



## SeroCP™ IgM

Ενζυμικός ανοσοπροσοφητικός προσδιορισμός (ELISA) για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων IgM έναντι των Χλαμυδίων της πνευμονίας (*Chlamydia pneumoniae*) σε ανθρώπινο ορό

### Φυλλάδιο οδηγιών

Διαγνωστικό σύνολο για 96 προσδιορισμούς (Αρ. καταλόγου A192-01M)

Διαγνωστικό σύνολο για 192 προσδιορισμούς (Αρ. καταλόγου B192-01M)

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](mailto:support@savyondiagnosics.com)

### Προοριζόμενη χρήση

Το διαγνωστικό σύνολο SeroCP™ IgM είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσοφητικός προσδιορισμός (ELISA) για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων IgM έναντι των Χλαμυδίων της πνευμονίας (*Chlamydia pneumoniae*) σε ανθρώπινο ορό. Η εξέταση επιτρέπει την πρώιμη διάγνωση τρέχουσας λοίμωξης σε δείγμα ορού με προσδιορισμό των IgM αντισωμάτων.

Για In Vitro διαγνωστική χρήση.

### Εισαγωγή

Τα Χλαμύδια της πνευμονίας (*Chlamydia pneumoniae*) (TWAR) είναι ένας μολυσματικός παράγοντας που εμφανίζεται με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, στις οποίες περιλαμβάνονται λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού (1). Οι λοιμώξεις από τα *C. pneumoniae* είναι στην πλειοψηφία τους ήπιες και ασυμπτωματικές, ενδέχεται όμως να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες, όπως φαρυγγίτιδα, παραρρινοκολπίτιδα, οξεία βρογχίτιδα και πνευμονία μεταδιδόμενη μέσω συγχρωτισμού. Η λοίμωξη, αν δεν ανιχνευθεί και δεν αντιμετωπιστεί θεραπευτικά, ενδέχεται να οδηγήσει σε παρατεταμένη ασθένεια

που δεν υποχωρεί. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν πιθανή συσχέτιση μεταξύ λοίμωξης από *C. pneumoniae* και χρόνιων ασθενειών (2).

Ο επιπολασμός των *C. pneumoniae* στον ορό είναι χαμηλός στα παιδιά, αυξάνεται απότομα στη μέση ηλικία και παραμένει υψηλός σε προχωρημένη ηλικία (>50%).

Οι δυσκολίες ως προς τη συλλογή των δειγμάτων και η αδυναμία πρόσβασης στο σημείο της μόλυνσης επηρεάζουν σοβαρά τη χρησιμότητα των μεθόδων άμεσης ανίχνευσης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται κατά κανόνα ο ορολογικός έλεγχος, που χρησιμεύει ως μη επεμβατικό εργαλείο για τον εντοπισμό τόσο περιφερικών όσο και χρόνιων λοιμώξεων από Χλαμύδια (3), σε περιπτώσεις όπου οι μέθοδοι άμεσης ανίχνευσης είναι σπανίως αποτελεσματικές (4). Επιπλέον, η παρουσία συγκεκριμένων τύπων αντισωμάτων ενδέχεται επίσης να υποδηλώνει τη φάση της νόσου.

Η πρωτογενής λοίμωξη από τα Χλαμύδια χαρακτηρίζεται από μια κύρια απόκριση των IgM εντός 2 έως 4 εβδομάδων και από μια καθυστερημένη απόκριση των IgG και IgA εντός 6 έως 8 εβδομάδων. Μετά από οξεία λοίμωξη από *C. pneumoniae*, τα αντισώματα IgM συνήθως χάνονται εντός 2 έως 6 μηνών (5), οι τίτλοι των αντισωμάτων IgG συνήθως μειώνονται αργά, ενώ τα αντισώματα IgA έχουν την τάση να εξαφανίζονται γρήγορα (6). Όταν υπάρχει υποψία για πρωτογενή λοίμωξη από Χλαμύδια, η ανίχνευση των IgM έχει ιδιαίτερη διαγνωστική σημασία (7). Ωστόσο, σε υποτροπιάζουσες ή χρόνιες λοιμώξεις, ο επιπολασμός των IgM είναι χαμηλός και επομένως η απουσία IgM δεν αποκλείει απαραίτητα τρέχουσα λοίμωξη.

Σε επαναλοίμωξη, τα επίπεδα των IgG και IgA αυξάνονται ταχέως, συχνά εντός μίας ή δύο εβδομάδων (8).

