

RIDASCREEN[®] Mycoplasma

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Antikörpern
(IgA, IgG, IgM) gegen Mycoplasma pneumoniae in Serum

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies
(IgA, IgG, IgM) against Mycoplasma pneumoniae in serum

Art. No.: K 4311 (IgA)
 K 4321 (IgG)
 K 4331 (IgM)

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

Anschrift:

R-Biopharm AG
Dolivostr. 10
D-64293 Darmstadt

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-0
Sekretariat Marketing (0 61 51) 81 02-23

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme (0 61 51) 81 02-20
orders@r-biopharm.de

Marketing (0 61 51) 81 02-40
info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm AG
Hersteller: R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland

—————

RIDA® und RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm AG
Manufacturer: R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Allgemeines	4
2. Einleitung	4
3. Testprinzip	5
4. Packungsinhalt	5
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör	7
6. Vorsichtsmaßnahmen	8
7. Reagenzien und ihre Lagerung	8
8. Anzeichen für Reagenzienverfall	9
9. Sammlung und Lagerung der Proben	9
10. Testdurchführung	9
11. Auswertung	13
12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation	15

Contents

	page
1. Intended use	17
2. General	17
3. Test principle	18
4. Reagents provided	19
5. Materials required but not provided	21
6. Warnings and precautions for the users	21
7. Storage instructions	22
8. Indication of instability or deterioration of reagents	22
9. Specimen collection and storage	22
10. Test procedure	23
11. Analysis	26
12. Remarks about the test procedure and interpretation	28

Appendix

Literature	29
------------------	----

1. Allgemeines

Der RIDASCREEN® Mycoplasma-Test ist ein in vitro Diagnostikum zum spezifischen Nachweis von IgA-, IgG- und IgM-Antikörpern gegen *Mycoplasma pneumoniae* in humanem Serum.

2. Einleitung

Mycoplasmen sind zellwandlose Bakterien, die sich durch ihre Pleomorphie auszeichnen. In ihrer kokkoiden Form sind sie ca. 0,4 µm groß. Bei Kontakt mit Wirtszellen oder inerten Materialien wie Glas oder Plastik nehmen sie eine spindelartige Form mit fädigen Strukturen an. Der wichtigste Vertreter humanpathogener Mycoplasmen des Respirationstraktes ist *Mycoplasma pneumoniae*.

Die Inkubationszeit einer Infektion mit *M. pneumoniae* ist relativ lang und liegt bei zehn Tagen bis drei Wochen. Nach dem Abklingen der klinischen Symptome kann *M. pneumoniae* noch über Wochen ausgeschieden werden. Die Infektiosität des Erregers ist allerdings sehr gering, so daß für eine Übertragung ein enger Kontakt bestehen muß, wie er in Familien, Kindergärten, Schulen und militärischen Einrichtungen gegeben ist. Erkrankungen treten meist im Kindes- und jungen Erwachsenenalter auf. Bei Kleinkindern unter fünf Jahren verlaufen die Infektionen häufig nahezu symptomlos. Ein Erstkontakt mit dem Erreger erzeugt keine Immunität. Zweitinfektionen verlaufen sogar oft schwerer. Hierfür werden überschießende Reaktionen des immunkompetenten Wirtes verantwortlich gemacht.

Das klinische Bild einer *M. pneumoniae*-Infektion ist eine Tracheobronchitis mit Abgeschlagenheit, Fieber, Kopfschmerzen und hartnäckigem, zunächst aber wenig produktivem Husten. In ca. 10 % der Fälle kann sich eine atypische, interstitielle Pneumonie entwickeln. Diese kann schwer verlaufen, nimmt aber nur selten einen tödlichen Ausgang. Hinzu kommen zahlreiche extrapulmonale Komplikationen wie sie auch bei anderen bakteriellen und viralen Infektionen vorkommen, und die nicht *M. pneumoniae*-spezifisch sind; dies sind u. a.: Erythema multiforme, Erythema nodosum, Arthralgien, Myalgien, hämolytische Anämien, Meningitis, Polyneuritis, Myokarditis und Perikarditis. Eine differentialdiagnostische Abklärung ist deshalb besonders wichtig.

Der RIDASCREEN® Mycoplasma-Test ist als Enzymimmunoassay eine einfache und hoch sensitive Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen *M. pneumoniae*. Im Unterschied zu anderen immunologischen Verfahren wie der KBR ist mittels EIA eine Differenzierung der verschiedenen Immunglobulinklassen möglich.

3. Testprinzip

Bei dem vorliegenden Test handelt es sich um einen Enzymimmunoassay (EIA) zum Nachweis von Antikörpern. An die Oberfläche der Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind gereinigte Antigene von *Mycoplasma pneumoniae* gebunden. In diese Vertiefungen werden verdünnte Patientenproben sowie die Kontrollen pipetiert und bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei binden vorhandene Antikörper an die immobilisierten Antigene. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt.

