

NovaLisa™

Mycoplasma pneumoniae

IgA - ELISA

CE

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgA-class antibodies against Mycoplasma pneumoniae in human serum or plasma

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgA-Antikörpern gegen Mycoplasma pneumoniae in Humanserum oder Plasma

Dosage immunoenzymatique pour la détermination qualitative des anticorps IgA dirigés contre Mycoplasma pneumoniae dans le sérum humain ou plasma

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgA per Mycoplasma pneumonite nel siero o plasma umano

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de los anticuerpos IgA contra Mycoplasma pneumoniae en suero o plasma humano

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2 to 6
Deutsch:	Seite	7 bis 10
Français:	Page	11 à 14
Italiano:	da Pagina	15 a 19
Espanol:	Página	20 a 24

For further languages please contact our authorized distributors.

Bibliography / Literatur / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografia	Page / Seite / Page / Pagina / Página	26
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des symboles / Legenda / Símbolos	Page / Seite / Page / Pagina / Página	27
Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung Testdurchführung/ Résumé de la procédure de test/ Schema della procedura/ Resumen de la técnica	Page / Seite / Page/ / Pagina / Página	28

Product Number: MYCA0350 (96 Determinations)

1. INTRODUCTION

The mycoplasmas belong to the class Mollicutes comprising three distinct families and four genera, one of which is *Mycoplasma* with over 60 species. Mycoplasmas are the smallest free living organisms known (300 to 500 nm in diameter) and unlike regular bacteria they lack a cell wall. Mycoplasmas are extracellular parasites, especially on mucous membranes, which can cause infections in human, animals, plants, and cell cultures. *Mycoplasma pneumoniae* is primarily a respiratory pathogen (obligat) in human involving the nasopharynx, throat, trachea, bronchi, bronchioles, and alveoli. Other Mycoplasmas, *M. buccale*, *M. faucium*, *M. orale* and *M. salivarium* are commensals in the oral cavity. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* inhabit primarily the genital tract and may act as opportunistic invaders. *M. pneumoniae* is by far the most important pathogen of this group. Infection with *M. pneumoniae* occurs worldwide, its epidemiology has been studied primarily in the USA, Europe, and Japan. Infections are endemic in larger urban areas, and epidemic increases are observed at varying intervals. *M. pneumoniae* has been estimated to cause 15-20% of all pneumoniae; the rate is highest in children and young adults. 74% of infections with *M. pneumoniae* are asymptomatic, reinfection may occur. Naturally acquired immunity to infection with *M. pneumoniae* appears to be of limited duration (2-3 years).

Species	Disease	Mechanism of Infection
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Respiratory tract disease: From asymptomatic infection to pharyngitis, bronchitis, croup, tracheobronchitis, pneumonitis and pneumonia	It is not known whether spread is primarily by droplets, direct or indirect contact, or by all these means

Infection may be identified by:

- Microscopy
- Hemadsorption, Tetrazolium reduction (specific for *M.pneumoniae*), Complement fixation
- Detection of antibody production by ELISA Serology: complement fixation (CF), neutralization (N) and hemagglutination-inhibition (HAI); Detection of antibodies and the hexon antigen by ELISA.

2. INTENDED USE

The NovaTec *M. pneumoniae* IgA-ELISA is intended for the qualitative determination of IgA class antibodies against *M. pneumoniae* in human serum or plasma (citrate).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of IgA-class antibodies against *M. pneumoniae* is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiter strip wells are precoated with *M. pneumoniae* antigens to bind corresponding antibodies of the specimen. After washing the wells to remove all unbound sample material horseradish peroxidase (HRP) labelled anti-human IgA conjugate is added. This conjugate binds to the captured *M. pneumoniae*-specific antibodies. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of *M. pneumoniae*-specific IgA antibodies in the specimen. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- ***Mycoplasma pneumoniae* Coated Wells (IgA):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with *M. pneumoniae* antigen; in resealable aluminium foil.
- **IgA Sample Diluent ***:** 1 bottle containing 100 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.2 mol/l; ready to use; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):*** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.
- ***Mycoplasma pneumoniae* anti-IgA conjugate**:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgA; coloured violet, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- ***Mycoplasma pneumoniae* IgA Positive Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- ***Mycoplasma pneumoniae* IgA Cut-off Control***:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- ***Mycoplasma pneumoniae* IgA Negative Control***:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µl
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!

6.1. Coated snap-off Strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with *M. pneumoniae* antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Mycoplasma pneumoniae anti-IgA Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human-IgA horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert violet dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.4. IgA Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.5. Washing Solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute washing solution 1+19; e.g. 10 ml washing solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to 37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date.*

6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C, away from the light. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening until expiry date when stored at 2...8°C.*

6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. After first opening stability until expiry date.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgA Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1ml IgA Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300µl to 350µl to avoid washing effects. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank,
1 well	(e.g. B1)	for the negative control,
2 wells	(e.g. C1+D1)	for the cut-off control and
1 well	(e.g. E1)	for the positive control.

