

SeroMP™ Recombinant IgM



ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) pro stanovení protilátek IgM proti *Mycoplasma pneumoniae* v lidském séru.

Savyon Diagnostics Ltd.

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č. 1262-01)

Skladujte při 2 – 8°C. **Nezmrazujte.**

Pouze pro profesionální použití

Pouze pro *in vitro* stanovení.

Dovází: GALI spol. s r.o.

Libštát 314, 512 03

Tel. 481 689 050

Fax. 481 689 051

E-mail: info@gali.cz



Vyrábí: Savyon Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel. +972.8.8562920

Fax. +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Použití

SeroMP™ IgM kit je kvalitativní ELISA diagnostikum pro stanovení specifických IgM protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae* v lidském séru.

Test umožňuje časnou diagnostiku probíhající infekce, stanovením IgM protilátek z jednoho vzorku séra pacienta.

Pro *In Vitro* diagnostické účely.

Úvod

M. pneumoniae je běžným případem populačně-získané pneumonie, počátek je často charakteristický bolestí hlavy, horečkou, nevolností, a typickým suchým kašlem.

M.pneumoniae je běžná ve všech věkových skupinách, nejběžnější je však u lidí v prvních dvou dekádách života, a zřídka se vyskytuje u dětí mladších 4 let. Bylo publikováno, že *M.pneumoniae* je příčinou více jak 30% všech případů pneumonií(2).

M.pneumoniae bývá také často spojována s nerespiračními onemocněními, jako je: meningitida, encefalitida, pankreatitida, senzorieurní ztráta sluchu, a akutní mozkový syndrom (5).

Vzhledem k častému výskytu, by bylo dobré mít na zřeteli *M.pneumoniae* ve všech případech pneumonie. Vzhledem

ke stejným symptomům u různých agens, se doporučuje používat jako diagnostické pomůcky serologické testy(3).

ELISA metoda je citlivá, specifická a umožňuje diferenciální diagnostiku specifických IgA, IgG a IgM protilátek(6).

Pokud jde o diagnózu a léčbu, nejnápadnějším strukturním znakem MP je nedostatečnost buněčné stěny. Ukázalo se, že otevřené nechráněné polypeptidy vyvolají imunogenitní odezvu, zvláště ty, které jsou spojené v připojené organely MP. Tato připojená organela je složená z komplexu polypeptidů, ve kterých má hlavní roli Cytadhesin Protein P1 (1,4,10). Vzhledem k jeho vysoké imunogenitě je P1 vhodný jako rozlišující antigen v základním serologickém diagnostickém systému, je důsledkem zlepšení různých parametrů chování testu. Běžný způsob jak zdokonalit chování testu užitím velmi imunogenitních polypeptidů jako je P1, je včleňování těchto polypeptidů do testu jako rekombinantních antigenů. Literatura uvádí, že některé polypeptidy jsou skutečně vhodné pro uvedené účely. (9).

Specifické protilátky proti *M. pneumoniae* ve třídě IgM stoupají brzo po nástupu onemocnění, maxima dosahují za 1 až 4 týdny, během 5 měsíců klesají pod detekovatelnou hladinu (7). Vzhledem k časnému nástupu protilátek, a k jejich poměrně krátkému výskytu, umožňuje detekce IgM protilátek, diagnostiku akutní infekce, užitím pouze jednoho séra pacienta. U mladých pacientů se nacházejí vyšší titry IgM než u dospělých (8). IgG protilátky stoupají pomaleji než IgM, ale zůstávají detekovatelné o mnoho déle. Významný vzestup hladiny protilátek u párových sér (odběr nejméně po 2 týdnech) může vypovídat o probíhající infekci nebo o reinfekci i v případě negativních IgM protilátek. Vysoké titry protilátek ve třídě IgA se vyskytují u postarších pacientů (7). Diagnostika ve třídě IgA se zdá být u dospělých, pro zjištění současné infekce, užitečnější(8).

Savyon® Diagnostics Ltd. vyvinul semi-kvantitativní kity využívající rekombinantní antigeny v IgG, IgA ELISA testech a kvalitativní test využívající směs rekombinantních a přírodních antigenů v ELISA testu, takto se měří změna hladiny protilátek ve třídě IgM.

