

VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG LINE Immunoblot
(M. pneumoniae IgG LINE-16)
Objednací číslo : WE214G16

VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgM LINE Immunoblot
(M. pneumoniae IgM LINE-16)
Objednací číslo : WE214M16

VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgA LINE Immunoblot
(M. pneumoniae IgA LINE-16)
Objednací číslo : WE214A16

POUZE K DIAGNOSTICE 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



Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah balení	3
3.1 Kit pro 16 určení	3
4. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů	3
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)	4
7. Vyšetřovaný materiál	4
8. Provedení testu	4
8.1 Příprava vzorků	4
8.2 Příprava reagensů	5
8.3 Provedení testu Imunoblot	5
8.4 Použití analyzátorů Imunoblot	6
9. Vyhodnocení testu	6
9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů	6
9.2 Použití Cut off kontroly	6
9.3 Význam antigenů	7
9.4 Kriteria pro vyhodnocení	7
9.5 Interpretační schéma IgG, IgA popř. IgM	8
9.6 Celkové konstelace nálezu Gesamt-Befundkonstellationen (IgG, IgA a IgM)	8
9.7 Posouzení P1-EP1	8
9.8 Omezení testu	8
10. Literatura	8
11. Schéma provedení testu	10

1. Účel použití

Line Immunoblot testovací kit pro kvalitativní důkaz specifických IgG-, IgA- a IgM-protilátek v lidském séru. Line Immunoblot je určen pro sérologickou diagnostiku čerstvých nebo nedávno prodělaných infekcí *Mycoplasma pneumoniae*. Sada může být použita pro sérologickou diagnostiku samostatně, nebo pokud je výsledek jiných testů sporný nebo pozitivní, jako potvrzující test. Pro speciální dotazování, jako např. na diferencované vyhledání původce při postinfekčních artritidách nebo u syndromu Guillain-Barree, není LINE momentálně ještě evaluováno.

2. Princip testu

Proteiny antigenů původce nemoci se přenesou pomocí speciální rozprašovací metody na nitrocelulózovou membránu. Nitrocelulózová membrána se pak nastříhá na jednotlivé proužky.

Incubace nitrocelulózových proužků s nanesenými antigeny se vzorky lidského séra / plazmy umožňuje důkaz specifických protilátek obsažených v séru. Tyto protilátky tvoří imunokomplexy s antigeny fixovanými na testovacím proužku. Po odstranění nenavázaných protilátek vymytím se jednotlivé proužky nitrocelulózy s anti-humánními protilátkami IgG-, IgA- popř. IgM konjugovanými alkalickou fosfatázou inkubují. Poté, co byly odstraněny nenavázané konjugované protilátky pomocí dalšího procesu vymytí, následuje zviditelnění komplexů antigenů/protilátek (navázané protilátky) pomocí přidání bezbarvého substrátu, který se při své enzymatické přeměně vytváří modrofialové pruhy ("antigenové pruhy"). Reakce enzymů/substrátu se zastaví vymytím nitrocelulózového proužku destilovanou/deionizovanou vodou. Srovnáním s pozorovaným vzorem pruhů je možné usoudit přítomnost specifických protilátek IgG-, IgA- popř. IgM.

3. Obsah balení

3.1 Kit pro 16 určení

1. IgG, IgA popř. IgM nitrocelulózové testovací proužky s nastříkanými antigeny, vyztužené fólií, rozříděné do bločků, připraveno k použití	1x	16 proužků
2. IgG, IgA popř. IgM Cut off kontrola , lidské sérum, předředěno	1x	1,0 ml
3. Zředovací/promývací pufr , pH 7,3 (10x konz.), s Tris a konzervačním prostředkem	1x	50 ml
4. IgG, IgA popř. IgM konjugát (100x konz.) antihumánní (koží) alkalická fosfatáza s konzervačním prostředkem	1x	0,7 ml
5. Substrát (BCIP/NBT), připraven k použití	1x	57 ml
6. Protokol pro vyhodnocení k zaprotokolování a archivaci výsledků	1x	1 kus.

K dodání na vyžádání:

IgG, popř. IgA nebo IgM- pozitivní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Vyhodnocení pozitivní pruhy > pruhy Cut off můžete zjistit z certifikátu, který je součástí dodávky.

