



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111308073 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 201911301197.1

(22)申请日 2019.12.17

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450000 河南省郑州市经济技术开发区
经北一路87号

(72)发明人 江雪 王新明 孙冯博 姜本光

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 潘颖

(51)Int.Cl.

G01N 33/571(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

(54)发明名称

一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及体外诊断技术领域,特别涉及一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒。该试剂盒包括梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒、梅毒螺旋体抗原酶结合物、化学发光底物;所述梅毒螺旋体抗原酶结合物为含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原、尿激酶、小牛血清的缓冲液。本发明采用磁性微粒作为抗体的固相载体,利用化学发光免疫分析技术,在全自动化学发光分析仪上可实现单人份、随机、快速、自动化检测。本发明经过试验验证,在酶结合物中添加0.1~30U/mL的尿激酶对灵敏度、特异性、稳定性以及精密性等指标无影响,但对临床复测率有着极大的改善。

1. 一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 包括梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒、梅毒螺旋体抗原酶结合物、化学发光底物; 所述梅毒螺旋体抗原酶结合物为含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原、尿激酶、小牛血清的缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述梅毒螺旋体抗原酶结合物中各组分的浓度为: 含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原0.2w/v%~1w/v%, 尿激酶0.1~30U/mL, 小牛血清10vt%~30vt%。

3. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述梅毒螺旋体抗原酶结合物中各组分的浓度为: 含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原0.5w/v%, 尿激酶5U/mL, 小牛血清20vt%。

4. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原中的生物酶为辣根过氧化物酶。

5. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述梅毒螺旋体抗原酶结合物中还包括0.05w/v%~0.5w/v%防腐剂。

6. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒中, 磁性微粒的直径为0.2~4 μ m, 所述梅毒螺旋体抗原与磁性微粒通过共价交联方式偶联, 梅毒螺旋体抗原的工作浓度为0.1~20 μ g/mL。

7. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述化学发光底物包括底物A和底物B, 底物A为异鲁米诺衍生物, 底物B为过氧化氢。

8. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述梅毒螺旋体抗体检测试剂盒还包括阴性对照和/或阳性对照。

9. 根据权利要求1所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述阴性对照为基质液, 1000mL基质液的组成为: 十二水磷酸氢二钠5~6g、二水磷酸二氢钠0.5~0.7g、氯化钠7~9g、小牛血清180~220mL、ADP 0.5~2g、Proclin300 0.5~2g、Bronidox防腐剂0.5~2g、水补足;

阳性对照为含有0.1vt%~1vt%的梅毒螺旋体抗体的基质液。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述阴性对照为基质液, 1000mL基质液的组成为: 十二水磷酸氢二钠5.80g、二水磷酸二氢钠0.59g、氯化钠8.00g、小牛血清200mL、ADP 1g、Proclin300 1g、Bronidox防腐剂1g、水补足。

一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术领域,特别涉及一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 梅毒是梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, TP)引起的一种慢性传播疾病。在梅毒的传播途径中,性接触传染占95%,主要通过性交由破损处传染,TP大量存在于皮肤粘膜损害表面,也见于唾液、乳液、精液和尿液中。未经治疗的病人在感染一年内最具传染性,随着病期的延长,传染性逐渐减弱,病期超过4年者,通过性接触无传染性。

[0003] 梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, TP)属于螺旋体目(Spirochaetales)螺旋体科(Spirochaetaceae)密螺旋体属(*Treponema*),是一种密螺旋体,呈柔软纤细的螺旋体,形如金属刨花,长约6-12 μ m,宽0.09-0.18 μ m,有12个整齐均匀的螺旋。梅毒螺旋体为厌氧菌,在体外只能存活数小时,煮沸、干燥、肥皂水及一般的消毒剂(如升汞、石炭酸等)很容易将其杀死。不耐温热,在42℃可存活2小时,100℃立即死亡,但耐寒力强,在0℃可存活48小时,-78℃下可保存数年,并保持其形态、活力及毒性,故常用液氮保存螺旋体。