Danach erfolgt die Zugabe eines Peroxidase-konjugierten Anti-human-Antikörpers (anti-IgA, -IgG bzw. -IgM). Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe von Substrat (H₂O₂/TMB), das bei positiven Proben durch gebundenes Enzym zur Entwicklung einer blauen Farbe führt. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stopp-Reagenz beendet. Dabei erfolgt gleichzeitig ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die abschließende Messung erfolgt in einem Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm).

4. Packungsinhalt

4.1. RIDASCREEN[®] Mycoplasma IgA (Art. No. K 4311)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;
beschichtet mit *M. pneumoniae* Antigen;
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroPP (110 ml);
Probenpuffer, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroWP (100 ml, 10fach konz.);
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
- 1 x Standardkontrolle (2,5 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroA LD (12 ml);
anti-*human-IgA*-Konjugat; gebrauchsfertig;
Peroxidase-markierter Antikörper (Ziege)

- 1 x RIDASCREEN[®] SeroSC (12 ml);
H₂O₂/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroStopp (12 ml);
1 N Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

4.2. RIDASCREEN[®] Mycoplasma IgG (Art. No. K 4321)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;
beschichtet mit *M. pneumoniae* Antigen
in verschließbarem Alu-Beutel
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroPP (110 ml);
Probenpuffer, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroWP (100 ml, 10fach konz.);
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
- 1 x Standardkontrolle (2,5 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroG HD (12 ml);
anti-*human-IgG*-Konjugat; gebrauchsfertig;
Peroxidase-markierter Antikörper (Kaninchen)
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroSC (12 ml);
H₂O₂/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroStopp (12 ml);
1 N Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

4.3. RIDASCREEN[®] Mycoplasma IgM (Art. No. K 4331)

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.
Jeder Reagenziensatz enthält:

- 1 x 12 Mikrotiterstreifen (teilbar) mit je 8 Vertiefungen im Halterahmen;
beschichtet mit *M. pneumoniae* Antigen;
in verschließbarem Alu-Beutel

- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);
Probenpuffer, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10fach konz.);
Waschpuffer, enthält 0,2 % Bronidox-L
- 1 x Standardkontrolle (2,5 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x Negativkontrolle (1,2 ml);
verdünntes Humanserum, gebrauchsfertig;
enthält 0,01 % Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroM HD (12 ml);
anti-*human-IgM*-Konjugat; gebrauchsfertig;
Peroxidase-markierter Antikörper (Kaninchen)
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);
H₂O₂/Tetramethylbenzidin (TMB), gebrauchsfertig
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);
1 N Schwefelsäure
- 1 x Gebrauchsanleitung

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

5.1. Reagenzien

- destilliertes oder deionisiertes Wasser

5.2. Zubehör

- feuchte Kammer bei 37 °C
- Probenröhrchen
- Vortex Mixer
- Mikropipetten für 10 – 100 µl und 100 – 1000 µl Volumina
- Meßzylinder (1000 ml)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten oder Mehrkanalpipette
- Photometer für Mikrotiterplatten (450 nm, Referenzfilter ≥ 620 nm)
- Filterpapier (Labortücher)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Die im Kit befindlichen Kontrollseren (Standardkontrolle und Negativkontrolle) wurden auf HIV- und HCV-Ak sowie HbsAg untersucht und für negativ befunden. Dennoch sollten sie, ebenso wie die Patientenproben, als potentiell infektiös gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Standardkontrolle und Negativkontrolle, sowie der Probenpuffer enthalten als Konservierungsmittel 0,01 % Thimerosal. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Der Waschpuffer enthält 0,2 % Bronidox-L als Konservierungsmittel. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Wasserstoffperoxid kann zu Verätzungen führen. Vorsichtig handhaben!

Das Stopp-Reagenz enthält 1 N Schwefelsäure. Hautkontakt sowie Kontakt mit Kleidung vermeiden!

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch der Kontrollseren zwischen Kits verschiedener Chargennummern ist nicht möglich.

Mikrotiterstreifen und Reagenzien dürfen nicht verwendet werden, wenn die Verpackung beschädigt ist oder die Gefäße undicht sind.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Alle Reagenzien sind bei 2 – 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Der verdünnte Waschpuffer (RIDASCREEN® SeroWP) ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

Vor Verwendung sind die Reagenzien und die Mikrotiterstreifen auf Raumtemperatur zu bringen. Zur Vermeidung von Kondenswasser in den Streifen sind diese erst nach Erreichen der Raumtemperatur ihrer Verpackung zu entnehmen. Der Alu-Beutel ist mit einer Schere so zu öffnen, daß der Klippverschluß nicht abgetrennt wird. Nicht benötigte Mikrotiterstreifen sind im verschlossenen Alu-Beutel sofort wieder bei 2 – 8 °C zu lagern.

