

Mycoplasma pneumoniae-IgG-ELISA medac

Deutsch/English/Français



HERSTELLER/MANUFACTURER/FABRICANT

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Fehlandtstraße 3
D-20354 Hamburg

VERTRIEB/MARKETING/DISTRIBUTION

medac
Gesellschaft für klinische
Spezialpräparate mbH
Geschäftseinheit Diagnostika
Theaterstraße 6
D-22880 Wedel

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-348
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-359

**BESTELLADRESSE/ORDERING ADDRESS/
ADRESSE DE COMMANDE:**

Tel./Phone: ++49 / 4103 / 80 06-111
Fax: ++49 / 4103 / 80 06-113

Deutsch: S. 1
English: p. 14
Français: p. 27

Literatur/References/Littérature: S./p./p. 40

Mycoplasma pneumoniae-IgG-ELISA medac

Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von **Mycoplasma pneumoniae** IgG-Antikörpern in humanem Serum

Katalog-Nr.: 360

ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

EINFÜHRUNG

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien (Klasse Mollicutes = Weichhäutige, Ordnung Mycoplasmatales) mit einem besonders kleinen Genom. Sie zeichnen sich durch ihre geringe Größe (300 - 800 nm) und die Fähigkeit zu extremen Formveränderungen (Pleomorphie) aus. Bisher sind über 100 Arten der Ordnung Mycoplasmatales bekannt. Die Mehrzahl davon kommt ausschließlich bei Tieren vor. Beim Menschen sind unterdessen 14 Arten isoliert worden, die die Schleimhaut des Respirations- und Urogenitaltrakts besiedeln. Nur wenige Vertreter davon sind pathogen. Zu den humanpathogenen Arten zählt **Mycoplasma pneumoniae**. Von **M. pneumoniae** sind zwei Varianten bekannt.

M. pneumoniae parasitiert extrazellulär auf der Schleimhaut des Respirationstrakts. Der Erreger zeichnet sich durch seine hohe Wirtsspezifität aus. Für das Anheften des Erregers an die Oberfläche der Wirtszelle ist ein spezifisches Adhäsion verantwortlich. Dieses Adhäsion stellt gleichzeitig den Virulenzfaktor dar, gegen den die entscheidende humorale Antwort gerichtet ist. Die Übertragung von **M. pneumoniae** erfolgt durch Tröpfcheninfektion. Dabei ist die Inkubationszeit mit 10 bis 20 Tagen relativ lang.

M. pneumoniae tritt endemisch und saisonal gehäuft im Frühjahr und Herbst auf. Epidemien in Abständen von 3-4 Jahren sind nicht ungewöhnlich. **M. pneumoniae**-Infektionen gehören zu den häufigsten Ursachen von nichtnosokomial erworbenen Tracheobronchitiden und atypischen Pneumonien im Kindesalter und bei Jugendlichen. Die höchste Inzidenz liegt zwischen dem 5. und dem 15. Lebensjahr. 5-10% der atypischen Pneumonien sind auf **M. pneumoniae** zurückzuführen. Weiterhin werden Erkrankungen wie Pharyngitis, Laryngitis, Otitis media und Myringitis verursacht. In Folge einer **M. pneumoniae**-Infektion, die zunächst mit einer Infektion des Respirationstrakts beginnt, kann es zu unterschiedlichen klinischen Manifestationen an anderen Organsystemen kommen: Peri- und

Myokarditis, reaktive Arthritis, Meningitis, Meningoencephalitis, Polyneuritis sowie unterschiedlichste Affektionen der Haut. Die zunächst harmlos erscheinende Infektion kann somit schwerwiegende Spätfolgen nach sich ziehen. Besonders schwere Krankheitsverläufe werden bei immundefizienten und immunsupprimierten Patienten beobachtet.

Eine durchlaufene **M. pneumoniae**-Infektion zieht keine Immunität gegen diesen Erreger nach sich. Daher werden häufig Reinfektionen beobachtet.

