

CHORUS

MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

REF 81033



DIESSE
DIESSE

	Capitolo Section Kapitola Kapitel Κεφάλαιο Capítulo Chapitre Capitulo Capitol Peatükk Rozdział Глава Poglavlje
Modifiche introdotte nella revisione corrente Changes introduced in the current revision Změny zavedené v aktuální revizi In der aktuellen Revision eingeführte Änderungen Αλλαγές που εισάγονται στην τρέχουσα αναθεώρηση Cambios introducidos en la revisión actual Changements introduits dans la révision actuelle Alterações introduzidas na revisão atual Modificări introduse în actuala revizuire Praegused versioonis tehtud muudatused Zmiany wprowadzone w aktualnej wersji Промени, въведени в текущата версия Promjene uvedene u trenutnoj reviziji	5 – 12

DIESSE Diagnostica Senese
 S.p.A.
 Strada dei Laghi, 39
 53035 Monteriggioni (Siena)
 Italy



ISTRUZIONI PER L'USO

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. UTILIZZAZIONE

Metodo immunoenzimatico per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgA anti Mycoplasma pneumoniae nel siero umano con dispositivo monouso applicato agli strumenti Chorus e Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi IgA anti Mycoplasma pneumoniae

Solo per uso diagnostico *in vitro*

2. INTRODUZIONE

Mycoplasma pneumoniae è il più comune agente eziologico di polmonite acquisita in comunità specialmente in età compresa dai 5 ai 30 anni; può essere responsabile di epidemie che si sviluppano lentamente poiché il periodo di incubazione varia da 10 a 14 giorni e il contagio coinvolge contatti ravvicinati o gruppi segregati (scuole, caserme, nuclei familiari). La polmonite da *Mycoplasma* è anche detta polmonite atipica primaria o polmonite dell'agente di Eaton.

M. pneumoniae attacca e distrugge le cellule epiteliali ciliate della mucosa del tratto respiratorio. Microscopicamente causa polmoniti interstiziali, bronchiti e bronchioliti.

Nei casi di polmonite, data la ricorrenza dei sintomi per vari agenti eziologici, mezzi diagnostici aggiuntivi come i test serologici si rendono necessari per la diagnosi di infezione acuta.

La risposta immunitaria, a seguito di infezione da *Mycoplasma pneumoniae*, risulta essere legata al tipo stesso di infezione: gli anticorpi di classe IgM sono presenti più frequentemente nei casi di infezione primaria come dimostra la loro riscontrabilità nei pazienti più giovani. Nei pazienti più adulti e con maggiore probabilità di reinfezione, le IgM sono basse o non riscontrabili; per contro le IgA risultano il marker di maggiore sensibilità nelle infezioni in atto, nelle reinfezioni, o infezioni recenti.

Gli anticorpi specifici di classe A compaiono in maniera precoce, a inizio della malattia e raggiungono titoli elevati nelle prime 4 settimane, per poi decadere in modo repentino prima delle IgG, permettendo la diagnosi di infezione acuta anche con un singolo prelievo. Le IgG compaiono dopo le IgM ed IgA, mediamente raggiungono il picco massimo nella 5^a settimana. Un titolo alto, accompagnato da un aumento significativo tra due prelievi a distanza di circa 2 settimane permette di confermare la presenza di un'infezione in corso.

L'antigene utilizzato nel test per la determinazione sierologica delle IgA specifiche, deriva da un estratto di membrana di *M. pneumoniae* contenente quantità significative di citoadesina P1 che rappresenta l'antigene immunodominante e corrispondente ad una proteina transmembrana, principale responsabile della citoadesione del *M. pneumoniae* all'epitelio respiratorio dell'ospite.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul metodo ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indiretta.

L'antigene, costituito da un estratto di *Mycoplasma pneumoniae* inattivato, viene legato alla fase solida. Per incubazione del siero umano in esame le IgA specifiche si legano all'antigene.

Dopo lavaggi per eliminare le proteine che non hanno reagito, si effettua l'incubazione con il coniugato costituito da anticorpi monoclonali anti IgA umane coniugate con perossidasi di rafano.

Si elimina il coniugato che non si è legato e si aggiunge il substrato per la perossidasi.

Il colore blu che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione degli anticorpi specifici presenti nel siero in esame.

I dispositivi monouso contengono tutti i reagenti per eseguire il test quando applicati agli strumenti Chorus.

4. PRECAUZIONI

SOLO PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Questo kit contiene materiali di origine umana che sono stati testati e trovati negativi con test approvati dall'FDA sia per la ricerca di HBsAg che per quella degli anticorpi anti-HIV-1, anti-HIV-2 ed anti-HCV. Poiché nessun test diagnostico può offrire una completa garanzia sull'assenza di agenti infettivi, qualunque materiale di origine umana deve essere considerato potenzialmente infetto. Tutti i reagenti e i campioni devono essere maneggiati secondo le norme di sicurezza normalmente adottate in laboratorio.

Smaltimento dei residui: i campioni di siero, i calibratori e le strip usate devono essere trattati come residui infetti, quindi smaltiti in accordo alle disposizioni di leggi vigenti.

Avvertenze per la sicurezza personale

1. Non pipettare con la bocca. Usare guanti monouso e protezione per gli occhi nel maneggiare i campioni e durante la prova. Lavare accuratamente le mani una volta terminato il test.
2. I seguenti reagenti contengono concentrazioni basse di sostanze dannose o irritanti:
 - a) Il coniugato ed i controlli contengono fenolo
 - b) Il substrato è acido
 Se un reagente viene a contatto con la pelle o con gli occhi, lavare abbondantemente con acqua.
3. Acidi neutralizzati ed altri rifiuti liquidi devono essere disinfettati aggiungendo sodio ipoclorito in un volume sufficiente da ottenere una concentrazione finale almeno

dell'1%. Un'esposizione al sodio ipoclorito all'1% per 30 minuti dovrebbe essere sufficiente per garantire una disinfezione efficace.

- Eventuali versamenti di materiali potenzialmente infetti devono essere rimossi immediatamente con carta assorbente e la zona inquinata dovrà essere decontaminata, per esempio con sodio ipoclorito all'1%, prima di proseguire il lavoro. Se è presente un acido, il sodio ipoclorito non deve essere usato prima che la zona sia stata asciugata. Tutti i materiali utilizzati per decontaminare eventuali versamenti accidentali, compresi guanti, devono essere scartati come rifiuti potenzialmente infetti. Non mettere in autoclave materiali contenenti sodio ipoclorito.

Avvertenze analitiche

Prima dell'uso, portare i dispositivi da utilizzare a temperatura ambiente (18-30°C) ed impiegare entro 60 minuti.

- Scartare i device con substrato (pozzetto 4) colorato di blu.**
- Nell'aggiungere il campione al pozzetto verificare che sia perfettamente distribuito sul fondo.
- Controllare l'effettiva presenza dei reagenti nel dispositivo e la integrità del dispositivo stesso, non utilizzare dispositivi che al controllo visivo presentano mancanza di qualche reagente.
- I dispositivi devono essere utilizzati insieme allo strumento Chorus, seguendo rigorosamente le Istruzioni per l'Uso e il Manuale dello strumento.
- Controllare che lo strumento Chorus sia impostato correttamente (vedi Manuale d'uso Chorus).
- Non alterare il codice a barre posto sulla impugnatura del device al fine di permetterne la corretta lettura da parte dello strumento.
- Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni.
- Codici a barre difettosi possono essere inseriti manualmente nello strumento.
- Non esporre i dispositivi a forte illuminazione né a vapori di ipoclorito durante la conservazione e l'uso.
- Può essere fonte di errori l'uso di campioni fortemente emolizzati, o campioni che presentano inquinamento microbico.
- Prima di inserire il dispositivo sullo strumento Chorus accertarsi che il pozzetto di reazione non contenga corpi estranei.
- Pipettare il siero in esame (50 µl) nel pozzetto 1 del dispositivo (vedi figura).
- Non utilizzare il dispositivo dopo la data di scadenza
- Controllare che lo strumento abbia la connessione con la Washing Buffer (Ref. 83606)**

5. COMPOSIZIONE DEL KIT E PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il kit è sufficiente per 36 determinazioni

DD DISPOSITIVI 6 confezioni da 6 dispositivi ciascuna

Descrizione:



Posizione 8: Spazio disponibile per etichetta con codice a barre

Posizione 7: Vuota

Posizione 6: POZZETTO DI MICROPIASTRA

Sensibilizzato con antigene di *Mycoplasma pneumoniae*

Posizione 5: POZZETTO

Non sensibilizzato.

Posizione 4: SUBSTRATO TMB

Contenuto: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H₂O₂ 0.01% stabilizzati in tampone citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posizione 3: DILUENTE PER I CAMPIONI

Contenuto: Soluzione proteica, contenente fenolo 0.05%, Bronidox 0.02% ed un indicatore per rivelare la presenza di siero.

Posizione 2: CONIUGATO

Contenuto: anticorpi monoclonali anti IgA umane marcati con perossidasi, in soluzione tampone fosfato contenente fenolo 0.05% e Bronidox 0.02%.

Posizione 1: POZZETTO VUOTO

Dove l'utilizzatore deve dispensare il siero non diluito.

Uso: equilibrare una busta a temperatura ambiente, aprire la busta, prelevare i dispositivi occorrenti; riporre gli altri nella busta contenente il gel di silice, far uscire l'aria e **sigillare** premendo sulla chiusura. Conservare a 2/8°C.

CALIBRATOR CALIBRATORE 1 x 0.175 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi con Proclin e Gentamicina. Liquido, pronto all'uso.

CONTROL + CONTROLLO POSITIVO 1 x 0.425 mL

Contenuto: Siero umano diluito, a concentrazione nota di anticorpi con Proclin e Gentamicina. Liquido, pronto all'uso.

ALTRO MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Acqua distillata o deionizzata
- Normale vetreria di laboratorio: cilindri, provette, ecc.
- Micropipette capaci di prelevare accuratamente volumi di 50-200 µl.
- Guanti mono-uso
- Soluzione al 5% di sodio ipoclorito
- Contenitori per la raccolta di materiali potenzialmente infetti

6. MODALITA' DI CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

I reagenti devono essere conservati a 2/8°C. Nel caso di una errata temperatura di conservazione deve essere ripetuta la calibrazione e controllata la correttezza del risultato tramite il siero di controllo (vedi capitolo 9: Validazione del test).

La data di scadenza è stampata su ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

I reagenti hanno una stabilità limitata dopo apertura e/o preparazione:

DISPOSITIVI	8 settimane a 2/8°C
CALIBRATORE	8 settimane a 2/8°C
CONTROLLO POSITIVO	8 settimane a 2/8°C

7. TIPO DI CAMPIONI E CONSERVAZIONE

Il campione è rappresentato da siero ottenuto da sangue prelevato per normale venipuntura e maneggiato come richiesto nelle procedure standard di laboratorio. Il siero fresco può essere mantenuto per 4 giorni a 2/8°C; per periodi di conservazione maggiori, congelare a -20°C. Il campione può subire fino ad un massimo di 3 scongelamenti. Evitare l'uso di congelatori auto sbrinanti per la conservazione dei campioni. Dopo scongelamento agitare con cura prima del dosaggio. La qualità del campione può essere seriamente influenzata dalla contaminazione microbica che può portare a risultati errati. Campioni fortemente lipemici, itterici o inquinati non possono essere utilizzati.

8. PROCEDIMENTO

1. Aprire la busta (lato contenente la chiusura a pressione), prelevare il numero di dispositivi necessario per eseguire gli esami e conservare gli altri richiudendo la busta dopo aver fatto uscire l'aria.
2. Controllare visivamente lo stato del dispositivo secondo le indicazioni riportate nel capitolo 4 "Avvertenze Analitiche".
3. Dispensare nel pozzetto n°1 di ciascun dispositivo 50 µl di siero non diluito da analizzare; ad ogni cambio di lotto utilizzare un dispositivo per il calibratore.
4. Introdurre i dispositivi sullo strumento Chorus. Eseguire la calibrazione (se richiesto) ed il test come riportato nel Manuale di Istruzione dello strumento.

9. VALIDAZIONE DEL TEST

Utilizzare il siero di controllo per verificare la correttezza del risultato ottenuto, processandolo come indicato nel manuale d'uso dello strumento. Se lo strumento segnala che il siero di controllo ha un valore fuori dal limite di accettabilità occorre effettuare nuovamente la calibrazione. I risultati precedenti verranno corretti automaticamente.

Se il risultato del siero di controllo continua ad essere fuori dall'intervallo di accettabilità, contattare il Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAZIONE DEL TEST

Lo strumento Chorus fornisce un risultato semiquantitativo in Unità Arbitrarie (AU/ml).

Il test sul siero in esame può essere interpretato come segue:

POSITIVO quando il risultato è > 18 AU/ml

NEGATIVO quando il risultato è < 12 AU/ml

DUBBIO: quando il risultato è compreso tra 12 e 18 AU/ml

In caso di risultato dubbio ripetere il test. Se il risultato rimane dubbio, ripetere il prelievo dopo 1-2 settimane.

11. LIMITAZIONI DEL TEST

I risultati devono essere sempre interpretati insieme ad altri dati provenienti dalla valutazione clinica e da altre indagini diagnostiche.

Per una migliore valutazione del profilo anticorpale del campione sarebbe opportuno valutarne anche la concentrazione in IgM e in IgG

E' possibile che campioni prelevati in fase iniziale dell'infezione possano non aver ancora sviluppato anticorpi in sufficiente quantità da poter essere rilevabili; in caso di dubbio o negativo è consigliabile ripetere un prelievo a distanza di 2-3 settimane ed eseguire una nuova analisi se persistono sospetti clinici.

Si consiglia, prima dell'utilizzo di campioni lipemici, o torbidi, una centrifugazione o filtrazione.

Interpretazione dei risultati basati sulla combinazione del dosaggio di anticorpi IgG, IgM e IgA:

Livello anticorpale M. pneumoniae			
IgG	IgM	IgA	Interpretazione
negativo	negativo	negativo	nessuna indicazione di infezione
negativo o positivo	positivo	negativo o positivo	indicazione di infezione corrente
positivo	negativo	negativo	indicazione di infezione pregressa
negativo o positivo	negativo	positivo	indicazione di infezione corrente

12. RANGE DI CALIBRAZIONE

Range di calibrazione 0-100.0 AU/ml.

Per campioni > 100.0 AU/ml ripetere il test prediluendo il campione in Negative Control/Sample Diluent (PF83607- non fornito con il kit).

13. SPECIFICITA' ANALITICA

Sono stati testati 2 campioni (1 cut-off e 1 negativo) ai quali sono stati aggiunti i seguenti interferenti:

Bilirubina (15 mg/dl – 60mg/dl)
 Trigliceridi (7.5 mg/ml – 30 mg/ml)
 Emoglobina (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)
 RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

La presenza nel siero in esame di sostanze interferenti sopra riportate non altera il risultato del test.

14. SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

In una sperimentazione, sono stati analizzati 102 campioni sia con il kit Diesse sia con altro kit del commercio.

Di seguito sono schematizzati i risultati della sperimentazione:

		Riferimento		
		+	-	Totale
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Totale	20	82	102

Sensibilità Diagnostica: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 – 100.0

Specificità Diagnostica: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 – 95.0

15. PRECISIONE

PRECISIONE ALL'INTERNO DELLA SEDUTA

	No. replicati	Media AU/ml	D.S.	CV%
Camp. 1	5	10.0	0.00	0.0
Camp. 2	5	20.5	2.47	12.0
Camp. 3	4	69.4	3.46	5.0
Camp. 4	4	35.7	4.81	13.5

PRECISIONE TRA SEDUTE

	Media AU/ml			Media	D.S.	CV%
	Gior 1	Gior 2	Gior 3			
Camp. 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Camp. 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Camp. 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Camp. 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Camp. 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Camp. 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAFIA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology (2000), 146, 741-747
3. S. Rotten: Interaction of *Mycoplasma* With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171

5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of *Mycoplasma pneumoniae* by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



INSTRUCTIONS FOR USE

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. INTENDED USE

Immunoenzymatic method for the semiquantitative determination of IgA-class antibodies to Mycoplasma pneumoniae in human serum, using a disposable device applied on the Chorus and Chorus TRIO instruments.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA For the Semiquantitative Determination of IgA Antibodies to Mycoplasma pneumoniae

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

2. INTRODUCTION

Mycoplasma pneumoniae is the most common etiological agent causing pneumonia acquired in community environments, particularly in the age range of 5 to 30 years; it can cause epidemics which develop slowly as the incubation period varies from 10 to 14 days, and the infection involves subjects living in close contact or in segregated groups (schools, military barracks, family groups). Pneumonia caused by Mycoplasma is also known as atypical primary pneumonia or Eaton's pneumonia.

Mycoplasma pneumoniae attacks and destroys ciliated epithelial cells of the respiratory tract mucosa. Microscopic examination evidences interstitial pneumonia, bronchitis and bronchiolitis.

Due to the recurrence of symptoms caused by different etiological agents, additional diagnostic measures such as serological tests are necessary for the diagnosis of an acute pneumonia infection.

The immune response, following a Mycoplasma pneumoniae infection, depends on the type of infection: the IgA-class antibodies are more frequently found in case of primary infections as demonstrated by their presence in younger patients. The IgM are low or not found in older patients with higher probability of reinfection. On the other hand the IgA represent the highest sensitivity marker in case of an infection in progress, a reinfection or a recent infection.

Specific IgA-class antibodies appear early during the infection and reach peak levels during the first 4 weeks, then declining quite rapidly, earlier than the IgG; diagnosis of an acute infection can often be made on the basis of a single sample test. The IgG appear after the IgM and IgA and they generally reach the peak level during the 5^o week. A high titer together with a significant increase between two samples taken

approximately 2 weeks apart, confirms that an infection is in progress.

The antigen used in the test for the serological determination of the specific IgA derives from an extract of M. pneumoniae membrane. This membrane contains significant quantities of P1 adhesin that represents the immunodominant antigen and corresponds to a transmembrane protein which is the main responsible of the adherence of M. pneumoniae to the host respiratory epithelium.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The test is based on the indirect ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) principle.

The antigen, composed of an extract of inactivated Mycoplasma pneumoniae is bound to the solid phase and is incubated with the human serum sample so that the specific IgA are bound to the antigen.

After washings to eliminate the proteins which have not reacted, incubation is performed with the conjugate constituted of anti-human IgA monoclonal antibodies conjugated to peroxidase.

The conjugate which has not reacted is eliminated and the peroxidase substrate is added. The blue colour which develops is proportional to the concentration of specific antibodies present in the test serum.

The disposable devices contain all the reagents necessary to perform the test when applied on the Chorus instruments.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE ONLY

This kit contains materials of human origin which have been tested and gave a negative response by FDA-approved methods for the presence of HBsAg and for anti-HIV-1, anti-HIV-2 and anti-HCV antibodies. As no diagnostic test can offer a complete guarantee regarding the absence of infective agents, all material of human origin must be handled as potentially infectious. All precautions normally adopted in laboratory practice should be followed when handling material of human origin.

Waste disposal: serum samples, calibrators and strips once used must be treated as infectious residuals and eliminated according to law.

Health and Safety Information

1. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens. Wash hands thoroughly after placing the devices in the CHORUS instrument.
2. The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - a) The conjugate contains phenol
 - b) The substrate is acid
 If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.

- Neutralized acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
- Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with adsorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid-containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

Analytical Precautions

Bring the devices to room temperature (18-30°C) before use; use within 60 min.

- Discard devices which show the substrate (well 4) blue colored.**
- Adding the sample into the well verify that it is perfectly distributed on the bottom.
- Check for the presence of the reagents in the device and that the device is not damaged; do not use devices which are lacking a reagent.
- The devices are for use with the Chorus instrument; the instructions for use must be carefully followed and the instrument operating manual must be consulted.
- Check that the Chorus instrument is set up correctly (see Chorus Operating Manual).
- Do not alter the bar code placed on the handle of the device in order to allow correct reading by the instrument and do not use devices with defective labels.
- Avoid using self-defrosting freezers for the storage of the samples.
- Defective barcodes can be inserted manually in the instrument.
- Do not expose the devices to strong light or to hypochlorite vapours during storage and use.
- The use of strongly hemolyzed samples or samples presenting microbial contamination may all constitute sources of error.
- Before inserting the devices in the instrument, check that the reaction well does not contain foreign bodies.
- Pipette the test serum (50 µl) in well 1 of the device (see figure).
- Do not use the device after the expiry date.
- Make sure that the instrument is connected to the Washing Buffer REF 83606.**

5. KIT COMPOSITION AND REAGENT PREPARATION

The kit is sufficient for 36 determinations.

DD DEVICES 6 packages each containing 6 devices

Description of device:



Position 8: Space for application of bar code label

Position 7: Empty

Position 6: MICROPLATE WELL

Coated with *Mycoplasma pneumoniae* antigen

Position 5: Uncoated MICROPLATE WELL

Position 4: TMB SUBSTRATE

Contents: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL and H₂O₂ 0.01% stabilized in 0.05 mol/L citrate buffer (pH 3.8)

Position 3: SAMPLE DILUENT

Contents: Proteic solution containing phenol 0.05%, Bronidox 0.02% and an indicator to reveal the presence of the serum.

Position 2: CONJUGATE

Contents: monoclonal antibodies anti-human IgA labelled with peroxidase in phosphate buffer containing phenol 0.05% and Bronidox 0.02%.

Position 1: EMPTY WELL

In which the operator must place the undiluted serum

Use: equilibrate a package at room temperature, open the package and remove the required devices; replace the others in the bag with the silica gel, expel the air and seal by pressing the closure. Store at 2-8°C.

CALIBRATOR CALIBRATOR 1 x 0.175 ml

Content: Diluted human serum, at known antibody concentration, containing Proclin and Gentamycin. Liquid, ready for use.

CONTROL + POSITIVE CONTROL 1 x 0.425 ml

Content: Diluted human serum, at known antibody concentration, containing Proclin and Gentamycin. Liquid, ready for use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Distilled or deionised water
- Normal laboratory glassware: cylinders, test-tubes etc.
- Micropipettes for the accurate collection of 50-200 µl solution
- Disposable gloves
- Sodium Hypochlorite solution (5%)
- Containers for collection of potentially infectious materials

6. STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents must be stored at 2/8°C. In the case of storage at an incorrect temperature the calibration must be repeated and the run validated using the control serum (see section 9, Test validation).

The expiry date is printed on each component and on the kit label.

Reagents have a limited stability after opening:

DEVICES	8 weeks at 2/8°C
CALIBRATOR	8 weeks at 2/8°C
POSITIVE CONTROL	8 weeks at 2/8°C

7. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The sample is composed of serum collected in the normal manner from the vein and handled with all precautions dictated by good laboratory practice. The fresh serum may be stored for 4 days at 2/8°C, or frozen for longer periods at -20°C, and can be thawed a maximum of 3 times. Do not keep the samples in auto-defrosting freezers. Defrosted samples must be shaken carefully before use. The quality of the sample can be seriously affected by microbial contamination which leads to erroneous results.

Strongly lipemic, icteric, hemolyzed or contaminated samples cannot be used. The test cannot be applied to plasma.

8. ASSAY PROCEDURE

1. Open the package (on the side containing the pressure-closure), remove the number of devices required and seal the rest in the bag after expelling the air.
2. Check the state of the device according to the indications reported in chapter 4, Analytical Precautions.
3. Dispense 50 µl of undiluted test serum in well no. 1 of each device; at each change of batch, use a device for the calibrator.
4. Place the devices in the instrument. Perform the calibration (if necessary) and the test as reported in the Chorus Operating Manual.

9. TEST VALIDATION

Use the control serum to check the validity of the results obtained. It should be used as reported in the operating manual. If the instrument signals that the control serum has a value outside the acceptable range, the calibration must be repeated. The previous results will be automatically corrected. If the result of the control serum continues to be outside the acceptable range, contact the Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION OF THE RESULTS

The Chorus instrument gives a semiquantitative result in AU/mL.

The test serum can be interpreted as follows:

POSITIVE: when the result is >18 AU/mL
 NEGATIVE: when the result is < 12 AU/mL
 DOUBTFUL: when the result is in the range 12-18 AU/mL

In the case of a doubtful result, repeat the test. If the test remains doubtful, collect a new sample after 1-2 weeks.

11. LIMITATIONS

The test results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation and other diagnostic procedures.

In order to obtain a better evaluation of the antibody profile of the sample it is advisable to detect the IgM and IgG concentration as well.

Samples collected during the early phase of the infection may not have developed sufficient antibodies to be detectable; in the case of doubtful or negative results, collect a new sample after 2-3 weeks and repeat the test if clinical suspects persist.

It is advisable to centrifuge or filter lipemic or cloudy samples before testing.

Interpretation of the results based on the combined assay of IgG, IgM and IgA:

M. pneumoniae antibody level			
IgG	IgM	IgA	Interpretation
negative	negative	negative	No indication of infection
negative or positive	positive	negative or positive	Indication of infection in progress
positive	negative	negative	Indication of past infection
negative or positive	negative	positive	Indication of infection in progress

12. CALIBRATION RANGE

Calibration range 0-100.0 AU/ml.

For samples > 100.0 AU/ml repeat the test pre-diluting the sample with Negative Control/Sample Diluent (PF83607 – not supplied with the kit).

13. ANALYTICAL SPECIFICITY

2 samples (1cut-off and 1negative) containing potentially interfering substances were tested:

Bilirubin (15 mg/dl – 60mg/dl)
 Triglycerides (7.5 mg/ml – 30 mg/ml)
 Hemoglobin (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)
 RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

The presence in the tested serum of the interfering substances listed above did not alter the results of the test.

14. DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

In an experimentation, 102 samples were analyzed with the Diesse kit as well as with another commercial method.

Below are the schematized results of the trial:

Reference		
+	-	Total

Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Total	20	82	102

Diagnostic Sensitivity: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 – 100.0

Diagnostic Specificity: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 – 95.0

15. PRECISION

WITHIN-RUN PRECISION

	No. of replicates	Mean AU/ml	S.D.	CV%
Sample 1	5	10.0	0.00	0.0
Sample 2	5	20.5	2.47	12.0
Sample 3	4	69.4	3.46	5.0
Sample 4	4	35.7	4.81	13.5

BETWEEN-RUNS PRECISION

	Mean AU/ml			Mean	S. D.	CV%
	Day 1	Day 2	Day 3			
Sample 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Sample 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Sample 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Sample 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Sample 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Sample 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. REFERENCES

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology (2000), 146, 741-747
3. S. Rotten: Interaction of *Mycoplasma* With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of *Mycoplasma pneumoniae* by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



NÁVOD NA POUŽITÍ

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. ÚČEL POUŽITÍ

Imunoenzymatická metoda k semikvantitativnímu stanovení IgA protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae* v lidském séru za použití jednorázového zařízení aplikovaného do zařízení Chorus nebo Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA K semikvantitativnímu stanovení IgA protilátek proti *Mycoplasma pneumoniae*

Určeno pouze k diagnostice *in vitro*

2. ÚVOD

Mycoplasma pneumoniae je nejběžnějším etiologickým agens způsobujícím zápal plic získaný mimo nemocnici, a to zvláště u osob v rozmezí 5 až 30 let věku. Může způsobovat epidemie, které se rozvíjejí pomalu, protože se inkubační doba pohybuje v rozmezí 10 až 14 dnů a infekce postihuje osoby žijící v blízkém kontaktu nebo v segregovaných skupinách (školy, kasárna, rodiny). Zápal plic způsobený mykoplasmatem je známý také jako atypická primární pneumonie či Eatonova pneumonie.

Mycoplasma pneumoniae napadá a ničí řasinkové epitelové buňky sliznice dýchacího traktu. Mikroskopická zkoumání ukazuje intersticiální pneumonii, bronchitidu a bronchiolitidu.