Eine Kontamination des Substrates (RIDASCREEN® SeroSC) mit der Konjugat-lösung ist unbedingt zu vermeiden, da diese eine Verfärbung des Substrates zur Folge hat. Ebenso ist eine direkte Lichteinwirkung auf das farblose Substrat zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Blaufärbung durch Autooxidation vorzu-beugen. Bei aufgetretener Blaufärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Folgende Kriterien können einen Reagenzienverfall anzeigen:

- eine Trübung oder Blaufärbung des farblosen Substrates vor Zugabe in die Ka-vitäten
- ein Extinktionswert der Negativkontrolle bei 450/620 nm > 0,3
- ein Extinktionswert des Standardkontrollserums bei 450/620 nm außerhalb des im beigefügten Auswertebrett angegebenen Wertebereichs.

9. Sammlung und Lagerung der Proben

Der RIDASCREEN® Mycoplasma EIA ist für die Untersuchung humaner Serum-proben entwickelt worden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitze inaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei –20 °C oder tiefer möglich.

Serumverdünnungen sind nicht länger als 7 Stunden bei 2 – 8 °C haltbar.

10. Testdurchführung

10.1. Allgemeines

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanwei-sung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Einzelne der im vorliegenden Test verwendeten Reagenzien sind nicht kitspezi-fisch. Diese mit RIDASCREEN® Sero bezeichneten Reagenzien (SeroWP, SeroPP, SeroA LD, SeroG HD, SeroM HD, SeroSC, SeroStopp) können auch bei anderen RIDASCREEN® EIAs mit entsprechend deklarierten Reagenzien ver-wendet werden. Dies gilt nicht für die chargenspezifischen Kontrollseren.

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Mikrotiterstreifen für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und –temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Mikrotiterstreifen ab. Eine Abweichung von den vorgegebenen Inkubationszeiten und Temperaturen führt zu einer übermäßigen Differenz der Standardkontrolle zum vorgegebenen Sollwert, welche nicht mehr von dem ermittelten Wertebereich abgedeckt wird.

Während des Waschens ist darauf zu achten, daß alle Vertiefungen mit Waschpuffer gefüllt werden, und daß zwischen den Waschschrritten keine Flüssigkeit in den Vertiefungen verbleibt. Zwischen den einzelnen Waschschrritten dürfen die Vertiefungen nicht austrocknen.

Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen die Mikrotiterplatte abzudecken.

Mit Ausnahme des Waschpuffers sind alle Reagenzien gebrauchsfertig.

10.2. Herstellung des Waschpuffers

1 Teil des Puffer-Konzentrates (RIDASCREEN® SeroWP) wird mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt. Hierfür werden 100 ml des Puffer-Konzentrates in einen 1000 ml Standzylinder gegeben und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle sind vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) zu lösen. Der verdünnte Puffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

10.3. Vorbereitung der Proben

Die zu untersuchenden Serumproben werden vor Testbeginn mit dem Probenpuffer (RIDASCREEN® SeroPP) 1:100 verdünnt.

Verdünnung der Serumproben (IgA-, IgG- und IgM-Bestimmung):

z. B. 10 µl Serum + 990 µl Probenpuffer

Für IgM-Bestimmungen sollten Seren vor der Testung einer IgG-Absorption (z. B. mit dem RIDA® RF-Absorbens, Art. No. Z 0202) unterzogen und erst danach mit dem Probenpuffer auf die jeweilige Endverdünnung gebracht werden.

Achtung!

Negativkontrolle und Standardkontrolle sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt oder absorbiert werden.

10.4. Erste Inkubation

Nach dem Einstecken einer ausreichenden Zahl von Kavitäten in den Halterahmen werden von den verdünnten Seren und gebrauchsfertigen Kontrollen jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, die Position A1 (Reagenzienleerwert) bleibt frei. Die Negativkontrolle wird einfach und die Standardkontrolle doppelt mitgeführt. Die Platte wird 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dabei sollte der Boden der Kavitäten keinen Kontakt zu gut wärmeleitenden Materialien (Metall oder feuchtes Papier) haben.

Die der Bestimmung (IgA, IgG bzw. IgM) entsprechenden Kontrollen sind zu verwenden.

A1	Reagenzienleerwert
B1	Negativkontrolle
C1	Standardkontrolle
D1	Standardkontrolle
E1, F1	Patientenserum 1, 2, usw.

Achtung!

Die ELISA-Platte darf nicht in ein kühles Inkubationsbehältnis gestellt werden, das sich erst während der Inkubation auf 37 °C erwärmt. Das Behältnis muß schon vorab an 37 °C adaptiert sein.

10.5. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und die Platte anschließend auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen. Anschließend wird 4mal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Dabei ist nach jedem Waschgang für eine komplette Entleerung durch Ausklopfen zu sorgen.

Bei Verwendung eines Waschautomaten ist auf die korrekte Einstellung des Gerätes auf den verwendeten Plattentyp zu achten.

10.6. Zweite Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroA LD, SeroG HD bzw. SeroM HD (Anti-human-IgA-, Anti-human-IgG- bzw. Anti-human-IgM-Konjugat) in die entsprechenden Vertiefungen (einschließlich A1). Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

10.7. Waschen

4maliges Waschen gemäß Pkt. 10.5.

