



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105759034 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(21)申请号 201610194372.1

(22)申请日 2016.04.01

(71)申请人 山东德诺生物科技有限公司
地址 261021 山东省安丘市新安街道翠山西街昌安产业园C6栋

(72)发明人 欧黎明 孙丽华

(51) Int. Cl.
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

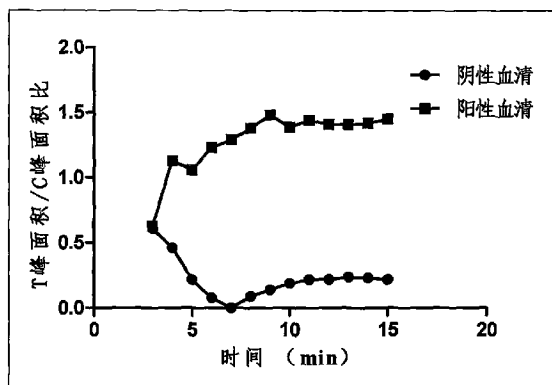
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种肺炎支原体检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种基于荧光免疫层析技术的肺炎支原体IgM的试剂盒和检测方法。本发明的方法是使用荧光素作为标记材料,标记小鼠抗人的IgM μ 链单克隆抗体。血清中的肺炎支原体特异性IgM抗体与荧光素标记抗体结合形成反应复合物,被肺炎支原体抗原捕获,肺炎支原体IgM捕获量与荧光抗体的信号强度呈正相关,通过免疫荧光检测仪读数,可检测出血清中的肺炎支原体IgM。本发明的方法具有时间短、特异性好、良好的精确性和稳定性等特点,与欧盟肺炎支原体IgM检测试剂盒检测结果符合率较高。为临床上快速准确检测肺炎支原体IgM提供一种新方法,具有良好的市场前景。



1. 一种基于荧光免疫层析技术的肺炎支原体检测试剂盒,包括在聚氯乙烯底板上依次贴附的样品垫、荧光垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其中荧光垫为包覆有荧光素标记鼠抗人的IgM抗体和荧光素标记羊抗兔IgG抗体的玻璃纤维垫;硝酸纤维素膜上有检测线和质控线,检测线包被有肺炎支原体抗原,质控线包被有兔IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述检测试剂盒,其中荧光素为近红外荧光素。

3. 根据权利要求2所述检测试剂盒,其中荧光素为荧光素Alexa Fluor® 647。

4. 根据权利要求1所述检测试剂盒,其中鼠抗人的IgM抗体为IgM μ 链单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述检测试剂盒,其中硝酸纤维素膜采用Satourius CN140。

6. 根据权利要求1所述检测试剂盒,其中肺炎支原体抗原为重组P1抗原和天然抗原。

7. 荧光素Alexa Fluor® 647在制备荧光免疫层析检测试剂中的用途。

8. 根据权利要求7所述用途,其中检测试剂为肺炎支原体抗体检测试剂。

9. 一种肺炎支原体抗体的荧光免疫层析检测方法,包括以下步骤:使用荧光素作为标记材料,标记鼠抗人的IgM抗体;血清中的肺炎支原体IgM抗体与样品稀释液混合后,与荧光素标记抗体结合形成反应复合物;随着层析作用沿着硝酸纤维素膜前移,被硝酸纤维素膜检测线上包被的肺炎支原体抗原捕获;通过免疫荧光检测仪,检测出血清中的肺炎支原体IgM抗体。

10. 根据权利要求9所述检测方法,其中荧光素为荧光素Alexa Fluor® 647,鼠抗人的IgM抗体为IgM μ 链单克隆抗体,样品稀释液表面活性剂添加2%Tween-20,硝酸纤维素膜采用Satourius CN140。

一种肺炎支原体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肺炎支原体的检测方法,具体涉及一种基于荧光免疫层析技术的肺炎支原体的检测方法,还涉及采用该方法的检测试剂盒。

背景技术

[0002] 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*,MP)是一种能在无生命培养基上自行繁殖的原核生物,不易染色,没有细胞壁。有研究显示MP引起的呼吸道感染约占社区获得性肺炎的20-40%(Principi,N.,etal:*Clin infectious diseases*,2001;32:1281-1289.)。据统计,大约每年约10万成人因为MP的感染住院治疗。肺炎支原体的临床症状不明显,有也只是头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状,由于MP无细胞壁,故其引起感染的治疗与其它细菌和病毒感染在治疗方法上有所不同。因此快速、准确诊断MP感染对于治疗很重要。

