



SeroMP™ IgM

Ενζυμικός ανοσοπροσοφητικός
προσδιορισμός (ELISA)
για την ημι-ποσοτική ανίχνευση
ειδικών αντισωμάτων IgG έναντι του
Μυκοπλάσματος πνευμονίας
σε ανθρώπινο ορό

Φυλλάδιο οδηγιών

Διαγνωστικό σύνολο για 96 προσδιορισμούς
(Αρ. καταλόγου A262-01M)

Διαγνωστικό σύνολο για 192 προσδιορισμούς
(Αρ. καταλόγου B262-01M)

Για In Vitro διαγνωστική χρήση
Φυλάσσετε στους 2-8° C. **Μην καταψύχετε**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Προοριζόμενη χρήση

Το διαγνωστικό σύνολο SeroMP™ IgM είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσοφητικός προσδιορισμός (ELISA) για τον προσδιορισμό ειδικών για το είδος αντισωμάτων IgM έναντι του Μυκοπλάσματος πνευμονίας (*Mycoplasma pneumoniae*) σε ανθρώπινο ορό

Η εξέταση επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση τρέχουσας λοίμωξης σε ένα μοναδικό δείγμα ορού με προσδιορισμό IgM αντισωμάτων.

Για **In Vitro** διαγνωστική χρήση.

Εισαγωγή

Το *M. pneumoniae* είναι συνήθης αιτία πνευμονίας που μεταδίδεται μέσω συγχρωτισμού, η οποία συχνά χαρακτηρίζεται από βαθμιαία εμφάνιση κεφαλαλγίας, πυρετού, αδιαθεσίας και, κατά κανόνα, ξηρού βήχα. Το *M. pneumoniae* είναι σύνθητες σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, αν και εμφανίζεται πιο συχνά στις πρώτες δύο δεκαετίες της ζωής και είναι σπάνιο σε παιδιά μικρότερα των τεσσάρων ετών. Έχει αναφερθεί ως η αιτία του 30% όλων των περιπτώσεων πνευμονίας (1). Το *M. pneumoniae* έχει επίσης συσχετιστεί με μη αναπνευστικές παθήσεις όπως η μηνιγγίτιδα, η εγκεφαλίτιδα, η παγκρεατίτιδα, η νευροαισθητηριακή απώλεια ακοής και το οξύ σύνδρομο του εγκεφαλικού στελέχους (2).

Λόγω του συχνού επιπολασμού του, θα μπορούσε να θεωρηθεί κανείς πιθανό το *M. pneumoniae* ως αίτιο σε όλες τις περιπτώσεις πνευμονίας, αλλά καθώς τα συμπτώματα είναι τα ίδια για διαφορετικούς παράγοντες, απαιτούνται επιπλέον διαγνωστικά εργαλεία όπως οι ορολογικές εξετάσεις (3).

Η τεχνική ELISA είναι ευαίσθητη, ειδική και παρέχει τη δυνατότητα για διαφορικό προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων IgG, IgA και IgM (4).

Τα ειδικά αντισώματα IgM έναντι του *M. pneumoniae* αυξάνονται σύντομα μετά την έναρξη της νόσου, φθάνουν στα ανώτατα επίπεδα εντός μίας έως τεσσάρων εβδομάδων και στη συνέχεια, εντός λίγων μηνών, μειώνονται σε επίπεδα μη σημαντικά από διαγνωστικά άποψη (5). Λόγω της πρώιμης εμφάνισης και της σχετικά βραχείας διάρκειας ζωής των αντισωμάτων IgM, η ανίχνευσή τους επιτρέπει τη διάγνωση οξείας λοίμωξης χρησιμοποιώντας ένα μόνο δείγμα ορού. Οι νεαροί ασθενείς έχουν συνήθως υψηλότερα επίπεδα IgM αντισωμάτων από τους ενήλικους (6). Τα επίπεδα των αντισωμάτων IgG αυξάνονται πιο αργά από ότι εκείνα των αντισωμάτων IgM, αλλά παραμένουν σε υψηλά επίπεδα για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επομένως, σημαντική αύξηση σε δύο διαδοχικά δείγματα που λαμβάνονται με απόσταση τουλάχιστον 2 εβδομάδων το ένα από το άλλο, ενδέχεται να αποτελεί ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης ή επαναλοίμωξης, ακόμη και αν δεν υπάρχουν αντισώματα IgM. Αντισώματα IgA παρατηρούνται σε υψηλότερα επίπεδα σε ηλικιωμένους ασθενείς (5) και μπορεί να είναι πιο χρήσιμα από τα αντισώματα IgM για τη διάγνωση τρέχουσας λοίμωξης σε ενήλικους (6).

