

REFERENCES

1. Tuazon CU, and Murray HW: "Atypical pneumonias". In: Respiratory Infections: diagnosis and Management. Pennington JE, ed. Raven Press, New York, NY, pp. 251, 1983.

2. Chanock RM, Fox HH, James WD, Gutekunst RR, White RT, Seterfit LB: Epidemiology of M.P. infection in military recruits. Ann. NY Acad. Sci. 143:484-496, 1967.

3. Lind K, Bentzon MW: Epidemics of *M. pneumoniae* infection in Denmark from 1958 - 1974. Tnt. J. Epidemiol. 5:267-277, 1976.

4. Noah ND: *M. pneumoniae* infection in the United Kingdom. British Med. J. 2:544-546, 1974.

5. Foy HM, Kenny GE, Cooney MK, Allan ID: Long-term epidemiology of infections with *M. pneumoniae*. J. Infect. Dis. 139:681-687, 1979.

6. Murray HW, Masur H, Seterfit LB, and Roberts LB: The protean manifestation of *M. pneumoniae* infections in adults. Am. J. Med. 58:229-242, 1975.

7. Cassell GH, and Cole BC: Mycoplasmas as agents of human disease. N. Engl. J. Med. 304:80, 1981.

8. Noriega ER, Simberkoff MS, Gilroy SJ, *et al*: Life threatening *M. pneumoniae*. JAMA 29:1471-1472, 1974.

9. Carter JB, and Carter SC: Acute-phase, Indirect Fluorescent antibody Procedure for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Ann. Clin. Lab. Sci. 13, No. 2, 150-155, 1983.

10. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.

11. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18, Approved Guideline.

12. Smith T:*Mycoplasma pneumoniae* Infections: Diagnosis based on Immunofluorescence titer of IgG and IgM antibodies. Mayo Clin Proc 61:831, 1986.

13. Lee SH, *et al*: Comparative studies of three serologic methods for the measurement of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. Am J Clin Pathol, Vol. 92, No. 3, 1989.

14. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.



Wampole Laboratories, Inc., Dist.  
2 Research Way,  
Princeton, NJ 08540 USA

ABBREVIATED TEST PROCEDURE

1. Dilute Serum 1:21
2. Add diluted serum to microwell 100 µL/well
3. 

→

 Incubate 20 to 30 minutes
4. Wash
5. Add Conjugate -- 100 µL/well
6. 

→

 Incubate 20 to 30 minutes
7. Wash
8. Add TMB 100 µL/well
9. 

→

 Incubate 10 to 15 minutes
10. Add Stop Solution 50 µL/well - Mix
11. READ



MYCOPLASMA IgG ELISA II

REF. 444800CE

INTENDED USE

The Wampole Laboratories Mycoplasma IgG ELISA test system provides a means for the qualitative detection of IgG antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human sera. The test may aid in the determination of the patient's serological status, or may aid in the diagnosis of disease associated with *Mycoplasma pneumoniae*. Potential cross-reactivity with *M. genitalium* has not been assessed, nor were studies performed on very young and/or elderly patients.

SIGNIFICANCE AND BACKGROUND

*Mycoplasma pneumoniae* is the most common cause of pneumonia and febrile upper-respiratory tract infections in the general population (except for influenza A) (1-5). Other nonrespiratory complications may also develop with this disease in virtually any organ system, with insult ranging from mild to life-threatening (6-8).

*Mycoplasma pneumoniae*, a prokaryote, is the smallest (10 x 200nm), and simplest self-replicating microorganism known, and more closely resembles a bacterium rather than a virus. However, because it lacks a cell-wall, a resistance to cell-wall-active antibiotics is obvious (*i.e.*, penicillin, cephalosporins (1)). This concern for diagnostic, or at least therapeutic accuracy in the early management of community-acquired infections is particularly critical in very young or elderly patients where very little temporal margin of error exists.

Until recently, the routine laboratory diagnosis of this infection has been limited to insensitive and/or non-specific assays (*i.e.*, cold agglutinins, complement-fixation, culture isolation). Species-specific antibodies to surface antigens are now known to exist. They are protective, and are readily detected by ELISA; even in the early stages of the disease. The diagnosis therefore, is best achieved serologically (9).

PRINCIPLE OF THE ELISA ASSAY

The Wampole Mycoplasma IgG ELISA test system is designed to detect IgG class antibodies to Mycoplasma IgG in human sera. Wells of plastic microwell strips are sensitized by passive absorption with Mycoplasma IgG antigen. The test procedure involves three incubation steps:

1. Test sera (properly diluted) are incubated in antigen coated microwells. Any antigen specific antibody in the sample will bind to the immobilized antigen. The plate is washed to remove unbound antibody and other serum components.
2. Peroxidase Conjugated goat anti-human IgG (γ chain specific) is added to the wells and the plate is incubated. The Conjugate will react with IgG antibody immobilized on the solid phase in step 1. The wells are washed to remove unreacted Conjugate.
3. The microwells containing immobilized peroxidase Conjugate are incubated with peroxidase Substrate Solution. Hydrolysis of the Substrate by peroxidase produces a color change. After a period of time the reaction is stopped and the color intensity of the solution is measured photometrically. The color intensity of the solution depends upon the antibody concentration in the original test sample.

MATERIALS PROVIDED

Each kit contains the following components in sufficient quantities to perform the number of tests indicated on packaging label. Note: All reactive reagents contain sodium azide as a preservative at a concentration of 0.1% (w/v).