It is recommended to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300µl of Washing Solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100µl M. pneumoniae anti-IgA Conjugate into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil.
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.

Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each control and patient sample in the distribution and identification plan.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38

$$\text{Cut-off} = 0.38$$

9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative
→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

9.3.1. Results in NovaTec Units

$$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{cut-off}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$$

Example: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-off: 10 NTU
Grey zone: 9-11 NTU
Negative: <9 NTU
Positive: >11 NTU

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

10.1. Precision

Interassay	n	Mean (NTU)	Cv (%)
Negative Serum	12	2.83	8.1
Positive Serum	12	18.41	3.9

Intraassay	n	Mean (E)	Cv (%)
Negative Serum	20	0.09	6.1
Positive Serum	24	0.64	3.5

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.
It is > 90 %.

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.
It is > 90 %.

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/ml hemoglobin, 5 mg/ml triglycerides and 0.2 mg/ml bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.
--

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data.

In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING:	In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!
----------	---

WARNING:	Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!
----------	--

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

13. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: MYCA0350 Mycoplasma pneumoniae IgA-ELISA (96 Determinations)

1. EINLEITUNG

Die Mykoplasmen gehören zur Klasse der Mollicutes, welche drei unterschiedliche Familien und vier Genera einschließt. Eines davon ist Mycoplasma mit über 60 Arten. Mykoplasmen sind die kleinsten bekannten frei lebenden Organismen (300 bis 500 nm Durchmesser). Die besitzen im Gegensatz zu Bakterien keine Zellwand. Mykoplasmen sind extrazelluläre Parasiten speziell der Schleimhäute und können bei Menschen, Tieren, Pflanzen und in Zellkulturen Infektionen hervorrufen. Mycoplasma pneumoniae ist in erster Linie ein obligat pathogener Erreger respiratorischer Erkrankungen unter Einbeziehung von Nasopharynx, Rachen, Luftröhre, Bronchien, Bronchiolen und Aveolen. Andere Mykoplasmen (M. buccale, M. faucium, M. orale, M. salivarium) sind Kommensalen in der Mundhöhle. Mycoplasma hominis und Ureaplasma urealyticum besiedeln vorwiegend den Genitaltrakt und können als opportunistische Invasoren auftreten. Mycoplasma pneumoniae ist mit Abstand das wichtigste Pathogen dieser Gruppe. Infektionen mit M. pneumoniae treten weltweit auf, deren Epidemiologie ist hauptsächlich in den USA, Europa und Japan untersucht worden. In größeren urbanen Regionen sind die Infektionen endemisch und epidemieartige Zuwächse werden in unregelmäßigen Abständen beobachtet. Es wird geschätzt, dass M. pneumoniae 15 bis 20 % aller Pneumonien verursacht; die Rate ist bei Kindern und jungen Erwachsenen am größten. 74 % der Infektionen mit M. pneumoniae verlaufen symptomlos; Reinfektionen können auftreten. Eine natürlich erworbene Immunität gegen Infektionen mit M. pneumoniae hält nur für 2 bis 3 Jahre an.

Spezies	Erkrankung	Infektionsmodus
Mycoplasma pneumoniae	Atemwegserkrankung, von asymptomatischer Infektion über Erkältungskrankheit, Pharyngitis, Bronchitis bis zur (atypischen) Pneumonie	Es ist nicht bekannt, ob die Ansteckung primär durch Tröpfchen oder als Schmierinfektion oder beides erfolgt.

Infektionen können nachgewiesen werden mittels:

- Mikroskopie
- HämadSORption, Tetrazolium Reduktion (spezifisch für M. pneumoniae), Komplement Fixation
- Serologie: Nachweis spezifischer Antikörper mittels KBR, Hämagglutinationstest, Immunfluoreszenz, ELISA

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Mycoplasma pneumoniae IgA ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgA-Antikörper gegen Mycoplasma pneumoniae in humanem Serum oder Plasma (Citrat) bestimmt.

3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von spezifischen IgA-Antikörpern gegen Mycoplasma pneumoniae beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik.

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit Mycoplasma pneumoniae spezifischen Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierte anti-human-IgA Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstandenen Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) - Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mycoplasma pneumoniae beschichtete Mikrotiterstreifen (IgA):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit M. pneumoniae Antigen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgA-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Mycoplasma pneumoniae anti-IgA-Konjugat**:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgA; violett gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Mycoplasma pneumoniae IgA Positivkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Mycoplasma pneumoniae IgA Cut-off Kontrolle***:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **Mycoplasma pneumoniae IgA Negativkontrolle***:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

5. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25°C) zu bringen!

