

ImmunoCard[®] MYCOPLASMA

A Rapid Enzyme Immunoassay for the Detection of IgM to *Mycoplasma pneumoniae* in Human Serum

REF 709030

IVD

Rx Only

INTENDED USE

The ImmunoCard Mycoplasma enzyme immunoassay (EIA) is an in vitro qualitative procedure for the detection of IgM to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. Test results are intended to aid in the diagnosis of recent *Mycoplasma pneumoniae* infection.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Mycoplasma pneumoniae is a member of a group of degenerate bacteria lacking a cell wall.¹ *M. pneumoniae* was the first human pathogen identified in the group and causes up to 20% of all cases of pneumonia.^{1,2} Mycoplasmal pneumoniae presents with flu-like symptoms,³ however unlike most viral and bacterial pneumonias, mycoplasmal pneumoniae is more gradual in both presentation and recovery. *M. pneumoniae* infections are usually grouped in the category of atypical pneumonia. Examples of other organisms which cause atypical pneumonia are influenza (A and B), respiratory syncytial virus, adenovirus, parainfluenza, cytomegalovirus, *Chlamydia*, *Legionella*, *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides immitis*.³ *M. pneumoniae* disease progression is usually limited to the respiratory system from the naso-pharynx through bronchioles; resulting in widely varying symptoms more consistent with bronchitis than pneumonia. Antibiotics may ameliorate symptoms, however organism can often be cultured from patients following antibiotic regimes. Asymptomatic (silent) infections may occur in adults and account for up to 20% of *M. pneumoniae* infections.⁴

M. pneumoniae is endemic, with minimal seasonal variation (small increases in the late summer/early fall).^{2,5} Incidence overall ranges from 0.5 to 5.0 per 1,000 population or up to 20% of all pneumonias. Incidence peaks with 5-9 year olds and declines with age except for a slight rise in the 30-40 year age group. The disease is rare in adults over 50 and infants, although the impact may be severe in these groups. The organism appears to require close contact for transmission. Development of symptoms may take several weeks, and transmissible organism may persist once symptoms have subsided. Epidemics occur in 4 to 7-year cycles worldwide and may be linked to childhood school and day-care facilities.^{5,6}

Direct detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection is currently difficult, owing the slow growth (4-20 days) of the organism in culture and fastidious growth requirements.¹ For this reason, serology is often the best laboratory method available.^{7,8} The complement fixation (CF) test identifies antibody to a mycoplasma lipopoly saccharide (LPS). In general, laboratories suggest that four-fold increases in CF titer using paired acute/convalescent sera, or CF titers ≥ 64 are diagnostic. Other serological tests include enzyme immunoassays (EIAs) and immunofluorescent assays (IFAs) for the detection of IgG or IgM, and detection of cold agglutinins. The advantage of an IgM based assay is the detection of early/acute illness rather than convalescent disease where the switch to IgG has occurred.

The presence of IgM to *M. pneumoniae* is considered to have a role in the diagnosis of early/acute disease.^{4,9,10,11} Tests which detect both IgM and IgG or tests which detect IgG only have the problem of being positive in convalescent patients, as well as in individuals with previous history of *M. pneumoniae* disease (subclinical).

The ImmunoCard Mycoplasma methodology provides a simple to use, self-contained device. No calculations are required and the visual color change makes interpretation of results objective and simple.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The ImmunoCard Mycoplasma EIA detects the presence of IgM to *M. pneumoniae* in serum. Patient serum is added to each of the two sample ports. After allowing the sample to enter the device and migrate along the membrane and through the reaction ports, three drops of anti-human IgM alkaline phosphatase conjugate are added to the sample ports and allowed to enter the device. Three drops of wash and two drops of substrate are then added to each of the reaction ports. Reaction ports are observed for the development of any blue color after five minutes. The CONTROL port serves as a procedural control, containing immobilized human IgM in the reaction port. The TEST port contains *M. pneumoniae* antigens and serves as the patient test port. The development of blue color in the TEST port indicates a reactive test result for IgM to *M. pneumoniae*. No blue color in the TEST port indicates a nonreactive result.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

1. **Test Cards** - Individually foil pouched cards containing immobilized detergent extracted *M. pneumoniae* antigens (TEST reaction port) and human IgM (CONTROL reaction port)
2. **Positive Control** - Sample containing human anti-*M. pneumoniae* IgM in a buffer containing 0.1% sodium azide
3. **Negative Control** - Buffer containing 0.1% sodium azide
4. **Enzyme Conjugate** - Monoclonal anti-human IgM labeled with alkaline phosphatase in a buffer containing 0.1% sodium azide
5. **Wash Buffer** - Buffer containing 9.5% (weight/vol.) guanidine hydrochloride
6. **Substrate Reagent** - Buffered solution containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and 0.1% sodium azide
7. **Transfer Pipettes**

MATERIALS NOT PROVIDED

Timer

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Reagent concentration, incubation times and temperatures (22-25 C) have been optimized for sensitivity and specificity. Best results are obtained by adhering to these specifications. Once the assay has been started, complete all subsequent steps without interruption.
3. The right reaction (upper) port has been coated with extracted *Mycoplasma* antigens. Handle as a potentially hazardous material.
4. Patient specimens, Positive Control reagent, and used Test Cards may contain infectious agents and should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
5. Inspect Test Cards before removing the foil pouch. Do not use Test Cards that have holes in the foil pouch or where the pouch has not been completely sealed. Do not use Test Cards where the desiccant indicator has changed from blue to pink. False-negative reactions may result due to deterioration of the improperly stored Test Cards.
6. The Positive Control contains human sera, which were screened for HBsAg and antibody to HIV-1 and found to be negative. However, no test can offer complete assurance that human blood will not transmit HIV, hepatitis, or other infectious agents.
7. All reagents should be gently mixed and at 22-25 C before use.
8. Do not interchange reagents from different kit lot numbers or use expired reagents.
9. Hold reagent vials and transfer pipettes vertically to insure proper drop size and delivery. Do not allow the tips of the bottle or pipette to touch either the sample or reaction ports.
10. Replace colored caps on correct vials.
11. Substrate Reagent may be light sensitive and should not be exposed to excessive illumination. Substrate Reagent should be colorless. If this reagent exhibits a blue color, it should be discarded.
12. Use only one transfer pipette per control or specimen. Discard after use. Do not attempt to reuse.
13. Disregard any color reactions in the sample (lower) ports. Results are determined by color development in the reaction (upper) ports.
14. Severely lipemic serum, contaminated serum, or serum with excessive debris may restrict movement of Enzyme Conjugate into the sample (lower) ports, potentially producing an invalid result. Noncontaminated serum causing flow problems (invalid results) may be centrifuged and retested.
15. Specimens with obvious microbial contamination or severe hemolysis should not be tested as they may yield unreliable results.

16. Patient samples should not be allowed to dry in the sample application ports. Drying of whole blood or serum onto filter paper inactivates, to varying extents, IgM class antibodies.¹²
WARNING: Some reagents in this kit contain sodium azide which is a skin irritant. Avoid skin contact with reagents. Disposal of reagents containing sodium azide into lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal azides. This can be avoided by flushing with a large volume of water during such disposal.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

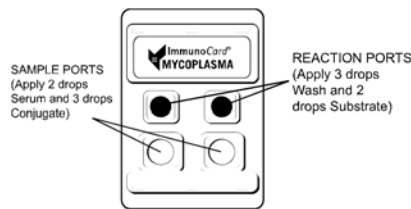
There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use.

PROCEDURAL NOTES

1. The Test Card format is diagrammed below:



2. Batch processing any number of samples or controls is possible provided that for each card, the appropriate steps, sequence of reagent addition, incubation (wait) times and result reading time are maintained. Each procedural step should be completed with each sample before the next step is started.
3. The CONTROL (left) side of each card provides a procedural control for each specimen. This tests for proper specimen and reagent flow characteristics as well as reagent performance.

REAGENT PREPARATION

1. Allow all kit components to reach room temperature (22-25 C) before use (requires at least one hour). Gently mix liquid reagents prior to use.
2. All reagents come ready to use (no dilution required)

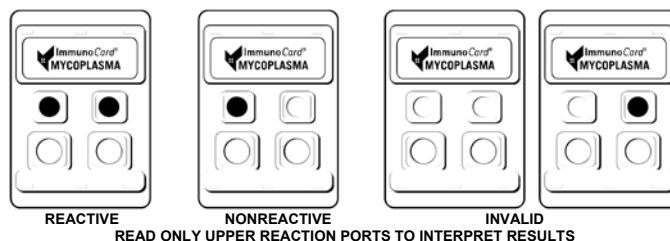
SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum specimens obtained from clotted blood should be stored at 2-8 C until tested. The specimen should be tested as soon as possible but may be held up to 72 hours at 2-8 C prior to testing. If testing cannot be performed within this time frame, the specimen should be frozen in a nondefrosting freezer (-20 C or lower) immediately upon receipt. Repeated freezing and thawing of specimens should be avoided.

TEST PROCEDURE

1. Remove the appropriate number of Test Cards from their envelopes. Label with appropriate identification. Use 1 Test Card for each control or sample to be tested.
2. Using a transfer pipette, dispense 2 drops of serum to both lower sample ports.
3. Incubate 2 minutes at 22-25 C. Note: during the 2-minute incubation, specimen must adsorb completely and cover both reaction (upper) ports.
4. Add 3 drops of Enzyme Conjugate to both sample (lower) ports. Incubate 2 minutes at 22-25 C. Enzyme Conjugate should completely adsorb during the incubation period.
5. Add 3 drops of Wash Buffer to both reaction (upper) ports. Wait until wash buffer has adsorbed completely.
6. Add 2 drops of Substrate Reagent to both reaction (upper) ports. Start a timer for 5 minutes when substrate is added to the first card. Incubate for 5 minutes at 22-25 C. Visually read results immediately at the end of the incubation period.

INTERPRETATION OF RESULTS



Reactive Test Result: Visually detectable blue color in BOTH reaction ports. Occasionally a reactive test result may show evidence of a gradation of blue color within the reaction port. A reactive result indicates the presence of IgM to *M. pneumoniae*.

Nonreactive Test Result: Visually detectable blue color in CONTROL reaction port (upper left) only. The TEST reaction port (upper right) should be colorless to faint grey. Occasionally, the TEST reaction port (upper right) may show evidence of a hint of blue color in the right or left side of the port, with the rest of the port remaining colorless. This should be considered a nonreactive test result. Nonreactive results indicate either the absence of IgM to *M. pneumoniae*, or levels below the limit of detection for the assay.

Invalid Test Result: No detectable color in CONTROL reaction port (upper left). Invalid test results may be due to a reagent/Test Card problem, a procedural error, or restriction of flow of sample and/or Enzyme Conjugate due to severely contaminated, lipemic or debris containing serum. Noncontaminated serum may be centrifuged and retested.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

The Positive and Negative Controls should be assayed with each new kit lot or each new shipment. Add two drops of Positive Control to both lower Sample ports of a card. Add two drops of Negative Control to both lower Sample ports of a second card. Follow Steps 3 through 6 in the Procedure Section.

1. **Positive Control:** Must yield visually detectable blue color in both reaction (upper) ports.
2. **Negative Control:** Must yield visually detectable blue color in CONTROL (upper left) reaction port only. The TEST (upper right) reaction port should be colorless.

The Procedural Control present in the upper left port of each Test Card tests the individual specimen for proper flow and reagent performance. Failure of the Procedural Control to yield a blue color with any specimen or control reagent indicates an invalid test result and the test should be repeated.

At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing, or leakage.

If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.

It is suggested that the results of each quality control check be recorded in an appropriate log book to maintain high quality testing records. If the expected reactions are not observed and the reagents are still within their expiration date, please contact Meridian Bioscience's Technical Support Services at 513-271-3700 or 800-343-3858 (for US only) or contact your Country/Local Distributor.

EXPECTED VALUES

The ImmunoCard Mycoplasma test was evaluated at four hospitals throughout the midwest. In addition, a reference lab tested specimens from throughout the country. Of the 160 prospective specimens tested at the hospital sites, 26 (16%) were positive by the ImmunoCard Mycoplasma test. The reference laboratory reported 85/352 (24%) ImmunoCard Mycoplasma positive specimens. These results were consistent with results obtained using other IgM tests for *M. pneumoniae*, as well as published findings for the prevalence of IgM to *M. pneumoniae*.^{1,2,13,14} When a group of blood bank sera was tested for IgM to *M. pneumoniae* using the ImmunoCard Mycoplasma and a reference EIA, a prevalence of 12.7% and 16% was found by each method, respectively.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. ImmunoCard Mycoplasma test results should be used in conjunction with information available from the patient clinical evaluation and other available diagnostic procedures.
2. Samples obtained too early during infection may not contain detectable levels of IgM antibody. If a *M. pneumoniae* infection is suspected, a second sample should be obtained in 7-14 days and tested.
3. Significance of test results of immunosuppressed patients may be difficult to interpret.
4. Positive test results may not be valid in persons who have received blood transfusions or other blood products within the past several months.
5. Specific IgM antibodies to *M. pneumoniae* are usually detected in patients with a recent primary infection. However, they may be found in patients with reactivated or secondary infections and are sometimes found in patients with no other detectable evidence of recent infection.^{7,11} In addition, IgM to *M. pneumoniae* has been shown to persist for extended periods (2-12 months) in some patients.¹¹
6. False negative results due to competition by high levels of IgG, while theoretically possible, have not been observed.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The ImmunoCard Mycoplasma test was evaluated using sera at three hospitals and one reference laboratory. ImmunoCard Mycoplasma results were compared with a microwell EIA for IgM to *M. pneumoniae*. Discrepant results were resolved by IFA, latex and complement fixation testing.

ImmunoCard	Reference EIA			Resolved		
	Reactive	Nonreactive	Retest	Reactive	Nonreactive	Retest
Reactive	69	45	16	88	29	13
Nonreactive	27	245	12	12	268	4

Relative Sensitivity 88% ± 6%¹
Relative Specificity 90% ± 3%
Relative Agreement 90% ± 3%

¹ ± values calculated as 95% confidence intervals using the normal method.

