

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG LINE Immunoblot
(M. pneumoniae IgG LINE-16)**

N° articolo: WE214G16

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgM LINE Immunoblot
(M. pneumoniae IgM LINE-16)**

N° articolo: WE214M16

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgA LINE Immunoblot
(M. pneumoniae IgA LINE-16)**

N° articolo: WE214A16

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5**

D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-82621

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Indice

| | |
|--|-----------|
| 1. Finalità d'uso | 3 |
| 2. Principio del test..... | 3 |
| 3. Contenuto della confezione | 3 |
| 3.1 Kit per 16 determinazioni | 3 |
| 4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi | 3 |
| 5. Precauzioni e avvertenze..... | 4 |
| 6. Altro materiale occorrente (non fornito) | 4 |
| 7. Materiale di analisi | 4 |
| 8. Esecuzione del test | 4 |
| 8.1 Preparazione dei campioni..... | 4 |
| 8.2 Preparazione dei reattivi | 5 |
| 8.3 Esecuzione del test di Immunoblot | 5 |
| 8.4 Impiego di processori Immunoblot | 6 |
| 9. Valutazione del test..... | 6 |
| 9.1 Valutazione dei campioni | 6 |
| 9.2 Impiego del controllo cut off | 6 |
| 9.3 Significato degli antigeni | 7 |
| 9.4 Criteri di valutazione..... | 8 |
| 9.5 Schema di interpretazione delle IgG, IgA e IgM | 8 |
| 9.6 Costellazione globale dei risultati (IgG, IgA e IgM) | 8 |
| 9.7 Valutazione P1-EP1 | 9 |
| 9.8 Limiti del test | 9 |
| 10. Bibliografia..... | 9 |
| 11. Schema di svolgimento del test..... | 10 |

1. Finalità d'uso

Kit del test Line Immunoblot per l'individuazione qualitativa di anticorpi IgG, IgA e IgM specifici nel siero umano. Il test Line Immunoblot consente la diagnosi sierologica di un'infezione recente o appena risolta da *Mycoplasma pneumoniae*. Il kit può essere utilizzato per la diagnosi sierologica da solo oppure, qualora il risultato di un'altra analisi sia dubbio o positivo, come test di conferma. Al momento il test LINE non è ancora valutato per problematiche particolari, quali ad es. la ricerca differenziata di patogeni in presenza di artriti post-infettive o in caso di sindrome di Guillain-Barree.

2. Principio del test

Le proteine dell'antigene patogeno vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante una speciale tecnica di spruzzatura. Tale membrana viene in seguito tagliata in singole strisce.

L'incubazione delle strisce di nitrocellulosa che supportano l'antigene assieme ai campioni di siero/plasma umano consente di individuare l'eventuale presenza di anticorpi specifici nel siero. Tali anticorpi formano immunocomplessi con gli antigeni fissati sulla striscia di prova. Dopo avere rimosso gli anticorpi non legati mediante opportune fasi di lavaggio, le singole strisce di nitrocellulosa vengono incubate con anticorpi IgG, IgA o IgM anti-umani coniugati a fosfatasi alcalina. Mediante un'ulteriore fase di lavaggio si rimuovono poi gli anticorpi coniugati non legati e si esegue la visualizzazione del complesso antigene/anticorpi (gli anticorpi legati), aggiungendo un substrato non colorato il quale, per reazione enzimatica propria, genera bande di colore violetto ("bande dell'antigene"). La reazione enzima/substrato viene interrotta lavando le strisce di nitrocellulosa in acqua distillata/deionizzata. A seconda del pattern delle bande osservato, si può rilevare la presenza di anticorpi specifici IgG, IgA o IgM.

3. Contenuto della confezione

3.1 Kit per 16 determinazioni

| | | |
|---|-----------|------------|
| 1. Strisce di nitrocellulosa per IgG, IgA o IgM con antigeni applicati a spruzzo, rinforzate con pellicola, assortite in bustina, pronte per l'uso | 1x | 16 strisce |
| 2. Controllo cut off IgM, IgA o IgG , siero umano, prediluito | 1x | 1,0 ml |
| 3. Tamponi di diluizione/lavaggio , pH 7,3 (concentrato 10 volte), con Tris e conservante | 1x | 50 ml |
| 4. Coniugato IgG, IgA o IgM (concentrato 100 volte) anti-umano, fosfatasi alcalina (capra), con conservante | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT) , pronto per l'uso | 1x | 57 ml |
| 6. Scheda protocollo d'analisi per protocollare e archiviare i risultati | 1x | 1 pezzo |

Su richiesta sono disponibili anche:

Controllo positivo per IgG o IgA o IgM, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Per le bande positive > banda cut off si rimanda al certificato fornito a corredo.

(Art. n°: IgG: WE214P60 o IgA: WE214P40 o IgM: WE214P80)

Controllo negativo per IgG/IgM/IgA, siero umano, prediluito, 0,5 ml.

Il controllo negativo non presenta nessuna banda, né bande rilevanti per la valutazione \geq banda cut off.

(Art. n°: IgG/IgM/IgA: WE214N50)

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

7. Non esporre i singoli reattivi a temperature eccessivamente basse o elevate.

8. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza.

9. Non conservare i reattivi in ambiente con luce abbagliante.

10. La soluzione per substrato BCIP/ NBT è fotosensibile e va conservata al buio.

11. **Strisce di reazione in nitrocellulosa:** utilizzare immediatamente le strisce dopo averle estratte dalla scatola. Chiudere perfettamente le scatole contenenti strisce non utilizzate e conservare a 2-8°C. Per l'archiviazione dei risultati, si raccomanda di proteggere le strisce di reazione in nitrocellulosa dalla luce diretta del sole, in modo da evitare lo scolorimento delle bande.

| Materiale | Stato | Conservazione | Stabilità |
|------------------------|--------------------------------------|---|------------------|
| Campioni da analizzare | non diluiti | da +2 a +8°C | 1 settimana |
| Strisce di reazione | dopo l'apertura | da +2 a +8°C (conservazione nella busta in dotazione) | 3 mesi |
| Controlli | dopo l'apertura | da +2 a +8°C | 3 mesi |
| Coniugato | dopo l'apertura | da +2 a +8°C | 3 mesi |
| | diluito | da +2 a +8°C | circa 6 ore |
| Substrato | dopo l'apertura | da +2 a +8°C (protetto dalla luce) | 3 mesi |
| Soluzione per lavaggio | dopo l'apertura | da +2 a +8°C (protetto dalla luce) | 3 mesi |
| | diluizione finale (pronta per l'uso) | da +2 a +8°C | 4 settimane |
| | diluizione finale (pronta per l'uso) | <i>oppure</i> temperatura ambiente | 2 settimane |

5. Precauzioni e avvertenze

1. Come sieri di controllo si impiegano esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV ed agli antigeni di superficie dell'epatite B. Tuttavia i sieri di controllo, i campioni, i campioni diluiti, i coniugati e le strisce di reazione in nitrocellulosa devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. Durante l'esecuzione dell'Immunoblot indossare guanti monouso e utilizzare pinzette di plastica.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.
4. Le vasche di incubazione sono state concepite dal produttore come prodotti monouso. L'uso ripetuto di tali vasche ricade sotto la responsabilità dell'utilizzatore. In caso di uso ripetuto, raccomandiamo di disinfettare le vasche di incubazione per parecchie ore utilizzando soluzione di ipoclorito di sodio all'1%, pulendo e risciacquando a fondo con acqua corrente e acqua distillata/deionizzata.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Vasca di incubazione (se necessario disponibile come art. n° WE300.08)
2. Agitatore (verticale non centrifugo)
3. Un flacone spruzzatore per bloccare la reazione
4. Pipetta o lavatore manuale
5. Micropipette da 5 µl - 1500 µl
6. Puntali pipettatori
7. Tubetti per campioni, volumi 2-20 ml
8. Pinzetta di plastica
9. Acqua distillata o deionizzata
10. Carta filtrante

7. Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

8. Esecuzione del test

Il rigoroso rispetto del metodo indicato da VIROTECH Diagnostics è la premessa indispensabile per conseguire risultati corretti.

8.1 Preparazione dei campioni

1. Per ogni campione prelevato dai pazienti sono necessari 15 µl di siero o di plasma.
2. Si raccomanda di eseguire il prelievo venoso in condizioni asettiche. Separare il siero quando la coagulazione è completa (non presente per il plasma).

3. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente i sieri.
4. I sieri inattivati al calore, lipemici, emolitici o contaminati da batteri possono dare origine a risultati falsati e se ne sconsiglia pertanto il riutilizzo.
5. Non impiegare campioni di siero torbidi (specialmente dopo scongelamento), eventualmente centrifugarli (5 min. a 1000x g), quindi utilizzare per il test il surnatante limpido.

8.2 Preparazione dei reattivi

1. Per l'adattamento alla routine di laboratorio, è possibile elaborare tutti i LINE in un unico ciclo di prova con gli stessi tempi di incubazione e componenti con una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli cut off saranno predisposti in modo specifico ai parametri e ai lotti.
2. Prima di diluire i reattivi di prova, portare i concentrati a temperatura ambiente. Utilizzare esclusivamente acqua distillata/deionizzata di alta qualità e a temperatura ambiente.
3. Mescolare accuratamente le diluizioni prima di eseguire il test.

4. Tampone di diluizione / lavaggio

Il tampone di lavaggio e di diluizione è concentrato 10 volte. Diluire il concentrato del tampone di lavaggio e di diluizione 1:10 con acqua distillata o deionizzata (concentrato 10ml/50ml/100ml + 90ml/450ml/900ml acqua dist./deionizzata) e miscelare bene.

Sia i tamponi di diluizione/di lavaggio concentrati che quelli diluiti possono a volte presentare una colorazione giallastra. Tale fenomeno non ha alcun effetto né sulla durata del tampone, né sulla funzionalità e sull'attendibilità diagnostica della serie di test.

5. Coniugato IgG, IgA o IgM

Diluire il coniugato 1 + 100 con tampone di diluizione/lavaggio a diluizione finale, mescolare accuratamente. Per ciascun campione di siero si richiedono 1,5 ml di soluzione d'uso di coniugato. Vedere la tabella di diluizione del coniugato (punto: "Schema del test").

6. Soluzione per substrato

La soluzione per substrato viene fornita pronta per l'uso.

8.3 Esecuzione del test di Immunoblot

Attenzione: Le strisce di nitrocellulosa possono essere testate esclusivamente nella classe Ig idonea (vedere l'etichetta sulla bustina del blot e la descrizione su ciascuna singola striscia di prova).

Per l'esecuzione e la valutazione corrette dei LINE per la *Mycoplasma pneumoniae*, utilizzare anche un controllo cut off per ogni serie di test.

Per una diagnosi sicura di *Mycoplasma pneumoniae* si raccomanda di eseguire il test LINE nelle IgG, IgA e IgM.

1. Il test va eseguito a temperatura ambiente.
2. Inserire 1 striscia per ciascun campione nell'apposita scanalatura di una vasca d'incubazione pulita. Se possibile, afferrare le strisce solo dall'estremità superiore contrassegnata.
3. Dispensare su ciascuna striscia 1,5 ml di **tampone di diluizione / lavaggio** pronto per l'uso e inserire nell'agitatore. Fare attenzione che le strisce di prova in nitrocellulosa siano coperte dal liquido in modo uniforme e che non si asciugino per l'intera durata di esecuzione del test.
4. Le strisce di prova rinforzate in nitrocellulosa vanno inumidite completamente entro un minuto e possono essere incubate in posizione rovesciata verso l'alto, capovolta o di lato.
5. Aggiungere su ogni striscia **15 µl di siero/plasma del paziente** o **100 µl del controllo cut off / positivo / negativo**, se possibile sull'estremità superiore contrassegnata. Incubare il siero del paziente e il controllo per **30 minuti** sull'agitatore. Durante la dispensazione e il successivo versamento, fare attenzione a evitare contaminazioni crociate tra i singoli campioni.
6. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare scolare con precauzione. Mentre si fa defluire il liquido, le strisce di prova in nitrocellulosa rimangono attaccate al bordo delle scanalature. Asciugare con carta assorbente il liquido residuo.

7. **Lavaggio** delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per **3 x 5 minuti** sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Prima di procedere con l'ultima fase di lavaggio, preparare la necessaria quantità di diluizione fresca di coniugato (v. tabella).
7. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
8. Dispensare 1,5 ml della **diluizione di coniugato** preparata in ciascuno dei corrispondenti solchi di incubazione e incubare per **30 minuti** sull'agitatore.
9. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire.
10. **Lavaggio** delle strisce: incubare ogni striscia con 1,5 ml di tampone di diluizione/lavaggio pronto per l'uso per **3 x 5 minuti** sull'agitatore. Aspirare sempre completamente il tampone di lavaggio o farlo scolare. Successivamente sciacquare per **1 x 1 minuti** con **acqua distillata/deionizzata**.
11. Aspirare completamente il liquido dalle scanalature oppure lasciare defluire (v. punto 6).
12. Dispensare 1,5 ml di **soluzione per substrato** pronta per l'uso in ciascun solco e sviluppare sull'agitatore per **10 ± 3 minuti**.
13. **Arrestare** lo sviluppo cromatico facendo defluire la soluzione per substrato. Successivamente sciacquare le strisce per **3 volte** senza incubazione intermedia, utilizzando 1,5 ml di **acqua distillata/deionizzata** per ciascuna.
14. Fare scolare l'acqua distillata/deionizzata e lasciare asciugare le strisce su un carta assorbente pulita. La colorazione di fondo, osservabile sulle strisce di prova in nitrocellulosa umide, scompare completamente sulle strisce asciutte. Rispetto alle strisce di prova in nitrocellulosa tradizionali, quelle rinforzate richiedono un tempo leggermente più lungo per asciugarsi.
15. Per la valutazione, utilizzare il relativo protocollo allegato. La dicitura delle bande altamente specifiche riportata sulla scheda di protocollo facilita la valutazione dei campioni dei pazienti.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

8.4 Impiego di processori Immunoblot

Per l'elaborazione automatica dei Blot e dei LINE, sono stati convalidati i seguenti apparecchi: Apollo e Profiblot. In linea di principio, sono idonei tutti i dispositivi automatici per Blot disponibili in commercio.

9. Valutazione del test

Per una valutazione sicura, ciascuna striscia LINE è provvista di due controlli:

1. **Controllo del siero** (= serum control):
La banda di incubazione del siero compare sotto la linea di marcatura (= markline) soltanto dopo l'incubazione con il siero del paziente.
2. **Controllo coniugato** (= conjugate control):
La strip LINE è dotata di una banda di controllo del coniugato che compare dopo l'incubazione con il coniugato corrispondente.

L'esecuzione del test è valida se sulle strisce di prova in nitrocellulosa sviluppate è chiaramente riconoscibile non solo il controllo del siero ma anche il controllo del coniugato interno.

Per la posizione della banda del controllo del siero/coniugato si rimanda alla scheda di protocollo.

9.1 Valutazione dei campioni

Per la posizione e la descrizione delle bande reattive si rimanda alla scheda di protocollo.

Bande delle IgG: P1, P90, P400, NMP, RP3M, RP3F e P1-EPI

Bande delle IgA: P1, P90, P400, RP14, P200

Bande delle IgM: P1, P90, P400, Pdh-B, GL, prot. I

9.2 Impiego del controllo cut off

Le bande di intensità più debole rispetto a quella della banda cut off (P1) del controllo cut off non vengono incluse nella valutazione. La banda P1 deve mostrare un'intensità debole.

Valutazione dell'intensità delle bande (eccezione: fare attenzione a Pdh-B, GL, proteina I, RP3M, RP3F e P1-EPI):

Banda P1: L'intensità della banda P1 del controllo cut off definisce la valutazione di tutte le bande proteiche

nelle IgG, IgA e IgM nel modo seguente:

- **Intensità inferiore rispetto alla banda P1 del controllo cut off = 0**
- **Stessa intensità rispetto alla banda P1 del controllo cut off = 1**
- **Intensità superiore rispetto alla banda P1 del controllo cut off= 2**

La somma delle intensità della bande fornisce la valutazione globale.

Importanti eccezioni:

- Nelle IgM le bande: **Pdh-B, GL e proteina I** vengono valutate soltanto non appena una delle bande P1, P90 o P400 è \geq alla banda cut off, cioè viene valutata con 1 o 2.
- Nelle IgG viene valutata soltanto una delle bande **RP3M e RP3F**. Per la valutazione si tiene conto della banda più fortemente reattiva.
- Nelle IgG, nella somma non è incluso il calcolo della **banda di contaminazione P1-EPI**. Sarà valutata come positiva se la sua intensità è \geq alla banda P1 del controllo cut off e fornisce - in caso di ulteriore valutazione generale negativa in tutte le classi Ig - l'indicazione di un precedente contatto pregresso con *Mycoplasma pneumoniae*.

9.3 Significato degli antigeni

Elenco degli antigeni ricombinanti (P1, P90, P400, RP3M, RP3F, RP14, P200) e nativi purificati (NMP, Pdh-B, GL, proteina I) utilizzati.

| Antigene / descrizione | Significato degli antigeni | Specificità degli anticorpi nel test LINE |
|-------------------------------|---|---|
| P1 | La proteina P1 è l'adesina principale (antigene principale) della <i>M. pneumoniae</i> (Mw 176 kDa). È espressa sulla superficie, localizzata nell'area della punta e responsabile della citoaderenza. | Altamente specifico |
| P90 | P90 è espresso sulla superficie e responsabile dell'integrazione corretta e specifica della proteina P1 nella membrana batterica. | Altamente specifico |
| P400 | La funzione di P400 è sostanzialmente sconosciuta. | Specifico |
| NMP | Proteine a basso peso molecolare: componenti della membrana e proteine espresse sulla superficie. | Specifico |
| RP3M & RP3F | Per effetto di differenze di sequenza nel gene P1, si assegnano isolati di <i>M. pneumoniae</i> al sierotipo 1 - M129 (RP3M) - o al sierotipo 2 - FH (RP3F). | Altamente specifico |
| RP14 | RP14 è la sezione ric. C-terminale dell'adesina P1. Gli anticorpi anti-RP14 possono inibire la citoaderenza di <i>M. pneumoniae</i> nelle HBEC (human bronchial epithelial cells, cellule bronco-epiteliali umane). | Altamente specifico |
| P200 | P200 partecipa alla formazione del citoscheletro di <i>M. pneumoniae</i> come proteina strutturale, consentendo al batterio di scorrere sulla superficie e di colonizzare l'ospite. | Altamente specifico |
| Pdh-B | Pdh-B è una componente della piruvato deidrogenasi. Pdh-B è espressa sulla superficie e fa parte delle cinque proteine che si presentano quantitativamente in maggiore concentrazione nella <i>M. pneumoniae</i> . | Possibile marker acuto in combinazione con antigeni altamente specifici anti-M. pn. |

| | | |
|-------------------|---|---|
| GL | <i>M. pneumoniae</i> viene circondata soltanto da una membrana a doppio strato sulla quale è sovrapposto uno strato di lipoglicani. A causa di ciò, è evidente che sulla superficie cellulare del batterio siano in parte presenti fosfo- e glicolipidi quali componenti essenziali della membrana, che vengono riconosciuti dal sistema immunitario umano. | Possibile marker acuto in combinazione con antigeni altamente specifici anti-M. pn. |
| Proteina I | Le proteine I sono antigeni eritrocitari riconosciuti dalle agglutinine a freddo (CA). Le CA, indotte da <i>M. pneumoniae</i> , sono del tipo IgM e per oltre il 90% sono dirette contro la proteina I. | Possibile marker acuto in combinazione con antigeni altamente specifici anti-M. pn. |
| P1-EPI | Una miscela dell'antigene P1 dei ceppi FH e M129, che indica la contaminazione nelle IgG. | Altamente specifico |

9.4 Criteri di valutazione

L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio disponibili.

| Valutazione delle IgG e delle IgA | |
|-----------------------------------|-------------|
| Somma dell'intensità delle bande | Valutazione |
| < 4 | Negativo |
| = 4 | Incerto |
| > 4 | Positivo |

| Valutazione delle IgM | |
|----------------------------------|-------------|
| Somma dell'intensità delle bande | Valutazione |
| < 3 | Negativo |
| = 3 | Incerto |
| > 3 | Positivo |

9.5 Schema di interpretazione delle IgG, IgA e IgM

| Valutazione | Interpretazione | |
|-------------|--|---|
| Negativo | Nessuna indicazione sierologica di infezione da <i>Mycoplasma pneumoniae</i> o di stato successivo a infezione pregressa. | Una banda di contaminazione positiva P1-EPI nelle IgG (\geq banda cut off) è indicativa di un precedente contatto con <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . |
| Incerto | Sono riscontrabili anticorpi anti- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . Reazione attenuata in caso di convalescenza, di anticorpi persistenti o di infezione in fase di esordio. È consigliabile un controllo a distanza di tempo. | |
| Positivo | Sono riscontrabili anticorpi anti- <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . Sospetto di infezione da <i>Mycoplasma pneumoniae</i> recente o appena risolta. | |

9.6 Costellazione globale dei risultati (IgG, IgA e IgM)

| IgG | IgA | IgM | Interpretazione |
|-----|-----|-----|--|
| - | - | - | Nessuna indicazione sierologica di infezione da <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . |
| - | + | + | Fase precoce di un'infezione acuta o reinfezione. |
| - | + | - | Fase precoce di un'infezione acuta o reinfezione |
| + | + | + | Infezione acuta |
| + | - | + | Infezione acuta (fase tardiva) |
| + | + | - | Reinfezione o infezione senza formazione di IgM. |

| | | | |
|---|---|---|------------------------------------|
| + | - | - | Infezione superata o reinfezione |
| - | - | + | Fase precoce di un'infezione acuta |