6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktiviertem *Mycoplasma pneumoniae* Antigen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

6.2. *Mycoplasma pneumoniae* anti-IgA-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgA-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten violetten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.4. IgA-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht hellblau. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8°C aufbewahrt werden, sonst tiefgefrieren (-70...-20°C). Wiederaufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. *Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!*

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgA-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgA-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Testvorbereitung

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µl auf 350 µl zu erhöhen. Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

1 Vertiefung	(z.B. A1)	für den Substratleerwert (Blank),
1 Vertiefungen	(z.B. B1)	für die Negativ Kontrolle und
2 Vertiefungen	(z.B. C1+D1)	für die Cut-off Kontrolle und
1 Vertiefung	(z.B. E1)	für die Positiv Kontrolle vorsehen

Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**

- Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschlösung waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falsch erhöhten Messergebnissen führt!

- 100µl Mycoplasma pneumoniae anti-IgA-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
- 30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
- Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
- 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
- Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
- In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.

Hinweis: Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgA-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.

- Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!

Extinktion aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1. Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion < **0,100**
- Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion < **0,200 und < cut-off**
- Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktionwerte **0,150 – 1,300**
- Positiv Kontrolle** in E1: Extinktionswerte > **Cut-off**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

Beispiel: 0.37 OD Cut-off Kontrolle + 0.39 OD Cut-off Kontrolle = 0.76 : 2 = 0.38

Cut-off = 0.38

9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**
Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off:	10	NTU
Grauzone:	9-11	NTU
Negativ:	<9	NTU
Positiv:	>11	NTU

10. TESTMERKMALE

10.1. Präzision

Interassay	n	Mittelwert (NTU)	Vk (%)
Negatives Serum	12	2.83	8.1
Positives Serum	12	18.41	3.9

Intraassay	n	Mittelwert (OD)	Vk (%)
Negatives Serum	20	0.09	6.1
Positives Serum	24	0.64	3.5

10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt >90%.

10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt >90%.

10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

Beachte: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen. Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der Novalisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG: Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.

WARNUNG: Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

13. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: MYCA0350 Mycoplasma pneumoniae IgA-ELISA (96 Bestimmungen)

1. INTRODUCTION

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des Mollicutes qui comprend trois familles distinctes et quatre genres, dont l'un est le mycoplasme avec plus de 60 espèces. Les Mycoplasmes sont les plus petits organismes libres connus (300 à 500 nm de diamètre) et contrairement aux bactéries régulières ils n'ont pas de membrane cellulaire. Les mycoplasmes sont des parasites extracellulaires, particulièrement sur les membranes muqueuses, qui peuvent causer des infections dans l'homme, les animaux, les plantes, et les cultures cellulaires. *Mycoplasma pneumoniae* est d'abord un pathogène respiratoire (obligatoire) dans l'homme qui peut atteindre le nasopharynx, la gorge, la trachée, les bronches, les bronchioles, et les alvéoles. D'autres mycoplasmes, *M. buccale*, *M. faucium*, *M. orale* et *M. salivarium* sont des commensales dans la cavité buccale. *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* habitent surtout la région génitale et peuvent agir en tant qu'envahisseurs opportunistes. *Mycoplasma pneumoniae* est de loin le microbe pathogène le plus important de ce groupe. L'infection avec *Mycoplasma pneumoniae* se produit dans le monde entier, son épidémiologie a surtout été étudiée aux Etats-Unis, en Europe, et au Japon. Les infections sont endémiques dans les grands secteurs urbains, et des augmentations épidémiques sont observées à intervalles variables. On a estimé que *Mycoplasma pneumoniae* cause 15-20% de toutes les pneumonies ; le taux est le plus élevé chez les enfants et de jeunes adultes. 74% des infections avec *Mycoplasma pneumoniae* sont asymptomatiques, et des réinfections peuvent se produire. L'immunité naturellement acquise contre l'infection avec *Mycoplasma pneumoniae* semble être de durée limitée (2 ou 3 ans).

Espèce	La maladie	Mécanisme de l'infection
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Maladie de région respiratoire : de l'infection asymptomatique à la pharyngite, la bronchite, le croup, la trachéo-bronchite, et à la pneumonie	On ne sait pas si la diffusion se produit principalement par le contact de gouttelettes, par le contact direct ou indirect, ou par tous ces moyens

L'infection peut être identifiée par :

- Microscopie
 - Hémasorption, réduction de Tetrazolium (spécifique pour *Mycoplasma pneumoniae*), fixation de complément
 - Détection de la production d'anticorps par ELISA
- Sérologie : fixation de complément, neutralisation (N) et inhibition d'hémagglutination ; détection des anticorps et de l'antigène d'hexon (« hexon antigen ») par ELISA.

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse *Mycoplasma pneumoniae* IgA ELISA de NovaTec est prévue pour la détermination qualitative des anticorps IgA anti-*Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain ou plasma (citrate).