Forty-five ImmunoCard Mycoplasma reactive specimens, which were nonreactive by the reference EIA had 14 reactive, 26 nonreactive, and five unresolved results. Sixteen sera with reactive ImmunoCard and indeterminate reference EIA results had five reactive, three nonreactive, and eight unresolved results.

Twenty-seven specimens with ImmunoCard nonreactive, reference EIA reactive results had 11 reactive, 14 nonreactive, and two unresolved results. Finally, 12 ImmunoCard nonreactive, reference EIA indeterminate specimens had one reactive, nine nonreactive, and two unresolved results. No ImmunoCard Mycoplasma invalid test results were obtained during clinical trials compared to 28/414 or a 6.8% retest rate for the reference EIA method.

Two of the clinical trial sites (one hospital and a reference lab) performed complement fixation titration for antibody to *M. pneumoniae*. CF results were grouped as nonreactive (< 1/8), low (1/8-1/32), and reactive (≥ 1/64). ImmunoCard Mycoplasma results were compared with CF titers in the table below.

ImmunoCard	CF Titer		
	< 8	8-32	≥ 64
Reactive	29	25	28
Nonreactive	97	56	4

The ImmunoCard Mycoplasma test correctly identified 28/32 (88%) of the high titer (≥ 64) CF specimens. The ImmunoCard test was reactive with 25 (31%) of the low titer CF (8-32) specimens. Twenty-four (96%) of these were confirmed as IgM reactive by other methods. Finally, 25/29 (86%) CF nonreactive specimens were found reactive by ImmunoCard Mycoplasma and were also reactive by either EIA or IFA.

ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the ImmunoCard Mycoplasma test was evaluated on retrospective specimens from patients with positive culture or with serological evidence for other atypical pneumonias, as well as viral, bacterial, and fungal pneumonias. Specimens positive for rheumatoid factor, anti-nuclear antibody and lupus were also tested. One of four lupus specimens was ImmunoCard Mycoplasma reactive. No cross-reactions were observed with the other classes of sera listed below. Values in parentheses indicate the number of sera tested.

Histoplasma (5)	Cytomegalovirus (6)	Coccidioides (10)	Epstein Barr Virus (14)
Parainfluenza 3 (1)	Legionella (7)	Influenza A (13)	Chlamydia (9)
Influenza B (1)	Antinuclear Antibody (20)	Respiratory Syncytial Virus (1)	Rheumatoid Factor (10)
Adenovirus (3)			

ITALIANO



Test rapido immunoenzimatico per la ricerca delle IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae* nel siero

REF 709030

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

L'ImmunoCard Mycoplasma è un test immunoenzimatico (EIA) che consente la ricerca qualitativa *in vitro* delle IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae* (MP) nel siero. I risultati di tale esame rappresentano un aiuto nella diagnostica delle infezioni acute o recenti causate da *Mycoplasma pneumoniae*.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Mycoplasma pneumoniae appartiene ad un gruppo di batteri, i *Mollicuti*, caratterizzati dalla mancanza della parete cellulare.¹ *M. pneumoniae* è stato il primo componente di questo gruppo ad essere identificato come patogeno umano ed attualmente è ritenuto responsabile di una percentuale abbastanza consistente (fino al 20%) dei casi di infezioni polmonari.^{1,2} La polmonite da *Mycoplasma* si presenta con una sintomatologia simile a quella dell'influenza,³ tuttavia, a differenza della maggior parte delle polmoniti ad eziologia batterica e virale, essa è caratterizzata da un'ampia gamma di microrganismi, tra cui virus influenzale (A e B), Virus Respiratorio Sinciziale, Adenovirus, Parainfluenza, Cytomegalovirus, *Chlamydia*, *Legionella*, *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*.³ La diffusione dell'infezione da *M. pneumoniae* è normalmente limitata alla parte dell'apparato respiratorio compresa tra la zona rinofaringea ed i bronchioli, con una conseguente sintomatologia molto variabile, più simile ad una bronchite che non ad una polmonite. La terapia antibiotica può alleviare i sintomi, tuttavia spesso è possibile isolare in coltura *M. pneumoniae* anche dopo il trattamento. Nei pazienti adulti si possono osservare anche infezioni asintomatiche (sileni), con una percentuale che può arrivare anche al 20% del totale di polmoniti da *M. pneumoniae*.⁴

M. pneumoniae è endemico, con minime variazioni stagionali: è stato notato un leggero aumento di casi nella tarda estate/inizio autunno.^{2,5} L'incidenza generale è compresa tra 0,5 e 5,0 casi per 1000 individui e può rappresentare fino al 20% di tutti i casi di polmonite. La massima incidenza si verifica attorno ai 5-9 anni di età per poi diminuire, salvo un moderato aumento riscontrato nei soggetti entro ai 30-40 anni. La malattia è rara negli adulti con più di 50 anni e nei neonati, sebbene in tali soggetti il quadro clinico possa presentare connotati di notevole gravità. Sembra che la trasmissione dell'infezione causata da *M. pneumoniae* richieda un contatto ravvicinato tra soggetti malati e soggetti sani. L'insorgenza della sintomatologia richiede a volte parecchie settimane ed un paziente può essere portatore di forme trasmissibili di *M. pneumoniae* anche dopo la scomparsa di tali manifestazioni. Le epidemie di polmonite da *M. pneumoniae* si verificano ciclicamente ogni 4-7 anni, con diffusione mondiale e sembrano essere collegate alla permanenza dei bambini nelle scuole o negli asili.^{5,6}

La diagnosi diretta dell'infezione da *M. pneumoniae* è difficile, a causa della lenta crescita del microrganismo (4-20 giorni) ed alla necessità di utilizzare particolari terreni colturali.⁷ Per tali motivi le tecniche sierologiche spesso rappresentano il metodo migliore a disposizione del laboratorio.^{7,8} Il test di fissazione del complemento (CF) rileva la presenza di anticorpi diretti contro un antigene lipopolisaccaridico (LPS) di *M. pneumoniae*. Normalmente aumenti superiori a quattro volte del titolo CF (utilizzando parallelamente sieri prelevati a distanza di 10-14 giorni l'uno dall'altro) oppure titoli CF ≥ 64 vengono considerati come indicativi di infezione. Altre tecniche sierologiche comprendono test immunoenzimatici (EIA) e di immunofluorescenza (IFA), per la ricerca di IgG o di IgM, e di emoaagglutinazione, per la rilevazione della presenza di "agglutinine fredde". Un metodo basato sulla ricerca delle IgM presenta il vantaggio di consentire la diagnosi della fase precoce/acuta della malattia piuttosto che quella di convalescenza, in cui sono rilevabili soltanto le IgG.

La presenza di IgM anti-*M. pneumoniae* viene considerata come un marker della fase precoce/acuta della malattia.^{4,9,10,11} I test che evidenziano sia le IgM che le IgG, oppure solo le IgG, presentano il problema di essere positivi anche durante la fase di convalescenza, come pure nei soggetti con anamnesi di pregressa infezione da *M. pneumoniae*.

Il kit ImmunoCard Mycoplasma è basato su una metodica di facile utilizzo: non è necessaria alcuna operazione di calcolo e lo sviluppo di colore rende l'interpretazione dei risultati facile ed oggettiva.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test immunoenzimatico ImmunoCard Mycoplasma rileva la presenza nel siero di IgM anti-*M. pneumoniae*. Il campione di siero viene distribuito in entrambi i pozzetti inferiori. Dopo aver lasciato migrare il campione lungo la membrana fino a raggiungere i pozzetti superiori di reazione, si aggiungono tre gocce di coniugato anti-IgM umano marcato con fosfatasi alcalina nei pozzetti inferiori. Si lascia assorbire il tutto, dopodiché si aggiungono, questa volta nei pozzetti superiori di reazione, tre gocce di tampone di lavaggio e, successivamente, due gocce di substrato. Si incuba per cinque minuti, al termine dei quali si legge il risultato osservando l'eventuale sviluppo di colore blu nei pozzetti di reazione. La parte sinistra della card (**CONTROL**) serve come controllo procedurale, in quanto contiene IgM umane adsorbite sulla membrana del pozzetto di reazione. La parte destra (**TEST**) contiene antigene di *M. pneumoniae* adsorbito sulla membrana del pozzetto di reazione, per cui serve per l'esecuzione del test vero e proprio. Lo sviluppo di colore blu nel pozzetto di reazione della colonna **TEST** indica un risultato positivo per la presenza di IgM anti-*M. pneumoniae*; se non c'è sviluppo di colore il risultato è negativo.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

1. **Test Cards** - Confezionate singolarmente in buste sigillate. Contengono antigene di *M. pneumoniae* (pozzetto di reazione **TEST**) ed IgM umane (pozzetto di reazione **CONTROL**)
2. **Controllo Positivo** - Campione contenente IgM umane anti-*M. pneumoniae*, diluito in soluzione tampone contenente sodio azide allo 0,1%
3. **Controllo Negativo** - Soluzione tampone contenente sodio azide allo 0,1%
4. **Coniugato Enzimatico** - Anticorpi monoclonali anti-IgM umane marcati con fosfatasi alcalina diluiti in soluzione tampone contenente sodio azide allo 0,1%
5. **Soluzione di lavaggio** - Soluzione tampone contenente sodio azide allo 0,1%
6. **Substrato** - Soluzione tampone contenente 5-bromo-4-cloro-3-indoli fosfato e sodio azide allo 0,1%
7. **Pipette monouso**

MATERIALI NON FORNITI

Timer

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
2. La concentrazione dei reagenti, i tempi e la temperatura di incubazione (22-25 C) sono stati ottimizzati per ottenere la massima sensibilità e specificità. Pertanto i risultati migliori vengono raggiunti seguendo scrupolosamente la procedura. Una volta iniziato il test, bisogna completare tutti i passaggi successivi senza interruzioni.
3. La membrana nel pozzetto di reazione in alto a destra è stata adsorbita con un estratto antigenico di *Mycoplasma*. Maneggiare il tutto come materiale potenzialmente pericoloso.
4. I campioni dei pazienti, il Controllo Positivo e le card usate possono contenere agenti infettivi e dovrebbero essere trattate secondo le norme previste per il Biosafety Level 2 citato nel manuale "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" a cura del Centers for Disease Control/National Institute of Health.
5. Controllare attentamente le Card di analisi prima di estrarle dalle buste di alluminio. Non usare le Card di analisi se le buste di alluminio presentano fori o non sono state completamente sigillate. Non usare le Card se l'indicatore dell'essiccante ha cambiato colore, da blu a rosa. Il deterioramento dovuto a una conservazione inadeguata delle Card di analisi potrebbe produrre risultati falso negativi.
6. Il Controllo Positivo è stato preparato da un pool di sieri umani che sono risultati negativi per la ricerca di HBSAg e di anticorpi anti-HIV-1. Tuttavia non esistono tests che offrano l'assoluta certezza che il sangue umano (o suoi derivati) non sia in grado di trasmettere il virus HIV, quello dell'epatite o altri agenti infettivi.
7. Tutti i reagenti dovrebbero essere delicatamente mescolati ed a temperatura ambiente (22-25 C) prima dell'uso.
8. Non scambiare reagenti appartenenti a lotti differenti né utilizzare reagenti scaduti.
9. Tenere i flaconcini e le pipette in posizione verticale per assicurare l'erogazione dell'esatta quantità di reagenti e di campione. Evitare di toccare con i contagocce dei flaconi o con le pipette sia i campioni sia la membrana dei pozzetti di reazione.
10. Richiudere ciascun flacone di reagenti con il corrispondente cappuccio colorato.
11. Il Substrato può essere sensibile alla luce e non dovrebbe essere esposto ad una fonte di illuminazione troppo forte. La soluzione dovrebbe essere incolore: se essa appare colorata in blu deve essere eliminata.
12. Utilizzare una sola pipetta per ciascun campione. NON RIUTILIZZARE LE PIPETTE.
13. Non prendere in considerazione eventuali sviluppi di colore nei pozzetti dei campioni (inferiori). I risultati vengono determinati dall'eventuale sviluppo di colore nei soli pozzetti di reazione (superiori).
14. Sieri iperlipemici, contaminati o contenenti notevoli quantità di detriti possono impedire un corretto assorbimento del Coniugato Enzimatico a livello del pozzetto dei campioni, provocando così risultati non validi. I sieri non contaminati che causano problemi di migrazione (risultati non validi) possono essere centrifugati e ritestati.
15. I campioni che presentano segni visibili di contaminazione microbica o di emolisi non dovrebbero essere testati, poiché potrebbero dare risultati non attendibili.
16. I campioni dei pazienti non dovrebbero essere lasciati seccare nei pozzetti in cui vengono distribuiti. L'essiccamento di sangue intero o di siero sulla membrana utilizzata può inattivare, in misura variabile, gli anticorpi della classe IgM.¹² **ATTENZIONE:** Alcuni reagenti contenuti in questo kit contengono sodio azide che è un composto irritante per la pelle. Evitare il contatto con la cute. L'eliminazione dei reagenti contenenti sodio azide nelle tubazioni di scarico contenenti piombo o rame può provocare la formazione di azidi metalliche esplosive. Tale pericolo può essere evitato lasciando scorrere notevoli quantità di acqua durante tale operazione.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

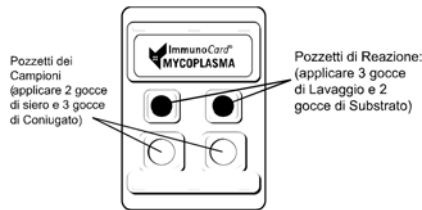
Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna. Conservare il kit a 2-8 C e rimetterlo in frigorifero immediatamente dopo l'utilizzo.

NOTE PROCEDURALI

- La forma delle Test Cards del kit ImmunoCard Mycoplasma è riportata nella figura qui di seguito:



- Si possono eseguire diversi test contemporaneamente, avendo l'accortezza di completare ciascun passaggio procedurale per tutti i campioni prima di passare a quello successivo.
- La parte sinistra (**CONTROL**) di ciascuna card fornisce un controllo procedurale per ciascun campione. Tale controllo permette di verificare la corretta migrazione dei campioni e dei reagenti lungo la membrana, nonché l'adeguato funzionamento dei reagenti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Lasciare che tutti i componenti del kit raggiungano temperatura ambiente (22-25 C) prima dell'uso (tale processo richiede almeno un'ora). Mescolare delicatamente le soluzioni dei reagenti prima dell'uso.
- Tutti i reagenti sono pronti all'uso, per cui non è necessaria alcuna diluizione.