Kvůli vracejícím se symptomům způsobeným různými etiologickými agens jsou nutné další diagnostické kroky, jako jsou serologické testy k diagnóze akutního zánětu plic.

Imunitní odezva po infekci *Mycoplasma pneumoniae* závisí na typu infekce: protilátky třídy IgA se nejčastěji nacházejí u primárních infekcí, jak dokazuje jejich přítomnost u mladších pacientů. U starších pacientů s vyšší pravděpodobností opakované infekce je hladina IgM protilátek nízká nebo nulová. Na druhou stranu představují IgA protilátky marker s největší citlivostí v případě probíhající infekce, opakované infekce nebo nedávne infekce.

Specifické protilátky třídy IgA se objevují brzy během infekce a dosahují nejvyšší hladiny během prvních 4 týdnů, poté vcelku rychle klesají, dříve než IgG protilátky. Diagnózu akutní infekce lze často provést na základě testování jediného vzorku. IgG protilátky se objevují po IgM a IgA protilátkách a obecně dosahují nejvyšší hladiny během 5. týdne. Vysoký titr spolu s významným nárůstem mezi dvěma vzorky sebranými přibližně ve dvoutýdenním odstupu potvrzuje, že infekce právě probíhá.

Antigen použitý v testu pro serologické stanovení specifických IgA je odvozen z extraktu membrány *M. pneumoniae*. Tato

membrána obsahuje významná množství adhezinu P1, který představuje imunodominantní antigen a odpovídá transmembránovému proteinu, který je především zodpovědný za přilnutí *M. pneumoniae* k respiračnímu epitelu hostitele.

3. PRINCIP METODY

Test je založen na principu ELISA (Enzymaticky vázaná imunisorbentní zkouška).

Antigen, složený z extraktu inaktivovaného *Mycoplasma pneumoniae*, je vázán na pevnou fázi a inkubován se vzorkem lidského séra tak, že se specifické IgA protilátky naváží na antigen.

Po promytí k eliminaci nereagujících bílkovin se provede inkubace s konjugátem složeným z anti-lidských monoklonálních IgA protilátek konjugovaných s peroxidázou.

Konjugát, který nereagoval, je eliminován a přidá se peroxidázový substrát. Modré zbarvení, které vznikne, je přímo úměrné koncentraci specifických protilátek přítomných v testovaném séru.

Jednorázové nástroje obsahují veškeré reagentie potřebné k provedení testu při použití zařízení Chorus.

4. VÝSTRAHY A BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ

URČENO POUZE K DIAGNOSTICE *IN VITRO*

Tato souprava obsahuje materiály lidského původu, které byly testovány a vykázaly negativní výsledky při použití metod schválených FDA pro stanovení přítomnosti HbsAg a anti-HIV-1, anti-HIV-2 a anti-HCV protilátek. Protože však žádný diagnostický test nemůže poskytnout úplnou záruku, že infekční agens nejsou přítomna, je třeba s veškerým materiálem lidského původu zacházet tak, jako by byl potenciálně infekční. Při zacházení s materiálem lidského původu je nutné dodržovat všechna relevantní opatření používaná v laboratorní praxi.

Likvidace odpadu: S použitými vzorky sér, kalibrátory a stripy je třeba zacházet jako s infekčními rezidui a likvidovat je v souladu s legislativou.

Informace týkající se zdraví a bezpečnosti

1. Nepipetujte ústy.
 2. Při zacházení se vzorky mějte nasazeny jednorázové rukavice a chraňte si oči.
 3. Po vložení nástrojů do zařízení CHORUS si důkladně umyjte ruce.
 4. Následující reagentie obsahují nízké koncentrace škodlivých nebo dráždivých látek:
 - c) Konjugát a kontroly obsahují fenol.
 - d) Substrát obsahuje kyselinu.
- Příjde-li jakákoliv reagentie do kontaktu s kůží nebo očima, omyjte danou oblast vydatně vodou.
5. Neutralizované kyseliny i jiný tekutý odpad je třeba dekontaminovat přidáním dostatečného množství chlornanu sodného tak, aby konečná koncentrace dosahovala alespoň 1%. Pro účinnou dekontaminaci je

nutné nechat působit 1% chlornan sodný po dobu 30 minut.

- Rozlitý potenciálně infekční materiál je třeba okamžitě odstranit pomocí absorpčního papírového ručníku a kontaminovanou oblast umýt, například 1% chlornanem sodným, a to předtím, než budete v práci pokračovat. Chlornan sodný nepoužívejte na rozlité tekutiny s obsahem kyseliny, ty musíte nejprve otřením vysušit. Materiály použité k čištění potřísněných povrchů, včetně rukavic, se musí likvidovat jako potenciálně životu nebezpečný odpad. Materiál obsahující chlornan sodný nevkláděte do autoklávu.

Opatření pro správné provedení testu

Než nástroje použijete, nechte je vyteperovat na pokojovou teplotu (18–30°C) a použijte je do 60 min.

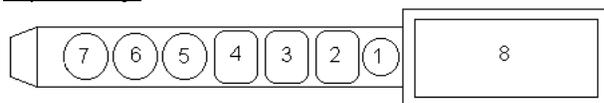
- Nástroje vykazující modré zbarvení substrátu (jamka 4) zlikvidujte.**
- Při aplikaci vzorku do jamky si ověřte, že je po dně dokonale rozprostřen.
- Zkontrolujte, že v nástroji jsou přítomny všechny reagentie a že nástroj není poškozen; nástroje, ve kterých chybí reagentie, nepoužívejte.
- Nástroje jsou určeny pro použití se zařízením Chorus; je třeba pečlivě dodržovat návod na použití a řídit se příručkou k obsluze nástroje.
- Zkontrolujte, že je zařízení Chorus správně nastaveno (viz Návod k obsluze zařízení Chorus).
- Čárový kód na rukojeti nástroje nikdy neměňte, aby jej zařízení správně přečetlo.
- Ke skladování vzorků nepoužívejte mrazáky, které se samy odmrazují.
- Defektní čárové kódy lze vložit do zařízení manuálně.
- Během skladování a používání nevystavujte nástroje silnému světlu či chlornanovým výparům.
- Použití silně hemolyzovaných vzorků nebo vzorků představujících mikrobiální kontaminaci může být zdrojem chyb.
- Než do zařízení vložíte nástroje, ujistěte se, že reakční jamka neobsahuje cizí tělesa.
- Testované sérum (50 µl) pipetujte do jamky 1 nástroje (viz obrázek).
- Nástroj nepoužívejte po datu spotřeby.
- Ujistěte se, že je nástroj připojen k promývacímu pufru Washing Buffer REF 83606.**

5. OBSAH SOUPRAVY A PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Souprava vystačí na 36 stanovení.

DD NÁSTROJE 6 balení po 6 nástrojích

Popis nástroje:



Pozice 8: Prostor pro aplikaci štítku s čárovým kódem

Pozice 7: prázdná

Pozice 6: MIKROTITRAČNÍ JAMKA

potážená antigenem *Mycoplasma pneumoniae*

Pozice 5: Nepotážená MIKROTITRAČNÍ JAMKA

Pozice 4: TMB SUBSTRÁT

Obsah: Tetramethylbenzidin 0.26 mg/ml a H₂O₂ 0.01% stabilizovaná v 0.05 mol/l citrátového pufru (pH 3.8)

Pozice 3: ŘEDIDLO VZORKU

Obsah: Bílkovinný roztok obsahující 0.05% fenol, 0.02% Bronidox a indikátor ukazující na přítomnost séra.

Pozice 2: KONJUGÁT

Obsah: Antilidské monoklonální IgA protilátky značené křenovou peroxidázou, ve fosfátovém pufru obsahujícím 0.05% fenol a 0.02% Bronidox

Pozice 1: PRÁZDNÁ JAMKA

do níž obsluha umístí neředěné sérum.

Použití: přiveďte balení na pokojovou teplotu, otevřete balení a vyjměte požadované nástroje; ostatní vložte do sáčku se silikagelem, vytlačte vzduch a **uzavřete** stisknutím. Skladujte při teplotě 2–8°C.

CALIBRATOR KALIBRÁTOR 1 x 0.175 mL

Obsah: Naředěné lidské sérum se známou koncentrací protilátek, obsahuje Proclin a Gentamycin, tekutina připravena k použití.

CONTROL + POZITIVNÍ KONTROLA 1 x 0.425 mL

Obsah: Naředěné lidské sérum se známou koncentrací protilátek, obsahuje Proclin a Gentamycin, tekutina připravena k použití.

POTŘEBNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607
- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Běžné laboratorní sklo: odměrné válce, zkumavky atd.
- Mikropipety pro přesný sběr 50–200 µl roztoku.
- Jednorázové rukavice.
- Roztok chlornanu sodného (5%).
- Kontejnery pro sběr potenciálně nebezpečného materiálu.

6. SKLADOVÁNÍ A STABILITA REAGENCIÍ

Reagentie je nutné skladovat při teplotě 2–8°C. Skladujete-li reagentie při nesprávné teplotě, je nutné zopakovat kalibraci a test validovat pomocí kontrolního séra (viz bod 9, Validace testu).

Datum spotřeby je vytištěno na každém komponentu a na štítku soupravy.

Reagentie mají po otevření omezenou stabilitu:

NÁSTROJE	8 týdnů při teplotě 2–8 °C
KALIBRÁTOR	8 týdnů při teplotě 2–8 °C
POZ. KONTROLA	8 týdnů při teplotě 2–8 °C

7. SBĚR A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

Vzorek je sérum sebrané běžným způsobem ze žíly, se kterým bylo nakládáno za dodržení opatření předepsaných dobrou laboratorní praxí. Čerstvé sérum lze skladovat 4 dny při teplotě 2–8°C, nebo zmrazit na delší dobu při teplotě -20°C. Rozmrazovat se smí maximálně 3 krát. Neskladujte vzorky v mrazácích s automatickým odmrazením. Inaktivace horkem může vést k chybným výsledkům. Rozmrazené vzorky je nutné před použitím pečlivě protřepat. Kvalita vzorku může být silně narušena mikrobiální kontaminací, což by vedlo k chybným výsledkům.

Silně lipemické, ikterické, hemolyzované či kontaminované vzorky nelze použít. Test nelze aplikovat na plazmu

8. POSTUP

- Otevřete balení (na straně s tlakovým uzávěrem), vyjměte požadované množství nástrojů a poté, co jste z balení vytlačili vzduch, je opět uzavřete.
- Zkontrolujte stav zařízení podle údajů uvedených v kapitole 4, Opatření pro správné provedení testu.
- Vložte 50 µl neředěného testovaného séra do jamky č. 1 každého nástroje; při každé změně šarže použijte nástroj na kalibraci.
- Nástroje umístěte do zařízení Chorus a proveďte kalibraci (je-li třeba) a test podle Návodu k obsluze zařízení Chorus.

9. OVĚŘENÍ TESTU

Pomocí kontrolního séra ověřte správnost získaných výsledků. Použijte je v souladu s instrukcemi uvedenými v návodu na obsluhu. Pokud zařízení ukáže, že se hodnota kontrolního séra pohybuje mimo přijatelné rozmezí, kalibraci je třeba opakovat. Předchozí výsledky budou automaticky opraveny.

Pokud je výsledek kontrolního séra i nadále mimo přijatelné rozmezí, zatelefonujte prosím do oddělení vědecké podpory.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Zařízení chorus uvádí semikvantitativní výsledky v AU/ml. Testované sérum lze interpretovat takto:

POZITIVNÍ: je-li výsledek >18 AU/ml
 NEGATIVNÍ: je-li výsledek < 12 AU/ml
 SPORNÝ: je-li výsledek v rozmezí 12–18 AU/ml

V případě sporného výsledku test opakujte. Zůstává-li test sporný, seberte za 1–2 týdny vzorek nový.

11. OMEZENÍ

Výsledky testu je třeba používat v kombinaci s informacemi získanými z klinického vyhodnocení a na základě ostatních diagnostických procedur.

Abyste získali lepší vyhodnocení profilu protilátek vzorku, doporučujeme detekovat také koncentraci IgM a IgG protilátek. U vzorků sebraných v průběhu rané fáze infekce se nemusel vytvořit dostatek protilátek tak, aby byly detekovatelné. V případě sporného nebo negativního výsledku seberte nový vzorek za 2–3 týdny a, pokud klinické podezření trvá, test opakujte.

Doporučujeme před testováním odstředit či přefiltrovat lipemické a kalné vzorky.

Interpretace výsledků založených na kombinované zkoušce na IgG, IgM a IgA protilátky:

Hladina protilátek proti M. pneumoniae			
IgG	IgM	IgA	Interpretace
negativní:	negativní:	negativní:	bez indikace infekce
negativní nebo pozitivní	pozitivní:	negativní nebo pozitivní	indikace probíhající infekce
pozitivní:	negativní:	negativní:	indikace proběhlé infekce
negativní nebo pozitivní	negativní:	pozitivní:	indikace probíhající infekce

12. KALIBRAČNÍ ROZMEZÍ

Kalibrační rozmezí 0–100.0 AU/ml.

Pro vzorky > 100.0 AU/ml znova vzorek otestujte nařazený v ředidle pro negativní kontrolní vzorek (PF83607 – se v rámci soupravy nedodává).

13. ANALYTICKÁ SPECIFIČNOST

Byly testovány 2 vzorky (1cut-off a 1negativní) obsahující potenciálně rušivé látky:

Bilirubin (15 mg/dl–60mg/dl)
 Triglyceridy (7.5 mg/ml–30 mg/ml)
 Hemoglobin (2.5 mg/ml–10 mg/ml)
 RF (30 IU/ml–150 IU/ml)

Přítomnost výše uvedených rušivých látek v testovaném séru nezměnila výsledky testu.

14. DIAGNOSTICKÁ SENZITIVITA A SPECIFICITA

V experimentu bylo testováno 102 vzorků pomocí soupravy Diesse a jiné komerční soupravy.

Výsledky shrnuje následující tabulka:

		Reference		
		+	–	Celkem
Diesse	+	20	8	28
	–	0	74	74
	Celkem	20	82	102

Diagnostická senzitivita: 100% CI_{95%}: 83.9–100.0

Diagnostická specificita: 90.2 % CI_{95%}: 81.9–95.0

15. PŘESNOST

PŘESNOST V RÁMCI TESTU

	Počet replikátů	Střední hodnota a AU/ml	S.O.	CV %
Vzorek 1	5	10.0	0.00	0.0
Vzorek 2	5	20.5	2.47	12.0
Vzorek 3	4	69.4	3.46	5.0
Vzorek 4	4	35.7	4.81	13.5

PŘESNOST MEZI TESTY

	Střední hodnota AU/ml			Střední hodnota	S. O.	CV %
	1.den	2.den	3.den			
Vzorek 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Vzorek 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Vzorek 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Vzorek 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Vzorek 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Vzorek 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. REFERENČNÍ LITERATURA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteinscomplexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000), 146, 741-747
3. S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol. Rev. 83: 417-432, 2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40: 165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol. Chem. Vol. 369, pp. 1295-1299, December 1988.

17. GLOSÁŘ POUŽITÝCH SYMBOLŮ

	Datum výroby
	Použitelné do
	Nepoužívejte opakovaně
	Pozor, čtěte přiložené dokumenty
	Výrobce
	Obsah stačí na < n > testů
	Teplotní omezení
	Čtěte návod k použití
	Biologická rizika
	Katalogové číslo
	Lékařské vybavení pro diagnostiku <i>in vitro</i>
	Kód šarže



GEBRAUCHSANLEITUNG

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunassay-Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung der Anti-Mycoplasma pneumoniae IgA-Antikörper im Humanserum mit einem Einweg-Testmodul, das in Kombination mit Chorus und Chorus TRIO Laboranalysatoren verwendet wird.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Zur semiquantitativen Bestimmung der Anti- Mycoplasma pneumoniae IgA-Antikörper

**Ausschließlich für die *In-vitro-Diagnostik*
bestimmt**

2. EINLEITUNG

Mycoplasma pneumoniae ist der häufigste ätiologische Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, vor allem im Alter zwischen 5 und 30 Jahren; er kann für Epidemien verantwortlich sein, die sich langsam entwickeln, weil die Inkubationszeit zwischen 10 und 14 Tagen variiert. Die Ansteckung erfolgt über engen Kontakt oder in abgegrenzten Gruppen (Schulen, Kasernen, Familien). Die Pneumonie durch Mycoplasma wird auch atypische primäre Pneumonie oder Pneumonie durch Eaton-Agent genannt.

M. pneumoniae greift die Zilien der Epithelzellen der Schleimhaut des Respirationstrakts an und zerstört sie. Mikroskopisch verursacht M. pneumoniae interstitielle Pneumonie, Bronchitis und Bronchiolitis.

Bei Fällen von Pneumonie sind aufgrund der Symptome durch verschiedene ätiologische Erreger zusätzliche diagnostische Mittel, wie serologische Tests, für die Diagnostik der akuten Infektion erforderlich.

Die Immunreaktion in Folge einer Infektion durch Mycoplasma pneumoniae ist an den Typ der Infektion gebunden: Die Antikörper der Klasse IgM sind meistens bei Fällen von Erstinfektion anzutreffen. Das erklärt, warum sie hauptsächlich bei jüngeren Patienten zu finden sind. Bei erwachsenen Patienten mit einer größeren Wahrscheinlichkeit der Reinfektion sind die IgM-Antikörper in geringer Zahl oder gar nicht vorhanden; hingegen sind die IgA-Antikörper Marker mit höherer Sensivität bei aktueller Infektion, Reinfektionen oder kürzlich erfolgten Infektionen.

Die spezifischen Antikörper der Klasse A treten zu einem frühen Zeitpunkt, zu Beginn der Krankheit auf und erreichen in den ersten 4 Wochen hohe Werte, um danach sofort vor den IgG-Antikörpern abzusinken, wodurch die Diagnostik der akuten Infektion auch mit einer einzigen Entnahme möglich ist. Die IgG entwickeln sich nach den IgM und IgA und erreichen den Spitzenwert durchschnittlich in der 5. Woche. Ein hoher Wert zusammen mit einem deutlichen Anstieg zwischen zwei Entnahmen, die in einem Abstand von ungefähr zwei Wochen erfolgen, erlaubt die Bestätigung der Präsenz einer aktuellen Infektion.

Das für den Test zur serologischen Bestimmung der spezifischen IgA-Antikörper verwendete Antigen kommt aus einem Extrakt der Membran von M. pneumoniae, das eine große Menge an Zytoadhäsion P1 enthält. Es stellt das immundominante Antigen dar und entspricht einem transmembranen Protein, dem Hauptverantwortlichen für die Zytoadhärenz von M. pneumoniae am Epithel des Respirationstrakts des Wirts.

3. TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der indirekten ELISA-Methode (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Das aus einem inaktivierten Extrakt aus Mycoplasma pneumoniae bestehende Antigen wird an die Festphase gebunden. Durch die Inkubation des untersuchten Humanserums binden die spezifischen IgA-Antikörper an das Antigen.

Nach dem Ausspülen der Proteine, die nicht reagiert haben, erfolgt die Inkubation mit dem Konjugat aus Meerrettichperoxidase-konjugierten monoklonalen Anti-human-IgA-Antikörpern.

Das nicht gebundene Konjugat wird entfernt und das Peroxidasesubstrat hinzugefügt.

Die Intensität der blauen Farbe entwickelt sich proportional zur Konzentration der spezifischen Antikörper im untersuchten Serum.

Die Einweg-Testmodule enthalten alle erforderlichen Reagenzien, um den Test nach Einlegen in den Chorus Laboranalysator durchführen zu können.

4. VORSICHTSMASSNAHMEN

AUSSCHLIESSLICH FÜR DIE *IN-VITRO-DIAGNOSTIK* BESTIMMT.

Dieser Testsatz enthält Material humanen Ursprungs, das mit FDA zugelassenen Methoden sowohl auf HBsAg als auch auf Anti-HIV-1, Anti-HIV-2 und Anti-HCV-Antikörper negativ getestet wurde. Da kein diagnostischer Test die Präsenz infektiöser Stoffe vollständig ausschließen kann, muss jedes Material humanen Ursprungs als potentiell infektiös betrachtet werden. Sämtliche Reagenzien und Proben müssen unter Einhaltung der üblicherweise in Labors geltenden Sicherheitsvorschriften gehandhabt werden.

Entsorgung der Abfälle: Die Serumproben, Kalibratoren und gebrauchten Streifen müssen als infektiöser Abfall behandelt und daher unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Warnhinweise für die Sicherheit des Personals

1. Nicht mit dem Mund pipettieren. Beim Handhaben der Proben und während des Tests Einweghandschuhe und einen Augenschutz tragen. Die Hände nach Beendigung des Tests sorgfältig waschen.
2. Die folgenden Reagenzien enthalten geringe Konzentrationen schädlicher oder reizender Substanzen:
 - c) Das Konjugat und die Kontrollen enthalten Phenol
 - d) Das Substrat ist sauer
 Wenn ein Reagenz mit der Haut oder mit den Augen in Berührung kommt, diese mit reichlich Wasser spülen.
3. Neutralisierende Säuren und andere flüssige Abfälle müssen durch Zugabe von Natriumhypochlorit desinfiziert werden. Das zugegebene Volumen muss eine Endkonzentration von mindestens 1 % ergeben. Eine 30-minütige Exposition mit 1 %igem Natriumhypochlorit sollte für die Gewährleistung einer wirksamen Desinfektion ausreichen.
4. Wird potentiell infektiöses Material versehentlich verschüttet, muss es umgehend mit Saugpapier entfernt werden. Die beschmutzte Fläche muss vor dem Fortsetzen der Arbeit zum Beispiel mit 1 %igem Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Wenn eine Säure vorhanden ist, darf das Natriumhypochlorit nicht verwendet werden, bevor die Fläche getrocknet wurde. Alle für die Dekontamination von verschüttetem Material verwendeten Hilfsmittel müssen einschließlich der Handschuhe als potentiell infektiöser Abfall entsorgt werden. Materialien, die Natriumhypochlorit enthalten, dürfen nicht autoklaviert werden.

Warnhinweise zur Analyse

Die zu verwendenden Testmodule vor dem Gebrauch auf Umgebungstemperatur (18–30 °C) bringen und innerhalb von 60 Minuten verwenden.

1. **Die Vorrichtungen mit blau gefärbtem Substrat (Napf 4) verwerfen.**
2. Beim Einfüllen der Probe in die Vertiefung auf die perfekte Verteilung am Boden achten.
3. Kontrollieren, ob die Reagenzien im Testmodul vorhanden sind und ob letzteres unversehrt ist. Keine Testmodule verwenden, bei denen im Zuge der Sichtkontrolle festgestellt wird, dass Reagenzien fehlen.
4. Die Testmodule müssen zusammen mit dem Chorus Laboranalysator verwendet werden. Dabei sind diese Gebrauchsanleitung und die Anweisungen in der Gebrauchsanleitung des Analysators strikt zu befolgen.
5. Kontrollieren, ob der Chorus Laboranalysator korrekt eingestellt ist (siehe Chorus Gebrauchsanleitung).
6. Den Strichcode auf dem Griff des Testmoduls nicht beschädigen, damit er vom Laboranalysator korrekt gelesen werden kann.

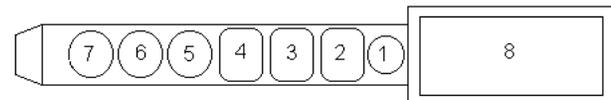
7. Für die Aufbewahrung der Proben keine selbstabtauenden Tiefkühlgeräte verwenden.
8. Unlesbare Codes können manuell in den Analysator eingegeben werden.
9. Die Testmodule während der Aufbewahrung und des Gebrauchs keiner starken Beleuchtung und keinen Natriumhypochlorit-Dämpfen aussetzen.
10. Stark hämolytische oder mikrobisch verunreinigte Proben können Fehlerquellen bergen.
11. Vor dem Einsetzen des Testmoduls in den Chorus Laboranalysator sicherstellen, dass sich in der Reaktionsvertiefung keine Fremdkörper befinden.
12. Das zu untersuchende Serum (50 µl) in die Vertiefung 1 des Testmoduls pipettieren (siehe Abbildung).
13. Das Testmodul nach dem Verfalldatum nicht mehr verwenden.

5. BESTANDTEILE DES TESTSATZES UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Der Testsatz reicht für 36 Bestimmungen.

DD TESTMODULE 6 Packungen mit je 6 Testmodulen

Beschreibung:



Position 8: Platz für Strichcode-Etikett

Position 7: leer

Position 6: MIKROPLATTENVERTIEFUNG, die mit dem Antigen von *Mycoplasma pneumoniae* sensibilisiert wurde

Position 5: VERTIEFUNG

nicht sensibilisiert

Position 4: TMB SUBSTRAT

Inhalt: 0.26 mg/ml Tetramethylbenzidin und 0.01% H₂O₂, stabilisiert in Citratpuffer (0.05 mol/l, pH 3.8)

Position 3: VERDÜNNUNGSMITTEL FÜR DIE PROBEN

Inhalt: Proteinlösung mit 0.05 % Phenol, 0.02 % Bronidox und einem Indikator, der die Präsenz von Serum erfasst

Position 2: KONJUGAT

Inhalt: Peroxidase-markierte monoklonale Anti-human-IgA-Antikörper in Phosphatpufferlösung mit 0.05 % Phenol und 0.02 % Bronidox

Position 1: LEERE VERTIEFUNG

In diese Vertiefung muss der Bediener das unverdünnte Serum füllen

Verwendung: Einen Beutel auf Raumtemperatur bringen,

den Beutel öffnen und die benötigten Testmodule herausnehmen; die nicht benötigten in den Beutel mit Kieselgel zurück legen, die Luft entweichen lassen und den Beutel durch Drücken auf den Verschluss **versiegeln**. Bei 2–8°C aufbewahren.

CALIBRATOR KALIBRATOR 1 x 0.175 mL

Inhalt: verdünntes Humanserum mit bekannter Antikörperkonzentration mit Proclin und Gentamycin. Flüssig, gebrauchsfertig

CONTROL + POSITIVE KONTROLLE 1 x 0.425 mL

Inhalt: verdünntes Humanserum mit bekannter Antikörperkonzentration mit Proclin und Gentamycin. Flüssig, gebrauchsfertig

WEITERES ERFORDERLICHES, ABER NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

- WASHING BUFFER [REF] 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 [REF] 83609
- SANITIZING SOLUTION [REF] 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT [REF] 83607
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Übliches Laborglas: Zylinder, Reagenzgläser, usw.
- Mikropipetten zur genauen Entnahme von Volumina zwischen 50 und 200 µl
- Einweghandschuhe
- 5 %ige Natriumhypochlorit-Lösung
- Behälter zum Sammeln potentiell infektiöser Materialien

6. AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT DER REAGENZEN

Die Reagenzien müssen bei 2–8°C aufbewahrt werden. Im Fall einer falschen Aufbewahrungstemperatur muss die Kalibrierung wiederholt und die Richtigkeit des Ergebnisses mit Hilfe des Kontrollserums überprüft werden (siehe Kapitel 9 Testvalidität).

Das Verfalldatum steht auf jeder Komponente und auf dem Außenetikett der Verpackung.

Die Reagenzien besitzen nach dem Öffnen bzw. der Vorbereitung eine begrenzte Stabilität:

TESTMODULE	8 Wochen bei 2–8°C
KALIBRATOR	8 Wochen bei 2–8°C
POSITIVE KONTROLLE	8 Wochen bei 2–8°C

7. PROBENART UND AUFBEWAHRUNG

Die Probe besteht aus Serum, das aus Blut gewonnen wird, das durch eine normale Punktion von Venen entnommen wurde und das entsprechend den für Labors geltenden Standardverfahren gehandhabt wird. Das frische Serum kann bei 2–8 °C 4 Tage lang aufbewahrt werden; für eine längere Aufbewahrung wird es bei -20 °C eingefroren. Die Probe kann maximal dreimal aufgetaut werden. Für die Aufbewahrung der Proben keine selbstabtauenden Tiefkühlgeräte verwenden. Nach dem Auftauen und vor der Dosierung sorgfältig durchmischen. Durch eine mikrobiische Kontamination kann die Qualität der Probe stark beeinflusst werden, was zu falschen Ergebnissen führen kann.