10.8. Dritte Inkubation

Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroSC in alle Vertiefungen. Anschließend wird die Platte für 30 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wird durch Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp in alle Vertiefungen die Reaktion gestoppt. Nach vorsichtigem Mischen (leichtes Tippen an den Plattenrand) wird die Extinktion in einem Plattenphotometer bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm). Der Abgleich des Nullwertes erfolgt gegen den Reagenzienleerwert (Position A1).

Achtung:

Zur Entfernung von Kondenswasser muß die Unterseite der Mikrotiterplatte vor der Messung abgewischt werden.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des RIDASCREEN® SeroWP
3. Herstellung der Serumverdünnungen
4. Pipettieren von 100 µl Standardkontrolle, Negativkontrolle bzw. Probe in die Mikrotiterstreifen; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
5. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
6. Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroA LD, SeroG HD bzw. SeroM HD; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
7. Entleerung der Kavitäten; anschließend 4maliges Waschen mit 300 µl Waschpuffer
8. Zugabe von je 100 µl RIDASCREEN® SeroSC; 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer
9. Nach Zugabe von 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp photometrische Auswertung bei 450 nm (Referenzwellenlänge ≥ 620 nm)

11. Auswertung

Die Auswertung des Tests kann auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt werden:

1. über die beiliegende Standardkurve
2. über die Wertetabelle (siehe beiliegendes Datenblatt)
3. mathematisch nach der 4-Parameter-Auswertung oder der α -Methode

Von allen Extinktionswerten muß vor der Auswertung der Reagenzienleerwert abgezogen werden.

11.1. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle sind bei jeder Testdurchführung Standardkontrolle (Doppelbestimmung) und Negativkontrolle mitzuführen. Der Test ist korrekt verlaufen, wenn der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle bei 450/620 nm in dem Wertebereich liegt, der auf dem beigefügten Datenblatt angegeben ist. Weichen die beiden Einzelmessungen um mehr als 20 % vom Mittelwert ab, muß der Test wiederholt werden. Die Negativkontrolle muß bei 450/620 nm einen Extinktionswert $< 0,3$ aufweisen.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)
- Korrekte Testdurchführung
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten auf Kontamination oder Undichtigkeit; eine bläulich gefärbte Substratlösung darf nicht mehr verwendet werden

Sind nach Testwiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

11.2. Auswertung über die Standardkurve

Um eine Auswertung mittels Standardkurve durchzuführen, muß zunächst über den Mittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) eine Korrektur der Tagesschwankung vorgenommen werden. Aus dem Sollwert der Standardkontrolle und dem aktuell gemessenen Wert der Kontrolle wird der Korrekturfaktor F berechnet. Der chargenabhängige Sollwert ist auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt.

$$F = \frac{\text{Sollwert der Standardkontrolle}}{\text{Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle}}$$

Mit dem Faktor F werden alle OD-Werte der Proben multipliziert. Mit diesen korrigierten Werten wird dann der entsprechende U/ml-Wert in der Standardkurve abgelesen.

11.3. Auswertung über die Wertetabelle

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle (siehe auch Pkt. 11.1.) bestimmt in der Wertetabelle die Spalte mit dem Wertebereich, der für die aktuelle Messung gültig ist. Innerhalb der Spalte wird der gemessene Extinktionswert der Probe dem passenden Extinktionsbereich zugeordnet und in der zweiten Spalte von links der entsprechende Titer in Units/ml abgelesen.

	Units/ml	Wertebereich der Standardkontrolle	
			0,84 - 0,88
-	< 23,0		< 0,30
?	23,0 - 31,0		0,30 - 0,38
+	31,1 - 70,0		0,39 - 0,69
	70,1 - 120,0		0,70 - 0,98
	120,1 - 200,0		0,99 - 1,32
	200,1 - 400,0		1,33 - 1,86
	400,1 - 1000,0		1,87 - 2,69
	> 1000,0		> 2,69

Abb. 1: Beispiel für eine IgG-Bestimmung
(Auszug aus einem chargenspezifischen Datenblatt)

Der Extinktionsmittelwert der Standardkontrolle beträgt beispielsweise bei einer Messung 0,86. In diesem Fall ist für die Ermittlung des Ergebnisses die Spalte mit dem Bereich 0,84 bis 0,88 aus der Tabelle entscheidend. Eine Patientenprobe mit einem Extinktionswert von 0,65 liegt dann in einem Titer-Bereich von 31,1 bis 70,0 Units/ml. (Die genannten Werte sind als Beispiel zu sehen und können von den aktuellen Werten des Datenblattes abweichen.)

Die Bewertung des ermittelten Ergebnisses - positiv (+), negativ (-) oder grenzwertig (?) - ist der ersten Spalte der Wertetabelle zu entnehmen.

11.4. Mathematische Auswertung

Die benötigten Werte für eine mathematische Auswertung nach der 4-Parameter-Auswertung oder der α -Methode sind auf dem beiliegenden Datenblatt vermerkt. Bei Fragen zur Anpassung des EIAs an Laborgeräte sowie zur mathematischen Auswertung stehen wir Ihnen gerne jederzeit unter folgender Rufnummer zur Verfügung: 0 61 51 / 81 02-0.