(obj.-č.: IgG: WE243P60 , popř. IgA: WE243P40, popř. IgM: WE214P80)

IgG/IgM/IgA- negativní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Negativní kontrola nezobrazuje žádné pruhy, resp. žádné vyhodnocení relevantní pruhy > pruhy Cut off.

(obj.-č.: IgG/IgM/IgA: WE214N50)

4. Přechovávaní a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensí

Testovací soupravu přechovávejte při 2 až 8°C. Upotřebitelnost jednotlivých složek je vyznačena na jejich štítcích, upotřebitelnost soupravy (datum expirace- viz příslušný certifikát o kontrole kvality).

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmraznout a nevystavujte je vysokým teplotám.
2. Reagensie nepoužívejte po uplynutí jejich data upotřebitelnosti.
3. Neponechávejte reagensie na přímém světle.
4. Roztok substrátu BCIP/ NBT je citlivý na světlo a musí být přechováván ve tmě..
5. **Nitrocelulózové testovací proužky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými proužky opět pevně uzavřete a přechovávejte při teplotě 2 až 8°C. K archivaci výsledků by měly být nitrocelulózové testovací proužky bezpodmínečně chráněny před přímým slunečním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
testovací proužky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v současně dodaném sáčku)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zředění (připravený k použití)	nebo pokojová teplota	2 týdny

5. Preventivní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra jsou využívána pouze séra, která byla testována a shledána negativní na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Přesto by měla být kontrolní séra, vzorky, zředěné vzorky, konjugáty a nitro-celulóзовé testovací proužky považována za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práce v laboratořích.
2. Při provádění imunoblotu je třeba používat jednorázové rukavice a pinzetu z umělé hmoty.
3. Likvidace použitého materiálu se uskutečňuje podle specifických směrnic platných v konkrétní zemi použití.
4. Inkubační vaničky jsou výrobcem koncipovány pouze pro jedno použití. Vícenásobné použití těchto inkubačních vaniček je na zodpovědnosti uživatele. Při event. vícenásobném použití doporučujeme inkubační vaničky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyčistit a důkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)

1. Inkubační vaničky (v případě potřeby lze objednat pod objednacím číslem WE300.08)
2. Vertikální třepačka, případně s naklápěním (ne rotační!)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Špičky mikropipet
7. Zkumavky na vzorky objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umělé hmoty
9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrační papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagancií), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

8. Provedení testu

Pro dosažení správných výsledků se musí přesně dodržovat pracovní předpis firmy VIROTECH Diagnostics.

8.1 Příprava vzorků

1. Na vzorek pacienta je zapotřebí 15 µl séra nebo plazmy.
2. Vzorky krve by měly být odebírány asepticky venepunkcí. Po úplné koagulaci je třeba sérum oddělit (u plazmy odpadá).
3. Séra se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.

4. Séra, která byla tepelně inaktivována nebo jsou lipémicky, hemolyticky nebo mikrobiálně kontaminována mohou vést k chybným výsledkům a neměla by být proto používána.
5. Nepoužívejte zakalená séra (zejména po roztání pokud byla zmražená), popřípadě se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), čirý supernatant odpipetujte a použijte při testu.

8.2 Příprava reagensí

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE v jednom testovacím cyklu se stejnými časy inkubace a komponenty různých parametrů z různých šarží. Cut off kontroly se provádějí podle parametrů a šarže.
2. Před zředováním koncentrovaných reagensí se musí vytemperovat na teplotu místnosti. Používejte pouze destilovanou vodu / deionizovanou vodu vysoké kvality a pracujte při teplotě místnosti.
3. Zředěné roztoky před použitím dobře promíchejte.
4. **Zředovací / promývací pufr**
Ředící roztok/promývací pufr je k dispozici v 10ti násobné koncentraci. Ředící roztok/promývací pufr se ředí v poměru 1:10 destilovanou nebo deionizovanou vodou (10ml/50ml/100ml koncentrátu + 90ml/450ml/900ml A. dest./deioniz.), dobře promíchat.
Koncentrovaný i naředěný ředící/promývací pufr může vykazovat žluté zabarvení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkčnost ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **IgG-, IgA- popř. IgM- konjugát**
Konjugát 1 + 100 naředte finálně zředěným zředovacím / promývacím puforem a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředování konjugátu (bod: „Schéma průběhu testu“).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití.