PLATE	1. Plate. 96 wells configured in twelve 1x8-well strips coated with partially purified inactivated <i>M. pneumoniae</i> (strain FN) antigen. The strips are packaged in a st holder and sealed in an envelope with desiccant.
CONJ	2. Conjugate. Conjugated (horseradish peroxidase) goat anti-human IgG (γ chain specific). Ready to use. One, 15 mL vial with a white cap.
CONTROL +	3. Positive Control (Human Serum). One, 0.35 mL vial with a red cap.
CAL	4. Calibrator (Human Serum). One, 0.5 mL vial with a blue cap.
CONTROL -	5. Negative Control (Human Serum). One, 0.35 mL vial with a green cap.
DILSPE	6. SAVe Diluent™ (Sample Diluent). One 30 mL bottle (green cap) containing Tween-20, bovine serum albumin and phosphate-buffered-saline, (pH 7.2 ± 0.2). Ready to use. Note: Shake Well Before Use. (Product #: 4500C) (NOTE: This reagent may be used with any Wampole ELISA test system utilizing Product #: 4500CC). NOTE: The SAVe Diluent™ will change color in the presence of serum.
SOLN TMB	7. TMB: One 15 mL amber bottle (amber cap) containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB). Ready to use. Contains DMSO < 15% (w).
SOLN STOP	8. Stop solution: One 15 mL bottle (red cap) containing 1M H2SO4, 0.7M HCl. Ready to use.
WASHBUF 10X	9. Wash buffer concentrate (10X): dilute 1 part concentrate + 9 parts deionized or distilled water. One 100 mL bottle (clear cap) containing a 10X concentrated phosphate-buffered-saline and Tween-20 solution (blue solution). NOTE: 1X solution will have a pH of 7.2 ± 0.2.

The following components are not kit lot number dependent and may be used interchangeably with the ELISA assays: TMB, Stop Solution, and Wash Buffer.

Note: Kit also contains:

1. Component list containing lot specific information is inside the kit box.
2. Package insert providing instructions for use.

PRECAUTIONS

1. For *In Vitro* Diagnostic Use.
2. Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. Wear suitable protective clothing, gloves, and eye/face protection. Do not breathe vapor. Dispose of waste observing all local, state, and federal laws.
3. The wells of the ELISA plate do not contain viable organisms. However, the strips should be considered **POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIALS** and handled accordingly.
4. The human serum controls are **POTENTIALLY BIOHAZARDOUS MATERIALS**. Source materials from which these products were derived were found negative for HIV-1 antigen, HBsAg. and for antibodies against HCV and HIV by approved test methods. However, since no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, these products should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories": current edition; and OSHA's Standard for Bloodborne Pathogens (14).
5. Adherence to the specified time and temperature of incubations is essential for accurate results. **All reagents must be allowed to reach room temperature (20-25°C) before starting the assay.** Return unused reagents to refrigerated temperature immediately after use.
6. Improper washing could cause false positive or false negative results. Be sure to minimize the amount of any residual wash solution; (e.g., by blotting or aspiration) before adding Conjugate or Substrate. Do not allow the wells to dry out between incubations.
7. The SAVe diluent™, controls, wash buffer, and conjugate contain sodium azide at a concentration of 0.1% (w/v). Sodium azide has been reported to form lead or copper azides in laboratory plumbing which may cause explosions on hammering. To prevent, rinse sink thoroughly with water after disposing of solution containing sodium azide.
8. The Stop Solution is TOXIC. Causes burns. Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed. In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.
9. The TMB Solution is HARMFUL. Irritating to eyes, respiratory system and skin.
10. The Wash Buffer concentrate is an IRRITANT. Irritating to eyes, respiratory system and skin.
11. Wipe bottom of plate free of residual liquid and/or fingerprints that can alter optical density (OD) readings.
12. Dilution or adulteration of these reagents may generate erroneous results.
13. Reagents from other sources or manufacturers should not be used.
14. TMB Solution should be colorless, very pale yellow, very pale green, or very pale blue when used. Contamination of the TMB with conjugate or other oxidants will cause the solution to change color prematurely. Do not use the TMB if it is noticeably blue in color. To help reduce the possibility of contamination, refer to Test Procedure, Substrate Incubation section to determine the amount of TMB to be used.
15. Never pipette by mouth. Avoid contact of reagents and patient specimens with skin and mucous membranes.
16. Avoid microbial contamination of reagents. Incorrect results may occur.
17. Cross contamination of reagents and/or samples could cause erroneous results

18. Reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed free of all detergents.
19. Avoid splashing or generation of aerosols.
20. Do not expose reagents to strong light during storage or incubation.
21. Allowing the microwell strips and holder to equilibrate to room temperature prior to opening the protective envelope will protect the wells from condensation.
22. Wash solution should be collected in a disposal basin. Treat the waste solution with 10% household bleach (0.5% sodium hypochlorite). Avoid exposure of reagents to bleach fumes.
23. Caution: Liquid waste at acid pH should be neutralized before adding to bleach solution.
24. Do not use ELISA plate if the indicator strip on the desiccant pouch has turned from blue to pink.
25. Do not allow the conjugate to come in contact with containers or instruments that may have previously contained a solution utilizing sodium azide as a preservative. Residual amounts of sodium azide may destroy the conjugate's enzymatic activity.
26. Do not expose any of the reactive reagents to bleach-containing solutions or to any strong odors from bleach-containing solutions. Trace amounts of bleach (sodium hypochlorite) may destroy the biological activity of many of the reactive reagents within this kit.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- ELISA microwell reader capable of reading at a wavelength of 450nm.
- Pipettes capable of accurately delivering 10 to 200µL.
- Multichannel pipette capable of accurately delivering (50-200µL)
- Reagent reservoirs for multichannel pipettes.
- Wash bottle or microwell washing system.
- Distilled or deionized water.
- One liter graduated cylinder.
- Serological pipettes.
- Disposable pipette tips.
- Paper towels.
- Laboratory timer to monitor incubation steps.
- Disposal basin and disinfectant. (example: 10% household bleach, 0.5% sodium hypochlorite.)

STORAGE CONDITIONS

1. Store the unopened kit between 2° and 8°C.
2. Coated microwell strips: Store between 2° and 8°C. Extra strips should be immediately resealed with desiccant and returned to proper storage. Strips are stable for 60 days after the envelope has been opened and properly resealed and the indicator strip on the desiccant pouch remains blue.
3. Conjugate: Store between 2° and 8°C. DO NOT FREEZE.
4. Calibrator, Positive Control and Negative Control: Store between 2° and 8°C.
5. TMB: Store between 2° and 8°C.
6. Wash Buffer concentrate (10X): Store between 2° and 25°C. Diluted wash buffer (1X) is stable at room temperature (20° to 25° C) for up to 7 days or for 30 days between 2° and 8°C.
7. SAVe Diluent™: Store between 2° and 8°C.
8. Stop Solution: Store between 2° and 25°C.