11.5. Testergebnis

Tab. 1: Bewertung der ermittelten Units

	IgA	IgG	IgM
negativ	< 39 U/ml	< 23 U/ml	< 50 U/ml
grenzwertig	39 - 50 U/ml	23 - 31 U/ml	50 - 71 U/ml
positiv	> 50 U/ml	> 31 U/ml	> 71 U/ml

12. Hinweise zur Testdurchführung und Interpretation

Der RIDASCREEN® Mycoplasma EIA weist Antikörper gegen Mycoplasma pneumoniae nach. Die Tests sollten bei begründetem Verdacht auf eine Mycoplasma-Infektion durchgeführt werden. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des gemessenen Extinktionswertes und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein negatives Ergebnis schließt eine Mycoplasma-Infektion nicht aus, da die Serumentnahme zu einem so frühen Zeitpunkt erfolgt sein kann, daß Antikörper noch nicht nachweisbar sind.

Ein positiver IgG-Nachweis alleine läßt keinen Schluß auf ein akutes Krankheitsgeschehen zu. Wichtig für die Interpretation eines IgG-Befundes ist die Höhe und der Verlauf des Titers. Deshalb sollten zur Verbesserung der diagnostischen Aussage zwei aufeinander folgende Seren eines Patienten untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

IgA-Antikörper geben Aufschluß über eine mögliche Besiedlung von Schleimhäuten mit M. pneumoniae. Ein hoher IgA-Titer deutet daher auf eine akute Infektion hin. In Einzelfällen können IgA-Titer aber auch über lange Zeit persistieren.

Einen positiven IgM-Befund findet man in der Regel nur nach Erstkontakt mit dem Erreger. Es wurden aber auch persistierende IgM-Titer beobachtet.

Generell sollten bei serologischen Untersuchungen zur Verbesserung der diagnostischen Aussage immer zwei aufeinander folgende Seren eines Patienten untersucht werden.

Ein positives Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger als Ursache für eine Erkrankung nicht aus.

RIDASCREEN[®] Mycoplasma

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies (IgA, IgG, IgM) against *Mycoplasma pneumoniae* in serum

1. Intended use

The RIDASCREEN[®] Mycoplasma test is an in vitro diagnosticum for specific detection of IgA, IgG and IgM antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* in human serum.

2. General

Mycoplasma are bacteria without cell walls which are characterized by their pleomorphism. They have a size of 0.4 µm in their coccoid form. In contact with host cells or inert material such as glass or plastic, they take on a spindle-like form with filamentous structures. The most important representative of human-pathogenic *Mycoplasma* of the respiratory tract is *Mycoplasma pneumoniae*.

The incubation period of an infection with *M. pneumoniae* takes a relatively long time and lasts from 10 days to three weeks. After the clinical symptoms have subsided, *M. pneumoniae* can be excreted for weeks. However, the infectivity of the causative agent is very slight, so that close contact must exist for transmission to take place, such as given in families, day care centers, schools and military facilities. Illnesses occur mainly during childhood and early adulthood. In young children under the age of five, the infection often occurs almost symptomless. First contact with the causative agent does not produce immunity. Second infections are often more severe. Over-shooting reactions of the immunologically competent host are made responsible.

The clinical picture of a *M. pneumoniae* infection is that of a tracheobronchitis with lethargy, fever, headache and persistent, initially unproductive coughing. In approx. 10 % of all cases, atypical, interstitial pneumonia develops. This development can be very difficult but seldom takes a deadly turn. In addition, a multitude of extrapulmonary complications can be found like in other bacterial and viral infections and which are not *M. pneumoniae* specific. These are among others: Ery-

thema multiforme, Erythema nodosum, arthralgia, myalgia, hemolytical anaemia, meningitis, polyneuritis, myocarditis und pericarditis. A differential diagnostical clarificaton is, therefore, very important.

The RIDASCREEN® Mycoplasma test is, as an enzyme immunoassay, a simple and highly sensitive method for the detection of antibodies against *M. pneumoniae*. In contrast to other immunological procedures such as the CFT, a differentiation of the different immunoglobulin classes is possible with the EIA.

3. Test principle

This test is an enzyme immunoassay (EIA) for the detection of antibodies. On the surface of the microtiter wells, purified antigens of *Mycoplasma pneumoniae* are bound. Diluted serum samples and controls are pipetted into the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. Present antibodies bind to the immobilized antigen. Unbound material is removed in a washing step.

In a second step, a peroxidase-conjugated anti-human antibody (anti-IgA, -IgG or -IgM) is added. After incubation, unbound conjugate is removed by washing. Substrate (H_2O_2/TMB) is added to the wells and incubated at 37 °C in a humid chamber. The enzyme bound in the wells converts the colorless substrate to a blue color. Addition of stop solution converts the color from blue to yellow. The absorption is measured at 450 nm wavelength (reference wavelength ≥ 620 nm).