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La détermination immunoenzymatique qualitative des anticorps IgA anti-*Mycoplasma pneumoniae* est basée sur la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les puits des barrettes de microtitration sont revêtus d'antigènes d'*Mycoplasma pneumoniae* pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après le lavage des puits pour éliminer l'échantillon non lié, le conjugué anti-IgA humaines marquées à la peroxydase du raifort (HRP) est ajouté. Ce conjugué se lie aux anticorps capturés spécifiques de l'*Mycoplasma pneumoniae*. Le complexe immun constitué par le conjugué lié est visualisé en ajoutant le substrat de Tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgA spécifiques de *Mycoplasma pneumoniae* dans l'échantillon de patient. De l'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Ceci produit une couleur jaune. L'absorbance à 450 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Puits revêtus d'*Mycoplasma pneumoniae* (IgA) :** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'antigène d'*Mycoplasma pneumoniae*; en sachets d'aluminium refermables.
- **Diluant pour échantillon IgA *** :** 1 flacon contenant 100 ml de tampon pour la dilution de l'échantillon ; pH 7.2 ± 0.2 ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon blanc.
- **Solution d'arrêt :** 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.2 mol/l ; prêt à l'emploi ; couvercle rouge.
- **Solution de lavage (concentrée x 20.) * :** 1 flacon contenant 50 ml d'un tampon concentré 20 fois (pH 7.2 ± 0.2) pour laver les puits ; bouchon blanc.
- **Conjugué IgA anti-*Mycoplasma pneumoniae* ** :** 1 flacon contenant 20 ml d'anticorps de lapin anti-IgA humaines conjuguées à de la peroxydase du raifort ; prêt à l'emploi ; couleur violette, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB :** 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) ; prêt à l'emploi ; bouchon jaune.
- **Contrôle positif IgA *Mycoplasma pneumoniae* *** :** 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon rouge.
- **Contrôle seuil (cut-off) IgA *Mycoplasma pneumoniae* *** :** 1 flacon contenant 3 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon vert.
- **Contrôle négatif IgA *Mycoplasma pneumoniae* *** :** 1 flacon contenant 2 ml ; prêt à l'emploi ; couleur jaune ; bouchon bleu.

* contient 0,1 % de Bronidox L après dilution

** contient 0,2 % de Bronidox L

*** contient 0,1 % de Kathon

4.2. Matériel fourni

- 1 support de plaque
- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériel et équipement requis

- lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620nm
- Incubateur à 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 10 et 1000 µl
- Mélangeur Vortex
- Eau désionisée ou (récemment) distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette, s'ils sont conservés entre 2 et 8°C.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (20 - 25°C) avant de commencer le dosage !

6.1. Barrettes revêtues sécables

Les barrettes sécables sont revêtues d'antigène de *Mycoplasma pneumoniae* et sont prêtes à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après avoir prélevé les barrettes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver à +2...+8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué IgA anti-*Mycoplasma pneumoniae*

Le flacon contient 20 ml d'une solution d'anti-IgA humaines avec de la peroxydase du raifort, un tampon, des stabilisants, des conservateurs et un colorant violette inerte. La solution est prête à l'emploi. Conserver à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.3. Contrôles

Les flacons de contrôle positif, contrôle seuil (cut-off) et de contrôle négatif contiennent une solution de contrôle prête à l'emploi. Elle contient 0,1% de Kathon et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.4. Diluant pour échantillon IgA

Le flacon contient 100 ml d'un tampon phosphaté, des stabilisants, des conservateurs et un colorant jaune inerte. Il est utilisé pour la dilution de l'échantillon du patient. Cette solution prête à l'emploi doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.5. Solution de lavage (conc. x 20)

Le flacon contient 50 ml d'un tampon concentré, des détergents, des stabilisants et des conservateurs. Diluer la solution de lavage au 1/20^{ème} ; par exemple 10 ml de la solution de lavage + 190 ml d'eau bidistillée récente et non contaminée. Le tampon dilué est stable 5 jours si conservé à température ambiante. Le tampon concentrée est stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C. *Les cristaux dans la solution disparaissent en chauffant à 37°C dans un bain marie.*

6.6. Solution de substrat TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé à +2...+8°C, à l'abri de la lumière. *La solution devrait être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et devrait être remplacé. Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à +2...+8°C.*

6.7. Solution d'arrêt

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0,2 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée à +2...+8°C. *Après la première utilisation, la solution reste stable jusqu'à la date de péremption, si elle est conservée à 2-8°C.*

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum humain ou plasma (citrate) pour cette analyse. Si le dosage est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à +2...+8°C ; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-20 à -70°C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation.*

L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7.1. Dilution de l'échantillon

Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués au 1/101^{ème} avec le diluant pour échantillon IgA.

Diluer 10 µl d'échantillon avec 1 ml du diluant pour échantillon IgA dans des tubes pour obtenir une dilution au 1/101^{ème} et mélanger soigneusement sur un Vortex.

8. PROCEDE DE DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. La technique de dosage suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le dosage doit être effectué sur un automate, nous conseillons d'augmenter le nombre d'étapes de lavage de trois à cinq et le volume de la solution de lavage de 300 à 350 µl. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans la trousse, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins :

- | | | |
|---------|------------------|--------------------------|
| 1 puits | (par exemple A1) | pour le blanc substrat, |
| 1 puits | (par exemple B1) | pour le contrôle négatif |

2 puits (par exemple C1+D1) pour le contrôle cut-off et
1 puits (par exemple E1) pour le contrôle positif.

Il est conseillé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets si nécessaire.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans délai entre les étapes.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1. Pipeter 100 µl de contrôles et d'échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Garder le puits A1 pour le blanc substrat.
2. Couvrir les puits avec le couvercle.
3. **Incuber pendant 1 heure \pm 5 minutes à $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. Le temps de trempage entre chaque cycle de lavage devrait être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape !
Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et à des valeurs d'absorbance faussement élevées.
5. Pipeter 100µl du conjugué IgA anti-Mycoplasma pneumoniae dans tous les puits sauf le puits blanc (par exemple A1). Fermer avec le couvercle.
6. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.** Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape numéro 4.
8. Pipeter 100 µl de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité.**
10. Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB.
La couleur bleue développée pendant l'incubation tourne au jaune.
Note : Des échantillons de patients fortement positifs peuvent causer des précipités foncés du chromogène ! Ces précipités peuvent influencer les valeurs mesurées de densité optique. Il est recommandé de diluer l'échantillon avec du sérum physiologique, par exemple au 1/2. Ensuite diluer l'échantillon au 1/101^{ème} avec le tampon et multiplier les résultats en NTU (NovaTec units) par 2.
11. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 450/620nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc substrat dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc substrat dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Une lecture en double longueur d'onde employant 620 nm comme longueur d'onde de référence est conseillée.

Calculer les **valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaire.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être respectés :

- **Blanc Substrat** dans A1 : Valeur d'absorbance **< 0,100**.
- **Contrôle négatif** dans B1 : Valeur d'absorbance **< 0,200 et < cut-off**
- **Contrôle seuil (cut-off)** dans C1 et D1: Valeur d'absorbance **0,150 – 1,30**
- **Contrôle positif** dans E1 : Valeur d'absorbance **>contrôle seuil (cut-off)**.

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

La valeur seuil correspond à la moyenne des valeurs d'absorbance du contrôle seuil (cut-off).

Exemple : 0,37 DO cont. seuil + 0,39 DO cont. seuil = $0,76 \div 2 = 0,38$

« Cut-off » = 0,38

9.3. Interprétation des résultats

Des échantillons sont considérés **POSITIFS** si la valeur d'absorbance est supérieure de 10% à la valeur seuil.

Des échantillons avec une valeur d'absorbance comprise entre +10% et -10% autour de la valeur « seuil » ne peuvent pas être considérés comme clairement positifs ou négatifs

→ **zone grise**

Il est conseillé de refaire le dosage 2 à 4 semaines après, avec un échantillon frais. Si les résultats du deuxième dosage sont encore dans la zone grise, l'échantillon doit être considéré **NÉGATIF**.

Des échantillons sont considérés **NÉGATIFS** si la valeur d'absorbance est inférieure de 10% à la valeur « seuil ».

9.3.1. Résultats en unités NovaTec

Valeur (moyenne) d'absorbance du patient x 10 = [unités NovaTec = NovaTec units= NTU]
« seuil »

Exemple : $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32$ NTU

« Seuil » :	10	NTU
Zone grise :	9-11	NTU
Négatif :	< 9	NTU
Positif :	> 11	NTU

10. PERFORMANCES DU DOSAGE

10.1. Précision

Inter-essais	n	moyenne (NTU)	CV (%)
Sérum pos.	12	2.83	8.1
Sérum pos.	12	18.41	3.9
Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
Sérum pos.	20	0.09	6.1
Sérum pos.	24	0.64	3.5

10.2. Spécificité diagnostique

La spécificité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >90 %.

10.3. Sensibilité diagnostique

La sensibilité diagnostique est définie comme la probabilité d'obtenir un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. Elle est supérieure à >90 %.

10.4. Interférences

Des sérums hémolytiques ou lipémiques ou icteriques n'ont pas montré d'interférences, avec des concentrations jusqu'à 10 mg/ml de hémoglobine, 5 mg/ml de triglycérides et 0,2 mg/ml de bilirubine.

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés ; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation-décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorbance. Le diagnostic d'une maladie infectieuse ne devrait pas être établi sur la base du résultat d'une seule analyse. Un diagnostic précis devrait tenir compte de l'historique clinique, de la symptomatologie ainsi que des données sérologiques. Les données sérologiques sont de valeur limitée dans le cas des patients immunocompromis et des nouveaux-nés.

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousses avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le NovaLisa™ ELISA est uniquement destiné à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

AVERTISSEMENT : A la concentration utilisée, Bronidox L ne pose pratiquement aucun risque toxicologique en cas de contact avec la peau et les membranes muqueuses !

AVERTISSEMENT : L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Référence : MYCA0350 Mycoplasma pneumoniae IgA-ELISA (96 déterminations)

1. INTRODUZIONE

Il *Mycoplasma pneumoniae* è un membro della classe dei Mollicuti, in quanto privo di parete cellulare e rivestito soltanto da membrana plasmatica. Pertanto rappresenta la più piccola cellula vivente al momento conosciuta. La famiglia dei Mycoplasmataceae si divide nei generi *Mycoplasma* ed *Ureaplasma*. Al momento sono conosciute più di 80 specie. Le specie più importanti e patogene per l'uomo sono: *M. pneumoniae*, *M. hominis* e *M. genitalis*. Oltre a questi esistono altre specie eventualmente patogene: *M. orale*, *M. salivarum*, *M. faucium* e *M. buccale*. *M. hominis* e *M. genitalis* sono gli agenti eziologici di infezioni non specifiche del tratto urogenitale. Il *Mycoplasma pneumoniae* è l'agente eziologico della polmonite atipica primaria e può anche essere causa di bronchite, laringite e tracheite. Colpisce soprattutto i bambini sopra i 5-6 anni di vita e predilige, in particolare, gli adolescenti e gli adulti. Dopo un periodo di incubazione di 2-3 settimane esordisce con febbre, cefalea, scarso appetito e malessere generale. Il quadro clinico della polmonite atipica si manifesta nel 5-25% delle persone infette. L'agente è ubiquitario, molto contagioso e viene trasmesso per via aerea.

Specie	Malattia	Sintomi	Modo d'infezione
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Infezioni del tratto respiratorio, Polmonite	Faringite, tosse secca, febbre	Trasmissione: aerea; contatto diretto con una persona infetta

Diagnosi

- Microscopia
- PCR
- Sierologia: agglutinazione, ELISA, immunofluorescenza indiretta IFA

2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Mycoplasma pneumoniae* IgA ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgA per *Mycoplasma pneumoniae* nel siero o plasma (citrato) umano.

3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgA per *Mycoplasma pneumoniae* si basa sul principio ELISA. I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici del *Mycoplasma pneumoniae*. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgA umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per il *Mycoplasma pneumoniae* di classe IgA presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

4. MATERIALI

4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni del *Mycoplasma pneumoniae* (IgA):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni del *Mycoplasma pneumoniae*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgA***:** 1 flacone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color giallo; pronto all'uso; tappo bianco.
- **Soluzione stop:** 1 flacone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):** 1 flacone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *Mycoplasma pneumoniae* anti IgA**:** 1 flacone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgA umani, coniugati a perossidasi; color violetto; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 flacone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- ***Mycoplasma pneumoniae* IgA Controllo positivo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- ***Mycoplasma pneumoniae* IgA Controllo Cut-off***:** 1 flacone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- ***Mycoplasma pneumoniae* IgA Controllo negativo***:** 1 flacone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

** contiene 0.2 % Bronidox L

*** contiene 0.1 % Kathon

4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!

6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili. Contengono adesivi antigeni inattivati del *Mycoplasma pneumoniae*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.2. Coniugato *Mycoplasma pneumoniae* IgA

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgA umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte violetto. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.4. Tampone diluente IgA

Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante giallo inerte. La soluzione viene usata per diluire i campioni. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino a 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Usare campioni di siero o plasma (cittrato) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.*

L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgA. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

8. PROCEDIMENTO

8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre.

Utilizzare almeno:

1 pozzetto	(es. A1)	per il bianco-substrato (blank)
1 pozzetti	(es. B1)	per il controllo negativo
2 pozzetti	(es. C1+D1)	per il controllo Cut-off
1 pozzetto	(es. E1)	per il controllo positivo.

È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora \pm 5 min a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Mycoplasma pneumoniae anti-IgA in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (20° ... 25°C).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20° ... 25°C) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgA. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) a zero usando il substrato-bianco (blank) in A1. Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450 nm e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare la media delle assorbanze.