[0004] TP特异性抗体检测方法有多种。首先是荧光梅毒螺旋体抗体吸收试验(fluorescent treponemal antibody-absorption test, FTA-ABS)。以Nichols梅毒螺旋体为抗原涂在载玻片上,用Reiter株非致病螺旋体制成的吸收剂加入病人血清中吸收30分钟后,以去除非特异抗体,用间接免疫荧光技术检测血清中的抗梅毒螺旋体IgG抗体,涂片上螺旋体有特异荧光者为阳性。此试验敏感性及特异性均高。

[0005] 梅毒螺旋体血球凝集试验(*treponema pallidum* hemagglutination assay, TPHA):是以梅毒螺旋体为抗原的间接血球凝集试验,敏感性及特异性均高。目前有2种TPHA试验:梅毒螺旋体微量血凝试验(MHA-TP);梅毒的血凝螺旋体试验(HATTS)。两者用超声波粉碎的Nichols株螺旋体悬液为抗原,前者用经甲醛处理的羊红细胞为抗原载体,后者用经戊二醛处理的大鸡红细胞为抗原载体。

[0006] 但上述检测方法,在临床检测时复测率较高。因此,急需提供一种复测率低的梅毒螺旋体抗体检测试剂及检测方法。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明提供了一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒。该试剂盒在酶结合物中添加尿激酶后,可有效改善临床复测率,对灵敏度、特异性、稳定性以及精密性等指标无影响。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0009] 本发明提供了一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒,包括梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒、梅毒螺旋体抗原酶结合物、化学发光底物;梅毒螺旋体抗原酶结合物为含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原、尿激酶、小牛血清的缓冲液。

[0010] 本试剂盒适用于人血清或血浆样品中梅毒螺旋体(TP)抗体的定性检测。

[0011] 作为优选,梅毒螺旋体抗原酶结合物中各组分的浓度为:含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原0.2w/v‰~1w/v‰,尿激酶0.1~30U/mL,小牛血清10vt%~30vt%。

[0012] 3、根据权利要求1的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒,梅毒螺旋体抗原酶结合物中各组分的浓度为:含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原0.5w/v‰,尿激酶5U/mL,小牛血清20vt%。

[0013] 作为优选,含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原中的生物酶为辣根过氧化物酶。

[0014] 作为优选,梅毒螺旋体抗原酶结合物中还包括0.05w/v%~0.5w/v%防腐剂。

[0015] 优选地,梅毒螺旋体抗原酶结合物中还包括0.1w/v%Bronidox防腐剂。

[0016] 作为优选,梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒中,磁性微粒的直径为0.2~4μm。

[0017] 作为优选,梅毒螺旋体抗原与磁性微粒通过共价交联方式偶联,梅毒螺旋体抗原的工作浓度为0.1~20μg/mL。

[0018] 优选地,梅毒螺旋体抗原的工作浓度为0.5μg/mL。

[0019] 作为优选,化学发光底物包括底物A和底物B,底物A为异鲁米诺衍生物,底物B为过氧化氢。

[0020] 作为优选,梅毒螺旋体抗体检测试剂盒还包括阴性对照和/或阳性对照。

[0021] 作为优选,阴性对照为基质液,1000mL基质液的组成为:十二水磷酸氢二钠5~6g、二水磷酸二氢钠0.5~0.7g、氯化钠7~9g、小牛血清180~220mL、ADP 0.5~2g、Proclin300 0.5~2g、Bronidox防腐剂0.5~2g、水补足;

[0022] 作为优选,阳性对照为含有0.1vt%~1vt%的梅毒螺旋体抗体的基质液。

[0023] 优选地,阴性对照为基质液,1000mL基质液的组成为:十二水磷酸氢二钠5.80g、二水磷酸二氢钠0.59g、氯化钠8.00g、小牛血清200mL、ADP 1g、Proclin300 1g、Bronidox防腐剂1g、水补足。

[0024] 本发明提供了一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒。该试剂盒包括梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒、梅毒螺旋体抗原酶结合物、化学发光底物;所述梅毒螺旋体抗原酶结合物为含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原、尿激酶、小牛血清的缓冲液。本发明的优点在于:

[0025] 本发明采用磁性微粒作为抗体的固相载体,利用化学发光免疫分析技术,在全自动化学发光分析仪上可实现单人份、随机、快速、自动化检测。由于本发明在技术原理上采用的是双抗原夹心法,特异性和灵敏度都符合国家及企业要求及用户体验要求,假阳性问题有很大程度上的改善。

[0026] 本发明经过试验验证,在酶结合物中添加0.1~30U/mL的尿激酶对灵敏度、特异性、稳定性以及精密性等指标无影响,但对临床复测率有着极大的改善。

具体实施方式

[0027] 本发明公开了一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0028] 本发明所述的梅毒螺旋体(TP)抗体检测试剂盒,包括以外购TP基因重组抗原片段

做为包被抗原,特异性地与待测血清或血浆中的抗体结合,以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的与包被抗原相同序列的抗原作为示踪物和化学发光底物液。本发明试剂盒技术原理上采用双抗原夹心法,特异性和灵敏度都符合国家及企业要求及用户体验要求。

[0029] 双抗原夹心法:随着技术的进步,人们已经可以用基因重组的方法获得特异性梅毒螺旋体抗原,在此基础上的双抗原夹心法成为普遍的检测技术。

[0030] 将本发明试剂盒与申请人公司的全自动化学发光仪AutoLumo A2000等仪器配合使用,可实现对样本的随机自动化检测,具有操作简单、快速、自动化等优点。

[0031] 所述磁性微粒的直径为0.2~4 μ m,所述TP重组抗原通过化学试剂共价交联的方法偶联在所述磁性微粒上,其工作浓度为0.1~20 μ g/mL。

[0032] 所述的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述TP抗原片段为外厂家采购抗原。

[0033] 所述的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述TP基因重组抗原片段,针对性结合人血清中特异性抗体TPN15、TPN17和TPN47蛋白,并形成抗原抗体免疫复合物。

[0034] 所述的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光底物液包括底物A液和底物B液,其中底物A液为异鲁米诺衍生物,底物B液为过氧化氢。

[0035] 所述的梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括阴性对照和阳性对照,其中阳性对照参与临界值的计算。

[0036] 本发明提供的梅毒螺旋体抗体检测试剂盒中所用试剂及检测仪器均可由市场购得。

[0037] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0038] 实施例1梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒的制备

[0039] 1. TP抗原偶联磁性微粒的制备

[0040] 1.1磁性微粒洗涤

[0041] 取200 μ L表面含羧基的磁微粒放在玻璃瓶中,用磁铁将磁微粒吸附在玻璃瓶底部,除去上清;加入2mL PBS (pH 7.4),重复以上操作3次。

[0042] 1.2磁性微粒活化

[0043] 将EDC和NHS分别溶解在0.1MMES (pH 5.0) 缓冲液中,浓度呈10~70mg/mL,然后各取1mL加入到磁微粒中;室温轻轻震荡反应30~60分钟;用磁铁将磁微粒吸附在底部,除去上清;再加入2mL 0.1MMES (pH5.0) 缓冲液,重悬磁微粒;重复以上操作2次。

[0044] 1.3TP抗原包被

[0045] 在活化后的磁珠中先加入0.1MMES (pH5.0) 缓冲液,再加入工作浓度为0.5 μ g/mL的TP重组抗原,室温轻轻震荡反应60分钟。

[0046] 2. TP抗原酶结合物的制备

[0047] 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记过的TP酶标抗原按照1:2000的比例稀释在含20%小牛血清、5U/mL尿激酶和0.1%Bronidox防腐剂的缓冲液中,2~8 $^{\circ}$ C保存。

[0048] 3. 阴性对照和阳性对照制备

[0049] 阴性对照为基质液,配制1000mL阴性对照:十二水磷酸氢二钠5.80g、二水磷酸二氢钠0.59g、氯化钠8.00g,用去离子水定容至800mL,加入200mL小牛血清、0.1%ADP、0.1%Proclin300、0.1%Bronidox防腐剂。

[0050] 阳性对照是在基质液中加入体积百分浓度1/100~1/1000的TP抗体阳性物质制备而成。

[0051] 4.化学发光底物液:

[0052] 底物A液采用异鲁米诺衍生物,底物B液采用过氧化氢。

[0053] 实施例2梅毒螺旋体 (TP) 抗体检测试剂盒的检测方法

[0054] 采用实施例1制备的试剂盒,与郑州安图生物工程股份有限公司生产的全自动化学发光仪AutoLumo A2000或AutoLumo A2000 Plus配合使用,用以检测梅毒螺旋体 (TP) 抗体:

[0055] 在反应容器(以下简称“孔”)中依次加入阴性对照2孔,阳性对照3孔(用于定Cutoff值),50 μ L/孔;其余孔中每孔分别加入50 μ L样本;

[0056] 每孔分别加入磁微粒混悬液20 μ L及酶结合物50 μ L;混匀后,37 $^{\circ}$ C温育30分钟;然后用清洗液洗涤5次;

[0057] 每孔再加入底物A液和底物B液各50 μ L;混匀后1~5分钟检测发光强度;

[0058] 结果计算:Cutoff值=阳性对照孔平均发光值 $\times$ 0.2;

[0059] 阳性判断值:S/C0=待测样本发光值/Cutoff值;

[0060] S/C0 $\geq$ 1.00时,结果判为阳性;S/C0<1.00时,结果判为阴性。

[0061] 试验例本发明试剂盒的性能评价

[0062] 1、重复性

[0063] 重复性是指对同一份样品重复测定,每次测定结果和均值的接近程度,以变异系数CV表示。

[0064] 选择不同浓度的3份样本,每天检测4个重复,连续检测5天,变异系数CV<8%,结果见表1:

[0065] 表1

[0066]

	检测次数	样本 1	样本 2	样本 3
第一天	1	20.63	11.37	5.98
	2	21.93	12.17	5.34
	3	22.25	12.43	5.51
	4	22.28	11.64	5.83
第二天	5	22.29	10.86	5.77
	6	22.32	11.69	5.68
	7	21.14	11.21	5.45
	8	22.37	11.26	5.55
第三天	9	18.56	10.93	5.44
	10	22.72	11.91	5.47
	11	23.04	10.67	5.30
	12	21.56	12.33	5.60
第四天	13	22.71	11.97	5.69
	14	21.82	11.67	5.56
	15	21.77	10.84	5.43
	16	22.50	10.87	5.80
第五天	17	20.72	11.57	5.51
	18	22.26	11.27	5.79
	19	21.63	12.28	5.98
	20	20.11	12.41	5.79

[0067]

	平均值	21.73	11.57	5.62
	标准差	1.06	0.58	0.20
	变异系数	4.90%	4.98%	3.55%

[0068] 从表1中结果可以看出:样本1的变异系数为4.90%,样本2的变异系数为4.98%,样本3的变异系数为3.55%,均小于行业要求的10%,证明其重复性良好。

[0069] 2、特异性

[0070] 测定TP的结构类似物,如巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、抗核抗体(ANA)、类风湿因子(RF)、甲肝病毒(HAV)。结果见表2:

[0071] 表2

[0072]

交叉品名称	交叉品浓度	检测浓度	交叉率
ANA	阳性	0.01	无交叉
ANA	阳性	0.01	无交叉
ANA	阳性	0.03	无交叉
ANA	阳性	0.01	无交叉
HCV 高	16	0.01	无交叉
HCV 中	5.3	0.01	无交叉
HCV 低	2.1	0.01	无交叉
EBV 高	12.3	0.03	无交叉
EBV 中	6.2	0.01	无交叉
EBV 低	1.5	0.01	无交叉
HEV-IgM 高	阳性	0.04	无交叉
HEV-IgM 中	阳性	0.00	无交叉
HEV-IgM 低	阳性	0.03	无交叉
HEV-IgG 高	阳性	0.02	无交叉
HEV-IgG 中	阳性	0.09	无交叉
HEV-IgG 低	阳性	0.01	无交叉
HAV-IgM 高	阳性	0.01	无交叉
HAV-IgM 中	阳性	0.01	无交叉
HAV-IgM 低	阳性	0.03	无交叉
HIV 高	21.3	0.02	无交叉
HIV 中	9.8	0.03	无交叉
HIV 低	2.3	0.01	无交叉

[0073]