SPECIMEN COLLECTION

1. It is recommended that specimen collection be carried out in accordance with NCCLS document M29: [Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease](#).
2. No known test method can offer complete assurance that human blood samples will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious.
3. Only freshly drawn and properly refrigerated sera obtained by approved aseptic venipuncture procedures should be used in this assay (10, 11). No anticoagulants or preservatives should be added. Avoid using hemolyzed, lipemic, or bacterially contaminated sera.
4. Store sample at room temperature for no longer than 8 hours. If testing is not performed within 8 hours, sera may be stored between 2° and 8°C for no longer than 48 hours. If delay in testing is anticipated, store test sera at –20°C or lower. Avoid multiple freeze/thaw cycles that may cause loss of antibody activity and give erroneous results.

GENERAL PROCEDURE

1. Remove the individual components from storage and allow them to warm to room temperature (20-25°C).
2. Determine the number of microwells needed. Allow six Control/Calibrator determinations (one Blank, one Negative Control, three Calibrators and one Positive Control) per run. A Reagent Blank should be run on each assay. Check software and reader requirements for the correct Controls/Calibrator configurations. Return unused strips to the resealable pouch with desiccant, seal, and returned to storage between 2° and 8°C.

EXAMPLE PLATE SET-UP		
	1	2
A	Blank	Patient 3
B	Neg. Control	Patient 4
C	Calibrator	Etc.
D	Calibrator	
E	Calibrator	
F	Pos. Control	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

3. Prepare a 1:21 dilution (e.g.: 10µL of serum + 200µL of SAVe Diluent™. NOTE: Shake Well Before Use) of the Negative Control, Calibrator, Positive Control, and each patient serum. The SAVe Diluent™ will undergo a color change confirming that the specimen has been combined with the diluent.
4. To individual wells, add 100µL of each diluted control, calibrator and sample. Ensure that the samples are properly mixed. Use a different pipette tip for each sample.
5. Add 100µL of SAVe Diluent™ to well A1 as a reagent blank. Check software and reader requirements for the correct reagent blank well configuration.
6. Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 25 ± 5 minutes.
7. Wash the microwell strips 5X.
- A. Manual Wash Procedure:
- a. Vigorously shake out the liquid from the wells.
- b. Fill each microwell with Wash Buffer. Make sure no air bubbles are trapped in the wells.
- c. Repeat steps a. and b. for a total of 5 washes.
- d. Shake out the wash solution from all the wells. Invert the plate over a paper towel and tap firmly to remove any residual wash solution from the wells. Visually inspect the plate to ensure that no residual wash solution remains. Collect wash solution in a disposable basin and treat with 0.5% sodium hypochlorite (bleach) at the end of the days run.

B. Automated Wash Procedure:

- If using an automated microwell wash system, set the dispensing volume to 300-350µL/well. Set the wash cycle for 5 washes with no delay between washes. If necessary, the microwell plate may be removed from the washer, inverted over a paper towel and tapped firmly to remove any residual wash solution from the microwells.
8. Add 100µL of the Conjugate to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the specimens were added.
9. Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 25 ± 5 minutes
10. Wash the microwells by following the procedure as described in step 7.
11. Add 100µL of TMB to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the specimens were added.
12. Incubate the plate at room temperature (20-25°C) for 10 to 15 minutes.
13. Stop the reaction by adding 50µL of Stop Solution to each well, including reagent blank well, at the same rate and in the same order as the TMB was added. Positive samples will turn from blue to yellow. After adding the Stop Solution, tap the plate several times to ensure that the samples are thoroughly mixed.
14. Set the microwell reader to read at a wavelength of 450nm and measure the optical density (OD) of each well against the reagent blank. The plate should be read within 30 minutes after the addition of the Stop Solution.

QUALITY CONTROL

1. Each time the assay is run the Calibrator must be run in triplicate. A reagent blank, Negative Control, and Positive Control must also be included in each assay.
2. Calculate the mean of the three Calibrator wells. If any of the three values differ by more than 15% from the mean, discard that value and calculate the mean using the remaining two wells.
3. The mean OD value for the Calibrator and the OD values for the Positive and Negative Controls should fall within the following ranges:

	OD Range
Negative Control	≤ 0.250
Calibrator	≥ 0.300
Positive Control	≥ 0.500

a. The OD of the Negative Control divided by the mean OD of the Calibrator should be ≤ 0.9.

b. The OD of the Positive Control divided by the mean OD of the Calibrator should be ≥ 1.25.

c. If the above conditions are not met the test should be considered invalid and should be repeated.
4. The Positive Control and Negative Control are intended to monitor for substantial reagent failure and will not ensure precision at the assay cut-off.
5. Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations.
6. Refer to NCCLS document C24: [Statistical Quality Control for Quantitative Measurements](#) for guidance on appropriate QC practices.

INTERPRETATION OF RESULTS

A. Calculations:

1. Correction Factor

A cutoff OD value for positive samples has been determined by the manufacturer and correlated to the Calibrator. The correction factor (CF) will allow you to determine the cutoff value for positive samples and to correct for slight day-to-day variations in test results. The correction factor is determined for each lot of kit components and is printed on the Component List located in the kit box.

2. Cutoff OD Value

To obtain the cutoff OD value, multiply the CF by the mean OD of the Calibrator determined above.

(CF x mean OD of Calibrator = cutoff OD value)

3. Index Values or OD Ratios

Calculate the Index Value or OD Ratio for each specimen by dividing its OD

value by the cutoff OD from step 2.

Example:

Mean OD of Calibrator	=	0.793
Correction Factor (CF)	=	0.25
Cut off OD	=	0.793 x 0.25 = 0.198
Unknown Specimen OD	=	0.432
Specimen Index Value or OD Ratio	=	0.432 / 0.198 = 2.18

B. Interpretations:

Index Values or OD ratios are interpreted as follows:

	Index Value or OD Ratio
Negative Specimens	≤ 0.90
Equivocal Specimens	0.91 to 1.09
Positive Specimens	≥ 1.10

1. An OD ratio ≤ 0.90 indicates no detectable IgG antibodies to *M. pneumoniae*. A non-reactive result indicates no current or previous infection with *M. pneumoniae*.
2. An OD ratio ≥ 1.10 is reactive for IgG antibodies to *M. pneumoniae*. A reactive test result indicates a past or recent infection with *M. pneumoniae*.
3. Specimens with OD ratio values in the equivocal range (0.91 - 1.09) should be retested in duplicate. Any two of the three results which agree should be reported. Specimens that remain equivocal after repeat testing should be tested by an alternate serologic procedure such as the Wampole Laboratories indirect fluorescent antibody (IFA) test procedure.

