



## SeroMP™ Recombinant IgM

Test Immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa di anticorpi specifici per *Mycoplasma pneumoniae* nel siero umano.

### Istruzioni per l'uso

Kit per 96 determinazioni  
Catalogo No. 1262-01

Per uso diagnostico **In Vitro**  
Solo per uso professionale  
Conservare a 2-8°C. **Non congelare**



**Savyon® Diagnostics Ltd.**

3 Habosem St. Ashdod 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: [support@savyondiagnosics.com](mailto:support@savyondiagnosics.com)

### Applicazioni

SeroMP™ Recombinant IgM è un test immunoenzimatico (ELISA) qualitativo per la determinazione di anticorpi IgM specifici per *Mycoplasma pneumoniae* nel siero umano. Il test consente anche la diagnosi di infezione corrente determinando il livello di anticorpi IgM in un singolo campione.

Per uso diagnostico *in vitro*.

### Introduzione

*M. pneumoniae* è un comune agente eziologico di polmonite acquisita in comunità, spesso caratterizzata da graduale insorgenza di mal di testa, febbre, malessere e, più tipicamente, tosse secca. *M. pneumoniae* è comune a tutte le età, tuttavia è più comune nelle prime due decadi di vita ed è raro nei bambini sotto i 4 anni. *M. pneumoniae* è stato indicato come causa di fino al 30% di tutti i casi di polmonite (2).

*M. pneumoniae* è anche stato associato a malattie non respiratorie come meningite, encefalite, pancreatite, perdita di udito sensoriale e sindrome acuta del tronco cerebrale (5).

Data la sua prevalenza, si dovrebbe considerare *M. pneumoniae* in tutti i casi di polmonite, ma, essendo i sintomi uguali per agenti diversi, sono necessari mezzi diagnostici aggiuntivi, quali i test serologici (3).

La tecnica ELISA è sensibile, specifica e consente la determinazione differenziale di anticorpi IgG, IgA e IgM (6).

Per quanto riguarda la diagnosi e il trattamento, la caratteristica strutturale più importante di MP è l'assenza di una parete cellulare. È stato osservato che i polipeptidi esposti sulla superficie scatenano una risposta immunogena, in particolare quelli coinvolti negli organelli di adesione di MP. Questa struttura di adesione è formata da un complesso di polipeptidi, in cui la proteina citoadesina P1 riveste il ruolo più importante (1; 4; 10). Grazie alla sua elevata immunogenicità, P1 funge da modello per l'utilizzo di un antigene specifico nei sistemi diagnostici su base sierologica, nel tentativo di migliorare vari parametri del test. Un metodo comune per migliorare le caratteristiche dei test usando polipeptidi altamente immunogeni quali la P1, è l'incorporazione di questi polipeptidi nei test come antigeni ricombinanti. In effetti, in letteratura sono stati identificati vari polipeptidi che possono essere utilizzati per questo scopo (9).

Gli anticorpi IgM specifici per *M. pneumoniae* aumentano rapidamente dopo l'esordio della malattia, raggiungono livelli di picco dopo 1-4 settimane, poi si riducono fino a livelli non significativi dal punto di vista diagnostico entro alcuni mesi (7). Grazie alla precoce apparizione e all'emivita relativamente breve degli anticorpi IgM, il loro rilevamento permette di diagnosticare un'infezione acuta usando un solo campione di siero. I pazienti giovani tendono ad avere livelli di IgM superiori rispetto agli adulti (8). I livelli di IgG aumentano più lentamente rispetto a quelli di IgM, ma restano elevati molto più a lungo, per cui un aumento significativo in due campioni consecutivi prelevati a 2 settimane di distanza, può indicare un'infezione in atto o una reinfezione anche in assenza di IgM. Nei pazienti più anziani si osservano valori superiori di anticorpi IgA (7), che possono essere più utili delle IgM per diagnosticare un'infezione in atto negli adulti (8).

Savyon® Diagnostics Ltd. ha sviluppato kit semi-quantitativi che utilizzano antigeni ricombinanti in test ELISA IgG e IgA, e un kit qualitativo che utilizza una miscela di antigeni ricombinanti e nativi nel test ELISA IgM, che permette di seguire le variazioni dei livelli anticorpali nei sieri umani.