Τα αντισώματα IgA έχουν αποδειχθεί ένας αξιόπιστος ανοσολογικός δείκτης πρωτογενών, χρόνιων και υποτροπιάζουσών λοιμώξεων. Τα αντισώματα αυτά συνήθως μειώνονται ταχέως φθάνοντας στα βασικά επίπεδα μετά από θεραπεία και εκρίζωση των λοιμώξεων από Χλαμύδια (3). Η επίμονη παρουσία αυξημένων τίτλων αντισωμάτων IgA θεωρείται γενικά ως ένδειξη χρόνιας λοίμωξης (6).

Τα αντισώματα IgG παραμένουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα και μειώνονται πολύ αργά. Επομένως, η παρουσία αντισωμάτων IgG είναι κυρίως ενδεικτική λοίμωξης από Χλαμύδια σε μη καθορισμένο χρόνο. Ωστόσο, τετραπλάσια αύξηση της IgG ή υψηλά επίπεδα αντισωμάτων IgG ενδέχεται να υποδηλώνουν τρέχουσα χρόνια λοίμωξη.

Ο προσδιορισμός SeroCP™ είναι ένας προσδιορισμός που βασίζεται στη μέθοδο ELISA στον οποίο χρησιμοποιούνται κεκαθαρμένα στοιχειώδη σωματίδια των *C. pneumoniae* (TWAR-183) ως αντιγόνα για την ανίχνευση της απόκρισης αντισωμάτων στους ανθρώπους. Για πλήρη διάγνωση τρέχουσας, χρόνιας ή παρελθούσας λοίμωξης, συνιστάται ο προσδιορισμός αντισωμάτων IgG, IgM και IgA έναντι των *C. pneumoniae*.

## Αρχή της εξέτασης

- Οι πλάκες μικροτιτλοδότησης SeroCP™ παρέχονται επιστρωμένες με κεκαθαρμένα στοιχειώδη σωμάτια των *C.pneumoniae* (TWAR - 183), ως αντιγόνα.
- Ο ορός προς εξέταση αραιώνεται και επωάζεται στην πλάκα μικροτιτλοδότησης SeroCP™ επί 1 ώρα στους 37° C. Κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος αντισώματα έναντι των *C.pneumoniae* δεσμεύονται στα ακινητοποιημένα αντιγόνα.
- Τα μη ειδικά αντισώματα αφαιρούνται με έκπλυση.
- Αντι-ανθρώπινη IgM συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP) προστίθεται και επωάζεται επί 1 ώρα στους 37° C. Κατά τη διάρκεια του βήματος αυτού, 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

Προσθέστε 2x50 μl αρνητικού ορού ελέγχου, 1x50 μl θετικού ορού ελέγχου και τα δείγματα αραιωμένα στα βυθίσματα της πλάκας μικροτιτλοδότησης που είναι επιστρωμένα με αντιγόνα των *C. pneumoniae*

↓  
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 nm

↓  
Υπολογίστε και ερμηνεύστε τα αποτελέσματα

## Περιεχόμενα του διαγνωστικού συνόλου

### Διαγνωστικό σύνολο για 96 προσδιορισμούς

#### Αρ. καταλόγου A192-01M

1. **Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρωμένη με αντιγόνο των *C.pneumoniae*:** 96 αποσπώμενα βυθίσματα (8x12) επιστρωμένα με αντιγόνα των *C.pneumoniae*, σε συσκευασία από αλουμίνιο που περιέχει ξηραντικό.  
**1 πλάκα**
2. **Συμπυκνωμένο πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (20X):** Ρυθμιστικό διάλυμα PBS - Tween.  
**1 φιάλη, 100 ml**
3. **Αραιωτικό ορού IgM (ερυθρό):** Αντιανθρώπινη IgG σε ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.  
**1 φιάλη, 60 ml**
4. **Αραιωτικό αντιδραστήριο σύζευξης (πράσινο):** Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.  
**1 φιάλη, 40 ml**
5. **Αρνητικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός αρνητικός για αντισώματα IgM έναντι των *C.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.  
**1 φιαλίδιο, 2,5 ml**
6. **Θετικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός θετικός για αντισώματα IgM έναντι των *C.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.  
**1 φιαλίδιο, 2ml**
7. **Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο σύζευξης, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgG (ειδική για τη γάμμα αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.  
**1 φιαλίδιο, 0,2 ml**
8. **Υπόστρωμα TMB:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 3, 3', 5, 5' - τετραμεθυλοβενζιδίνη ως χρωμογόνο και υπεροξειδίο ως υπόστρωμα.  
**1 φιάλη, 14 ml**
9. **Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
**1 φιάλη, 15 ml**
10. **Κάλυμμα πλάκας:** **1 τεμάχιο**
11. **Φυλλάδιο οδηγιών:** **1**