RV-IgM 高	阳性	0.01	无交叉
RV-IgM 中	阳性	0.01	无交叉
RV-IgM 低	阳性	0.01	无交叉
HSV-1 IgG 高	阳性	0.01	无交叉
HSV-1 IgG 中	阳性	0.01	无交叉
HSV-1 IgG 低	阳性	0.01	无交叉
TOX-IgM 高	阳性	0.01	无交叉
TOX-IgM 中	阳性	0.00	无交叉
TOX-IgM 低	阳性	0.01	无交叉
TOX-IgG 高	阳性	0.03	无交叉
TOX-IgG 中	阳性	0.01	无交叉
TOX-IgG 低	阳性	0.01	无交叉
CMV-IgG 高	阳性	0.01	无交叉
CMV-IgG 中	阳性	0.01	无交叉
CMV-IgG 低	阳性	0.01	无交叉
HSV-2 IgG 高	阳性	0.01	无交叉
HSV-2 IgG 中	阳性	0.07	无交叉
HSV-2 IgG 低	阳性	0.08	无交叉
RV-IgG 高	阳性	0.01	无交叉
RV-IgG 中	阳性	0.09	无交叉
RV-IgG 低	阳性	0.01	无交叉
HBsAg 高	阳性	0.02	无交叉
HBsAb 高	阳性	0.01	无交叉
HBeAg 高	阳性	0.01	无交叉
HBeAb 高	阳性	0.01	无交叉
HBcAb 高	阳性	0.01	无交叉

[0074] 从表2结果可以看出:共检测19个项目的阳性样本,检测结果显示与本项目均无交叉。

[0075] 类风湿因子、ANA、HAMA等自身抗体可能会对实验结果产生干扰,为了验证这些物质的干扰,收集RF阳性样本、ANA阳性样本、HAMA阳性样本各11份,用本试剂盒进行检测。结果如表3:

[0076] 表3:

[0077]

RF				ANA			HAMA		
样本序号	RF 含量 (单位 IU/mL)	发光值	测定结果	样本序号	发光值	测定结果	样本序号	发光值	测定结果

[0078]

RF1	125.3	17,979	0.01	ANA1	51,835	0.03	HAMA1	8,392	0.01
RF2	65.2	4,694	0	ANA2	5,902	0	HAMA2	8,795	0.01
RF3	132.2	7,215	0	ANA3	95,186	0.06	HAMA3	7,985	0
RF4	127.3	19,992	0.01	ANA4	22,119	0.01	HAMA4	36,594	0.02
RF5	42.1	11,305	0.01	ANA5	5,818	0	HAMA5	6,505	0
RF6	130.2	10,268	0.01	ANA6	15,455	0.01	HAMA6	6,275	0
RF7	125.7	6,096	0	ANA7	5,334	0	HAMA7	6,868	0
RF8	122.3	8,971	0.01	ANA8	5,874	0	HAMA8	12,361	0.01
RF9	120.1	5,617	0	ANA9	5,483	0	HAMA9	9,913	0.01
RF10	167.8	6,739	0	ANA10	6,062	0	HAMA10	18,174	0.01
RF11	33	9,549	0.01	ANA11	18,249	0.01	HAMA11	6,014	0

[0079] 从表3结果可以看出:使用本试剂盒检测结果表明,RF阳性、ANA阳性、HAMA阳性对检测结果无影响。

[0080] 3、样本的采集和处理

[0081] 临床检验的样本类型一般为血清或者血浆。血浆样本采用的抗凝剂有柠檬酸钠, EDTA-2Na或者肝素钠等。不同抗凝剂及普通管(不含添加剂)的采血管均需要考核其对检测结果是否存在干扰。对比不同采血管的阳性样本和阴性样本,检测结果是否存在干扰。

[0082] 结果显示,不同抗凝剂样本检测信号值差异较小,说明抗凝剂对检测结果无明显干扰。因此,本试剂盒适用的样本类型可以是血清或血浆,抗凝剂可以使用EDTA-2Na或K、枸橼酸钠或肝素,结果见表4:

[0083] 表4. 不同抗凝剂对比

[0084]