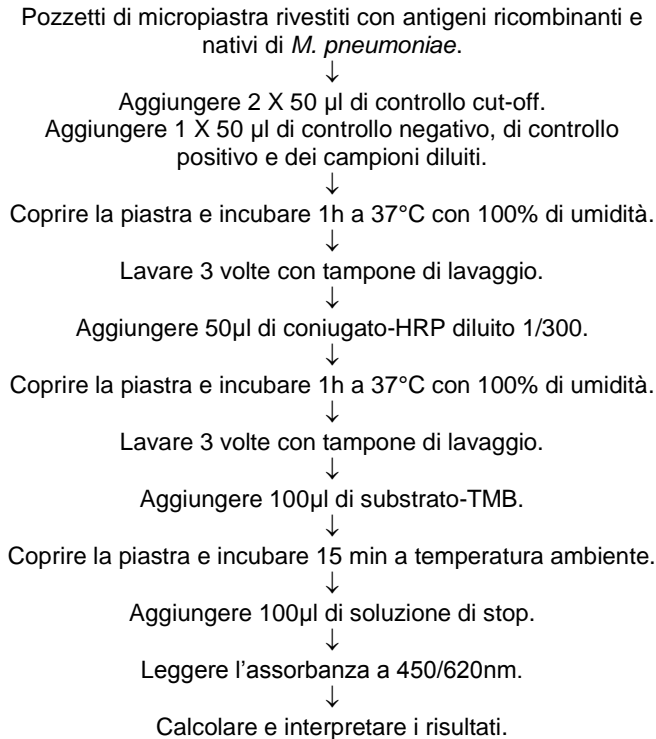
I test SeroMP™ Recombinant consentono la determinazione precoce e accurata di anticorpi specifici IgG, IgA e IgM per *M. pneumoniae*.

### Principio del Test

- Le micropiastre SeroMP™ Recombinant sono rivestite con una frazione purificata di proteine di membrana di *M. pneumoniae* e antigeni ricombinanti.
- Il siero da analizzare viene diluito e incubato nella micropiastro. In questo passaggio gli anticorpi specifici per *M. pneumoniae* si legano agli antigeni immobilizzati.
- Gli anticorpi non specifici vengono rimossi lavando.
- Si aggiungono anticorpi anti-IgM umane coniugati con perossidasi di rafano (HRP). In questo passaggio il coniugato-HRP si lega al complesso antigene-anticorpo già legato.
- Il coniugato non legato viene rimosso lavando.
- All'aggiunta del substrato-TMB, il substrato viene idrolizzato dalla perossidasi, producendo una soluzione blu di substrato ridotto.
- Dopo aggiunta di soluzione di stop, il colore blu vira al giallo e viene letto su un lettore ELISA a 450/620nm.

- L'assorbanza è proporzionale ai livelli di anticorpi specifici legati agli antigeni fissati sulla micropiastra.

### Procedimento del Test



### Contenuto del Kit

#### Kit per 96 Determinazioni

1. **Micropiastra rivestita con antigene *M. pneumoniae*:** 96 pozzetti separabili (8x12) rivestiti con antigeni ricombinanti e nativi di *M. pneumoniae*, confezionati in busta di alluminio con desiccante.  
**1 piastra**
2. **Tampone di lavaggio concentrato (20X):** Un tampone PBS-Tween.  
**1 flacone, 100 ml**
3. **UniDiluent (giallo):** Soluzione tampone pronta per l'uso. Contiene meno di 0,05% di Proclin come conservante.  
**1 flacone, 60 ml**
4. **Diluyente del siero con IgM (arancio):** Una soluzione tampone pronta per l'uso di anti-IgG humane. Contiene meno di 0,05% di Proclin come conservante.  
**2 flaconi, 60 ml**
5. **Controllo positivo:** Un siero umano positivo per IgM anti-*M. pneumoniae*. Contiene meno di 0,05% di Proclin e meno di 0,1% di sodio azide come conservanti.  
**1 flacone, 2,0 ml**
6. **Controllo negativo:** Un siero umano negativo per IgM anti-*M. pneumoniae*. Contiene meno di 0,05% di Proclin e meno di 0,1% di sodio azide come conservanti.  
**1 flacone, 2,0 ml**