**NOTE:** Performance of this assay has not been tested with specimens known to be positive for antibodies to organisms which are known to be associated with lower respiratory illness ( i.e., Influenza A & B, CMV, *C. pneumoniae*, parainfluenza), and closely related Mycoplasma serovars known to cross-react with *M. pneumoniae*. **Cross-reactivity studies with such organisms have not been performed with this test system.**

LIMITATION OF THE ASSAY

1. A diagnosis should not be made on the basis of anti-Mycoplasma results alone. Test results for anti-Mycoplasma should be interpreted in conjunction with the clinical evaluation and the results of other diagnostic procedures.
2. If testing a particular specimen occurs early during the primary infection, no detectable IgG may be evident. If a Mycoplasma infection is suspected, a second sample should be taken at least fourteen days later.
3. The use of hemolytic, lipemic, bacterially contaminated or heat inactivated specimens should be avoided. Erroneous results may occur.
4. Assay performance characteristics have not been established for matrices other than serum.
5. A single positive result only indicates previous immunologic exposure. The level of antibody response or class of antibody response may both be required to determine active infection or disease stage.
6. Negative results do not rule out the diagnosis of *M. pneumoniae*-associated disease. The specimen may have been drawn before the appearance of detectable antibodies. Negative results in suspected early disease should be repeated in 4-6 weeks.
7. The continued presence or absence of antibodies cannot be used to determine the success or failure of therapy.
8. Testing should not be performed as a screening procedure for the general population. The predictive value of a positive or negative serologic result depends on the pretest likelihood of *M. pneumoniae* being present. Testing should only be done when clinical evidence suggests the diagnosis of *M. pneumoniae* associated disease.
9. The performance of this device has not been established on neonates and immunocompromised patients.

EXPECTED RESULTS

Symptomatic infections attributable to this organism most commonly occur in children and young adults (ages 2-19 years (12)). One report demonstrated that 97-98% of sera from a healthy adult population were non-reactive for *M. pneumoniae* antibody by CF and IFA (13). Each laboratory should establish their own expected results based upon the population type typically evaluated.

The clinical study for this product included 205 random specimens which were sent to a reference laboratory in the Northeastern United States for routine Mycoplasma serological analysis. With respect to this population, 92/205 (45%) were negative, 21/205 (10%) were equivocal, and 92/205 (45%) were reactive.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Comparative Study:

A comparative study was performed to demonstrate the equivalence of the Wampole Laboratories Mycoplasma IgG ELISA test system to the Wampole Laboratories Crowntitre® IgG IFA test system.

The performance of the Wampole Laboratories Mycoplasma IgG ELISA test system was evaluated in a two site clinical investigation. There were a total of 194 specimens tested; 109 at site one, and 85 at site two. Most of the specimens (192/194) were obtained from a reference laboratory in Northeastern United States. These specimens were sent to the lab for routine Mycoplasma serological analysis. The remaining two specimens were repository specimens which had been previously tested for Mycoplasma IgG antibody, and were found to be positive. All specimens were frozen and maintained according to the guidelines indicated under the Specimen Collection

section of this insert.

Specimens were tested on the ELISA test system at the clinical sites, and were then tested in-house by IFA. Table 1 below shows the results of this comparative study. These results represent those from single patient samples and not from multiple draws from the same patient.

Table 1: Calculation of Relative Sensitivity, Specificity, and Agreement

Wampole IFA Test System					
	≥1:64 Positive	<1:32 Negative	1:32 Equivocal	Totals	
Wampole Mycoplasma IgG ELISA Results	+	69	12	17	98
	-	4	84	0	88
	±	2	6	0	8
	Totals	75	102	17	194

Relative Sensitivity = 69/73 = 94.5% (95% Confidence Interval\* = 89.3 to 99.7%)

Relative Specificity = 84/96 = 87.5% (95% Confidence Interval\* = 80.9 to 94.1%)

Relative Agreement = 153/169 = 90.5% (95% Confidence Interval\* = 86.1 to 94.9%)

\* 95% confidence intervals calculated using the exact method.

In addition to the two-site clinical study described above, the Wampole Laboratories Mycoplasma IgG ELISA was used to evaluate 35 pairs of acute and convalescent specimens which were previously characterized by complement fixation (CF). Of the 35 pairs, 29 pairs demonstrated a four-fold or greater increase in the CF endpoint titer. Of the 29 pairs, 16 pairs were ELISA negative at the acute stage, and positive at the convalescent stage; eight pairs were positive at both the acute and convalescent stage; and five pairs were negative at both the acute and convalescent stage.

**NOTE:** Be advised that relative refers to the comparison of this assay's results to that of a similar assay. There was not an attempt to correlate the assay's results with disease presence or absence. No judgment can be made on the comparison assay's accuracy to predict disease.

Reproducibility:

Reproducibility was evaluated as outlined in document number EP5: [Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices, Current Edition](#), as published by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Villanova, PA. Reproducibility studies were conducted at both clinical sites using the same specimens.

Briefly, six specimens were tested, two relatively strong positive specimens, two specimens near the cut-off, and two which were clearly negative. Additionally, the kit's Negative Control and High Positive Control were included as additional panel members, for a total of eight specimens. On each day of testing, each of the eight specimens were assayed in duplicate. Also, on each day of testing, the assay was performed twice, once in the morning and once in the afternoon, for a total of four replicates for each specimen daily. The clinical sites conducted this reproducibility study for a twenty day period, for a total of 80 observations for each of the eight panel members. A summary of this investigation appears in Table 2 below:

Table 2: Summary of Precision Testing Conducted at Clinical Sites 1 and 2

Specimen	Site	Mean Ratio	Result	SWR*	ST**	Days	Total Observations	Overall % CV
M-1	1	6.056	High	0.682	1.016	20	80	16.75
	2	6.124	Positive	0.349	0.683	20	80	11.15
M-2	1	3.084	High	0.220	0.449	20	80	14.55
	2	3.295	Positive	0.185	0.397	20	80	12.04
M-3	1	1.089	Near	0.117	0.127	20	80	11.68
	2	0.896	Cut-off	0.087	0.124	20	80	13.83
M-4	1	0.881	Near	0.056	0.073	20	80	8.32
	2	0.611	Cut-off	0.056	0.094	20	80	15.30
M-5	1	0.475	Negative	0.024	0.076	20	80	16.03
	2	0.093		0.045	0.077	20	80	83.35
M-6	1	0.443	Negative	0.026	0.072	20	80	16.24
	2	0.049		0.051	0.067	20	80	137.6
High Positive Control	1	3.611	Positive	0.210	0.275	20	80	7.61
	2	3.680		0.257	0.311	20	80	8.44
Negative Control	1	0.415	Negative	0.013	0.068	20	80	16.42
	2	0.111		0.062	0.119	20	80	107.6

\* Point estimate of within run precision standard deviation.

\*\* Point estimate of total precision standard deviation.

**NOTE:** The reproducibility results depicted in Table 2 are presented only as an example of those results obtained during the clinical study, using ideal conditions of environment, equipment, and technique. Reproducibility should be evaluated at each laboratory, and may

adicionales del panel, en un total de ocho muestras. Durante cada día de las pruebas, cada una de estas ocho muestras se sometió a ensayo por duplicado. Además, durante cada uno de los días de las pruebas, el ensayo se realizó dos veces; una vez por la mañana y otra por la tarde, lo que supone un total de cuatro duplicados diarios para cada muestra. Los laboratorios llevaron a cabo este estudio de reproducibilidad durante un periodo de veinte días, con un total de 80 observaciones para cada uno de los ocho componentes del panel. La tabla 2 que aparece a continuación resume los datos de esta investigación:

Tabla 2: Resumen de pruebas de precisión realizadas en los laboratorios 1 y 2

Muestra	Lab.	Cociente medio	Resultado	DTA*	DTT**	Días	Total de observaciones	% CV global
M-1	1	6,056	Positivo	0,682	1,016	20	80	16,75
	2	6,124		0,349	0,683	20	80	11,15
M-2	1	3,084	Positivo	0,220	0,449	20	80	14,55
	2	3,295		0,185	0,397	20	80	12,04
M-3	1	1,089	Cerca del límite de referencia	0,117	0,127	20	80	11,68
	2	0,896		0,087	0,124	20	80	13,83
M-4	1	0,881	Cerca del límite de referencia	0,056	0,073	20	80	8,32
	2	0,611		0,056	0,094	20	80	15,30
M-5	1	0,475	Negativo	0,024	0,076	20	80	16,03
	2	0,093		0,045	0,077	20	80	83,35
M-6	1	0,443	Negativo	0,026	0,072	20	80	16,24
	2	0,049		0,051	0,067	20	80	137,6
Control positivo	1	3,611	Positivo	0,210	0,275	20	80	7,61
	2	3,680		0,257	0,311	20	80	8,44
Control negativo	1	0,415	Negativo	0,013	0,068	20	80	16,42
	2	0,111		0,062	0,119	20	80	107,6

\* Cálculo puntual de la desviación típica de la precisión dentro de un mismo análisis.  
\*\* Cálculo puntual de la desviación típica de la precisión total.

NOTA: Los resultados de reproducibilidad ilustrados en la tabla 2 se presentan solamente como ejemplo de los resultados obtenidos durante el estudio clínico, en condiciones ideales en lo que respecta a entorno, equipamiento y técnica. La reproducibilidad deberá evaluarse en cada laboratorio, y puede variar en función de las condiciones del mismo.

REFERENCIAS

- Tuazon CU, and Murray HW: "Atypical pneumonias". In: Respiratory Infections: diagnosis and Management. Pennington JE, ed. Raven Press, New York, NY, pp. 251, 1983.
- Chanock RM, Fox HH, James WD, Gutekunst RR, White RT, Seterfit LB: Epidemiology of M.P. infection in military recruits. Ann. NY Acad. Sci. 143:484-496, 1967.
- Lind K, Bentzon MW: Epidemics of *M. pneumoniae* infection in Denmark from 1958 - 1974. Tnt. J. Epidemiol. 5:267-277, 1976.
- Noah ND: *M. pneumoniae* infection in the United Kingdom. British Med. J. 2:544-546, 1974.
- Foy HM, Kenny GE, Cooney MK, Allan ID: Long-term epidemiology of infections with *M. pneumoniae*. J. Infect. Dis. 139:681-687, 1979.

- Murray HW, Masur H, Seterfit LB, and Roberts LB: The protean manifestation of *M. pneumoniae* infections in adults. Am. J. Med. 58:229-242, 1975.
- Cassell GH, and Cole BC: Mycoplasmas as agents of human disease. N. Engl. J. Med. 304:80, 1981.
- Noriega ER, Simberkoff MS, Gilroy SJ, *et al*: Life threatening *M. pneumoniae*. JAMA 29:1471-1472, 1974.
- Carter JB, and Carter SC: Acute-phase, Indirect Fluorescent antibody Procedure for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Ann. Clin. Lab. Sci. 13, No. 2, 150-155, 1983.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18, Approved Guideline.
- Smith T:*Mycoplasma pneumoniae* Infections: Diagnosis based on Immunofluorescence titer of IgG and IgM antibodies. Mayo Clin Proc 61:831, 1986.
- Lee SH, *et al*: Comparative studies of three serologic methods for the measurement of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. Am J Clin Pathol, Vol. 92, No. 3, 1989.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.

PROCEDIMIENTO ABREVIADO DE LA PRUEBA

- Diluir el suero a 1:21
- Añadir 100 µl de suero diluido/micropocillo
- Incubar 20-30 minutos
- Lavar
- Añadir 100 µl de conjugado/micropocillo
- Incubar 20-30 minutos
- Lavar
- Añadir 100 µl de TMB/micropocillo
- Incubar 10-15 minutos
- Añadir 50 µl de solución de parada/micropocillo - Mezclar
- LEER



SISTEMA DE PRUEBAS MYCOPLASMA IgG ELISA II

444800CE

APLICACIÓN

El sistema de pruebas Mycoplasma IgG ELISA de Wampole Laboratories está diseñado para la detección cualitativa de anticuerpos de tipo IgG contra *Mycoplasma pneumoniae* en suero humano. La prueba puede ayudar en la determinación del estado serológico del paciente o en el diagnóstico de enfermedades asociadas con el *Mycoplasma pneumoniae*. No se ha evaluado la reactividad cruzada potencial con el *M. genitalium*, ni tampoco se han realizado estudios en pacientes muy jóvenes o muy ancianos.