[0003] 目前,检测MP的主要方法是MP分离培养、PCR检测、冷凝集试验、血清特异性抗体检测等几个方面,各有优缺点。病原体分离培养被认为是疾病诊断的金标准,但MP培养要求条件很高,需要的时间较长(约6周),故对于临床患者的治疗无实用性,所以很少实验室通过培养来诊断患者是否为MP感染。目前PCR方法检测MP的P1蛋白、16SrRNA及其它蛋白基因已经有大量报道(Waveren,G.,etal:*JClinmicrobiology*,1999;37:14-17.),但PCR方法操作复杂,需要有相关的仪器,实验员必须经过专门的培训,所以在一些基层单位很难推广。冷凝集试验为非特异性反应,除了在MP感染时可呈阳性外,也可见于肝病、溶血性贫血、传染性单核细胞增多症等,并且如果第一次血液标本采集的较晚,或者患者的抵抗力比较弱,检测结果也可能为阴性(Sanchez-Vargas,F.M.,etal:*Clinmicrobiology and infection*,2008;14,:105-117.)。

[0004] 应用最广泛的血清学检测是ELISA,需要很少量的血清就可以进行此试验。但酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒操作繁琐,费时费力的弊端阻碍了它在即时检验中的应用。能够应用于即时检验的血清学检测方法是免疫层析方法,该方法操作简单、快速、方便、结果易于判断、无须特殊的检测设备,已在临床检验、食品安全监督与环境监控各领域得到了广泛的应用。市场上大部分免疫层析产品采用胶体金作为检测标记物,以定性和半定量为主(Kosack,C.S.,etal:*Jvirological methods*,2014;204:6-10.)。但应用光学仪器进行半定量检测时,胶体金试纸条通常只能检测硝酸纤维素膜表面10-20 μ m的光学信号,损失了近80-90%的信号。

[0005] MP血清抗体的检测有IgM和IgG两种,IgM在感染7~10天后就可以被检测到(Talkington,D.F.,etal:*Clinical and diagnostic laboratory immunology*,2004;11:862-867.)。由于MP感染的潜伏期为2~3周,单独检测IgG非常容易假阴性而导致漏诊误诊,而IgM一般在感染后一周出现,3~4周达到高峰,当患者出现症状就诊时,IgM抗体已达到较高水平,故IgM抗体的检测有助于MP的早期诊断。

[0006] 目前,国内外采用荧光免疫层析方法检测肺炎支原体IgM抗体的研究还未见报道。选择荧光素作为标记材料来替代胶体金,建立荧光免疫层析方法将具备胶体金免疫层析简

单、快速的优势,又能够具有更高的敏感性,有利于MP感染的快速、准确诊断。

发明内容

[0007] 本发明还公开了一种基于荧光免疫层析技术的肺炎支原体检测试剂盒,该肺炎支原体检测试剂盒包括在聚氯乙烯(PVC)底板上依次贴附的样品垫、荧光垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;其中荧光垫为包覆有荧光素标记鼠抗人的IgM抗体和荧光素标记羊抗兔IgG抗体的玻璃纤维垫;硝酸纤维素膜检测线包被有肺炎支原体抗原,质控线包被有兔IgG抗体。标记的荧光素为近红外荧光素,优选荧光素AIexa**Fluor**®647。鼠抗人的IgM抗体为IgM μ 链单克隆抗体。硝酸纤维素膜采用Satourius CN140。肺炎支原体抗原为重组P1抗原和天然抗原,其中肺炎支原体重组P1抗原购自深圳菲鹏生物股份有限公司,天然抗原购自Microbix公司。P1蛋白是肺炎支原体的主要免疫原性蛋白和粘附蛋白之一,目前已成为肺炎支原体临床检测的主要靶标(Li,W.,et al:Scientific reports,2015;5:15539.)。本发明选择的肺炎支原体重组P1抗原是P1蛋白的C末端片段,具有较高的免疫原性(Chourasia,B.K.,et al:BMC microbiology,2014;14:108.)。天然抗原是肺炎支原体标准菌株FH,采用乙醚灭活,能够尽可能捕获大多数肺炎支原体特异性IgM。综合重组P1抗原检测肺炎支原体的特异性,和天然抗原检测肺炎支原体的敏感性,可以提高本发明检测试剂的性能。

[0008] 本发明还公开了荧光素AIexa**Fluor**®647在制备荧光免疫层析检测试剂中的用途,特别是在制备肺炎支原体检测试剂中的用途。本发明选择荧光素AIexa**Fluor**®647作为新型荧光标记材料,它是一种明亮稳定的远红外光染料,人眼不可见但是能够被大多数的成像系统接收。在本发明的检测肺炎支原体的方法中,AIexa**Fluor**®647的NHS酯能够与抗体的首个氨基结合而不损害抗体的生物活性,相较于其他类似荧光,具有更高的荧光强度,更好的耐光性,能够大大降低背景荧光的干扰。目前AIexa**Fluor**®647还未应用于肺炎支原体免疫层析检测试剂,相较于胶体金,AIexa**Fluor**®647作为标记材料能够提高试剂的敏感性;相较于量子点和时间分辨等微球标记材料,AIexa**Fluor**®647能够保证试剂的精确性,CV值更低。