### Διαγνωστικό σύνολο για 192 προσδιορισμούς

#### Αρ. καταλόγου B192-01M

1. **Πλάκα μικροτιτλοδότησης επιστρωμένη με αντιγόνο των *C. pneumoniae*:** 96 αποσπώμενα βυθίσματα (8x12) επιστρωμένα με αντιγόνα των *C.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 (ερυθρό):** Αμτιανθρώπινη IgG σε ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.  
**2 φιάλες, 60 ml εκάστη**
4. **Αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης (πράσινο):** Ρυθμιστικό διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.  
**1 φιάλη, 80 ml**
5. **Αρνητικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός αρνητικός για αντισώματα IgM έναντι των *C.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.  
**1 φιαλίδιο, 2,4 ml**
6. **Θετικός ορός ελέγχου:** Ανθρώπινος ορός, θετικός για αντισώματα IgM έναντι των *C.pneumoniae*, έτοιμος για χρήση. Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη και λιγότερο από 0,1% αζίδιο του νατρίου, ως συντηρητικά.  
**1 φιαλίδιο, 1,25 ml**
7. **Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο σύζευξης, συζευγμένο με HRP (300X):** Αντι-ανθρώπινη IgG (ειδική για τη γάμμα αλυσίδα) συζευγμένη με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Περιέχει λιγότερο από 0,05% προκλίνη, ως συντηρητικό.  
**1 φιαλίδιο, 0,2 ml**
8. **Υπόστρωμα TMB:** Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 3, 3', 5, 5' - τετραμεθυλοβενζιδίνη ως χρωμογόνο και υπεροξειδίο ως υπόστρωμα.  
**1 φιάλη, 24 ml**
9. **Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης:**  
Διάλυμα έτοιμο για χρήση. Περιέχει 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
**1 φιάλη, 30 ml**
10. **Κάλυμμα πλάκας:** **2 τεμάχια**
11. **Φυλλάδιο οδηγιών:** **1**

#### Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

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

#### Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

##### Για In Vitro διαγνωστική χρήση

1. 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 HBsAg 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 εγχειρίδιο του CDC/NIH υπό τον τίτλο "Βιολογική ασφάλεια σε Μικροβιολογικά και Βιοϊατρικά Εργαστήρια" (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 1988.
2. Το διάλυμα του υποστρώματος TMB είναι υλικό που ερεθίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους. Αποφύγετε την άμεση επαφή.
3. 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.
4. Το αραιωμένο θειικό οξύ (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 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

1. 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 πωματισμένων ή σφραγισμένων συστατικών του διαγνωστικού συνόλου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί λίγες ώρες δεν θα προκαλέσει βλάβη στα αντιδραστήρια. **MHN ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ!**
2. Μόλις ανοιχθεί το διαγνωστικό σύνολο, η διάρκεια ζωής του είναι 90 ημέρες.
3. Οι μη χρησιμοποιημένες σειρές μικροπιπλοδότησης 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.
4. 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 συνήθεις 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 δειγμάτων

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

1. Φέρετε όλα τα συστατικά και τα προς εξέταση κλινικά δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμείξτε καλά το θετικό ορό ελέγχου, τον αρνητικό ορό ελέγχου και τα κλινικά δείγματα πριν από τη χρήση.
2. Καθορίστε το συνολικό αριθμό των προς εξέταση δειγμάτων. Εκτός από τα δείγματα, σε κάθε εξέταση πρέπει να περιλαμβάνονται τα εξής: δύο βύθισμα με αρνητικό ορό ελέγχου και ένα βύθισμα με θετικό ορό ελέγχου.
3. 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 βύθισμάτων.
4. 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.

### B. Επώαση των δειγμάτων ορών και των ορών ελέγχου

5. **Αραίωση σε ένα βήμα:** Αραιώστε κάθε ορό ασθενούς σε αναλογία 1/105 με το παρεχόμενο αραιωτικό ορού ως εξής: Προσθέστε 5 μl από τον ορό του ασθενούς σε 520 μl αραιωτικού ορού.  
**Αραίωση σε δύο βήματα:** 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 αντιανθρώπινη IgG, για την απομάκρυνση των IgG αντισωμάτων από τον ανθρώπινο ορό.