Η Savyon® Diagnostics Ltd. έχει αναπτύξει ημιποσοτικές εξετάσεις IgG, IgA και IgM ELISA, που παρέχουν τη δυνατότητα παρακολούθησης της αλλαγής των επιπέδων των αντισωμάτων σε ανθρώπινους ορούς. Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται στην εξέταση SeroMP™ είναι ένα μεμβρανικό παρασκεύασμα του *M.pneumoniae*, το οποίο περιέχει την P1 μεμβρανική πρωτεΐνη, που είναι ένας σημαντικός ανοσογόνος παράγοντας (7, 8, 9, 10, 11).

Η εξέταση SeroMP™ παρέχει τη δυνατότητα πρώιμης και ακριβούς ανίχνευσης αντισωμάτων IgG, IgA και IgM ειδικών για το *M. pneumoniae*.

Αρχή της εξέτασης

- Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης SeroMP™ είναι επιστρωμένες με κεκαθαμένο κλάσμα μεμβρανικών πρωτεϊνών του *M. pneumoniae*
- Ο προς εξέταση ορός αραιώνεται και επωάζεται στην πλάκα SeroMP™. Στο βήμα αυτό, ειδικά αντισώματα έναντι του *M.pneumoniae* δεσμεύονται στα ακινητοποιημένα αντιγόνα.
- Τα μη ειδικά αντισώματα αφαιρούνται με έκπλυση.
- Προστίθεται αντι-ανθρώπινη IgM συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Στο βήμα αυτό, το συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης δεσμεύεται στο ήδη δεσμευμένο σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος.
- Το μη δεσμευμένο αντιδραστήριο σύζευξης αφαιρείται με έκπλυση.
- Μετά την προσθήκη υποστρώματος TMB, το υπόστρωμα υδρολύεται από την υπεροξειδάση, δίνοντας κυανό διάλυμα του ανηγμένου υποστρώματος.
- Μόλις προστεθεί το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (Stop Solution), το κυανό χρώμα γίνεται κίτρινο και θα πρέπει να διαβαστεί με φωτόμετρο ELISA σε μήκος κύματος 450/620 nm.
- Η απορρόφηση είναι ανάλογη προς την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που έχουν δεσμευτεί στα επιστρωμένα αντιγόνα.

Διαδικασία προσδιορισμού

Βυθίσματα πλάκας μικροτιτλοδότησης επιστρωμένα με αντιγόνα του *M.pneumoniae*



Προσθέστε 50 μl από τον αρνητικό ορό ελέγχου, 50 μl απο τον θετικό ορό ελέγχου και 50 μl από κάθε βαθμονομητή: (P10, P50, P75) και τα αραιωμένα δείγματα



Καλύψτε την πλάκα και επωάστε επί 1 ώρα στους 37° C σε υγρασία 100%

↓

Εκπλύνετε 3 φορές με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα

↓

Προσθέστε 50 μl από το αραιωμένο σε αναλογία 1/300 και συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης

↓

Καλύψτε την πλάκα και επωάστε επί 1 ώρα στους 37° C σε υγρασία 100%

↓

Εκπλύνετε 3 φορές με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα

↓

Προσθέστε 100 μl από το υπόστρωμα TMB

↓

Καλύψτε την πλάκα και επωάστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

