4. 上端渐近线 参数 D

标准曲线由在德国维尔茨堡的德国维润赛润研发有限公司试验多次研制所得。使用者无需花费大量的时间和使用昂贵的仪器来制作标准曲线。每一个试剂盒内均带有一特异标准曲线和一特异评估表图以衡量抗体活度。如有需要也可取得相关的评估软件。

为了校正正常试验偏差和建立试验对照，每轮试验均需使用标准血清。对于此种对照血清，有效范围参考值是由厂商的质量控制决定的。在此范围内，可保证抗体活度的正确计量。因为标准血清不必是一阳性对照，所以在某些 ELISA 试验中标准血清数值可能近于 0 或负值。

8.2 有效性标准

- 底物空白的 OD <0.25
- 阴性对照必须为阴性
- 赛润 ELISA *classic* 定量试验：标准血清的平均 OD 值必须在有效范围内，此范围在试剂盒的特异性质量控制认证书上给定（减去底物空白之后！）
- 赛润 ELISA *classic* 定量试验：阳性对照的平均 OD 值必须在有效范围内，此范围在试剂盒的特异性质量控制认证书上给定（减去底物空白之后！）
- OD 值的变化不能超过 20%

如果未达到以上标准，试验无效且必须重做。

8.3 赛润 ELISA *classic* 衣原体 IgG / IgA 的定量计算

8.3.1 非自动评估

每个试剂盒内均备有一个标准曲线和一个评估表，因而每一个 OD 值就可得到一个抗体活性值。标准血清的参考值和有效范围会在评估表格（质量控制认证）中给定。

所有的OD值在评估前必须先减去空白A1。

方法 1：用评估表精确确定抗体活

为确定定点范围，请将已测得的标准 OD 平均值与质量控制认证书上求得的数据相乘（见专用公式），例如：

$$OD=0.502 \times MW \text{ (STD) 临界值上限}$$

$$OD=0.352 \times MW \text{ (STD) 临界值下限}$$

如果得到的标准血清的平均消光度值是 0.64，那么临界值的范围即为 0.225-0.321。

方法 2：利用标准曲线进行抗体活性的连续求值。

通过将当前患者样品测量结果乘以**校正系数 F**，可纠正所谓的“测定间差异”（不同测量时间及不同试验室引起的差异）。此系数的计算如下所示：

$$F = \frac{\text{标准血清OD参考值}}{\text{标准血清当前测量OD值}}$$

此步骤对于校正当前检测与批次标准曲线之间的偏差是非常必要的。

首先，日间测定差异可通过计算（校正系数 F）得以纠正：

1. 计算标准血清两个 OD 值的平均数，检查此平均数是否在给定的有效范围之内。
2. 计算校正因子 F：给定的参考数值除以标准血清消光度值平均数。F=标准血清参考消光度值 / 标准血清消光度值平均数。

3. 将患者样品所有测得值均乘以校正因子“F”。
4. 此时便可通过修正后的数值以标准曲线求得抗体活性 U / ml 或 IU / ml。

IgG 抗体的计算：

阳性结果：	> 15	U/ml
临界值结果：	10-15	U/ml
阴性结果：	< 10	U/ml

IgA 抗体的计算：

阳性结果：	>4	U/ml
临界值结果：	3-4	U/ml
阴性结果：	< 3	U/ml

针对临界值结果的样品，应在 1-2 周后对相应的病人再取样，重新检测

8.3.2 通过 SERION *easy base* 4PL 软件 / SERION 自动评估软件进行自动评估。

输入四个参数和标准血清参考值之后，联机软件就会计算出抗体活性。
如果标准血清的消光值超出有效范围，SERION *easy base* 4PL 软件就会显示如下信息：

“标准已超出允许范围”和 / 或“标准差异大于 20%”。

SERION 评估软件只用英语显示：

„Standard values out of ranges in following groups: Group 1-24. Standard value differ more than 20% in following groups: Group 1-24.” (“以下组样品标准值超出范围：组 1-24。以下组样品标准值差异大于 20%：组 1-24。”)

