

SeroMP™ Recombinant IgG

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

Savyon Diagnostics Ltd.

Testovací souprava pro 96 stanovení.
(Katalogové č.1261-01)

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 7761003
ISRAEL
Tel. +972.8.8562920
Fax. +972.8.8523176
E-mail: support@savyondiagnosics.com

Použití

SeroMP™ IgG kit je semi-kvantitativní ELISA diagnostikum pro stanovení specifických IgG protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae* v lidském séru.

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, sensorineurální 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 strukturálním znakem MP je nedostatečnost buněčné stěny. Ukázalo se, že otevřené nechráněné polypeptidy vyvolají imunogení 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 imunogenicitě 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 imunogenních 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 schopné měřit změnu hladiny protilátek ve třídě IgM.

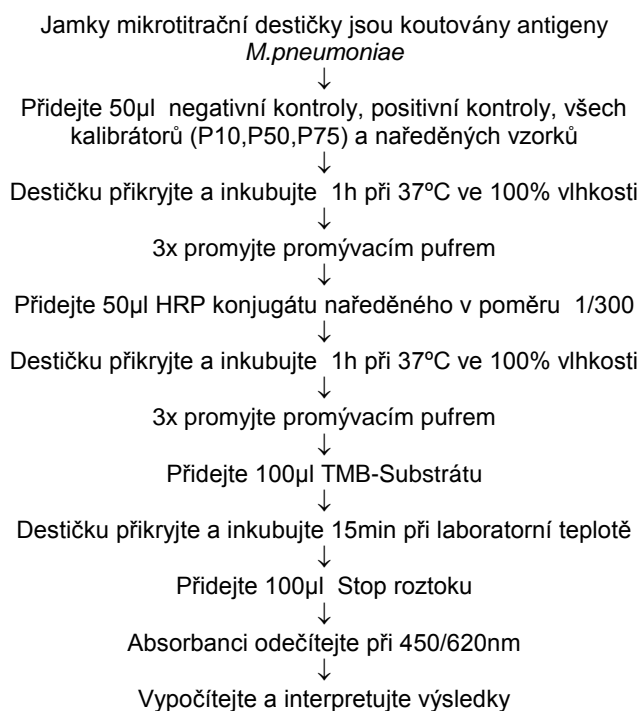
SeroMP™ Rekombinant IgG, IgA a IgM test umožňuje časnou a přesnou detekci specifických protilátek proti infekci *M. pneumoniae*.

Princip stanovení

- SeroMP™ Recombinant mikrotitrační destička je koutovaná 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 IgG protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP). Jestliže v prvním kroku vznikl komplex antigen-protilátka, HRP značená protilátka se naváže na protilátka 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 zbarvení 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
3. **UniDiluent™ (žlutý):** V pracovní koncentraci. S obsahem méně než 0.05% proclinu v jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 60 ml
4. **Positivní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum pozitivní na IgG. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku..
1 lahvička, 2.0 ml
5. **Negativní kontrola:** V pracovní koncentraci. Lidské sérum negativní na IgG. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2.0 ml
6. **P10 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 10 BU/ml (arbitrary binding units) specifických IgG protilátek proti *M.pneumoniae*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2.0 ml

7. **P50 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 50 BU/ml (arbitrary binding units) specifických IgG protilátek proti *M.pneumoniae*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2.0 ml
8. **P75 kalibrátor:** V pracovní koncentraci. Koncentrace 100 BU/ml (arbitrary binding units) specifických IgG protilátek proti *M.pneumoniae*. S obsahem méně než 0.05% proclinu a méně než 0,1% azidu sodného jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 2.0 ml
9. **Koncentrovaný HRP konjugát (300x):** anti-lidské IgG (γ řetězec specifický). S obsahem méně než 0.05% proclinu jako konzervačního prostředku.
1 lahvička, 0.2 ml
10. **TMB substrát:** v pracovní koncentraci, obsahuje 3,3',5,5' - tetramethylbenzidin jako chromogen a peroxid jako substrát
1 lahvička, 14 ml
11. **Stop roztok:** V pracovní koncentraci. Obsahující 1M H₂SO₄.
1 lahvička, 15 ml
12. **Fólie na přikrytí destiček:** **1**
13. **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.