[0009] 本发明还公开了一种检测肺炎支原体的方法,该方法是基于荧光免疫层析技术,采用本发明公开的检测试剂盒,检测血清样本中的肺炎支原体IgM抗体。

[0010] 本发明的检测血清样本中肺炎支原体的方法包括以下步骤:使用荧光素作为标记材料,标记小鼠抗人的IgM μ 链单克隆抗体。当血清与缓冲液混合,并滴加到免疫层析膜上,血清中的肺炎支原体特异性IgM抗体与荧光素标记抗体结合形成反应复合物,反应复合物随着层析作用沿着硝酸纤维素膜前移,被硝酸纤维素膜检测线上包被的肺炎支原体重组P1抗原和天然抗原捕获,血清中的肺炎支原体IgM捕获量与荧光抗体的信号强度呈正相关,通过免疫荧光检测仪读数,可检测出血清中的肺炎支原体IgM。

[0011] 其中荧光素为近红外荧光素,优选荧光素AIexa**Fluor**®647。鼠抗人的IgM抗体为IgM μ 链单克隆抗体,肺炎支原体抗原为重组P1抗原和天然抗原,重组P1抗原是P1蛋白的C末端片段,天然抗原是肺炎支原体标准菌株FH。硝酸纤维素膜采用Satourius CN140,样品稀释液表面活性剂添加2%Tween-20,较其它表面活性剂,层析效果更快。

[0012] 对本发明的试剂盒,通过绘制ROC曲线确定Cutoff值,对试剂的性能进行考察。结果显示,(1)基于荧光免疫层析技术的肺炎支原体IgM快速检测试剂的最佳反应时间为

10min,能够快速获得检测结果;(2)具有良好的特异性,与其它几种常见的呼吸道病原体无交叉反应;(3)具有良好的精确性,批内和批间变异系数均小于15%;(4)具有良好的稳定性,能够于常温保存两年;(5)与欧盟肺炎支原体IgM检测试剂盒检测结果符合率较高。所以本方法的建立为临床检测提供一种快速准确检测肺炎支原体IgM的手段。

[0013] 本发明的基于荧光免疫层析技术快速检测肺炎支原体的试剂盒,综合了荧光的灵敏准确以及层析方法的快速简单的优点。选择的荧光素是一种吸收651nm波长的光并能激发出672nm波长的荧光染料,长波长的荧光能够有效的避免了其他本底物质荧光的干扰。通过与抗体的R-NH₂基团连接而稳定的共价结合在抗体上,这是本试剂能够稳定保存的基础。另外,荧光素AlexaFluor®647的使用有效的降低了批间批内差异,这为检测结果的可靠性提供了保障。本发明的检测方法,快速简便,只需要10min就可以获得准确结果,不需要对检测人员进行培训就可以直接操作,极大地方便了临床检测。

[0014] 标记抗体本发明选择高度特异的抗人IgM μ 链单克隆抗体,专一的捕获血清中的IgM,不与IgG或者其他种类的免疫球蛋白结合,故有高度的IgM抗体特异性。(Forghani B, et al: J Clin microbial, 1984; 19: 606-609.)天然抗原与重组抗原的同时包被,有效的减少了漏检误检的情况,尤其是重组蛋白的使用,提高了检测信号值,它的特异性非常高,降低了与其他常见的呼吸道病原体交叉反应的概率。两种抗原的组合使用,优于单独抗原的使用效果。

[0015] 本发明对不同的硝酸纤维素膜进行了比较,通过比较Satourius CN 95和Satourius CN140两种不同孔径的膜对荧光免疫层析结果的影响进行选择。结果表明,相比CN95,CN140阴阳性差异更大。本发明还进行了样品稀释液中表面活性剂的选择优化试验。在PBS缓冲液(pH 7.4)中加入2%NP-40,2%Tween-20,2%Tween-80和2%Triton-X100,比较不同的表面活性剂对本发明的影响。发现2%的Tween-20在层析过程中跑线最佳,能更快的达到层析效果。

[0016] MP广泛存在于世界各地,能够引起地区性流行,早期诊断有利于缩短肺炎支原体患者的病程。本发明方法克服了酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒操作繁琐,费时费力的弊端和胶体金法无法量化,灵敏度较低,以及可能出现的漏诊的缺陷,与欧盟ELISA试剂盒比较敏感度相当。本发明方法的检测敏感性高于胶体金检测试剂,且可以实现定量。