Stark lipämische, ikterische oder kontaminierte Proben können nicht verwendet werden.

8. VORGEHENSWEISE

1. Den Beutel öffnen (Seite mit Druckverschluss), die für die Durchführung der Tests erforderliche Anzahl von Testmodulen entnehmen und den Beutel mit den restlichen Testmodulen nach dem Entfernen der Luft wieder verschließen.
2. Das Testmodul gemäß den Anweisungen in Kapitel 4 Warnhinweise zur Analyse, Punkte 1 und 8, einer Sichtkontrolle unterziehen.
3. In die Vertiefung 1 jedes Testmoduls 50 µl des zu analysierenden, unverdünnten Serums geben; bei jedem Chargenwechsel ein Testmodul für den Kalibrator verwenden.
4. Die Testmodule in den Chorus Laboranalysator einsetzen. Die Kalibrierung (sofern erforderlich) und den Test gemäß den Anweisungen der Gebrauchsanleitung des Analysators durchführen.

9. TESTVALIDITÄT

Zur Überprüfung der Richtigkeit des Testergebnisses das Kontrollserum verwenden. Es wird gemäß den Anweisungen der Gebrauchsanleitung des Analysators eingesetzt. Wenn der Analysator für das Kontrollserum einen Wert außerhalb des akzeptablen Bereichs anzeigt, muss die Kalibrierung wiederholt werden. Die vorhergehenden Ergebnisse werden dann automatisch korrigiert.

Wenn das Ergebnis des Kontrollserums weiterhin außerhalb des akzeptablen Bereichs liegt, kontaktieren Sie bitte den Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETATION DES TESTS

Der Chorus Laboranalysator liefert ein semiquantitatives Ergebnis in Arbitrary Units (AU/ml). Der Test des untersuchten Serums kann wie folgt interpretiert werden:

POSITIV bei Ergebnis >18 AU/ml
 NEGATIV bei Ergebnis <12 AU/ml
 GRAUZONE: bei Ergebnis zwischen 12 und 18 AU/ml

Den Test wiederholen, wenn das Ergebnis in der Grauzone liegt. Sollte das Ergebnis weiterhin in der Grauzone liegen, die Blutabnahme nach 1–2 Wochen wiederholen.

11. GRENZEN DES TESTS

Die Ergebnisse müssen immer zusammen mit anderen Daten der klinischen Auswertung und anderen diagnostischen Untersuchungen interpretiert werden.

Für eine bessere Beurteilung des Antikörperprofils der Probe ist auch eine Beurteilung der Konzentration der IgM- und IgG-Antikörper empfehlenswert.

Es kann sein, dass Proben, die in der Anfangsphase der Infektion entnommen wurden, noch keine ausreichende Menge an Antikörpern entwickelt haben, um nachweisbar zu sein; bei

einem Ergebnis in der Grauzone oder bei einem negativen Ergebnis wird empfohlen, nach 2–3 Wochen eine weitere Entnahme für eine neue Analyse vorzunehmen, wenn der klinische Verdacht weiterhin besteht.

Vor der Verwendung von lipämischen oder trüben Proben wird empfohlen, diese zu zentrifugieren oder zu filtrieren.

Interpretation der Ergebnisse basierend auf der Kombination des quantitativen Nachweises der IgG-, IgM- und IgA-Antikörper:

M. pneumoniae Antikörpermenge			
IgG	IgM	IgA	Interpretation
negativ	negativ	negativ	kein Hinweis auf eine Infektion
negativ oder positiv	positiv	negativ oder positiv	Hinweis auf eine aktuelle Infektion
positiv	negativ	negativ	Hinweis auf eine frühere Infektion
negativ oder positiv	negativ	positiv	Hinweis auf eine aktuelle Infektion

12. KALIBRIERBEREICH

Kalibrierbereich 0–100.0 AU/ml.

Bei Proben > 100.0 AU/ml den Test wiederholen und die Probe zuvor mit Negative Control/Sample Diluent (PF83607- nicht im Testset enthalten) verdünnen.

13. ANALYTISCHE SPEZIFITÄT

Es wurden 2 Proben (1 Cut-off und 1 negativ) getestet, denen folgende Interferenzen beigelegt wurden:

Bilirubin (15 mg/dl – 60 mg/dl)
 Triglyceride (7,5 mg/ml – 30 mg/ml)
 Hämoglobin (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)
 RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

Die Präsenz der oben genannten Interferenzen im untersuchten Serum hat keinen Einfluss auf das Testergebnis.

14. DIAGNOSTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Bei einem Versuch wurden 102 Proben sowohl mit dem Testset Diese als auch mit einem im Handel erhältlichen Testset analysiert.

In den folgenden Tabellen sind die Versuchsergebnisse aufgeführt:

		Referenz		
		+	-	Insgesamt
Diese	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Insgesamt	20	82	102

Diagnostische Sensitivität: 100.0 % CI_{95%}: 83.9–100.0

Diagnostische Spezifität: 90.2 % CI_{95%}: 81.9–95.0

15. PRÄZISION

PRÄZISION INNERHALB EINES DURCHLAUFS

	Anz. der Parallelproben	Mittelwert t AU/ml	SD	CV %
Probe 1	5	10.0	0.00	0.0
Probe 2	5	20.5	2.47	12.0
Probe 3	4	69.4	3.46	5.0
Probe 4	4	35.7	4.81	13.5

PRÄZISION ZWISCHEN DURCHLÄUFEN

	Mittelwert AU/ml			Mittelwert	SD	CV %
	Tag 1	Tag 2	Tag 3			
Probe 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Probe 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Probe 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Probe 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Probe 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Probe 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. LITERATUR

- G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000), 146, 741-747
- S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol. Rev. 83: 417-432, 2003
- J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40: 165-171
- E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol. Chem. Vol. 369, pp. 1295-1299, December 1988.



ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. ΕΝΔΕΔΙΓΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ανοσοενζυμική μέθοδος για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων IgA έναντι του μυκοπλάσματος της πνευμονίας στον ανθρώπινο ορό, με σερτ μίας χρήσης που χρησιμοποιείται μαζί με τους αναλυτές Chorus και Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

Για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων IgA έναντι του μυκοπλάσματος της πνευμονίας

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μυκόπλασμα της πνευμονίας είναι το πιο κοινό παθογόνο αίτιο πνευμονίας της κοινότητας, ιδιαίτερα στις ηλικίες μεταξύ 5 και 30 ετών· μπορεί να προκαλέσει επιδημίες που εξελίσσονται αργά, καθώς το διάστημα επώασης κυμαίνεται μεταξύ 10 και 14 ημερών και η μετάδοση απαιτεί στενή επαφή ή κλειστές ομάδες (σχολεία, στρατώνες, οικογενειακό περιβάλλον). Η πνευμονία που οφείλεται στο μυκόπλασμα ονομάζεται επίσης άτυπη πρωτοπαθής πνευμονία ή πνευμονία του παράγοντα Eaton.

Το Μ. της πνευμονίας επιτίθεται και καταστρέφει τα κροσσωτά επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου της αναπνευστικής οδού. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση διαπιστώνεται διάμεση πνευμονία, βρογχίτιδα και βρογχιολίτιδα.

Στην περίπτωση της πνευμονίας, με δεδομένη την επανεμφάνιση των συμπτωμάτων για διάφορους αιτιολογικούς παράγοντες, καθίσταται απαραίτητο να υπάρχουν συμπληρωματικά διαγνωστικά μέσα, όπως είναι οι ορολογικές δοκιμασίες, ώστε να διαγιγνώσκεται η οξεία λοίμωξη.

Η ανοσολογική απόκριση στη λοίμωξη από το μυκόπλασμα της πνευμονίας εξαρτάται από τον τύπο της λοίμωξης: τα αντισώματα τάξης IgM εμφανίζονται πιο συχνά σε περιπτώσεις πρωτοπαθούς λοίμωξης, όπως αποδεικνύει η συχνότητα ανίχνευσής τους σε νεότερους ασθενείς. Σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας, όπου η πιθανότητα επαναλοίμωξης είναι μεγαλύτερη, τα αντισώματα IgM είναι χαμηλά ή δεν ανιχνεύονται· αντιθέτως, τα αντισώματα IgA είναι ο δείκτης με τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε περιπτώσεις τρέχουσας λοίμωξης, επαναλοίμωξης ή πρόσφατης λοίμωξης.

Τα ειδικά αντισώματα τάξης A εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης και φθάνουν σε υψηλούς τίτλους τις

πρώτες 4 εβδομάδες. Στη συνέχεια, ελαττώνονται ταχέως, ταχύτερα από τα IgG, γεγονός που επιτρέπει τη διάγνωση της οξείας λοίμωξης ακόμα και με ένα μόνο δείγμα. Τα IgG εμφανίζονται μετά από τα IgM και τα IgA και, κατά κανόνα, φθάνουν στα μέγιστα επίπεδα την 5η εβδομάδα της λοίμωξης. Υψηλός τίτλος, που συνοδεύεται από σημαντική αύξηση μεταξύ δύο δειγματοληψιών που απέχουν περίπου 2 εβδομάδες μεταξύ τους, επιβεβαιώνει τρέχουσα λοίμωξη.

Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται στη δοκιμασία για τον ανοσολογικό προσδιορισμό των ειδικών αντισωμάτων IgA προέρχεται από εκχύλιση της μεμβράνης του Μ. της πνευμονίας και περιέχει σημαντικές ποσότητες προσκολλητίνης P1. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία αποτελεί το ανοσοκυρίαρχο αντιγόνο και είναι η κύρια υπεύθυνη για την προσκόλληση του Μ. της πνευμονίας στο αναπνευστικό επιθήλιο του ξενιστή.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμασία βασίζεται στην έμμεση ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Το αντιγόνο, που αποτελείται από εκχύλισμα αδρανοποιημένου μυκοπλάσματος της πνευμονίας, δεσμεύεται στη στερεά φάση. Κατόπιν επώασης με το δείγμα ανθρώπινου ορού, τα ειδικά αντισώματα IgA συνδέονται με το αντιγόνο. Αφού πραγματοποιηθούν εκπλύσεις για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν αντέδρασαν, γίνεται επώαση με το συζυγές που αποτελείται από μονόκλωνα αντισώματα έναντι ανθρώπινων IgA συζευγμένων με υπεροξειδάση αγριοραφανίδων.

Απομακρύνεται το συζυγές που δεν αντέδρασε και προστίθεται το υπόστρωμα για την υπεροξειδάση.

Το κυανό χρώμα που σχηματίζεται είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων που υπάρχουν στο δείγμα του ορού.

Τα σερτ μίας χρήσης περιέχουν όλα τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για να εκτελεστεί η δοκιμασία στους αναλυτές Chorus.

4. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO*.

Αυτό το κιτ περιέχει υλικά ανθρώπινης προέλευσης που έχουν περάσει από τεστ και έχουν βρεθεί αρνητικά σε εγκεκριμένα από την FDA τεστ, τόσο όσον αφορά την ανίχνευση του HbsAg όσο και για τα αντισώματα αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV. Επειδή κανένα διαγνωστικό τεστ δεν προσφέρει απόλυτη εγγύηση απουσίας μολυσματικών παραγόντων, κάθε υλικό ανθρώπινης προέλευσης πρέπει να θεωρείται ως δυνητικά μολυσματικό. Χρησιμοποιείτε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα παίρνοντας όλες τις προφυλάξεις που προβλέπονται από τους κανονισμούς ασφαλείας του εργαστηρίου.

Διάθεση αποβλήτων: τα δείγματα ορού, οι βαθμονομητές και οι ταινίες που χρησιμοποιούνται πρέπει να επεξεργάζονται ως μολυσματικά απόβλητα και στη

συνέχεια να διατίθενται σύμφωνα με τις διατάξεις των ισχυόντων νόμων.

Οδηγίες για την προσωπική σας ασφάλεια

1. Μην κάνετε αναρρόφηση με το στόμα.
2. Χρησιμοποιείτε γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά όταν χειρίζεστε τα δείγματα και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.
3. Πλένετε πολύ καλά τα χέρια σας μόλις τελειώσετε το τεστ.
4. Η περιεκτικότητα των παρακάτω αντιδραστηρίων σε βλαβερές ή ερεθιστικές ουσίες, είναι χαμηλή:
 - a) το συζυγές και τα αντιδραστήρια ελέγχου περιέχουν φαινόλη
 - b) Το υπόστρωμα είναι όξινο
 Αν ένα αντιδραστήριο έρθει σε επαφή με το δέρμα ή με τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό.
5. Εξουδετερωμένα οξέα και άλλα υγρά απόβλητα πρέπει να απολυμαίνονται προσθέτοντας υποχλωριώδες νάτριο, τόσο όσο χρειάζεται ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι τουλάχιστον 1%. Μια έκθεση σε υποχλωριώδες νάτριο στο 1% για 30 λεπτά, υπό κανονικές συνθήκες είναι αρκετή για να υπάρξει μία αποτελεσματική απολύμανση.
6. Χυμένα υγρά, δυνητικά μολυσματικά, πρέπει να καθαρίζονται αμέσως με απορροφητικό χαρτί και η ζώνη που έχει μολυνθεί θα πρέπει να απολυμαίνεται, για παράδειγμα με υποχλωριώδες νάτριο 1%, πριν να συνεχίσετε την εργασία. Παρουσία οξέος, το υποχλωριώδες νάτριο δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πριν να στεγνώσει η ζώνη. Όλα τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν για να καθαριστούν τυχόν χυμένα υγρά, πρέπει να απορρίπτονται ως δυνητικά μολυσματικά απόβλητα. Μην βάζετε στον κλίβανο υλικά που περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο.

Αναλυτικές οδηγίες

Πριν από την χρήση φέρτε τα σετ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (18-30°C) και χρησιμοποιήστε τα μέσα σε 60 λεπτά.

1. **Απορρίψτε τις ταινίες όπου το υπόστρωμα (θέση 4) έχει γίνει μπλε.**
2. Αφού ρίξετε το δείγμα στην κυψελίδα, ελέγξτε αν έχει κατανεμηθεί ομοιόμορφα στον πυθμένα.
3. Ελέγξτε αν υπάρχουν στο σετ όλα τα αντιδραστήρια και αν το σετ είναι άθικτο. Μην χρησιμοποιήσετε εκείνα τα σετ που, μετά από έναν οπτικό έλεγχο, παρουσιάζουν έλλειψη κάποιου αντιδραστηρίου.
4. Τα σετ πρέπει να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά με την συσκευή Chorus, ακολουθώντας σχολαστικά τις Οδηγίες Χρήσης και το Εγχειρίδιο του οργάνου.
5. Ελέγξτε αν η συσκευή Chorus είναι ρυθμισμένη σωστά (βλ. Εγχειρίδιο Χρήσης του Chorus).
6. Μην αλλοιώνετε με κανένα τρόπο των γραμμωτό κωδικό στη λαβή του σετ, ώστε να μπορεί ο αναγνώστης του γραμμικού κώδικα να τον διαβάσει σωστά.

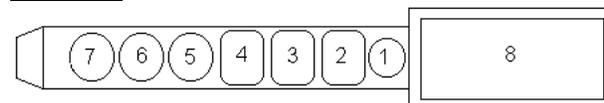
7. Αποφύγετε τη χρήση καταφυκτών αυτόματης απόψυξης για την αποθήκευση των δειγμάτων.
8. Τους γραμμωτούς κωδικούς που δεν διαβάζονται σωστά, μπορείτε να τους περάσετε με το χέρι.
9. Μην εκθέτετε τα σετ σε δυνατό φως ούτε σε υποχλωριώδεις ατμούς κατά τη χρήση ή την αποθήκευσή τους.
10. Τα δείγματα που παρουσιάζουν ισχυρή αιμόλυση, καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν μικροβιακή μόλυση, μπορεί να δώσουν λανθασμένα αποτελέσματα.
11. Πριν τοποθετήσετε το σετ στη συσκευή Chorus βεβαιωθείτε ότι η κυψελίδα αντίδρασης δεν περιέχει ξένα σώματα.
12. Εισάγετε τον ορό που θα αναλυθεί (50 ul) στην κυψελίδα 1 του σετ με σιφώνιο (βλ. εικόνα).
13. Μην χρησιμοποιείτε τα σετ μετά την ημερομηνία λήξης τους.
14. **Βεβαιωθείτε ότι η συσκευή είναι συνδεδεμένη με τον Washing Buffer ΚΩΔ. 83606.**

5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΚΙΤ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Το όλο kit καλύπτει 36 τεστ.

DD ΣΥΣΚΕΥΕΣ 6 πακέτα των 6 σετ το κάθε ένα

Περιγραφή:



Θέση 8: Διαθέσιμος χώρος για ετικέτα γραμμωτού κώδικα

Θέση 7: Κενή

Θέση 6: ΚΥΨΕΛΙΔΑ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΙΔΙΟΥ

Επικαλυμμένη με αντιγόνο του *Mycoplasma pneumoniae*

Θέση 5: ΚΥΨΕΛΙΔΑ

Μη επικαλυμμένη.

Θέση 4: ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ TMB

Περιεχόμενο: τετραμεθυλβενζιδίνη 0.26 mg/mL και H₂O₂ 0.01% σταθεροποιημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0.05 mol/L (pH 3.8)

Θέση 3: ΑΡΑΙΩΤΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Περιεχόμενο: πρωτεϊνικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη 0.05%, Bronidox 0.02% και έναν δείκτη παρουσίας ορού.

Θέση 2: ΣΥΖΥΓΕΣ

Περιεχόμενο: μονόκλωνα αντισώματα έναντι ανθρώπινων IgA σημασμένα με υπεροξειδάση, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει φαινόλη 0.05% και Bronidox 0.02%.

Θέση 1: ΚΕΝΗ ΚΥΨΕΛΙΔΑ

Στην οποία ο χειριστής πρέπει να τοποθετήσει μη αραιωμένο ορό.

Χρήση: Αφήστε να ισορροπήσει μία σακούλα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ανοίξτε τη σακούλα, βγάλτε όσα σετ χρειάζεστε και βάλτε τα υπόλοιπα πίσω στη σακούλα, που περιέχει γέλη πυριτίου, αφαιρέστε τον αέρα και **σφραγίστε την** πιέζοντας το ειδικό σύστημα κλεισίματος. Αποθηκεύστε στους 2/8°C.

CALIBRATOR ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 1 x 0.175 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός γνωστού τίτλου σε αντισώματα με Proclin και Gentamycin, υγρός, έτοιμος για χρήση.

CONTROL + ΘΕΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΛΕΓΧΟΥ 1 x 0.425 mL

Περιεχόμενο: Αραιωμένος ανθρώπινος ορός γνωστού τίτλου σε αντισώματα με Proclin και Gentamycin, υγρός, έτοιμος για χρήση.

ΑΛΛΟ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΟ ΑΛΛΑ ΜΗ ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.

- WASHING BUFFER [REF] 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 [REF] 83609
- SANITIZING SOLUTION [REF] 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT [REF] 83607
- Αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό
- Στάνταρντ υάλινος εξοπλισμός εργαστηρίου: κύλινδροι, δοκιμαστικοί σωλήνες, κ.λ.π.
- Μικροπιπέτες που αναρροφούν με ακρίβεια όγκους 50-200 µL
- Γάντια μίας χρήσης
- Διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5%
- Δοχεία για την απόρριψη των δυνητικά μολυσματικών υλικών.

6. ΤΡΟΠΟΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται στους 2/8°C. Σε περίπτωση που αποθηκεύτηκαν σε λανθασμένη θερμοκρασία, πρέπει να επαναληφθεί η βαθμονόμηση και να ελεγχθεί το αποτέλεσμα με τον ορό ελέγχου (βλ. κεφ. 9: Εγκυρότητα του τεστ).

Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη σε κάθε συστατικό μέρος και πάνω στην εξωτερική ετικέτα της συσκευασίας.

Τα Αντιδραστήρια έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής μετά το άνοιγμα και/ή την προετοιμασία

ΣΕΤ	8 εβδομάδες σε 2/8°C
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ	8 εβδομάδες σε 2/8°C
ΘΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	8 εβδομάδες σε 2/8°C

7. ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Το δείγμα αποτελείται από ορό που έχει συλλεχθεί με φλεβική λήψη και που έχει περάσει από όλες τις διαδικασίες που προβλέπονται από τους βασικούς κανονισμούς του εργαστηρίου. Ο νωπός ορός μπορεί να διατηρηθεί για 4 ημέρες στους 2/8°C. Για μεγαλύτερη χρονική περίοδο καταψύξτε στους -20°C. Το δείγμα μπορεί να αποψυχθεί το πολύ 3 φορές. Αποφεύγετε τη χρήση αυτο-αποψυχόμενων ψυγείων για τη συντήρηση των δειγμάτων. Μετά από την απόψυξη ανακινήστε το καλά πριν το ρίξετε στην κυψελίδα. Η αδρανοποίηση με θερμότητα μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα. Η μικροβιακή μόλυνση μπορεί να επηρεάσει σε

μεγάλο βαθμό την ποιότητα του δείγματος και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα.

Υψηλά λιπαιμικά και ικτερικά δείγματα, καθώς και μολυσμένα δείγματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ανοίξτε την συσκευασία (από την πλευρά του κλείστρου με πίεση), πάρτε όσα σετ χρειάζεστε για την ανάλυση και φυλάξτε τα υπόλοιπα κλείνοντας την σακούλα, αφού πρώτα αφαιρέσετε τον αέρα.
2. Ελέγξτε προσεκτικά την κατάσταση του σετ ακολουθώντας τις υποδείξεις που αναφέρονται στο κεφ. 4 Αναλυτικές Οδηγίες,
3. Ρίξτε στην κυψελίδα 1 καθενός σετ, 50 µL μη αραιωμένο ορό για ανάλυση. Σε κάθε αλλαγή παρτίδας, χρησιμοποιήστε ένα σετ για τον βαθμονομητή.
4. Τοποθετήστε τα σετ στη συσκευή Chorus. Κάνετε την βαθμονόμηση (αν είναι αναγκαίο) και τα τεστ, ακολουθώντας τις οδηγίες του Εγχειριδίου Χρήσης της συσκευής.

9. ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΤΕΣΤ

Χρησιμοποιήστε τον ορό ελέγχου για να εξακριβώσετε την ακρίβεια του ληφθέντος αποτελέσματος, ακολουθώντας τις οδηγίες του εγχειριδίου χρήσης της συσκευής. Αν η συσκευή επισημάνει ό,τι ο ορός ελέγχου έχει τιμή έξω από το όριο ανεκτής διακυμάνσεως, πρέπει να κάνετε και πάλι την βαθμονόμηση. Τα προηγούμενα αποτελέσματα θα διορθωθούν αυτόματα.

Αν το αποτέλεσμα του ορού ελέγχου εξακολουθεί να βρίσκεται εκτός των αποδεκτών ορίων, επικοινωνήστε με το Τμήμα Επιστημονικής Υποστήριξης.

Τηλ.: 0039 0577 319554
 Φαξ: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ο αναλυτής Chorus δίνει το αποτέλεσμα του ημιποσοτικού προσδιορισμού σε αυθαίρετες μονάδες (AU/ml).

Τα αποτελέσματα ανάλυσης των δειγμάτων ορού μπορούν να ερμηνευθούν ως εξής:

ΘΕΤΙΚΟ όταν το αποτέλεσμα είναι > 18 AU/ml
 ΑΡΝΗΤΙΚΟ όταν το αποτέλεσμα είναι < 12 AU/ml
 ΑΜΦΙΒΟΛΟ: όταν το αποτέλεσμα βρίσκεται μεταξύ 12 και 18 AU/ml

Αν το αποτέλεσμα είναι αμφίβολο, επαναλάβετε τη δοκιμασία. Αν το αποτέλεσμα παραμένει αμφίβολο, επαναλάβετε τη δειγματοληψία μετά από 1-2 εβδομάδες.

11. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα πρέπει πάντα να αξιολογούνται σε συνδυασμό με συμπληρωματικά δεδομένα που προέρχονται από την κλινική αξιολόγηση και άλλες διαγνωστικές εξετάσεις.

Για να αξιολογηθεί καλύτερα το ανοσολογικό προφίλ του δείγματος, είναι σκόπιμο να εκτιμηθεί επίσης η συγκέντρωση των αντισωμάτων IgM και IgG.

Στα δείγματα που λαμβάνονται στο αρχικό στάδιο της λοίμωξης μπορεί να μην έχει ακόμα αναπτυχθεί επαρκής ποσότητα αντισωμάτων, η οποία να είναι ανιχνεύσιμη. Εάν το αποτέλεσμα είναι αμφίβολο ή αρνητικό, συνιστάται να λαμβάνετε δεύτερο δείγμα μετά από 2-3 εβδομάδες και να επαναλαμβάνετε την ανάλυση, εάν επιμένουν τα ύποπτα κλινικά συμπτώματα.

Πριν από την ανάλυση λιπαιμικών ή θολερών δειγμάτων, συνιστάται φυγοκέντριση ή διήθηση.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση το συνδυασμό των επιπέδων αντισωμάτων IgG, IgM και IgA:

Επίπεδο αντισωμάτων M. της πνευμονίας			
IgG	IgM	IgA	Ερμηνεία
αρνητικό	αρνητικό	αρνητικό	καμία ένδειξη λοίμωξης
αρνητικό ή θετικό	θετικό	αρνητικό ή θετικό	ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης
θετικό	αρνητικό	αρνητικό	ένδειξη προηγούμενης λοίμωξης
αρνητικό ή θετικό	αρνητικό	θετικό	ένδειξη τρέχουσας λοίμωξης

12. ΕΥΡΟΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Εύρος Βαθμονόμησης 0-100.0 AU/ml.

Για δείγματα >100.0 AU/ml επαναλάβετε το τεστ, αραιώνοντας πρώτα το δείγμα σε Negative Control/Sample Diluent (Αρνητικό Έλεγχο/Δείγμα Διαλύτη) (PF83607- δεν παρέχεται με το kit).

13. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Υποβλήθηκαν σε δοκιμασία 2 δείγματα (1 στην τιμή αποκοπής και 1 αρνητικό), στα οποία προστέθηκαν οι ακόλουθες ουσίες παρεμβολής:

Χολερουθρίνη (15 mg/dl – 60mg/dl)
 Τριγλυκερίδια (7.5 mg/ml – 30 mg/ml)
 Αιμοσφαιρίνη (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)
 Ρευματοειδής παράγων (30 IU/ml – 150 IU/ml)

Η παρουσία των ανωτέρω ουσιών παρεμβολής στον εξεταζόμενο ορό δεν μεταβάλλει το αποτέλεσμα της δοκιμασίας προσδιορισμού.

14. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Διενεργήθηκε μελέτη στο πλαίσιο της οποίας αναλύθηκαν 102 δείγματα με το kit Diesse και με άλλο kit του εμπορίου.

Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα της μελέτης:

		Αναφορά		
		+	-	Σύνολο
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Σύνολο	20	82	102

Διαγνωστική ευαισθησία: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 – 100.0

Διαγνωστική ειδικότητα: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 – 95.0

15. ΑΚΡΙΒΕΙΑ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΕΝΤΟΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

	Αριθμός επαναλήψεων	Μέση Τ. AU/ml	D.S.	CV%
Δείγμα 1	5	10.0	0.00	0.0
Δείγμα 2	5	20.5	2.47	12.0
Δείγμα 3	4	69.4	3.46	5.0
Δείγμα 4	4	35.7	4.81	13.5

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΚΥΚΛΩΝ

	Μέση Τ. AU/ml			Μέση Τ.	Σταθ. Απόκ.	CV%
	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3			
Δείγμα 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Δείγμα 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Δείγμα 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Δείγμα 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Δείγμα 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Δείγμα 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000),146,741-747
- S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
- J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
- E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



INSTRUCCIONES DE USO

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. INDICACIONES

Método inmunoenzimático para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgA anti mycoplasma pneumoniae en suero humano mediante dispositivo desechable aplicado a los equipos Chorus y Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Para la determinación semicuantitativa de anticuerpos IgA anti mycoplasma pneumoniae

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

2. INTRODUCCIÓN

Mycoplasma pneumoniae es el agente etiológico más común de neumonía que se adquiere en la comunidad, especialmente en la edad comprendida entre 5 y 30 años; puede ser responsable de epidemias que se desarrollan lentamente ya que el período de incubación varía de 10 a 14 días y el contagio se realiza con contactos cercanos o grupos segregados (escuelas, cuarteles, núcleos familiares). La neumonía causada por mycoplasma se llama también neumonía atípica primaria o neumonía del agente de Eaton.

M. pneumoniae ataca y destruye las células epiteliales ciliadas de la mucosa de las vías aéreas. Microscópicamente causa neumonía intersticial, bronquitis y bronquiolitis.

En los casos de neumonía, dada la recurrencia de los síntomas por los varios agentes etiológicos, para diagnosticar infecciones agudas es necesario utilizar medios diagnósticos adicionales como las pruebas serológicas.

La respuesta inmunitaria después de una infección causada por mycoplasma pneumoniae resulta estar ligada al mismo tipo de infección: los anticuerpos de clase IgM están presentes de forma más frecuente en los casos de infección primaria como demuestra el hecho de que se encuentran en los pacientes más jóvenes. En los pacientes más adultos y con una mayor probabilidad de reinfección, las IgM son bajas o no se encuentran, en cambio, las IgA resultan ser el marcador de mayor sensibilidad en las infecciones en curso, en las reinfecciones o en las infecciones recientes.

Los anticuerpos específicos de clase A aparecen de manera precoz, cuando comienza la enfermedad y llegan a títulos elevados en las primeras 4 semanas, después decaen repentinamente antes de las IgG, permitiendo el diagnóstico de infección aguda incluso con una sola extracción. Las IgG aparecen después de las IgM y las IgA, en promedio llegan al

pico máximo en la 5ª semana. Un título alto, acompañado por un aumento significativo entre las dos extracciones a un intervalo de unas 2 semanas permite confirmar la presencia de una infección en curso.

El antígeno que se utiliza en la prueba para la determinación serológica de las IgA específicas, deriva de un extracto de membrana de M. pneumoniae que contiene cantidades significativas de citoadesina P1 que representa el origen del antígeno inmunodominante y que corresponde a una proteína transmembrana, que es la principal responsable de la citoaderencia de mycoplasma pneumoniae en el epitelio respiratorio del huésped.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba está basada en el método ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indirecto.

El antígeno, constituido por un extracto de mycoplasma pneumoniae inactivado, está unido a la fase sólida. Las IgA específicas se unen al antígeno por incubación del suero humano en examen.

Tras varios lavados destinados a eliminar las proteínas que no han reaccionado, se realiza la incubación con el conjugado compuesto por anticuerpos monoclonales anti IgA humanas unidas con peroxidasa de rábano.

El conjugado que no se ha unido se elimina y se añade el sustrato para peroxidasa.

El color azul que se produce es según la proporción de la concentración de anticuerpos específicos presentes en el suero en examen.

Los productos desechables contienen todos los reactivos para realizar la prueba cuando se utilizan con los equipos Chorus.

4. PRECAUCIONES

PARA USO EXCLUSIVO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Este kit contiene materiales de origen humano que han sido testados y dieron resultados negativos en métodos aprobados por la FDA para la presencia de HbsAg y de los anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-HCV. Dado que ninguna prueba diagnóstica puede ofrecer una completa garantía sobre la ausencia de agentes infecciosos, cualquier material de origen humano debe ser considerado potencialmente infeccioso. Todos los materiales de origen humano deben manipularse según las normas comúnmente adoptadas en la práctica diaria de laboratorio.

Desecho de los residuos: las muestras de suero, los calibradores y las tiras utilizadas se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos, de acuerdo con las disposiciones normativas vigentes.

Informaciones de Salud y Seguridad:

1. No pipetear por vía oral.
2. Usar los guantes desechables y la protección para los ojos al manipular las muestras y durante la prueba.

3. Lavar las manos a fondo después de terminar la prueba.
4. Los reactivos siguientes contienen baja concentración de sustancias dañinas o irritantes:
 - a) El conjugado y los controles contienen fenol
 - b) El sustrato es ácido
 Si cualquier reactivo entrara en contacto con la piel u ojos, lavar con agua abundante
5. Los ácidos neutralizados y otros residuos líquidos se deben desinfectar añadiendo hipoclorito de sodio en un volumen suficiente para obtener una concentración final por lo menos del 1,0%. Se requiere una exposición al hipoclorito de sodio al 1% durante 30 minutos para garantizar una desinfección eficaz.
6. El vertido de materiales potencialmente infecciosos se debe eliminar inmediatamente con papel absorbente y el área contaminada debe ser limpiada, por ejemplo con hipoclorito de sodio al 1,0%, antes de continuar con el trabajo. El hipoclorito de sodio no se debe utilizar en vertidos que contengan ácido antes de que la zona sea limpiada. Todos los materiales utilizados para limpiar vertidos, incluidos los guantes, se deben desechar como residuos potencialmente infecciosos. No autoclavar materiales que contengan hipoclorito de sodio.

Precauciones analíticas

Poner todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (18-30°C) antes de su uso; utilizar en 60 minutos.

1. **Desechar los dispositivos con sustrato (pocillo 4) de color azul.**
2. Añadiendo la muestra al pocillo, comprobar que esté bien distribuida en el fondo.
3. Comprobar la presencia de los reactivos en el dispositivo y que éste no esté dañado, no utilizar dispositivos en los que falte algún reactivo.
4. Los dispositivos se deben utilizar junto con el equipo Chorus, siguiendo rigurosamente las Instrucciones de Uso y el Manual del Usuario.
5. Comprobar que las opciones del equipo Chorus sean correctas (ver Manual del Usuario Chorus).
6. No modificar el código de barras colocado en la asa del dispositivo a fin de garantizar la lectura correcta.
7. Evitar el uso de congeladores autodescongelantes para la conservación de las muestras.
8. Los códigos de barras dañados se pueden colocar en el equipo manualmente.
9. No exponer los dispositivos a luz intensa ni a humos de hipoclorito durante su conservación y/o uso.
10. El uso de muestras altamente hemolizadas, o que presenten contaminación microbiana puede ser fuente de error.
11. Antes de colocar el dispositivo en el equipo Chorus comprobar que el pocillo de reacción no contenga partículas extrañas.
12. Pipetear el suero (50 µl) en el pocillo 1 del dispositivo (ver dibujo).

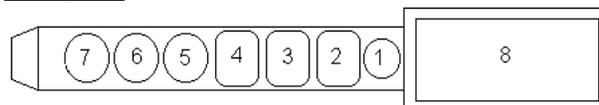
13. No utilizar el suero después de la fecha de caducidad.
14. **Comprobar que el aparato esté conectado con la Washing Buffer REF 83606.**

5. COMPONENTES DEL KIT Y PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Reactivos suficientes para 36 determinaciones.

DD DISPOSITIVOS 6 envases con 6 dispositivos cada uno

Descripción:



Posición 8: Espacio para etiquetas con código de barras

Posición 7: libre

Posición 6: POCILLO DE MICROPLACA

Sensibilizado con antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*

Posición 5: POCILLO

No sensibilizado.

Posición 4: SUSTRATO TMB

Contenido: Tetrametilbencidina 0.26 mg/mL y H₂O₂ 0.01% estabilizados en tampón citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posición 3: DILUYENTE PARA MUESTRAS

Contenido: Solución proteica con fenol al 0.05%, Bronidox al 0.02% y un indicador para detectar la presencia de suero.

Posición 2: CONJUGADO

Contenido: anticuerpos monoclonales anti-IgA humanas marcados con peroxidasa; en solución tampón de fosfato con fenol al 0.05% y Bronidox al 0.02%.

Posición 1: POCILLO LIBRE

Donde el usuario coloca el suero sin diluir.

Uso: equilibrar un envase a temperatura ambiente, abrir el envase y retirar los dispositivos necesarios; colocar los dispositivos no utilizados en la bolsa de plástico con el gel de sílice, extraer el aire y **cerrar** presionando el cierre. Conservar a 2/8°C.

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.175 ml

Contenido: Suero humano diluido a titulación conocida de anticuerpos con Proclin y Gentamicin. Líquido, listo para su uso.

CONTROL + CONTROL POSITIVO 1 x 0.425 ml

Contenido: Suero humano diluido a titulación conocida de anticuerpos con Proclin y Gentamicin. Líquido, listo para su uso.

MATERIALES REQUERIDOS NO SUMINISTRADOS.

- WASHING BUFFER **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **REF** 83607

- Agua destilada o desionizada
- Material de laboratorio: cubetas, tubos de ensayo, etc.
- Micropipetas de precisión para extraer 50-200 µl
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (5%)
- Envases para la recogida de materiales potencialmente infecciosos

6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Los reactivos deben ser conservados a 2/8°C. En caso de una errónea temperatura de conservación, la calibración debe ser repetida y la validez del resultado debe ser verificada por medio del suero de control (ver capítulo 9, Validación de la prueba)

La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes y en la etiqueta exterior de la caja.

Los reactivos tienen una estabilidad limitada después de la apertura y/o preparación.

DISPOSITIVOS	8 semanas a 2/8°C
CALIBRADOR	8 semanas a 2/8°C
CONTROL POSITIVO	8 semanas a 2/8°C

7. TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

La muestra consta de suero extraído de la vena de forma común y debe manipularse siguiendo las precauciones dictadas por la buena práctica de laboratorio. El suero fresco se puede conservar a 2/8°C durante 4 días; para conservaciones más largas congelar a -20°C. La muestra se puede descongelar hasta un máximo de 3 veces. No deben ser utilizados congeladores autodescongelantes para la conservación de la muestra. Después de descongelar, agitar con cuidado antes de su uso. La inactivación térmica puede dar resultados erróneos. La calidad de la muestra puede verse seriamente afectada por la contaminación microbiana que conduce a resultados erróneos.

No utilizar muestras muy lipémicas, ictericas o contaminadas.

8. PROCEDIMIENTO

1. Abrir el envase (por el lado del cierre a presión), retirar los dispositivos necesarios para ejecutar las pruebas y conservar los otros en el envase, extraer el aire y cerrar presionando el cierre.
2. Comprobar visualmente el estado del dispositivo según las indicaciones del capítulo 4 Precauciones Analíticas.
3. Dispensar 50 µl de suero no diluido en el pocillo n°1 de cada dispositivo, por cada cambio de lote utilizar un dispositivo para el calibrador.
4. Colocar los dispositivos en el equipo Chorus. Ejecutar la calibración (si fuera necesario) y el test según indicaciones del Manual del Usuario Chorus.

9. VALIDACIÓN DE LA PRUEBA

Utilizar el suero de control para verificar la validez del resultado obtenido, procesándolo según indicaciones del Manual del Usuario del equipo. Si el equipo indica que el suero de control tiene un valor fuera de los límites de aceptabilidad, es

necesario realizar de nuevo la calibración. Los resultados previos se corregirán automáticamente.

Si el resultado del suero de control continúa estando fuera del rango de aceptabilidad, contactar con Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
 Fax: 0039 0577 366605
 email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

El instrumento Chorus proporciona un resultado semicuantitativo en unidades arbitrarias (AU/ml).

La prueba del suero puede interpretarse de la siguiente manera:

POSITIVO cuando el resultado es > 18 AU/ml

NEGATIVO cuando el resultado es < 12 AU/ml

DUDOSO: cuando el resultado está comprendido entre 12 y 18 AU/ml

En caso de resultado dudoso se aconseja repetir la prueba. Si el resultado sigue siendo dudoso, repetir la extracción después de 1-2 semanas.

11. LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los resultados deben interpretarse junto con los demás datos que provienen de la evaluación clínica y de otros exámenes diagnósticos.

Para una mejor evaluación del perfil de los anticuerpos de la muestra sería indicado evaluar también la concentración de IgM y de IgG

Es posible que las muestras que se han tomado en la fase inicial de la infección no hubiesen aún desarrollado una suficiente cantidad de anticuerpos para que puedan ser detectables; si el resultado fuera dudoso o negativo se recomienda repetir la extracción después de 2-3 semanas y realizar un nuevo análisis si existen aún sospechas clínicas.

Antes de utilizar muestras lipémicas, o turbias, se aconseja llevar a cabo una centrifugación o filtración.

Interpretación de los resultados sobre la base de la combinación de la dosificación de anticuerpos IgG, IgM e IgA:

Nivel de anticuerpos de <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	Interpretación
negativo	negativo	negativo	ninguna indicación de infección
negativo o positivo	positivo	negativo o positivo	indicación de infección actual
positivo	negativo	negativo	indicación de infección contraída en el pasado
negativo o positivo	negativo	positivo	indicación de infección actual

12. RANGO DE CALIBRACIÓN

Rango de calibración 0-100.0 AU/ml.

Para muestras > 100.0 AU/ml repetir la prueba y prediluir la muestra en Negative Control/Sample Diluent (PF83607 – no suministrado con el kit).

13. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Fueron analizadas 2 muestras (1 cut-off y 1 negativa) a las que se añadieron los siguientes interferentes:

Bilirrubina (15 mg/dl – 60mg/dl)

Triglicéridos (7.5 mg/ml – 30 mg/ml)

Hemoglobina (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)

RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

La presencia de las mencionadas sustancias interferentes en el suero no altera el resultado de la prueba.

14. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

En una prueba se analizaron 102 muestras con el kit Diesse y con otro kit comercial.

A continuación se indican los resultados de la prueba:

		Referencia		
		+	-	Total
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Total	20	82	102

Sensibilidad de Diagnóstico: 100.0 % $CI_{95\%}$: 83.9 – 100.0

Especificidad de Diagnóstico: 90.2 % $CI_{95\%}$: 81.9 – 95.0

15. REPRODUCIBILIDAD

REPRODUCIBILIDAD INTRA-ENSAYO

	Número de réplicas	Media AU/ml	Desv. Est.	CV%
Muestra 1	5	10.0	0.00	0.0
Muestra 2	5	20.5	2.47	12.0
Muestra 3	4	69.4	3.46	5.0
Muestra 4	4	35.7	4.81	13.5

REPRODUCIBILIDAD ENTRE ENSAYOS

	Media AU/ml			Media	Desv. Est.	CV%
	Día 1	Día 2	Día 3			
Muestra 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Muestra 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Muestra 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Muestra 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Muestra 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Muestra 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAFÍA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).

2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology (2000), 146, 741-747
3. S. Rotten: Interaction of *Mycoplasma* With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of *Mycoplasma pneumoniae* by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



INSTRUCTIONS POUR L'UTILISATION

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1.UTILISATION

Méthode immuno-enzymatique pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgA anti Mycoplasma pneumoniae dans le sérum humain grâce à un dispositif à usage unique appliqué sur les appareils Chorus e Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Pour la détermination semi-quantitative des anticorps IgA anti Mycoplasma pneumoniae

Uniquement pour un usage diagnostique *in vitro*

2. INTRODUCTION

Le Mycoplasma pneumoniae est l'agent étiologique de la pneumonie communautaire acquise le plus fréquent, notamment dans la tranche d'âge comprise entre 5 et 30 ans ; il peut être à l'origine d'épidémies qui se développent lentement, dans la mesure où le temps d'incubation varie de 10 à 14 jours et où la contagion suppose des contacts rapprochés ou la présence de groupes isolés (écoles, casernes, foyers familiaux). La pneumonie à mycoplasme est également dénommée pneumonie atypique primaire ou pneumonie à agent d'Eaton.

Le M. pneumoniae attaque et détruit les cellules épithéliales ciliées de la muqueuse respiratoire. L'examen au microscope met en évidence des pneumopathies interstitielles, des bronchites et des bronchiolites.

Dans les cas de pneumonie, au vu de la récurrence des symptômes pour différents agents étiologiques, des dispositifs de diagnostic supplémentaires comme les tests sérologiques sont nécessaires au diagnostic d'une infection aiguë.

À la suite d'une infection à Mycoplasma pneumoniae, la réponse immunitaire est liée au type même de l'infection : les anticorps de classe IgM sont plus fréquents dans les cas d'infection primaire, comme le prouve leur incidence chez les adolescents et les jeunes adultes. Chez les patients adultes et qui présentent un risque de réinfection supérieur, les IgM sont faibles ou non décelables ; en revanche, les IgA constituent le marqueur le plus sensible dans les infections en cours, les réinfections ou les infections récentes.

Les anticorps spécifiques de classe A apparaissent de manière précoce, au début de la maladie, et ils atteignent des titres élevés au cours des 4 premières semaines, avant de retomber subitement avant les IgG, ce qui permet de poser un diagnostic

d'infection aiguë grâce à un seul prélèvement. Les IgG apparaissent après les IgM et les IgA, pour atteindre en moyenne le pic maximum au cours de la 5ème semaine. Un titre élevé, accompagné d'une augmentation significative entre deux prélèvements effectués à distance de 2 semaines environ, permet de confirmer la présence d'une infection en cours.

L'antigène utilisé dans le test pour la détermination sérologique des IgA spécifiques dérive d'un extrait de membrane de M. pneumoniae contenant des quantités significatives de cytoadhésine P1 qui représente l'antigène immunodominant et correspondant à une protéine transmembranaire, principal responsable de la cytoadhérence du M. pneumoniae à l'épithélium respiratoire de l'hôte.

3. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test repose sur la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ou « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) indirecte.

L'antigène, constitué d'un extrait de Mycoplasma pneumoniae inactivé, est lié à la phase solide. Les IgA spécifiques à l'antigène sous effet de l'incubation du sérum humain.

Après lavage visant à éliminer les protéines qui n'ont pas réagi, on effectue l'incubation avec le conjugué constitué d'anticorps monoclonaux anti-IgA humains conjugués à de la peroxydase de raifort.

Le conjugué non lié est éliminé et le substrat de la peroxydase est ajouté.

La coloration bleue qui se développe est proportionnelle à la concentration des anticorps spécifiques présents dans le sérum examiné.

Les dispositifs à usage unique contiennent tous les réactifs nécessaires à l'exécution du test lorsqu'ils appliqués sur les appareils Chorus.

4. PRÉCAUTIONS

UNIQUEMENT POUR DIAGNOSTIC *IN VITRO*.

Ce kit contient des matériaux d'origine humaine qui ont été contrôlés et trouvés négatifs à la suite de l'exécution de tests approuvés par la FDA, tant pour le recherche de HbsAg que pour celles des anticorps anti-VIH-1/VIH-2 et anti-VHC. Étant donné qu'aucun test diagnostique ne peut offrir une garantie absolue quant à l'absence d'agents infectieux, tout matériel d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infecté. Tous les réactifs et échantillons doivent être manipulés conformément aux normes de sécurité normalement adoptées en laboratoire.

Élimination des déchets : les échantillons de sérum, les calibreurs et les bandelettes utilisés doivent être traités comme étant des déchets infectés. Ils doivent donc être éliminés conformément aux lois en vigueur.

Avertissements pour la sécurité personnelle

1. Ne pas pipeter avec la bouche.

2. Utiliser des gants jetables et des lunettes de protection lors de la manipulation des échantillons.
3. Se laver soigneusement les mains une fois inséré les dispositifs dans le Chorus.
4. Les réactifs suivants contiennent de faibles concentrations en substances dangereuses ou irritantes :
 - e) Le conjugué contient du phénol
 - f) Le substrat est acide.
 Si un réactif entre en contact avec la peau ou avec les yeux, les laver à grande eau.
5. Les acides neutralisés et les déchets liquides doivent être désinfectés en ajoutant un volume suffisant de solution d'hypochlorite de sodium afin d'obtenir une concentration finale de 1 % au minimum. Une exposition de 30 minutes avec cette solution devrait être suffisante pour garantir une désinfection efficace.
6. En cas de renversement accidentel de matériaux potentiellement infectés, essuyer immédiatement avec du papier absorbant ; la zone souillée devra être désinfectée avec, par exemple, de l'hypochlorite de sodium (1 %), avant de continuer le travail. En présence d'un acide, veiller à bien essuyer le plan de travail avant d'utiliser de l'hypochlorite de sodium. Tous les matériels (notamment les gants) utilisés pour désinfecter les zones souillées par d'éventuels renversements accidentels, doivent être considérés comme potentiellement infectés et éliminés. Ne pas autoclaver de matériaux contenant de l'hypochlorite de sodium.

Précautions analytiques

Avant usage, laisser les dispositifs à utiliser à température ambiante (+18-30 °C) et utiliser dans les 60 minutes.

1. **Éliminer les dispositifs avec le substrat (puits 4) coloré de bleu.**
2. En ajoutant l'échantillon dans les puits, s'assurer qu'il est parfaitement distribué sur le fond.
3. Contrôler la présence effective des réactifs dans le dispositif et l'intégrité du dispositif. Ne pas utiliser des dispositifs qui, au contrôle visuel, présentent l'absence d'un réactif.
4. Les dispositifs doivent être utilisés avec l'instrument Chorus, en suivant scrupuleusement les instructions pour l'emploi et le manuel de l'utilisateur de l'instrument.
5. S'assurer que l'instrument Chorus soit réglé comme il se doit (voir le manuel de l'utilisateur).
6. Ne pas altérer le code à barres situé sur la poignée du dispositif à fin de permettre une correcte lecture de la part de l'instrument.
7. Éviter l'utilisation de congélateurs auto-dégivrants pour conserver les échantillons.
8. Les codes à barres défectueux peuvent être insérés manuellement dans l'instrument.
9. Ne pas exposer les dispositifs à une forte illumination ni aux vapeurs d'hypochlorite pendant la conservation et l'utilisation.

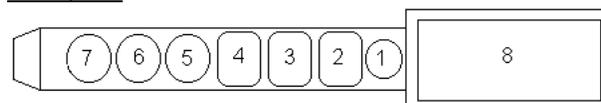
10. Les échantillons fortement hémolysés, ou les échantillons présentant une contamination microbienne peuvent engendrer des résultats erronés.
11. Avant d'insérer le dispositif dans l'instrument Chorus, s'assurer que le puits de réaction ne contient pas de corps étrangers.
12. Pipeter le sérum examiné (50 µl) dans le puits 1 du dispositif (voir la figure).
13. Ne pas utiliser le dispositif après la date de péremption.
14. **Contrôler que l'instrument soit connecté au Washing Buffer REF 83606.**

5. COMPOSITION DU KIT ET PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Le kit est suffisant pour réaliser 36 déterminations.

DD DISPOSITIFS 6 confections contenant 6 dispositifs chacune

Description:



Position 8 : Place disponible pour l'étiquette avec le code à barres

Position 7 : Vide

Position 6 : PUIT DE LA MICROPLAQUE

Recouvert avec de l'antigène de *Mycoplasma pneumoniae*

Position 5 : PUIITS

Non recouvert.

Position 4 : SUBSTRAT TMB

Contenu : Tétraméthylbenzidine 0.26 mg/mL et H₂O₂ 0.01 % stabilisée en tampon citrate 0.05 mol/L (pH 3.8)

Position 3 : DILUANT POUR ÉCHANTILLON

Contenu : solution protéique additionnée de 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox et un indicateur pour révéler la présence du sérum.

Position 2 : CONJUGUÉ

Contenu : anticorps monoclonaux anti-IgA humaines marqués à la peroxydase en tampon phosphate contenant 0.05 % de phénol et 0.02 % de bronidox.

Position 1 : PUIT VIDE

L'utilisateur doit y mettre le sérum non dilué.

Emploi : équilibrer un sachet à température ambiante,

ouvrir le sachet, prélever les dispositifs nécessaires, et replacer ceux non utilisées dans le sachet en plastique avec du gel de silice; chasser l'air et **fermer** le sachet par pression sur la fermeture. Conserver à 2-8°C.

CALIBRATOR CALIBRATEUR 1 x 0.175 mL

Contenu : Sérum humain dilué, à une concentration connue d'anticorps, contenant du Proclin et de la Gentamycine, liquide prêt à l'emploi.

CONTROL + CONTRÔLE POSITIF 1 x 0.425 mL

Contenu : Sérum humain dilué, à une concentration connue d'anticorps, contenant du Proclin et de la Gentamycine. Liquide, prêt à l'emploi.

AUTRE MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- WASHING BUFFER [REF] 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 [REF] 83609
- SANITIZING SOLUTION [REF] 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT [REF] 83607
- Eau distillée ou désionisée
- Instruments de laboratoire en verre normaux : cylindres, éprouvettes, etc.
- Micropipettes capables de prélever de façon précise des volumes de 50-200µL
- Gants jetables
- Solution à 5% d'hypochlorite de sodium
- Récipients pour les matériaux potentiellement infectés.

6. MODALITÉS DE CONSERVATION ET STABILITÉ DES RÉACTIFS

Les réactifs doivent être conservés à +2-8°C. En cas de température de conservation incorrecte, la calibration doit être répétée et l'exactitude du résultat en recourant au sérum de contrôle doit être contrôlée (voir section 9 : validation du test).

La date de péremption est imprimée sur chaque composant et sur l'étiquette apposée sur la confection.

Les réactifs ont une stabilité limitée après ouverture et/ou préparation:

DISPOSITIFS	8 semaines à 2/8 °C
CALIBRATEUR	8 semaines à 2/8 °C
CONTRÔLE POSITIF	8 semaines à 2/8 °C

7. TYPE D'ÉCHANTILLON ET CONSERVATION

L'échantillon est représenté par le sérum obtenu par du sang prélevé par normale prise de sang et manipulé comme recommandé dans les procédures standard de laboratoire. Le sérum frais peut être conservé pendant 4 jours entre 2 et 8°C, pour des périodes de conservation plus longues, congeler à -20°C. L'échantillon peut subir jusqu'à un maximum de 3 décongélations. Éviter l'utilisation de congélateurs auto-dégivrants pour conserver les échantillons.

Après décongélation, agiter avec soin avant le dosage. La non-activation à la chaleur peut provoquer des résultats erronés. La qualité de l'échantillon peut être sérieusement influencée par la contamination microbienne qui peut porter à des résultats erronés. Des échantillons fortement lipémiques, ictériques, ou contaminés ne devraient pas être utilisés.

8. PROCÉDURE

1. Ouvrir le sachet (du côté contenant la fermeture à pression), prélever le nombre de dispositifs nécessaires et

conserver les autres dans le sachet après en avoir chassé l'air.

2. Contrôler visuellement l'état du dispositif selon les indications reportées au paragraphe 4 : « Précautions analytiques ».
3. Déposer 50 µL de sérum non dilué à analyser dans le puits n°. 1 de chaque dispositif. Utiliser un dispositif pour le calibrateur à chaque changement de lot.
4. Introduire les dispositifs dans l'instrument Chorus. Effectuer la calibration (si demandé) et le test selon les indications du manuel de l'utilisateur de l'instrument.

9. VALIDATION DU TEST

Utiliser le sérum de contrôle pour vérifier l'exactitude du résultat obtenu, l'analysant comme décrit dans le manuel d'utilisation de l'instrument. Si l'instrument signale que le sérum de contrôle présente une valeur en dehors des limites acceptables, refaire la calibration. Les résultats précédents seront corrigés automatiquement.