9. RISULTATI

9.1. Validazione del test

Il test é valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e< cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza >**Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off e' la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38
Cut-Off = 0.38

9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso é raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato é ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

Assorbanza media del campione x 10 = [unità NovaTec = NTU]
Cut-Off

Esempio: $\frac{1.786 \times 10}{0.38} = 47 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off :	10	NTU
Dubbio:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARATTERISTICHE DEL TEST

10.1. Precisione

Interdosaggio	n	Media (NTU)	Cv (%)
Siero neg.	12	2.83	8.1
Siero pos.	12	18.41	3.9

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
Siero neg.	20	0.09	6.1
Siero pos.	24	0.64	3.5

10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica é pari a >90%.

10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica é la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica é pari a >90%.

10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.
--

11. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

ATTENZIONE: Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

ATTENZIONE: L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Numero del prodotto: MYCA0350 Mycoplasma pneumoniae IgA-ELISA (96 determinazioni)

1. INTRODUCCIÓN

Las Mycoplasma son procariotas con la característica principal de no tener pared celular. Por esta facultad se forma la nueva clase de los "Mollicutes" (mollis: suave, cutis: piel). La familia de los Mycoplasmataceae se divide en los géneros Mycoplasma y Ureaplasma. En los Mycoplasma se conocen más de 80 especies dentro de las más importantes como patógenos para el hombre son *M. pneumoniae*, *M. hominis* y *M. genitalis*. Aparte de estos patógenos obligatorios existen varias especies que son facultativo patógeno (*M. orale*, *M. salivarium*, *M. faucium*, *M. buccale*).

M. pneumoniae produce infecciones del tracto respiratorio (neumonías atípicas), *M. hominis* y *M. genitalis* infectan al tracto urogenital. *M. pneumoniae* coloniza la traquea y los bronquios destruyendo el epitelio sin entrar en el tejido peribronquial. Las infiltraciones en el tejido peribronquial son probablemente reacciones fuertes del sistema inmunitario con presencia de linfocitos, células plasma y macrófagos. Muchas veces se muestran fenómenos autoinmunitarios en forma de la formación de anticuerpos con reacciones cruzadas con tejidos corporales. Después de un período de incubación medio de 3 semanas se producen en el 75% de los casos infecciones gripales fuertes con faringitis o traqueobronquitis. Del 5 al 25 % de los casos solamente de desarrolla una neumonía atípica que comienza con cansancio, dolores de cabeza, fiebre y tos pertinente.

El *M. pneumoniae* no pertenece a la flora normal del hombre. Las Mycoplasma son de manifestación mundial y se transmiten con alta contagiosidad por el aire y por gotats de fluido contaminado. El grupo más afectado son los jóvenes de 5 a 20 años. Las infecciones dentro de una familia o en comunidades se explican por la alta contagiosidad y el modo de infección. Son comunes las reinfecciones.

Especies	Enfermedad	Síntomas	Vía de transmisión
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Infecciones respiratorias, de infecciones asintomáticas hasta neumonías atípicas	faringitis, tos seca, fiebre, neumonía	aerógena, por gotas de fluido contaminado

La bacteria puede ser detectada por:

- Microscopia
- PCR
- Serología: Detección de anticuerpos específicos a través de KBR, prueba de hemaglutinación, Inmunofluorescencia, ELISA

2. USO PREVISTO

El enzimoimmunoensayo de Nova Tec es para la determinación cualitativa de anticuerpos IgA específicos contra *Mycoplasma pneumoniae* en suero o plasma (citrat) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra *Mycoplasma pneumoniae* se basa en la técnica del ELISA (Enzym linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de *Mycoplasma pneumoniae*. Los anticuerpos existentes en la muestra unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microfítulación. El conjugado de anticuerpos IgA anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgA) recubiertas de antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de *Mycoplasma pneumoniae*, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgA de la muestra*****: 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; pH 7.2 ± 0.2; color amarillo; listo para ser utilizado; tapa blanca.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.)*:** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgA anti-humano (*Mycoplasma pneumoniae*)**:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgA anti-humano con peroxidasa; color violeta; tapa negra.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgA (*Mycoplasma pneumoniae*)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para el uso.
- **Control cut-off de IgA (*Mycoplasma pneumoniae*)***:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para el uso.
- **Control negativo de IgA (*Mycoplasma pneumoniae*)***:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para el uso.

* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

** contiene 0.2% Bronidox L

*** contiene 0.1% Catón

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

4.3. Materiales y instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!

6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de *Mycoplasma pneumoniae* están selladas. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

6.2. Conjugado de IgA anti-humano (*Mycoplasma pneumoniae*)

La botella contiene 20ml de una solución de IgA anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante violeta inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.3. Controles

Las botellas contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.4. Tampón de dilución de IgA para la muestra

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante amarillo inerte. La solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgA, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA eleva el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

1 pocillo	(z.B. A1)	para el blanco,
1 pocillo	(z.B. B1)	para el control negativo,
2 pocillos	(z.B. C1+D1)	para el control cut-off y
1 pocillo	(z.B. D1)	para el control positivo

Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C**.
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evita el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!