8.3 Provedení testu Immunoblot

Pozor : Nitrocelulózové testovací proužky smějí být testovány pouze ve schválené (povolené) třídě Ig (viz etiketu na sešitku Blot a označení na každém jednotlivém testovacím proužku).

Pro správné provedení a posouzení *Mycoplasma pneumoniae* LINE musí být při každém testu současně provedena Cut off kontrola odpovídající parametrům a šarží.

Pro bezpečnou diagnostiku *Mycoplasma pneumoniae* by měl být proveden test LINE v IgG, IgA a IgM.

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom proužku do žlábků čisté inkubační vaničky. Proužků se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředovací / promývací pufr** a vložte na třepačku.. Dbejte na to, aby nitrocelulózové testovací proužky byly kapalinou pokryty stejnoměrně. Proužky nesmějí během celého provádění testu oschnout.
4. Zesílené nitrocelulózové testovací proužky se během minuty zcela navlhčí a mohou být inkubovány v poloze zadní stranou dolů, přední stranou dolů nebo v poloze na straně.
5. Na každých **15µl séra/plazmy pacienta** či **100µl pozitivní / negativní kontroly Cut off** pipetujte, pokud možno na horním, označeném konci proužku. Pacientovo sérum a kontrolu nechte **30 minut** inkubovat na třepačce.. Při pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci ostatních vzorků.
6. Zcela odsajte kapalinu ze žlábků nebo opatrně odlijte. Při odlévání kapaliny zůstanou nitrocelulózové testovací proužky ulpělé na dně žlábků. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.
7. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství čerstvého zředěného konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **zředěného konjugátu** do žlábků s proužky a inkubujte **30 minut** na třepačce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků.

11. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do žlábků a nechte vyvíjet zbarvení na **třepačce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odlitím roztoku substrátu. Dále promyjte proužky bez meziinkubace **3 x** vždy 1,5 ml **destilované nebo deionizované vody**.
15. Odlijte destilovanou nebo deionizovanou vodu a nechte proužky oschnout na čistém filtračním papíře. Zbarvení pozadí, které lze pozorovat u vlhkých nitrocelulózových testovacích proužků, se u oschlých proužků zcela ztrácí. Zesílené nitrocelulózové testovací proužky vyžadují v porovnání s obvyklými nitrocelulózovými testovacími proužky trochu více času, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte připojený vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých proužků na protokolu a přímo na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátorů Imunoblot

Pro automatické zpracování Blot a LINE jsou schváleny tyto přístroje: Apollo a Profiblot. V zásadě jsou vhodné všechny automaty Blot obvyklé na trhu.

9. Vyhodnocení testu

Je spolehlivému vyhodnocení je každý z proužků LINE vybaven dvěma kontrolami :

1. kontrolou séra

Pouze po inkubaci se sérem pacienta se pod označovací linií objeví pruh inkubace séra.

2. kontrolou konjugátu

Pásek LINE je vybaven kontrolním pásem konjugátu, který se zobrazí po inkubaci s odpovídajícím konjugátem.

Provedení testu je platné, pokud je na vyvolaných nitrocelulózových prouzcích zřetelně rozeznatelná jak kontrola séra tak i interní kontrola konjugátu.

Polohu kontrolního pásu séra a konjugátu najdete na protokolu..

9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů

Pozice a označení reaktivních proužků zjistíte v protokolu.

IgG-pásy: P1, P90, P400, NMP, RP3M, RP3F a P1-EPI

IgA-pásy: P1, P90, P400, RP14, P200

IgM-pásy: P1, P90, P400, Pdh-B, GL, I-Prot.

9.2 Použití Cut off kontroly

Pásy, jejichž intenzita je slabší než pásy Cut off (P1) kontroly Cut off, se do hodnocení nezahrnují. Pásy P1 musí vykazovat slabou intenzitu.

Hodnocení intenzity pásů (dbát na výjimky: Pdh-B, GL, I-protein, RP3M, RP3F a P1-EPI):

P1-pásy: Intenzita pásů P1 kontroly Cut off udává hodnocení všech proteinových pásů.