抗凝剂		1 阳性	2 阳性	3 阳性	4 阳性	5 阳性	6 阳性	7 阴性	8 阴性	9 阴性	10 阴性
发光值	普通管	15957986	37519653	10794646	80761173	22068823	46171780	8569	7647	7055	8523
	柠檬酸钠	15457277	36935212	11373027	81880789	24526934	48369605	8886	7319	7284	8256
	EDTA	16348779	35845579	11321548	81544213	25545123	48533648	8411	7536	7365	8168
	肝素钠	17005483	38745237	10564128	82147853	20048751	47952544	8765	7611	7278	7750
量值差异	柠檬酸钠	-3.14%	-1.56%	5.36%	1.39%	11.14%	4.76%	3.70%	-4.29%	3.25%	-3.13%
	EDTA	2.45%	-4.46%	4.88%	0.97%	15.75%	5.12%	-1.84%	-1.45%	4.39%	-4.17%

[0085]

	肝素钠	6.56%	3.27%	-2.14%	1.72%	-9.15%	3.86%	2.29%	-0.47%	3.16%	-9.07%
--	-----	-------	-------	--------	-------	--------	-------	-------	--------	-------	--------

[0086] 4、样本中内源性物质的干扰

[0087] 样本中的内源性干扰物质可能会干扰检测结果,需要考核本试剂盒对内源性干扰物质的耐受浓度。在6份阳性样本(1份弱阳性、3份中强阳性、2份强阳性)和6份阴性样本中分别添加以下浓度的纯品:500mg/dl血红蛋白、20mg/dl胆红素和3g/dl甘油三酯进行检测。

[0088] 对于阳性样本,计算样本和对照品的平均发光值,计算每个样本发光值的干扰百分比:

[0089] 干扰百分比 = (样本平均发光值 - 对照品平均发光值) / 对照品平均发光值 × 100%

[0090] 如果阳性样本干扰在 $\pm 15\%$ 以内,阴性样本本底无明显变化,不影响结果判定,认为本试剂盒对样本中内源性物质的干扰可以接受。

[0091] 经验证,添加内源性物质后干扰率均 $<15\%$,干扰可接受。由于临床样本生理浓度和病理浓度均低于内源性干扰物考核浓度,因此500mg/dl血红蛋白、20mg/dl胆红素和3g/dl甘油三酯可以作为本试剂盒的内源性干扰耐受极限,结果见表5:

[0092] 表5内源性干扰物质的影响

对照		甘油三酯干扰		胆红素干扰		血红蛋白干扰	
阳性	阴性	阳性		阴性		阳性	
未添加	未添加	添加	干扰率	添加	添加	干扰率	添加
126171780	43660	134568712	6.24%	3239	126987412	0.64%	4234
41482668	9439	42598712	2.62%	6861	40268741	-3.01%	92177
68308839	30678	69562321	1.80%	27070	70256410	2.77%	3203
28911605	4136	29145879	0.80%	58937	30354187	4.75%	65422
10683669	3216	9852345	-8.44%	16468	12054620	11.37%	6510
15032774	77613	16239487	7.43%	29230	16210215	7.26%	14171
							16287498
							7.70%
							17871

[0094] 5、参考值确定

[0095] 在发光值400-5000之间设定cuo-off值,根据所假设的不同cut-off值计算特异性、灵敏度 (TPR) 和假阳性率 (FPR),见表6:

[0096] 表6不同cut-off值下测定的特异性、灵敏度 (TPR) 和假阳性率 (FPR) 的关系

[0097]

Cut-off 值	特异性 (%)	灵敏度 (%)	假阳性率 (%)
	真阴性率(TPR)	真阳性率(TPR)	FPR
100,000	92.05	98.9	7.95
300,000	97.44	98.9	2.56
600,000	97.69	98.9	2.31
900,000	97.95	98.68	2.05
1,200,000	98.21	98.68	1.79
1,500,000	98.72	98.46	1.28
1,800,000	99.23	98.24	0.77
2,100,000	99.23	98.24	0.77
2,400,000	99.23	97.36	0.77
2,800,000	99.49	96.7	0.51
3,200,000	99.74	96.26	0.26
5,000,000	99.74	90.99	0.26
8,000,000	99.74	82.64	0.26
12,000,000	99.74	72.31	0.26
15,000,000	99.74	63.74	0.26
20,000,000	99.74	54.95	0.26
25,000,000	99.74	44.4	0.26
30,000,000	99.74	38.02	0.26
35,000,000	99.74	30.99	0.26