↓

Προσθέστε 100 μl από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (Stop Solution)

↓

Διαβάστε την απορρόφηση στα 450/620 nm

↓

Υπολογίστε και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα

Περιεχόμενα του διαγνωστικού συνόλου:

Διαγνωστικό σύνολο για 96 προσδιορισμούς Αρ. καταλόγου A262-01M

- 1. Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρωμένη με αντιγόνο του *M.pneumoniae*:** 96 αποσπώμενα βυθίσματα (8x12) επιστρωμένα με αντιγόνα του *M.pneumoniae*, σε συσκευασία από αλουμίνιο που περιέχει ξηραντικό.
1 πλάκες
- 2. Συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (20X):** Ρυθμιστικό διάλυμα PBS - Tween.
1 φιάλη, 100 ml
- 3. Αραιωτικό ορού IgM (κόκκινο):** Αντι-ανθρώπινη IgG σε ρυθμιστικό διάλυμα, έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 60 ml
- 4. Αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης (πράσινο):** Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 40 ml
- 5. Θετικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός θετικός για αντισώματα IgG έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 6. Αρνητικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός αρνητικός για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 7. Βαθμονομητής P10:** Ανθρώπινος ορός, χαμηλής θετικότητας για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει 10 BU/ml IgM (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης). Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 8. Βαθμονομητής P50:** Ανθρώπινος ορός, μέσης θετικότητας για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει 50 BU/ml IgM (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης). Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml

- 9. Βαθμονομητής P75:** Ανθρώπινος ορός, υψηλής θετικότητας για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει 75 BU/ml IgM (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης). Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml

- 10. Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο σύζευξης, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgM (ειδική για τη γάμμα αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιαλίδιο, 0,2 ml

- 11. Υπόστρωμα TMB:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 3, 3', 5, 5' - τετραμεθυλοβενζιδίνη ως χρωμογόνο και υπεροξειδίο ως υπόστρωμα.
1 φιάλη, 14 ml

- 12. Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 1M H₂SO₄.
1 φιάλη, 15 ml

- 13. Κάλυμμα πλάκας:**
1 τεμάχια
- 14. Φυλλάδιο οδηγιών:**
1

Διαγνωστικό σύνολο για 192 προσδιορισμούς Αρ. καταλόγου B262-01M

- 1. Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρωμένη με αντιγόνο του *M.pneumoniae*:** 96 αποσπώμενα βυθίσματα (8x12) επιστρωμένα με αντιγόνα του *M.pneumoniae*, σε συσκευασία από αλουμίνιο που περιέχει ξηραντικό.
2 πλάκες
- 2. Συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (20X):** Ρυθμιστικό διάλυμα PBS - Tween.
2 φιάλες, 100 ml εκάστη
- 3. Αραιωτικό ορού IgM (κόκκινο):** Αντι-ανθρώπινη IgG σε ρυθμιστικό διάλυμα, έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 60 ml
- 4. Αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης (πράσινο):** Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.
1 φιάλη, 80 ml
- 5. Θετικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός θετικός για αντισώματα IgG έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 6. Αρνητικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός αρνητικός για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 7. Βαθμονομητής P10:** Ανθρώπινος ορός, χαμηλής θετικότητας για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει 10 BU/ml IgM (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης). Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 8. Βαθμονομητής P50:** Ανθρώπινος ορός, μέσης θετικότητας για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει 50 BU/ml IgM (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης). Περιέχει λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.
1 φιαλίδιο, 2,0 ml
- 9. Βαθμονομητής P75:** Ανθρώπινος ορός, υψηλής θετικότητας για αντισώματα IgM έναντι του *M.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει 75 BU/ml IgM (αυθαίρετες μονάδες δέσμευσης). Περιέχει λιγότερο

από 0,1% αζίδιο του νατρίου και λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικά.

