

APLICACIÓN

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

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Mycoplasma pneumoniae es la causa más frecuente de neumonía e infecciones febriles de vías respiratorias altas en población general (salvo la infección por influenza A) (1-5). También se pueden desarrollar otras complicaciones no respiratorias en esta enfermedad que pueden afectar prácticamente a todos los sistemas y que pueden oscilar de leves a potencialmente mortales (6-8). *Mycoplasma pneumoniae* es un procariota. Se trata del microorganismo más pequeño (10x200 nm) y más simple con capacidad de autoduplicación, y se parece más a una bacteria que a un virus. Sin embargo, debido a que carece de membrana celular, resulta evidente su resistencia a los antibióticos que actúan en la membrana celular (es decir, penicilina, cefalosporinas (1)). La importancia del diagnóstico, o al menos la exactitud terapéutica en la gestión de las primeras fases de las infecciones adquiridas en una comunidad es especialmente importante en pacientes muy jóvenes o ancianos, para los que el margen de error temporal es muy pequeño. Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico normal de la infección en laboratorio ha estado limitado a ensayos insensibles y no específicos (aglutininas frías, fijación del complemento, aislamiento de cultivos). Las investigaciones muestran la existencia de anticuerpos contra especies específicas que actúan contra los antígenos superficiales. Su misión es la de proteger y se detectan mediante pruebas ELISA, incluso en la fase temprana de la enfermedad. Por este motivo, el mejor diagnóstico se alcanza por procedimientos serológicos (9).

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA *M. pneumoniae* IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra *M. pneumoniae* en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno de tipo IgG contra *M. pneumoniae*. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

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

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVe Diluent®.**

PLATE	1. Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno del <i>M. pneumoniae</i> (cepa FH) desactivado. Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante.
CONJ	2. Conjugado: anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (específica de la cadena Fc). Un vial de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3. Control positivo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón rojo.
CAL	4. Calibrador (suero humano): un vial de 0,5 ml con tapón azul.
CONTROL -	5. Control negativo (suero humano): un vial de 0,35 ml con tapón verde.
DIL	6. Diluyente SAVe Diluent®: un frasco de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVe Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero.
SOLN	7. TMB: un frasco de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN	8. Solución para detener la reacción: un frasco de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF	9. Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Un frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVe Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (14).

- Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
- Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
- El diluyente SAVe Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
- La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
- La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
- Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
- La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
- Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
- Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
- Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
- No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
- Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
- Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
- No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
- No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
- No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
- Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
- Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
- Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
- Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
- Agua destilada o desionizada.
- Probeta graduada de un litro.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipeta desechables.
- Toallas de papel.
- Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
- Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

 2°C	Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul. Conjugado: NO CONGELAR. Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVe Diluent® sin abrir
 25°C	Solución para detener la reacción: 2 - 25°C Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C. Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).
- Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (10, 11). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8 °C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (15).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

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

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

3. Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVe Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVe Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
4. A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
5. Añada 100 µl de diluyente SAVe Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
6. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
7. Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.

a. **Procedimiento de lavado manual:**

1. Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
2. Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
3. Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
4. Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desecharable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.

b. **Procedimiento de lavado automático:**

Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.

8. Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
9. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
10. Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
11. Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
12. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
13. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
14. Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

1. Diluya el suero 1:21.
2. Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
3. *Incube durante 25 ± 5 minutos.*
4. Lave.
5. Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
6. *Incube durante 25 ± 5 minutos.*
7. Lave.
8. Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
9. *Incube durante 10 - 15 minutos.*
10. Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
11. LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

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

Intervalo de DO

Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

- a. El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
- b. El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
- c. Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.

4. Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
5. Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
6. Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- Factor de corrección:** El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- Límite de referencia de la DO:** Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
 $(FC \times \text{media de DO del calibrador} = \text{límite de referencia de la DO})$
- Valores índice/cocientes de DO:** Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

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

2. Interpretaciones:

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

	Valor índice/cociente de DO
Muestras negativas	$\leq 0,90$
Muestras dudosas	0,91 a 1,09
Muestras positivas	$\geq 1,10$