V IgG, IgA a IgM následovně:

- | | | |
|---|---|---|
| ● Menší intenzita než pásy P1 kontroly Cut off | = | 0 |
| ● Stejná intenzita jako pásy P1 kontroly Cut off | = | 1 |
| ● Silnější intenzita než pásy P1 kontroly Cut off | = | 2 |

Suma intenzity pásů poskytne celkové zhodnocení.

Důležité výjimky:

- V IgM se pásy: **Pdh-B, GL a I-protein** hodnotí jen tehdy, jakmile je alespoň jeden z pásů: P1, P90 nebo P400 $\geq$ Cut off pásy, to znamená vyhodnocení s 1 nebo 2.
- V IgG se hodnotí pouze jeden z pásů **RP3M a RP3F**. K posouzení se použije silněji reaktivní pás.
- V IgG se do celku nezahrnuje **zamořený pás P1-EPI**. Hodnotí se jako pozitivní, pokud je jeho intenzita $\geq$ P1 pás kontroly Cut off a udává – při dodatečně negativním celkovém hodnocení ve všech třídách Ig – důkaz o delším ustupujícím dřívějším kontaktu s *Mycoplasma pneumoniae*.

9.3 Význam antigenů

Seznam použitých rekombinantních (P1, P90, P400, RP3M, RP3F, RP14, P200) a vyčištěných nativních antigenů (NMP, Pdh-B, GL, I-protein).

Antigen / označení	Význam antigenu	Specifičnost protilátek v LINE
P1	Protein P1 je hlavním adhezinem (hlavní antigen) <i>M. pneumoniae</i> (Mw 176 kDa). Je exprimovaný povrchově, lokalizován v tip-regionu a zodpovědný za cytoadherenci.	vysoce specifický
P90	P90 povrchově exprimovaný a zodpovědný za správnou a specifickou integraci proteinu P1 do bakteriální membrány.	vysoce specifický
P400	Funkce P400 je zcela neznámá.	specifický
NMP	Nízkomolekulární proteiny: součásti membrány a povrchově exprimovaných proteinů.	specifický
RP3M & RP3F	Pomocí rozdílů v sekvencích v Gen P1 se serotypu 1 - M129 (RP3M)) – nebo sérotypu 2 - FH (RP3F) přiřadí izoláty <i>M. pneumoniae</i> .	vysoce specifický
RP14	RP14 je rek. C-terminální úsek P1 adhezinu. Protilátky proti RP14 mohou inhibovat cytoadherenci <i>M. pneumoniae</i> na HBEC (human bronchial epithelial cells).	vysoce specifický
P200	P200 se podílí na tvoření cytoskeletu <i>M. pneumoniae</i> jako strukturní protein a umožňuje bakterii klouzat po plochách a tím úspěšnou kolonizaci hostitele.	vysoce specifický
Pdh-B	Pdh-B je komponenta Pyruvatdehydrogenázy. Pdh-B je plošně exprimovaný a patří k oněm pěti proteinům, které se vyskytují v <i>M. pneumoniae</i> v kvantitativně nejvyšší koncentraci.	Možný akutní marker v kombinaci s vysoce specifickými protilátkami <i>M. pn.</i>
GL	<i>M. pneumoniae</i> je obklopena výlučně dvouvrstvou membránou, na které je uložena lipoglykanová vrstva. Na základě toho lze usuzovat, že se fosfolipidy a glykolipidy jako esenciální součásti membrán částečně prezentují na buněčném povrchu a lidský imunitní systém je rozezná.	Možný akutní marker v kombinaci s vysoce specifickými protilátkami <i>M. pn.</i>
I-Protein	I-proteiny jsou erytrocytové antigeny, které jsou rozpoznány chladovými aglutininy (CA). CA, které jsou indukovány <i>M. pneumoniae</i> , jsou typu IgM a směřují ve více než 90 % proti I-proteinu.	Možný akutní marker v kombinaci s vysoce specifickými protilátkami <i>M. pn.</i>
P1-EPI	Směs antigenů P1a kmenů FH a M129, a vykazuje zamoření v IgG.	vysoce specifický

9.4 Kriteria pro vyhodnocení

Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologické údaje a další laboratorní nálezy, které jsou k dispozici.