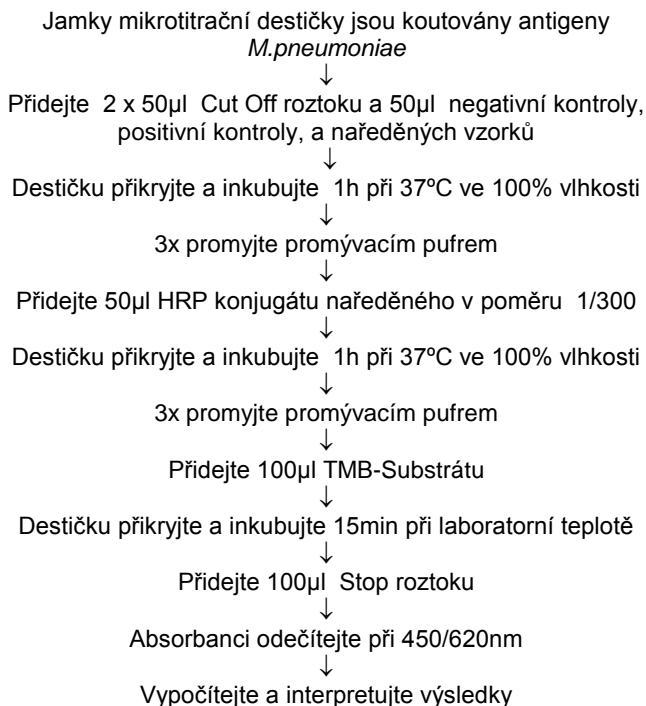
SeroMP™ Rekombinant IgG, IgA a IgM test umožňuje časnou a přesnou detekci specifických protilátek při infekci *M. pneumoniae*.

Princip stanovení

- SeroMP™ Rekombinant mikrotitrační destička je koutovaná čištěnou frakcí membránových proteinů a rekombinantními antigeny *M. pneumoniae*.
- Naředěné testované sérum, se inkubuje v jamkách mikrotitrační destičky. Specifická protilátka přítomná v séru pacienta se naváže na antigen navázaný na mikrodestičce.
- Nespecifické protilátky jsou odstraněny promytím.
- Dále se přidává anti-lidská IgM protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP). Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátka se naváže na protilátku a vytvoří komplex.
- Nenavázaný konjugát je odstraněn promytím.
- V dalším kroku je do jamek přidáván chromogenní substrát, který při pozitivní enzymatické reakci vytvoří modré zbarvení.

- Enzymatická reakce je ukončena stop roztokem (1M H₂SO₄). Modré zabarvení se změní na žluté. Absorbance se měří při 450/620 nm.
- Hodnota absorbance je proporcionálně úměrná hladině specifických protilátek navázaných na koutované antigeny.

Přehled kroků



Součásti kitu

Souprava na 96 stanovení

1. **Mikrotitrační destička koutovaná antigenem *M.pneumoniae*:** 96 odlamovatelných jamek (8x12) koutovaných antigeny *M.pneumoniae*, zabalené v hliníkové fólii se sušidlem. **1 destička**
2. **Koncentrovaný promývací pufr (20X):** PBS - Tween pufr. **1 lahvička, 100 ml v každé**
3. **UniDiluent (žlutý):** v pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku. **1 lahvička, 60 ml**
4. **IgM Roztok k ředění sér (oranžový):** Roztok pufru, v pracovní koncentraci, Anti-lidské IgG.(IgG/Rf Stripper) S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku. **2 lahvička, 60 ml**
5. **Positivní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum pozitivní na IgM. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.. **1 lahvička, 2.0 ml**
6. **Negativní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum negativní na IgM. S obsahem méně než 0.05%

proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.

