



## SeroMP™ Recombinant IgM

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

### Manual de Instrucciones

Ensayo para 96 determinaciones  
(Ref. 1262-01)

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 77610

ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

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

### Aplicaciones

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

Este ensayo posibilita el diagnóstico temprano con una sola muestra de suero, por medio de la determinación de anticuerpos IgM.

Para uso exclusivo en el 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).

También se ha asociado a *M. pneumoniae* 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 cuál la Proteína Captosina 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.

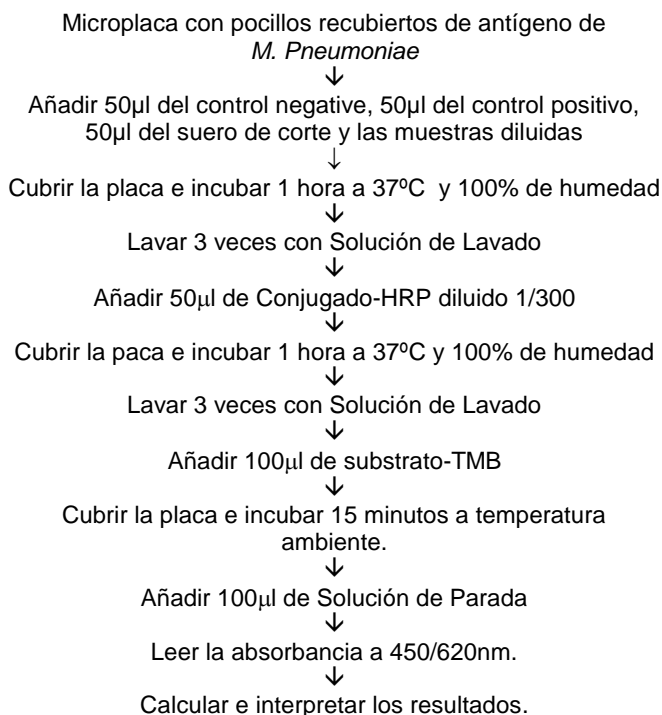
El kit SeroMP™ Recombinant IgG, IgA and IgM permite la detección de infección temprana de *M. pneumoniae*.

### Principio del Ensayo

- La microplaca del kit SeroMP™ Recombinant está recubierta con la fracción de proteínas de membrana y 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 IgM 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 450/620nm.
- 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**
- Diluyente del suero – IgM (naranja):** Anti-IgG humana en tampón, listo para usar (**IgG/Rf Stripper**). Contiene menos de 0.05% Proclin como preservativo.  
**2 Botellas, 60ml**
- Control Positivo:** Suero humano positivo a la presencia de anticuerpos IgM 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 IgM frente a *M. pneumoniae*. Contiene Proclin (<0.05%) y azida sódica (<0.1%) como conservantes.  
**1 Vial, 2.0ml**

- Control de corte:** Suero de anticuerpos IgM de *M. pneumoniae* IgM, usado para la determinación del punto de corte. Contiene Proclin (<0.05%) y azida sódica (<0.1%) como conservantes.  
**1 Vial, 2.5ml**
- Conjugado-HRP concentrado (300 X):** Anti IgM humana (específica de cadena µ) conjugada con peroxidasa.  
**1 Vial, 0.2ml**
- Substrato-TMB:** Solución, lista para usar, que contiene 3',3',5',5'-tetrametilbencidina como cromógeno y peróxido como sustrato.  
**1 Botella, 14ml**
- Solución:** A ready-to-use solution. Contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M.  
**1 Botella, 15ml**
- Tapa para la microplaca:**  
**1 unidad**
- 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 "Bioafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988").
- La solución de substrato-TMB, contiene un material irritante para la piel y para las membranas mucosas. Evitar el contacto directo.
- 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.
- El ácido sulfúrico diluido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 el control negativo, positivo y de corte, 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 positivo, respectivamente y dos pocillos para el control de corte.
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. Diluya el suero de cada paciente 1/105 de la siguiente manera: Añada 10 µl de suero del paciente a 1040 µl de Diluyente de Suero.  
**Nota: El diluyente de suero IgM contiene anti-IgG humana para la eliminación de anticuerpos IgG y del FR del suero humano.**
6. Dispensar: 50µl de Control Negativo; 50µl de Control Positivo; Control de Cut Off por DUPLICADO; y las muestras de suero diluidas 1:105 a pocillos separados de la tira del ensayo.
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 concentrado de anti IgM humana conjugado con peroxidasa a la dilución de trabajo, deberá realizarse poco antes de su utilización. Diluir 1/300 el concentrado de anti IgM humana conjugado con peroxidasa, con el UniDiluent. 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 IgM 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