Vyhodnocení IgG-popř. IgA	
Suma intenzit pásů	Posouzení
< 4	negativní
= 4	nápadné
> 4	pozitivní

Vyhodnocení IgM	
Suma intenzit pásů	Posouzení
< 3	negativní
= 3	nápadné
> 3	pozitivní

9.5 Interpretační schéma IgG, IgA popř. IgM

Posouzení	Interpretace	
negativní	Žádný sérologický náznak výskytu <i>Mycoplasma pneumoniae</i> – infekce nebo stav po delší ustupující infekci.	Pozitivní zamořené pásy P1-EPI v IgG ($\geq$ Cut-off pásy) naznačují dřívější kontakt s <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
nápadné	Lze dokázat protilátky proti <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . Oslabená reakce při rekonvalescenci, perzistujících protilátkách nebo při právě začínající infekci. Doporučuje se provést průběžnou kontrolu.	
pozitivní	Protilátky proti <i>Mycoplasma pneumoniae</i> lze dokázat. Podezření na čerstvou nebo nedávno prodělanou infekci <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .	

9.6 Celkové konstelace nálezu Gesamt-Befundkonstellationen (IgG, IgA a IgM)

IgG	IgA	IgM	Interpretace
-	-	-	žádný sérologický průkaz infekce mykoplazmové pneumonie
-	+	+	časná fáze akutní infekce nebo reinfekce
-	+	-	časná fáze akutní infekce nebo reinfekce
+	+	+	akutní infekce
+	-	+	akutní infekce (pozdní fáze)
+	+	-	reinfekce nebo infekce bez tvorby IgM
+	-	-	prodělaná infekce nebo reinfekce
-	-	+	časná fáze akutní infekce

9.7 Posouzení P1-EP1

IgG	IgA	IgM	P1-EP1	Interpretace
-	-	-	+	průkaz infekce mykoplazmové pneumonie v minulosti

9.8 Omezení testu

- Negativní výsledek blotu zcela nevylučuje možnost infekce *Mycoplasma pneumoniae*. Zkouška mohla být provedena před výskytem protilátek nebo je koncentrace protilátek pod důkazní hranici testu.
- Zřídka mohou vzorky pacientů vykazovat „inverzní“ pásy (tmavé pozadí, bílé pásy); tyto nelze hodnotit, tzn. že imunoblot není v těchto případech hodnotitelný. Sérum by mělo být otestováno jinými sérologickými metodami.

10. Literatura

- Clyde WA.J.: Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. J. Clin Infect. Dis. 1993, 17 (suppl. 1) 32-37
- 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. 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.
8. Sasaki Y, et al., Detection of *Mycoplasma fermentans* DNA from lymph nodes of acquired immunodeficiency syndrome patients. Microb Pathog (England) Aug. 1994, 17 (2) p131-5
9. Daxboeck F., Krause R. and Wenisch C. ,Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection, Clin. Microbiol. Infect 2003;9: p263-273
10. Bebear C., Biological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory infections, Diagnostic biologique des infections respiratoires a *Mycoplasma pneumoniae*, Rev. Mal Respir (FRANCE) 1986, 3 (2) p67-71
11. Jacobs, E. (1991) *Mycoplasma pneumoniae* virulence factors and immune response. Reviews in Medical Microbiology 2, 83-90

11. Schéma provedení testu

Provedení testu

inkubace vzorků	30 minut	15 µl séra/plazmy pacienta / 100 µl kontrola v 1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
inkubace s konjugátem	30 minut	1,5 ml p zředěného konjugátu (1 + 100)
promývání	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	1,5 ml zředovacího / promývacího pufru destilovanou / deionizovanou vodou
inkubace se substrátem	10 ± 3 minut	1,5 ml roztoku substrátu
zastavení vývoje barvy	3 x bez meziinkubace	1,5 ml destilované / deionizované vody

Tabulka ředění konjugátu : (zaokrouhleně)

počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředovací / promývací pufr	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrovaný konjugát	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
konečný objem	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

počet proužků	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
zředovací / promývací pufr	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrovaný konjugát	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
konečný objem	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

počet proužků	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
zředovací / promývací pufr	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrovaný konjugát	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
konečný objem	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

počet proužků	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
zředovací / promývací pufr	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrovaný konjugát	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
konečný objem	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml