



SeroMP™ Recombinant IgA

Ensayo Inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) para la determinación semi-cuantitativa de anticuerpos IgA específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* en suero humano

Manual de Instrucciones

Ensayo para 96 determinaciones (Ref. 1263-01)

Para utilización en el diagnóstico *In Vitro*
Exclusivamente para uso profesional
Almacenar de 2-8°C. **No congelar**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 7761003
ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Uso

El ensayo SeroMP™ Recombinant IgA es un inmunoensayo semicuantitativo enzimático en fase sólida (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgA específicos frente a *Mycoplasma pneumoniae* en suero humano.

El kit de Savyon® SeroMP™ Recombinant IgA se utiliza como una herramienta en el diagnóstico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*.

Para uso en diagnóstico *In Vitro*.

Introducción

M. pneumoniae es un agente etiológico común de neumonía adquirida en la comunidad, a menudo caracterizado por una manifestación gradual de síntomas con dolor de cabeza, fiebre, malestar y más frecuentemente con tos seca. *M. pneumoniae* se presenta en grupos de todas las edades. Sin embargo, es más común en las dos primeras décadas de la vida y raramente se presenta en niños menores de cuatro años. Se ha publicado que *M. pneumoniae* es el responsable de hasta un 30% de todos los casos de neumonía (2).

M. pneumoniae ha sido también asociada con enfermedades no respiratorias como la meningitis, encefalitis, pancreatitis, pérdida de la capacidad auditiva neurosensorial y síndrome agudo de tallo cerebral (5). Debido a su frecuencia de aparición, se debe considerar una posible infección por *M. pneumoniae* en todos los casos de neumonía; pero teniendo en cuenta que estos mismos síntomas aparecen también en infecciones por diferentes

agentes, se requieren técnicas adicionales de diagnóstico, como la serología (3).

La técnica de ELISA es sensible y específica permitiendo la determinación diferencial de anticuerpos específicos del isotipo IgG, IgA e IgM (6).

Respecto al diagnóstico y tratamiento, la característica más prominente del MP es la carencia de una pared celular. Se ha demostrado que los polipéptidos presentes en la superficie activan la respuesta inmune, en particular aquellos que están involucrados en la unión al orgánulo del MP. Esta unión al orgánulo está compuesta por un complejo de polipéptidos, en el cual la Proteína Captesina P1 tiene una función principal. (1; 4; 10) Debido a su mayor inmunogenicidad, P1 es fundamental para ser utilizada como antígeno definitivo para el diagnóstico serológico de micoplasma, intentando mejorar el ensayo con varios parámetros. Una forma muy común de mejorar las características, usando polipéptidos altamente inmunogénicos como la P1, es incorporando esos polipéptidos en los tests como antígenos recombinantes. De hecho, varios polipéptidos han sido identificados en literatura, como buenos candidatos para este propósito. (9)

Los anticuerpos IgM específicos frente a *M. pneumoniae* aparecen al comienzo de la infección, alcanzando el pico de máxima expresión entre la primera y la cuarta semana, declinando a los pocos meses hacia niveles sin valor diagnóstico (7). Debido a la aparición temprana de anticuerpos IgM y a su vida media relativamente corta, su detección permite el diagnóstico de la infección aguda utilizando una única muestra de suero. Los pacientes jóvenes tienden a tener niveles de IgM más elevados que los adultos (8). Los niveles de IgG incrementan más lentamente que los de IgM, pero permanecen elevados durante mucho más tiempo; por lo que un incremento significativo entre dos muestras consecutivas, extraídas al menos con dos semanas de diferencia, puede indicar una infección reciente o una re-infección incluso en ausencia de IgM. Los anticuerpos IgA presentan niveles más elevados en pacientes con edad más avanzada (7) por lo que puede resultar más útil que la IgM para el diagnóstico de infección actual en pacientes adultos (8).

Savyon® Diagnostics Ltd. ha desarrollado un test semicuantitativo ELISA utilizando antígenos recombinantes para la detección de anticuerpos IgG e IgA y una mezcla de antígenos recombinantes y nativos para la detección de los anticuerpos IgM en sueros humanos.

The SeroMP™ Recombinant IgG, IgA and IgM permite la detección de infección temprana de *M. pneumoniae*.

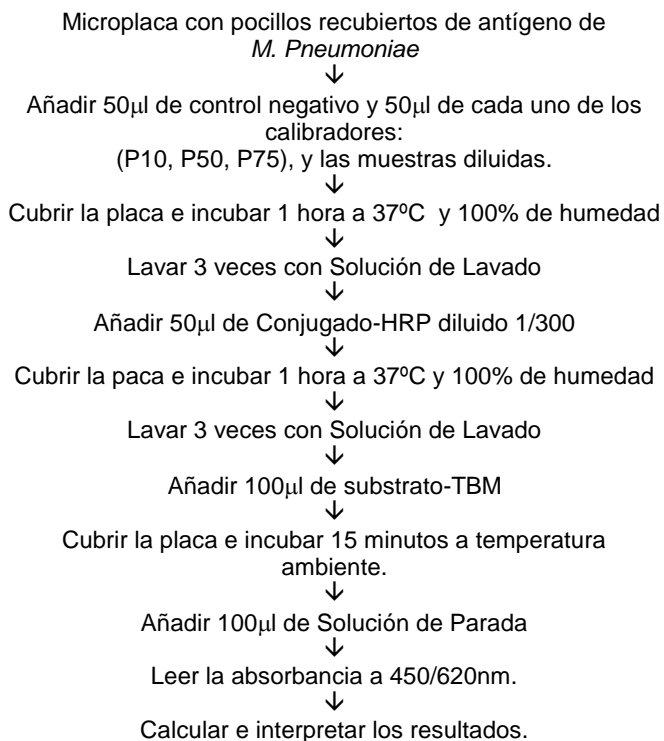
Principio del Ensayo

- La microplaca del kit SeroMP™ Recombinant está recubierta con antígenos recombinantes de *M. pneumoniae*.
- El suero a testar se diluye y se incuba en la microplaca de SeroMP™ Recombinant. En este paso, los anticuerpos específicos frente a *M. pneumoniae* se unen a los antígenos inmovilizados.
- Los anticuerpos no específicos, se eliminan por un paso de lavado.
- Se añade anti IgA humana marcada con peroxidasa (HRP). En este paso, el conjugado-HRP se une al complejo antígeno-anticuerpo previamente unido a la placa.
- El conjugado sin unir, se elimina por un paso de lavado.
- Tras la adición del substrato-TBM se hidroliza por acción de la peroxidasa, generándose un producto de

la reacción (substrato reducido) que confiere color azul a la solución.

- Tras la adición de la solución de parada el color azul vira a amarillo debiendo leerse en un lector de ELISA a longitud de onda de 450/620 nm.
- La absorbancia detectada, es proporcional al nivel de anticuerpos específicos que se han unido a los antígenos que recubren la placa.

Procedimiento del ensayo



Componentes del Ensayo

Ensayo para 96 determinaciones.

- Microplaca recubierta con antígeno de *M. pneumoniae*:** 96 pocillos divisibles (8x12) recubiertos con antígenos de *M. pneumoniae*, incluida en una bolsa de aluminio que contiene desecante.
1 Placa
- Solución de Lavado concentrada (20X):** Solución de PBS-Tween 20.
1 Botella, 100ml
- UniDiluent™ (amarillo):** Solución lista para el uso. Contiene Proclin como conservante, a concentración inferior a 0.05 %.
1 Botella, 60ml
- Control positivo:** Suero humano positivo a la presencia de anticuerpos IgA frente a *M.pneumoniae*. Contiene Proclin (< 0.05%) y azida sódica (< 0.1%) como conservantes.
1 Vial, 2.0ml
- Control Negativo:** Suero humano negativo a la presencia de anticuerpos IgA frente a *M. pneumoniae*. Contiene Proclin (<0.05%) y azida sódica (<0.1%) como conservantes.
1 Vial, 2.0ml

- Calibrador P10:** Suero humano con positividad baja para anticuerpos IgA frente a *M. pneumoniae*. Contiene 10 BU/ml (unidades arbitrarias de unión). Contiene Proclin (<0.05%) y azida sódica (<0.1%) como conservantes.
1 Vial, 2.0ml
- Calibrador P50:** Suero humano con positividad media para anticuerpos IgA frente a *M. pneumoniae*. Contiene 50 BU/ml (unidades arbitrarias de unión). Contiene Proclin (<0.05%) y azida sódica (<0.1%) como conservantes.
1 Vial, 2.0ml
- Calibrador P75:** Suero humano con positividad alta para anticuerpos IgA frente a *M. pneumoniae*. Contiene 100 BU/ml (unidades arbitrarias de unión). Contiene Proclin (<0.05%) y azida sódica (<0.1%) como conservantes.
1 Vial, 2.0ml
- Conjugado-HRP concentrado (300 X):** Anti IgA humana (específica de cadena α) conjugada con peroxidasa. Contiene Proclin como conservante (<0.05%).
1 Vial, 0.2ml
- Substrato-TMB:** Solución, lista para usar, que contiene 3', 5', 5'-tetrametilbencidina como cromógeno y peróxido como substrato.
1 Botella, 14ml
- Solución de Parada:** Solución lista para usar, que contiene H₂SO₄ 1M.
1 Botella, 15 ml
- Tapa para la microplaca:**
1 Unit
- Manual de Instrucciones:**
1

Material requerido que no se proporciona:

- Tubos de ensayo limpios para la dilución del suero de los pacientes.
- Tubos de plástico desechables para la dilución del conjugado-HRP concentrado.
- Micropipetas ajustables y pipeta multicanal (rangos 5-50, 50-200, 200-1000µl) y puntas desechables.
- Un frasco calibrado para un litro.
- Una probeta calibrada para 50ml
- Un frasco lavador
- Papel absorbente
- Agitador tipo vortex.
- Baño de agua con tapadera para 37°C, o cámara húmeda situada dentro de un incubador a 37°C.
- Lector de ELISA con filtros para 450 y 620nm.
- Agua destilada o doblemente desionizada.

Medidas de Seguridad

Para su utilización en el diagnóstico *In Vitro*

- Este kit contiene suero humano que ha sido testado por técnicas aprobadas por la FDA con resultado negativo para el antígeno del VHB y para anticuerpos frente a VHC y VIH 1 y 2. Ya que no se conoce ningún método que sea capaz de ofrecer una garantía completa de que los productos derivados de la sangre humana no transmiten infección, todos los componentes de la sangre humana que se suministran en este kit deben manipularse como si fueran muestras de sangre o de suero potencialmente infecciosas; de acuerdo con las

recomendaciones publicadas en el R.D. 664/1997 sobre Protección de los Trabajadores contra Riesgos relacionados con la Exposición a Agentes Biológicos en el Trabajo (manual CDC/NIH "Biosefty in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988").

2. La solución de sustrato-TMB, contiene un material irritante para la piel y para las membranas mucosas. Evitar el contacto directo.
3. Todos los componentes del ensayo, se han calibrado y examinado para cada lote. No se recomienda mezclar reactivos de diferentes lotes, ya que podría afectar a los resultados.
4. El ácido sulfúrico diluido (H_2SO_4 , 1M) es un agente irritante para los ojos y para la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con agua y solicitar atención médica.

Almacenamiento y vida media de los reactivos

1. Todos los componentes que se suministran, deberán almacenarse de 2-8°C. Los viales de reactivo sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. La exposición de los componentes del kit, durante algunas horas a temperatura ambiente, no provoca ninguna alteración sobre los reactivos.
NO CONGELAR!
2. Una vez que se abre el kit, tiene una vida media de 90 días.
3. Las filas de pocillos sin usar, deben guardarse en la bolsa de aluminio con el desecante en su interior, enrollándose por la parte del extremo abierto de la bolsa y cerrándose con cinta adhesiva a todo lo largo, procurando que la bolsa quede perfectamente sellada.
4. Durante el almacenamiento en frío, pueden formarse cristales en la solución de lavado concentrada 20x, siendo esto una reacción perfectamente normal. Volver a disolver los cristales, calentando la solución a 37°C antes de su dilución. La solución una vez diluida, puede almacenarse de 2-8°C hasta 21 días.

Preparación de las muestras

A partir de las muestras extraídas por técnicas estándar, preparar los sueros asépticamente. No deben utilizarse muestras de suero que hayan sido inactivadas por calor. No se recomienda la utilización de sueros lipémicos, turbios o contaminados. La presencia de partículas o precipitados en el suero, puede conducir a resultados erróneos. Se recomienda depurar las muestras por centrifugación o filtración antes de comenzar con el ensayo.

Almacenamiento

Las muestras deberían almacenarse de 2-8°C y ensayarse dentro de los siguientes 7 días (se recomienda añadir azida sódica al 0.1%). Si se precisan periodos prolongados de almacenamiento, alicuotar los sueros y guardar a -20°C, evitando ciclos repetidos de congelación y descongelación.

Procedimiento del Ensayo - Manual

Protocolo de automatización disponible bajo petición

A. Preparación de los Reactivos

1. Todos los reactivos y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente, antes de comenzar con el ensayo. Mezclar bien los calibradores (P10, P50, P75), el control negativo y las muestras de suero, antes de su utilización.
2. Calcular el número de muestras a ensayar. Además de las muestras, en cada ensayo se debe incluir: un pocillo para el blanco, un pocillo para el control negativo y tres pocillos para los calibradores.
3. Extraer la microplaca cortando la bolsa de aluminio por el extremo cercano al cierre. Colocar el número de filas necesarias (según el número de muestras a testar) en el soporte para la microplaca de 96 pocillos.
4. Diluir 1/20 la solución de lavado concentrada con agua destilada o doblemente desionizada. Por ejemplo, para preparar un litro de solución de lavado, añadir 50ml de la solución de lavado concentrada a 950ml de agua destilada o doblemente desionizada.

B. Incubación de las muestras de suero y de los controles

5. Diluir cada uno de los sueros de los pacientes 1:105 con el diluyente de suero proporcionado, Unidiluent™ como se indica a continuación: Añadir 10µl del suero del paciente a 200µl del Unidiluent (1/21); realizar una dilución posterior añadiendo 25µl de la dilución 1/21 a 100µl del diluyente del suero.
6. Añadir a pocillos respectivos, 50µl de muestra en blanco (diluyente del suero), del control negativo, de los tres calibradores (P10, P50, P75), y de las muestras de suero diluidas 1:105.
7. Cubrir las filas con una tapa e incubar durante 1 hora en una cámara húmeda a 37°C.
8. Eliminar el líquido contenido en los pocillos.
9. **Paso de lavado:** Llenar completamente cada uno de los pocillos y eliminar el líquido, repetir este paso tres veces.
10. Secar las filas y el soporte, invirtiéndolo sobre papel absorbente y golpeando suavemente.

C. Incubación con el conjugado

11. La dilución de trabajo del anticuerpo anti IgA humano conjugado con peroxidasa, deberá realizarse un poco antes de su utilización. Diluir 1/300 el anticuerpo concentrado anti IgA humana conjugado con peroxidasa, con diluyente del conjugado. Por ejemplo: Para dos filas de pocillos, preparar un mínimo de 3ml de conjugado como se indica a continuación: Mezclar 10µl del anticuerpo concentrado anti IgA humana conjugado con peroxidasa con 3ml del diluyente del conjugado.
12. Añadir 50µl del conjugado diluido a cada uno de los pocillos.
13. Cubrir las filas con una tapa e incubar durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.
14. Eliminar el líquido y lavar según se indica en los pasos 9-10.

D. Incubación con el sustrato-TMB

- Añadir 100µl del sustrato-TMB a cada pocillo, cubrir las filas con una tapa e incubar a temperatura ambiente durante **15 minutos**.
- Parar la reacción añadiendo 100µl de solución de parada (H₂SO₄, 1M) a cada pocillo.

E. Determinación de los resultados

- Determinar la absorbancia a 450/620nm y grabar los resultados. La determinación no deberá exceder en más de 30 minutos a la finalización de la reacción cromogénica.
 - Advertencia:** Debe eliminarse cualquier burbuja de aire antes de la lectura. Debe limpiarse cuidadosamente el fondo de la placa de ELISA.

Validación del ensayo

Para que el ensayo se considere como válido, deben cumplirse los siguientes criterios de validación. En el caso de que no se cumplieren, el ensayo no debería considerarse como válido y debería repetirse.

- O.D._{P75} > **0.9**
- Relación: O.D._{P10} / O.D._{CN} > **1.5**
- Relación: O.D._{P50} / O.D._{CN} > **4**
- Relación: O.D._{P75} / O.D._{CN} > **5**
- PC debería ser ≥ 40 BU/ml

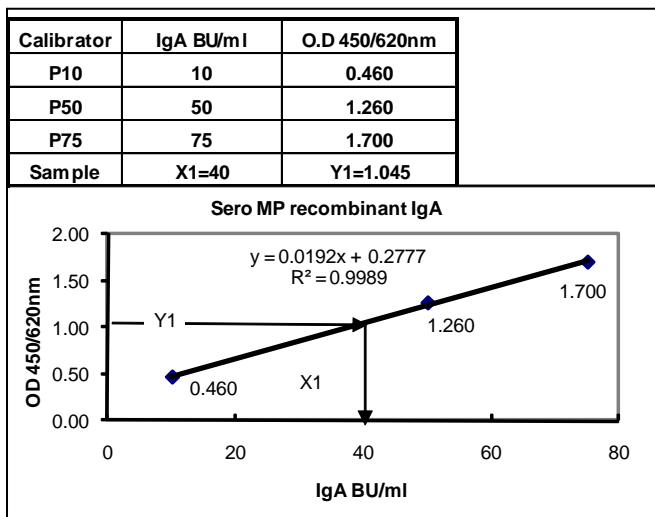
Cálculo de los Resultados

Método manual utilizando papel milimetrado:

- Situar los valores de la absorbancia (OD) de los tres calibradores (P10, P50 y P75) en el eje Y frente a sus concentraciones correspondientes (BU/ml) en el eje X.
- Dibujar la línea recta que se ajuste mejor a los tres puntos.
- Extrapolar la concentración de cada una de las muestras (en BU/ml) a partir de la curva estándar, utilizando los valores de las absorbancias (ver ejemplo 1).

Ejemplo 1: Interpolación de los resultados:

El valor de la absorbancia de la muestra se sitúa en el eje Y, y se dibuja a partir de este punto una línea horizontal hasta la curva de calibración. Se dibuja una línea vertical desde el punto de corte hacia el eje X. Leer la concentración en BU/ml de la muestra indicada en el eje X.



Interpretación de los Resultados

IgA BU/ml	Resultado	Interpretación diagnóstica
< 10 BU/ml	Negativo Anticuerpos IgA no detectados	No hay indicación de infección por <i>M. pneumoniae</i>
≥ 10 BU/ml	Positivo Nivel relevante de anticuerpos IgA	Indicación de infección actual o crónica por <i>M. pneumoniae</i>

Se deberá realizar un ensayo para IgM e IgG con el objeto de conseguir un perfil completo de los anticuerpos.