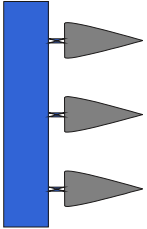
Die Infektion verläuft bei Kindern unter 5 Jahren vorwiegend asymptomatisch. Die Erkrankung nimmt hier einen leichten Verlauf. Dagegen geht die Infektion bei älteren Kindern sowie Jugendlichen und Erwachsenen mit einer deutlichen Symptomatik einher. Die Symptome wie Abgeschlagenheit, Kopfschmerz, Fieber und nicht produktiver, trockener Husten sind jedoch sehr unspezifisch und lassen nicht auf den Infektionserreger schließen. Eine effiziente Diagnostik ist hier angezeigt.

In der Akutphase der Erkrankung ist der Erregernachweis die Methode der Wahl. Der Erregernachweis wird aus Rachenabstrichen, Sputen und Bronchoalveolären Lavagen (BAL) durchgeführt. Der klassische Erregernachweis für **M. pneumoniae** über die Zellkultur ist sehr zeitintensiv (10-14 Tage). Dennoch kann mit einer erfolgreichen Isolierung des Keims nur in 40-60% der Fälle gerechnet werden. Für einen Antigen-ELISA wird ein sehr zellreiches Material vorausgesetzt, da die Sensitivität des Tests relativ gering ist. Qualitativ hochwertige kommerzielle DNA - Nachweise für diesen Erreger fehlen bisher.

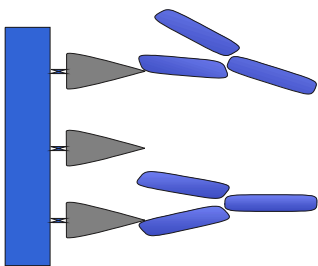
Die Serologie stellt die Methode der Wahl bei chronischen Krankheitsverläufen, Reinfektionen und extrapulmonalen Erkrankungen durch **M. pneumoniae** dar. Als kommerzielle Nachweissysteme stehen Komplementbindungsreaktion (KBR), Hämagglutinationstest (HAT) und Enzymimmunoassay (ELISA) zur Verfügung. Die ELISA-Techniken erlauben im Gegensatz zur KBR und zum HAT eine Differenzierung in die Immunglobulinklassen IgG, IgA, IgM, wodurch akute Infektionen von chronischen und zurückliegenden Infektionen abgegrenzt werden können.

Der **Mycoplasma pneumoniae-IgG-ELISA medac** verwendet für den serologischen Nachweis ein rekombinantes Antigengemisch. So werden Ergebnisse mit hoher Spezifität und Sensitivität erreicht. Darüber hinaus bietet die medac-Einpunktquantifizierung (AU/ml) die beste Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse und damit auch für die Messung von Antikörperverläufen.

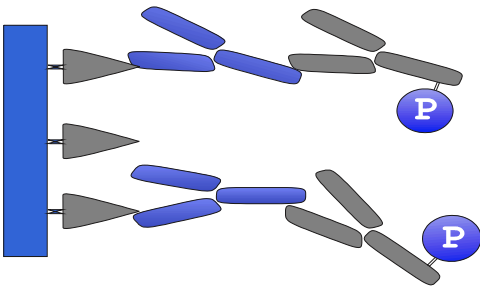
TESTPRINZIP



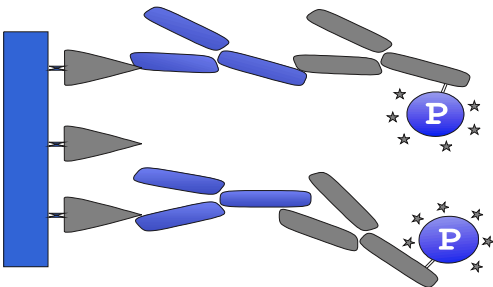
Mit *M. pneumoniae* spezifischem rekombinanten Antigen beschichtete Mikrotiterplatte.



Die *M. pneumoniae* spezifischen Antikörper aus der Patientenprobe binden an das Antigen.



Das Peroxidase-gekoppelte Anti-Human-IgG bindet an die IgG-Antikörper (P = Peroxidase).



Inkubation mit TMB-Substrat (*). Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure. Die Auswertung erfolgt photometrisch.

Testvorteile

- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.
- ☞ Automatisierbar auf offenen ELISA-Gerätesystemen.
- ☞ Ein-Punkt-Quantifizierung, keine Standardkurve mehr nötig.