[0017] 为临床提供一种既快速又能准确检测肺炎支原体IgM的新方法,为早期诊断MP感染提供帮助,具有良好的市场前景。

附图说明

[0018] 图1膜的优化图。其中N1 N2 N3 N4分别代表阴性血清,P1 P2 P3 P4分别代表阳性血清。

[0019] 图2样品稀释液中表面活性剂的选择图。

[0020] 图3检测时间的确定图。观察测一份阴性以及阳性血清的T峰/C峰面积比随着时间的增加的变化情况。

[0021] 图4 ROC曲线确定Cutoff值。检测148份阳性以及61份阴性血清,通过SPSS 16.0中ROC曲线分析出Cutoff值。

[0022] 图5稳定性试验图。

具体实施方式

[0023] 实施例检测试纸的制备

[0024] 一、材料：

[0025] 荧光素Alexa**Fluor**®647:Invitrogen公司

[0026] P1重组抗原:深圳菲鹏生物股份有限公司

[0027] MP天然抗原:Microbix公司

[0028] 小鼠抗人的IgM μ 链单克隆抗体:深圳菲鹏生物股份有限公司

[0029] 兔IgG抗体和羊抗兔IgG抗体:Sigma公司

[0030] Sucrose,PVP和Tween-20等:国药集团化学试剂有限公司

[0031] 肺炎支原体IgM胶体金检测试剂盒:潍坊市康华生物技术有限公司

[0032] 欧盟肺炎支原体IgMELISA检测试剂盒:EUROIMMUN US公司

[0033] 甲型流感病毒,乙型流感病毒,呼吸道合胞病毒,腺病毒,肺炎衣原体,Q热立克次体,副流感病毒,嗜肺军团菌等呼吸道病原体阳性血清,MP阳性血清和MP阴性血清:沈阳疾控中心,解放军304医院和解放军307医院。

[0034] 缓冲溶液如下:

[0035] 样品垫处理液(50mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$,1%PVP(wt/vol),0.2%Casein-Na(wt/vol),0.5%Tween-20(vol/vol),0.1% NaN_3 (wt/vol));

[0036] 样品稀释液(10mol/L PBS,2%Tween-20(v/v)(pH 7.4));

[0037] 荧光抗体复合物保存液:(50mmol/L Tris-HCl,1%BSA(wt/vol),0.5%Tween-20(vol/vol),10%Sucrose(wt/vol)和0.05%ProcIn-300(vol/vol)(pH 8.0))。

[0038] 二、方法:

[0039] (一)荧光素与抗体复合物的准备

[0040] 取1mg抗体,按照终浓度为2mg/ml稀释比例溶于定量的0.01M pH 的PBS缓冲溶液中,混匀,静置10min。然后向反应体系中加入1M 50 μ l的 NaHCO_3 溶液,反应混匀,静置15min。根据相应比例,加入10 μ l的荧光染料。反应混匀,在室温下静置2h。然后移入4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜。再将标记好的复合物经过凝胶Sephadex G 25过柱,除去未结合抗体的荧光素以及未结合荧光素的抗体,以减少非特异反应。最后将过柱好的复合物进行超滤浓缩保存待用。

[0041] 采用荧光抗体复合物保存液稀释荧光素标记鼠抗人IgM μ 链抗体和羊抗兔抗体,8 μ l/cm喷于玻璃纤维垫。分别将P1重组抗原与MP天然抗原使用PBS稀释成0.75mg/ml,0.175mg/ml包被在检测线位置,将兔IgG抗体使用PBS稀释成1.5mg/ml包被在质控线位置。

[0042] (二)层析试纸条的准备

[0043] 1.层析试纸条的组装

[0044] 层析纸条主要包括五个部分,硝酸纤维素膜(NC膜),吸水纸,样品垫,荧光垫,PVC底板。NC膜T线包被MP天然抗原和P1重组抗原,C线包被有合适浓度的兔IgG抗体,于37 $^{\circ}$ 烘箱里烘干3h。样品垫经样品垫处理液浸泡,于37 $^{\circ}$ 烘箱里烘干12h。荧光垫上喷有标记荧光素的鼠抗人IgM μ 链抗体和标记荧光素的羊抗兔IgG抗体,于37 $^{\circ}$ 烘箱烘干1h。将样品垫、荧光垫、NC膜、吸水纸按顺序组装完之后使用自动斩切机切成3.6mm/条子,装入检测卡待用。

[0045] 2.操作步骤

[0046] 取1 μ I血清使用样品稀释液按照1:100稀释后,滴于样品孔,在10min时通过荧光检测仪分别识别T线和C线位置荧光信号的波峰,仪器自动计算出波峰面积,并得出T峰/C峰面积比。。

[0047] (三)层析系统的优化

[0048] 1.膜的优化

[0049] 比较Satourius CN 95和Satourius CN140两种不同孔径的膜对荧光免疫层析结果的影响。检测血清为4份MP阴性血清和4份MP阳性血清,利用仪器检测出T峰/C峰面积比,确定最适合的NC膜。

[0050] 2.样品稀释液中表面活性剂的选择

[0051] 在10moI/L PBS缓冲液(pH 7.4)中加入2%NP-40,2%Tween-20,2%Tween-80和2%Triton-X100,比较不同的表面活性剂对本发明的影响。