SIGNIFICACIÓN Y ASPECTOS GENERALES

*Mycoplasma pneumoniae* es la causa más frecuente de neumonía e infecciones febriles de vías respiratorias altas en población general (salvo la infección por influenza A) (1-5). También se pueden desarrollar otras complicaciones no respiratorias en esta enfermedad que pueden afectar prácticamente a todos los sistemas y que pueden oscilar de leves a potencialmente mortales (6-8).

El *Mycoplasma pneumoniae* es un procariota. Se trata del microorganismo más pequeño (10x200 nm) y más simple con capacidad de autoduplicación, y se parece más a una bacteria que a un virus. Sin embargo, debido a que carece de membrana celular, resulta evidente su resistencia a los antibióticos que actúan en la membrana celular (es decir, penicilina, cefalosporinas (1)). La importancia del diagnóstico, o al menos la exactitud terapéutica en la gestión de las primeras fases de las infecciones adquiridas en una comunidad es especialmente importante en pacientes muy jóvenes o ancianos, para los que el margen de error temporal es muy pequeño.

Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico normal de la infección en laboratorio ha estado limitado a ensayos insensibles y no específicos (aglutininas frías, fijación del complemento, aislamiento de cultivos). No se conoce la existencia de anticuerpos contra especies específicas que actúen contra los antígenos superficiales. Su misión es la de proteger y se detectan mediante pruebas ELISA, incluso en la fase temprana de la enfermedad. Por este motivo, el mejor diagnóstico se alcanza por procedimientos serológicos (9).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA ELISA

El sistema de pruebas Mycoplasma IgG ELISA de Wampole está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra micoplasma en suero humano. Los pocillos de las tirillas de micropocillos de plástico se sensibilizan mediante absorción pasiva con antígeno e IgG frente a micoplasma. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

- Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
- Se agrega anti-IgG humana (específica de la cadena γ) de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo tipo IgG inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los pocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
- Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Cada kit contiene los siguientes componentes en cantidades suficientes para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. Todos los reactivos contienen como conservante azida de sodio a una concentración del 0,1% (p/v).

PLATE	1. Placa. 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno inactivado parcialmente purificado de <i>M. pneumoniae</i> (cepa FN). Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un
CONJ	2. Conjugado. Anti-IgG humana (específica de la cadena γ) de cabra conjugada con peroxidasa de rábano. Lista para usar. Un vial de 15 ml con tapón blanco.
CONTROL +	3. Control positivo (suero humano). Un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4. Calibrador (suero humano). Un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5. Control negativo (suero humano). Un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DILSPE	6. SAvE Diluent™ (Diluyente de la muestra). Frasco de 30 ml (tapón verde) con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2 ± 0,2). Lista para su uso. <b>Nota:</b> Agite bien antes de usar. (Nº de producto: 4500CC). (NOTA: Este reactivo puede usarse con cualquier sistema de pruebas ELISA de Wampole que utilice el producto nº 4500CC). <b>NOTA:</b> el diluyente de la muestra cambiará de color en presencia de suero.
SOLN TMB	7. TMB: Un frasco de 15 ml de color ámbar (tapón ámbar) que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Lista para usar. Contiene DMSO ≤ 15% (p).
SOLN STOP	8. Solución para detener la reacción: Un frasco de 15 ml (tapón rojo) con H2SO4 1 M y HCl 0,7 M. Lista para usar.
WASHBUF 10X	9. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml (tapón transparente) que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). <b>NOTA:</b> la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

Los siguientes componentes no dependen del número de lote del kit y se pueden usar indistintamente con cualquier método ELISA: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado.

Nota: El kit también contiene:

- Relación de componentes con información específica del número de lote, incluida en la caja del kit.
- Prospecto incluido en la caja con las instrucciones de uso.

PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con agua abundante y busque atención médica. Use ropa protectora adecuada, guantes y protección para los ojos y el rostro. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
- Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, las tirillas se deben considerar **MATERIALES BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE PELIGROSOS**, y se deben manipular como tales.
- Los controles de suero humano son **MATERIALES BIOLÓGICOS POTENCIALMENTE PELIGROSOS**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, debido a que ningún método de prueba puede ofrecer completa seguridad de que estén ausentes agentes infecciosos, estos productos deben ser manejados según el Nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda para cualquier suero humano o muestra de sangre potencialmente infecciosos en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos): edición actual, y en el Estándar OSHA (Seguridad ocupacional y administración de salud) para patógenos transmitidos por sangre (14).
- Para obtener resultados exactos es esencial cumplir con el tiempo y la temperatura que se especifican para las incubaciones. **Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de empezar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
- El lavado inadecuado ocasionará resultados positivos falsos o negativos falsos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente de la muestra, los controles, la solución tampon de lavado, y el conjugado contienen azoda de sodio a una concentración del 0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azoda de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosions al martillar las tuberías. Para evitario, enjuague bien el lavabo con agua tras desechar las soluciones que contienen azida de sodio.
- La solución para detener la reacción es TÓXICA. Provoca quemaduras. Tóxica por inhalación, por contacto con la piel y en caso de ingestión. En caso de accidente o si usted se siente mal, busque atención médica inmediatamente.
- La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel.
- La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, sistema respiratorio y piel.
- Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No se deben utilizar reactivos de otro origen o fabricante.



Wampole Laboratories, Inc., Dist.  
2 Research Way,  
Princeton, NJ 08540 USA



1-800-257-9525

1-800-532-0295

Press 1 for Customer Service  
Press 2 for Technical Service  
FAX



- La solución TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y de las muestras de pacientes con la piel o membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y muestras podría provocar resultados falsos.
- Los instrumentos de cristal que no sean desechables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para que queden libres de todo residuo de detergente.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
- No exponga los reactivos a luz fuerte durante el almacenamiento o la incubación.
- Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
- Las soluciones de lavado deben recogerse en un recipiente para desechos. Trate la solución de desecho con lejía de uso doméstico al 10% (hipoclorito sódico al 0,5%). Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: El desecho líquido con pH ácido debe ser neutralizado antes de agregarlo a la solución de lejía.
- No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
- No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
- No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a cualquier fragancia fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio) pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este kit.

#### MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

- Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm.
- Pipetas capaces de dispensar con precisión entre 10 y 200 µl.
- Pipeta multicanal capaz de una dispensación exacta (50-200 µl).
- Reservorios de reactivos para pipetas de varios canales.
- Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
- Agua destilada o desionizada.
- Cilindro graduado de un litro.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipeta desechables.
- Toallas de papel.
- Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
- Recipiente para desechos y desinfectante. (Ejemplo: lejía de uso doméstico al 10%, hipoclorito de sodio al 0,5%).

#### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

- Almacenar el kit sin abrir entre 2 y 8 °C.
- Tirillas de micropocillos revestidos: Almacenar entre 2 y 8 °C. Las tirillas sobrantes se deberán volver a sellar inmediatamente con el desecante y se devolverán al lugar adecuado de almacenamiento. Las tirillas son estables durante 60 días tras la apertura del sobre si se resellan correctamente y la tirilla indicadora del envase del desecante permanece azul.
- Conjugado: Almacenar entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR.
- Calibrador, control positivo y control negativo: Almacenar entre 2 y 8 °C.
- TMB: Almacenar entre 2 y 8 °C.
- Tampón de lavado concentrado (10X): Almacenar entre 2 y 25 °C. El tampón de lavado diluido (1X) es estable a temperatura ambiente (20-25 °C) hasta 7 días o durante 30 días entre 2 y 8 °C.
- Diluyente de la muestra: Almacenar entre 2 y 8 °C.
- Solución para detener la reacción: Almacenar entre 2 y 25 °C.

#### RECOGIDA DE LA MUESTRA

- Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con el documento M29 del NCCLS: *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre humana no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan recolectado mediante procedimientos homologados de venipuntura aséptica (10,11). No deberán agregarse anticoagulantes ni conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- No conserve la muestra a temperatura ambiente durante más de ocho horas. Si la prueba no se va a llevar a cabo dentro de las 8 horas siguientes, los sueros se pueden conservar entre 2 y 8 °C durante un máximo de 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a –20 °C o a temperaturas inferiores. Evite congelar y descongelar la muestra más de una vez, ya que esto puede causar la pérdida de actividad del anticuerpo y dar resultados erróneos.

#### PROCEDIMIENTO GENERAL

- Retire los componentes individuales del kit del lugar de almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C).

- Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control neg.	Paciente 4
C	Calibrador	etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control pos.	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

- Prepare una dilución 1:21 (p. ej.: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente de la muestra. NOTA: Agite bien antes de usar) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. El diluyente de muestra cambiará de color, confirmando que la muestra se ha combinado con el diluyente.
- A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente para muestras al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.

##### A. Procedimiento de lavado manual:

- Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
- Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
- Repita los pasos a y b para un total de 5 lavados.
- Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con hipoclorito de sodio al 0,5% (lejía) al final de la jornada de trabajo.

##### B. Procedimiento de lavado automático:

- Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
  - Incube la placa a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
  - Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
  - Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
  - Incube la placa a temperatura ambiente (20-25 °C) entre 10 y 15 minutos.
  - Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución de parada a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se añadió la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
  - Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. La placa deberá leerse en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

#### CONTROL DE CALIDAD

- El calibrador se debe ensayar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir en cada ensayo un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.
- Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
- El valor medio de la DO del calibrador y los valores de la DO de los controles negativo y positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

	Intervalo de DO
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.

- La DO del control positivo dividida por la DO media del calibrador deberá ser ≥1,25.
  - Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
- Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, y no aseguran la precisión del límite de referencia.
  - Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
  - Consulte el documento C24 del NCCLS: *Statistical Quality Control for Quantitative Measurements* (Control de calidad estadístico para determinaciones cuantitativas) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

##### A. Cálculos:

###### 1. Factor de corrección

El fabricante ha establecido un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas y corregir las pequeñas variaciones cotidianas en las pruebas de los resultados. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la lista de componentes que se encuentra en la caja del kit.

###### 2. Límite de referencia de la DO

Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente:

(FC x media de DO del calibrador = límite de referencia de la DO)

###### 3. Valores índice o cocientes de DO

Calcule el valor índice o cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso 2.

Ejemplo:			
DO media del calibrador	=	0,793	
Factor de corrección (FC)	=	0,25	
DO de límite de referencia	=	0,793 x 0,25 = 0,198	
DO de muestra desconocida	=	0,432	
Valor índice o cociente de DO de la muestra	=	0,432 / 0,198 = 2,18	

##### B. Interpretaciones:

Los valores índice o cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

	Valor índice o cociente de DO
Muestras negativas	≤ 0,90
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	≥ 1,10

- Un cociente de DO □ 0,90 indica que no se detectan anticuerpos de tipo IgG contra el *M. pneumoniae*. Un resultado no reactivo indica que no existe ni ha existido anteriormente una infección por *M. pneumoniae*.
- Un cociente de DO ≥ 1,10 es reactivo cuando existen anticuerpos de tipo IgG contra el *M. pneumoniae*. Un resultado reactivo indica una infección anterior o reciente por *M. pneumoniae*.
- Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Se deberán utilizar cualesquiera dos de los tres resultados que coincidan. Las muestras que continúan siendo dudosas tras repetir la prueba se deben analizar mediante un procedimiento serológico alternativo, como por ejemplo un procedimiento de prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) de Wampole Laboratories.

