

# Bio-M. Pneumonia IgM

*Inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa de Micoplasma Pneumonia IgM en suero o plasma.*

## INTENCIÓN DE USO

El kit Micoplasma Pneumonia IgM ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgM de Micoplasma Pneumonia en suero o plasma humano.

## RESUMEN Y APLICACIÓN

Micoplasma Pneumonia es un patógeno con un amplio espectro de presentaciones clínicas que van desde asintomática hasta neumonía pronunciada. Los síntomas comienzan entre 6-32 días después de la exposición con dolor de cabeza, malestar general, tos, dolor de garganta y fiebre. La enfermedad puede durar desde unos pocos días hasta un mes o más. La detección de anticuerpos IgM contra M. Pneumonia por ELISA o bien la demostración de un aumento significativo de anticuerpos específicos son una fuerte evidencia de infección reciente en el contexto clínico adecuado. Los anticuerpos específicos IgM aumentan significativamente 1 semana después del comienzo clínico, mientras que los niveles de IgG específico se elevan en la segunda semana. Los anticuerpos IgM pueden, sin embargo, encontrarse presentes por más de dos años después de la infección, por lo tanto, la detección de IgM específico no indica con precisión el tiempo de la infección. La infección primaria y la reinfección se pueden distinguir por la presencia de IgA específico elevados y de IgM específico en infecciones primarias y por la presencia de IgA específico elevado en ausencia de IgM específico en las reinfecciones. En general, la ausencia de IgM específico en muestras de suero recogidas entre 10-20 días después del inicio, significan una fuerte evidencia contra la neumonía primaria por M. Pneumonia.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgM específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrólisis del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM específico en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos antígeno M. Pneumonia	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador: 1 Vial ( listo para usar)	1ml
4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)	1ml
5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar)	1ml
6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12ml
7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12ml
8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12ml
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25ml

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2-8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984:
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apearse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare 1X de solución de trabajo a 1:20 con el diluyente de ensayo. Conserve a temperatura ambiente (18-23°C).

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-23°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente.
3. Dispense 100 µl del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100 µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

## EJEMPLO DE LA MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.8
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.2
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	1.6
Anticuerpo Índice	4.0

## CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

## INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

<0.9 Anticuerpo no detectado de M Pneumonia IgM por ELISA  
0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de M Pneumonia IgM por ELISA

## PERFORMANCE

### 1. Sensibilidad y Especificidad:

127 Pacientes fueron analizados utilizando el kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 38 sueros resultaron positivos y 82 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 94%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	M. Pneumonia IgM ELISA		
	+	-	Total
Kit de Referencia ELISA	38	3	41
-	4	82	86
Total	42	85	127

## 2. Precisión:

### Estudio Intra-Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	16	1.45	0.091	6.2
2	16	1.21	0.061	5.4
3	16	0.22	0.014	6.4

### Estudio Inter-Ensayo

Suero	No. de Replicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación %
1	10	1.37	1.120	8.7
2	10	0.88	0.087	9.88
3	10	0.27	0.026	9.62

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Para asegurar sensibilidad y especificidad en esta prueba IgM, el diluyente de la muestra provisto fue formulado para bloquear posibles interferencias de IgG y de Factor Reumatoide (RF). Puede observarse turbidez luego de diluir la muestra, lo que se debe al bloque del suero IgG y no ha demostrado interferencia en los resultados. Dicha turbidez puede ser removida mediante centrifugación.
2. En especímenes con un alto RF y gran presencia de anticuerpos autoinmunes, no puede asegurarse la eliminación de interferencias.
3. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

## REFERENCIAS

1. Quinn TC. Diagnosis of atypical pneumonias: Legionella, Chlamydia, and Mycoplasma infections. Ann Intern Med 1996; 124:591-4.
2. Cimolai N, Cheong ACH. An assessment of a new diagnostic indirect enzyme immunoassay for the detection of anti-Mycoplasma pneumoniae IgM. Am J Clin Pathol 1996; 105:205
3. Shearman MJ, Cubie HA, Inglis JM. Mycoplasma pneumoniae infection: early diagnosis by detection of specific IgM by immunofluorescence. Br J Biomed Sci 1993; 50:305-8.
4. Lee SH, Charoenying S, Brennan T, Markowski M, Mayo DR. Comparative studies of three serologic methods for the measurement of Mycoplasma pneumoniae antibodies. Am J Clin Pathol 1989; 92:342-7
5. Kenny GE, Kaiser GG, Cooney MK, Foy HM. Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia: sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. J Clin Microbiol 1990; 28:2087- 93.