PACKUNGSIHALT

KAT.-NR.: 360

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, gelb-markiert (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit rekombinanten Antigenen aus *Mycoplasma pneumoniae* und FKS, gebrauchsfertig.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält NBCS, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive Kontrolle: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
4.

CAL

Kalibrator: 1 Fläschchen à 1,5 ml, humanes Serum, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
5.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
6.

BAC-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7,0 - 7,2, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält ProClin™ 300.
7.

CON

Konjugat: 3 Fläschchen à 4,5 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, grün gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
8.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
9.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.

1. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Testkit	ungeöffnet	2 - 8 °C	bis Verfalldatum
Mikrotiterplatte	geöffnet	2 - 8 °C im Beutel mit Trockenmittelpappe	12 Wochen
Kontrollen/ Kalibrator	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2 - 8 °C	12 Wochen
Probenverdünnungspuffer	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Konjugat	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
TMB-Substrat	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Stopplösung	geöffnet	2 - 8 °C	bis Verfalldatum

Die Reagenzien sind nach Ablauf des angegebenen Verfalldatums nicht mehr zu verwenden.

2. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

- 2.1. Aqua ad iniectabilia (H₂O bidest.). Die Verwendung von entionisiertem Wasser kann zu Störungen im Testsystem führen.
- 2.2. Mikroliterpipetten für entsprechende Volumina.
- 2.3. Saubere Glas- oder Kunststoffgefäße zum Verdünnen von Waschpuffer und Proben.
- 2.4. Geeignete Vorrichtung zum Waschen der Mikrotiterplatte (z. B. Multistepper oder ELISA-Waschgerät).
- 2.5. Inkubator für 37 °C.
- 2.6. Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern für 450 nm und 620 - 650 nm.

3. ANSETZEN DER REAGENZIEN

Alle Kitkomponenten müssen vor Testansatz auf Raumtemperatur gebracht werden.

Ermitteln Sie die Anzahl der benötigten Mikrotitervertiefungen.

3.1. Mikrotiterplatte

Der Aluminiumbeutel muß nach jeder Entnahme zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe unter Punkt 1.

3.2. Waschpuffer

1 Teil Waschpuffer (10x) wird mit 9 Teilen Aqua ad iniectabilia angesetzt (z. B. 50 ml Waschpuffer (10x) mit 450 ml Aqua ad iniectabilia). Für acht Vertiefungen werden 10 ml Waschpuffer benötigt.

Evtl. im Waschpuffer (10x) vorhandene Kristalle sind vor dem Ansetzen durch Erwärmen (max. 37 °C) und/oder Rühren bei RT in Lösung zu bringen.

Die testspezifischen Reagenzien (Mikrotiterplatte, Kontrollen, Kalibrator, Konjugat) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat und Stopplösung für alle Chlamydia- und Mycoplasma-ELISA medac grundsätzlich austauschbar.

Reagenzien anderer Hersteller sind generell nicht einzusetzen.

Nur bei exakter Einhaltung der Arbeitsvorschrift werden valide und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

4.1. Der Test ist geeignet zur Untersuchung von Serum.

4.2. Eine Vorbehandlung der Seren, wie z. B. Inaktivierung, ist nicht erforderlich, sie sollten jedoch nicht mikrobiell kontaminiert und frei von Humanerythrocyten sein.

4.3. Die Seren werden 1:100 mit Probenverdünnungspuffer verdünnt.

5.A. ARBEITSVORSCHRIFT

5.1. Die Verpackung der Mikrotiterplatte am ZIP-Verschluß öffnen und die erforderliche Anzahl Mikrotitervertiefungen entnehmen (s. 3.1.).

Die Mikrotitervertiefungen sind gebrauchsfertig und müssen nicht vorgewaschen werden.

5.2. Für die Ermittlung des Leerwertes (s. 6.A.) in die Vertiefung A1 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettieren. Jeweils 50 µl der negativen Kontrolle, der positiven Kontrolle sowie der Proben in Einfachbestimmung und 50 µl des Kalibrators in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der Platte pipettieren.

Ggf. kann die Platte bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer für max. 30 min. bei RT gelagert werden.

5.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

5.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer waschen. Darauf achten, daß alle Vertiefungen beim Waschen gefüllt werden. Nach Beendigung des Waschvorganges Mikrotitervertiefungen auf Filterpapier ausklopfen.