15. Añadir 100µl del sustrato-TMB a cada pocillo, cubrir las filas con una tapa e incubar a temperatura ambiente durante **15 minutos**.
16. Parar la reacción añadiendo 100µl de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1M) a cada pocillo.

### E. Determinación de los resultados

17. 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.

1. O.D.<sub>CP</sub> ≥ 1.0
2. Relación O.D.<sub>CP</sub>/ O.D.<sub>control de corte</sub> > 2
3. O.D.<sub>CN</sub> < 0.3

### Cálculo de resultados

1. Calcular la media de los valores del control de corte.
2. Para normalizar los resultados obtenidos en diferentes tests, se calcula el índice del control de corte (COI), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{COI} = \frac{\text{OD de la muestra}}{\text{OD de la media del control de corte}} \times 10$$

### Interpretación de los Resultados

IgM COI	Resultado	Interpretación Diagnóstica
< 10	<b>Negativo</b> Nivel no detectable de anticuerpos IgM	<b>No hay indicación de infección por <i>M. pneumoniae</i></b>
10-11	<b>Límite</b>	<b>La presencia o ausencia de niveles detectables (límite) de anticuerpos IgM frente a <i>M. pneumoniae</i> no se puede determinar. Ensayar una segunda muestra, tomada de dos a tres semanas más tarde. (Cuando la segunda muestra de un resultado límite, deberá ser considerada como negativa)</b>
>11	<b>Positivo</b> Nivel relevante de anticuerpos IgM	<b>Indicativo de infección actual por <i>M. pneumoniae</i></b>

Se deberá realizar un ensayo para IgG e IgA 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	<b>Negativo</b>	Negativo	<b>Sin indicar infección por <i>M. pneumoniae</i></b>
Negativo o Positivo	<b>Positivo</b>	Negativo o Positivo	<b>Indicativo de infección actual</b>
Positivo	<b>Negativo</b>	Negativo	<b>Indicativo de infección pasada</b>
Negativo o Positivo	<b>Negativo</b>	Positivo	<b>Indicativo de infección actual o reinfección</b>

### Realización del test

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

	Grupo (N)	% POS SeroMP Recombinant	% POS. Comercial MP
IgG	Población sana (30)	20	40
	Pacientes con neumonía (61)	32.8	36.1
IgA	Healthy Population (30)	6.6	3.3, 6.6 (BL)
	Pneumonia Patients (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

### Reactividad Cruzada

Pacientes hospitalizados con infecciones en el tracto respiratorio a causa de agentes patógenos como: *Chlamydia pneumoniae* y *EBV*, los cuales también se diagnostican mediante kits serológicos fueron evaluados también con el kit de SeroMP Recombinant. La mayoría de los sueros dieron negativo, no habiendo detección significativa de reacción cruzada.

### Precisión

Intra-ensayo (ensayo simultáneo):

Muestra	No. de Repeticiones	Promedio	CV%
Positivo	10	2.164	4.7
Negativo	10	0.159	13.0

Inter-ensayo (ensayos repetidos):

Muestra	No. de Repeticiones	Promedio	CV%
Positivo	10	1.196	4.9
Negativo	10	0.252	7.3

## 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.

## Bibliography

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. Epidemiol.* 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.



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

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