4. Reagents provided

4.1. RIDASCREEN® Mycoplasma IgA (Art. No. K 4311)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.
Each test kit contains:

- 1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;
coated with *M. pneumoniae* antigen;
in a resealable foil bag
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);
Sample Diluent, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10x conc.);
Washing Buffer, contains 0.2 % Bronidox-L
- 1 x Standard Control (2.5 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x Negative Control (1.2 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroA LD (12 ml);
Anti-human-IgA-Conjugate, ready to use;
peroxidase-conjugated antibody (goat)
- 1 x RIDASCREEN® SeroSC (12 ml);
H₂O₂/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x RIDASCREEN® SeroStopp (12 ml);
1 M sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

4.2. RIDASCREEN® Mycoplasma IgG (Art. No. K 4321)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.
Each test kit contains:

- 1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;
coated with *M. pneumoniae* antigen;
in a resealable foil bag
- 1 x RIDASCREEN® SeroPP (110 ml);
Sample Diluent, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN® SeroWP (100 ml, 10x conc.);
Washing Buffer, contains 0.2 % Bronidox-L

- 1 x Standard Control (2.5 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x Negative Control (1.2 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroG HD(12 ml);
Anti-*human-IgG*-Conjugate, ready to use;
peroxidase-conjugated antibody (rabbit)
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroSC (12 ml);
H₂O₂/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroStopp (12 ml);
1 M sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

4.3. RIDASCREEN[®] Mycoplasma IgM (Art. No. K 4331)

The reagents in one package are sufficient for 96 determinations.
Each test kit contains:

- 1 x 12 Microwell Strips (breakable) with 8 wells each in a frame;
coated with *M. pneumoniae* antigen;
in a resealable foil bag
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroPP (110 ml);
Sample Diluent, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroWP (100 ml, 10x conc.);
Washing Buffer, contains 0.2 % Bronidox-L
- 1 x Standard Control (2.5 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x Negative Control (1.2 ml);
diluted human serum, ready to use;
contains 0.01% Thimerosal
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroM HD (12 ml);
Anti-*human-IgM*-Conjugate, ready to use;
peroxidase-conjugated antibody (rabbit)
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroSC (12 ml);
H₂O₂/tetramethylbenzidine (TMB), ready to use
- 1 x RIDASCREEN[®] SeroStopp (12 ml);
1 M sulfuric acid
- 1 x Instructions for use

5. Reagents required but not provided

5.1. Reagents

- Distilled or deionized water

5.2. Accessories

- Moist chamber at 37 °C
- Test tubes
- Vortex mixer
- Micropipets for volumes of 10 - 100 µl and 100 - 1000 µl
- Measuring cylinder (1000 ml)
- Microplate washer or multichannel pipet
- Microplate reader (450 nm, reference wavelength \geq 620 nm)
- Absorbent paper

6. Warnings and precautions for the users

The control sera (standard control and negative control) have been tested for HIV- and HCV-Ab as well as for HBsAg and were found to be negative. However, they as well as the patient samples should be considered potentially contagious and be treated with the necessary safety precautions.

The standard control and the negative control as well as the sample diluent contain 0.01 % Thimerosal. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

The washing buffer contains Bronidox-L. Contact with skin or mucous membranes must be avoided.

Hydrogen peroxide can cause cauterization. Handle with care!

The stop solution contains 1 N sulfuric acid. Avoid contact with skin and clothing!

All reagents and materials coming in contact with potential infectious specimens must be treated with disinfectants or autoclaved at 121 °C for at least one hour.

An exchange of the controls between kits of different lot numbers is not possible.

Microwell strips and reagents must not be used if pouch is damaged or vials are leaking.

7. Storage instructions

All reagents have to be stored at 2 - 8 °C and can be used up to the expiry date printed on the labels. Microbial contamination has to be avoided. A quality warranty cannot be given beyond the kit expiration date.

The diluted washing buffer (RIDASCREEN® SeroWP) can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

Allow reagents and microwell strips to get room temperature before use. To avoid moisture within the strips, do not take the strips out of the foil bag before having reached room temperature. The foil bag should be opened with a pair of scissors without detaching the fastener. Return any unused strips to the foil bag, reseal and store them directly at 2 - 8 °C.

It is absolutely necessary to avoid contamination of the substrate (RIDASCREEN® SeroSC) with the conjugate solution, since this results in a coloration of the substrate. In the same way, the colorless substrate must be protected from exposure to direct light to avoid deterioration or coloration by autooxidation. If the substrate has turned blue, the reagent should be discarded.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

The following criteria may indicate a reagent deterioration:

- a turbidity or a blue coloration of the colorless substrate prior to its use
- an absorbance value of the negative control at 450/620 nm > 0.3
- an absorbance value of the positive control at 450/620 nm out of the values given in the attached tables of values

9. Specimen collection and storage

The RIDASCREEN® Mycoplasma EIA has been evaluated for the investigation of human serum samples. Repeated freezing and thawing of the samples as well as microbial contamination must be avoided. The application of heat treated, lipemic, hemolytic, icteric or turbid samples can lead to wrong results.

The sample material can be stored for up to 1 week at 2 - 8 °C if the test cannot be carried out immediately. A prolonged storage of samples is possible at -20 °C.