6. Διανείμετε 50μl από το θετικό ορό ελέγχου, τον αρνητικό ορό ελέγχου και τους αραιωμένους σε αναλογία 1/105 ορούς σε ξεχωριστά βύθισμα της σειράς μικροπιλοδότησης. **Ο αρνητικός ορός ελέγχου θα πρέπει να διανεμηθεί με πιπέτα σε δύο ξεχωριστά βύθισμα.**
7. Καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επώαστε επί 1 ώρα σε 37° C μέσα σε υγραντικό θάλαμο.
8. Απορρίψτε το υγρό περιεχόμενο των βύθισμάτων.
9. **Βήμα έκπλυσης:** Γεμίστε κάθε βύθισμα με πλυστικό ρυθμιστικό διάλυμα (300-350 μl) μέχρι το στόμιο του βύθισματος 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 αντιανθρώπινης IgM συζευγμένο με HRP πρέπει να αραιώνεται σε διάλυμα εργασίας ακριβώς πριν από τη χρήση. Αραιώστε το συμπυκνωμένο, συζευγμένο με HRP, αντιδραστήριο αντιανθρώπινης IgM σε αναλογία 1/300 με το αραιωτικό αντιδραστηρίου σύζευξης. Για παράδειγμα, για δύο σειρές ετοιμάστε τουλάχιστον 3 ml από το αραιωμένο, συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο σύζευξης (10 μl από το συμπυκνωμένο, συζευγμένο με HRP αντιδραστήριο αντιανθρώπινης IgM αναμειγνύεται 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 επώαστε 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 100μl από το υπόστρωμα TMB σε κάθε βύθισμα, καλύψτε τις σειρές μικροπιλοδότησης με ένα κάλυμμα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου επί **15 λεπτά**.
16. Τερματίστε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl από το διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) σε κάθε βύθισμα.

### Ε. Προσδιορισμός των αποτελεσμάτων

17. Προσδιορίστε την απορρόφηση στα 450 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.

## 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.

1. **Θετικός ορός ελέγχου:** Η τιμή απορρόφησης θα πρέπει να είναι:  $\geq 0,8$  στα 450 nm.
2. **Αρνητικός ορός ελέγχου:** Η μέση τιμή απορρόφησης του αρνητικού ορού ελέγχου (NC) θα πρέπει να είναι:  $0,1 < NC \leq 0,4$  στα 450 nm.

## Υπολογισμός της οριακής (Cut-Off) τιμής (COV) και του δείκτη οριακής (Cut-Off) τιμής (COI)

Η οριακή τιμή υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$COV = NC \times 2$$

**NC** = Η μέση απορρόφηση στα 450 nm του αρνητικού ορού ελέγχου που εξετάστηκε εις διπλούν.

Προκειμένου να κανονικοποιηθούν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από διαφορετικές εξετάσεις, ο δείκτης οριακής τιμής υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$COI = \frac{\text{Απορρόφηση δείγματος ορού στα 450 nm}}{COV}$$

## Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Απορρόφηση (450 nm)	COI	Αποτελέσματα	Διαγνωστική ερμηνεία
$O.D < 1,4 \times COV$	$< 1.4$	Αρνητικό Δεν είναι ανιχνεύσιμα αντισώματα IgM	Καμία ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης από τα <i>C.pneumoniae</i>
$1,4 \times COV \leq O.D \leq 1,5 \times COV$	$1,4-1.5$	Οριακό Χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων IgM	Ένδειξη πιθανής έκθεσης στα <i>C.pneumoniae</i> . Απαιτείται εξέταση δεύτερου δείγματος μετά από 2-4 εβδομάδες <sup>1</sup>
$O.D > 1,5 \times COV$	$> 1.5$	Θετικό Σχετικά επίπεδα αντισωμάτων IgM	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης από τα <i>C.pneumoniae</i>

1. Όταν πρόκειται να εξεταστεί δεύτερο δείγμα, θα πρέπει να εξετάζονται ταυτόχρονα τόσο το πρώτο όσο και το δεύτερο δείγμα. Αν επαναληφθεί το οριακό αποτέλεσμα, το δείγμα θα πρέπει να θεωρηθεί αρνητικό.