9.7 Valutazione P1-EP1

| IgG | IgA | IgM | P1-EP1 | Interpretazione |
|-----|-----|-----|--------|--|
| - | - | - | + | Indicazione di infezione pregressa da <i>Mycoplasma pneumoniae</i> . |

9.8 Limiti del test

1. Un risultato negativo del blot non esclude completamente la possibilità di un'infezione da *Mycoplasma pneumoniae*. È possibile che il campione possa essere stato prelevato prima della comparsa degli anticorpi oppure che la concentrazione degli anticorpi sia inferiore al limite d'individuazione del test.
2. In rari casi i sieri dei pazienti possono presentare bande "inverse" (fondo scuro, bande bianche); non eseguire la valutazione di queste bande, poiché in questi casi l'immunoblot non è valutabile. Si raccomanda di controllare il siero con l'ausilio di altri opportuni metodi sierologici.

10. Bibliografia

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. 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. Schema di svolgimento del test

Esecuzione del test in breve:

| | | |
|-----------------------|--|---|
| Preincubazione | 30 minuti | 15 µl di siero/plasma del paziente / 100 µl di controllo in 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio |
| Lavaggio | 3 x 5 minuti | Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio |
| Incubazione coniugato | 30 minuti | Con 1,5 ml di diluizione d'uso (1 + 100) |
| Lavaggio | 3 x 5 minuti 1 x 1 minuto | Con 1,5 ml per campione di tampone di diluizione/lavaggio Con acqua distillata/deionizzata |
| Incubazione substrato | 10 ± 3 minuti | Con 1,5 ml per campione di soluzione per substrato |
| Arresto | 3 x senza incubazione intermedia | Con 1,5 ml per campione di acqua distillata/deionizzata. |

Tabella di diluizione coniugato: (valori arrotondati)

| Numero strisce | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 1,5ml | 3,0ml | 4,5ml | 6,0ml | 7,5ml | 9,0ml | 11,0ml | 12,0ml | 14,0ml | 15,0ml |
| coniugato Concentrato | 15µl | 30µl | 45µl | 60µl | 75µl | 90µl | 110µl | 120µl | 140µl | 150µl |
| Volumi finali | 1,515ml | 3,03ml | 4,545ml | 6,06ml | 7,575ml | 9,09ml | 11,11ml | 12,12ml | 14,14ml | 15,15ml |

| Numero strisce | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 17,0ml | 18,0ml | 20,0ml | 21,0ml | 23,0ml | 24,0ml | 26,0ml | 27,0ml | 29,0ml | 30,0ml |
| coniugato Concentrato | 170µl | 180µl | 200µl | 210µl | 230µl | 240µl | 260µl | 270µl | 290µl | 300µl |
| Volumi finali | 17,17ml | 18,18ml | 20,2ml | 21,21ml | 23,23ml | 24,24ml | 26,26ml | 27,27ml | 29,29ml | 30,3ml |

| Numero strisce | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 32,0ml | 33,0ml | 35,0ml | 36,0ml | 38,0ml | 39,0ml | 41,0ml | 42,0ml | 44,0ml | 45,0ml |
| coniugato Concentrato | 320µl | 330µl | 350µl | 360µl | 380µl | 390µl | 410µl | 420µl | 440µl | 450µl |
| Volumi finali | 32,32ml | 33,33ml | 35,35ml | 36,36ml | 38,38ml | 39,39ml | 41,41ml | 42,42ml | 44,44ml | 45,45ml |

| Numero strisce | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
|--------------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Tampone di diluizione/lavaggio | 47,0ml | 48,0ml | 50,0ml | 51,0ml | 53,0ml | 54,0ml | 56,0ml | 57,0ml | 59,0ml | 60,0ml |
| coniugato Concentrato | 470µl | 480µl | 500µl | 510µl | 530µl | 540µl | 560µl | 570µl | 590µl | 600µl |
| Volumi finali | 47,47ml | 48,48ml | 50,5ml | 51,51ml | 53,53ml | 54,54ml | 56,56ml | 57,57ml | 59,59ml | 60,6ml |