Diluted samples can be used for up to 7 hours if they have been stored at 2 - 8 °C.

10. Test procedure

10.1. Preliminary comments

The test has to be used only by experienced laboratory personal. Please refer to guidelines for safety regulations in medical laboratories. The test protocol must be followed strictly.

The RIDASCREEN® EIAs for serological antibody detection contain some test independent reagents. These reagents are labeled RIDASCREEN® Sero (SeroWP, SeroPP, SeroA LD, SeroG HD, SeroM HD, SeroSC, SeroStopp). They are not kit specific and can be changed between single test kits with correspondingly labeled reagents. But, this is not valid for the controls.

Bring all reagents and the microwell strips to room temperature before use. Mix the reagents well before use. Reproducibility in any EIA depends on exact pipetting, the observance of incubation times and temperature and the consistency of wash sequences. A deviation from the given incubation times and temperatures leads to an excessive difference of the standard control serum to the given target value, which is no longer covered by the determined area of values. During the washing steps, take care that all wells are filled with buffer and that the liquid is completely removed from the wells. Do not allow microwells to dry between steps. Avoid direct sunlight during all incubations. Covering the microtiter plate is recommended.

Except the washing buffer, all reagents are ready to use.

10.2. Preparation of the washing buffer

1 part of the concentrated washing buffer (RIDASCREEN® SeroWP) is diluted with 9 parts of distilled water. Crystals in the buffer concentrate can be dissolved in a waterbath at 37 °C. Add 100 ml of the concentrated washing buffer to a 1000 ml graduated cylinder. Bring the final volume to 1000 ml with distilled or deionized water. The diluted washing buffer can be used up to the expiry date printed on the labels if stored at 2 - 8 °C.

10.3. Preparation of the samples

Before starting the test, serum samples have to be diluted 1:100 with the sample diluent (RIDASCREEN® SeroPP).

Dilution of serum samples (IgA, IgG and IgM determination):

e.g. 10 µl serum + 990 µl sample diluent

For IgM determination, sera should be treated with a IgG-absorbent (e.g. RIDA® RF-Absorbens, Art. No. Z 0202) prior to the test, following that it should be brought to its final dilution of 1:100 with the sample diluent.

Attention!

Negative control and standard control are ready to use and must not be diluted or absorbed.

10.4. First incubation

After insertion of a sufficient number of cavities into the microwell holder, 100 µl of the diluted sera and ready to use controls are each added to the corresponding wells, the position A1 remains empty (blank). One negative control and two standard controls are carried along. The plate is incubated in a humid chamber at 37 °C for 30 min. The bottom of the cavities should not be in touch with materials that conduct temperature well (metal or wet paper).

The controls that correspond to the determinations (IgA, IgG or IgM) are to be used.

A1	blank
B1	negative control
C1	standard control
D1	standard control
E1, F1	patient serum 1, 2, etc.

Attention!

The ELISA plate should not be placed in a cold incubation container which is heated to 37 °C during the incubation. The container must already be adapted to 37 °C prior to the incubation.

10.5. Washing

Decant or aspirate all microwells into a waste container with a disinfectant. Ensure complete removal of the liquid from the microwells by tapping the inverted plate onto absorbent paper. Then wash all wells 4 times with 300 µl of prepared washing buffer. Be sure to remove residual washing solution by firmly tapping the inverted microwells on absorbent paper after single washing steps.

If a microplate washer is used, take care that the washer is adjusted to the used microplate type.

10.6. Second incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroA LD, SeroG HD or SeroM HD (anti-*human-IgA*-, anti-*human-IgG*- or anti-*human-IgM*-conjugate) into the corresponding wells (including A1). Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber.

10.7. Washing

Wash 4 times according to step 10.5.

10.8. Third incubation

Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC into each well. Incubate the plate for 30 min at 37 °C in a humid chamber. Following the incubation, the reaction is stopped by adding 100 µl of RIDASCREEN® SeroStopp to each well. After careful mixing (soft tapping on the edge of the plate) the absorbance is measured in a microplate reader at 450 nm (reference wavelength \geq 620 nm). Zero adjustment is done against the blank (position A1).

Remark:

To remove moisture, wipe the bottom of the microplate before measuring.

Summary of the test procedure

1. Bring all reagents to room temperature
2. Dilute the RIDASCREEN® SeroWP
3. Dilute the serum samples
4. Pipet 100 µl of the standard control, the negative control or the diluted samples into the microwells; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
5. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of washing buffer
6. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroA LD, SeroG HD or SeroM HD; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
7. Discard the incubate and wash 4 times with 300 µl of washing buffer
8. Add 100 µl of RIDASCREEN® SeroSC; 30 minutes incubation at 37 °C in a humid chamber
9. After addition of 100 µl RIDASCREEN® SeroStopp spectrophotometric determination at 450 nm (reference wavelength \geq 620 nm)

11. Analysis

Analysis of the test can be done in three different ways:

1. using the standard curve enclosed
2. using the table of values (see data sheet enclosed)
3. mathematically by the 4-parameter calculation or the α -method

The blank (A1) must be subtracted from all OD values prior to the analysis.