Si le résultat du sérum de contrôle n'est toujours pas compris dans la plage d'acceptabilité, contacter le Scientific Support.

Tél. : 0039 0577 319554

Fax : 0039 0577 366605

e-mail : scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRÉTATION DU TEST

L'appareil Chorus fournit un résultat semi-quantitatif en unités arbitraires (AU/ml).

Le dosage du sérum examiné peut être interprété comme suit :

POSITIF lorsque le résultat est >18 AU/mL

NÉGATIF lorsque le résultat est <12 AU/mL

DOUTEUX : lorsque le résultat est compris entre 12 et 18 AU/mL

En cas de résultat douteux, répéter le dosage. Si le résultat reste douteux, répéter le prélèvement après 1 à 2 semaines.

11. LIMITES DU TEST

Les résultats doivent être systématiquement interprétés avec d'autres données fournies par l'évaluation clinique et par d'autres examens diagnostiques.

Pour une meilleure évaluation du profil anticorporel de l'échantillon, il serait opportun d'en évaluer également la concentration en IgM et en IgG.

Il est possible que les échantillons prélevés en phase initiale de l'infection puissent ne pas avoir encore développé une quantité suffisante d'anticorps pour pouvoir être relevés. En cas de résultat douteux ou négatif, répéter un prélèvement à distance de 2 à 3 semaines et effectuer de nouveau le dosage si des doutes cliniques persistent.

Une centrifugation ou une filtration est conseillée avant d'utiliser des échantillons lipémiques ou à l'aspect trouble.

Interprétation des résultats basés sur la combinaison du dosage d'anticorps IgG, IgM et IgA :

Niveau anticorpal de <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	Interprétation
négatif	négatif	négatif	aucune indication d'infection
négatif ou positif	positif	négatif ou positif	Indication d'infection en cours
positif	négatif	négatif	Indication d'infection antérieure
négatif ou positif	négatif	positif	Indication d'infection en cours

12. PLAGE D'ÉTALONNAGE

Plage d'étalonnage 0-100.0 AU/ml.

Pour les échantillons > 100.0 AU/ml répéter le test en pré-diluant l'échantillon dans Negative Control/Sample Diluent (PF83607- non fourni avec le kit).

13. SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

2 échantillons ont été dosés (1 à la limite et 1 négatif) auxquels ont été ajoutés les substances interférentes suivantes :

Bilirubine (15 mg/dL – 60 mg/dL)

Triglycérides (7,5 mg/mL – 30 mg/mL)

Hémoglobine (2,5 mg/mL – 10 mg/mL)

RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

La présence dans le sérum examiné des substances interférentes reportées ci-dessus n'altère pas le résultat du test.

14. SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ DIAGNOSTIQUE

Lors d'une étude, 102 échantillons ont été analysés avec le kit Diesse et avec un autre kit commercial.

Les résultats de l'étude sont résumés ci-dessous :

		Référence		
		+	-	Total
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Total	20	82	102

Sensibilité diagnostique: 100.0 % $CI_{95\%}$: 83.9 – 100.0

Spécificité diagnostique: 90.2 % $CI_{95\%}$: 81.9 – 95.0

15. PRÉCISION

PRECISION INTRA-SÉANCE

	Nombre de répliques	Moyenne AU/ml	Dev. St.	CV%
Échantillon 1	5	10.0	0.00	0.0
Échantillon 2	5	20.5	2.47	12.0
Échantillon 3	4	69.4	3.46	5.0
Échantillon 4	4	35.7	4.81	13.5

PRECISION INTER-SEANCES

	Moyenne AU/ml			Moyenne	Dev. St.	CV%
	Jour 1	Jour 2	Jour 3			
Échantillon 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Échantillon 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Échantillon 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Échantillon 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Échantillon 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Échantillon 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

15. BIBLIOGRAPHIE

- G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
- G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology (2000),146,741-747
- S. Rotten: Interaction of *Mycoplasma* With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
- J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
- E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of *Mycoplasma pneumoniae* by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



INSTRUÇÕES PARA O USO

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. UTILIZAÇÃO

Método imunoenzimático para a determinação semi-quantitativa dos anticorpos IgA anti *Mycoplasma pneumoniae* no soro humano com dispositivo descartável aplicado aos instrumentos Chorus e Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Para a determinação semi-quantitativa dos anticorpos IgA anti *Mycoplasma pneumoniae*

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

2. INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma pneumoniae* é o agente etiológico mais comum da pneumonia adquirida especialmente em grupos com idade compreendida entre os 5 e os 30 anos. Pode ser responsável por epidemias que se desenvolvem lentamente porque o período de incubação varia de 10 a 14 dias e o contágio envolve contactos estreitos ou grupos fechados (escolas, quartéis, núcleos familiares). A pneumonia por *Mycoplasma* é também conhecida como pneumonia atípica primária ou pneumonia do agente de Eaton.

A *M. pneumoniae* ataca e destrói as células epiteliais ciliadas da mucosa do trato respiratório. Microscopicamente causa pneumonias intersticiais, bronquites e bronquiolites.

Nos casos de pneumonia, tendo em conta a recorrência dos sintomas para diversos agentes etiológicos, são necessários instrumentos de diagnóstico adicionais tais como testes sorológicos, para o diagnóstico de infecção aguda.

A resposta imunitária, na sequência de infecção por *Mycoplasma pneumoniae*, está ligada ao próprio tipo de infecção: anticorpos da classe IgM estão presentes mais frequentemente nos casos de infecção primária como evidenciado nos casos verificados nos pacientes mais jovens. Nos pacientes mais adultos existe maior probabilidade de reinfecção, as IgM são baixas ou não detetáveis; pelo contrário as IgA resultam ser o marcador mais sensível nas infecções em curso, nas infecções recidivas e nas infecções recentes.

Os anticorpos específicos de classe A aparecem precocemente, no início da doença e atingem títulos elevados nas primeiras 4 semanas, para depois decrescerem subitamente antes das IgG, permitindo o diagnóstico da infecção aguda com uma única colheita. As IgG aparecem depois das IgM e das IgA, em média atingem o pico máximo na 5ª semana. Um título elevado, acompanhado por um aumento

significativo entre duas colheitas, a uma distância de cerca de 2 semanas permite confirmar a presença de uma infecção em curso.

O antígeno utilizado nos testes para determinação serológica das IgA específicas, derivado de um extrato de membrana de *M. pneumoniae* que contém quantidades significativas de citoadesina P1 que representa o antígeno imunodominante correspondente a uma proteína transmembranar, principal responsável da citoaderência do *M. pneumoniae* ao epitélio respiratório do hospede.

3. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O teste baseia-se no método ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) indireto.

O antígeno que consiste num extrato de *Mycoplasma pneumoniae* inativado, está ligado à fase sólida. Para incubação do soro humano em exame as IgA específicas ligam-se ao antígeno.

Após lavagens para eliminar as proteínas que não tenham reagido, realiza-se a incubação com o conjugado composto por anticorpos monoclonais anti-IgA humanos conjugados com peroxidase de rábano.

Elimina-se o conjugado não ligado e adiciona-se o substrato para a peroxidase.

A cor azul que se desenvolve é proporcional à concentração de anticorpos específicos presentes no soro examinado.

Os dispositivos descartáveis contêm todos os reagentes para efetuar o teste quando aplicados aos instrumentos Chorus.

4. PRECAUÇÕES

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Este kit contém materiais de origem humana que foram testados com testes aprovados pela FDA e encontrados negativos para A presença de HBsAg, anticorpos anti-HIV-1, anti HIV-2 e anti-HCV. De qualquer modo, nenhum teste diagnóstico garante a ausência dos agentes infecciosos, todos os materiais de origem humana precisam ser considerados potencialmente infecciosos. Todos os reagentes e as amostras devem ser manuseados conforme as regras de segurança definidas em cada laboratório.

Eliminação de resíduos: as amostras de soro, os calibradores e as tiras usadas devem ser tratadas como resíduos infectados e, portanto, devem ser eliminados de acordo com as disposições de lei em vigor.

Precauções para a segurança individual

1. Não pipetar com a boca.
2. Usar luvas descartáveis e uma protecção para os olhos quando manusear as amostras e durante o teste.
3. Lavar muito bem as mãos no final do teste.
4. Os seguintes reagentes contêm baixas concentrações de substancias perigosas ou irritantes:
 - a) O conjugado e os controlos contêm fenol
 - b) O substrato é ácido

- Em caso de contacto desses reagentes com os olhos e a pele, lavar abundantemente com água.
- Os ácidos neutralizados e os outros resíduos líquidos devem ser desinfectados adicionando um volume de hipoclorito de sódio suficiente para obter uma concentração final pelo menos de 1%. A exposição ao hipoclorito de sódio a 1% durante 30 minutos deverá ser suficiente para garantir uma desinfectação eficaz.
 - Eventuais derramamentos de materiais potencialmente infecciosos devem ser absorvidos imediatamente com papel absorvente e a área afectada deverá ser descontaminada, por exemplo com hipoclorito de sódio a 1%, antes de continuar o trabalho. Se estiver presente um ácido, o hipoclorito de sódio não pode ser usado antes de enxugar a área. Todos os materiais usados para descontaminar eventuais derramamentos acidentais, incluindo as luvas, devem ser eliminados como lixo potencialmente infeccioso. Não esterilizar na autoclave materiais contendo hipoclorito de sódio.

Precauções analíticas

Antes do uso, deixar que os dispositivos a utilizar se estabilizem à temperatura ambiente (18 a 30°C) e utilizar no prazo de 60 minutos.

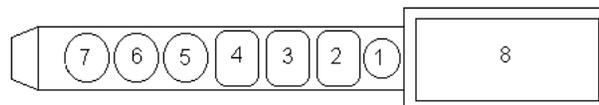
- Deitar fora os dispositivos com substrato (poço 4) azul.**
- Adicionando a amostra ao poço verifique se está distribuído perfeitamente no fundo.
- Controlar a presença dos reagentes nas cavidades do dispositivo e a integridade do dispositivo mesmo; não usar dispositivos que, ao controle visual, faltam alguns reagentes.
- Os dispositivos devem ser utilizados exclusivamente com o instrumento Chorus, seguindo rigorosamente as Instruções de Utilização e o Manual do instrumento.
- Controlar que o instrumento Chorus esteja programado correctamente (ver o Manual de Utilização Chorus).
- Não alterar o código de barras no punho do dispositivo, permitindo uma correcta leitura pelo equipamento.
- Evitar o uso de congeladores No Frost para a conservação das amostras.
- Códigos de barras com defeitos podem ser inseridos manualmente no instrumento.
- Durante o uso e a conservação, não expor os dispositivos a forte luz ou a vapores de hipoclorito.
- Amostras fortemente hemolisadas, ou amostras com contaminação bacteriana podem gerar resultados errados.
- Antes de inserir o dispositivo no instrumento Chorus, verificar que o poço de reacção não contenha corpos estranhos.

- Pipetar o soro em teste (50 µL) no poço 1 do dispositivo (ver a figura).
- Não usar o dispositivo depois da data de validade.
- 14. Verificar se o instrumento tem a ligação ao Washing Buffer (REF 83606).**

5. COMPOSIÇÃO DO KIT E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

O kit é suficiente para 36 determinações

DD DISPOSITIVOS 6 embalagens de 6 dispositivos cada
Descrição:



Posição 8: Espaço livre para rótulo com código de barras

Posição 7: livre

Posição 6: POÇO DA MICRO-PLACA

Sensibilizado com antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*

Posição 5: POÇO

Não sensibilizado.

Posição 4: SUBSTRATO TMB

Conteúdo: Tetrametilbenzidina 0.26 mg/mL ed H₂O₂ 0.01% estabilizados em tampão citrato 0.05 mol/L (pH 3.8)

Posição 3: DILUENTE PARA AS AMOSTRAS

Conteúdo: Solução protéica com fenol 0.05%, Bronidox 0.02% e um indicador para detetar a presença de soro.

Posição 2: CONJUGADO

Conteúdo: anticorpo monoclonal anti-IgA humano marcado com peroxidase, em solução tampão de fosfato contendo fenol 0.05% e Bronidox 0.02%.

Posição 1: POÇO VAZIO

Onde o utilizador deve colocar o soro não diluído.

Uso: estabilizar um pacote à temperatura ambiente, abrir o pacote, retirar os dispositivos necessários; colocar os restantes no pacote com o gel de sílica, esvaziar o ar e **fechar** o pacote premindo o fecho. Conservar entre 2 e 8°C.

CALIBRATOR CALIBRADOR 1 x 0.175 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, de concentração conhecida de anticorpos com Proclina e Gentamicina, líquido, pronto a usar.

CONTROL + CONTROLO POSITIVO 1 x 0.425 mL

Conteúdo: Soro humano diluído, com concentração conhecida de anticorpos, com Proclin e Gentamicina. Líquido, pronto a usar.

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS.

- WASHING BUFFER [REF] 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 [REF] 83609
- SANITIZING SOLUTION [REF] 83604 - 83608

- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT
REF 83607
- Água destilada ou desionizada
- Vidros normais de laboratório: cilindros, provetas, etc.
- Micropipetas com capacidade para recolher com precisão volumes de 50 a 200 µL
- Luvas descartáveis
- Solução de hipoclorito de sódio a 5%
- Recipientes para a recolha de materiais potencialmente infecciosos

6. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes devem ser conservados entre 2 e 8°C. Em caso de temperatura de conservação errada, é necessário refazer a calibração e verificar a exactidão do resultado por meio do soro de controlo (consultar o capítulo 9 - Validação do teste).

A data de validade está impressa em cada componente e no rótulo externo da embalagem.

Os reagentes têm uma estabilidade limitada depois da abertura e/ou da preparação:

DISPOSITIVOS	8 semanas entre 2 e 8°C
CALIBRADOR	8 semanas entre 2 e 8°C
CONTROLO POSITIVO	8 semanas entre 2 e 8°C

7. TIPO DE AMOSTRAS E CONSERVAÇÃO

A amostra é um soro, obtido de sangue recolhido das veias e manuseado de acordo com os procedimentos standard de laboratório. O soro fresco pode ser conservado durante 4 dias entre 2 e 8°C; para períodos de conservação mais prolongados, congelar a -20°C. A amostra pode ser descongelada até um máximo de 3 vezes. Evitar o uso de congeladores No Frost para a conservação das amostras. Depois de descongelar, misturar cuidadosamente antes do teste. Inactivação de calor pode levar a resultados erróneos. A qualidade das amostras pode ser gravemente influenciada pela contaminação bacteriana, que pode gerar resultados errados. Não devem ser utilizadas amostras fortemente lipémicas, ictéricas ou contaminadas.

8. PROCEDIMENTO DO TESTE

1. Abrir o pacote (do lado da fechadura por pressão), retirar o número de dispositivos necessários para os testes e conservar os restantes no pacote, esvaziar o ar e fechar o pacote.
2. Controlar visualmente as condições do dispositivo de acordo com as indicações do capítulo 4, "Precauções Analíticas".
3. Distribuir no poço 1 de cada dispositivo 50 µl de soro não diluído a testar; em cada mudança de lote utilizar um dispositivo para o calibrador.
4. Inserir o dispositivo no instrumento Chorus. Realizar a calibração (se necessário) e o teste como definido no Manual do Instruções do instrumento.

9. VALIDAÇÃO DO TESTE

Utilizar o soro de controlo para verificar a exactidão do resultado obtido, testando como indicado no Manual de Instruções do instrumento. Se o equipamento assinalar que o soro de controlo está fora do limite de aceitação, é necessário efectuar novamente a calibração. Os resultados anteriores serão corrigidos automaticamente.

Se o resultado do soro de controlo continuar fora do intervalo de aceitação, contatar o Scientific Support.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAÇÃO DO TESTE

O instrumento Chorus fornece um resultado semi-quantitativo em Unidades Arbitrárias (UA / mL).

O teste no soro em análise pode ser interpretado da seguinte forma:

POSITIVO quando o resultado é > 18 AU/ml

NEGATIVO quando o resultado é < 12 AU/ml

DÚBIO: quando o resultado está compreendido entre 12 e 18 AU/ml

Se o resultado for dúbio, repetir o teste. Se o resultado continuar dúbio, repetir a colheita após 1-2 semanas.

11. LIMITAÇÕES DO TESTE

Os resultados devem sempre ser interpretados juntamente com outros dados provenientes da avaliação clínica e de outras investigações diagnósticas.

Para uma melhor avaliação do perfil de anticorpos da amostra, será oportuno avaliar também a concentração em IgM e em IgA.

É possível que amostras recolhidas na fase inicial da infeção possam não ter ainda desenvolvido anticorpos em quantidade suficiente para poderem ser detetáveis; em caso de resultado dúbio ou negativo, é aconselhável repetir uma recolha à distância de 2-3 semanas e fazer uma nova análise se persistirem suspeitas clínicas.

Aconselha-se, antes da utilização de amostras lipémicas ou turvas, uma centrifugação ou filtração.

Interpretação dos resultados com base na combinação da dosagem de anticorpos IgG, IgM e IgA:

Nível de anticorpos M. pneumoniae			
IgG	IgM	IgA	Interpretação
negativo	negativo	negativo	nenhuma indicação de infeção
negativo ou positivo	positivo	negativo ou positivo	indicação de infeção em curso
positivo	negativo	negativo	indicação de infeção progressa
negativo ou positivo	negativo	positivo	indicação de infeção em curso

12. INTERVALO DE CALIBRAÇÃO

Intervalo de calibração 0-100.0 AU/ml.

Para amostras > 100.0 AU/ml repetir o teste diluindo primeiramente a amostra com o Negative Control/ Sample Diluent (PF83607- não fornecido com o kit).

13. ESPECIFICIDADE ANALÍTICA

Foram testadas 2 amostras (1 cut-off e 1 negativa) às quais foram adicionados os seguintes interferentes:

Bilirrubina (15 mg/dl – 60mg/dl)

Triglicéridos (7.5 mg/ml – 30 mg/ml)

Hemoglobina (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)

RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

A presença das substâncias interferentes acima referidas no soro examinado não altera o resultado do teste.

14. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DIAGNÓSTICA

Numa experiência, foram analisadas 102 amostras quer com o kit Diesse, quer com outro kit comercializado.

A seguir são apresentados os resultados da experiência:

		Referência		
		+	-	Total
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Total	20	82	102

Sensibilidade Diagnóstica: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 – 100.0

Especificidade Diagnóstica: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 – 95.0

15. PRECISÃO

PRECISÃO NO TESTE

	Número de repetições	Média AU/ml	Desv. Padrão	CV%
Amostra 1	5	10.0	0.00	0.0
Amostra 2	5	20.5	2.47	12.0
Amostra 3	4	69.4	3.46	5.0
Amostra 4	4	35.7	4.81	13.5

PRECISÃO ENTRE TESTES

	Média AU/ml			Média	Desv. Padrão	CV%
	1º Dia	2º Dia	3º Dia			
Amostra 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Amostra 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Amostra 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Amostra 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Amostra 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Amostra 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAFIA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology (2000),146,741-747
3. S. Rotten: Interaction of *Mycoplasma* With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of *Mycoplasma pneumoniae* by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



INSTRUCTIUNI DE UTILIZARE

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. UTILIZARE RECOMANDATA

Metoda imunoenzimatica pentru determinarea semicantitativa a anticorpilor de clasa IgA impotriva Mycoplasma pneumonia in seruri umane, folosind un instrument de unica folosinta pe instrumentele CHORUS si CHORUS TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Pentru determinarea semicantitativa a anticorpilor IgA impotriva Mycoplasma pneumoniae

Destinat numai pentru Diagnosticarea *In Vitro*

2. INTRODUCERE

Mycoplasma pneumonia este cel mai comun agent etiologic care cauzeaza pneumonia intalnita in mediile populate, in special la persoanele cu varsta intre 5 si 30 ani; poate cauza epidemii deoarece perioada de incubare variaza intre 10 si 14 zile, iar infectia implica subiectii care au un contact apropiat sau grupurile izolate (scoli, unitati militare, familii). Pneumonia cauzata de Mycoplasma mai este cunoscuta si ca pneumonie primara atipica sau pneumonia Eaton.

Mycoplasma pneumoniae ataca si distruge celulele epiteliale ciliate ale mucoasei tractului respirator. Examinarea microscopica indica pneumonia interstitiala, bronșita si bronșiolita.

Datorita recurenței simptomelor, cauzata de diferiti agenti etiologici, sunt necesare masuri aditionale de diagnosticare, precum testele serologice, pentru diagnosticarea unei infectii pulmonare acute.

Raspunsul imun care urmeaza unei infectii cu Mycoplasma pneumoniae, depinde de tipul de infectie: anticorpilor de clasa IgA se gasesc mai frecvent in cazul infectiilor primare dupa cum demonstreaza prezenta lor la pacientii mai tineri. IgM sunt mai redusi sau nu se gasesc la pacientii mai in varsta cu o probabilitate mai mare de recidiva. Pe de alta parte, IgA reprezinta markerul cel mai mare de sensibilitate in cazul unei infectii in desfasurare, a unei recidive sau a unei infectii recente.

Anticorpilor de clasa IgA specifici apar devreme in cadrul infectiei si ating nivelul de varf in primele 4 saptamani, apoi scad destul de repede, mai devreme decat IgG; diagnosticarea unei infectii acute poate fi adesea facuta pe baza unui singur test al probei. IgG apar dupa IgM si IgA si de obicei ating nivelul de varf in a 5

a saptamana. Un titru ridicat impreuna cu o crestere semnificativa intre cele doua probe recoltate la aproximativ 2 saptamani distanta, confirma prezenta unei infectii in desfasurare.

Antigenul folosit in testul pentru determinarea serologica a IgA specific deriva dintr-un extract din membrana M. pneumoniae. Aceasta membrana contine cantitati semnificative de adezina P1 care reprezinta antigenul imunodominant si corespunde unei proteine transmembrane, principala responsabila a aderentei M. pneumoniae de epiteliul respirator al gazdei.

3. PRINCIPIUL METODEI

Testul este bazat pe metoda indirecta ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Antigenul, compus dintr-un extract inactiv de Mycoplasma pneumoniae este legat de faza solida si este incubat cu proba de ser uman pentru ca IgA specific sa fie legat de antigen.

Dupa spalările efectuate pentru a elimina proteinele care nu au participat la reactie, incubarea este efectuata cu conjugatul constituit din anticorpi monoclonali anti-umani IgA conjugate cu peroxidaza.

Conjugatul care nu a participat la reactie este eliminat si este adaugat substratul de peroxidaza. Culoarea albastra care se dezvolta este proportionala cu concentratia de anticorpi specifici prezenti in proba de ser.

Dispozitivele de unica folosinta contin toti reactivii pentru efectuarea testului aplicat pe instrumentele Chorus.

4. ATENTIONARI SI MASURI DE PRECAUTIE

NUMAI PENTRU UTILIZARE IN DIAGNOSTICAREA *IN VITRO*

Acest kit contine materiale de origine umana, care au fost testate si au indicat un rezultat negativ pentru prezenta HBsAg si pentru anticorpilor anti-HIV-1, anti-HIV-2 si anti-HCV, prin testarea cu ajutorul metodelor aprobate de catre FDA. Deoarece nici un test de diagnosticare nu poate oferi garantii complete cu privire la absenta agentilor infectiosi, toate materialele de origine umana trebuie manevrate ca fiind potential infectioase. In cazul manevrării materialelor de origine umana, trebuie urmate toate masurile de precautie adoptate in mod normal in practica de laborator.

Indepartarea deșeurilor: probele de ser, calibratorii si stripurile utilizate trebuie tratate ca fiind reziduuri infectioase si eliminate conform legii.

Informatii cu privire la Sanatate si Siguranta

1. Nu pipetati cu gura.
2. In timpul manevrării specimenelor, purtati manusi de unica folosinta si ochelari de protectie.
3. Spalati-va temeinic pe maini dupa pozitionarea dispozitivelor in instrumentul CHORUS.
4. Urmatorii reactivi contin concentratii scazute de substante daunatoare sau iritante:
 - a) Conjugatul si controalele contin fenol
 - b) Substratul este acid

In cazul in care vreunul dintre reactivi intra in contact cu pielea sau cu ochii, spalati zona temeinic cu apa.

5. Acizii neutralizati si alte deseuri lichide ar trebui decontaminate prin adaugarea unui volum suficient de hipoclorit de sodiu pentru a obtine o concentratie finala de cel putin 1%. Un timp de expunere de 30 de minute la hipoclorit de sodiu in concentratie de 1%, poate fi necesar pentru a asigura o decontaminare eficienta.
6. Picaturile de substante potential infectioase trebuie indepartate imediat cu prosop de hartie absorbanta, si, inainte de a continua lucrul, zona contaminata trebuie tamponata, de exemplu, cu 1% solutie de hipoclorit de sodiu. Hipocloritul de sodiu nu trebuie utilizat peste zone in care s-au varsat substante continand acid, cu exceptia cazului in care acea zona a fost mai intai stearsa si uscata. Materialele utilizate pentru curatarea picaturilor, inclusiv manusile, trebuie indepartate ca fiind deseuri potential bio-periculoase. Nu autoclavati materialele ce contin hipoclorit de sodiu.

Masuri de Precautie Analitice

Inainte de utilizare, lasati dispozitivele sa ajunga la temperatura camerei (18-30°C); utilizati-le in decurs de 60 de minute.

1. **Indepartati dispozitivele al caror substrat (godeul 4) este de coloratie albastra.**
2. La adaugarea probei in godeu, verificati ca aceasta sa fie perfect distribuita pe fundul godeului.
3. Verificati ca reactivii sa existe in dispozitiv, si ca dispozitivul sa nu fie deteriorat; nu utilizati dispozitive carora le lipseste vreun reactiv.
4. Dispozitivele sunt destinate folosirii impreuna cu instrumentul Chorus; instructiunile de utilizare trebuie urmate cu atentie si trebuie consultat manualul de operare al instrumentului.
5. Verificati ca instrumentul Chorus sa fie setat in mod corect (vezi Manualul de Operare al Instrumentului Chorus).
6. Nu deteriorati codul de bare aflat pe manerul dispozitivului, pentru a permite instrumentului sa il citeasca in mod corect.
7. Pentru depozitarea probelor, evitati utilizarea congelatoarelor cu auto-dejivrare.
8. Codurile de bare deteriorate pot fi introduse manual in instrument.
9. In timpul depozitarii si utilizarii, nu expuneti dispozitivele la lumina puternica sau la vapori de hipoclorit.
10. Utilizarea probelor puternic hemolizate sau a probelor prezentand contaminare microbiana, pot constitui surse de indicare a unei erori.
11. Inainte de a introduce dispozitivele in instrument, verificati ca godeul de reactie sa nu contina corpuri straine.
12. Pipetati serul de testare (50 µl) in godeul 1 al dispozitivului (vezi figura).
13. Nu utilizati dispozitivul dupa data de expirare.
14. **Asigurati-va ca instrumentul este conectat la Washing Buffer REF 83606.**

5. COMPONENTA KITULUI SI PREGATIREA REACTIVILOR

Kitul contine suficiente dispozitive si substante pentru efectuarea a 36 de determinari.

DD DISPOZITIVE 6 pachete, fiecare continand 6 dispozitive
Descrierea dispozitivului:



Pozitia 8: Spatiu pentru aplicarea codului de bare

Pozitia 7: gol

Pozitia 6: GODEUL MICROPLACII captusit cu antigen *Mycoplasma pneumoniae*

Pozitia 5: GODEUL MICROPLACII necaptusit

Pozitia 4: TMB SUBSTRAT

Continut: Tetramethylbenzidine 0.26 mg/mL si H₂O₂ 0.01% stabilizat in 0.05 mol/L tampon citrat (pH 3.8)

Pozitia 3: PROBA DILUANT

Continut: Solutie Proteica continand fenol 0.05%, Bronidox 0.02% si un indicator pentru a demonstra prezenta serului.