1 lahvička, 2.0 ml

7. **Cut Off Control:** V pracovní koncentraci. Roztok specifických IgM protilátek proti *M.pneumoniae*, užívaný pro stanovení Cut Off hodnoty. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku. **1 lahvička, 2.5 ml**
8. **Koncentrovaný HRP konjugát (300x):** anti-lidské IgM (μ řetězec specifický). S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku. **1 lahvička, 0.2 ml**
9. **TMB substrát:** v pracovní koncentraci, obsahuje 3,3',5,5'- tetramethylbenzidin jako chromogen a peroxid jako substrát **1 lahvička, 14 ml**
10. **Stop roztok:** V pracovní koncentraci.. Obsahující 1M H₂SO₄. **1 lahvička, 15 ml**
11. **Fólie na přikrytí destiček:** **1**
12. **Návod k použití:** **1**

Potřebný materiál, nedodávaný v soupravě

1. Naprosto čisté zkumavky pro ředění séra pacienta
2. plastové zkumavky na jedno použití pro ředění HRP konjugátu
3. Vhodné mikropipety nebo multi-kanálové pipety (5-50, 50-200 a 200-1000 μl) a špičky
4. Jednolitrová volumetrická láhev
5. 50 ml volumetrický válec
6. Promývací nádoba
7. Filtrační papír
8. Vortexové míchadlo
9. Vodní lázeň s víčkem (37± 1°C) nebo mlžná komora umístěná v inkubátoru (37± 1°C)
10. Reader s filtrem 450/620nm pro měření mikrodestiček
11. Destilovaná nebo dvakrát deionizovaná voda pro ředění promývacího pufru (Wash Buffer)

Upozornění

Pouze pro in-vitro diagnostické použití!

- Tato souprava obsahuje lidská séra, která byla testována technikami podle FDA. Séra jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HCV a HIV, nicméně, jelikož žádná známá metoda nemůže zaručit s úplnou jistotou, že výrobky derivované z lidské krve nepřenášejí infekci, se všemi komponenty z lidské krve, obsaženými v této soupravě se musí zacházet jako s potencionálně infekčním sérem nebo krví, způsobem identickým (nebo podobným) s doporučením publikovaným v CDC/NIH manuálu „Biobezpečnost mikrobiologických a lékařských laboratořích“, 1988.
- Roztok chromogenního substrátu působí dráždivě na pokožku a mukózní membrány. Vyvarujte se přímého kontaktu.
- Všechny součásti kitu jsou kalibrovány na danou šarži. Kombinování součástí kitů různých šarží může ovlivnit výsledek stanovení.
- Kyselina sírová 1M, je pro oči a pokožku dráždivá. V případě kontaktu s oční sliznicí, vyplachujte oko proudem vody.

Uchovávání a trvanlivost reagensů

1. Všechny dodávané materiály je nutno skladovat při teplotě 2 až 8°C. Reagencie, uchovávané při teplotě 2 až 8°C, jsou stabilní do data expirace, vyznačeného na obalu soupravy. Expozice složek soupravy obyčejné teplotě po dobu několika hodin nezpůsobí zničení reagensů. **Reagencie nezmrazujte.**
2. Životnost kitu po otevření je 90 dní.
3. Nepoužité stripy se musí skladovat v hliníkové fólii společně se sušidlem.
4. V 20x koncentrovaném promývacím pufru se mohou během skladování tvořit krystalky. Toto je běžné. Krystalky rozpustíte zahřátím pufru na 37°C ještě před jeho ředěním. Naředěný pufr skladujte při 2-8°C a to po dobu maximálně 21 dní.

Odběr vzorků

Vzorky séra se odebírají asepticky standardními technikami. Tepelně inaktivovaná séra nemohou být použita. Nedoporučuje se použití lipemických, zakalených a kontaminovaných séra. Drobné částice a sraženiny v séru mohou způsobovat chybné výsledky. Tyto vzorky by měly být před stanovením vyčiřeny centrifugací nebo filtrací.

Skladování vzorků

Vzorky by se měly skladovat při teplotě 2-8°C pokud jsou testovány během 7 dní (doporučuje se přidávek 0,1% azidu sodného). Pro delší uchování je nutno alikvoty séra uchovávat při teplotě -20°C. Vyhněte se opakovanému mrazení a rozmrazování séra.