[0052] 3.层析时间的确定

[0053] 将1份MP阴性血清和1份MP阳性血清分别采用稀释液进行稀释后,滴加于试纸条的加样孔进行层析,从加样开始计时,每隔1min检测T峰/C峰面积比。

[0054] (四)检测实际样本确定Cutoff值

[0055] 采用本发明试剂盒对34份MP阳性血清和166份MP阴性血清进行检测,并通过SPSS 16.0中ROC曲线确定其Cutoff值。

[0056] (五)检测系统性能考察

[0057] 1.特异性考察

[0058] 采用本发明试剂盒检测甲型流感病毒,乙型流感病毒,呼吸道合胞病毒,腺病毒,肺炎衣原体,Q热立克次体,副流感病毒,嗜肺军团菌几种呼吸道病原菌的阳性血清各三份,每份三次重复,考察特异性情况。

[0059] 2.敏感性考察

[0060] 采用本发明试剂盒和胶体金免疫层析方法,对11份MP阳性血清和7份MP阴性血清进行检测,比较两种方法的敏感性。

[0061] 3.精密度考察

[0062] 两批制备的试剂条分别检测同一份阴性阳性血清,每批检测10次,分别计算批内批内的变异系数(CV),考察准确性。

[0063] 4.稳定性考察

[0064] 将准备好的试剂条放置60 $^{\circ}$ C电热鼓风干燥箱里加热0天,2天,4天,6天,8天,分别检测强阳,弱阳,阴性血清各三次,考察加速稳定性情况。

[0065] (六)与欧盟肺炎支原体IgM ELISA检测试剂盒的一致性考察

[0066] 分别使用本发明与欧盟试剂盒检测47份MP阳性血清和339份阴性血清,使用SPSS 16.0软件四格表检验分析得出本方法与欧盟试剂盒一致性比较结果,并计算出阳性符合率、阴性符合率和Kappa系数等。欧盟肺炎支原体IgM检测试剂盒是市面上常用的肺炎支原体检测试剂盒,与本发明检测原理相近,均用于MP IgM抗体检测。

[0067] 三、结果:

[0068] (一)层析系统的优化

[0069] 1.膜的优化

[0070] 比较Satourius CN95和CN140两种型号NC膜检测结果,即T峰/C峰面积比值的差异。相对于CN95,CN140阴阳性差异更大,因此本发明选择CN140膜作为最适NC膜(见附图1)。

[0071] 2. 样品稀释液中表面活性剂的选择

[0072] 采用不同的稀释液对1份MP阳性血清进行检测,2%的Tween-20在层析过程中跑线最佳,能更快的达到层析效果,所以我们选择Tween-20作为本发明的最佳表面活性剂(见附图2)。

[0073] 3. 层析时间的确定

[0074] 我们检测MP阴阳性血清T峰/C峰面积比值随时间的变化情况。从5min开始T峰/C峰面积比值趋于稳定,也就是说层析开始5min后使用仪器进行检测,结果无差异,但考虑到检测的准确性和反应的充分性等,本发明选择10min作为最佳检测时间(见附图3)。

[0075] (二)检测实际样本确定Cutoff值

[0076] 采用本发明对34份MP阳性血清和166份MP阴性血清进行检测,通过SPSS16.0ROC曲线分析,曲线下面积为0.986($p < 0.001$)。选择曲线上最靠左的一点(灵敏度加特异性最大的一点)确定Cutoff为0.3830,低于0.3830为阴性,高于0.3830为阳性(见附图4)。

[0077] (三)检测系统性能考察

[0078] 1. 特异性

[0079] 如表1所示,使用本发明检测甲流,乙流,呼吸道合胞病毒,腺病毒,副流感病毒,肺炎衣原体,Q热立克次体,嗜肺军团菌各3份阳性血清。这几种病原体阳性血清的检测值都在Cutoff值以下,表明本发明检测肺炎支原体的方法特异性较高,与这几种呼吸道感染类病原体没有交叉反应。

[0080] 表1几种呼吸道病原体血清检测结果

	病毒类型	血清
[0081]	呼吸道合胞病毒	0/3
	嗜肺军团菌	0/3
	乙型流感病毒	0/3
	甲型流感病毒	0/3
	Q热立克次体	0/3
	腺病毒	0/3
	肺炎衣原体	0/3
[0082]	副流感病毒	0/3

[0083] 2. 敏感性

[0084] 如表2所示,本发明检测15份血清的结果与欧盟肺炎支原体IgMELISA检测试剂盒的结果完全一致。而采用胶体金试剂盒进行检测,7份MP阴性血清结果与上述两种检测方法一致,但8份MP阳性血清却检出5份阴性结果,由此可见,胶体金检测试剂盒的敏感性低于本发明方法。

[0085] 表2本发明与胶体金检测试剂盒检测结果的比较

[0086]