1 φιαλίδιο, 2,0 ml

10. **Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο σύζευξης, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgM (ειδική για τη γάμμα αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.

1 φιαλίδιο, 0,2 ml

11. **Υπόστρωμα TMB:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 3, 3', 5, 5' - τετραμεθυλοβενζιδίνη ως χρωμογόνο και υπεροξείδιο ως υπόστρωμα.

1 φιάλη, 24 ml

12. **Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 1M H₂SO₄.

1 φιάλη, 30 ml

13. **Κάλυμμα πλάκας:** **2 τεμάχια**
14. **Φυλλάδιο οδηγιών:** **1**

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται:

- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες για την αραίωση των ορών των ασθενών.
- Πλαστικό φιαλίδιο μίας χρήσης για την αραίωση του συμπυκνωμένου, συζευγμένου με HRP αντιδραστήριου σύζευξης.
- Μικροπιπέτες μεταβλητού όγκου και πολυκάναλες πιπέτες (εύρος όγκων σε μικρολίτρα 5-50, 50-200 και 200-1000) και ρύγχη μίας χρήσης.
- Μία ογκομετρική φιάλη ενός λίτρου.
- Ένας ογκομετρικός κύλινδρος των 50 ml.
- Φιάλη έκπλυσης.
- Απορροφητικό χαρτί.
- Αναμεικτής στροβιλισμού (vortex).
- Υδατόλουτρο 37° C με καπάκι ή υγραντικός θάλαμος τοποθετημένος μέσα σε επωαστήρα 37° C.
- Φωτόμετρο ELISA με φίλτρο 450 και 620 nm.
- Απεσταγμένο ή διπλά απιονισμένο νερό.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για In Vitro διαγνωστική χρήση

- Το παρόν διαγνωστικό σύνολο περιλαμβάνει ανθρώπινους ορούς, οι οποίοι έχουν εξεταστεί με τεχνικές εγκεκριμένες από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) και βρέθηκαν αρνητικοί για αντιγόνο HBV και για αντισώματα έναντι των HCV και HIV 1 & 2. Ωστόσο, επειδή καμία γνωστή μέθοδος δεν μπορεί να διασφαλίσει πλήρως ότι προϊόντα που παράγονται από ανθρώπινο αίμα δεν μεταδίδουν λοίμωξη, ο χειρισμός όλων των συστατικών ανθρώπινου αίματος που παρέχονται με αυτό το διαγνωστικό σύνολο θα πρέπει να γίνεται σαν να επρόκειτο για δυνητικώς μολυσματικό ορό ή αίμα, σύμφωνα με τις συστάσεις που δημοσιεύθηκαν στο χειρίδιο του CDC/NIH υπό τον τίτλο "Βιολογική ασφάλεια σε Μικροβιολογικά και Βιοϊατρικά Εργαστήρια" (Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories), 1988.
- Το διάλυμα του υποστρώματος TMB είναι υλικό που ερεθίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους. Αποφύγετε την άμεση επαφή.
- Όλα τα συστατικά αυτού του διαγνωστικού συνόλου έχουν βαθμονομηθεί και εξεταστεί ανά παρτίδα. Δεν συνιστάται η ανάμειξη συστατικών από διαφορετικές παρτίδες διότι αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.
- Το αραιωμένο θειικό οξύ (1M H₂SO₄) είναι παράγοντας που ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα. Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, ξεπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό και συμβουλευθείτε γιατρό.