Pozitia 2: CONJUGAT

Continut: anticorpi monoclonali anti-umani IgA tapetati cu peroxidaza in solutie tampon fosfat continand 0.05% fenol si 0.02% Bronidox.

Pozitia 1: GODEU GOL

In care operatorul trebuie sa introduca serul nediluat

Utilizare: lasati un pachet sa ajunga la temperatura camerei, deschideti pachetul si scoateti dispozitivele necesare; repuneti-le pe celelalte in punga impreuna cu pliculetul cu silica gel, scoateti aerul din punga si **sigilati** prin presarea sistemului de inchidere. Pastrati la 2-8°C.

CALIBRATOR CALIBRATOR 1 x 0.175 mL

Continut: Ser uman diluat, cu o concentratie cunoscuta de anticorpi, continand Proclin si Gentamicina. In forma lichida, gata de utilizare.

CONTROL + CONTROL POZITIV 1 x 0.425 mL

Continut: Ser uman diluat, cu o concentratie cunoscuta de anticorpi, continand Proclin si Gentamicina. In forma lichida, gata de utilizare.

MATERIALE NECESARE DAR NEFURNIZATE

- WASHING BUFFER REF 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 REF 83609
- SANITIZING SOLUTION REF 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT REF 83607
- Apa distilata sau deionizata
- Sticlaria obisnuita de laborator: cilindrii, tuburi de testare etc.
- Micropipete pentru recoltarea exacta a 50-200 µl de solutie
- Manusi de unica folosinta
- Solutie de Hipoclorit de Sodiu (5%)

- Recipiente pentru colectarea materialelor potential infectioase

6. PASTRAREA SI STABILITATEA REACTIVILOR

Reactivii trebuie pastrati la 2/8°C. In cazul pastrarii la o temperatura necorespunzatoare, calibrarea trebuie repetata, iar ciclul de rulare trebuie validat utilizand serul de control (a se vedea sectiunea 9, Validarea testului).

Data de expirare este imprimata pe fiecare componenta si pe eticheta kitului.

Dupa deschidere, stabilitatea reactivilor este limitata:

DISPOZITIVELE	8 saptamani la 2/8°C
CALIBRATORUL	8 saptamani la 2/8°C
CONTROLUL POZITIV	8 saptamani la 2/8°C

7. RECOLTAREA PROBEI SI DEPOZITAREA

Proba este compusa din ser recoltat normal din vena si manevrata cu toate precautiile impuse de buna practica in laborator. Serul proaspat poate fi depozitat timp de 4 zile la 2/8°C sau inghetat pentru perioade mai lungi la -20°C si poate fi decongelat de maxim 3 ori. Nu tineti probele in frigider care se dezgheata automat. Probele decongelate trebuie vortexate cu atentie inainte de utilizare. Neutralizarea la caldura poate duce la rezultate eronate. Calitatea probei poate fi serios afectata de contaminarea microbiana, care poate duce la rezultate eronate.

Probele puternic lipemice, icterice, hemolizate sau contaminate trebuie evitate. Testul nu poate fi aplicat pentru plasma.

8. PROCEDURA ANALIZEI

1. Deschideti pachetul (pe latura care contine dispozitivul de inchidere prin presare), extrageti numarul necesar de dispozitive si, dupa ce ati eliminat aerul din interiorul pungii continand restul dispozitivelor, sigilati-o.
2. Verificati starea dispozitivului in conformitate cu indicatiile mentionate in capitolul 4, Masuri de Precautie Analitice.
3. Distribuiti 50 µl din serul de testare nediluat in godeul numarul 1 al fiecarui dispozitiv; la fiecare schimbare de lot, utilizati un dispozitiv pentru calibrator.
4. Pozitionati dispozitivele in instrument. Efectuati calibrarea (in cazul in care este necesar) si testul conform specificatiilor din Manualul de Operare al instrumentului Chorus.

9. VALIDAREA TESTULUI

Utilizati serul de control pentru a verifica validitatea rezultatelor obtinute. Acesta trebuie folosit conform indicatiilor din manualul de operare. In cazul in care instrumentul semnaleaza faptul ca serul de control are o valoare care se situeaza in afara intervalului acceptabil, calibrarea trebuie repetata. Rezultatele anterioare vor fi corectate in mod automat.

Daca rezultatul serului de control continua sa se situeze in afara intervalului acceptabil, apelati Suportul Stiintific.

Tel: 0039 0577 319554
Fax: 0039 0577 366605

email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Instrumentul CHORUS ofera un rezultat semicantitativ exprimat in AU/mL.

Testul serului poate fi interpretat dupa cum urmeaza:

POZITIV: cand rezultatul este >18 AU/mL

NEGATIV: cand rezultatul este < 12 AU/mL

INCERT: cand rezultatul este in intervalul 12-18 AU/mL

In cazul in care rezultatul este incert, repetati testul. Daca testul ramane incert, recoltati o noua proba dupa 1-2 saptamani.

11. LIMITARI

Rezultatele testului ar trebui interpretate in raport cu informatia disponibila din evaluarea clinica si a altor proceduri de diagnosticare.

Pentru a obtine o evaluare mai buna a profilului anticorpului probei, este recomandata si detectarea IgM si IgG.

Probele recoltate in timpul fazei incipiente a infectiei pot sa nu dezvolte suficiente anticorpi pentru a fi detectata; in cazul unor rezultate incerte sau negative, recoltati o noua proba dupa 2-3 saptamani si repetati testul daca persista suspiciunile clinice. Este recomandata centrifugarea sau filtrarea probelor lipemice sau tulburi, inainte de testare.

Interpretarea rezultatelor bazata pe analiza combinata din IgM si IgA:

Nivelul anticorpului M. pneumoniae			
IgG	IgM	IgA	Interpretare
negativ	negativ	negativ	Nu indica o infectie
negativ sau pozitiv	pozitiv	negativ sau pozitiv	Indica o infectie in desfasurare
pozitiv	negativ	negativ	Indica o fosta infectie
negativ sau pozitiv	negativ	pozitiv	Indica o infectie in desfasurare

12. ARIA DE CALIBRARE

Aria de calibrare: 0-100.0 AU/ml.

Pentru probele cu un titru > 100.0 AU/ml, repetati testul prediluand proba cu Negative Control/Sample Diluent (PF83607 – care nu este furnizat impreuna cu kitul).

13. SPECIFICITATEA ANALITICA

Au fost testate 2 probe (1cut-off si 1negativa) continand substante potential interferente:

Bilirubina (15 mg/dl – 60mg/dl)

Trigliceride (7.5 mg/ml – 30 mg/ml)

Hemoglobina (2.5 mg/ml – 10 mg/ml)

RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

Prezenta in serul testat a substantelor interferente metionate mai sus, nu au modificat rezultatele testului.

14. SENSIBILITATEA SI SPECIFICITATEA DIAGNOSTICULUI

In cadrul unui experiment extern, 102 probe au fost testate cu kitul Diesse si cu o alta metoda disponibila pe piata.

Rezultatele sunt redade in tabelul urmatoar:

Mai jos sunt redade rezultatele experimentului:

		Referinta		
		+	-	Total
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Total	20	82	102

Sensibilitatea Diagnosticului: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 – 100.0

Specificitatea Diagnosticului: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 – 95.0

15. PRECIZIA

PRECIZIE IN TIMPUL CIRCUITULUI

	Nr. replici	Media AU/ml	Dev. St.	CV%
Proba 1	5	10.0	0.00	0.0
Proba 2	5	20.5	2.47	12.0
Proba 3	4	69.4	3.46	5.0
Proba 4	4	35.7	4.81	13.5

PRECIZIE INTRE CIRCUITE

	Media AU/ml			Media	Dev. St.	CV%
	Ziua 1	Ziua 2	Ziua 3			
Proba 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Proba 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Proba 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Proba 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Proba 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Proba 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAFIE

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000), 146, 741-747
3. S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.

17. INDEXUL SIMBOLURILLOR FOLOSITE

	Data fabricatiei
	A se folosi pana la
	A nu se refolosi
	Atentie, consultati documentele insotitoare
	Productator
	Continut suficient pt <n> teste
	Limita da temperatura
	Pentru utilizare consultati instructiunile
	Risk biologic
	Numar de catalog
	Dizpozitiv medical pentru diagnosticare <i>in vitro</i>
	Lot



ИНСТРУКЦИИ ЗА УПОТРЕБА

CHORUS МИКОПЛАЗМА ПНЕВМОНИЯ IgA

1. ИЗПОЛЗВАЙТЕ

Метод за ензимен имуноанализ за полуколичествено определяне на IgA антитела към *Mycoplasma pneumoniae* в човешки серум с изделие за еднократна употреба, приложено към апаратите Chorus и Chorus TRIO.

CHORUS МИКОПЛАЗМА ПНЕВМОНИЯ IgA

**За полуколичествено определяне на антитела
IgA анти *Mycoplasma pneumoniae***

Само за диагностична употреба *in vitro*

2. ВЪВЕДЕНИЕ

Mycoplasma pneumoniae е най-честият етиологичен причинител на пневмония, придобита в обществото, особено във възрастовата група от 5 до 30 години; тя може да бъде причина за епидемии, които се развиват бавно, тъй като инкубационният период варира от 10 до 14 дни, а заразяването включва близки контакти или обособени групи (училища, казарми, домакинства). Микоплазмената пневмония се нарича още първична атипична пневмония или пневмония с причинител Итън.

M. pneumoniae атакува и разрушава ресничестите епителни клетки на лигавицата на дихателните пътища. Микроскопски той причинява интерстициална пневмония, бронхит и бронхиолит.

В случаите на пневмония, предвид повторната поява на симптоми при различни етиологични агенти, за диагностициране на острата инфекция са необходими допълнителни диагностични средства като серологични тестове.

Имунният отговор след инфекция с *Mycoplasma pneumoniae* изглежда е свързан с вида на самата инфекция: антитела от клас IgM се срещат по-често в случаите на първична инфекция, за което свидетелства появата им при по-млади пациенти. При по-възрастните пациенти, при които вероятността от повторна инфекция е по-голяма, IgM е нисък или неоткриваем; за разлика от него IgA е маркерът с най-висока чувствителност при текущи инфекции, повторни инфекции или скоростни инфекции.

Специфичните антитела от клас A се появяват рано, в началото на заболяването, и достигат високи титри през първите 4 седмици, след което рязко намаляват преди IgG, което позволява диагностицирането на острата инфекция

дори с една кръвна проба. IgG се появява след IgM и IgA, като средно достига своя връх през 5-ата седмица. Високият титър, придружен от значително увеличение между две проби с интервал от около две седмици, потвърждава наличието на продължаваща инфекция.

Антигенът, използван в теста за серологично определяне на специфичен IgA, се получава от мембранен екстракт на *M. pneumoniae*, съдържащ значителни количества цитоадезин P1, който е имунодоминантният антиген и съответства на трансмембранен протеин, отговорен главно за цитоадхеренцията на *M. pneumoniae* към респираторния епител на гостоприемника.

3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Тестът се основава на метода на индиректната ELISA (ензимно свързан имуносорбентен анализ).

Антигенът, състоящ се от екстракт от инактивирана *Mycoplasma pneumoniae*, е свързан с твърдата фаза. При инкубация на човешкия серум за изследване специфичният IgA се свързва с антигена.

След промиване за отстраняване на нереагиралите протеини се извършва инкубация с конюгат, състоящ се от моноклонални анти-човешки IgA антитела, конюгирани с хрян пероксидаза.

Несвързаният конюгат се отстранява и се добавя субстрат за пероксидазата.

Синьото оцветяване, което се получава, е пропорционално на концентрацията на специфичните антитела в тестовия серум.

Устройствата за еднократна употреба съдържат всички реактиви за извършване на теста, когато се прилагат към инструментите Chorus.

4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

САМО ЗА ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА *IN VITRO*.

Този комплект съдържа материали от човешки произход, които са тествани и са отрицателни в одобрени от FDA тестове за HBsAg и анти-HIV-1, анти-HIV-2 и анти-HCV антитела. Тъй като никой диагностичен тест не може да даде пълна гаранция за отсъствието на инфекциозни агенти, всеки материал от човешки произход трябва да се счита за потенциално заразен. С всички реактиви и проби трябва да се борави в съответствие с правилата за безопасност, приети в лабораторията.

Изхвърляне на остатъци: използваните серумни проби, калибратори и ленти трябва да се третират като инфектирани остатъци, след което да се изхвърлят в съответствие с разпоредбите.

Предупреждения за лична безопасност

1. Не пипетирайте с уста. Използвайте ръкавици за еднократна употреба и защита на очите при работа с

- пробите и по време на теста. След приключване на теста измийте добре ръцете си.
- Следните реактиви съдържат ниски концентрации на вредни или дразнещи вещества:
 - Конюгатът и контролите съдържат фенол
 - Субстратът е киселинен
 Ако реагентът попадне върху кожата или очите, измийте ги обилно с вода.
 - Неутрализираните киселини и други течни отпадъци трябва да се дезинфекцират чрез добавяне на натриев хипохлорит в достатъчен обем, за да се постигне крайна концентрация от поне 1 %. Излагането на 1% натриев хипохлорит в продължение на 30 минути трябва да е достатъчно, за да се осигури ефективна дезинфекция.
 - Всеки разлив на потенциално инфектирани материали трябва да се отстрани незабавно с абсорбираща хартия, а замърсената зона трябва да се дезинфекцира, напр. с 1% натриев хипохлорит, преди да се продължи работата. Ако има киселина, натриевият хипохлорит не трябва да се използва, докато зоната не бъде изсушена. Всички материали, използвани за обеззаразяване на случайни разливи, включително ръкавици, трябва да се изхвърлят като потенциално инфекциозен отпадък. Не използвайте автоклав за материали, съдържащи натриев хипохлорит.

Аналитични предупреждения

Преди употреба приведете устройствата на стайна температура (18-30°C) и ги използвайте в рамките на 60 минути.

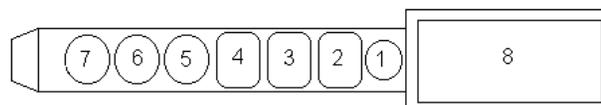
- Изхвърлете устройствата със субстрат (ямка 4), оцветен в синьо.**
- Когато добавяте пробата в ямката, проверете дали тя е напълно разпределена на дъното.
- Проверявайте действителното наличие на реагентите в устройството и целостта на самото устройство, не използвайте устройства, които показват липса на някои реагенти при визуална проверка.
- Устройствата трябва да се използват заедно с инструмента Chorus, като се спазват стриктно инструкциите за употреба и ръководството на инструмента.
- Проверете дали инструментът Chorus е правилно настроен (вж. Ръководството за потребителя на Chorus).
- Не променяйте баркода върху дръжката на устройството, за да може той да бъде прочетен правилно от инструмента.
- Избягвайте използването на саморазмразяващи се фризери за съхранение на проби.
- Дефектните баркодове могат да бъдат въведени ръчно в инструмента.
- Не излагайте устройствата на силна светлина или хипохлоритни пари по време на съхранение и употреба.

- Използването на силно хемолизирани проби или проби с микробно замърсяване може да бъде източник на грешки.
- Преди да поставите устройството в инструмента Chorus, се уверете, че в реакционната ямка няма чужди тела.
- Нанесете с пипета тестовия серум (50 µl) в ямка 1 на устройството (вж. фигурата).
- Не използвайте устройството след изтичане на срока на годност
- Проверете дали инструментът има връзка към буфера за промиване (вж. 83606)**

5. СЪСТАВ НА КОМПЛЕКТА И ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТ

Комплектът е достатъчен за 36 определяния

DD УСТРОЙСТВА 6 опаковки с по 6 устройства
Описание:



Позиция 8: Свободно място за етикет с баркод

Позиция 7: Празен

Позиция 6: ЯМКА ЗА МИКРОПЛАКА

Сенсибилизирани с антиген на *Mycoplasma pneumoniae*

Позиция 5: ЯМКА

Не е сенсибилизиран.

Позиция 4: ТМВ СУБСТРАТ

Съдържание: Тетраметилбензидин 0,26 mg/ml и H₂O₂ 0,01%, стабилизирани в цитратен буфер 0,05 mol/L (pH 3,8)

Позиция 3: РАЗРЕДИТЕЛ ЗА ПРОБИ

Съдържание: Протеинов разтвор, съдържащ фенол 0,05%, Бронидокс 0,02% и индикатор за откриване на наличие на серум.

Позиция 2: КОНЮГАТ

Съдържание: Маркирани с пероксидаза моноклонални античовешки IgA антители във фосфатнобуфериран разтвор, съдържащ 0,05 % фенол и 0,02 % Bronidox.

Позиция 1: ПРАЗЕН РЕЗЕРВОАР

Където потребителят трябва да дозира неразредения серум.

Употреба: уравнишете пликата до стайна температура, отворете пликата, извадете необходимите устройства; поставете останалите в пликата, съдържащ силикагел, изпуснете въздуха и **запечатайте,** като натиснете затварянето. Съхранявайте при 2/8°C.

КАЛИБРАТОР КАЛИБРАТОР 1 x 0,175 ml

Съдържание: Разреден човешки серум, известна концентрация на антители с Proclin и Gentamicin. Течен, готов за употреба.

КОНТРОЛА + ПОЛОЖИТЕЛНА КОНТРОЛА 1 x 0.425 ml

Съдържание: Разреден човешки серум, известна концентрация на антитела с Proclin и Gentamicin. Течен, готов за употреба.

ДРУГИ НЕОБХОДИМИ, НО НЕПРЕДВИДЕНИ МАТЕРИАЛИ

- ПРОМИВЕН БУФЕР С РЕФЕРЕНТЕН НОМЕР 83606
- ПОЧИСТВАЩ РАЗТВОР 2000 РЕФ. 83609
- ДЕЗИНФЕКЦИРАЩ РАЗТВОР С РЕФЕРЕНТЕН НОМЕР 83604 - 83608
- ХОР ОТРИЦАТЕЛНА КОНТРОЛА/РАЗРЕДИТЕЛ ЗА ПРОБИ РЕФ. НОМЕР 83607
- Дестилирана или дейонизирана вода
- Обикновена лабораторна стъklarия: цилиндри, епруветки и др.
- Микропипети, които могат точно да вземат обеми от 50-200 µl.
- Ръкавици за еднократна употреба
- 5% разтвор на натриев хипохлорит
- Контейнери за събиране на потенциално заразени материали

6. СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА РЕАКТИВИТЕ

Реагентите трябва да се съхраняват при температура 2/8°C. В случай на неправилна температура на съхранение калибрирането трябва да се повтори и да се провери правилността на резултата с помощта на контролен серум (вж. глава 9: Валидиране на теста).

Датата на изтичане на срока на годност е отпечатана върху всеки компонент и върху етикета на външната опаковка.

Реагентите са с ограничена стабилност след отваряне и/или приготвяне:

УСТРОЙСТВА	8 седмици при 2/8°C
КАЛИБРАТОР	8 седмици при 2/8°C
ПОЛОЖИТЕЛЕН КОНТРОЛ	8 седмици при 2/8°C

7. ТИП ПРОБИ И СЪХРАНЕНИЕ

Пробата е серум, получен от кръв, взета чрез обикновена венепункция, и се обработва съгласно стандартните лабораторни процедури. Пресният серум може да се съхранява в продължение на 4 дни при 2/8°C; за по-дълъг период на съхранение я замразете при -20°C. Пробата може да бъде подложена на максимум 3 размразявания. Избягвайте използването на саморазмразяващи се фризери за съхранение на проби. След размразяването разклатете внимателно преди дозиране. Качеството на пробата може да бъде сериозно засегнато от микробно замърсяване, което може да доведе до грешни резултати. Не могат да се използват силно липемични, иктерни или замърсени проби.

8. ПРОЦЕДУРА

1. Отворете плика (страната, съдържаща уплътнението под налягане), извадете необходимия брой устройства за извършване на изследванията и запазете останалите, като затворите плика отново, след като изпуснете въздуха.
2. Визуално проверете състоянието на устройството съгласно инструкциите в глава 4 "Аналитични предупреждения".
3. Дозирайте 50 µl неразреден серум, който ще се анализира, в ямка № 1 на всяко устройство; използвайте калибратор при всяка смяна на партидата.
4. Представете устройствата на инструмента Chorus. Извършете калибриране (ако е необходимо) и тест, както е описано в ръководството за употреба на инструмента.

9. ВАЛИДИРАНЕ НА ТЕСТА

Използвайте контролен серум, за да проверите правилността на получения резултат, като го обработите, както е посочено в ръководството за потребителя на уреда. Ако уредът покаже, че контролен серум има стойност извън допустимата граница, калибрирането трябва да се извърши отново. Предишните резултати ще бъдат коригирани автоматично.

Ако резултатът от контролния серум продължава да е извън допустимия диапазон, свържете се с отдела за научна поддръжка.

Тел: 0039 0577 319554
Факс: 0039 0577 366605
имейл: scientificsupport@diesse.it

10. ТЪЛКУВАНЕ НА ТЕСТА

Инструментът Chorus предоставя полуколичествен резултат в произволни единици (AU/ml). Тестът на тестовия серум може да се интерпретира по следния начин:

ПОЛОЖИТЕЛЕН, когато резултатът е > 18 AU/ml

НЕГАТИВЕН, когато резултатът е < 12 AU/ml

СЪМНИТЕЛЕН: когато резултатът е между 12 и 18 AU/ml

В случай на съмнителен резултат повторете теста. Ако резултатът остава съмнителен, повторете пробата след 1-2 седмици.

11. ОГРАНИЧЕНИЯ НА ТЕСТА

Резултатите винаги трябва да се тълкуват заедно с другите данни от клиничната оценка и другите диагностични изследвания.

За по-добра оценка на профила на антителата в пробата е препоръчително да се оцени и концентрацията на IgM и IgG. Възможно е пробите, взети в ранен стадий на инфекцията, все още да не са развили антитела в достатъчно количество, за да бъдат открити; в случай на съмнение или

отрицателни резултати е препоръчително да се повтори пробата 2-3 седмици по-късно и да се направи нов тест, ако клиничните подозрения продължават.

Препоръчва се центрофугиране или филтриране, преди да се използват липаемични или мътни проби.

Тълкуване на резултатите, основани на комбинацията от анализ на антитела IgG, IgM и IgA:

Ниво на антитела срещу <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	Интерпретация
отрицателен	отрицателен	отрицателен	без признаци на инфекция
отрицателен или положителен	положителен	отрицателен или положителен	индикация за текуща инфекция
положителен	отрицателен	отрицателен	индикация за предишна инфекция
отрицателен или положителен	отрицателен	положителен	индикация за текуща инфекция

12. ОБХВАТ НА КАЛИБРИРАНЕ

Обхват на калибриране 0-100,0 AU/ml.

За проби > 100,0 AU/ml повторете теста, като предварително разтворите пробата в отрицателна контрола/разредител за проби (PF83607 - не се доставя с комплекта).

13. АНАЛИТИЧНА СПЕЦИФИЧНОСТ

Бяха изследвани 2 проби (1 отрязана и 1 отрицателна), към които бяха добавени следните интерференти:

Билирубин (15 mg/dl - 60mg/dl)

Триглицериди (7,5 mg/ml - 30 mg/ml)

Хемоглобин (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)

RF (30 IU/ml - 150 IU/ml)

Наличието на горепосочените интерфериращи вещества в тестовия серум не променя резултата от теста.

14. ДИАГНОСТИЧНА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ И СПЕЦИФИЧНОСТ

При едно изпитване 102 проби са анализирани както с комплекта на Diesse, така и с други търговски комплекти.

Резултатите от експеримента са описани по-долу:

		Справка		
		+	-	Общо
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Общо	20	82	102

Диагностична чувствителност: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 - 100.0

Диагностична специфичност: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 - 95.0

15. ПРЕЦИЗНОСТ

ПРЕЦИЗНОСТ В РАМКИТЕ НА СЕСИЯТА

	Брой повторения	Среден AU/ml	Д.С.	CV%
Проба. 1	5	10.0	0.00	0.0
Проба. 2	5	20.5	2.47	12.0
Проба. 3	4	69.4	3.46	5.0
Проба. 4	4	35.7	4.81	13.5

ПРЕЦИЗНОСТ МЕЖДУ СЕСИИТЕ

	Среден AU/ml			Среден	Д.С.	CV%
	Ден 1	Ден 2	Ден 3			
Проба. 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Проба. 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Проба. 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Проба. 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Проба. 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Проба. 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. БИБЛИОГРАФИЯ

- G. V. Wisdom: Ензимно-имунологичен анализ. Клин. Хим. 22: 1243 (1976).
- G. Layh-Schmitt: Протеини, комплексиращи с адезина P1 на *Mycoplasma pneumoniae*. Микробиология (2000), 146, 741-747
- S. Rotten: Взаимодействие на микоплазмите с клетките-гостоприемници. Физиол. Изд. 83: 417-432, 2003
- J. Petitjean: Оценка на четири предлагани на пазара имуноглобулин G и IgM-специфични ензимни имуноанализи за диагностика на инфекции с *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Микробиол. 2002 40: 165-171
- Е. Джейкъбс: Изолиране на адхерентния протеин на *Mycoplasma pneumoniae* чрез фракционирана солубилизация и хроматография с изключване на размера. Biol. Chem, том 369, стр. 1295-1299, декември 1988 г.



UPUTE ZA UPORABU

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. KORIŠTENJE

Imunoenzimska metoda za semikvantitativno određivanje antitijela IgA na *Mycoplasma pneumoniae* u ljudskom serumu pomoću uređaja za jednokratnu uporabu koji se primjenjuje na instrumente Chorus i Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Za semikvantitativno određivanje protutijela IgA na *Mycoplasma pneumoniae*

Samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu

2. UVOD

Mycoplasma pneumoniae je najčešći uzročnik upale pluća stečene u zajednici, posebno u dobi od 5 do 30 godina; može biti odgovoran za epidemije koje se polako razvijaju jer razdoblje inkubacije varira od 10 do 14 dana, a zaraza uključuje bliske kontakte ili odvojene skupine (škole, vojarnje, kućanstva). Upala pluća mikoplazme naziva se i primarna atipična upala pluća ili Eaton agens upala pluća.

M. pneumoniae napada i uništava epitelne stanice sluznice s treptljivkama dišnog sustava. Mikroskopski uzrokuje intersticijsku pneumoniju, bronhitis i bronhiolitis.

U slučajevima upale pluća, s obzirom na ponavljanje simptoma za različite uzročnike, potrebna su dodatna dijagnostička sredstva kao što su serološka ispitivanja za dijagnozu akutne infekcije.

Imunološki odgovor, nakon infekcije *Mycoplasma pneumoniae*, povezan je s vrstom infekcije: protutijela IgM klase češće su prisutna u slučajevima primarne infekcije, o čemu svjedoči njihovo otkrivanje kod mlađih pacijenata. Kod starijih bolesnika s većom vjerojatnošću ponovne infekcije, IgM je nizak ili neotkriven; s druge strane, IgA je pokazatelj veće osjetljivosti u trenutnoj infekciji, ponovnoj infekciji ili nedavnoj infekciji.

Specifična protutijela klase A pojavljuju se rano, na početku bolesti i dosežu visoki titar u prva 4 tjedna, a zatim naglo opadaju prije IgG-a i time dopuštaju dijagnozu akutne infekcije čak i samo jednim uzorkovanjem. IgG se pojavljuju nakon IgM-a i IgA, i u prosjeku dostižu svoj vrhunac u 5. tjednu. Visoki titar, praćen značajnim povećanjem između dva vađenja uzorka u razmaku od oko 2 tjedna, omogućuje potvrdu prisutnosti infekcije u tijeku.