11.1. Quality control

For the quality control, standard control (double determination) and negative control must be carried along with each test procedure. The test was carried out correctly if the mean absorbance value of the standard control at 450/620 nm corresponds to the value range of the data sheet enclosed. If the single measurements diverge from the mean absorbance value more than 20 %, the test must be repeated. The negative control must show an absorbance value at 450/620 nm < 0.3.

If the expected control values are not fulfilled, please check the following before repeating the test:

- expiration date of the reagents
- calibration of the used instruments
- exact test procedure
- visual examination of kit components for signs of contamination, deterioration or leakage; substrate solution must not be used if turned blue

If the control data are not fulfilled after repeating, please contact your local distributor of R-Biopharm.

11.2. Analysis with the standard curve

If the analysis is to be carried out with the standard curve, first the daily variation must be corrected by a double determination of the standard control (see also pt. 11.1.). The correction factor F is calculated with the given nominal value of the standard control and the actually measured standard control value. The Lot-dependent nominal value is given on the data sheet enclosed.

$$F = \frac{\text{nominal value of the standard control}}{\text{mean absorbance value of the standard control}}$$

All OD values of the samples are multiplied by the factor F. With these corrected values, the corresponding Unit value is read from the standard curve.

11.3. Analysis with the table of values

The mean absorbance value of the standard control (see also pt. 11.1.) determines the column of the value range in the attached value table, which is decisive for the actual measurement. Within this column the measured absorbance value of the sample is classed to the suited absorbance range and the corresponding titer in Units/ml is read in the second column from the left.

The mean absorbance value of the standard control in a measurement is 0.86 for example. In this case, the column with the value range from 0.84 to 0.88 is decisive for result determination. Then, a patient sample with an absorbance of 0.65 lies in a titer range from 31.1 to 70.0 Units/ml. (The foregoing values are an example and can differ from the actual values of the Lot-dependent data sheet.)

The valuation of the determined results - positive (+), negative (-), equivocal (?) - can be taken from the first column of the table of values on the data sheet enclosed.

	U/ml	Range of standard control	
			0.84 - 0.88
-	< 23.0		< 0.30
?	23.0 - 31.0		0.30 - 0.38
+	31.1 - 70.0		0.39 - 0.69
	70.1 - 120.0		0.70 - 0.98
	120.1 - 200.0		0.99 - 1.32
	200.1 - 400.0		1.33 - 1.86
	400.1 - 1000.0		1.87 - 2.69
	> 1000.0		> 2.69

Fig. 1: Example for IgG determination
(Excerpt from a Lot dependent data sheet)

11.4. Mathematical analysis

Needed values for a mathematical analysis by the 4-parameter calculation or the α -method are given on the data sheet enclosed.

11.5. Test result

Tab. 1: Valuation of calculated units

	IgA	IgG	IgM
negativ	< 39 U/ml	< 23 U/ml	< 50 U/ml
grenzwertig	39 - 50 U/ml	23 - 31 U/ml	50 - 71 U/ml
positiv	> 50 U/ml	> 31 U/ml	> 71 U/ml

12. Remarks about the test procedure and interpretation

The RIDASCREEN[®] Mycoplasma EIA detects antibodies against *Mycoplasma pneumoniae*. It should be carried out if a well-founded suspicion of a *Mycoplasma* infection exists. A relation between the measured OD-value and the clinical relevance is not given. The results obtained should always be interpreted in connection with the clinical picture.

A negative result does not exclude a *Mycoplasma* infection, since the time at which the serum was taken could have been too early to detect any antibodies.

A positive IgG detection alone does not allow conclusions to be drawn about an acute illness. Important for the interpretation of an IgG diagnosis is the height and the development of the titer. Therefore, to improve the diagnostic statement, two consecutive sera of a patient should be examined. The results obtained should always be interpreted in connection with the clinical picture.

IgA antibodies allow conclusions to be drawn about a possible colonization of the mucous membrane with *M. pneumoniae*. Therefore, a high IgA titer indicates an acute infection. In some cases, IgA titers can also persist over a long period of time.

Usually, a positive IgM finding is only found after the first contact with the pathogen. But persistent IgM titers have also been observed.

Generally, two successive sera of a patient should always be examined to improve the diagnostic assertion.

A positive result does not exclude the presence of other pathogens as cause for an illness.

Appendix

Literature

1. Ansorg, R.: Isolierung und Identifizierung von Mycoplasmen und Chlamydien. Zbl. Bakt. Hyg. A 270, 470 - 486 (1989)
2. Blenk, H., Zotz, R. B.: Mycoplasmeninfektionen. In: Gsell, O., Krech, U., Mohr, W., eds. Klinische Virologie. Stuttgart: Urban und Schwarzenberg, 337 - 353 (1986)
3. Rudd, P. T., Brown, M. B., Cassell, G. H.: A prospective study of mycoplasma infection in the preterm infant. Isr. J. Med. Sci. 20, 899 - 901 (1984)