在这种情况下，此轮试验无效，需重做。

只有更换批号时，参数和参数值才需要改变（评估表中标有参数与参考值）。组别特异性数据的正确输入与否可以以标准血清的 IU/ml 或 U/ml 值为基础进行检验。计算出的平均单位值需与组别特异性认证书所示的单位值相对应。可自动校正测定值。使用标准版本打印机会显示如下内容：

样本编号
OD 值
IU / ml 或 U / ml
结果解释

8.4 检测结果分析

在 IgA 检测为阳性的同时 IgG 为阴性表明发生急性衣原体感染。应在几个星期后再次抽取血清检测是否存在 IgG 抗体。

当衣原体 IgA 和 IgG 的 ELISA 检测结果均为阳性时，则表明病人为急性衣原体感染。IgG 测试结果为阳性的同时 IgA 为阴性表明病人几个月前曾为急性衣原体感染。

9. 性能特征

9.1 重复性

测定内重复性通过在同一轮试验中检测 20 次不同反应的血清来判断。测定间重复性通过分别在 5 天进行 10 次独立的血清检测分析来判断。

$$\text{差异系数 (CV)} = \frac{\text{标准差}}{\text{平均值}} \times 100$$

赛润 ELISA classic衣原体IgG :

	平均消光值 (OD)	检测内分析 (CV%)	平均消光值 (OD)	检测间分析 (CV%)
样品				
临界值	0.324	5.0	0.333	7.5
阳性	0.702	5.5	0.717	9.6
强阳性	1.445	5.1	1.528	5.8

赛润 ELISA classic衣原体IgA :

	平均消光值 (OD)	检测内分析 (CV%)	平均消光值 (OD)	检测间分析 (CV%)
样品				
弱阳性	0.446	8.1	0.388	12.0
阳性	0.836	6.5	0.783	6.3
强阳性	1.314	4.9	1.485	9.7

9.2 敏感性 & 特异性

与金标法及免疫荧光法相比较,赛润 ELISA classic 衣原体 IgA 的灵敏度及特异性是更强的。与此测试相比较,在衣原体 IgA 测试中对 42 份血清(取自病人及献血者)进行测试。

在测试中分别考虑了沙眼衣原体,肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体的特殊抗体。至少在其中一种抗体中显示浓度大于等于 1:32 时,则被定义为阳性。

在进一步的研究中将赛润 ELISA classic 衣原体 Ig 与 CFT 进行比较评估。计算显示出以下敏感性及特异性结果：

赛润 ELISA classic	
	衣原体 IgA
敏感性	100%
特异性	100%

使用其它厂商生产的肺炎衣原体 IgG - ELISA 和沙眼衣原体 IgG - ELISA 各三组，对 86 个血清进行对照检测，可以计算出赛润 ELISA classic 衣原体 IgG 的敏感性和特异性。如果在一种衣原体的三组 ELISA 检测中至少有两组显示呈阳性，则可确定血清为阳性。

赛润 ELISA classic	
	衣原体 IgG
敏感性	88%
特异性	89%

在对赛润 ELISA classic 衣原体 IgG, IgA 敏感性 & 特异性测试中未考虑到临界值结果。

10.警告

10.1 警告和安全措施

赛润 ELISA classic 试剂盒是针对熟悉实验室操作人员所设计使用的。

所有试剂盒试剂及人类标本必须采用已有的良好实验技术，小心处理：

- 此试剂盒内含人血成分。尽管所有的对照及定点对照都已经过验证并且发现对于乙型肝炎表面抗原，丙型肝炎抗体，HIV 体均为阴性；但仍认为它们具有潜在的感染性。
- 移液过程禁止用口。
- 在处理试剂和标本的地方禁止吸烟，饮食。
- 使用试剂盒和标本时，必须戴一次性手套，穿试验服，戴安镜。使用后请彻底洗手清洁。
- 患者样本及其他潜在感染材料试验后应予以消毒。
- 试剂应保存在安全的地方，禁止儿童接触。
- 终止液：具有腐蚀性（C）；发生酸烧伤（R34）；因此在操作时应穿戴防护镜，手套和试验服。

10.2 废料处理

请注意相关要求！