Antigen koji se koristi u ispitivanju za serološko određivanje specifičnog IgA proizlazi iz membranskog ekstrakta *M.*

pneumoniae koji sadrži značajne količine citoadhezina P1 koji predstavlja imunodominantni antigen i odgovara transmembranskom proteinu, uglavnom odgovornom za citoadherenciju *M. pneumoniae* na epitel respiratornog sustava.

3. NAČELO METODE

Test se temelji na metodi neizravnog imunoenzimskog testa ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Antigen, koji se sastoji od inaktiviranog ekstrakta *Mycoplasma pneumoniae*, veže se za čvrstu fazu. Inkubacijom ljudskog seruma koji se ispituje, specifične IgA se vežu za protutijelo.

Nakon pranja kako bi se uklonili proteini koji nisu reagirali, inkubacija se provodi s konjugatom koji se sastoji od ljudskih protu-IgA monoklonskih protutijela konjugiranih peroksidazom iz hrena.

Nevezani konjugat se uklanja i peroksidazom se dodaje supstrat.

Plava boja koja se razvija proporcionalna je koncentraciji specifičnih protutijela prisutnih u testnom serumu.

Jednokratni uređaji sadrže sve reagense za izvođenje testa kada se primjenjuju na Instrumente Chorus.

4. MJERE OPREZA

SAMO ZA *IN VITRO* DIJAGNOSTIČKU UPORABU.

Ovaj komplet sadrži materijale ljudskog podrijetla koji su testirani i utvrđeni negativni s testovima odobrenim od strane FDA (Uprave za hranu i lijekove) za HBsAg i anti-HIV-1, anti-HIV-2 i anti-HCV protutijela. Budući da nijedan dijagnostički test ne može ponuditi potpuno jamstvo odsutnosti infektivnih agensa, svi materijali ljudskog podrijetla moraju se smatrati potencijalno zaraženim. Sa svim reagensima mora se postupiti u skladu sa sigurnosnim standardima koji se obično usvajaju u laboratoriju.

Odlaganje ostataka: uzorci seruma, kalibratori i rabljene trake moraju se tretirati kao zaraženi ostaci i stoga se moraju zbrinuti u skladu s odredbama važećih zakona.

Upozorenja o osobnoj sigurnosti

1. Ne pipetirati ustima. Prilikom rukovanja uzorcima i tijekom testiranja koristite jednokratne rukavice i zaštitu za oči. Temeljito operite ruke nakon završetka testiranja.
2. Sljedeći reagensi sadrže niske koncentracije štetnih ili iritantnih tvari:
 - i) Konjugat i kontrole sadrže fenol
 - j) Supstrat je kiseli

Ako reagens dođe u dodir s kožom ili očima, temeljito operite vodom.
3. Neutralizirane kiseline i drugi tekući otpad moraju se dezinficirati dodavanjem natrijevog hipoklorita u dovoljnoj količini kako bi se dobila konačna koncentracija od najmanje 1%. Izloženost natrijevom hipokloritu na 1% tijekom 30 minuta trebala bi biti dovoljna kako bi se osigurala učinkovita dezinfekcija.

4. Svako izlivanje potencijalno zaraženog materijala mora se odmah ukloniti upijajućim papirom, a zagađeno područje mora se dekontaminirati, na primjer s 1% natrijevog hipoklorita, prije nastavka rada. Ako je prisutna kiselina, natrijev hipoklorit se ne smije koristiti prije nego što se područje osuši. Svi materijali koji se upotrebljavaju za dekontaminaciju svih slučajnih izlivanja, uključujući rukavice, moraju se odbaciti kao potencijalno zaraženi otpad. Nemojte stavljati u autoklavu materijale koji sadrže natrijev hipoklorit.

Analićka upozorenja

Prije uporabe pobrinite se da uređaji koji će se koristiti dostignu sobnu temperaturu (18-30 °C) i upotrijebite u roku od 60 minuta.

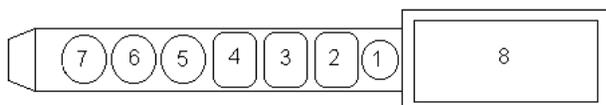
1. **Odbacite uređaje čiji je supstrat (jažica 4) plave boje.**
2. Prilikom dodavanja uzorka u jažicu provjerite da je besprijekorno raspoređen na dnu.
3. Provjerite stvarnu prisutnost reagensa u uređaju i cjelovitost samog uređaja, nemojte koristiti uređaje kojima nedostaje neki reagens prilikom vizualnog pregleda.
4. Uređaji se moraju koristiti zajedno s instrumentom Chorus, strogo slijedeći Upute za uporabu i Priručnik instrumenta.
5. Provjerite je li alat Chorus ispravno postavljen (pogledajte Priručnik za uporabu Chorus).
6. Nemojte mijenjati crtični kod postavljen na ručku uređaja kako biste omogućili ispravno očitavanje instrumenta.
7. Izbjegavajte uporabu zamrzivača koji se sami odmrzavaju za čuvanje uzoraka.
8. Neispravni crtični kodovi mogu se unijeti ručno u instrument.
9. Ne izlažite uređaje jakoj rasvjeti ili pari hipoklorita tijekom skladištenja i uporabe.
10. Uporaba jako hemoliziranih uzoraka ili uzoraka koji predstavljaju mikrobnog onečišćenje može biti izvor pogrešaka.
11. Prije umetanja uređaja u instrument Chorus, uvjerite se da reakcijska jažica ne sadrži strana tijela.
12. Pipetirajte testni serum (50 µl) u jažicu 1 uređaja (vidi sliku).
13. Ne koristite uređaj nakon datuma isteka
14. **Provjerite ima li instrument vezu s puferom za ispiranje (Ref. 83606)**

5. SASTAV KOMPLETA I PRIPREMA REAGENSA

Komplet je dovoljan za 36 određivanja

DD UREĐAJI 6 paketa svaki od 6 uređaja

Opis:



Položaj 8: Prostor dostupan za oznaku crtičnog koda

Položaj 7: Prazan

Položaj 6: JAŽICA MIKROPLOČICE

Senzibilizirano s *Mycoplasma pneumoniae* antigenom

Položaj 5: JAŽICA

Nije senzibilizirano.

Položaj 4: TMB SUPSTRAT

Sadržaj: Tetrametilbenzidin 0,26 mg/mL i H₂O 20,01% stabiliziran u citratnom puferu 0,05 mol/L (pH 3,8)

Položaj 3: RAZRJEĐIVAČ ZA UZORKE

Sadržaj: Proteinska otopina, koja sadrži fenol 0,05%, Bronidox 0,02% i pokazatelj za otkrivanje prisutnosti seruma.

Položaj 2: KONJUGAT

Sadržaj: ljudska monoklonska protutijela protu-IgA označena peroksidazom, u otopini fosfatnog pufera koja sadrži 0,05% fenola i 0,02% Bronidoxa.

Položaj 1: PRAZNA JAŽICA

Gdje korisnik mora razdijeliti neiskorišteni serum.

Uporaba: uravnotežite jednu vrećicu na sobnoj temperaturi, otvorite vrećicu, izvadite potrebne uređaje; stavite ostale u vrećicu koja sadrži silika-gel, ispustite zrak i **zatvorite** pritiskom na zatvaranje. Čuvajte na 2/8 °C.

CALIBRATOR KALIBRATOR 1 x 0,175 mL

Sadržaj: Razrijeđeni ljudski serum, u poznatoj koncentraciji protutijela na Proclin i Gentamicin. Tekućina, spremna za uporabu.

CONTROL + POZITIVNA KONTROLA 1 x 0,425 mL

Sadržaj: Razrijeđeni ljudski serum, u poznatoj koncentraciji protutijela na Proclin i Gentamicin. Tekućina, spremna za uporabu.

OSTALI ZATRAŽENI MATERIJAL, ALI NIJE DOSTAVLJEN

- WASHING BUFFER / PUFER ZA ISPIRANJE **REF** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 / OTOPINA ZA ČIŠĆENJE **REF** 83609
- SANITIZING SOLUTION / OTOPINA ZA DEZINFEKCIJU **REF** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT / NEGATIVNA KONTROLA RAZRJEĐIVAČ UZORKA **REF** 83607
- Destilirana ili deionizirana voda
- Normalna laboratorijska staklena oprema: cilindri, epruvete itd.
- Mikro pipete u stanju točno preuzeti volumene od 50-200 µl.
- Jednokratne rukavice
- 5% otopina natrijevog hipoklorita
- Spremnici za prikupljanje potencijalno zaraženih materijala

6. NAČIN ČUVANJA I STABILNOST REAGENSA

Reagense treba čuvati na 2/8 °C. U slučaju nepravilne temperature skladištenja kalibracija se mora ponoviti, a ispravnost rezultata provjeriti pomoću kontrolnog seruma (vidi poglavlje 9.: Validacija testa).

Datum isteka je otisnut na svakoj komponenti i na vanjskoj etiketi pakiranja.

Reagensi imaju ograničenu stabilnost nakon otvaranja i/ili pripreme:

UREĐAJI	8 tjedana na 2/8 °C
KALIBRATOR	8 tjedana na 2/8 °C
POZITIVNA KONTROLA	8 tjedana na 2/8 °C

7. VRSTA UZORAKA I ČUVANJE

Uzorak čini serum dobiven iz krvi uzete normalnom venepunkcijom i obrađene prema potrebi standardnim laboratorijskim postupcima. Svježi serum se može čuvati 4 dana na 2/8 °C; za dulja razdoblja čuvanja zamrznuti na -20 °C. Uzorak može proći do najviše 3 odmrzavanja. Izbjegavajte uporabu zamrzivača koji se sami odmrzavaju za čuvanje uzoraka. Nakon odmrzavanja pažljivo protresite prije doziranja. Na kvalitetu uzorka može ozbiljno utjecati mikroba kontaminacija koja može dovesti do netočnih rezultata. Jako lipemični uzorci, ikterični ili zagađeni uzorci ne mogu se koristiti.

8. POSTUPAK

- Otvorite oмотnicu (strana na kojoj se nalazi zatvaranje na pritisak), uzmite potreban broj uređaja za obavljanje pregleda i pohranite ostale te zatvorite vrećicu nakon što ste ispustili zrak.
- Vizualno provjerite stanje uređaja prema smjernicama iz poglavlja 4 „Analitička upozorenja“.
- Raspodijelite u jačicu br. 1 svakog uređaja 50 µl nerazrijeđenog seruma koji će se analizirati; pri svakoj promjeni serije koristite uređaj za kalibrator.
- Unesite uređaje u instrument Chorus. Izvršite kalibraciju (ako je potrebno) i ispitivanje kako je navedeno u Priručniku za uporabu instrumenta.

9. VALIDACIJA TESTA

Koristite kontrolni serum kako biste provjerili ispravnost dobivenog rezultata, obradivši ga kako je navedeno u priručniku za uporabu instrumenta. Ako instrument pokazuje da kontrolni serum ima vrijednost izvan granice prihvatljivosti, potrebno je ponovno provesti kalibraciju. Gore navedeni rezultati automatski će se ispraviti.

Ako je rezultat kontrolnog seruma i dalje izvan raspona prihvatljivosti, obratite se znanstvenoj podršci.

Tel: 0039 0577 319554
Faks: 0039 0577 366605
E- scientificsupport@diesse.it
pošta:

10. TUMAČENJE TESTA

Instrument Chorus pruža polukvantitativni rezultat u proizvoljno odabranim jedinicama (AU/ml).

Test na serumu koji se ispituje može se protumačiti na sljedeći način:

POZITIVAN kada je rezultat > 18 AU/ml

NEGATIVAN kada je rezultat < 12 AU/ml

SUMNJIV: kada je rezultat između 12 i 18 AU/ml

U slučaju sumnjivog rezultata ponovite test. Ako rezultat ostane sumnjiv, ponovite vađenje nakon 1-2 tjedna.

11. OGRANIČENJA TESTA

Rezultate uvijek treba tumačiti zajedno s drugim podacima iz kliničke procjene i iz drugih dijagnostičkih ispitivanja.

Za bolju procjenu profila protutijela uzorka bilo bi poželjno procijeniti i koncentraciju u IgM-u i IgG-u

Moguće je da uzorci uzeti u ranoj fazi infekcije možda još nisu razvili protutijela u dovoljnim količinama za otkrivanje; u slučaju sumnjivog ili negativnog rezultata preporučljivo je ponoviti vađenje nakon 2-3 tjedna i provesti novu analizu ako se kliničke sumnje nastave.

Prije uporabe lipemičnih ili mutnih uzoraka preporučuje se centrifugiranje ili filtriranje.

Tumačenje rezultata na temelju kombinacije testa IgG, IgM i IgA protutijela:

Razina protutijela M. pneumoniae			
IgG	IgM	IgA	Tumačenje
negativan	negativan	negativan	nema naznaka infekcije
negativan ili pozitivan	pozitivan	negativan ili pozitivan	naznaka infekcije u tijeku
pozitivan	negativan	negativan	naznaka prijašnje infekcije
negativan ili pozitivan	negativan	pozitivan	naznaka infekcije u tijeku

12. RASPON KALIBRACIJE

Raspon kalibracije 0-100,0 AU/ml.

Za uzorke > 100,0 AU/ml ponoviti test prethodnim razrjeđivanjem uzorka u Negative Control/Sample Diluent otopini (PF83607- nije isporučena s kompletom).

13. ANALITIČKA SPECIFIČNOST

Ispitana su 2 uzorka (1 cut-off i 1 negativan) kojima su dodani sljedeći disruptori:

Bilirubin (15 mg/dl – 60mg/dl)
Trigliceridi (7,5 mg/ml – 30 mg/ml)
Hemoglobin (2,5 mg/ml – 10 mg/ml)
RF (30 IU/ml – 150 IU/ml)

Prisutnost gore navedenih ometajućih tvari u ispitnom serumu ne mijenja rezultat ispitivanja.

14. DIJAGNOSTIČKA OSJETLJIVOST I SPECIFIČNOST

U jednom istraživanju analizirana su 102 uzorka s kompletom Diesse i s još jednim drugim komercijalnim kompletom.

Rezultati ispitivanja sažeti su u nastavku:

		Referenca		
		+	-	Ukupno
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Ukupno	20	82	102

Dijagnostička osjetljivost: 100,0 % $CI_{95\%}$: 83.9 – 100.0

Dijagnostička specifičnost: 90,2 % $CI_{95\%}$: 81.9 – 95.0

15. PRECIZNOST

PRECIZNOST UNUTAR SESIJE

	Replicira no	Prosječno AU/ml	D.S.	CV%
Uzor. 1	5	10.0	0.00	0.0
Uzor. 2	5	20.5	2.47	12.0
Uzor. 3	4	69.4	3.46	5.0
Uzor. 4	4	35.7	4.81	13.5

PRECIZNOST IZMEĐU SESIJA

	Prosječno AU/ml			Prosjek	D.S.	CV%
	1. dan	2. dan	3. dan			
Uzor. 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Uzor. 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Uzor. 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Uzor. 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Uzor. 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Uzor. 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAFIJA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000), 146,741-747
3. S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, str.1295-1299, Prosinac 1988.



INSTRUKCJA OBSŁUGI

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. ZASTOSOWANIE

Metoda immunoenzymatyczna do półilościowego oznaczania przeciwciał IgA przeciwko *Mycoplasma pneumoniae* w surowicy ludzkiej za pomocą jednorazowego wyrobu stosowanego w aparatach Chorus i Chorus TRIO.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Do półilościowego oznaczania przeciwciał IgA anty *Mycoplasma pneumoniae*

Tylko do diagnostyki *in vitro*

2. WPROWADZENIE

Mycoplasma pneumoniae jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym zapalenia płuc w społeczności, zwłaszcza w grupie wiekowej od 5 do 30 lat; może być odpowiedzialna za epidemie, które rozwijają się powoli, ponieważ okres inkubacji wynosi od 10 do 14 dni, a zarażenie dotyczy bliskich kontaktów lub grup wydzielonych (szkoły, koszary, gospodarstwa domowe). *Mycoplasma pneumoniae* jest również nazywana pierwotnym atypowym zapaleniem płuc lub zapaleniem płuc wywołanym przez czynnik Eatona.

M. pneumoniae atakuje i niszczy komórki włoskowate błony śluzowej dróg oddechowych. Mikroskopowo powoduje śródmiąższowe zapalenie płuc, zapalenie oskrzeli i oskrzelików.

W przypadkach zapalenia płuc, biorąc pod uwagę nawroty objawów dla różnych czynników etiologicznych, do rozpoznania ostrego zakażenia niezbędne są dodatkowe środki diagnostyczne, takie jak badania serologiczne.

Odpowiedź immunologiczna po zakażeniu *Mycoplasma pneumoniae* wydaje się być związana z typem samego zakażenia: przeciwciała klasy IgM są obecne częściej w przypadkach zakażenia pierwotnego, o czym świadczy ich występowanie u młodszych pacjentów. U starszych pacjentów z większym prawdopodobieństwem ponownego zakażenia, zawartość IgM jest niska lub niewykrywalna; w przeciwieństwie do tego, IgA są markerem o najwyższej czułości w trwających zakażeniach, reinfekcjach lub niedawnych zakażeniach.

Swoiste przeciwciała klasy A pojawiają się wcześniej, na początku choroby i osiągają wysokie miano w ciągu pierwszych 4 tygodni, po czym gwałtownie zanikają przed IgG, co pozwala na rozpoznanie ostrego zakażenia nawet na podstawie jednej próbki krwi. IgG pojawia się po IgM i IgA, średnio osiągając

szczyt w 5 tygodniu. Wysokie miano, któremu towarzyszy znaczny wzrost między dwoma pobraniami próbek w odstępie około dwóch tygodni, potwierdza obecność trwającego zakażenia.

Antygen stosowany w teście do serologicznego oznaczania swoistych IgA, pochodzi z ekstraktu błonowego *M. pneumoniae* zawierającego znaczne ilości cytoadhezyny P1, która jest antygenem immunodominującym i odpowiada białku transmembranowemu, głównie odpowiedzialnemu za cytoadherencję *M. pneumoniae* do nabłonka oddechowego gospodarza.

3. ZASADA METODY

Test jest oparty na metodzie pośredniej ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Antygen, składający się z ekstraktu inaktywowanej *Mycoplasma pneumoniae*, wiąże się z fazą stałą. Poprzez inkubację badanej ludzkiej surowicy, swoiste IgA wiążą się z antygenem.

Po płukaniu w celu usunięcia nieprzereagowanych białek przeprowadza się inkubację z koniugatem składającym się ze sprzężonych z peroksydazą chrzanową ludzkich przeciwciał antyimmunoglobulinowych.

Niezwiązany koniugat jest usuwany i dodawany jest substrat do peroksydazy.

Powstający kolor jest proporcjonalny do stężenia swoistych przeciwciał obecnych w badanej surowicy.

Wyroby jednorazowe zawierają wszystkie odczynniki do badań w aparatach Chorus/Chorus TRIO.

4. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

TYLKO DO DIAGNOSTYKI *IN VITRO*.

Ten zestaw zawiera materiały pochodzenia ludzkiego, które zostały przetestowane i uznane za ujemne w zatwierdzonych przez FDA testach zarówno dla HBsAg, jak i przeciwciał anti-HIV-1, anti-HIV-2 i anti-HCV. Ponieważ żaden test diagnostyczny nie może dać całkowitej gwarancji braku czynników zakaźnych, każdy materiał pochodzenia ludzkiego należy uznać za potencjalnie zakażony. Ze wszystkimi odczynniki i próbkami należy obchodzić się zgodnie z zasadami bezpieczeństwa przyjętymi zwykle w laboratorium.

Usuwanie pozostałości: zużyte próbki surowicy, kalibratory i paski należy traktować jak zakażone pozostałości, a następnie usunąć zgodnie z przepisami.

Ostrzeżenia dotyczące bezpieczeństwa osobistego

1. Nie należy pipetować ustami. Podczas pracy z próbkami i w trakcie badania należy używać jednorazowych rękawic i ochrony oczu. Po zakończeniu badania należy dokładnie umyć ręce.
2. Poniższe odczynniki zawierają niskie stężenia substancji szkodliwych lub drażniących:
 - k) Koniugat i kontrole zawierają fenol.
 - l) Substrat jest kwaśny.

W przypadku kontaktu odczynnika ze skórą lub oczami należy dokładnie przemyć wodą.

- Zneutralizowane kwasy i inne odpady płynne należy zdezynfekować przez dodanie podchlorynu sodu w ilości wystarczającej do uzyskania końcowego stężenia co najmniej 1%. Ekspozycja na 1% podchloryn sodu przez 30 minut powinna być wystarczająca do zapewnienia skutecznej dezynfekcji.
- Wszelkie rozlane potencjalnie zakażone materiały należy natychmiast usunąć za pomocą chłonnego papieru, a zanieczyszczony obszar przed kontynuacją pracy odkazić, np. 1% podchlorynem sodu. W przypadku obecności kwasu, podchloryn sodu nie może być stosowany do czasu osuszenia obszaru. Wszystkie materiały użyte do odkażania przypadkowych wycieków, w tym rękawice, muszą być wyrzucone jako odpady potencjalnie zakażone. Nie należy poddawać autoklawowaniu materiałów zawierających podchloryn sodu.

Ostrzeżenia analityczne

Przed użyciem doprowadzić wyroby do temperatury pokojowej (18-30°C) i użyć w ciągu 60 minut.

- Wyrzucić urządzenie z substratem (studzienka 4) zabarwionym na niebiesko.**
- Podczas dodawania próbki do studzienki należy sprawdzić, czy jest ona idealnie rozprowadzona na dnie.
- Sprawdzić rzeczywistą obecność odczynników w wyrobie oraz stan samego wyrobu, nie używać wyrobów, które przy oględzinach wykazują brak jakiegось odczynnika.
- Wyroby muszą być używane w połączeniu z aparatem Chorus, ściśle przestrzegając instrukcji obsługi oraz instrukcji obsługi aparatu.
- Sprawdzić, czy aparat Chorus jest ustawiony prawidłowo (patrz Instrukcja obsługi Chorus).
- Nie należy zmieniać kodu kreskowego na uchwycie urządzenia, aby umożliwić jego prawidłowy odczyt przez urządzenie.
- Do przechowywania próbek unikać stosowania samoodmrażających się zamrażarek.
- Wadliwe kody kreskowe mogą być ręcznie wprowadzone do aparatu.
- Podczas przechowywania i użytkowania nie należy narażać wyrobów na działanie silnego światła lub oparów podchlorynu.
- Stosowanie próbek silnie zhemolizowanych lub próbek z zanieczyszczeniem mikrobiologicznym może być źródłem błędów.
- Przed włożeniem wyrobu do aparatu Chorus należy się upewnić, że studzienka reakcyjna nie zawiera żadnych ciał obcych.
- Odpipetować badaną surowicę (50 µl) do studzienki 1 wyrobu (patrz rysunek).
- Nie należy używać wyrobu po upływie terminu ważności.
- Sprawdzić, czy aparat ma połączenie z buforem do płukania (Odn. 83606)**

5. SKŁAD ZESTAWU I PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Zestaw wystarcza na 36 oznaczeń

DD WYROBY 6 opakowań po 6 wyrobów w każdym
Opis:



Pozycja 8: Dostępne miejsce na etykiecie z kodem kreskowym

Pozycja 7: Puste

Pozycja 6: STUDZIENKA NA MIKROPŁYTKĘ

Uczulony na antygen *Mycoplasma pneumoniae*

Pozycja 5: STUDZIENKA

Nieuczulona.

Pozycja 4: SUBSTRAT TMB

Zawartość: Tetrametylobenzzydina 0,26 mg/ml i H₂O₂ 0,01% stabilizowane w buforze cytrynianowym 0,05 mol/l (pH 3,8)

Pozycja 3: ROZCIEŃCZALNIK DO PRÓBEK

Zawartość: Roztwór białka, zawierający fenol 0,05%, Bronidox 0,02% oraz wskaźnik do wykrywania obecności surowicy.

Pozycja 2: SKONIUGOWANY

Zawartość: znakowane peroksydazą monoklonalne przeciwciała przeciwko ludzkim IgA w roztworze buforowanym fosforanem zawierającym 0,05% fenolu i Bronidox 0,02%.

Pozycja 1: PUSTA STUDZIENKA

Gdzie użytkownik musi dozować nierozcieńczoną surowicę.

Sposób użycia: doprowadzić kopertę do temperatury pokojowej, otworzyć kopertę, wyjąć wymagane wyroby; pozostałe umieścić w kopercie zawierającej żel krzemionkowy, wypuścić powietrze i **zakleić**, naciskając na zamknięcie. Przechowywać w temperaturze 2/8°C.

CALIBRATOR KALIBRATOR 1 x 0,175 ml

Zawartość: Rozcieńczona surowica ludzka, znane stężenie przeciwciał z Proclinem i Gentamycyną. Płynna, gotowa do użycia.

CONTROL + KONTROLA DODATNIA 1 x 0,425 ml

Zawartość: Rozcieńczona surowica ludzka, znane stężenie przeciwciał z Proclinem i Gentamycyną. Płynna, gotowa do użycia.

INNE WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE MATERIAŁY:

- WASHING BUFFER **ODN** 83606
- CLEANING SOLUTION 2000 **ODN** 83609
- SANITIZING SOLUTION **ODN** 83604 - 83608
- CHORUS NEGATIVE CONTROL/SAMPLE DILUENT **ODN** 83607
- Woda destylowana lub dejonizowana
- Zwykle szkło laboratoryjne: cylindry, próbówki itp.
- Mikropipety umożliwiające dokładne pobieranie objętości 50-200 µl.
- Rękawice jednorazowe
- 5% roztwór podchlorynu sodu

- Pojemniki do zbierania potencjalnie zakażonych materiałów

6. PRZECHOWYWANIE I STABILNOŚĆ ODCZYNNIKÓW

Odczynniki należy przechowywać w temperaturze 2/8°C. W przypadku nieprawidłowej temperatury przechowywania, należy powtórzyć kalibrację i sprawdzić poprawność wyniku za pomocą serum kontrolnego (patrz rozdział 9: Walidacja badania).

Data ważności jest wydrukowana na każdym elemencie oraz na zewnętrznej etykiecie opakowania.

Odczynniki mają ograniczoną stabilność po otwarciu i/lub przygotowaniu:

WYROBY	8 tygodni w temperaturze 2/8°C
KALIBRATOR	8 tygodni w temperaturze 2/8°C
KONTROLA DODATNIA	8 tygodni w temperaturze 2/8°C

7. RODZAJ PRÓBEK I ICH PRZECHOWYWANIE

Próbka jest surowicą uzyskaną z krwi pobranej przez zwykłe nakłucie żyły i traktowaną zgodnie z wymaganiami standardowych procedur laboratoryjnych. Świeża surowica może być przechowywana przez 4 dni w temperaturze 2/8°C; w przypadku dłuższego okresu przechowywania należy ją zamrozić w temperaturze -20°C. Próbka może być poddana maksymalnie 3 rozmrożeniom. Do przechowywania próbek unikać stosowania samoodmrażających się zamrażarek. Po rozmrożeniu, przed dozowaniem dokładnie wstrząsnąć. Na jakość próbki może mieć poważny wpływ zanieczyszczenie mikrobiologiczne, które może prowadzić do błędnych wyników. Nie można stosować próbek silnie lipemicznych, miazdżycowych lub zanieczyszczonych.

8. PROCEDURA

1. Otworzyć kopertę (strona zawierająca zamknięcie zaciskowe), wyjąć wyroby potrzebne do wykonania badań, a pozostałe zachować, zamykając ponownie kopertę po wypuszczeniu powietrza.
2. Wzrokowo sprawdzić stan wyrobu zgodnie z instrukcjami zawartymi w rozdziale 4 „Ostrzeżenia analityczne”.
3. Wprowadzić 50 µl nierozcieńczonej surowicy, która ma być analizowana, do studzienki nr 1 każdego wyrobu; użyć urządzenia kalibrującego przy każdej zmianie partii.
4. Umieścić wyroby na aparacie Chorus. Przeprowadzić kalibrację (jeśli jest wymagana) i test zgodnie z Instrukcją obsługi aparatu.