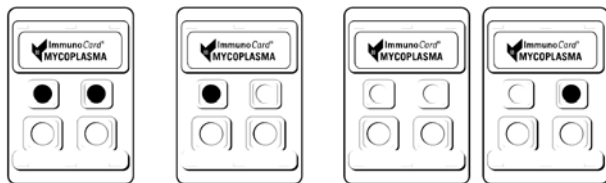
RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di siero ottenuti da sangue coagulato dovrebbero essere conservati a 2-8 C fino al momento dell'esecuzione dell'esame, se esso può essere eseguito entro 72 ore. In caso di necessità, i sieri possono essere congelati immediatamente (minimo a -20 C) in congelatori senza sbrinatorio automatico. Evitare accuratamente di sottoporre i sieri a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

PROCEDURA DEL TEST

- Estrarre il numero di cards necessarie dalle rispettive buste sigillate. Contrassegnare ciascuna card in modo appropriato; utilizzare 1 sola card per ciascun controllo o campione da esaminare.
- Usando una delle pipette fornite con il kit, distribuire due gocce di siero in entrambi i pozzetti dei campioni (in basso).
- Incubare 2 minuti a 22-25 C. Nota: durante i 2 minuti di incubazione i campioni devono essere completamente assorbiti sulla membrana e raggiungere i pozzetti di reazione (in alto).
- Aggiungere 3 gocce di Coniugato Enzimatico ad entrambi i pozzetti dei campioni (in basso). Incubare 2 minuti a 22-25 C. Durante i 2 minuti di incubazione il Coniugato dovrebbe essere completamente assorbito sulla membrana.
- Distribuire 3 gocce di Tampone di lavaggio in entrambi i pozzetti di reazione (in alto). Attendere fino al completo assorbimento della soluzione.
- Aggiungere 2 gocce di Substrato ad entrambi i pozzetti di reazione (in alto). Far partire il timer (regolato a 5 minuti) quando si aggiunge il Substrato alla prima card. Incubare 5 minuti a 22-25 C. Leggere il risultato visivamente immediatamente allo scadere del tempo stabilito.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



Risultato Positivo Risultato Negativo Risultato Non-valido Risultato Invalido
LEGGERE IL RISULTATO SOLO NEI POZZETTI DI REAZIONE SUPERIORI

Risultato Positivo: Si nota sviluppo di colore blu visivamente apprezzabile in **ENTRABI** i pozzetti di reazione. A volte un test positivo può mostrare diverse tonalità di colore all'interno del pozzetto di reazione. Un risultato positivo indica la presenza di IgM anti-*M. pneumoniae*.

Risultato Negativo: Si nota sviluppo di colore blu visivamente apprezzabile solo nel pozzetto di reazione **CONTROL** (in alto a sinistra). Il pozzetto di reazione **TEST** (in alto a destra) dovrebbe rimanere incolore oppure assumere un debole colore grigio. Può succedere, a volte, che nel pozzetto di reazione **TEST** (in alto a destra) si noti uno sviluppo di colore blu sul lato destro o sinistro, mentre il resto del pozzetto rimane incolore: tale risultato deve essere considerato come negativo. Un risultato negativo indica o l'assenza di IgM anti-*M. pneumoniae* oppure la loro presenza a livelli inferiori al limite di sensibilità del metodo.

Risultato Non-Valido: Non si nota alcuno sviluppo di colore blu nel pozzetto di reazione **CONTROL** (in alto a sinistra). Un test non valido può essere causato da problemi sia con i reagenti (**verificare la temperatura**) che con la card, da un errore nell'esecuzione della metodica oppure da una ridotta migrazione del campione o del Coniugato Enzimatico lungo la membrana (soprattutto in caso di sieri iperlipemici, contaminati o contenenti detriti). Si può ripetere il test sui campioni non contaminati, previa centrifugazione.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

I Controlli Positivi e Negativi dovrebbero essere analizzati con ogni nuovo lotto o con ogni nuova spedizione del kit. Si distribuiscono due gocce di Controllo Positivo e due gocce di Controllo Negativo in entrambi i pozzetti dei campioni (in basso), utilizzando ovviamente una singola card per ciascun controllo. Completare il test seguendo la sopra citata procedura dal punto tre al punto sei.

- Controllo Positivo:** si deve notare visivamente lo sviluppo di colore blu in entrambi i pozzetti di reazione (in alto) (Figura 1).
- Controllo Negativo:** si deve notare visivamente lo sviluppo di colore blu solo nel pozzetto di reazione **CONTROL** (in alto a sinistra). Il pozzetto di reazione **TEST** (in alto a destra) dovrebbe rimanere incolore (Figura 2).

Il **Controllo Procedurale** presente nel pozzetto in alto a sinistra di ciascuna card serve per verificare l'avvenuta migrazione dei campioni lungo la membrana ed il corretto funzionamento dei reagenti. Se nel Controllo Procedurale non si ha sviluppo di colore blu con un campione o con un controllo, il risultato non è valido ed il test dovrebbe essere ripetuto.

Ogni volta che si usa il kit bisognerebbe esaminare ciascun flacone di reagenti per verificare che non presentino segni evidenti di contaminazione microbiologica, di congelamento o di perdite.

Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale.

Si consiglia di trascrivere i risultati di ciascun controllo di qualità in un apposito registro, per mantenere un elevato standard qualitativo e per ottemperare alle norme degli Enti preposti ai controlli. Qualora si ottengano risultati diversi da quelli previsti ed i reagenti non siano scaduti, si prega di contattare il Servizio Clienti Meridian.

VALORI ATTESI

Il test ImmunoCard Mycoplasma è stato sottoposto a studi comparativi presso quattro Ospedali negli Stati Uniti e presso una Laboratorio di Riferimento che ha testato campioni provenienti da tutti gli Stati Uniti. Dei 160 campioni esaminati presso gli Ospedali, 26 (16%) erano positivi con il test ImmunoCard Mycoplasma. I risultati ottenuti presso il Laboratorio di Riferimento hanno permesso di rilevare 85 su 352 (24%) campioni positivi con il test ImmunoCard Mycoplasma. Questi risultati concordavano con quelli ottenuti mediante altri tests per la ricerca delle IgM anti-*M. pneumoniae*, come pure con i dati segnalati in letteratura riguardanti la percentuale di positività per la presenza di IgM anti-*M. pneumoniae*.^{1, 2, 13, 14}

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- I risultati ottenuti con il test ImmunoCard Mycoplasma dovrebbero essere valutati alla luce del quadro clinico del paziente e del risultato di tutti gli altri esami eseguiti.
- I campioni prelevati in una fase troppo precoce della malattia possono contenere livelli non rilevabili di IgM. Nel caso di un risultato negativo in presenza di sintomi riconducibili ad un'infezione da *M. pneumoniae* si dovrebbe esaminare un campione successivo, prelevato 7-14 giorni dopo il primo.
- L'interpretazione del risultato nei pazienti immunodepressi può essere assai difficile.
- Un risultato positivo può non essere significativo in soggetti sottoposti a trasfusioni di sangue e di emoderivati, anche a distanza di molti mesi.
- Anticorpi della classe IgM specifici anti-*M. pneumoniae* vengono di solito evidenziati in pazienti con infezioni in fase acuta o recenti. Tuttavia, essi possono essere riscontrati anche in corso di riattivazione dell'infezione in soggetti con infezioni secondarie oppure in alcuni casi in cui non esiste alcun altro riscontro di infezione recente.¹¹ Inoltre, in alcuni pazienti, le IgM anti-*M. pneumoniae* sono state evidenziate per periodi inaspettatamente lunghi (2-12 mesi).¹¹
- Anche se teoricamente possibile, non sono stati segnalati casi di risultati falsi negativi causati da fenomeni di competizione in caso di presenza di elevati livelli di IgG.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test ImmunoCard Mycoplasma è stato valutato presso tre Ospedali ed un Laboratorio di Riferimento. I risultati ottenuti con il test ImmunoCard Mycoplasma sono stati paragonati a quelli ottenuti con un test EIA in microtitler per la ricerca di IgM anti-*M. pneumoniae*. I risultati discordanti sono stati risolti mediante un test in immunofluorescenza per la ricerca delle IgM anti-*M. pneumoniae*, un test al lattice e un test di fissazione del complemento.

ImmunoCard	EIA di riferimento			Data risolti		
	Pos	Neg	Retistati	Pos	Neg	Non risolti
Positivi	69	45	16	88	29	13
Negativi	27	245	12	12	268	4

Sensibilità: 88% ± 6%¹
Specificità: 90% ± 3%
Concordanza: 90% ± 3%

¹ i valori ± sono calcolati mediante il metodo normale come intervalli di confidenza (CI 95%)

Dei 45 campioni positivi con il test ImmunoCard Mycoplasma e negativi in EIA, 14 si sono dimostrati positivi, 26 erano negativi e cinque davano risultati non risolti. Di 16 sieri positivi con il test ImmunoCard Mycoplasma ed indeterminati con il test EIA di riferimento, cinque erano positivi, tre negativi e otto non risolti.

Di 27 campioni negativi con ImmunoCard Mycoplasma e positivi con il test EIA di riferimento, 11 si sono confermati positivi, 14 erano negativi e due non risolti. Infine, di 12 campioni negativi con ImmunoCard Mycoplasma ed indeterminati con il test EIA di riferimento, uno si è confermato positivo, nove erano negativi e due non risolti.

Durante questi studi clinici non sono stati ottenuti risultati non validi con il test ImmunoCard Mycoplasma, mentre con il test EIA 28/414 campioni (pari al 6.8%) davano risultati indeterminati.

Due dei Centri coinvolti nella valutazione clinica del test (un Ospedale ed il Laboratorio di Riferimento) hanno utilizzato il test di fissazione del complemento (CF) per titolare gli anticorpi anti-*M. pneumoniae*. I risultati ottenuti mediante CF sono stati divisi in negativi (< 1/8), bassi positivi (1/8-1/32) e positivi (≥ 1/64). Il risultato della comparazione tra ImmunoCard Mycoplasma e CF è riportato nella seguente tabella. Il test ImmunoCard Mycoplasma si è rivelato in grado di identificare correttamente 28/32 (88%) campioni positivi ad alto titolo CF (≥ 1/64) e 25 (31%) dei sieri a basso titolo CF (1/8 - 1/32).

ImmunoCard	Titoli CF		
	< 8	8-32	≥ 64
Positivi	29	25	28
Negativi	97	56	4

Un successivo riesame di questi campioni mediante altri metodi ha confermato che 24 (96%) di questi sieri contenevano effettivamente IgM specifiche. Infine, 25 (86%) dei 29 sieri negativi in CF e positivi con ImmunoCard Mycoplasma si sono rivelati positivi mediante test EIA in microtitler o mediante IFA.

SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità del test ImmunoCard Mycoplasma è stata valutata esaminando campioni retrospettivi di pazienti con cultura positiva o con positività sierologica per altri tipi di polmonite atipica, come pure per polmoniti virali, batteriche e fungine.

Sono stati testati anche campioni positivi per fattore reumatoide, anticorpi anti-nucleo e lupus eritematoso: uno dei campioni di siero di pazienti con lupus è risultato positivo con il test ImmunoCard Mycoplasma.

Non è stata osservata alcuna reazione crociata con i sieri di pazienti affetti da infezioni causate dai seguenti microrganismi o dalle seguenti patologie. I valori tra parentesi indicano il numero dei sieri testati.

Histoplasma (5)	Cytomegalovirus (6)	Coccidioides (10)	Epstein-Barr Virus (14)
Parainfluenza 3 (1)	Legionella (7)	Influenza A (13)	Chlamydia (9)
Influenza B (1)	Anticorpi anti-nucleo (20)	Virus Respiratorio Sinciziale (1)	Fattore reumatoide (10)
Adenovirus (3)			

FRANÇAIS



Un test immuno-enzymatique rapide pour la détection des IgM dirigées contre *Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain

REF 709030

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le test ELISA ImmunoCard Mycoplasma est un test in vitro pour la détection des IgM dirigées contre *Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain. Les résultats du test sont destinés à fournir une aide au diagnostic d'infections récentes à *Mycoplasma pneumoniae*.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Mycoplasma pneumoniae fait partie du groupe des bactéries dégénérées sans paroi cellulaire.¹ *M. pneumoniae* fut le premier pathogène humain identifié dans ce groupe et est la cause de plus de 20% de tous les cas de pneumonie.¹ La pneumonie à *Mycoplasma pneumoniae* présente des symptômes proches de ceux de la grippe,³ cependant, contrairement à la plupart des pneumonies virales ou bactériennes, la pneumonie à *Mycoplasma pneumoniae* est plus progressive tant au niveau du développement que de la guérison. Les infections à *Mycoplasma pneumoniae* sont généralement groupées dans la catégorie des pneumonies atypiques. Des exemples d'autres organismes provoquant des pneumonies atypiques sont le virus influenza (A et B), virus syncytial respiratoire, adenovirus, parainfluenza, cytomegalovirus, *Chlamydia*, *Legionella*, *Histoplasma capsulatum* et *Coccidioides immitis*.³ Le développement de l'infection à *M. pneumoniae* est généralement limité au système respiratoire, depuis le nasopharynx jusqu'aux bronchioles, et entraîne une large variété de symptômes rappelant plutôt la bronchite que la pneumonie. Les antibiotiques peuvent améliorer les symptômes, cependant l'organisme peut souvent être cultivé à partir de patients ayant subi un traitement antibiotique. Des infections asymptomatiques (silencieuses) sont possibles chez les adultes et ont lieu dans plus de 20% des cas d'infections à *M. pneumoniae*.⁴

M. pneumoniae est endémique, avec une variation saisonnière minimale (légère augmentation à la fin de l'été/début de l'automne).^{2,5} Le taux d'incidence globale dans la population est de 0,5 à 5,0 pour 1000 ou de plus de 20% de tous les cas de pneumonies. Le pic de l'incidence se situe autour de l'âge de 5-9 ans puis diminue avec l'âge excepté une petite augmentation dans le groupe d'âge des 30-40 ans. La maladie est rare chez les adultes de plus de 50 ans et chez les enfants, bien que l'impact puisse être grave dans ces groupes. La transmission de l'organisme nécessite apparemment un contact étroit. Le développement des symptômes peut prendre plusieurs semaines, et l'organisme transmissible peut persister une fois que les symptômes ont disparu. Des épidémies se produisent de part le monde par cycles de 4 à 7 ans et pourraient être liées aux écoles et aux services de garderies.^{5,6}

La détection directe des infections à *Mycoplasma pneumoniae* est actuellement difficile à cause d'une croissance lente de l'organisme en culture (4-20 jours) et de conditions de culture fastidieuses.¹ Pour ces raisons, la sérologie est souvent la meilleure méthode de laboratoire disponible.^{7,9} Le test de fixation du complément (FC) identifie les anticorps dirigés contre un lipopolysaccharide (LPS). En général, les laboratoires suggèrent un diagnostic positif pour une augmentation d'un facteur quatre de titre en FC entre un sérum de phase aiguë et de convalescence, ou pour des titre en FC ≥ 64 . Les autres tests sérologiques incluent les immunosais enzymatiques (ELISA) et l'immunofluorescence (IFI) pour la détection des IgG ou des IgM, ainsi que la détection des agglutinines froides. L'avantage d'un test basé sur les IgM est la mise en évidence de la maladie précoce/aiguë plutôt que la phase de convalescence où la séroconversion des IgG a eu lieu.

La présence des IgM dirigées contre *M. pneumoniae* est considérée comme ayant un rôle dans le diagnostic de la maladie précoce/aiguë.^{4,9,10,11} Les tests qui détectent à la fois les IgM et les IgG ou les tests qui détectent les IgG seulement ont comme inconvénient d'être positifs chez les patients convalescents ainsi que chez les patients ayant un historique antérieur d'infection à *M. pneumoniae* (sous-clinique).

La méthode ImmunoCard Mycoplasma est un système simple à utiliser, unitaire. Aucun calcul n'est nécessaire et le changement de couleur visible permet une interprétation objective et simple des résultats.

PRINCIPE DU TEST

Le test ImmunoCard Mycoplasma ELISA détecte la présence des IgM dirigées contre *M. pneumoniae* dans le sérum. Le sérum du patient est ajouté dans chacun des deux puits échantillons. Après avoir permis à l'échantillon de pénétrer dans le système, de migrer le long de la membrane et au travers des puits de réactions, trois gouttes d'anti-IgM humaines conjuguées à la phosphatase alcaline sont ajoutées aux puits échantillons. Après pénétration dans le système, trois gouttes de lavage et deux gouttes de substrat sont ajoutées à chacun des puits de réactions. Le puits **CONTROLE** permet de valider la méthode et contient des IgM humaines immobilisées au niveau du puits de réaction. Le puits **TEST** contient des antigènes *M. pneumoniae* et sert de puits de réaction pour l'échantillon. L'apparition d'une coloration bleue dans le puits **TEST** indique un résultat de test réactif pour les IgM dirigés contre *M. pneumoniae*. L'absence de coloration bleue dans le puits **TEST** indique un résultat non réactif.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. **Cartes de test** - Cartes de test sous sachet individuel contenant des antigènes *M. pneumoniae* extraits par des détergents immobilisés (puits de réaction **TEST**) et des IgM humaines (puits de réaction **CONTROLE**)
2. **Contrôle positif** - IgM humaines anti-*M. pneumoniae* dans un tampon contenant 0,1% d'azide de sodium
3. **Contrôle négatif** - Tampon contenant 0,1% d'azide de sodium
4. **Conjugué enzymatique** - Anticorps anti-IgM humaines monoclonal marqué à la phosphatase alcaline dans un tampon contenant 0,1% d'azide de sodium
5. **Tampon de lavage** - tampon contenant 9,5% (p/v) de chlorhydrate de guanidine
6. **Solution substrat** - solution tamponnée contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate et 0,1% d'azide de sodium
7. **Pipettes de transfert**

MATERIEL NON FOURNI

Minuteur

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Les concentrations des réactifs, les temps d'incubation et les températures (22-25 C) ont été déterminés pour optimiser la sensibilité et la spécificité. Les meilleurs résultats sont obtenus en respectant ces spécifications. Lorsque le dosage est lancé, effectuer toutes les étapes suivantes sans interruption.
3. Le puits de réaction droit (supérieur) contient des antigènes Mycoplasma et doit être manipulé comme un matériel potentiellement infectieux.
4. Les échantillons de patients, le contrôle positif et les cartes de test usagées peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés avec précaution (Biosafety niveau 2, CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories").
5. Inspecter la pochette en feuille d'aluminium des cartes de test. Ne pas utiliser les cartes de test dont la pochette en feuille d'aluminium est trouée ou n'a pas été complètement fermée. Ne pas utiliser les cartes de test si l'indicateur du dessiccateur a viré du bleu au rose. Des réactions faussement négatives peuvent en résulter, en raison de la détérioration des cartes de test qui n'ont pas été conservées correctement.
6. Le contrôle positif contient du sérum humain qui a été testé pour l'HBsAg et les anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2 et a été trouvé négatif. Cependant, aucune méthode de test n'offre l'assurance totale que le sang humain ne transmettra pas le VIH, l'hépatite ou d'autres agents infectieux.
7. Tous les réactifs doivent être agités soigneusement et ramenés à 22-25 C avant utilisation.
8. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets de lots différents et ne pas utiliser de réactifs périmés.
9. Tenir les flacons de réactifs et les pipettes de transfert verticalement afin d'assurer une bonne calibration des gouttes. Ne pas laisser l'extrémité du flacon ou de la pipette entrer en contact avec l'échantillon ou les puits de réactions.
10. Remettre les bouchons colorés sur les réactifs correspondants.
11. La solution de substrat est sensible à la lumière et ne doit pas être exposée à un éclairage excessif. La solution de substrat doit rester incolore. Si ce réactif présente une coloration bleue, il doit être jeté.
12. Utiliser une seule pipette de transfert par contrôle ou par échantillon. Jeter après usage. Ne pas réutiliser.
13. Ne tenir aucun compte des réactions de coloration dans les puits échantillons (inférieurs). Les résultats sont déterminés par le développement de la coloration dans les puits réactions (supérieurs).
14. Les sérums hyperlipémiques, contaminés ou contenant des débris peuvent restreindre le mouvement du conjugué enzymatique à l'intérieur du puits échantillons (inférieur) et peuvent potentiellement produire un résultat non valide. Des sérums non contaminés posant des problèmes d'écoulement (résultat non valide) doivent être centrifugés et testés à nouveau.
15. Les échantillons contenant une contamination microbienne manifeste ou fortement hémolysés ne doivent pas être utilisés car ils peuvent produire des résultats non fiables.
16. Ne pas laisser sécher les échantillons de patient dans les puits échantillons. L'assechement du sang total ou du sérum sur le papier filtre inactive les anticorps de classe IgM.¹²
ATTENTION: Certains réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium qui est un irritant de la peau. Eviter tout contact avec la peau. L'élimination de réactifs contenant de l'azide de sodium dans des canalisations en cuivre ou en plomb peut provoquer la formation d'azides métalliques explosifs. Ceci peut être évité en rinçant à grande eau lors de l'élimination.

DANGER ET MISES EN GARDE

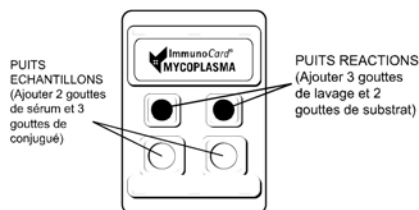
A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration est indiquée sur l'étiquette du coffret. Conserver le coffret à 2-8 C et le replacer rapidement au réfrigérateur après utilisation.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

1. Le test ImmunoCard Mycoplasma se présente ainsi:



2. Il est possible de traiter autant d'échantillons ou de contrôles que l'on souhaite dans la mesure où, pour chaque carte de test, les étapes, les séquences d'addition des réactifs et les temps d'incubation sont respectés. Chaque étape de la technique devra être terminée pour tous les échantillons avant de commencer l'étape suivante.
3. Le côté "**CONTROLE**" (gauche) de chaque carte fournit un contrôle de la méthode pour chaque échantillon. Ceci permet de vérifier la dilution de l'échantillon et les performances des réactifs.

PREPARATION DES REACTIFS

1. Laisser tous les éléments du coffret revenir à température ambiante (22-25 C) avant utilisation (pendant une heure minimum). Mélanger doucement les réactifs liquides avant utilisation.
2. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi (aucune dilution supplémentaire n'est nécessaire).

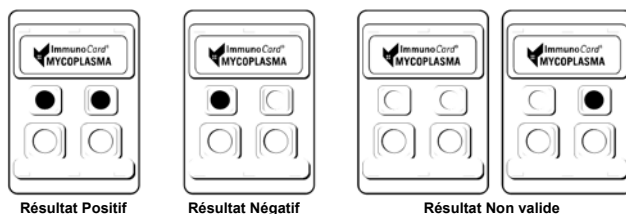
PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de sérum obtenus à partir de sang coagulé doivent être conservés à 2-8 C jusqu'à leur utilisation. L'échantillon devra être testé aussi rapidement que possible, il peut cependant être conservé jusqu'à 72h à 2-8 C avant d'être testé. Si l'échantillon ne peut pas être testé dans cet intervalle de temps, il doit être congelé immédiatement après le prélèvement, à -20 C ou à une température inférieure. Des congélations/décongélations répétées des échantillons doivent être évitées.

PROCEDURE DE TEST

1. Sortir de leurs emballages le nombre de cartes de test nécessaire. Les identifier de manière appropriée. Utiliser 1 carte pour chaque contrôle ou échantillon à tester.
2. A l'aide d'une pipette de transfert, distribuer 2 gouttes de sérum dans chacun des puits échantillons.
3. Incuber 2 minutes à 22-25 C. Remarque: Pendant les 2 minutes d'incubation, l'échantillon doit être complètement absorbé et recouvrir chacun des puits réactions (supérieurs).
4. Ajouter 3 gouttes de conjugué enzymatique à chacun des puits échantillons (inférieurs). Incuber 2 minutes à 22-25 C. le conjugué enzymatique doit être complètement absorbé pendant le temps d'incubation.
5. Ajouter 3 gouttes de solution de lavage à chacun des puits réactions (supérieurs). Attendre jusqu'à ce que le réactif de lavage soit complètement absorbé.
6. Ajouter 2 gouttes de substrat à chacun des puits réactions (supérieurs). Démarrer le minuteur pour 5 minutes dès que le substrat est ajouté à la première carte de test. Incuber 5 minutes à 22-25 C. Lire les résultats immédiatement après la fin de l'incubation.

INTERPRETATION DES RESULTATS



LIRE SEULEMENT LES PUIITS REACTIONS SUPERIEURS POUR INTERPRETER LES RESULTATS.

Résultat du test positif: Coloration bleue visible à l'œil nu dans les **DEUX** puits réactions. Une réaction positive du test pourra parfois apparaître sous la forme d'un dégradé bleu du bas du puits vers le haut. Un tel résultat devra être interprété comme positif un résultat positif indique la présence d'IgM dirigées contre *M. pneumoniae*.

Résultat du test négatif: Coloration bleue visible à l'œil nu dans le puits réaction "**CONTROL**" (orifice supérieur gauche) seulement. Le puits réaction "**TEST**" (orifice supérieur droit) doit être incolore ou gris très clair. Le puits réaction "**TEST**" (orifice supérieur droit) peut parfois présenter un soupçon de coloration bleue du côté gauche ou droit du puits, le reste du puits étant incolore. Un tel résultat devra être interprété comme négatif. Un résultat non réactif indique soit l'absence d'IgM dirigées contre *M. pneumoniae* soit un taux inférieur à la limite de détection du test.

Résultat du test non valide: Aucune coloration visible dans le puits réaction "**CONTROL**" (orifice supérieur gauche). Les résultats du test non valide peuvent être dus à un problème de réactif ou de carte test, à une erreur de procédure, ou à un écoulement restreint de l'échantillon et/ou du conjugué enzymatique à cause de sérums contaminés, lipémiques ou contenant des débris. Les sérums non contaminés doivent être centrifugés et testés à nouveau.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

Les contrôles Positif et Négatif doivent être testés à chaque nouveau lot de coffret livré ou à chaque nouvelle livraison. Ajouter deux gouttes de contrôle positif à chacun des puits échantillons de la carte de test. Ajouter deux gouttes de contrôle négatif à chacun des orifices échantillons d'une autre carte. Poursuivre par les étapes trois à six de la procédure de test.

1. **Contrôle positif:** coloration bleue visible dans les deux puits réactions (orifice supérieurs) (Figure 1).
2. **Contrôle négatif:** coloration bleue visible dans les puits réactions "**CONTROL**" seulement (orifice supérieur gauche). Le puits réaction "**TEST**" doit être incolore (Figure 2).

Le **contrôle interne** présent dans le puits supérieur gauche de chaque carte de test, permet de vérifier la dilution de l'échantillon et les performances des réactifs. L'absence de coloration bleue du contrôle interne avec un échantillon ou le contrôle positif est le signe d'un test ininterprétable qui doit être répété.

Lors de chaque utilisation, les composants du kit doivent être examinés visuellement à la recherche de signes de contamination, de congélation ou de fuites.

Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.

Il est recommandé de conserver les résultats de chaque vérification des réactifs dans un cahier de laboratoire afin de maintenir une qualité élevée des procédures de test. Si les réactions attendues ne sont pas observées et si les réactifs n'ont pas dépassé leur date de péremption, veuillez contacter les services techniques de Meridian pour une assistance.

VALEURS ATTENDUES

Le test ImmunoCard Mycoplasma a été évalué dans 4 hôpitaux des Etats-Unis. De plus, un laboratoire de référence a testé des échantillons recueillis sur l'ensemble du pays. Sur les 160 échantillons testés dans les hôpitaux, 26 (16%) étaient positifs avec le test ImmunoCard Mycoplasma. Le laboratoire de référence a obtenu 85/352 (24%) échantillons positifs avec le test ImmunoCard Mycoplasma. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus en utilisant d'autres tests pour les IgM dirigées contre *M. pneumoniae*, de même qu'avec la prévalence des IgM dirigées contre *M. pneumoniae* ayant fait l'objet de publications.^{1, 2, 13, 14} Lorsqu'un groupe de sérums provenant d'une banque de sang a été testé avec le test ImmunoCard Mycoplasma et un test de référence ELISA, une prévalence de 12,7% et 16% respectivement, a été trouvée.

LIMITES DU TEST

1. Les résultats du test ImmunoCard Mycoplasma doivent être utilisés conjointement avec les informations cliniques disponibles du patient et d'autres procédures diagnostiques.
2. Les échantillons obtenus à un stade trop précoce de l'infection peuvent ne pas contenir de taux détectables d'anticorps IgM. Si une infection à *M. pneumoniae* est suspectée, un second échantillon doit être obtenu dans les 7-14 jours et testé.
3. La signification de résultats de tests sur des patients immunodéprimés peut être difficile à interpréter.
4. Des résultats positifs peuvent ne pas être valides chez des personnes ayant subi une transfusion de sang ou d'autres produits sanguins dans les mois précédents.
5. Les anticorps IgM spécifiques de *M. pneumoniae* sont généralement détectés chez des patients avec une infection primaire récente. Cependant, ils peuvent être trouvés chez des patients avec une réactivation ou une seconde infection et peuvent parfois être détectés chez des patients n'ayant aucun signe détectable d'une infection récente.^{7, 11} De plus, les IgM dirigées contre *M. pneumoniae* ont été montrées comme pouvant persister pendant de longues périodes (2-12 mois) chez certains patients.¹¹

6. Des résultats faussement négatifs dus à des taux élevés en IgG, bien que théoriquement possible, n'ont pas été observés.

PERFORMANCES DU TEST

Le test ImmunoCard Mycoplasma a été évalué sur des sérums dans trois hôpitaux et un laboratoire de référence. Les résultats du test ImmunoCard Mycoplasma ont été comparés à un test ELISA micropuits pour les IgM dirigées contre *M. pneumoniae*. Les résultats discordants ont été résolus par IF, latex et fixation du complément.

ImmunoCard	Elisa de référence			Techniques de Résolution		
	Positif	Négatif	Retesté	Positif	Négatif	Non résolu
Positif	69	45	16	88	29	13
Négatif	27	245	12	12	268	4

Sensibilité Relative 88% ± 6%¹
 Spécificité Relative 90% ± 3%
 Corrélation Relative 90% ± 3%

¹ valeurs ± calculées comme un intervalle de confiance à 95% en utilisant la méthode normale.

Parmi les 45 échantillons positifs avec le test ImmunoCard Mycoplasma, négatifs avec le test ELISA de référence, 14 ont été trouvés positifs, 26 négatifs et cinq non résolus. Parmi les 16 sérums positifs en ImmunoCard et indéterminés par le test ELISA, cinq ont été trouvés positifs, trois négatifs et huit non résolus.

Parmi les 27 échantillons négatifs en ImmunoCard et positifs en ELISA, 11 ont été trouvés positifs, 14 négatifs et deux non résolus. Enfin, parmi les 12 échantillons négatifs en ImmunoCard et indéterminés en ELISA, une a été trouvée positive, neuf négatifs et deux non résolus.

Aucun résultat non valide n'a été obtenu avec le test ImmunoCard Mycoplasma au cours des tests cliniques, contre 28/414 soit 6,8% de taux de retest par la méthode ELISA de référence.

Deux des sites cliniques (un hôpital et un laboratoire de référence) ont réalisé des tests de fixation du complément (FC) pour les anticorps dirigés contre *M. pneumoniae*. Les résultats en FC ont été classés comme non réactifs (< 1/8), positifs faibles (1/8-1/32) et positifs (≥ 1/64). Les résultats du test ImmunoCard Mycoplasma ont été comparés aux titres FC et sont présentés sur le tableau suivant:

ImmunoCard	Titres FC		
	< 8	8-32	≥ 64
Réactifs	29	25	28
Non Réactifs	97	56	4

Le test ImmunoCard Mycoplasma a identifié correctement 28/32 (88%) des échantillons à titre élevé (≥ 1/64). Le test ImmunoCard Mycoplasma était réactif avec 25 des échantillons (31%) ayant un titre faible (8-32). Parmi ceux-ci, 24 (96%) ont été confirmés comme réactifs en IgM par une autre méthode. Enfin, 25/29 (86%) des échantillons non réactifs en FC étaient réactifs avec le test ImmunoCard Mycoplasma et ont aussi été trouvés réactifs soit en ELISA soit en IF.

SPECIFICITE ANALYTIQUE

La spécificité du test ImmunoCard Mycoplasma a été évaluée sur des échantillons rétrospectifs provenant de patients avec des résultats de culture positifs ou présentant des évidences sérologiques pour d'autres pneumonies atypiques ou pour des pneumonies virales, bactériennes ou fongiques. Des échantillons positifs pour le facteur rhumatoïde, les anticorps antinucléaires et le lupus ont aussi été testés. Un des quatre échantillons positifs pour le lupus était réactif en ImmunoCard Mycoplasma. Aucune réaction croisée n'a été observée avec les autres classes (voir liste ci-dessous). Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de sérums testés.

Histoplasma (5)	Cytomegalovirus (6)	Coccidioides (10)	Epstein Barr Virus (14)
Parainfluenza 3 (1)	Legionella (7)	Influenza A (13)	Chlamydia (9)
Influenza B (1)	Anticorps antinucléaires (20)	Virus syncytial respiratoire (1)	Facteur rhumatoïde (10)
Adenovirus (3)			

ESPAÑOL



Enzoinmunoensayo Rápido para la Detección de IgM contra *Mycoplasma pneumoniae* en Suero Humano

REF 709030

IVD

Rx Only

USO INDICADO

El enzoinmunoensayo (EIA) ImmunoCard Mycoplasma es un procedimiento cualitativo, in vitro para la detección de IgM contra *Mycoplasma pneumoniae* en suero humano. Los resultados de la prueba son útiles para la ayuda en el diagnóstico de una infección reciente por *Mycoplasma pneumoniae*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Mycoplasma pneumoniae es miembro de un grupo de bacterias degeneradas que carecen de pared celular.¹ *M. pneumoniae* fue el primer patógeno humano identificado de este grupo y causa hasta el 20% de todos los casos de neumonía.^{1, 2} La neumonía micoplasmal se presenta con síntomas parecidos a la gripe,² no obstante, a diferencia de la mayoría de neumonías bacterianas y víricas, la neumonía micoplasmal es más gradual en cuanto a presentación y recuperación. Las infecciones por *M. pneumoniae* se agrupan habitualmente en la categoría de neumonías atípicas. Ejemplos de otros organismos que causan neumonía atípica son el virus influenza (A,B), el virus sincitial respiratorio, adenovirus, parainfluenza, citomegalovirus, *Chlamydia*, *Legionella*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*.³ La progresión de la enfermedad por *M. pneumoniae* está habitualmente limitada al sistema respiratorio desde la nasofaringe hasta los bronquiolos, dando como resultado un amplio abanico de síntomas más acordes con bronquitis que con neumonía. Los antibióticos pueden mejorar los síntomas, no obstante el organismo puede ser cultivado a menudo a partir de pacientes que siguen un régimen antibiótico. Las infecciones asintomáticas (silenciosas) pueden darse en adultos y figurar como hasta un 20% de las infecciones por *M. pneumoniae*.⁴

M. pneumoniae es endémico, con una mínima variación estacional (pequeños incrementos a finales de verano/principios de otoño).^{2, 5} La incidencia global va del 0,5 al 5,0 por 1000 en la población o hasta un 20% de todas las neumonías. La incidencia tiene un pico en los niños de 5 a 9 años y desciende con la edad, exceptuando un leve aumento en el grupo de edad de 30 a 40 años. La enfermedad es rara en adultos mayores de 50 años y niños pequeños, aunque el impacto puede ser severo en estos grupos. El organismo parece requerir un contacto estrecho para ser transmitido. El desarrollo de los síntomas puede tomar varias semanas y el organismo transmisible puede persistir una vez los síntomas han disminuido. Las epidemias se suceden por el todo el mundo en ciclos de 4 a 7 años y pueden estar ligadas a escuelas de infancia y guarderías.^{5, 6}

La detección directa de la infección por *Mycoplasma pneumoniae* es actualmente difícil debido al lento crecimiento del organismo en cultivo (4-20 días) y a los exigentes requerimientos de crecimiento.⁷ Por esta razón, la serología es a menudo el mejor método de laboratorio disponible.^{7, 8} La prueba de la fijación del complemento (CF) identifica anticuerpos contra un lipopolisacárido micoplasmal (LPS). En general, los laboratorios sugieren que incrementos de cuatro veces del título de CF utilizando sueros agudos/convalécientes apareados, o títulos de CF ≥ 64, son diagnósticos. Otras pruebas serológicas incluyen enzoinmunoensayos (EIAs) y ensayos de inmunofluorescencia (IFAs) para la detección de IgG o IgM y detección de aglutininas en frío. La ventaja de un ensayo basado en IgM es la detección de la enfermedad temprana/aguda antes que la enfermedad convaleciente, en la cual sucede el cambio a IgG.

La presencia de IgM contra *M. pneumoniae* se considera de tener un papel en el diagnóstico de la enfermedad temprana/aguda.^{4, 9, 10, 11} Las pruebas que detectan IgG e IgM a la vez o las pruebas que detectan solamente IgG tienen el problema de positivizarse en pacientes convalecientes, así como en individuos con historia previa de enfermedad por *M. pneumoniae* (subclínica).

La metodología de ImmunoCard Mycoplasma aporta un sistema de fácil utilización e independiente. No se precisan cálculos y el cambio de color visible hace que la interpretación de los resultados sea objetiva y simple.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

El EIA ImmunoCard Mycoplasma detecta la presencia de IgM contra *M. pneumoniae* en suero. El suero del paciente se añade a cada uno de los dos puertos de muestra. Después de dejar que la muestra entre en el dispositivo y migre a lo largo de la membrana y a través de los puertos de reacción, se añaden tres gotas de conjugado de fosfatasa alcalina-anti IgM humana a los puertos de muestra y se dejan entrar en el sistema. Se añaden luego tres gotas de lavado y dos gotas de sustrato a cada puerto de reacción. Se observan los puertos de reacción en busca del desarrollo de cualquier color azul después de cinco minutos. El puerto **CONTROL** sirve como un control del procedimiento ya que contiene IgM humana inmovilizada en el puerto de reacción. El puerto **TEST** contiene antígenos de I y sirve como puerto de prueba de paciente. El desarrollo de color azul en el puerto **TEST** indica un resultado reactivo del test para IgM contra *M. pneumoniae*. La no aparición de color azul en el puerto **TEST** indica un resultado no reactivo.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

- Tarjetas de Prueba** - Tarjetas envasadas individualmente que contienen antígenos inmovilizados de *M. pneumoniae* extraídos por detergente (puerto de reacción de **TEST**) e IgM humana (puerto de reacción de **CONTROL**)
- Control Positivo** - Muestra que contiene IgM anti-*M. pneumoniae* humana en un tampón que contiene 0,1% de azida sódica
- Control Negativo** - Tampón que contiene 0,1% de azida sódica
- Conjugado Enzimático** - IgM anti-humana monoclonal unida a fosfatasa alcalina en un tampón que contiene 0,1% de azida sódica
- Tampón de Lavado** - Tampón que contiene 9,5% (peso/volumen) de guanidina hidrocloreuro
- Reactivo Sustrato** - Solución tamponada que contiene 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y 0,1% de azida sódica
- Pipetas de Transferencia**

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

Cronómetro

PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstica in vitro.
- La concentración de los reactivos, los tiempos de incubación y las temperaturas (22-25 C) han sido optimizados para la sensibilidad y la especificidad. Los mejores resultados se obtienen citándose a esas especificaciones. Una vez el ensayo ha empezado, complete todos los pasos subsiguientes sin interrupción.
- El puerto de reacción derecho (superior) ha sido revestido con antígenos extraídos de Mycoplasma. Manipule el sistema como un material potencialmente biopeligroso.
- Las muestras de los pacientes, el Control Positivo y las Tarjetas de Prueba ya usadas pueden contener agentes infecciosos y deberían ser manejadas a un Nivel de Bioseguridad 2 tal y como se recomienda en el manual CDC/NIH "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos".
- Revise las Tarjetas de Prueba antes de sacarlas de la bolsa de papel metálico en que vienen. No utilice Tarjetas de Prueba cuya envoltura estuviera agujerada o en las cuales la envoltura no ha sido sellada por completo. No utilice Tarjetas del Test si el indicador del desecante ha cambiado de color azul a color rosado. Pueden ocurrir reacciones negativas falsas por causa del deterioro de las Tarjetas de Prueba que no han sido almacenadas apropiadamente.
- El Control Positivo contiene suero humano que fue cribado para HBsAg y anticuerpos contra HIV-1 siendo el resultado negativo. No obstante, ninguna prueba puede ofrecer total seguridad en cuanto a que la sangre humana no va a transmitir HIV, hepatitis u otros agentes infecciosos.
- Todos los reactivos deben ser agitados suavemente a 22-25 C antes de su utilización.
- No se deben intercambiar reactivos de kits con diferente número de lote ni utilizar reactivos caducados.
- Sostenga los viales de reactivo y las pipetas de transferencia verticalmente para así asegurar un tamaño y dispensación de gota adecuados. No permita que las puntas de los viales o de las pipetas toquen los puertos de muestra o de reacción.
- Coloque de nuevo los tapones coloreados en sus viales correspondientes.
- El Reactivo Substrato puede ser sensible a la luz y no debe, por tanto, exponerse a excesiva iluminación. El Reactivo Substrato debería ser incoloro. Si este reactivo mostrara una coloración azul, debe ser descartado.
- Utilice solamente una pipeta de transferencia por control o muestra. Deséchela después de su utilización. No intente reutilizarla.
- No haga caso de cualquier reacción de color que se produzca en los puertos de muestra (inferiores). Los resultados se determinan por el desarrollo de color en los puertos de reacción (superiores).
- Un suero muy lipémico, contaminado o con excesivos restos puede restringir el movimiento del Conjugado Enzimático hacia los puertos de muestra (inferior), produciendo potencialmente un resultado inválido. Los sueros no contaminados que causen problemas de flujo (resultados inválidos) pueden ser centrifugados y testados de nuevo.
- Las muestras con contaminación microbiana obvia o severa hemólisis no deben ser testadas ya que pueden producir resultados no fiables.
- Las muestras de pacientes no se deben dejar secar en los puertos de aplicación de muestra. El secado de la sangre total o el suero en un papel de filtro, inactiva, hasta varios puntos, los anticuerpos de la clase IgM.¹² **ADVERTENCIA:** Algunos reactivos de este kit contienen azida sódica que es un irritante de la piel. Evite el contacto de los reactivos con la piel. El desecho de reactivos que contienen azida sódica dentro de cañerías de plomo o cobre puede provocar la formación de azidas metálicas explosivas. Esto se puede evitar haciendo correr un gran volumen de agua durante el desecho.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

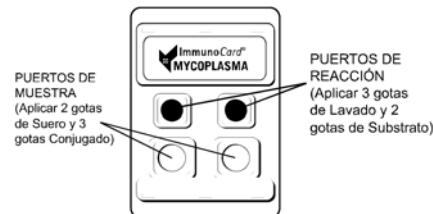
No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta del kit. Almacene el kit a 2-8 C y colóquelo de nuevo y con prontitud al refrigerador después de cada utilización.

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

- El formato de la Tarjeta de Prueba se muestra en el diagrama siguiente:



- El proceso en serie de cualquier número de muestras o controles es posible de realizar a condición de que, para cada tarjeta, se mantengan los pasos apropiados: secuencia de adición de reactivos y tiempos de incubación (espera) y de lectura de resultados. Cada paso en el procedimiento debe ser completado en cada muestra antes de iniciar el paso siguiente.
- El espacio del **CONTROL** (izquierda) de cada tarjeta proporciona un control interno para cada muestra. En este puerto se testan las características de flujo apropiadas de muestra y reactivo, así como el comportamiento del reactivo.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Permita que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (22-25 C) antes de ser utilizados (se requiere al menos una hora). Agite suavemente los reactivos líquidos antes de su uso.
- Todos los reactivos se suministran listos para el uso (no se requiere ninguna dilución).

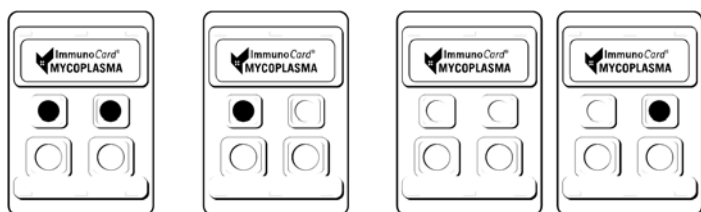
RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de suero obtenidas a partir de sangre coagulada deben ser almacenadas a 2-8 C hasta que sean testadas. La muestra debe testarse lo antes posible pero puede ser mantenida hasta 72 horas a 2-8 C antes del ensayo. Si la prueba no se puede realizar dentro de ese margen de tiempo, la muestra debe ser congelada en un congelador que no se descongele (-20 C o inferior) inmediatamente después de ser recibida. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Saque la cantidad apropiada de Tarjetas de Prueba de sus respectivos sobres. Identifíquelas convenientemente. Utilice 1 Tarjeta de Prueba para cada control o muestra que se teste.
- Utilizando una pipeta de transferencia, dispense 2 gotas de suero a ambos puertos de muestra inferiores.
- Incube 2 minutos a 22-25 C. Nota: durante la incubación de 2 minutos, la muestra se debe absorber completamente y cubrir ambos puertos de reacción (superiores).
- Añada 3 gotas de Conjugado Enzimático a ambos puertos de muestra (inferiores). Incube 2 minutos a 22-25 C. El Conjugado Enzimático debería absorberse completamente durante el periodo de incubación.
- Añada 3 gotas de Tampón de Lavado a ambos puertos de reacción (superiores). Espere hasta que el tampón de lavado se haya absorbido completamente.
- Añada 2 gotas de Reactivo Sustrato a ambos puertos de reacción (superiores). Cronometre 5 minutos a partir de cuando el Sustrato se añade a la primera Tarjeta. Incube durante 5 minutos a 22-25 C. Lea los resultados de manera visual inmediatamente al final del periodo de incubación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



LEA SOLAMENTE LOS PUERTOS DE REACCIÓN SUPERIORES PARA INTERPRETAR LOS RESULTADOS

Resultado de Prueba Reactivo: Color azul visualmente detectable en **AMBOS** puertos de reacción. Ocasionalmente un resultado de prueba reactivo puede mostrar una graduación de color azul dentro del puerto de reacción. Un resultado reactivo indica la presencia de IgM contra *M. pneumoniae*.

Resultado de Prueba No Reactivo: Color azul visualmente detectable solamente en el puerto de reacción de **CONTROL** (superior izquierdo). El puerto de reacción de **TEST** (superior derecho) debe ser incoloro hasta gris pálido o verde pálido. Ocasionalmente, el puerto de reacción de **TEST** (superior derecho) puede mostrar un inicio de color azul en la parte derecha o izquierda del puerto, con el resto del puerto permaneciendo incoloro. Esto debería considerarse un resultado de prueba no reactivo. Los resultados no reactivos indica que la IgM de *M. pneumoniae* está ausente o por debajo del nivel de detección del ensayo.

Resultado de Test Inválido: No aparición de color detectable en el puerto de reacción de **CONTROL** (superior izquierdo). Los resultados de prueba inválidos pueden ser debidos a un problema de reactivo/Tarjeta de Prueba, a un error en el procedimiento o a una restricción del flujo de muestra y/o Conjugado Enzimático debido a un suero severamente lipémico, contaminado o provisto de restos.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales. Los Controles Positivo y Negativo deben ser probados con cada lote nuevo o con cada embarque. Añada dos gotas de Control Positivo a ambos puertos de muestra inferiores de una Tarjeta. Añada dos gotas de Control Negativo a ambos puertos de muestra inferiores de una segunda Tarjeta. Siga los pasos del tres al seis de la sección de Procedimiento.

- Control Positivo:** Debe producir un color azul visualmente detectable en ambos puertos de reacción (superiores) (Figura 1).
- Control Negativo:** Debe producir un color azul visualmente detectable solamente en el puerto de reacción de **CONTROL** (superior izquierdo). El puerto de reacción de **TEST** (superior derecho) debería ser incoloro (Figura 2).

El **Control de Procedimiento** presente en el puerto izquierdo superior de cada Tarjeta de Prueba, testa el flujo adecuado y el comportamiento del reactivo para cada muestra individual. Si el **Control de Procedimiento** no desarrolla un color azul con cualquier muestra o control indica un resultado inválido y la prueba debe repetirse.

En el momento de cada utilización, los componentes del kit deben ser examinados visualmente pos si hubieran signos obvios de contaminación microbiana, congelación o derrame.

Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

Se recomienda que los resultados del chequeo de cada control de calidad sean registrados en un libro apropiado para así mantener registros de proceso de alta calidad. Si las reacciones esperadas no se observan estando los reactivos aún dentro de su margen de caducidad, por favor contacte con el Centro de Asistencia Técnica de Meridian Bioscience llamando al 1-800-343-3858.

VALORES ESPERADOS

La prueba ImmunoCard Mycoplasma fue evaluado en cuatro hospitales a lo largo de la región del occidente medio de los EE.UU. Además, un laboratorio de referencia analizó muestras provenientes de todo el país. De las 160 muestras prospectivas analizadas en los sitios hospitalarios, 26 (16%) dieron un resultado positivo en el test ImmunoCard Mycoplasma. El laboratorio de referencia reportó un total de 85/352 (24%) muestras positivas en el test ImmunoCard Mycoplasma. Estos resultados eran consistentes con los obtenidos utilizando otros tests para IgM contra *M. pneumoniae*, al igual que con los resultados publicados respecto de la prevalencia de IgM contra *M. pneumoniae*.^{1,2,13,14} Cuando un grupo de suero proveniente de un banco de sangre fue evaluado para la presencia de IgM contra *M. pneumoniae*, utilizando la prueba ImmunoCard Mycoplasma y otra prueba de EIA de referencia, se encontró una prevalencia de 12,7% y de 16,0% con cada una de las pruebas, respectivamente.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados de la prueba de ImmunoCard Mycoplasma deberían ser utilizados en conjunto con la información disponible de evaluación clínica del paciente y de otros procedimientos diagnósticos disponibles.
- Las muestras obtenidas muy tempranamente durante la infección pueden no contener niveles detectables de anticuerpo IgM. Si se sospecha una infección por *M. pneumoniae*, se debería obtener una segunda muestra en 7-14 días y testarla.
- El significado de los resultados de la prueba de pacientes inmunosuprimidos puede ser difícil de interpretar.
- Resultados positivos pueden no ser válidos en personas que han recibido transfusiones sanguíneas u otros productos sanguíneos durante los pasados últimos meses.

- Los anticuerpos IgM específicos contra *M. pneumoniae* se detectan habitualmente en pacientes con una infección primaria reciente. Sin embargo, se pueden hallar en pacientes con infecciones secundarias o reactivadas y se encuentran algunas veces en pacientes con ninguna otra evidencia detectable de infección reciente.^{7,11} Además, la IgM contra *M. pneumoniae* ha sido vista de persistir durante extensos periodos (2-12 meses) en algunos pacientes.¹¹
- No se han observado, aún siendo teóricamente posibles, resultados falsos negativos debidos a competencia con elevados niveles de IgG.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La prueba ImmunoCard Mycoplasma fue evaluado en suero en tres hospitales y un laboratorio de referencia. Los resultados obtenidos con la prueba ImmunoCard Mycoplasma fueron comparados con una prueba EIA IgM contra *M. pneumoniae* en micropícelos. Los resultados discrepantes fueron resueltos mediante pruebas de anticuerpos inmunofluorescentes (IFA), látex y fijación de complemento.

ImmunoCard	EIA Referencia			Resolución		
	R	NR	Repetida	R	NR	No Discernible
Reactiva (R)	69	45	16	88	29	13
No Reactiva (NR)	27	245	12	12	268	4

Sensibilidad Relativa 88% ± 6%¹
 Especificidad Relativa 90% ± 3%
 Concordancia Relativa 90% ± 3%

¹ ± valores calculados por el método normal como intervalos de confianza del 95%.

Los resultados de elucidación en cuarenta y cinco muestras reactivas para la prueba ImmunoCard Mycoplasma, y las cuales dieron resultado negativo en la prueba EIA de referencia fueron: 14 reactivas, 26 no reactivas cinco no discernibles. Además, los resultados obtenidos en dieciséis sueros reactivos con la prueba ImmunoCard Mycoplasma e indeterminados en la prueba EIA de referencia fueron: cinco reactivos, tres no reactivos y ocho no discernibles.

Adicionalmente, de 27 muestras ImmunoCard Mycoplasma no reactivas EIA de referencia reactivas, 11 dieron reactivas, 14 no reactivas y dos no discernibles. Finalmente, en 12 muestras ImmunoCard Mycoplasma no reactivas EIA de referencia indeterminado, uno dio reactiva, nueve no reactivas y dos indistinguibles.

No se obtuvo ningún resultado no válido en la prueba ImmunoCard Mycoplasma durante los estudios clínicos; en cambio, con la prueba EIA de referencia, se obtuvo una tasa de repetición igual a 28/414 ó 6,8%.

En dos de los lugares donde se realizó el estudio clínico (un hospital y un laboratorio de referencia) se hicieron pruebas de titulación por fijación de complemento (FC) para *M. pneumoniae*. Los resultados de la prueba de FC se agruparon como no reactivo (< 1/8), reactivo bajo (1/8 hasta 1/32) y reactivo (≥ 1/64). Los resultados de la prueba ImmunoCard Mycoplasma se comparan con los títulos de FC en la tabla que se muestra a continuación.

ImmunoCard	Título en prueba de FC		
	< 8	8-32	≥ 64
Reactiva	29	25	28
Non Reactiva	97	56	4

La prueba ImmunoCard Mycoplasma identificó correctamente 28/32 (88%) muestras con título positivo alto (≥ 64) en la prueba de FC. Entre las muestras con título bajo en la prueba de FC (8-32) la prueba ImmunoCard Mycoplasma dio resultado reactivo en 25 (31%) de las mismas. De éstas, 24 (96%) fueron confirmadas como reactivas para IgM mediante otros métodos. Finalmente, 25/29 (86%) muestras no reactivas en la prueba de FC dieron resultado reactivo con la prueba ImmunoCard Mycoplasma y también con tests de EIA ó IFA.

ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad de la prueba ImmunoCard Mycoplasma fue evaluada con muestras retrospectivas obtenidas a partir de pacientes con cultivo positivo, o evidencia serológica de otras neumonías atípicas, al igual que virales, bacterianas y por hongos. Además, se analizaron muestras con resultado positivo para el factor reumatoides, anticuerpos antinucleares y lupus. Una de cuatro muestras positivas para lupus dio resultado reactivo con la prueba ImmunoCard Mycoplasma. No se observaron reacciones de reactividad cruzada con las otras clases de sueros anotados más adelante. Los valores entre paréntesis son indicativos del número de muestras analizadas.