血清编号	欧盟试剂盒	胶体金试剂盒	免疫荧光	
			T/C 峰面积比 (平均值±标准差)	
1	+	+	0.62±0.02	+
2	+	+	0.67±0.02	+
3	+	-	0.49±0.01	+
4	+	+	3.75±0.24	+
5	+	-	2.63±0.08	+
6	+	-	0.45±0.02	+
7	+	-	0.46±0.01	+
8	+	-	0.46±0.03	+
9	-	-	0.27±0.02	-
10	-	-	0.37±0.02	-
11	-	-	0.32±0.02	-
12	-	-	0.34±0.02	-
13	-	-	0.35±0.03	-
14	-	-	0.30±0.01	-
15	-	-	0.28±0.01	-

[0087] 除此之外,将3份MP阳性血清进行稀释,检测结果如表3所示。对于同一份阳性血清来说,胶体金检测试剂盒只能检出1:10稀释的MP特异性IgM抗体,而荧光免疫层析方法却可以检出1:1000稀释的MP 特异性IgM抗体。通过以上两方面的比较,本发明AIexa**Fluor**®647相比较于胶体金来说更适合作为标记物应用于层析系统。

[0088] 表3本发明与胶体金检测试剂盒敏感性比较

血清编号	稀释比例	胶体金试剂盒	免疫荧光	
			T/C 峰面积比 (平均值±标准差)	
16	1:10	+	1.73±0.23	+
	1:100	-	1.35±0.14	+
	1:1000	-	0.43±0.04	+
17	1:10	+	2.39±0.16	+
	1:100	-	1.55±0.09	+
	1:1000	-	0.56±0.04	+
18	1:10	+	1.68±0.15	+
	1:100	-	0.89±0.07	+
	1:1000	-	0.47±0.02	+

[0090] 3.精密度

[0091] 如表4所示,本发明检测MP强阳性血清、弱阳性血清和阴性血清的批间CV分别在3.28%、6.04%和6%,批内的CV分别为3.45%、4.89%和10.14%,都能控制在15%以下。表明本发明有着较好的重复性,这大大降低了检测时的系统误差,使结果更可靠。

[0092] 表4批间批内差异

血清	批间差 (n=10)		批内差 (n=10)	
	平均值±标准差	CV(%)	平均值±标准差	CV(%)
[0093] 强阳性	1.520±0.049	3.28	1.525±0.052	3.45
弱阳性	0.583±0.035	6.04	0.583±0.028	4.89
阴性	0.200±0.012	6	0.190±0.019	10.14

[0094] 4. 稳定性

[0095] 本发明试剂盒在60℃条件下分别高温加速0天,2天,4天,6天,8天后,血清检测结果(见附图5)。0天,2天,4天,6天检测结果偏差都小于10%,变化不大,第8天时强阳和弱阳检测值相较于第六天分别下降24%,14%,下降幅度较大,阴性检测值相较于第六天升高19%,总体变化明显。60℃加速6天大概等于25℃常温放置两年,因此本发明试剂盒最少能够稳定保存两年左右。

[0096] (四)与欧盟肺炎支原体IgM检测试剂盒的一致性考察

[0097] 如表5所示,本发明与欧盟试剂盒的比对,阳性符合率为93.62%,阴性符合率为96.76%,总符合率为96.37%,使用SPSS 16.0软件中四格表检验得出两个试剂盒的一致性较好(Kappa系数为0.842,p<0.001)。