- Un cociente de DO $\leq 0,90$ indica que no se ha detectado una cantidad significativa de anticuerpos de tipo IgG contra *M. pneumoniae*. Un resultado no reactivo indica que no hay, ni hubo, una infección anterior.
- Un cociente de DO $\geq 1,10$ indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgG específicos contra *M. pneumoniae*. Un resultado reactivo indica una infección anterior o reciente.
- Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- No se debe emitir un diagnóstico que se base exclusivamente en los resultados del sistema de pruebas ELISA *M. pneumoniae* IgG de ZEUS, sino que deben interpretarse de forma conjunta con la evaluación clínica y los resultados de otros procedimientos de diagnóstico.
- Si se somete a pruebas una muestra durante un proceso de infección primaria, puede suceder que no se detecten anticuerpos de tipo IgG. Si se sospecha de la existencia de una infección por *Mycoplasma*, será necesario tomar una segunda muestra transcurridos 14 días como mínimo.
- Evite el uso de muestras hemolíticas, lipémicas, contaminadas con bacterias o inactivadas por el calor. Esto puede ocasionar resultados erróneos.
- Las características de funcionamiento del ensayo no se han establecido para otras matrices que no sean suero.
- Un solo resultado positivo indica únicamente una exposición inmunológica anterior. Para determinar el estado de la infección activa o de la enfermedad, puede ser necesario utilizar tanto el nivel como la clase de respuesta de los anticuerpos.
- Los resultados negativos no descartan el diagnóstico de una enfermedad asociada al *M. pneumoniae*. Es posible que la muestra se haya extraído antes de que aparezcan anticuerpos detectables. Los resultados negativos cuando se sospecha que el paciente está en la fase temprana de la enfermedad, deberán repetirse entre cuatro y seis semanas después.
- La presencia o la ausencia continua de anticuerpos no puede utilizarse para determinar el éxito o el fracaso de la terapia.
- Las pruebas no se deben utilizar como procedimiento de selección de individuos infectados entre la población general. El valor predictivo de un resultado serológico positivo o negativo depende de la posibilidad de la presencia del *M. pneumoniae* antes de la realización de la prueba. Las pruebas solamente deberán llevarse a cabo cuando la evidencia clínica sugiera el diagnóstico de una enfermedad asociada al *M. pneumoniae*.
- El funcionamiento de este dispositivo no se ha establecido en neonatos ni en pacientes inmunocomprometidos.

RESULTADOS ESPERADOS

Las infecciones sintomáticas atribuibles a este microorganismo son más frecuentes en niños y adultos jóvenes (entre 2 y 19 años de edad (12)). En una publicación se demostró que el 97-98% de los sueros de una población de adultos sanos no reaccionaba con el anticuerpo contra *M. pneumoniae* por CF e IFA (13). Cada laboratorio debe establecer sus propios valores esperados según el tipo de población que estudie habitualmente. El estudio clínico de este producto incluyó 205 muestras aleatorias que se enviaron a un laboratorio de referencia, situado en el noreste de Estados Unidos, para un análisis serológico rutinario de *Mycoplasma*. En lo que respecta a esta población, 92/205 (45%) fueron negativos, 21/205 (10%) fueron dudosos y 92/205 (45%) fueron reactivos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudios comparativos

Se ha realizado un estudio comparativo para demostrar la equivalencia del sistema de pruebas ELISA *M. pneumoniae* IgG de ZEUS con el sistema de pruebas IFA Crowntitre® IgG de ZEUS. El funcionamiento del sistema de pruebas ELISA *M. pneumoniae* IgG de ZEUS se ha evaluado en una investigación llevada a cabo en dos laboratorios clínicos. Se sometieron a análisis 194 muestras, 109 en el laboratorio uno y 85 en el laboratorio dos. La mayoría de las muestras (192/194) provenían de un laboratorio de referencia en el noreste de Estados Unidos. Estas muestras se enviaron al laboratorio para un análisis serológico habitual de micoplasma. Las otras dos muestras provenían de un repositorio y habían resultado positivas tras el análisis de anticuerpos de tipo IgG antimicoplasma. Todas las muestras se congelaron y se mantuvieron según las directrices especificadas en la sección Recogida de las muestras de este prospecto. Las muestras se estudiaron con el sistema de pruebas ELISA Mycoplasma IgG de ZEUS en los laboratorios y después se estudiaron internamente por IFA. La Tabla 1 siguiente muestra los resultados de este estudio comparativo. Dichos resultados corresponden a muestras de diferentes pacientes, y no a varias extracciones de un mismo paciente.

Tabla 1: Cálculo de sensibilidad relativa, especificidad y concordancia

	Resultados del sistema de pruebas IFA de ZEUS			
	$\geq 1:64$ Positivo	$<1:32$ Negativo	1:32 Dudoso	Total
Sistema de pruebas ELISA <i>M. pneumoniae</i> IgG de ZEUS	Positivo	69	12	17
	Negativo	4	84	0
	Dudoso	2	6	0
	Total	75	102	17

Sensibilidad relativa = $69/73 = 94,5\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 89,3 a 99,7%)

Especificidad relativa = $84/96 = 87,5\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 80,9 a 94,1%)

*Los intervalos de confianza de 95% se calcularon según el

método exacto.