Pracovní postup - Ruční

Aplikační listy pro automatické zpracování jsou na vyžádání

A. Příprava reagensů.

1. Všechny testovací reagenty a vzorky před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte Cut Off kontrolu, negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky séra.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuty dvě jamky pro Cut Off kontrolu, jedna jamka pro negativní kontrolu a pozitivní kontrolu.
3. Vyjměte mikrodestičku z hliníkové fólie rozstřížením jednoho konce blízko sváru. Odeberte potřebné množství stripů (odpovídající množství testovaných vzorků) z 96 jamkového rámečku.
4. Zředte 1/20 koncentrovaný promývací pufr deionizovanou nebo destilovanou vodou. Pro příklad: pro přípravu 1 L promývacího pufru přidejte k 50ml koncentrovaného roztoku promývacího pufru 950ml dvakrát deionizované nebo destilované vody.

B. Inkubace vzorků séra a kontrol.

5. Naředte každý vzorek pacienta v poměru 1/105 následovně: přidejte 10 µl séra pacienta k 1040µl roztoku pro ředění séra.

Poznámka: IgM roztok k ředění séra obsahuje Anti-lidský IgG pro odstranění IgG protilátek ze séra.

6. Pipetujte 50µl negativní kontroly, pozitivní kontroly a Cut Off kontroly a séra naředěných v poměru 1/105 do příslušných jamek na stripu.
7. Přikryjte strip víčkem a dejte inkubovat na 1 hodinu do mlžné komory (37°C).
8. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek.
9. **Promývací krok:** naplňte každou jamku promývacím pufr (300-350µl) po okraj a poté tekutinu odstraňte. Postup opakujte 3x.
10. Osušte stripy a rámeček jemným poklepáním na absorpčním papíru.

C. Inkubace s konjugátem.

11. Koncentrovaný roztok HRP-konjugátu IgM zředte do pracovní koncentrace těsně před použitím v poměru 1/300 roztokem UniDiluent. Např. pro dva stripy připravte minimálně 3 ml zředěného HRP-konjugátu následovně: 10µl koncentrovaného roztoku HRP-konjugátu IgM a smíchejte s 3 ml roztoku UniDiluent.
12. Odpipetujte 50µl zředěného konjugátu do každé z jamek.
13. Přikryjte strip víčkem a inkubujte 1 hodinu při 37°C v mlžné komoře.
14. Odstraňte přebytečné tekutiny z jamek a proveďte promývací krok, jak je uvedeno v bodě 9-10.

D. Inkubování s TMB-substrátem.

15. Odpipetujte 100µl roztoku TMB-Substrátu do každé z jamek, přikryjte víčkem a inkubujte při laboratorní teplotě **15 min.**
16. Reakci ukončete přidáním 100µl roztoku Stop roztoku (1 M H₂SO₄) do každé z jamek.

E. Odečtení výsledků.

17. Proměřte absorbanci při 450/620 nm a výsledek запиšte. Odečtení může být provedeno do 30 min od zastavení chromogenní reakce.

Pozn.: Před odečtením nesmí jamka obsahovat žádné bublinky. Dno destičky musí být opatrně otřeno.

Validita testu

Test je validní, jestliže jsou splněna následující kritéria: Pokud nejsou splněny tyto podmínky, není test validní a musí být zopakován.

1. O.D. Positive Control ≥ 1.0
2. Poměr: O.D. Positive Control / O.D. Cut Off Control > 2
3. O.D. negative control < 0.3

Výpočet výsledků

1. Průměrná hodnota absorpce Cut Off roztoku ve zdvojeném běhu by měla být vypočítaná.
2. K normalizaci výsledků získaných různými testy, je Cut Off index (COI) vypočítán podle následujícího vzorce:

$$\text{COI} = \frac{\text{OD of the Serum Sample}}{\text{OD Average of Cut Off Control}} \times 10$$

