

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG/IgM ELISA
(M. pneumoniae IgG/IgM ELISA)**

Referencia: EC114.00

M. pneumoniae IgA-Set

Referencia: EC114.08

Código de color: azul oscuro

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Índice

1. Finalidad de la prueba	3
2. Principio de la prueba	3
3. Contenido	3
3.1 Kit de ensayo IgG/IgM.....	3
3.2 Juego de reactivos IgA.....	3
4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar	3
5. Medidas de precaución y advertencias	4
6. Material adicional necesario (no suministrado)	4
7. Realización de la prueba	4
7.1 Material de muestra	4
7.2 Preparación de los reactivos	5
7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH.....	5
7.4 Empleo de procesadores ELISA	5
8. Valoración del ensayo	6
8.1 Control del funcionamiento del ensayo.....	6
8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE).....	6
8.3 Valoración de los resultados	6
8.4 Esquema de interpretación	7
8.5 Limitaciones del ensayo.....	7
9. Literatura.....	8
10. Esquema de la realización de la prueba.....	9

1. Finalidad de la prueba

El *Mycoplasma pneumoniae* ELISA sirve para la detección semicuantitativa y cualitativa de anticuerpos IgG, IgM e IgA en el suero humano. La detección de anticuerpos IgG está ajustada de tal forma que pone de manifiesto sobre todo infecciones recientes.

2. Principio de la prueba

El anticuerpo buscado en el suero humano forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

3. Contenido

3.1 Kit de ensayo IgG/IgM

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno, liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x) 50 ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgG, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control cut-off para IgG, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgG, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Control negativo para IgM, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
8. **Control cut-off para IgM, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
9. **Control positivo para IgM, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
10. **Conjugado IgG (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
11. **Conjugado IgM (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con FCS y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
12. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',5,5')**, 11ml, lista para utilizar
13. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

3.2 Juego de reactivos IgA

1. **Control negativo para IgA, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
2. **Control cut-off para IgA, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
3. **Control positivo para IgA, 1300µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
4. **Conjugado IgA 2 (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con FCS y conservante en tampón Tris, listo para utilizar

4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
2. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
3. Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

Material	Estado	Almacenamiento	Durabilidad
Muestras de análisis	diluidas	de +2 hasta +8°C	máx. 6h
	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Placa de microtitulación	tras la apertura	de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante)	3 meses
Absorbente del factor reumatoide	sin diluir, tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	1 semana
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Tetrametilbencidina (TMB)	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de parada	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +25°C	4 semanas

5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, controles, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Pipeta multicanal 50µl, 100µl
3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensayo
5. Servilletas de celulosa
6. Cubierta para placas ELISA
7. Recipientes para residuos infecciosos
8. Aparato de lavado manual para ELISA o aparato de lavado automático para placas de microtitulación
9. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
10. Estufa de incubación

7. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

7.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítense una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

7.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. Los controles listos para utilizar (control positivo, control de nivel de corte, control negativo) son específicos para cada parámetro y deben emplearse exclusivamente con el lote de placas indicado en el certificado de control de calidad.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.
4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).
5. Los niveles elevados de IgG o los factores reumáticos pueden interferir en la determinación de anticuerpos IgM y provocar falsos positivos o falsos negativos. **Tratar previamente los sueros con RF-SorboTech** (agente de adsorción VIROTECH). En el caso de los controles IgM no es necesaria la adsorción previa.

7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

1. Para cada prueba, pipetee 100µl del tampón de dilución listo para utilizar (valor cero), del control negativo, del control cut-off y del control positivo para IgG, IgM y IgA, así como de los sueros de paciente diluidos. Recomendamos ensayar duplicados en cada caso (valor cero, controles y sueros de paciente); en el caso del control cut-off, la preparación de duplicados imprescindible. Dilución de trabajo de los sueros de paciente: 1+100; p.ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.
3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

7.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.
3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

8. Valoración del ensayo

Los controles listos para utilizar sirven para una determinación semicuantitativa de los anticuerpos específicos IgG e IgM, cuya concentración se indica en unidades VIROTECH (VE). Las fluctuaciones debidas a la realización de la prueba se compensan con el método de cálculo, con lo que se alcanza una elevada reproducibilidad. Para el cálculo del valor VE se emplean los valores medios de las densidades ópticas.

8.1 Control del funcionamiento del ensayo

a) Valores de densidad óptica

El valor de densidad óptica correspondiente al valor cero debe ser inferior a 0,15.

Los valores de densidad óptica (DO) de los controles negativos deben estar por debajo de los valores de DO indicados en el certificado de control de calidad, mientras que los valores de DO de los controles positivos y del cut -off deben estar por encima de los valores de DO indicados en el certificado.

b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles cut-off se definen como 10 VE. Los VE calculados para los controles positivos deben estar dentro de los intervalos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen estas exigencias (valores de DO, VE), debe repetirse la prueba.