7. **Controllo cut-off:** Siero con IgM anti-*M. pneumoniae* pronto per l'uso, usato per la determinazione del cut-off. Contiene meno dello 0,1% di sodio azide e meno dello 0,05% di Proclin come conservanti.  
**1 flacone, 2,5 ml**
8. **Coniugato-HRP concentrato (300X):** Anticorpi anti-IgM umane coniugati con perossidasi di rafano (HRP) (specifiche per catena µ). Contiene meno di 0,05% di Proclin come conservante.  
**1 flacone, 0,2 ml**
9. **Substrato-TMB:** Una soluzione pronta per l'uso. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina come cromogeno e perossido di idrogeno come substrato.  
**1 flacone, 14 ml**
10. **Soluzione di stop:** Una soluzione pronta per l'uso. Contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.  
**1 flacone, 15 ml**
11. **Copripiastra**  
**1 unità**
12. **Istruzioni per l'Uso**  
**1**

### Materiali Richiesti ma non forniti

1. Provette pulite per la diluizione dei sieri dei pazienti.
2. Provetta di plastica monouso per la diluizione del coniugato concentrato.
3. Micropipette regolabili e multicanale (5-50, 50-200 e 200-1000µl) e puntali monouso.
4. Beuta graduata da un litro.
5. Cilindro graduato da 50ml.
6. Spruzzetta.
7. Carta assorbente.
8. Agitatore Vortex.
9. Bagnomaria a 37°C con coperchio o camera umida in un termostato a 37°C
10. Lettore ELISA con filtri a 450 e 620nm.
11. Acqua distillata o bi-deionizzata.

### Avvertenze e precauzioni

#### Per Uso Diagnostico in Vitro

1. Questo kit contiene siero umano che è stato testato con metodiche approvate da FDA e CE, ed è risultato negativo per l'antigene HBV e per anticorpi contro HCV e HIV-1&2. Poiché nessun metodo conosciuto può dare assicurazione totale che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano infezioni, tutti i componenti derivati da sangue umano forniti in questo kit devono essere maneggiati come siero o sangue potenzialmente infettante, secondo le raccomandazioni pubblicate nel manuale del CDC/NIH "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories", 1988.
2. La soluzione substrato-TMB è irritante per la pelle e le membrane mucose. Evitare il contatto diretto.
3. Tutti i componenti di questo kit sono stati calibrati e analizzati per lotto. Non è raccomandabile mescolare componenti da lotti diversi in quanto può influenzare i risultati.
4. La soluzione di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) è irritante per gli occhi e per la pelle. In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

## Conservazione e stabilità dei reagenti

1. Tutti i reagenti forniti devono essere conservati a 2-8°C. I flaconi non aperti sono stabili fino alla scadenza indicata in etichetta. L'esposizione di componenti ancora sigillati a temperatura ambiente per alcune ore non causa danno ai reagenti contenuti. **NON CONGELARE!**
2. Una volta aperto il kit ha una scadenza di 90 giorni.
3. Le strisce di pozzetti non utilizzate vanno risigillate nella busta di alluminio con il dessiccante, arrotolando l'estremità aperta e sigillando l'intera larghezza dell'apertura con nastro adesivo.
4. Cristalli possono formarsi nel tampone di lavaggio concentrato (20X) durante la conservazione refrigerata; ciò è perfettamente normale. Ridisciogliere i cristalli riscaldando il tampone a 37°C prima di diluire. La soluzione può essere conservata a 2-8°C fino a 21 giorni.

## Prelievo dei Campioni di Siero

Preparare i sieri da campioni raccolti asepticamente usando metodiche standard. Non usare siero inattivato al calore. L'uso di sieri lipemici, torbidi o contaminati non è raccomandabile. Materiale particolato e precipitato nel siero può causare risultati erronei. Tali campioni devono essere chiarificati per centrifugazione o filtrazione prima del test.