5. Pipetear 100µl de conjugado anti-IgA (Mycoplasma pneumoniae) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C)**. Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso número 4.
8. Pipetear 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C)**.
10. Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*

Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgA 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.

11. Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

Es aconsejable la medición bicromática a una longitud de onda de referencia de 620nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- **Blanco** en A1 extinción < **0.100**
- **Control negativo** en B1 extinción < **0.200 y < cut-off**
- **Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- **Control positivo** en E1 extinción > **cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los volores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

$$\text{Cut-off} = 0,43$$

9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción $\pm 10\%$ del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas → **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

Promedio de la extinción de la muestra x 10 = [NovaTec-unidades = NTU]

Cut-Off

Ejemplo: $\frac{1.536 \times 10}{0.48} = 32 \text{ NTU (NovaTec unidades)}$

Cut-Off:	10	NTU
Zona intermedia:	9-11	NTU
Negativo:	<9	NTU
Positivo:	>11	NTU

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1. Precisión

Intraensayo	n	Media (E)	CV (%)
Suero negativo	20	0.09	6.1
Suero positivo	24	0.64	3.5

Interensayo	n	Media (NTU)	CV (%)
Suero negativo	12	2.83	8.1
Suero positivo	12	18.41	3.9

10.2. Especificidad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente. Es de >90 %.

10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es de > 90 %.

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en personas inmunodeprimidas o en neonatos.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

ADVERTENCIA: Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

ADVERTENCIA: El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos






Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

Nº del producto: MYCA0350 Mycoplasma pneumoniae IgA-ELISA (96 determinaciones)

BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

- Clyde WA Jr: Clinical overview of typical *M. pneumoniae* infections. *Clin. Infect. Dis* 1993 Aug; 17 Suppl 1: S32-6 Medline
- E. Jacobs. 1993. Serologicals Diagnosis of *M. pneumoniae* Infections: Current Procedures. *Clinical Infectious Diseases*. 17 (suppl 1) 79-82
- Foy, H.M. 1993. Infections caused by *M. pneumoniae* and possible populations of patients. *Clinical Infectious Diseases*. 17 (suppl 1) 37-46
- Handley J.G., and L.D. Gray. 1997. The incidence of *M. pneumoniae* Board Family Practice 11(6): 425-429
- Vikerfors, T., Brodin, G., Grandien, M., Hirshberg, L., Krook, A., and C.A. Pettersson. Specific IgM antibodies for the diagnosis of *M. pneumoniae* infections. *Scand. J. Infect. Dis.* 20(6): 601-610
- Wiegand, R.: *M. pneumoniae*. In: Brandis, H., W. Köhler, H.J. Eggers, G. Pulverer (ed.): *Med. Mikrobiologie* 1994. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York (1994) 767-769

Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Explication des symboles / Legenda / Símbolos	
	Manufactured by / Hergestellt von/ Fabriqué par/ Prodotto da/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Numéro de lot/ Lotto/ Número de lote
	Expiration Date/ Verfallsdatum/ Date de péremption/ Scadenza/ Fecha de caducidad
	Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Température de conservation/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento
CE	CE Mark/ CE-Zeichen/ Marquage CE / Marchio CE/ Marca CE
[REF]	Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Référence du catalogue/ Numero di codice/ Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consulter la notice d'utilisation/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate/ Mikrotiterplatte/ Microplaque/ Micropiastra/ Microplaca
CONJ	Conjugate/ Konjugat/ Conjugué/ Coniugato/ Conjugado
CONTROL -	Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ Sérum de contrôle négatif/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo
CONTROL +	Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ Sérum de contrôle positif/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo
CUT OFF	Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ Sérum de contrôle du cut-off/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off
DIL A	Sample diluent buffer IgA/ IgA-Probenverdünnungspuffer/ Tampon diluant pour échantillon IgA/ soluzione tampone per i campioni IgA/ solución tampón para muestras IgA
SOLN STOP	Stop solution/ Stopplösung/ Solution d'arrêt/Soluzione bloccante
SUB TMB	TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ Substrat TMB/ soluzione substrato TMB/ solción substrato TMB
WASHBUF 20x	Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ Solution de lavage concentré 20 x/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20
	Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenu suffisant pour "n" tests/ Contenido suficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

M. pneumoniae IgA-ELISA

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank (e.g. A1)	Negative control	Positive control	Cut-off control	Sample (diluted 1+100)
Negative control	-	100µl	-	-	-
Positive control	-	-	100µl	-	-
Cut-off control	-	-	-	100µl	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37°C Wash each well three times with 300µl of washing solution					
Conjugate	-	100µl	100µl	100µl	100µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 30 min at room temperature Wash each well three times with 300µl of washing solution					
TMB Substrate	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark					
Stop Solution	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

MYCA0350engl,dt,fr,it,es10082009-JH