Interpretace výsledků

| IgM COI | Výsledek | Diagnostická Interpretace |
|---------|--|--|
| < 10 | Negativní Nedetekovatelná hladina IgM protilátek | Neindikuje infekci <i>M. pneumoniae</i> |
| 10-11 | Hraniční | Přítomnost nebo absence prokazatelné hladiny specifických protilátek IgM <i>M. pneumoniae</i> nemůže být určena. Po 2-3 týdnech by se měl odebrat druhý vzorek, a testovat paralelně s prvním. Pokud je i druhý vzorek hraniční, vzorek se považuje za negativní. |
| >11 | Positivní Významná hladina IgM protilátek. | Indikuje probíhající <i>M. pneumoniae</i> Infekci |

Ke získání kompletního protilátkového profilu, by mělo být testováno IgA, IgM a IgG

Interpretace výsledků založených na detekci IgA, IgM a IgG protilátek.

| Hladina <i>M. pneumoniae</i> protilátek | | | |
|---|------------------|-----------|--|
| IgG | IgM | IgA | |
| Negativní | Negativní | Negativní | Neindikuje infekci <i>M. pneumoniae</i> |
| Negativní nebo Positivní | Positivní | Negativní | Indikuje probíhající <i>M. pneumoniae</i> Infekci |
| Positivní | Negativní | Negativní | Indikuje proběhlou infekci |
| Negativní nebo Positivní | Negativní | Positivní | Indikuje probíhající <i>M. pneumoniae</i> Infekci nebo re-infekci |

Zkřížená reaktivita

Hospitalizovaní pacienti, infikovaní respiračními patogeny: *Chlamydia pneumoniae* a *EBV*, diagnostika byla provedena komerčně dostupnými kity. Tyto pacienti byli testováni kitem SeroMP kit.

Většina sér byla shledána negativní, nebyla detekována žádná zkřížená reaktivita.

Přesnost

Intra-assay (uvnitř běhu)

| Vzorek | Počet opakování | Střední hodnota | CV% |
|-----------|-----------------|-----------------|------|
| Positivní | 10 | 2.164 | 4.7% |
| Negativní | 10 | 0.159 | 13% |

Inter assay (mezi běhy)

| Vzorek | Počet opakování | Střední hodnota | CV% |
|-----------|-----------------|-----------------|------|
| Positivní | 10 | 1.196 | 4.9% |
| Negativní | 10 | 0.252 | 7.3% |

Omezení testu

- Jednotlivé serologické testy nemohou být používány jako jediné kritérium pro stanovení diagnózy. Musí se brát v úvahu všechny klinické a laboratorní výsledky.
- Vzorky, které byly odebrány příliš brzo během primární infekce nemusí obsahovat detekovatelné množství protilátek. Pokud je podezření na mycoplasmovou infekci, měl by se během 2-4 týdnů odebrat další vzorek na analýzu. Ten by se měl testovat paralelně s prvním vzorkem.
- Používání lipemických, turbidních a kontaminovaných sér se nedoporučuje. Zakalení a precipitace v sérech může být příčinou špatných výsledků. Tyto vzorky by měly být před testováním vyčištěny centrifugací nebo filtrací.

Literatura

- Jacobs, E., A. Bennewitz, and W. Bredt, Reaction pattern of human anti-Mycoplasma pneumoniae antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays and immunoblotting, *J Clin Microbiol*, 23 (3), 517-22., 1986
- 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.
- 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.
- Macadam, S., and N. Cimolai, Anti-Mycoplasma pneumoniae secretory antibody in human breast milk, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43 (3), 247-250, 2002.

5. 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
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Tuuminen, T., and R. Vainionpaa, Development of enzyme immunoassays to detect salivary sIgA to Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae, *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 61 (5), 357-362, 2001.
10. Tuuminen, T., S. Varjo, H. Ingman, T. Weber, J. Oksi, and M. Viljanen, Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7 (5), 734-738, 2000.

CE



European Authorized Representative: Obelis s.a.
 Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels, Belgium
 Tel: +32.2.732.59.54 Fax: +32.2.732.60.03
 E-mail: mail@obelis.net

| | |
|--|---------------------------------|
| | Teplotní omezení |
| | Čtěte pozorně příbalový leták |
| | Pro In Vitro diagnostické účely |
| | Výrobce |
| | Autorizovaný Evropský zástupce |