Histoplasma (5)	Cytomegalovirus (6)	Coccidioides (10)	Virus Epstein-Barr (14)
Parainfluenza 3 (1)	Legionella (7)	Influenza A (13)	Chlamydia (9)
Influenza B (1)	Anticuerpo anti-nucleo (20)	Virus Respiratorio Sincitial (1)	Factor reumatoide (10)
Adenovirus (3)			

DEUTSCH



ELISA-Schnelltest zum Nachweis von IgM gegen *Mycoplasma pneumoniae* in menschlichem Serum

REF 70930

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der ImmunoCard Mycoplasma-Enzymimmunoassay (EIA) ist ein qualitatives in vitro-Verfahren zum Nachweis von IgM gegen *Mycoplasma pneumoniae* in menschlichem Serum. Die Testergebnisse sollen die Diagnose frischer *Mycoplasma pneumoniae*-Infektionen unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Mycoplasma pneumoniae zählt zu einer Gruppe degenerierter Bakterien, denen die Zellwand fehlt.¹ *M. pneumoniae* war der erste identifizierte humanpathogene Erreger dieser Gruppe. Er verursacht bis zu 20% aller Fälle von Lungenentzündung.^{1,2} Mykoplasmenpneumonien zeigen sich mit Grippe-ähnlichen Symptomen,³ aber anders als bei viralen oder bakteriellen Pneumonien, bildet sich die Mykoplasmenpneumonie nur langsam aus und heilt auch nur langsam ab. *M. pneumoniae*-Infektionen werden für gewöhnlich in die Kategorie atypischer Lungenentzündungen eingestuft. Beispiele für andere Organismen, die eine atypische Lungenentzündung hervorrufen, sind das Influenza-Virus (A und B), der Respiratory Syncytial Virus (RS-Virus), Adenovirus, das Parainfluenza-Virus, das Zytomegalie-Virus, Chlamydien, *Legionella*, *Histoplasma capsulatum* und *Coccidioides immitis*.³ Die Erkrankung an *M. pneumoniae* breitet sich normalerweise nur im Atemtrakt vom Nasopharynx bis zu den Bronchiolen aus und löst eine breite Vielfalt von Symptomen aus, die vielmehr zu einer Bronchitis als zu einer Lungenentzündung passen. Antibiotika können die Symptome lindern, dennoch können die Organismen häufig von Patienten nach einer Antibiotika-Therapie kultiviert werden. Asymptomatische (stille) Infektionen können bei Erwachsenen auftreten und sind für bis zu 20% von *M. pneumoniae*-Infektionen verantwortlich.⁴

M. pneumoniae tritt endemisch auf mit minimalen jahreszeitlichen Schwankungen (leichte Anstiege im späten Sommer/frühen Herbst).^{2,5} Die Inzidenz insgesamt bewegt sich zwischen 0,5 und 5,0 pro 1.000 in der Bevölkerung oder bis zu 20% aller Pneumoniefälle. Die Inzidenz hat ein Maximum bei den 5 bis 9-Jährigen und nimmt mit dem Alter bis auf einen kleinen Anstieg in der Gruppe der 30-40-Jährigen ab. Die Krankheit ist selten bei Erwachsenen über 50 Jahren und Kleinkindern, obwohl in diesen Gruppen die Auswirkungen schwerwiegend sein können. Der Organismus braucht offensichtlich einen engen Kontakt zur Übertragung. Die Entwicklung von Symptomen kann mehrere Wochen dauern, und die Erreger können immer noch übertragbar sein, auch wenn die Symptome abgeklungen sind. Epidemien treten weltweit alle 4-7 Jahre auf und können von Kindergärten, Grundschulen und Tageseinrichtungen ausgehen.^{5,6}

Der direkte Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae*-Infektionen ist derzeit schwierig wegen des langsamen Wachstums des Organismus in Kultur und der hohen Wachstumsanforderungen.¹ Aus diesem Grund ist die Serologie oft die beste verfügbare Labormethode.^{7,8} Der Komplement-Fixierungs (CF)-Test identifiziert Antikörper gegen ein Lipopolysaccharid (LPS) der Mykoplasmen. Im allgemeinen werden ein vierfach erhöhter CF-Titer bei der paarweisen Analyse akuter und rekonzaleszenter Seren oder CF-Titer ≥ 64 von den Labors als Diagnoseweisend angesehen. Weitere serologische Tests sind Enzymimmunoassays (ELISAs) und Immunofluoreszenzassays (IFAs) zum Nachweis von IgG oder IgM, sowie der Nachweis kalter Agglutinine. Der Vorteil eines Tests, der auf IgM basiert, ist, daß eher ein frühes/akutes Stadium der Erkrankung erfaßt wird, als ein Stadium der Genesung, in dem die Umstellung auf IgG erfolgt ist.

Dem Vorkommen von IgM gegen *M. pneumoniae* wird eine wichtige Rolle in der Diagnose früher/akuter Krankheitsstadien zugesprochen.^{4,9,10,11} Tests, die sowohl IgM als auch IgG oder Tests, die nur IgG nachweisen, sind problematisch, da sie positive Ergebnisse zeigen bei Rekonzaleszenten sowie bei Patienten mit einer *M. pneumoniae*-Infektion (subklinisch) in der Anamnese.

Der ImmunoCard Mycoplasma-Test ist ein Schnelltest und daher einfach in der Anwendung. Berechnungen sind nicht nötig, und ein Farbumschlag macht die Interpretation der Ergebnisse objektiv und einfach.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der ImmunoCard Mycoplasma-ELISA weist das Vorkommen von IgM gegen *M. pneumoniae* im Serum nach. Patientenserum wird in jedes der beiden Probenfenster gegeben. Nachdem die Probe in die Testkarte aufgenommen wurde und entlang der Membran durch die Reaktionsfenster gewandert ist, werden drei Tropfen eines Konjugats von anti-humanem IgM mit alkalischer Phosphatase in die Probenfenster gegeben. Wenn das Konjugat in die Testkarte aufgenommen ist, werden drei Tropfen Waschpuffer und zwei Tropfen Substrat in jedes der Reaktionsfenster gegeben. Die Reaktionsfenster werden auf die Entwicklung einer Blaufärbung nach fünf Minuten beobachtet. Das **KONTROLL**-Fenster ist mit IgM beschichtet und dient zur Überprüfung des Testvorgangs. Das **TEST**-Fenster enthält *M. pneumoniae* Antigene und dient als Patientens-Fenster. Die Entwicklung von blauer Farbe im **TEST**-Fenster zeigt das Vorkommen von IgM gegen *M. pneumoniae* an. Wenn keine Blaufärbung im **TEST**-Fenster entsteht, ist das Ergebnis negativ.

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die **Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.**

1. **Testkarten** - Einzel in Folie verpackte Karten, die fest gebundene, mit Detergens extrahierte *M. pneumoniae*-Antigene (im **TEST**-Reaktionsfenster) und humanes IgM (im **KONTROLL**-Reaktionsfenster) enthalten
2. **Positiv-Kontrolle** - Probe mit humanem anti-*M. pneumoniae*-IgM in einem Puffer mit 0,1% Natriumazid
3. **Negativ-Kontrolle** - Puffer mit 0,1% Natriumazid
4. **Enzym-Konjugat** - Monoklonale Antikörper gegen humanes IgM, markiert mit alkalischer Phosphatase in einem Puffer mit 0,1% Natriumazid
5. **Waschpuffer** - Puffer mit 9,5% (Gewicht/Volumen) Guanidin-Hydrochlorid
6. **Substrat-Reagenz** - gepufferte Lösung mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat und 0,1% Natriumazid
7. **Transfer-Pipetten**

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

Stopp-Uhr

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In vitro Diagnostik bestimmt.
2. Reagenzien-Konzentrationen, Inkubationszeiten und Temperaturen (22-25 C) wurden bezüglich Sensitivität und Spezifität optimiert. Die besten Ergebnisse werden bei Einhalten dieser Vorgaben erzielt. Wenn der Test einmal begonnen wurde, sollten alle weiteren Schritte ohne Unterbrechung vollendet werden.
3. Das rechte (obere) Reaktionsfenster wurde mit extrahierten *Mycoplasma*-Antigenen beschichtet. Sie sind als potentiell gefährliches Material zu behandeln.
4. Patientenproben, Positiv-Kontrolle und benutzte Testkarten können infektiöse Erreger enthalten und sollten nach den Biosafety Level 2 - Richtlinien - wie in dem CDC/NIH Handbuch "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories," beschrieben - gehandhabt werden.
5. Vor dem Entfernen des Folienbeutels die Testkarten inspizieren. Testkarten, deren Folienbeutel Löcher aufweisen bzw. deren Folienbeutel nicht vollständig verschlossen sind, nicht verwenden. Testkarten, deren Trockenmittellindikator von Blau nach Rosa umgeschlagen ist, nicht verwenden. Der Zerfall unsachgemäß gelagerter Testkarten kann zu falsch-negativen Reaktionen führen.
6. Die Positiv-Kontrolle enthält menschliches Serum, das auf HBsAg und Antikörper gegen HIV-1 mit negativem Ergebnis untersucht wurde. Dennoch kann kein Test mit völliger Sicherheit ausschließen, dass menschliches Blut HIV, Hepatitis oder andere infektiöse Erreger übertragen wird.
7. Alle Reagenzien sollten vorsichtig gemischt und vor Gebrauch auf 22-25 C gebracht werden.
8. Reagenzien aus Testkits mit unterschiedlicher Chargennummer sollten nicht ausgetauscht werden. Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
9. Reagenzien-Flaschen und Transferpipetten senkrecht halten, um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen der richtigen Größe zu erzielen. Mit den Spitzen der Flaschen oder Pipetten weder die Proben- noch die Reaktionsfenster berühren.
10. Die Fläschchen mit den richtigen farbigen Deckeln wiederverschließen.
11. Das Substrat-Reagenz kann lichtempfindlich sein und sollte nicht einer übermäßigen Beleuchtung ausgesetzt werden. Das Substrat-Reagenz sollte farblos sein. Wenn es eine Blaufärbung zeigt, sollte es verworfen werden.
12. Für jede Kontrolle oder Probe eine eigene Transferpipette benutzen. Nach Gebrauch wegwerfen. Versuchen Sie nicht, die Pipette wiederzuverwenden.
13. Farbreaktionen in den (unteren) Probenfenstern nicht beachten. Die Ergebnisse werden durch die Farbreaktion in den (oberen) Reaktionsfenstern bestimmt.
14. Stark lipamisches Serum, kontaminiertes Serum oder Serum mit einem Übermaß an (Zell-)Bruchstücken kann die Wanderung des Enzymkonjugats in die (unteren) Probenfenster einschränken und so eventuell ungültige Ergebnisse erzielen. Nichtkontaminiertes Serum, das Fließprobleme hervorruft (ungültige Ergebnisse), kann zentrifugiert werden und erneut analysiert werden.
15. Offensichtlich mikrobiell kontaminierte oder stark hämolytierte Proben sollten nicht analysiert werden, da sie unzuverlässige Ergebnisse erzielen.
16. Patientenproben sollten in den Probenfenstern nicht austrocknen. Antikörper der IgM-Klasse werden in unterschiedlichem Maße durch das Trocknen von Vollblut oder Serum auf Filterpapier inaktiviert.¹²
WARNUNG: Einige Reagenzien dieses Testkits enthalten Natriumazid, das hautreizend wirkt. Hautkontakt mit den Reagenzien vermeiden. Das Entsorgen von Natriumazid-haltigen Reagenzien in Blei- oder Kupferrohren kann zur Bildung explosiver Metallazide führen. Dies kann durch Spülen mit großen Wassermengen während des Entsorgens vermieden werden.

GEFÄHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

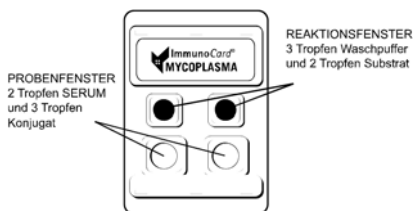
Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Haltbarkeitsdatum ist auf dem Etikett des Tests angegeben. Der Testkit sollte bei 2-8 C gelagert werden und sofort nach Gebrauch wieder in den Kühlschrank zurückgelegt werden.

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

1. Das Format der Testkarte ist unten abgebildet (die Testkarte sieht wie unten abgebildet aus):



2. Die Analyse einer großen Anzahl von Proben oder Kontrollen ist möglich, vorausgesetzt, daß für jede Karte die korrekten Schritte, die Reihenfolge der Reagenzienzugabe, die Inkubations(Warte-)Zeiten und die Zeiten, nach denen die Ergebnisse abgelesen werden, eingehalten werden. Jeder Schritte sollte für jede Probe abgeschlossen sein, bevor der nächste Schritt begonnen wird.
3. Die (linke) **KONTROLL**-Seite jeder Karte dient zur Überprüfung des Testvorgangs für jede Probe. So werden ein sauberer Proben- und Reagenzienfluß sowie das Funktionieren der Reagenzien kontrolliert.

VORBEREITUNG DER REAGENZEN

1. Den gesamten Testkit vor Gebrauch auf 22-25 C bringen (dauert mindestens eine Stunde). Flüssige Reagenzien vor Gebrauch vorsichtig mischen.
2. Alle Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert (keine Verdünnung nötig).

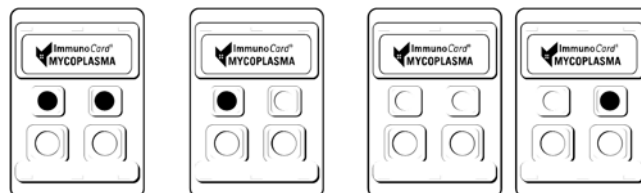
PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Aus gewonnenem Blut gewonnene Serumproben sollten bis zum Test bei 2-8 C gelagert werden. Die Proben sollten so bald wie möglich getestet werden, können aber bei 2-8 C bis zu 72 Stunden aufbewahrt werden. Wenn die Analyse nicht in diesem Zeitrahmen erfolgen kann, sollten die Proben in einem nicht selbstabtauenden Gefriergerät (-20 C oder weniger) sofort nach Erhalt eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben sollte vermieden werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die benötigte Anzahl von Testkarten aus ihren Verpackungen entnehmen. Mit der richtigen Kennzeichnung beschriften. Eine Testkarte für jede Kontrolle oder Probe verwenden.
2. Mit einer Transferpipette 2 Tropfen Serum in beide unteren Probenfenster geben.
3. Zwei Minuten bei 22-25 C inkubieren. Achtung: während der 2 Minuten dauernden Inkubation müssen die Proben komplett aufgesaugt sein und beide (oberen) Reaktionsfenster bedecken.
4. Drei Tropfen Enzym-Konjugat in beide (unteren) Fenster geben. Zwei Minuten bei 22-25 C inkubieren. Das Enzym-Konjugat sollte während der Inkubationsperiode vollständig aufgesaugt werden.
5. Drei Tropfen Waschpuffer in beide (oberen) Fenster geben. Warten, bis der Waschpuffer vollständig aufgesaugt ist.
6. Zwei Tropfen Substrat-Reagenz in beide (oberen) Reaktionsfenster geben. Eine Stopp-Uhr auf 5 Minuten einstellen, sobald das Substrat auf die erste Karte gegeben wurde. Fünf Minuten bei 22-25 C inkubieren. Die Ergebnisse sofort am Ende der Inkubationsperiode ablesen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE



Positives Ergebnis: Deutlich sichtbare Blaufärbung in **BEIDEN** Reaktionsfenstern. Gelegentlich kann ein positives Ergebnis eine Abstufung der blauen Farbe innerhalb des Reaktionsfensters zeigen. Eine positive Reaktion zeigt das Vorkommen von IgM gegen *M. pneumoniae* an.