[0098] 表5与欧盟试剂盒的一致性考察

免疫荧光 (a)	欧盟试剂盒 (b)		合计
	阳性	阴性	
[0099] 阳性	44	11	55
阴性	3	328	331
合计	47	339	386

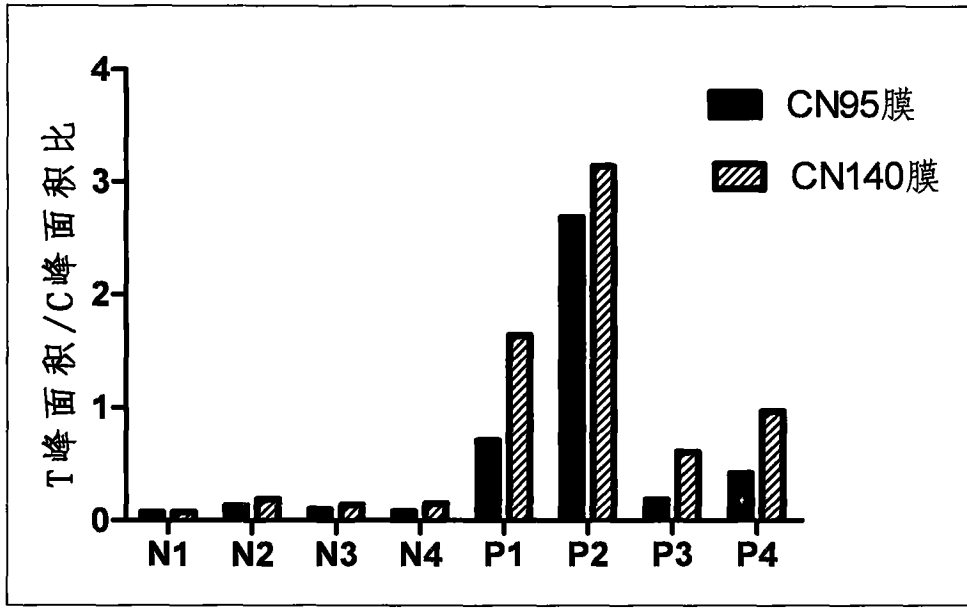


图1

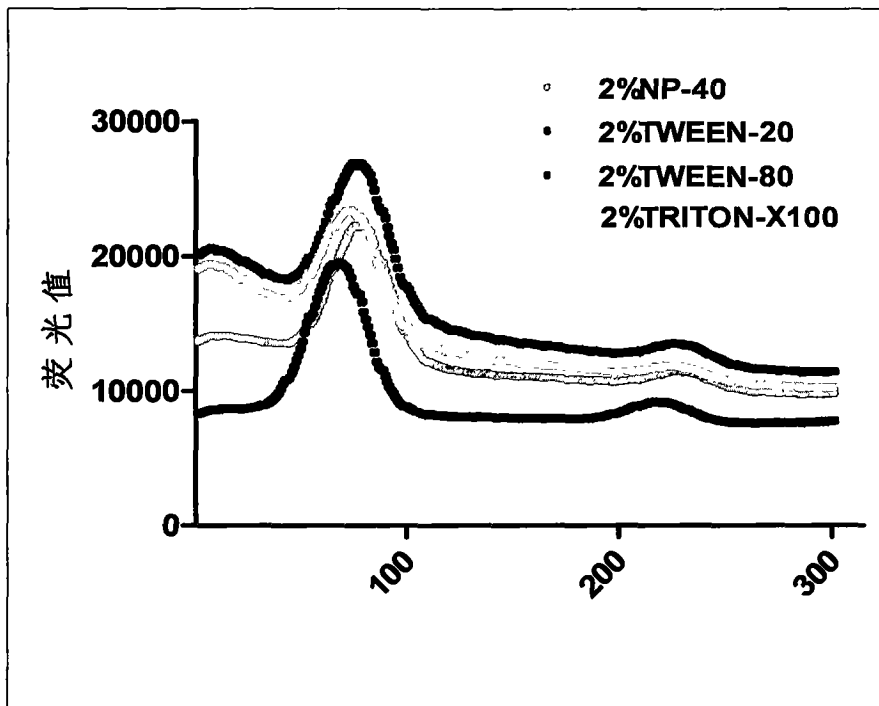


图2

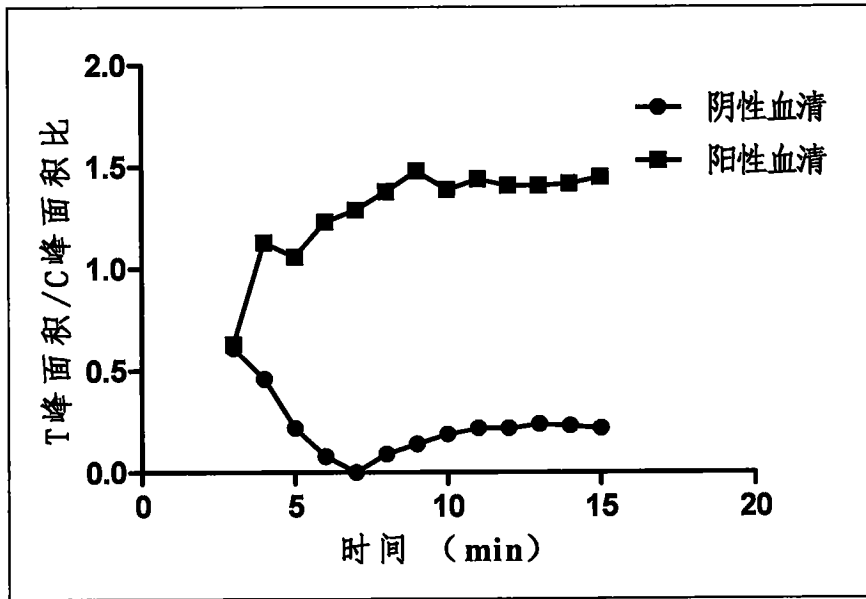


图3

ROC 曲线

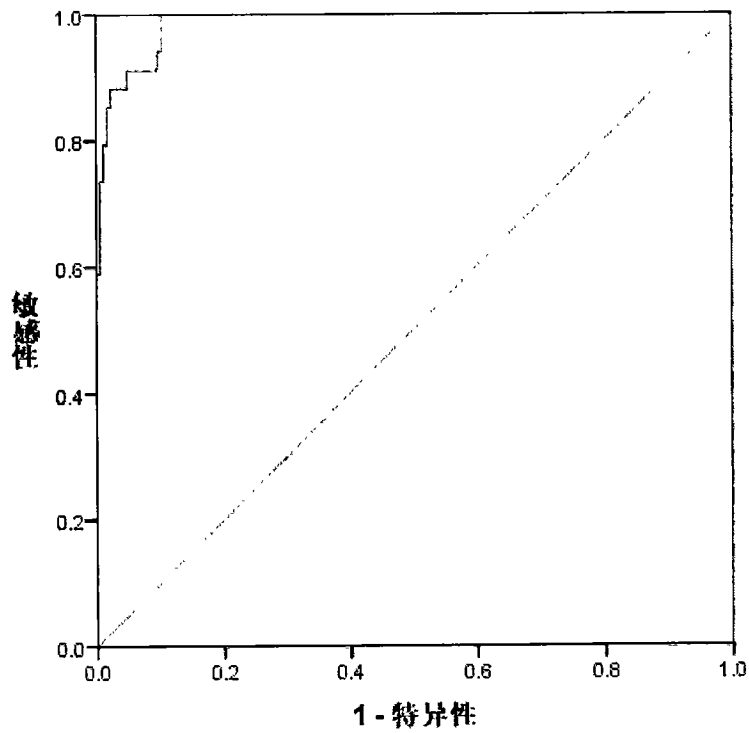


图4

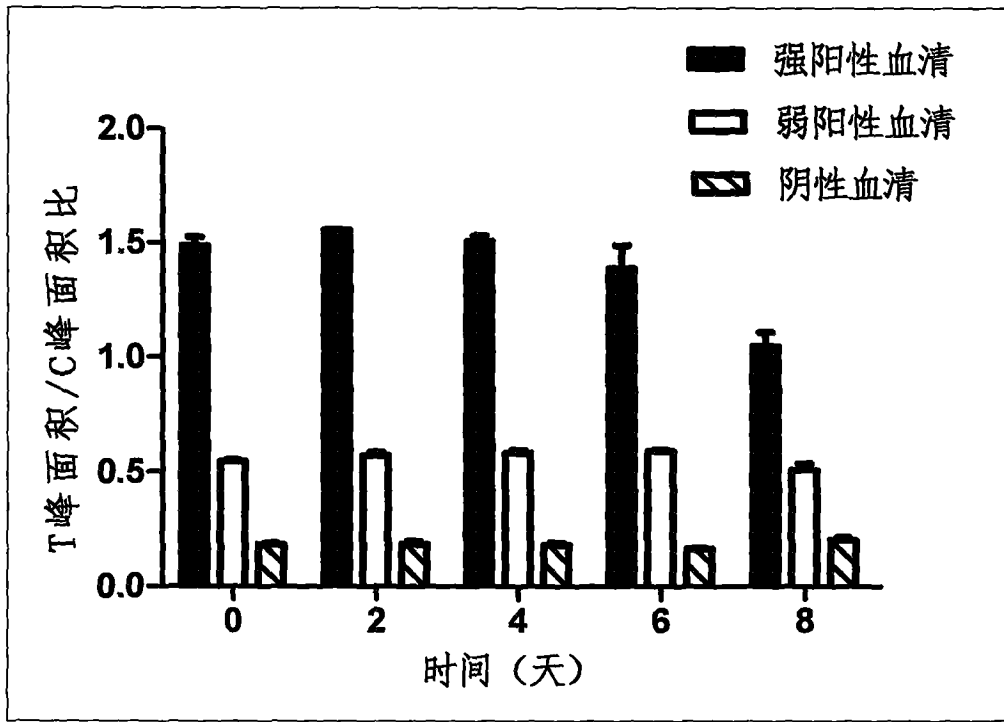


图5

专利名称(译)	一种肺炎支原体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN105759034A	公开(公告)日	2016-07-13
申请号	CN201610194372.1	申请日	2016-04-01
[标]发明人	欧黎明 孙丽华		
发明人	欧黎明 孙丽华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56933 G01N33/533 G01N33/558 G01N2333/30		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于荧光免疫层析技术的肺炎支原体IgM的试剂盒和检测方法。本发明的方法是使用荧光素作为标记材料，标记小鼠抗人的IgM μ 链单克隆抗体。血清中的肺炎支原体特异性IgM抗体与荧光素标记抗体结合形成反应复合物，被肺炎支原体抗原捕获，肺炎支原体IgM捕获量与荧光抗体的信号强度呈正相关，通过免疫荧光检测仪读数，可检测出血清中的肺炎支原体IgM。本发明的方法具有时间短、特异性好、良好的精确性和稳定性等特点，与欧盟肺炎支原体IgM检测试剂盒检测结果符合率较高。为临床上快速准确检测肺炎支原体IgM提供一种新方法，具有良好的市场前景。