## Conservazione

I campioni devono essere conservati a 2-8°C e analizzati entro 7 giorni (si raccomanda di aggiungere sodio azide 0,1%). Se si prevede una conservazione più lunga, aliquotare e conservare i campioni sotto -20°C. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

## Procedimento del Test - Manuale

### Protocollo di automazione disponibile su richiesta

#### A. Preparazione dei Reagenti

1. Portare tutti i componenti e i campioni a temperatura ambiente. Miscelare bene il controllo cut-off, il controllo negativo, il controllo positivo e i campioni clinici prima dell'uso.
2. Determinare il numero totale di campioni da analizzare. In aggiunta ai campioni, includere ogni volta: due pozzetti di controllo cut-off, un pozzetto di controllo negativo ed uno di controllo positivo.
3. Estrarre la micropiastra dalla sua busta di alluminio tagliando un'estremità vicino al sigillo. Lasciare le strisce necessarie (secondo il numero di campioni da analizzare) nel portapiastra da 96 pozzetti.
4. Diluire il tampone di lavaggio concentrato 1/20 con acqua bi-deionizzata o distillata. Ad esempio per preparare un litro di tampone di lavaggio, aggiungere 50ml del tampone di lavaggio concentrato a 950ml di acqua distillata o bi-deionizzata.

#### B. Incubazione dei campioni di siero e dei controlli

5. Diluire ogni campione 1/105 come segue: aggiungere 10 µl di siero a 1040 µl di Diluente del Siero-IgM.  
**Nota: Il diluente del siero con IgM contiene IgG anti-immunoglobuline umane e viene usato per la rimozione degli anticorpi IgG e del RF dal siero umano.**
6. Distribuire 50µl di controllo negativo, 50µl di controllo positivo, controllo cut-off in duplicato e campioni di siero diluiti 1/105 nei rispettivi pozzetti.
7. Coprire le strisce con un copripiastra e incubare 1h a 37°C in una camera umida.
8. Eliminare il liquido contenuto nei pozzetti.
9. **Lavaggio:** Riempire ciascun pozzetto con tampone di lavaggio (300-350µl) ed eliminare il liquido. Ripetere questo passaggio due volte per un totale di tre lavaggi.
10. Asciugare strisce e portapiastra scuotendole con attenzione su carta assorbente pulita.

#### C. Incubazione con il coniugato

11. Il coniugato-HRP concentrato deve essere diluito a soluzione di lavoro subito prima dell'uso. Diluire 1/300 il coniugato-HRP concentrato con UniDiluent. Per esempio, per due strisce preparare un minimo di 3ml di coniugato-HRP diluito (10µl di coniugato-HRP concentrato mescolato con 3ml di UniDiluent).
12. Dispensare 50µl di coniugato diluito in ciascun pozzetto.
13. Coprire le strisce con un copripiastra e incubare 1h a 37°C in una camera umida.
14. Eliminare il liquido e lavare come descritto ai punti 9-10.

#### D. Incubazione con il substrato-TMB

15. Dispensare 100µl di substrato-TMB in ogni pozzetto coprire le strisce e incubare a temperatura ambiente per **15 minuti**.
16. Arrestare la reazione aggiungendo 100µl di soluzione di stop (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M) in ogni pozzetto.

#### E. Determinazione dei Risultati

17. Determinare l'assorbanza a 450/620nm e registrare i risultati. La lettura non deve essere fatta oltre i 30 minuti dall'arresto della reazione cromogena.

**Nota: Qualsiasi bolla d'aria deve essere rimossa prima della lettura. Il fondo della piastra ELISA deve essere pulito con cura.**

## Validazione del Test

Perché il test sia valido devono essere rispettati i seguenti criteri. Se i seguenti criteri non sono rispettati il test va considerato non valido e deve essere ripetuto.

1. O.D.<sub>PC</sub> ≥ **1,0**.
2. Rapporto: O.D.<sub>PC</sub> / O.D.<sub>COC</sub> > **2**.
3. O.D.<sub>NC</sub> < **0,3**.