Concordancia relativa = $153/169 = 90,5\%$ (Intervalo de confianza de 95%* = de 86,1 a 94,9%)

Además del estudio realizado en dos laboratorios descrito anteriormente, el sistema de pruebas ELISA *M. pneumoniae* IgG de ZEUS se utilizó para evaluar 35 pares de muestras de pacientes agudos y convalecientes que se habían caracterizado anteriormente mediante fijación del complemento (CF). De estos 35 pares, 29 habían multiplicado por cuatro (o más) su título final de fijación del complemento. De los 29 pares, 16 fueron negativos en la fase aguda mediante pruebas ELISA, y positivos en la fase convaleciente; 8 pares fueron positivos tanto en la fase aguda como en la convaleciente, y 5 pares fueron negativos tanto en la fase aguda como en la convaleciente. **NOTA: tenga en cuenta que el término relativo se refiere a la comparación de los resultados de este ensayo con los de un ensayo similar.** No se ha intentado correlacionar los resultados del ensayo con la ausencia o la presencia de enfermedad. No se puede juzgar la precisión del ensayo comparado para predecir la existencia de enfermedad.

2. Precisión y reproducibilidad:

La reproducibilidad se evaluó según se describe en el documento número EP5: *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices, Current Edition (Evaluación del Comportamiento de la Precisión de Instrumentos de Química Clínica - Edición actual)*, publicado por el Comité Nacional para los Estándares del Laboratorio de Química Clínica (NCCLS, por sus siglas en inglés), Villanova, PA, EE.UU. Se han realizado estudios de reproducibilidad en ambos laboratorios clínicos con las mismas muestras. Se analizaron seis muestras: dos relativamente fuertes para positivo, dos cercanas al límite de referencia y otras dos que eran claramente negativas. Además, los controles negativo y positivo del sistema de pruebas se incluyeron como componentes del panel, en un total de ocho muestras. Durante cada día de las pruebas, cada una de estas ocho muestras se sometió a ensayo por duplicado. Además, durante cada uno de los días de las pruebas, el ensayo se realizó dos veces; una vez por la mañana y otra por la tarde, lo que supone un total de cuatro duplicados diarios para cada muestra. Los laboratorios clínicos llevaron a cabo este estudio de reproducibilidad durante un periodo de veinte días, con un total de 80 observaciones para cada uno de los ocho componentes del panel. La Tabla 2 que aparece a continuación resume los datos de esta investigación.

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

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

*Estimación puntual de la desviación estándar de la precisión dentro de un mismo ensayo.

**Estimación puntual de la desviación estándar de la precisión total.

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

REFERENCIAS

- Tuazon CU, and Murray HW: "Atypical pneumonias". In: Respiratory Infections: diagnosis and Management. Pennington JE, ed. Raven Press, New York, NY, pp. 251, 1983.
- Chanock RM, Fox HH, James WD, Gutekunst RR, White RT, Seterfit LB: Epidemiology of M.P. infection in military recruits. Ann. NY Acad. Sci. 143:484-496, 1967.
- Lind K, Bentzon MW: Epidemics of *M. pneumoniae* infection in Denmark from 1958 - 1974. Tnt. J. Epidemiol. 5:267-277, 1976.
- Noah ND: *M. pneumoniae* infection in the United Kingdom. British Med. J. 2:544-546, 1974.
- Foy HM, Kenny GE, Cooney MK, Allan ID: Long-term epidemiology of infections with *M. pneumoniae*. J. Infect. Dis. 139:681-687, 1979.
- Murray HW, Masur H, Seterfit LB, and Roberts LB: The protean manifestation of *M. pneumoniae* infections in adults. Am. J. Med. 58:229-242, 1975.
- Cassell GH, and Cole BC: Mycoplasmas as agents of human disease. N. Engl. J. Med. 304:80, 1981.
- Noriega ER, Simberkoff MS, Gilroy SJ, et al: Life threatening *M. pneumoniae*. JAMA 29:1471-1472, 1974.
- Carter JB, and Carter SC: Acute-phase, Indirect Fluorescent antibody Procedure for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Ann. Clin. Lab. Sci. Vol. 13, No. 2, 150-155, 1983.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18, Approved Guideline.
- Smith T: *Mycoplasma pneumoniae* Infections: Diagnosis based on Immunofluorescence titer of IgG and IgM antibodies. Mayo Clin Proc 61:831, 1986.
- Lee SH, et al: Comparative studies of three serologic methods for the measurement of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. Am J Clin Pathol, Vol. 92, No. 3, 1989.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2
International: +1 908-526-3744
Fax: +1 908-526-2058
Website: www.zeusscientific.com
ZEUS ELISA y SAve Diluent® son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.
Sistema de pruebas *M. pneumoniae* IgG

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.
Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.



(Fecha Rev. 12/20/2017)