Φύλαξη και διάρκεια ζωής των αντιδραστηρίων

- Όλα τα παρεχόμενα υλικά πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C. Τα μη ανοιγμένα φιαλίδια αντιδραστηρίων παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφέρεται στη συσκευασία του διαγνωστικού συνόλου. Η έκθεση των ανέγγιχτων παματισμένων ή σφραγισμένων συστατικών του διαγνωστικού συνόλου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί λίγες ώρες δεν θα προκαλέσει βλάβη στα αντιδραστήρια. **ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ!**
- Μόλις ανοιχθεί το διαγνωστικό σύνολο, η διάρκεια ζωής του είναι 90 ημέρες.
- Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μικροπιλοδότησης πρέπει να σφραγίζονται εκ νέου μέσα στη συσκευασία από αλουμίνιο με το ξηραντικό, γυρίζοντας καλά το ανοιχτό άκρο και σφραγίζοντας ερμητικά με ταινία κατά μήκος του ανοίγματος.
- Ενδέχεται να αναπτυχθούν κρύσταλλοι στο 20x συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα κατά τη διάρκεια της φύλαξης στο ψυγείο. Αυτό είναι απολύτως φυσιολογικό. Αναδιαλύστε τους κρυστάλλους θερμαίνοντας το ρυθμιστικό διάλυμα στους 37° C πριν την αραίωση. Μόλις αραιωθεί, το διάλυμα μπορεί να φυλαχτεί στους 2-8° C μέχρι είκοσι μία ημέρες.

Συλλογή ορών

Προετοιμάστε τους ορούς από δείγματα που συλλέχθηκαν με ασηπτική διαδικασία χρησιμοποιώντας τις συνήθειες τεχνικές. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται οροί που αδρανοποιήθηκαν με θερμότητα. Η χρήση λιπαιμικών, θολών ή μολυσμένων ορών δε συνιστάται. Σωματίδια και ιζήματα στον ορό ενδέχεται να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τέτοια δείγματα θα πρέπει να διαυγάζονται μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης πριν από την εξέταση.

Φύλαξη

Τα δείγματα πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8° C και να εξετάζονται εντός 7 ημερών (συνιστάται ιδιαίτερα η προσθήκη αζιδίου του νατρίου 0,1%). Αν αναμένεται μεγαλύτερη περίοδος φύλαξης, χωρίστε σε κλάσματα και φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία μικρότερη των -20° C. Αποφύγετε την επανειλημμένη απόψυξη και κατάψυξη.

Διαδικασία εξέτασης

A. Προετοιμασία των αντιδραστηρίων

- Φέρετε όλα τα συστατικά και τα προς εξέταση κλινικά δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμείξτε καλά τους βαθμονομητές (P10, P50, P75), τον αρνητικό ορό ελέγχου, τον θετικό ορό ελέγχου και τα κλινικά δείγματα πριν από τη χρήση.
- Καθορίστε το συνολικό αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων. Εκτός από τα δείγματα, σε κάθε εξέταση πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής: Ένα βύθισμα για το τυφλό, ένα για τον αρνητικό ορό ελέγχου, ένα για τον θετικό ορό ελέγχου και τρία βυθίσματα για τους βαθμονομητές (P10, P50, P75).
- Αφαιρέστε την πλάκα μικροπιλοδότησης από την αλουμινένια συσκευασία της κόβοντας το ένα άκρο κοντά στο σημείο του σφραγίσματος. Αφήστε τον απαιτούμενο αριθμό σειρών μικροπιλοδότησης (ανάλογα με τον αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων) στο πλαίσιο των 96 βυθισμάτων.
- Αραιώστε το συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα σε αναλογία 1/20 με διπλά απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό. Για παράδειγμα, προκειμένου να ετοιμάσετε ένα λίτρο πλυστικού ρυθμιστικού διαλύματος, προσθέστε 50 ml συμπυκνωμένου πλυστικού

ρυθμιστικού διαλύματος σε 950 ml διπλά απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού.