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

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

Επίπεδα των αντισωμάτων έναντι των <i>C. pneumoniae</i>			Ερμηνεία των αποτελεσμάτων
IgM	IgG	IgA	
Αρνητικό	Αρνητικό	Αρνητικό	Καμία ένδειξη λοίμωξης από <i>C. pneumoniae</i>
Θετικό	Αρνητικό ή θετικό	Αρνητικό ή θετικό	Ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης
Αρνητικό	Θετικό	Αρνητικό	Ένδειξη παρελθούσας ή τρέχουσας λοίμωξης
Αρνητικό	Αρνητικό	Ένδειξη παρελθούσας ή τρέχουσας λοίμωξης	Αρνητικό

## Περιορισμοί της εξέτασης

1. 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.
2. Δείγματα που λαμβάνονται σε πολύ αρχικό στάδιο πρωτογενούς λοίμωξης ενδέχεται να μην περιέχουν ανιχνεύσιμα αντισώματα. Αν υπάρχει υποψία για λοίμωξη από *Chlamydia*, πρέπει να ληφθεί δεύτερο δείγμα 2-4 εβδομάδες αργότερα και να εξετασθεί παράλληλα με το αρχικό δείγμα.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

### Σύγκριση του προσδιορισμού SeroCP™ IgM με τον προσδιορισμό Chlamydia IgM SeroFIA του Οίκου SAVYON.

Ο προσδιορισμός SeroCP™ IgM αξιολογήθηκε ως προς τον προσδιορισμό Chlamydia IgM SeroFIA του Οίκου SAVYON (αρ. καταλόγου 512-01). Η μελέτη εκπονήθηκε σε δύο ιατρικά κέντρα χρησιμοποιώντας 113 δείγματα ορών από συμπτωματικούς (33) ασθενείς και δείγματα ορών από υγιή παιδιά (80).

	SeroFIA	Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
SeroCP™				
Θετικό		30	4	34
Αρνητικό		3	76	79
Σύνολο		33	80	113

Ευαισθησία:  $30/33 \times 100 = 91\%$

Ειδικότητα:  $76/80 \times 100 = 95\%$

Ολική συμφωνία:  $106/113 \times 100 = 94\%$

## Ακρίβεια

Εντός του ίδιου προσδιορισμού (στην ίδια εκτέλεση)

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση τιμή	Σ.Δ. %
Θετικό	10	1,469	2,3
Αρνητικό	10	0,236	4,7

Μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (σε διαφορετικές εκτελέσεις)

Δείγμα	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση τιμή	Σ.Δ. %
Θετικό	10	0,605	5,4
Αρνητικό	10	0,163	6,0

## Bibliography

1. Kuo, C.C., Jackson L.A. and Grayston, J.T. (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) Clin Microbiol REV; 8:451-461.
2. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Manninen, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki heart study. Ann. Intern. Med. 116: 273-278.
3. Puolakkainen, M., Saikku, P., Leinonen, M., Nurminen, M., Vaananen, P. and Makela, P.H. (1984). *Chlamydia pneumoniae* and its serodiagnosis in infants. J. Infect. Dis. 149: 598-604.
4. Campbell, L.A. (1993). PCR detection of *Chlamydia pneumoniae* In Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J., Eds). ASM Press. pp. 247-252
5. Henry-Suchet, J., Askienazy-Elbhar, M., Thibon, M., Revol, C. and Akue, B.A. (1994). Post-therapeutic evolution of serum *chlamydia* antibody titers in women with acute salpingitis and tubal infertility. Fertility and Sterility. 62: No. 3.
6. Saikku, P., Matila, K., Nieminen, M.S., Huttunen, J.K., Leinon, M., Eckman, M.R., Makela, P.H. and Valtonen, V. (1988). Serological Evidence of an Association of a Novel *Chlamydia* TWAR with Chronic Coronary Heart Disease and Acute Myocardial Infarction. Lancet. 2: 983-986.

7. Grayston, J.T., Cambell, L.A., Mordhorst, C.H., Saikku, P., Thom, D. and Wang, S.P. (1989). A New Respiratory Pathogen: *Chlamydia pneumoniae* Strain TWAR. J. Inf. Dis. 161: 618-625.
8. Saikku, P., Leinonen, M., Tenkanen, L., Linnanmaki, E., Ekman, M.R., Mannin, V., Manttari, M., Frick, M.H. and Huttunen, J.K. (1992). Chronic *Chlamydia pneumoniae* Infections as a Risk Factor for Coronary Heart Disease in the Helsinki Heart Study. Ann. of Int. Med. 116: 273-278.



Obelis s.a. (Εξουσιοδοτημένο κέντρο αντιπροσώπευσης για την Ευρώπη)  
Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels  
Τηλ.: +32.2.732.59.54 Φαξ: +32.2.732.60.03  
E-mail: [mail@obelis.net](mailto:mail@obelis.net) Mobile: +32.475.45.46.60