9. WALIDACJA BADANIA

Za pomocą surowicy kontrolnej sprawdzić poprawność uzyskanego wyniku, przetwarzając go zgodnie z instrukcją obsługi aparatu. Jeśli urządzenie wskaże, że surowica kontrolna ma wartość poza dopuszczalną granicą, należy ponownie przeprowadzić kalibrację. Poprzednie wyniki zostaną skorygowane automatycznie.

Jeżeli wynik surowicy kontrolnej nadal znajduje się poza dopuszczalnym zakresem, należy skontaktować się z Scientific Support.

Tel.: 0039 0577 319554
Faks: 0039 0577 366605
email: scientificsupport@diesse.it

10. INTERPRETACJA BADANIA

Aparat Chorus dostarcza półilościowy wynik w jednostkach arbitralnych (AU/ml).

Badanie na surowicy można zinterpretować w następujący sposób:

DODATNI: gdy wynik jest > 18 IU/ml
UJEMNY: gdy wynik jest < 12 IU/ml
WĄTPLIWY: gdy wynik jest pomiędzy 12 a 18 AU/ml

W przypadku wątpliwego wyniku badanie należy powtórzyć. Jeśli wynik pozostaje wątpliwy, powtórzyć pobranie próbki po 1-2 tygodniach.

11. OGRANICZENIA BADANIA

Wyniki muszą być zawsze interpretowane łącznie z innymi danymi z oceny klinicznej i innych badań diagnostycznych.

Dla lepszej oceny profilu przeciwciał w próbce, wskazane byłoby również oszacowanie stężenia IgM i IgG.

Możliwe jest, że w próbkach pobranych we wczesnym stadium zakażenia nie wytworzyły się jeszcze przeciwciała w ilości wystarczającej do wykrycia; w przypadku wątpliwości lub wyników ujemnych zaleca się powtórzenie próbki 2-3 tygodnie później i wykonanie nowego badania, jeśli utrzymują się podejrzenia kliniczne.

Przed użyciem próbek lipemicznych lub mętnych zaleca się odwirowanie lub filtrację.

Interpretacja wyników na podstawie kombinacji badania przeciwciał IgG, IgM i IgA:

Poziom przeciwciał M. pneumoniae			
IgG	IgM	IgA	Interperetacja
ujemny	ujemny	ujemny	brak oznak zakażenia
ujemny lub dodatni	dodatni	ujemny lub dodatni	wskazanie bieżącego zakażenia
dodatni	ujemny	ujemny	wskazanie wcześniejszego zakażenia
ujemny lub dodatni	ujemny	dodatni	wskazanie bieżącego zakażenia

12. ZAKRES KALIBRACJI

Zakres kalibracji 0-100,0 AU/ml.

Dla próbek > 100,0 AU/ml powtórzyć test rozcieńczając wstępnie próbkę w Negative Control/Sample Diluent (PF83607-niedolączony do zestawu).

13. SWOISTOŚĆ ANALITYCZNA

Badano dwie próbki (1 cut-off i 1 ujemna), do których dodano następujące interferenty:

Bilirubina (15 mg/dl - 60mg/dl)
Triglicerydy (7,5 mg/ml - 30 mg/ml)
Hemoglobina (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)
RF (30 IU/ml - 150 IU/ml)

Obecność powyższych substancji zakłócających w badanej surowicy nie zmienia wyniku badania.

14. CZUŁOŚĆ I SWOISTOŚĆ DIAGNOSTYCZNA

W jednym badaniu 102 próbki zostały przeanalizowane zarówno przy użyciu zestawu Diesse, jak i innych zestawów komercyjnych.

Wyniki eksperymentu zostały przedstawione poniżej:

		Oдноśnik		
		+	-	Razem
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Razem	20	82	102

Czułość diagnostyczna: 100,0% CI_{95%}: 83.9 – 100.0

Swoistość diagnostyczna: 90,2% CI_{95%}: 81.9 – 95.0

15. PRECYZJA

PRECYZJA W RAMACH SESJI

	Liczba powtórzeń	Średnia AU/ml	D.S.	CV%
Prób. 1	5	10.0	0.00	0.0
Prób. 2	5	20.5	2.47	12.0
Prób. 3	4	69.4	3.46	5.0
Prób. 4	4	35.7	4.81	13.5

PRECYZJA MIĘDZY SESJAMI

	Średnia AU/ml			Średnia	D.S.	CV%
	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3			
Prób. 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Prób. 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Prób. 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Prób. 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Prób. 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Prób. 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAFIA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).

2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000),146,741-747
3. S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.



KASUTUSJUHE

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA

1. KASUTA

Ensüümimmunoloogiline meetod *Mycoplasma pneumoniae* vastaste IgA antikehade poolkvantitatiivseks määramiseks inimese seerumis Chorus ja Chorus TRIO seadmetel kasutatava ühekordse seadme abil.

CHORUS MYCOPLASMA PNEUMONIAE IgA Antikehade poolkvantitatiivseks määramiseks IgA anti *Mycoplasma pneumoniae* vastu

Ainult diagnostiliseks kasutamiseks *in vitro*

2. SISSEJUHATUS

Mycoplasma pneumoniae on kõige levinum kogukonnas esineva kopsupõletiku etioloogiline haigustekitaja, eriti vanuses 5-30 aastat; see võib põhjustada epideemiaid, mis arenevad aeglaselt, kuna inkubatsiooniperiood on 10-14 päeva ja nakatumine toimub lähedaste kontaktide või eraldatud rühmade (koolid, kasarmud, kodumajapidamised) kaudu. Mükoplasmakopsupõletikku nimetatakse ka primaarseks atüüpiliseks kopsupõletikuks või Eaton'i agendi kopsupõletikuks. *M. pneumoniae* ründab ja hävitab hingamisteede limaskesta kiilse epiteelirakke. Mikroskoopiliselt põhjustab see interstiitsiaalset kopsupõletikku, bronhiiti ja bronhioliiti.

Kopsupõletiku puhul, arvestades erinevate etioloogiliste tekitajate sümptomite kordumist, on ägeda nakkuse diagnoosimiseks vaja täiendavaid diagnostilisi vahendeid, näiteks seroloogilisi teste.

Mycoplasma pneumoniae infektsiooni järgne immuunvastus näib olevat seotud infektsiooni tüübiga: IgM-klassi antikehad esinevad sagedamini esmase infektsiooni korral, nagu näitab nende esinemine noorematel patsientidel. Vanematel patsientidel, kellel on suurem tõenäosus reinfektsiooniks, on IgM madal või määramata; seevastu IgA on kõige tundlikum marker käimasolevate infektsioonide, reinfektsioonide või hiljutiste infektsioonide puhul.

A-klassi spetsiifilised antikehad ilmnevad varakult, haiguse alguses ja saavutavad kõrge tiitri esimese 4 nädala jooksul, seejärel langevad järsult enne IgG, mis võimaldab ägeda nakkuse diagnoosimist isegi ühe vereproovi alusel. IgG ilmub pärast IgM ja IgA, saavutades keskmiselt tippaseme 5. nädalal. Kõrge tiiter, millega kaasneb märkimisväärne tõus kahe umbes 2 nädala tagant võetud proovi vahel, kinnitab käimasoleva nakkuse olemasolu.

Spetsiifilise IgA seroloogilise määramise testis kasutatav antigeen on saadud *M. pneumoniae* membraaniekstraktist, mis sisaldab märkimisväärse koguses tsütoadhesiini P1, mis on immunodomeeriv antigeen ja vastab transmembraanvalgule, mis vastutab peamiselt *M. pneumoniae* tsütoadhesiivsuse eest peremeesorganismi hingamisteede epiteelile.

3. MEETODI PÕHIMÕTE

Test põhineb kaudsel ELISA-meetodil (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Antigeen, mis koosneb inaktiveeritud *Mycoplasma pneumoniae* ekstraktist, on seotud tahke faasiga. Inimese testseerumi inkubeerimisel seondub antigeeniga spetsiifiline IgA.

Pärast pesemist, et eemaldada reageerimata valgud, inkubeeritakse konjugaadiga, mis koosneb mädarõika-peroksidaasiga konjugeeritud monoklonaalsetest anti-inimese IgA antikehadest.

Sidumata konjugaat eemaldatakse ja lisatakse peroksidaasi substraat.

Tekkiv sinine värvus on proportsionaalne testseerumis olevate spetsiifiliste antikehade kontsentratsiooniga.

Korduvkasutatavad seadmed sisaldavad kõiki reaktiive, mis on vajalikud Chorus'i seadmetele rakendatud testi läbiviimiseks.

4. ETTEVAATUST

AINULT DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS *IN VITRO*.

See komplekt sisaldab inimpäritolu materjale, mis on testitud ja leitud negatiivseks FDA poolt heakskiidetud testides nii HBsAg kui ka HIV-1-, HIV-2 ja HCV-vastaste antikehade suhtes. Kuna ükski diagnostiline test ei saa anda täielikku garantiid nakkusetekitajate puudumise kohta, tuleb igasugust inimpäritolu materjali pidada potentsiaalselt nakatunuks. Kõiki reagente ja proove tuleb käsitleda vastavalt laboris tavaliselt vastuvõetud ohutusstandarditele.

Jääkide kõrvaldamine: kasutatud seerumiproove, kalibraatoreid ja ribasid tuleb käsitleda kui nakatunud jääke ja seejärel kõrvaldada vastavalt eeskirjadele.

Isikliku ohutuse hoiatused

- Ärge pipeteerige suu kaudu. Proovide käitlemisel ja katse ajal kasutage ühekordselt kasutatavaid kindaid ja silmakaitsevahendeid. Pärast proovi võtmist peske oma käed põhjalikult.
- Järgmised reagentid sisaldavad vähesel määral kahjulikke või ärritavaid aineid:
 - Konjugaat ja kontrollid sisaldavad fenooli
 - Substraat on happeline
 Kui reagent satub nahale või silmadesse, peske seda põhjalikult veega.
- Neutraliseeritud happed ja muud vedelad jäätmed tuleb desinfitseerida, lisades piisavas koguses naatriumhüpokloriiti, et saavutada lõplik kontsentratsioon

vähemalt 1%. Tõhusaks desinfitseerimiseks peaks olema piisav kokkupuude 1% naatriumhüpokloriidiga 30 minuti jooksul.

- Võimalikult nakatunud materjalide lekked tuleb viivitamatult eemaldada absorbeeriva paberiga ja saastunud ala tuleb enne töö jätkamist dekontamineerida, nt 1%-lise naatriumhüpokloriidiga. Happe olemasolu korral ei tohi naatriumhüpokloriidi kasutada enne, kui ala on kuivatatud. Kõik juhusliku lekke kõrvaldamiseks kasutatud materjalid, sealhulgas kindad, tuleb hävitada kui potentsiaalselt nakkusohhtlikud jäämed. Mitte autoklaavida materjale, mis sisaldavad naatriumhüpokloriiti.

Analüütilised hoiatused

Enne kasutamist viige seadmed toatemperatuurile (18-30 °C) ja kasutage 60 minuti jooksul.

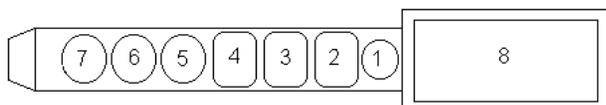
- Visake ära seadmed, mille substraat (süvend 4) on värvitud siniseks.**
- Proovi lisamisel süvendisse kontrollige, et see oleks põhjas ideaalselt jaotunud.
- Kontrollige reagentide tegelikku olemasolu seadmes ja seadme enda tervikklikkust, ärge kasutage seadmeid, mille visuaalne kontroll näitab mõne reagenti puudumist.
- Seadmeid tuleb kasutada koos Chorus seadmega, järgides rangelt kasutusjuhendit ja seadme kasutusjuhendit.
- Kontrollige, kas Chorus instrument on õigesti seadistatud (vt Chorus kasutusjuhend).
- Ärge muutke seadme käepidemel olevat vöötkoodi, et seade saaks seda õigesti lugeda.
- Vältige isesulavate sügavkülmikute kasutamist proovide säilitamiseks.
- Defektsed vöötkoodid saab seadmesse käsitsi sisestada.
- Ärge pange seadmeid hoiustamise ja kasutamise ajal kokku tugeva valguse või hüpokloriidaurudega.
- Tugevalt hemolüüsunud proovide või mikroobidega saastunud proovide kasutamine võib olla vigade allikaks.
- Enne seadme sisestamist Chorus seadmesse veenduge, et reaktsioonisüvendis ei sisaldaks võõrkehi.
- Pipeteerige testseerum (50 µl) seadme 1. süvendis (vt joonis).
- Ärge kasutage seadet pärast kõlblikkusaega
- Kontrollige, et seadmel oleks ühendus Washing Buffer-iga (Ref. 83606)**

5. KOMPLEKTI KOOSTIS JA REAGENTIDE VALMISTAMINE

Komplektist piisab 36 määramiseks

DD SEADMED 6 pakki 6 seadmega igaiühes

Kirjeldus:



Positsioon 8: Vaba ruum vöötkoodi etiketi jaoks

Positsioon 7: Tühi

Positsioon 6: MIKROPLAADI SÜVEND

Sensibiliseeritud *Mycoplasma pneumoniae* antigeeniga

Positsioon 5: SÜVEND

Ei ole sensibiliseeritud.

Positsioon 4: TMB SUBSTRAAT

Sisu: Tetrametüülbensidiin 0,26 mg/mL ja H₂O₂ 0,01% stabiliseeritud tsitraadipuhvril 0,05 mol/l (pH 3,8)

Positsioon 3: PROOVIDE LAHJENDAJA

Sisu: Valgulahus, mis sisaldab fenooli 0,05%, Bronidox 0,02% ja indikaatorit seerumi olemasolu tuvastamiseks.

Positsioon 2: KONJUGAAT

Sisu: peroksidaasiga märgistatud monoklonaalsed inimese IgA-vastased antikehad fosfaatpuhverdatud lahuses, mis sisaldab 0,05% fenooli ja 0,02% Bronidoxi.

Positsioon 1: TÜHI SÜVEND

Kuhu kasutaja peab väljastama lahjendamata seerumi.

Kasutamine: tasakaalustage kott toatemperatuurini, avage kott, võtke välja vajalikud seadmed; asetage teised silikageeli sisaldavasse kotti, laske õhk välja ja sulgege, vajutades sulgurile. Säilitada temperatuuril 2/8 °C.

KALIBRAATOR KALIBRAATOR 1 x 0,175 ml

Sisu: Lahjendatud inimseerum, antikehade teadaolev kontsentratsioon koos prokliiniga ja gentamüsiiniga. Vedel, kasutusvalmis.

KONTROLL + POSITIIVNE KONTROLL 1 x 0,425 ml

Sisu: Lahjendatud inimseerum, antikehade teadaolev kontsentratsioon koos prokliiniga ja gentamüsiiniga. Vedel, kasutusvalmis.

VAJALIK ON MUU MATERJAL, MIDA POLE KAASAS

- PESUPUHVVER [REF](#) 83606
- PUHASTUSLAHUS 2000 [REF](#) 83609
- DESINFITSEERIMISLAHUS [REF](#) 83604 - 83608
- KOOR NEGATIIVNE KONTROLL/PROOVI LAHJENDAJA [REF](#) 83607
- Destilleeritud või deioniseeritud vesi
- Tavalised laboratoorsed klaastarbed: balloonid, katseklaasid jne.
- Mikropipetid, mis suudavad täpselt võtta 50-200 µl mahte.
- Ühekordseks kasutamiseks mõeldud kindad
- 5%-line naatriumhüpokloriidi lahus
- Konteinerid potentsiaalselt nakatunud materjalide kogumiseks

6. REAGENTIDE SÄILITAMINE JA STABIILSUS

Reagentid tuleb säilitada temperatuuril 2/8 °C. Vale säilitustemperatuuri korral tuleb kalibreerimist korrata ja tulemuse õigsust kontrollida kontrollseerumi abil (vt 9. peatükk: Testi valideerimine).

Aegumiskuupäev on trükitud igale komponendile ja välispakendi etiketile.

Reagentide stabiilsus pärast avamist ja/või valmistamist on piiratud:

SEADMED	8 nädalat temperatuuril 2/8°C
KALIBRAATOR	8 nädalat temperatuuril 2/8°C
POSITIIVNE KONTROLL	8 nädalat temperatuuril 2/8°C

7. PROOVIDE TÜÜP JA SÄILITAMINE

Prooviks on seerum, mis on saadud tavalise veenipunktsiooni teel võetud verest ja mida käideldakse vastavalt standardsetele laboratoorsele protseduuridele. Värsket seerumit võib säilitada 4 päeva temperatuuril 2/8 °C; pikemaks säilitamiseks külmutage see temperatuuril -20 °C. Proov võib läbida maksimaalselt 3 sulatamist. Vältige isesulatuivate sügavkülmikute kasutamist proovide säilitamiseks. Pärast sulatamist raputage hoolikalt enne doseerimist. Proovi kvaliteeti võib tõsiselt mõjutada mikroobne saastumine, mis võib viia vigaste tulemusteni.

Tugevalt lipaeemilisi, ikterilisi või saastunud proove ei saa kasutada.

8. MENETLUS

1. Avage kott (survetihendit sisaldav pool), võtke välja nii palju seadmeid, kui on vaja uuringute läbiviimiseks, ja hoidke ülejäänud, sulgedes koti pärast õhu väljapumpamist uuesti.
2. Kontrollige seadme seisundit visuaalselt vastavalt 4. peatükis "Analüütilised hoiatused" toodud juhiste.
3. Annustada 50 µl analüüsivat lahjendamata seerumit iga seadme süvendisse nr. 1; kasutada iga partii vahetamisel kalibraatorseadet.
4. Sisestage seadmed Chorus'i instrumendile. Viige läbi kalibreerimine (kui see on vajalik) ja testimine vastavalt seadme kasutusjuhendile.

9. TESTI VALIDEERIMINE

Kasutage saadud tulemuse õigsuse kontrollimiseks kontrollseerumit, töödeldes seda vastavalt seadme kasutusjuhendile. Kui seade näitab, et kontrollseerumi väärtus jääb väljapoole vastuvõetavat piiri, tuleb kalibreerimine uuesti läbi viia. Varasemad tulemused parandatakse automaatselt. Kui kontrollseerumi tulemus jääb jätkuvalt vastuvõetavast vahemikust väljapoole, võtke ühendust teadusliku toega.

Tel: 0039 0577 319554
Faks: 0039 0577 366605
e-post: scientificsupport@diesse.it

10. TESTI TÕLGENDAMINE

Instrument Chorus annab poolkvalitatiivse tulemuse suvalistes ühikutes (AU/ml).

Testseerumi testi võib tõlgendada järgmiselt:

POSITIIVNE, kui tulemus on > 18 AU/ml

NEGATIIVNE, kui tulemus on < 12 AU/ml

KAHTLANE: kui tulemus jääb vahemikku 12-18 AU/ml

Kahtlase tulemuse korral korrake testi. Kui tulemus jääb kahtlaseks, korrake proovi 1-2 nädala pärast.

11. TESTI PIIRANGUD

Tulemusi tuleb alati tõlgendada koos muude kliinilise hindamise ja muude diagnostiliste uuringute andmetega.

Proovi antikehaprofiili paremaks hindamiseks oleks soovitatav hinnata ka selle IgM- ja IgG-kontsentratsiooni

On võimalik, et nakkuse varajases staadiumis võetud proovid ei ole veel piisavas koguses antikehi välja arenenud, et neid oleks võimalik tuvastada; kahtluse või negatiivsete tulemuste korral on soovitatav 2-3 nädalat hiljem proovi korrata ja teha uus test, kui kliiniline kahtlus püsib.

Enne lipaeemiliste või häguste proovide kasutamist soovitatakse tsentrifuugimist või filtreerimist.

IgG, IgM ja IgA antikehade analüüsi kombinatsioonil põhinevate tulemuste tõlgendamine:

M. pneumoniae antikehade tase			
IgG	IgM	IgA	Tõlgendamine
negatiivne	negatiivne	negatiivne	puuduvad viited infektsioonile
negatiivne või positiivne	positiivne	negatiivne või positiivne	märk praegusest infektsioonist
positiivne	negatiivne	negatiivne	märk varasemast infektsioonist
negatiivne või positiivne	negatiivne	positiivne	märk praegusest infektsioonist

12. KALIBREERIMISVAHEMIK

Kalibreerimisvahemik 0-100,0 AU/ml.

Proovide puhul > 100,0 AU/ml korrake testi, lahjendades proovi eelnevalt negatiivse kontrolli/proovi lahjendajaga (PF83607 - ei ole komplektiga kaasas).

13. ANALÜÜTILINE SPETSIIFILISUS

Katsetati 2 proovi (1 katkestatud ja 1 negatiivne), millele lisati järgmised interferendid:

Bilirubiin (15 mg/dl - 60mg/dl)
Triglütseriidid (7,5 mg/ml - 30 mg/ml)
Hemoglobiin (2,5 mg/ml - 10 mg/ml)
RF (30 IU/ml - 150 IU/ml)

Eespool nimetatud häirivate ainete esinemine uuritavas seerumis ei muuda testi tulemust.

14. DIAGNOSTILINE TUNDLIKKUS JA SPETSIIFILISUS

Ühes uuringus analüüsiti 102 proovi nii Diesse'i komplekti kui ka teiste kommertslike komplektidega.

Katse tulemused on esitatud allpool:

Viide

		+	-	Kokku
Diesse	+	20	8	28
	-	0	74	74
	Kokku	20	82	102

Diagnostiline tundlikkus: 100.0 % CI_{95%}: 83.9 - 100.0

Diagnostiline spetsiifilisus: 90.2 % CI_{95%}: 81.9 - 95.0

15. TÄPSUS

TÄPSUS SEANSI JOOKSUL

	Korduste arv	Keskmine AU/ml	D.S.	CV%
Proov 1	5	10.0	0.00	0.0
Proov 2	5	20.5	2.47	12.0
Proov 3	4	69.4	3.46	5.0
Proov 4	4	35.7	4.81	13.5

TÄPSUS SEANSSIDE VAHEL

	Keskmine AU/ml			Keskmine	D.S.	CV%
	Päev 1	Päev 2	Päev 3			
Proov 1	20.3	20.5	24.1	21.6	2.14	9.9
Proov 2	48.9	43.9	44.7	45.8	2.69	5.9
Proov 3	11.9	10.3	10.0	10.7	1.02	9.5
Proov 4	10.0	10.0	10.0	10.0	0.00	0.0
Proov 5	55.0	55.4	57.8	56.1	1.51	2.7
Proov 6	18.2	16.4	17.5	17.4	0.91	5.2

16. BIBLIOGRAAFIA

1. G. B. Wisdom: Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22: 1243 (1976).
2. G. Layh-Schmitt: Proteins complexed to the P1 adhesin of Mycoplasma pneumoniae. Microbiology (2000), 146,741-747
3. S. Rotten: Interaction of Mycoplasma With Host Cells. Physiol.Rev.83:417-432,2003
4. J. Petitjean: Evaluation of four Commercial Immunoglobulin G and IgM-Specific Enzyme Immunoassays for Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infections. J. Clin. Microbiol. 2002 40:165-171
5. E. Jacobs: Isolation of the Adherence Protein of Mycoplasma pneumoniae by Fractionated Solubilization and size exclusion Chromatography. Biol.Chem Vol.369, pp.1295-1299, December 1988.

	EN ES IT CS HR BG	Date of manufacture Fecha de fabricación Data di fabbricazione Datum výroby Datum proizvodnje Дата на производство	FR EL PT RO DE ET PL	Date de fabrication Ημερομηνία Παραγωγής Data de fabrico Data fabricatiei Herstellungsdatum Valmistamise kuupäev Data produkcji
	EN ES IT CS HR BG	Use By Fecha de caducidad Utilizzare entro Použitelné do Upotrijebiti do Използване в рамките на	FR EL PT RO DE ET PL	Utiliser jusque Ημερομηνία λήξης Prazo de validade A se folosi pana la Verwendbar bis Kasutage siseselt Data minimalnej trwałości
	EN ES IT CS HR BG	Caution, consult accompanying documents Atención, ver instrucciones de uso Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso Pozor, čtěte přiložené dokumenty Pozor, vidí upute za uporabu Внимание, вижте инструкциите за употреба	FR EL PT RO DE ET PL	Attention voir notice d'instructions Προειδοποίηση, συμβουλευτείτε τα συνοδά έντυπα Atenção, consulte a documentação incluída Atentie, consultați documentele insoitoare Achtung, Begleitdokumente beachten Tähelepanu, vt kasutusjuhendit Uwaga, patrz instrukcja obsługi
	EN ES IT CS HR BG	Manufacturer Fabricante Fabbricante Výrobce Proizvođač Производител	FR EL PT RO DE ET PL	Fabricant Κατασκευαστής Fabricante Productator Hersteller Tootja Producent
	EN ES IT CS HR BG	Contains sufficient for <n> tests Contenido suficiente para <n> ensayos Contenuto sufficiente per "n" saggi Obsah stačí na <n> testů Sadržaj dovoljan za „tot.“ Testova Достаточно съдържание за "n" есета	FR EL PT RO DE ET PL	Contenu suffisant pour "n" tests Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις Conteúdo suficiente para "n" ensaios Continunt sufficient pt <n> teste Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen Piisav sisu "n" essee jaoks Zawiera wystarczającą ilość do „n” próbek
	EN ES IT CS HR BG	Temperature limitation Límite de temperatura Limiti di temperatura Teplotní omezení Temperaturne granice Температурни граници	FR EL PT RO DE ET PL	Limites de température Περιορισμοί θερμοκρασίας Limites de temperatura Limita da temperatura Temperaturbegrenzung Temperatuuripiirangud Wartości graniczne temperatury
	EN ES IT CS HR BG	Consult Instructions for Use Consulte las instrucciones de uso Consultare le istruzioni per l'uso Čtěte návod k použití Pogledati upute za uporabu Вижте инструкциите за употреба	FR EL PT RO DE ET PL	Consulter les instructions d'utilisation Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης Consulte as instruções de utilização Pentru utilizare consultați instructiunile Gebrauchsanweisung beachten Vt kasutusjuhendit Patrz instrukcja obsługi
	EN ES IT CS HR BG	Catalogue number Número de catálogo Numero di catalogo Katalogové číslo Kataloški broj Каталожен номер	FR EL PT RO DE ET PL	Référence du catalogue Αριθμός καταλόγου Referência de catálogo Numar de catalog Bestellnummer Kataloogi number Numer katalogowy

	EN ES IT CS HR BG	<i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Lékařské vybavení pro diagnostiku <i>in vitro</i> Medicinski proizvod za dijagnostiku in vitro Диагностично медицинско изделие ин витро	FR EL PT RO DE ET PL	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i> Dizpositiv medical pentru diagnosticare <i>in vitro</i> <i>In-Vitro</i> -Diagnostikum In vitro diagnostiline meditsiiniseade Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	EN ES IT CS HR BG	Batch code Código de lote Codice del lotto Kód šarže Šifra serije Код на партидата	FR EL PT RO DE ET PL	Code du lot Αριθμός Παρτίδας Código do lote Lot Chargenbezeichnung Partii kood Kod partii
	IT EN CS DE HR BG	Marcatura CE di conformità CE marking of conformity Oznakowanie zgodności CE CE-Konformität Skenneichnung CE oznaka sukladnosti Маркировка за съответствие CE	ES EL FR PT RO ET PL	Marcado CE de conformidad Σημανση συμμορφωση CE Marquage de conformité CE Marcação CE de conformidade Marcajul de conformitate CE CE-vastavusmärgis Oznaczenie zgodności CE