Interpretación de los resultados basados en la combinación de anticuerpos IgM, IgG e IgA

Nivel de anticuerpos frente a <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	
Negativo	Negativo	Negativo	Sin indicar infección por <i>M.pneumoniae</i>
Negativo o Positivo	Positivo	Negativo o Positivo	Indicativo de infección actual
Positivo	Negativo	Negativo	Indicativo de infección pasada
Negativo o Positivo	Negativo	Positivo	Indicativo de infección actual (Re-infección)

Realización del test

Efecto del antígeno recombinante comparado con el nativo para IgA, en pacientes con neumonía

	Grupo	% Antígeno Nativo	% Antígeno Recombinante
IgA N=91	Positivo	44	58
	Límite	16	0
	Negativo	40	42

The effect of recombinant based-antigen compared to native based-antigen in IgA, in a healthy population

	Grupo	% Antígeno Nativo	% Antígeno Recombinante
IgA N=91	Positivo	7	4
	Límite	13	0
	Negativo	80	96

- En los pacientes con neumonía – la tasa de positivos es mayor y las muestras límite dan valor 0 en el test recombinante.
- En la población sana – la tasa de positivos es más baja y las muestras límite dan valor 0 en el test recombinante.

Realización del test Savyon® SeroMP™ Recombinant basado en la detección de IgG, IgA e IgM comparado con la realización de un test recombinante respectivo comercial*

	Grupo (N)	% POS. SeroMP Recombinant	% POS. Commercial MP
IgG	Población sana (30)	20	40
	Pacientes con neumonía (61)	32.8	36.1
IgA	Población sana (30)	6.6	3.3, 6.6 (BL)
	Pacientes con neumonía (61)	55.7	42.6
IgM	Población sana (30)	6.6	3.3
	Pacientes con neumonía (56)	64.2	44.6, 18 (BL)

- Mayor sensibilidad de SeroMP recombinant en pacientes con neumonía que experimentan infecciones agudas o crónicas, como se representa mediante los resultados de IgM e IgA.
- El predominio entre la población sana es más bajo con el ensayo de Savyon Sero MP recombinant.
- La discriminación entre pacientes enfermos y población sana en los casos agudos y en las infecciones actuales serán más grandes con SeroMP recombinant

*Estudio casero

Reacción cruzada

Pacientes hospitalizados con infecciones en el tracto respiratorio a causa de patógenos como: *Chlamydia pneumoniae*, *Influenza A.*, *Influenza B.*, *Parainfluenza 1,2 y 3* así como *Adenovirus* y *EBV* según diagnóstico por kits serológicos comerciales, fueron evaluados también con el ensayo SeroMP. La mayoría de los sueros fueron encontrados negativos, no habiendo detección significativa de reacción cruzada.

Precisión

Intra-Ensayo (ensayo simultáneo):

Muestra	No. de Repeticiones	Valor Medio	CV%
Positivo	10	1.262	5.0
Negativo	10	0.210	9.9

Inter-ensayo (ensayos repetidos):

Muestra	No. de Repeticiones	Valor Medio	CV%
Positivo	10	1.015	3.7
Negativo	10	0.224	5.4

Limitaciones del Ensayo

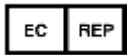
1. No debe realizarse únicamente un ensayo serológico para establecer un diagnóstico final. Deben tenerse en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.
2. Las muestras extraídas tempranamente en una infección primaria, pueden no contener cantidades detectables de anticuerpo. Si se sospecha una infección por *Mycoplasma*, se deberá extraer una segunda muestra transcurridas 2-4 semanas y ensayarse en paralelo con la muestra original.
3. Sustancias que interfieren: No se recomienda la utilización de sueros lipémicos, turbios o contaminados. La presencia de partículas o precipitados en el suero, puede conducir a resultados erróneos. Se recomienda clarificar las muestras por centrifugación o filtración antes de comenzar con el ensayo.

Referencias

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., Leioninen M., Horowitz O., Manor E. and Porath A. (1996) Multiple pathogens in adult patients admitted with Community - acquired *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.

CE



Representante Europeo Autorizado: 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

	Control de Temperatura
	Consultar manual de instrucciones
	Dispositivo para diagnóstico médico <i>In Vitro</i>
	Fabricante
	Representante Europeo Autorizado.