[0098] 在cut-off值定在2,800,000-8,000,000之间时真阳性率 (TPR) 和假阳性率 (FPR) 的比例较合适,因此,设定试剂盒cut-off值的发光值范围为2,800,000-8,000,000。

[0099] cut-off值确定以后并不意味着每次测定的cut-off值都一成不变。由于免疫测定在试验间经常会有较大的变异,因此每次测定的cut-off值都会有所差异,为控制这种差异对结果判定的影响,我们在临界值计算时,以阳性对照发光值的平均值乘以一个系数来计算:

[0100] 即Cut off=阳性对照平均发光值*0.2

[0101] 大于等于该值判为阳性,小于该值判为阴性。

[0102] 6、灵敏度

[0103] 考核60份梅毒样本,本试剂盒与罗氏试剂阳性符合率为100% (58/58) (95%CI: 93.79%~100%)。结果见表7:

[0104] 表7

[0105]

		参比试剂(罗氏)		合 计
		+	-	
考核试剂(安图)	+	58	1	59
	-	0	1	1
合 计		58	2	60

[0106] 从表7结果可以看出：本试剂盒与罗氏(电化学发光法)具有较高的临床符合率，证明本试剂盒具有很高的灵敏度和特异性。

[0107] 7、复测率

[0108] 验证方法为非平行考核，对照组为无尿激酶组，共考核1118份门诊/体检/传染病院样本，实验组为添加尿激酶组，共考核4042份门诊/体检样本，验证情况如下：

[0109] 表8

[0110]

	样本总数	阳性	不确定	阴性	复测
对照组	1118	11	0	1107	17
实验组	4042	28	1	4013	1

[0111] 从表8验证情况来看，在酶结合物中添加尿激酶对临床复测率有极大的改善。

[0112] 经过试验验证，在酶结合物中添加0.1~30U/mL的尿激酶对灵敏度、特异性、稳定性以及精密性等指标无影响，但对临床复测率有着极大的改善。

[0113] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN111308073A	公开(公告)日	2020-06-19
申请号	CN201911301197.1	申请日	2019-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	江雪 王新明 孙冯博		
发明人	江雪 王新明 孙冯博 姜本光		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/535 G01N33/543 G01N21/76		
代理人(译)	潘颖		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外诊断技术领域，特别涉及一种梅毒螺旋体抗体检测试剂盒。该试剂盒包括梅毒螺旋体抗原偶联磁性微粒、梅毒螺旋体抗原酶结合物、化学发光底物；所述梅毒螺旋体抗原酶结合物为含有生物酶标记的梅毒螺旋体抗原、尿激酶、小牛血清的缓冲液。本发明采用磁性微粒作为抗体的固相载体，利用化学发光免疫分析技术，在全自动化学发光分析仪上可实现单人份、随机、快速、自动化检测。本发明经过试验验证，在酶结合物中添加0.1~30U/mL的尿激酶对灵敏度、特异性、稳定性以及精密性等指标无影响，但对临床复测率有着极大的改善。

	检测次数	样本 1	样本 2	样本 3
第一天	1	20.63	11.37	5.98
	2	21.93	12.17	5.34
	3	22.25	12.43	5.51
	4	22.28	11.64	5.83
第二天	5	22.29	10.86	5.77
	6	22.32	11.69	5.68
	7	21.14	11.21	5.45
	8	22.37	11.26	5.55
第三天	9	18.56	10.93	5.44
	10	22.72	11.91	5.47
	11	23.04	10.67	5.30
	12	21.56	12.33	5.60
第四天	13	22.71	11.97	5.69
	14	21.82	11.67	5.56
	15	21.77	10.84	5.43
	16	22.50	10.87	5.80
第五天	17	20.72	11.57	5.51
	18	22.26	11.27	5.79
	19	21.63	12.28	5.98
	20	20.11	12.41	5.79