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 nepřenáší 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 rozpusťte 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 přídavek 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 reagencie a vzorky před použitím vytemperujte na laboratorní teplotu. Před použitím dobře promíchejte kalibrátory (P10, P50, P75) negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a testované vzorky séra.
2. Určete celkové množství jamek potřebných na testování. Kromě vzorků pacienta musí být v každém měření zahrnuta jedna pro negativní kontrolu, pozitivní kontrolu a tři jamky pro kalibrátory (P10, P50, P75).
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 dodávaným roztokem k ředění séra, následovně: přidejte 10μl séra pacienta k 200μl roztoku pro ředění séra (1/21). A následně přidejte 25μl takto získaného roztoku 1/21 ke 100μl roztoku k ředění séra.
6. Pipetujte 50μl negativní kontroly, pozitivní kontroly, tři kalibrátory (P10, P50, P75) 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 pufrům (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 IgG 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 IgG 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 žádná 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.P75 > **0.9**
2. Poměr: O.D._{P10} / O.D._{NC} > **1.5**
3. Poměr: O.D._{P50} / O.D._{NC} > **4**
4. Poměr: O.D._{P75} / O.D._{NC} > **5**
5. PC by měl být ≥ 40 BU/ml

Výpočet výsledků

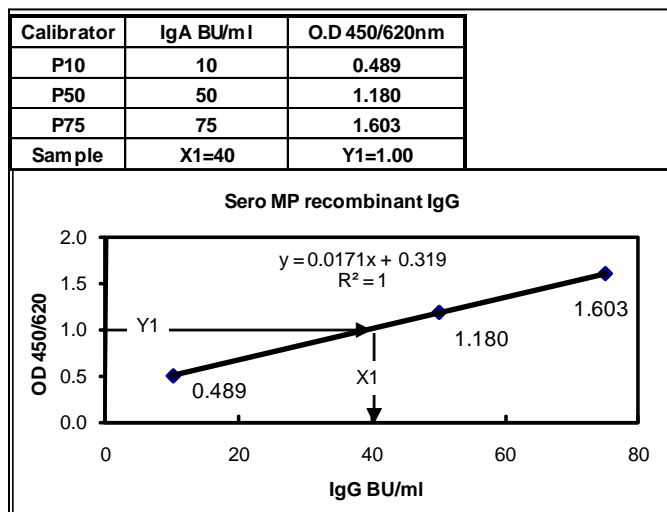
Manuální metoda, kde se používá milimetrový papír:

1. Vyneste hodnoty absorbance (OD) všech tří kalibračních standardů (P10, P50 a P75) na osu y proti jejich koncentracím v jednotkách BU/ml na ose x.
2. Vzniklémi body vhodně proložte základní lineární křivku.
3. Použitím standardní křivky odečítejte hodnoty testovaných vzorků (v jednotkách BU/ml) z naměřených absorbancí jednotlivých testovaných vzorků pacientů (viz př.1).

Příklad 1. Interpolace výsledků:

Na osu Y vyneste hodnoty absorbance vzorku (Y1) a nakreslete horizontální čáru ke kalibrační křivce.

Z daného bodu vedte vertikální čáru k ose X. Odečtěte koncentraci vzorku v BU/ml.



Interpretace výsledků

IgG BU/ml	Výsledek	Diagnostická Interpretace
< 10 BU/ml	Negativní Nedetekovatelná hladina IgG protilátek	Neindikuje infekci <i>M. pneumoniae</i>
≥10BU/ml	Positivní Významná hladina IgG protilátek.	Indikuje probíhající nebo nedávné <i>M. pneumoniae</i> Infekci¹

¹ K rozlišení mezi proběhlou a probíhající infekcí se doporučuje odebrat druhý vzorek za 2-4 týdny. Pokud se hodnota druhého vzorku v BU/ml významně zvýší jedná se o probíhající 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 nebo Positivní	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 detekovaná žádná zkřížená reaktivita.

Přesnost

Inter-assay (uvnitř běhu)

Vzorek	Počet opakování	Střední hodnota	CV%
Positivní	10	1.516	4,2%
Negativní	10	0.180	9,9%

Inter assay (mezi běhy)

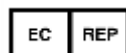
Vzorek	Počet opakování	Střední hodnota	CV%
Positivní	10	0.978	4,1%
Negativní	10	0.202	6,5%

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.
- 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

1. 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
2. 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.
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. 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. Epidermol.* 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.



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