Β. Επώαση των δειγμάτων ορών και των ορών ελέγχου

5. Αραιώστε κάθε ορό ασθενούς σε αναλογία 1:105 με το παρεχόμενο αραιωτικό ορού ως εξής: Προσθέστε 10 μl από τον ορό του ασθενούς σε 200 μl αραιωτικού ορού (1/21) και κατόπιν αραιώστε κι άλλο προσθέτοντας 25 μl από την αραιώση 1/21 σε 100 μl αραιωτικού ορού.
Σημείωση: Το αραιωτικό ορού περιέχει αντι-ανθρώπινη IgG για την απομάκρυνση των IgG αντισωμάτων από τον ανθρώπινο ορό.
6. Διανείμετε 50μl από το τυφλό (αραιωτικό ορού), τον αρνητικό ορό ελέγχου, τον θετικό ορό ελέγχου, τους τρεις βαθμονομητές (P10, P50, P 75) και τα αραιωμένα σε αναλογία 1:105 δείγματα ορού σε ξεχωριστά βυθίσματα της σειράς μικροπιλοδότησης.
7. Καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επωάστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.
8. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο των βυθισμάτων.
9. **Βήμα έκπλυσης:** Γεμίστε κάθε βύθισμα με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι το στόμιο του βυθίσματος και απορρίψτε το υγρό, επαναλάβετε αυτό το βήμα τρεις φορές.
10. Στεγνώστε τις σειρές μικροπιλοδότησης και το πλαίσιο χτυπώντας τα απαλά πάνω σε καθαρό απορροφητικό χαρτί.

Γ. Επώαση με το αντιδραστήριο σύζευξης

11. Το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο αντι-ανθρώπινης IgM συζευγμένο με HRP πρέπει να αραιώνεται σε διάλυμα εργασίας ακριβώς πριν από τη χρήση. Αραιώστε τη συμπυκνωμένη, συζευγμένη με HRP αντι-ανθρώπινη IgM σε αναλογία 1/300 με το αραιωτικό αντιδραστήριο σύζευξης. Για παράδειγμα: για δύο σειρές, προετοιμάστε τουλάχιστον 3 ml αντιδραστηρίου σύζευξης, ως εξής: 10μl από τη συμπυκνωμένη, συζευγμένη με HRP αντι-ανθρώπινη IgM αναμειγνύονται με 3 ml από το αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης.
12. Διανείμετε 50 μl από το αραιωμένο αντιδραστήριο σύζευξης σε κάθε βύθισμα.
13. Καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επωάστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.
14. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο και πλύνετε όπως περιγράφεται στα βήματα 9-10.

Δ. Επώαση με υπόστρωμα TMB

15. Διανείμετε 100 μl από το υπόστρωμα TMB σε κάθε βύθισμα, καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί **15 ΛΕΠΤΑ**.
16. Τερματίστε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (1M H₂SO₄) σε κάθε βύθισμα.

Ε. Προσδιορισμός των αποτελεσμάτων

17. Προσδιορίστε την απορρόφηση στα 450/620 nm και καταγράψτε τα αποτελέσματα. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να γίνει μέσα σε 30 λεπτά από τον τερματισμό της χρωμογόνου αντίδρασης.
 - **Σημείωση:** Τυχόν φυσαλίδες αέρα θα πρέπει να αφαιρούνται πριν την ανάγνωση. Ο πυθμένας της μικροπλάκας ELISA πρέπει να καθαρίζεται προσεκτικά.

1. O.D._{P75} > **0,9**

2. Λόγος: O.D._{P10} / O.D._{NC} > **1,5**

3. Λόγος: O.D._{P50} / O.D._{NC} > **4**

4. Λόγος: O.D._{P75} / O.D._{NC} > **5,5**

5. Ο θετικός ορός ελέγχου (PC) θα πρέπει να είναι ≥ **40 BU/ml**

Υπολογισμός των αποτελεσμάτων της εξέτασης

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από διαφορετικές εξετάσεις, θα πρέπει να προσδιοριστεί η τιμή BU/ml των δειγμάτων, ως ακολούθως:

Μέθοδος με το χέρι, χρησιμοποιώντας τετραγωνισμένο χαρτί γραφημάτων (χαρτί μιλιμετρέ):