8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE)

La absorbancia correspondiente al valor cero (450/620 nm) debe restarse de todos los valores de absorbancia.

$$VE_{\text{(control positivo)}} = \frac{DO_{\text{(control positivo)}}}{DO_{\text{(control de nivel de corte)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(suero del paciente)}} = \frac{DO_{\text{(suero del paciente)}}}{DO_{\text{(cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Valoración de los resultados

a) Para IgM e IgA en todos los pacientes, para IgG en pacientes mayores de 14 años

Resultado (VE) (IgG > 14 años, IgM e IgA)	Valoración
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	zona dudosa
> 11,0	positivo

b) Para IgG en niños (0-14 años) si son IgM y/o IgA positivos

En niños de hasta 14 años, el rango límite (cut off) en IgG se puede desplazar hacia abajo debido a que el análisis ELISA de VIROTECH en IgG está ajustado de tal forma que principalmente se detectan infecciones agudas. No obstante, el requisito para la aplicación de este esquema es que el suero proporcione un resultado positivo de IgM y/o IgA.

Resultado (VE) (IgG 0-14 años)	Evaluación
< 7,0	negativo
7,0 - 8,0	límite
> 8,0	positivo

1. Si las VE calculadas para la muestra están por encima de la zona dudosa, la muestra se considera positiva.
2. Para la determinación segura de una infección es necesario determinar el nivel de anticuerpos de dos muestras de suero: Una muestra debe tomarse inmediatamente tras el comienzo de la infección, y otra 5-10 días después (suero de convalecencia). La concentración de anticuerpos de ambas muestras debe determinarse en paralelo, es decir, en una misma prueba. No es posible un diagnóstico correcto a partir de la valoración de una única muestra de suero. La

máxima sensibilidad se alcanza si se analizan las 3 clases de anticuerpos IgG, IgM e IgA, ya que hay que tener en cuenta que algunas personas no desarrollan IgM.

- Si los valores medidos se encuentran por debajo de la zona dudosa, la muestra no contiene anticuerpos detectables específicos para el antígeno en cuestión. La muestra se considera negativa.

8.4 Esquema de interpretación

IgG	IgA	IgM	Interpretación
-	-	-	Ausencia de contacto con <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , o descenso del nivel de anticuerpos por debajo del nivel de corte
-	+	+	Fase muy temprana de una infección aguda o reinfección
-	+	-	Fase muy temprana de una infección aguda; primera infección o reinfección sin IgM, o bien aparecerán posteriormente niveles positivos de IgM
+	+	+	Infección aguda, generalmente primera infección en fase tardía, IgG e IgM ya desarrollados, IgA aún no descendido
+	-	+	Infección aguda, generalmente primera infección en fase tardía, IgG e IgM ya desarrollados, IgA ya descendido
+	+	-	Reinfección, fase muy tardía, aún existe IgA, ya no existe IgM, o reactivación o infección sin formación de IgM.
+	-	-	Reinfección, fase muy tardía, IgA ya ha descendido o ni siquiera se ha formado (sucede en algunos adultos), o reactivación o infección sin formación de IgM, o nivel de IgG persistente después de haber pasado la infección.
-	-	+	Infección temprana aguda, IgA aún está ausente o ya ha descendido, nivel de IgG aún demasiado bajo.

Nota importante: No se pueden excluir totalmente resultados IgA o IgM positivos falsos aislados. Como confirmación se recomienda realizar una comprobación del título IgG en entre cinco y diez días o una comprobación mediante Immunoblot (LINE).

8.5 Limitaciones del ensayo

- La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.
- A pesar de la anamnesis y el examen clínico, incluido el análisis de laboratorio estándar y el control radiográfico, es difícil diferenciar una infección con *Mycoplasma* de otras infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores o de neumonías atípicas. En los casos inciertos o si los síntomas persisten a pesar de un diagnóstico negativo, recomendamos, además de la serología, apoyar el diagnóstico mediante métodos de detección de biología molecular.
- No pueden descartarse reacciones cruzadas con *M. genitalium* o *M. hominis*. Los sueros EBV-positivos también pueden presentar reactividad cruzada.

9. Literatura

1. Clyde WA.J.: Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J. Clin Infect. Dis.* 1993, 17 (suppl. 1) 32-37
2. Hu, P.-C., Collier, A.M. and Baseman, J.B. (1977): Surface parasitism by *Mycoplasma pneumoniae* of respiratory epithelium. *J. of Experimental med.* 145, 1328-13343.
3. Razin, S. (1992): Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 423-432.
4. Taylor-Robinson, D. (1996): Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. *Clin. Infect. Dis.* 23, 671-684.
5. Jacobs, E.: *Mycoplasmen-Infektionen.* mta. 1997, 12: 236-239
6. Jacobs, E.: Das Adhäsion von *Mycoplasma pneumoniae*: Seine Bedeutung als Virulenzfaktor in der Pathogenese und in der Diagnostik. *Klin. Lab.* 1994: 40: 228-229
7. Dumke, R., A. Strubel, C. Cyncynatus, H. Nuytens, R. Herrmann, C. Lück, and E. Jacobs. 2012. Optimized serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* Elsevier Inc. 73:200-203.
8. Foy, HM: Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. *J Clin Infect Dis* 1993, 17(suppl. 1) 37-47.
9. Baum, H. v. et.al.: *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ), *BMC Infectious Diseases* 2009, 9:62

Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

▼ **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro

▼ **Dilución del Muestras IgG/IgA**
1:101

p.ej.
10 µl de suero/plasma + 1000 µl de tampón de dilución
(El tampón de dilución para suero está listo para utilizar)

▼ **Dilución del Muestras IgM**
1:101
Absorción del factor reumático con RF-SorboTech

p.ej.
5 µl de suero/plasma +450 µl de tampón de dilución
1 gota de RF-SorboTech, incubar 15 min a temp. amb.

Realización de la prueba