### Calcolo dei Risultati

1. Il valore medio di assorbanza del controllo cut-off deve essere calcolato su due replicati.
2. Per normalizzare i risultati ottenuti in test differenti, l'indice di cut-off (COI) viene calcolato in base alla formula seguente:

$$\text{COI} = \frac{\text{O.D. del campione di siero}}{\text{O.D. media del controllo cut-off}} \times 10$$

### Interpretazione dei Risultati

IgM COI	Risultato	Interpretazione Diagnostica
< 10	<b>Negativo</b> Anticorpi IgM non rilevabili	<b>Nessuna indicazione di infezione da <i>M. pneumoniae</i></b>
10-11	<b>Dubbio</b>	<b>Impossibile determinare la presenza o l'assenza di IgM anti-<i>M. pneumoniae</i>. Si richiede l'analisi di un secondo campione dopo 14-21 giorni. Se anche il secondo campione risulta dubbio il risultato è da considerarsi negativo</b>
> 11	<b>Positivo</b> Rilevanti livelli di anticorpi IgM	<b>Indicazione di infezione in atto da <i>M. pneumoniae</i></b>

**Per ottenere un profilo anticorpale più completo si devono rilevare anche IgA e IgG**

**Interpretazione dei risultati basata sulla rilevazione combinata di anticorpi IgM, IgG e IgA.**

Livello anticorpi anti- <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	
Negativo	<b>Negativo</b>	Negativo	<b>Nessuna indicazione di infezione da <i>M. pneumoniae</i></b>
Negativo o positivo	<b>Positivo</b>	Negativo o positivo	<b>Indicazione di infezione in atto</b>
Positivo	<b>Negativo</b>	Negativo	<b>Indicazione di infezione progressa</b>
Negativo o positivo	<b>Negativo</b>	Positivo	<b>Indicazione di infezione in atto o reinfezione</b>

### Prestazioni del test

**Prestazioni del test Savyon® SeroMP™ Recombinant basato sulla rilevazione di IgG, IgA e IgM in confronto a quelle di un kit commerciale che usa tecnologia ricombinante.\***

	Gruppo (N)	% di positivi, SeroMP Recombinant	% di positivi, kit commerciale MP
IgG	Popolazione sana (30)	20	40
	Pazienti con polmonite (61)	32,8	36,1
IgA	Popolazione sana (30)	6,6	3,3 - 6,6 (dubbi)
	Pazienti con polmonite (61)	55,7	42,6
IgM	Popolazione sana (30)	6,6	3,3
	Pazienti con polmonite (56)	64,2	44,6 - 18 (dubbi)

- Sensibilità più elevata del test SeroMP Recombinant nei pazienti affetti da polmonite cronica o acuta, come appare dai risultati di IgM e IgA.
- La prevalenza all'interno della popolazione sana è inferiore per il test Savyon SeroMP Recombinant.
- La discriminazione tra pazienti malati e popolazione sana è migliore per il test SeroMP Recombinant in caso di infezione acuta in atto.

\* Studio interno.

### Reattività Crociata

Pazienti ospedalizzati, infettati con patogeni del tratto respiratorio (*Chlamydia pneumoniae* ed EBV) diagnosticati con kit serologici commerciali, sono stati testati anche con il kit SeroMP. La maggior parte dei sieri è risultata negativa, non si è rilevata alcuna reattività crociata significativa.

### Precisione

#### Intra-saggio (ripetibilità)

Campione	Numero di replicati	Valore Medio	CV%
Positivo	10	2,164	4,7
Negativo	10	0,159	13,0

#### Inter-saggio (riproducibilità)

Campione	Numero di replicati	Valore Medio	CV%
Positivo	10	1,196	4,9
Negativo	10	0,252	7,3

## Limiti del Test

1. Nessun singolo test serologico deve essere usato per la diagnosi finale. Tutti i dati clinici e di laboratorio dovrebbero essere considerati.
2. I campioni ottenuti troppo precocemente durante un'infezione primaria possono non contenere anticorpi rilevabili. Se si sospetta infezione da *Mycoplasma*, si deve fare un secondo prelievo 2-4 settimane più tardi per analizzarlo in parallelo al campione originale.
3. Sostanze interferenti: l'uso di sieri lipemici, torbidi o contaminati non è raccomandabile. Il materiale particolato e i precipitati nel siero possono causare risultati erranei. Tali campioni devono essere chiarificati per centrifugazione o filtrazione prima del test.

## Bibliografia

1. Jacobs, E., A. Bennowitz, 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 - 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 Bicrobiol 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 Sensorimeural 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



**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](mailto:mail@obelis.net)

	Limite di temperatura
	Consultare le istruzioni prima dell'uso
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Produttore
	Rappresentante europeo autorizzato