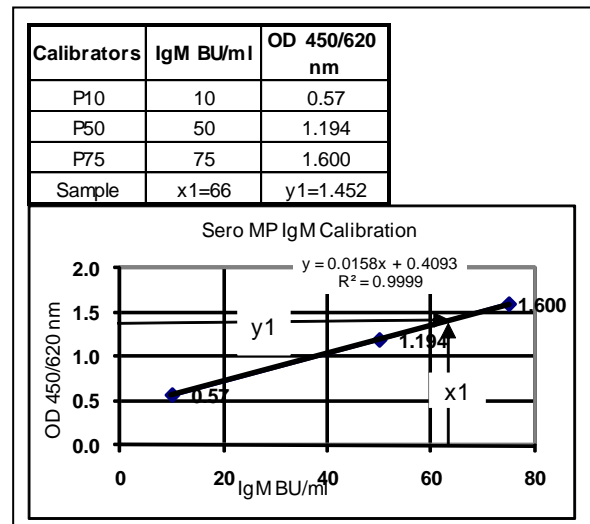
1. Αποτυπώστε γραφικά τις τιμές απορρόφησης (OD) των τριών βαθμονομητών (P10, P50 και P75) στον άξονα των Y ως προς τη συγκέντρωσή τους (BU/ml) στον άξονα των X.
2. Σχεδιάστε την καλύτερα προσαρμοσμένη γραμμική καμπύλη που διέρχεται από τα σημεία.
3. Χρησιμοποιώντας την τυπική καμπύλη, υπολογίστε τη συγκέντρωση των εξετασθέντων δειγμάτων (σε BU/ml) από κάθε απορρόφηση που μετρήθηκε (δείτε το παράδειγμα 1).

Παράδειγμα1:Υπολογισμόςτων αποτελεσμάτων

Στον άξονα των Y διαβάστε την τιμή απορρόφησης του δείγματος και τραβήξτε μια οριζόντια γραμμή μέχρι την καμπύλη βαθμονόμησης.

Από το σημείο τομής, τραβήξτε μια κάθετη γραμμή στον άξονα των X.

Διαβάστε τη συγκέντρωση του δείγματος σε BU/ml.



Επικύρωση της εξέτασης

Για να είναι έγκυρη η εξέταση, πρέπει να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια. Αν δεν πληρούνται αυτά τα κριτήρια, η εξέταση θα πρέπει να θεωρείται άκυρη και να επαναλαμβάνεται.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

IgM BU/ml	Αποτέλεσμα	Διαγνωστική ερμηνεία
< 10 BU/ml	Αρνητικό Δεν είναι ανιχνεύσιμα αντισώματα IgM	Καμία ένδειξη λοίμωξης από <i>M. pneumoniae</i>
≥10 BU/ml ≤ 20 BU/m	Οριακό	Εξετάστε, παράλληλα με το πρώτο δείγμα, ένα δεύτερο δείγμα, το οποίο θα ληφθεί δύο έως τέσσερις εβδομάδες αργότερα. Όταν το δεύτερο δείγμα είναι οριακό, το αποτέλεσμα θα πρέπει να θεωρείται αρνητικό
>20 BU/ml	Θετικό Σχετικά επίπεδα αντισωμάτων IgM	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης από <i>M. pneumoniae</i>

Προκειμένου να ληφθεί ένα πλήρες προφίλ των αντισωμάτων, θα πρέπει να γίνει εξέταση και για IgA και IgG.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση το συνδυασμό της ανίχνευσης αντισωμάτων IgM, IgG και IgA.