Negatives Ergebnis: Deutlich sichtbare Blaufärbung nur im **KONTROLL**-Reaktionsfenster (oben links). Das **TEST**-Reaktionsfenster (oben rechts) sollte farblos bis schwach grau sein. Gelegentlich kann das **TEST**-Reaktionsfenster (oben rechts) auf der linken oder rechten Seite eine Spur blauer Farbe zeigen, während der Rest des Fensters farblos bleibt. Dies sollte als negatives Testergebnis angesehen werden. Negative Ergebnisse zeigen entweder an, daß keine IgM gegen *M. pneumoniae* vorliegen, oder daß die Spiegel unter der Nachweisgrenze des Tests liegen.

Ungültiges Ergebnis: Keine erkennbare Farbe im **KONTROLL**-Reaktionsfenster (oben links). Ungültige Testergebnisse können auf ein Problem der Reagenzien oder der Testkarte oder einen Fehler in der Testdurchführung zurückzuführen sein. Eine weitere Ursache könnte ein eingeschränkter Fluß der Probe und/oder des Enzym-Konjugats aufgrund stark kontaminierter, lipamischer Proben oder Proben mit Zellbruchstücken sein. Nichtkontaminierte Proben können zentrifugiert und erneut getestet werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- Jede neue Kitcharge oder jede neue Lieferung soll mit den positiven und negativen Kontrollen überprüft werden. Zwei Tropfen der Positivkontrolle in beide unteren Probenfenster der Karte geben. Zwei Tropfen Negativkontrolle in beide unteren Probenfenster einer zweiten Karte geben. Schritt 3-6 des Abschnitts Testdurchführung befolgen.
1. **Positiv-Kontrolle:** muß eine sichtbare blaue Farbe in beiden (oberen) Reaktionsfenstern erzielen
 2. **Negativ-Kontrolle:** muß nur im **KONTROLL**-Reaktionsfenster (oben links) eine sichtbare blaue Farbe erzielen. Das **TEST**-Reaktionsfenster (oben rechts) sollte farblos sein.

Die **Verfahrenskontrolle** im linken oberen Fenster jeder Testkarte überprüft die einzelnen Proben auf einen sauberen Fluß und das Funktionieren der Reagenzien. Wenn die Verfahrenskontrolle mit den Proben oder mit dem Kontrollreagenz keine Blaufärbung aufweist, zeigt dies ungültige Testergebnisse an, und der Test sollte wiederholt werden.

Bei jedem Gebrauch sollten die Testbestandteile auf offensichtliche Zeichen von mikrobiellem Befall, Vereisungen oder Undichtigkeiten untersucht werden.

Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor.

Die Ergebnisse jeder Qualitätskontrolle sollten in einem geeigneten Laborjournal aufgezeichnet werden, um einen hohen Standard der Testdokumentation aufrecht zu erhalten. Wenn die erwarteten Reaktionen nicht beobachtet werden, und die Reagenzien noch nicht abgelaufen sind, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.

ERWARTETE WERTE

Der ImmunoCard Mycoplasma -Test wurde in vier Krankenhäusern im mittleren Westen der USA geprüft. Zusätzlich testete ein Referenzlabor Proben aus den ganzen USA. Von den 160 Proben, die in den Krankenhäusern getestet wurden, waren 26 (16%) im ImmunoCard Mycoplasma -Test positiv. Das Referenzlabor berichtete über 85 im ImmunoCard Mycoplasma -Test positiven Proben von insgesamt 352 getesteten Proben (24%). Diese Resultate stimmen mit Ergebnissen überein, die mit anderen Tests auf IgM gegen *M. pneumoniae* gewonnen wurden, sowie mit veröffentlichten Werten für die Prävalenz von IgM gegen *M. pneumoniae*.^{1,2,13,14} Eine Gruppe von Blutbank-Seren wurde auf IgM Antikörper gegen *M. pneumoniae* mit dem ImmunoCard Mycoplasma -Test und einem Referenz-ELISA getestet. Die Prävalenz lag bei 12,7% bzw. 16%.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Ergebnisse des ImmunoCard Mycoplasma -Tests sollten in Verbindung mit allen verfügbaren Informationen aus klinischen oder anderen diagnostischen Untersuchungen des Patienten bewertet werden.
2. Proben, die zu früh im Verlauf einer Infektion abgenommen wurden, enthalten eventuell keine nachweisbaren Spiegel von IgM-Antikörpern. Wenn der Verdacht auf eine *M. pneumoniae*-Infektion vorliegt, sollte eine zweite Probe innerhalb von 7-14 Tagen abgenommen und untersucht werden.
3. Die Signifikanz der Test-Ergebnisse bei immunsupprimierten Patienten kann unter Umständen schwierig zu interpretieren sein.
4. Positive Testergebnisse können bei Personen, die innerhalb der vergangenen Monate Blut-Transfusionen oder andere Blutprodukte bekommen haben, ungültig sein.

- IgM-Antikörper, die spezifisch gegen *M. pneumoniae* sind, werden normalerweise bei Patienten mit einer frischen Primärinfektion gefunden. Sie können jedoch auch bei Patienten mit reaktivierten oder sekundären Infektionen oder manchmal bei Patienten ohne andere nachweisbare Zeichen einer frischen Infektion gefunden werden.^{7,11} Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß bei manchen Patienten IgM gegen *M. pneumoniae* über einen längeren Zeitraum (2-12 Monate) vorkommen können.¹¹
- Falsch negative Ergebnisse aufgrund der Konkurrenz hoher IgG-Spiegel sind theoretisch möglich, sind bisher jedoch nicht beobachtet worden.

LEISTUNGSMERKMALE

An drei Kliniken und einem Referenzlabor wurden Seren mit dem ImmunoCard Mycoplasma -Test analysiert. Die Ergebnisse des ImmunoCard Mycoplasma -Tests wurden mit einem Mikrotiter ELISA auf IgM gegen *M.pneumoniae* verglichen. Abweichende Ergebnisse wurden durch IF-Tests, Latex- oder Komplementbindungstests endgültig bewertet.

ImmunoCard	Referenz EIA			Endgültige Bewertung		
	Positiv	Negativ	Erneuter Test	Positiv	Negativ	Erneuter Test
Positiv	69	45	16	88	29	13
Negativ	27	245	12	12	268	4

Relative Sensitivität 88% ± 6%¹
 Relative Spezifität 90% ± 3%
 Relative Übereinstimmung 90% ± 3%

¹ ± Werte als 95% Vertrauensbereich mit der Normalmethode berechnet

Von den 45 Proben, die im ImmunoCard Mycoplasma -Test positiv und im Referenz-ELISA negativ waren, zeigten bei der endgültigen Bewertung 14 positiv, 26 negativ und fünf nicht eindeutige Ergebnisse. Sechzehn Seren, die im ImmunoCard Mycoplasma -Test positiv waren und im Referenz-ELISA unbestimmt waren, zeigten bei der endgültigen Bewertung fünf positiv, drei negativ und acht nicht eindeutige Ergebnisse.

Siebenundzwanzig Proben mit negativen Ergebnissen im ImmunoCard Mycoplasma -Test und positiven Ergebnissen im Referenz-ELISA zeigten bei der endgültigen Bewertung 11 positiv, 14 negativ und zwei nicht eindeutige Ergebnisse. Schließlich zeigten 12 Proben, die im ImmunoCard Mycoplasma -Test negativ und im Referenz-ELISA unbestimmt waren, einmal positiv, neunmal negativ und zweimal unklare Ergebnisse bei der endgültigen Bewertung. In den klinischen Studien wurde mit dem ImmunoCard Mycoplasma -Test kein ungültiges Ergebnis erzielt, dagegen waren bei der Referenz-ELISA-Methode 28 von 414 Tests ungültig, dies entspricht einer Rate von Testwiederholungen von 6,8%.

Zwei der Studienzentren (eine Klinik und ein Referenzlabor) wandten den Komplementbindungstest auf Antikörper gegen *M.pneumoniae* an. Die Ergebnisse dieses Tests wurden als negativ (< 1/8), niedrig (1/8-1/32) oder positiv (≥ 1/64) eingestuft. In der nachfolgenden Tabelle wurden die Ergebnisse des ImmunoCard Mycoplasma-Tests mit den Titern des Komplementbindungstests verglichen.

ImmunoCard	Titer des Komplementbindungstests		
	< 8	8-32	≥ 64
Positiv	29	25	28
Negativ	97	56	4

Der ImmunoCard Mycoplasma -Test identifizierte 28 von 32 (88%) der Proben mit hohen Komplementbindungstest-Titern korrekt. Der ImmunoCard Mycoplasma -Test zeigte bei 25 (31%) der Proben mit niedrigen Komplementbindungstest-Titern (8-32) positiv Ergebnisse. Vierundzwanzig (96%) davon wurden durch andere Methoden als IgM positiv bestätigt. Schließlich waren 25 von 29 (86%) der Proben, die im Komplementbindungstest negativ waren, im ImmunoCard Mycoplasma -Test positiv wie auch im ELISA und IF-Test.

TESTSPEZIFITÄT

Die Spezifität des ImmunoCard Mycoplasma -Tests wurde an retrospektiven Proben von Patienten mit positiven Kulturen oder mit einem serologischen Nachweis anderer atypischer Pneumonien sowie von viralen, bakteriellen oder Pilz-Pneumonien überprüft. Proben, die positiv bezüglich Rheuma-Faktoren, anti-nuklearen Antikörpern und Lupus waren, wurden ebenfalls getestet. Eine von vier Lupus-Proben war positiv im ImmunoCard Mycoplasma -Test. Mit den anderen Gruppen von Seren, die unten aufgelistet sind, wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet. Die Werte in Klammern geben die Anzahl der getesteten Seren an.

Histoplasma (5)	Cytomegalovirus (6)	Coccidioides (10)	Epstein Barr Virus (14)
Parainfluenza 3 (1)	Legionella (7)	Influenza A (13)	Chlamydia (9)
Influenza B (1)	Antinuclear Antibody (20)	Respiratory Syncytial Virus (1)	Rheumatoid Factor (10)
Adenovirus (3)			

REFERENCES

- Kenny, GE. Immunologic methods for mycoplasmas and miscellaneous bacteria. In Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, Friedman H and Penn GM (eds) Manual of Clinical Laboratory Immunology, 4th ed. American Soc. Microbiol., Washington DC: 1992; p. 498-502.
- Foy HM, Kenny GE, Cooney MK and Allan ID. Long-term epidemiology of infections with *Mycoplasma pneumoniae*. J Inf Dis 1979;139:681-687.
- Krause DC and Taylor-Robinson D. Mycoplasmas which infect humans. In Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R. and Baseman, J.B.(eds) Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington, DC: 1992; p. 417-444.
- Clyde WA, Jr. *Mycoplasma pneumoniae* respiratory disease symposium: summation and significance. Yale J Biol Med 1983;56:523-527.
- Foy HM. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. Clin Inf Dis 1993;17 (Suppl. 1): 537-546.
- Fernald GW, Collier AM, and Clyde Jr WA. Respiratory infections due to *Mycoplasma pneumoniae* in infants and children. Pediatrics 1975;55:327-335.
- Kenny GE. Serodiagnosis. In Maniloff, J., McElhaney, R.N., Finch, L.R. and Baseman, J.B. (eds) Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington, DC: 1992; p. 505-512.
- Jacobs, E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: A critical review of current procedures. Clin Inf Dis 1993;17 (Suppl. 1): 579-582.
- Skaak K, J. Eng, I. Orstavik and Haug KW. The diagnostic value of determination of IgM antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* by the indirect immunofluorescent antibody test. Acta Path. Microbiol. Scand. 1976; Sect. B 84:170-176.
- Carter JB and Carter SL. Acute-phase, indirect fluorescent antibody procedure for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Anals. Clin. Lab. Sci. 1983;13:150-155.
- Dussaix E, Slim A and Tournier P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test for detection of *Mycoplasma pneumoniae* J Clin Path 1983;36: 228-232.
- Schmidt NJ, and Emmons RW. General principles of laboratory diagnostic methods for viral, rickettsial and chlamydial infections. In: Schmidt, N.J., Emmons, R.W., eds, Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections, 6th ed. Washington, DC: American Public Health Assoc. 1989; p. 1-35.
- Kok TW, Marmijn BP, Varkanis G and Worswick DA. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Epidem. Inf. 1989;103:613-623.
- Sambra Z and Gadba R. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by specific IgM antibodies using a new capture-enzyme-immunoassay. Eur J Epid 1993;9:97-99.



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
 USA/Corporate Office
 3471 River Hills Drive
 Cincinnati, Ohio 45244
 Telephone: 513.271.3700
 Orders/Customer Service:
 800.543.1980
 Technical Support Center:
 800.343.3858
 Information Fax: 513.272.5432
 Ordering Fax: 513.271.0124

Meridian Bioscience Europe S. r. L.
 Via dell'Industria, 7
 20020 Villa Cortese, Milano
 ITALY
 Tel: +39 0331 43 36 36
 Fax: +39 0331 43 36 16
 Email: info@meridianbioscience.eu
 WEB: www.meridianbioscience.eu

EC REP
 Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
 2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
 BELGIUM
 Tel: +32 (0) 67 89 59 59
 Fax: +32 (0) 67 89 59 58
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu











Meridian Bioscience Europe France
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
 FRANCE
 Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
 Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.
 Postbus 301 - 5460 AH Veghel
 NETHERLANDS
 Tel: +31 (0) 411 62 11 66
 Fax: +31 (0) 411 62 48 41
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenvorbereitungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence ou catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Reactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi / Contenu suffisant pour <n> tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stoplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Conjugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Número de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tamponne / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenza / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Conjugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentrierendes Waschkonzentrat
R. Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.



SN11231

REV. 12/16