**NOTA:** No se ha probado el funcionamiento de este ensayo con muestras positivas en anticuerpos contra organismos de los que se conoce su asociación con enfermedades del tracto respiratorio inferior (por ejemplo, influenza A y B, CMV, *C. pneumoniae*, parainfluenza), y su relación estrecha con serovares de *Mycoplasma* que muestran una reactividad cruzada con el *M. pneumoniae*. **No se han realizado estudios de reactividad con dichos organismos mediante este sistema de pruebas.**

#### LIMITACIÓN DEL ENSAYO

- No se debe emitir un diagnóstico que se base exclusivamente en los resultados de la prueba antimicoplasma. Los resultados de las pruebas antimicoplasma deberán interpretarse de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
- Si se somete a pruebas una muestra durante un proceso de infección primaria, puede suceder que no se detecten anticuerpos de tipo IgG. Si se sospecha de la existencia de una infección por *Mycoplasma*, será necesario tomar una segunda muestra transcurridas dos semanas como mínimo.
- Debe evitarse el uso de muestras hemolíticas, lipémicas, contaminadas con bacterias o inactivadas por el calor. Pueden producirse resultados incorrectos.
- Las características de funcionamiento del ensayo no se han establecido para otras matrices que no sean suero.
- Un solo resultado positivo indica únicamente que ha existido una exposición inmunológica anterior. Para determinar el estado de la infección activa o de la enfermedad, puede ser necesario utilizar tanto el nivel como la clase de respuesta de los anticuerpos.
- Los resultados negativos no descartan el diagnóstico de una enfermedad asociada al *M. pneumoniae*. Es posible que la muestra se haya extraído antes de que aparezcan anticuerpos detectables. Los resultados negativos cuando se sospecha que el paciente está en la fase temprana de la enfermedad, deberán repetirse entre 4 y 6 semanas después.

- La presencia o la ausencia continua de anticuerpos no puede utilizarse para determinar el éxito o el fracaso de la terapia.
- Las pruebas no se deben utilizar como procedimiento de selección de individuos infectados entre la población general. El valor predictivo de un resultado serológico positivo o negativo depende de la posibilidad de la presencia del *M. pneumoniae* antes de la realización de la prueba. Las pruebas solamente deberán llevarse a cabo cuando la evidencia clínica sugiera el diagnóstico de una enfermedad asociada al *M. pneumoniae*.
- El funcionamiento de este dispositivo no se ha establecido en neonatos ni en pacientes inmunocomprometidos.

#### EXPECTATIVA DE RESULTADOS

Las infecciones sintomáticas atribuibles a este microorganismo son más frecuentes en niños y adultos jóvenes (entre 2 y 19 años de edad (12)). En una publicación se demostró que el 97-98% de los sueros de una población de adultos sanos no reaccionaba con el anticuerpo contra *M. Pneumoniae* por CF e IFA (13). Cada laboratorio debe establecer sus propios valores esperados según el tipo de población que estudie habitualmente.

El estudio clínico de este producto incluyó 205 muestras aleatorias que se enviaron a un laboratorio de referencia, situado en el nordeste de Estados Unidos, para un análisis serológico rutinario de *Mycoplasma*. En lo que respecta a esta población, 92/205 (45%) fueron negativos, 21/205 (10%) fueron dudosos y 92/205 (45%) fueron reactivos.

#### CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

##### Estudio comparativo:

Se ha realizado un estudio comparativo para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas Mycoplasma IgG ELISA de Wampole Laboratories con el sistema de pruebas Crownitire® IgG IFA de Wampole Laboratories

El funcionamiento del sistema de pruebas Mycoplasma IgG ELISA de Wampole Laboratories se ha evaluado en una investigación llevada a cabo en dos laboratorios clínicos. Se sometieron a prueba un total de 194 muestras, 109 en el laboratorio 1, y 85 en el laboratorio 2. La mayoría de las muestras (192/194) provenían de un laboratorio de referencia en el noroeste de Estados Unidos. Estas muestras se enviaron al laboratorio para un análisis serológico habitual de micoplasma. Las otras dos muestras provenían de un repositorio y habían resultado positivas tras el análisis de anticuerpos de tipo IgG antimicoplasma. Todas las muestras se congelaron y se mantuvieron según las directrices especificadas en la sección RECOGIDA DE LA MUESTRA de este prospecto.

Las muestras se estudiaron con el sistema de pruebas ELISA en los laboratorios y después se estudiaron internamente por IFA. La tabla 1 muestra los resultados de este estudio comparativo. Dichos resultados corresponden a muestras de diferentes pacientes, y no a varias extracciones de un mismo paciente.

Tabla 1: Cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y concordancia				
Sistema de pruebas IFA de Wampole				
	≥1:64 Positivo	<1:32 Negativo	1:32 Dudoso	Totales
Resultados de la prueba Mycoplasma IgG ELISA de Wampole	+	69	12	98
	-	4	84	0
	±	2	6	0
	Totales	75	102	17
194				

Sensibilidad relativa = 69/73 = 94,5% (Intervalo de confianza de 95%\* = de 89,3 a 99,7%)  
Especificidad relativa = 84/96 = 87,5% (Intervalo de confianza de 95%\* = de 80,9 a 94,1%)  
Concordancia relativa = 153/169 = 90,5% (Intervalo de confianza de 95%\* = de 86,1 a 94,9%)  
\* Los intervalos de confianza del 95% se calcularon según el método exacto.

Además del estudio realizado en dos laboratorios descrito anteriormente, la prueba Mycoplasma IgG ELISA de Wampole Laboratories se utilizó para evaluar 35 pares de muestras de pacientes agudos y convalecientes que se habían caracterizado anteriormente mediante fijación del complemento (CF). De estos 35 pares, 29 habían multiplicado por cuatro (o más) su título final de fijación del complemento. De los 29 pares, 16 fueron negativos en la fase aguda mediante pruebas ELISA, y positivos en la fase convaleciente; ocho pares fueron positivos tanto en la fase aguda como en la convaleciente, y cinco pares fueron negativos tanto en la fase aguda como en la convaleciente.

**NOTA:** Tenga en cuenta que el término relativo se refiere a la comparación de los resultados de este ensayo con los de un ensayo similar. No se ha intentado correlacionar los resultados del ensayo con la ausencia o la presencia de enfermedad. No se puede juzgar la precisión del ensayo comparado para predecir la existencia de enfermedad.

##### Reproducibilidad:

La reproducibilidad se evaluó según se describe en el documento número EP5: *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices, Current Edition* (Evaluación de la precisión funcional de los dispositivos químicos clínicos – Edición actual), según ha publicado el Comité nacional para homologación de normas de laboratorio (NCCLS), Villanova, PA, EE.UU. Los estudios de reproducibilidad se llevaron a cabo en los dos laboratorios y se utilizaron las mismas muestras.

Se sometieron a prueba seis muestras: dos relativamente fuertes para positivo, dos cercanas al límite de referencia y otras dos que eran claramente negativas. Además, los controles negativo y positivo del kit se incluyeron como componentes