Επίπεδο των αντισωμάτων έναντι του <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	
Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Καμία ένδειξη λοίμωξης από <i>M. pneumoniae</i>
Αρνητικό ή Θετικό	Θετικό	Αρνητικό ή Θετικό	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης
Θετικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Ένδειξη παρελθούσας λοίμωξης
Αρνητικό ή Θετικό	Αρνητικό	Θετικό	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης ή επαναλοίμωξης

Διασταυρούμενες αντιδράσεις

Ασθενείς που νοσηλεύονται, με λοιμώξεις από παθογόνα της αναπνευστικής οδού: *Χλαμύδια πνευμονίας (Chlamydia pneumoniae)* Ιό της Γρίππης τύπου A (*Influenza A*), Ιό της Γρίππης τύπου B (*Influenza B*), Ιό της Παραγρίππης (*Parainfluenza*) τύπων 1, 2 και 3 καθώς και *Αδενοϊό* και *EBV*, των οποίων η διάγνωση έγινε με ορολογικά διαγνωστικά σύνολα του εμπορίου, εξετάστηκαν επίσης με το διαγνωστικό σύνολο SeroMP. Οι περισσότεροι από τους ορούς βρέθηκαν αρνητικοί. Δεν ανιχνεύθηκε σημαντική διασταυρούμενη αντίδραση.

Περιορισμοί της εξέτασης

- Για την τελική διάγνωση δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται μία μόνον ορολογική εξέταση. Θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα κλινικά και τα εργαστηριακά δεδομένα.
- Δείγματα που λαμβάνονται σε πολύ αρχικό στάδιο πρωτογενούς λοίμωξης ενδέχεται να μην περιέχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα. Αν υπάρχει υποψία για λοίμωξη από *Μυκόπλασμα*, πρέπει να ληφθεί δεύτερο

δείγμα 2-4 εβδομάδες αργότερα και να εξετασθεί παράλληλα με το αρχικό δείγμα.

- Ουσίες που επιδρούν: Η χρήση λιπαιμικών, θολών ή μολυσμένων ορών δε συνιστάται. Σωματίδια και ιζήματα στον ορό ενδέχεται να προκαλέσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τέτοια δείγματα θα πρέπει να διαυγάζονται μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης πριν από την εξέταση.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Ειδικότητα και ευαισθησία

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της εξέτασης SeroMP™ IgM υπολογίστηκε με χρήση ορών, οι οποίοι εξετάστηκαν και τα αποτελέσματά τους ευρέθησαν σε συμφωνία με 2 προσδιορισμούς ELISA του εμπορίου (συναινετικά αποτελέσματα), χρησιμοποιώντας 22 ορούς που ελήφθησαν από ασθενείς με πνευμονία και 21 ορούς από υγιείς αιμοδότες.

SeroMP IgM		Συναινετικά αποτελέσματα	
		Θετικό	Αρνητικό
SeroMP IgM	Θετικό	21	0
	Αρνητικό	1	21

Ευαισθησία : $21/22 \times 100 = 95\%$

Ειδικότητα: $21/21 \times 100 = 100\%$

Ολική συμφωνία: $42/43 \times 100 = 98\%$

Ακρίβεια

Ακρίβεια εντός του ίδιου προσδιορισμού (στην ίδια εκτέλεση):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση τιμή	Σ.Δ. %
Θετικό	10	1,341	3,4 %
Αρνητικό	10	0,243	4,3 %

Ακρίβεια μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (σε διαφορετικές εκτελέσεις):

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση τιμή	Σ.Δ. %
Θετικό	10	1,302	4.4%
Αρνητικό	10	0,189	8,6%

Bibliography

1. Liberman D., Schlaffer F., Boldur I., Liberman D., Horowitz S., Friedman, M.G., Leinonen M., Horowitz O., Manor E. and Porath A. (1996) Multiple pathogens in adult patients admitted with Community - aquired *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., Leibman, 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., Leibman, 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.
10. Lieberman, D., Leibman, 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., Carlquish, 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.



Obelis s.a. (Εξουσιοδοτημένο κέντρο αντιπροσώπευσης για την Ευρώπη)

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels

Tel.: +32.2.732.59.54 Fax.: +32.2.732.60.03

e-mail: mail@obelis.net