Nicht austrocknen lassen! Umgehend weiterverwenden!

5.5. Konjugat (grün gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.

Beim manuellen Abarbeiten des Tests werden 50 μ l Konjugat pro Vertiefung pipettiert.

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 μ l Konjugat pro Vertiefung zu programmieren.

Die grundsätzliche Eignung des Testes für die automatisierte Abarbeitung konnte im Rahmen der Validierung gezeigt werden. Dennoch empfehlen wir, die Kompatibilität mit dem zum Einsatz kommenden Gerätesystemen zu verifizieren.

5.6. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

5.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.4.).

5.8. 50 μ l TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.

5.9. Durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung in jede Vertiefung wird die Reaktion gestoppt. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

Mikrotitervertiefungen vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, daß keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind!

Die Messung ist innerhalb von 15 min nach dem Stoppen durchzuführen!

5.B. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Kalibrator	Probe
Probenverdünnungs- puffer	50 µl	-	-	-	-
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-	-
Kalibrator	-	-	-	50 µl	-
Probe	-	-	-	-	50 µl
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen					
Konjugat	50/60 µl*	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen					
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubieren					
Stopplösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620-650 nm)					

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.5.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * Die Auswertung erfolgt quantitativ in willkürlichen Einheiten (AU).
- * Die photometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 620 - 650 nm).
- * Die OD des Leerwertes (Vertiefung A1) wird von allen OD-Werten subtrahiert.
- * Chargenspezifische Daten
Dem Test liegt ein chargenspezifisches Datenblatt bei. Diesem können folgende Angaben entnommen werden:
 - chargenspezifische Standardkurve
 - Kurvenparameter a und b
 - OD-Sollwert des Kalibrators
 - unterer Grenzwert für die OD des Kalibrators
 - Sollbereich in AU/ml für die positive Kontrolle

* Validitätskriterien

- Der OD-Wert des **Leerwertes** muß < **0,100** betragen.
- Der OD-Wert der **negativen Kontrolle** muß < **0,100** betragen.
- Der Unit-Wert der **positiven Kontrolle** muß innerhalb des Sollwertbereiches gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.
- Der OD-Mittelwert des Kalibrators muß oberhalb des Grenzwertes gemäß chargenspezifischem Datenblatt liegen.

Sind die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, muß der Test wiederholt werden!

* Korrektur der Meßergebnisse

Die OD-Werte für die Positive Kontrolle und die Patientenproben werden wie folgt korrigiert:

$$OD_{\text{korrigiert}} = \frac{\text{OD-Sollwert des Kalibrators}}{\text{OD-Meßwert des Kalibrators}} \times OD_{\text{gemessen}}$$

* Quantifizierung der Meßergebnisse

Für die korrigierten OD-Werte sind die korrespondierenden Konzentrationen in AU/ml aus der Standardkurve auf dem chargenspezifischen Datenblatt zu ermitteln.

Alternativ lassen sich die Konzentrationen auch mit der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Konzentration [AU/ml]} = b / \left(\frac{a}{OD_{\text{korrigiert}}} - 1 \right)$$

Die meisten ELISA-Photometer neuerer Bauart gestatten die Eingabe dieser Formel, so daß eine direkte Auswertung mittels Photometer möglich ist.

Der Meßbereich erstreckt sich von 9 bis 125 AU/ml. Proben mit Unit-Werten unterhalb des Meßbereiches sind als < 9 AU/ml zu bewerten, solche oberhalb als > 125 AU/ml. Diese dürfen nicht extrapoliert werden.

Der Cut-off liegt bei 10 AU/ml.

Grenzbereich = 9 - 11 AU/ml

6.B. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/GRENZEN DER METHODE

* Proben mit Unit-Werten unterhalb des Grenzbereiches werden als **NEGATIV** bewertet.

* Proben mit Unit-Werten innerhalb des Grenzbereiches werden als **GRENZWERTIG** bewertet.

Diese Werte sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.

* Proben mit Unit-Werten oberhalb des Grenzbereiches werden als **POSITIV** bewertet.

* Die Testergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der Patienten und weiteren diagnostischen Parametern interpretiert werden.

* Hohe Hämoglobinkonzentrationen im Serum beeinflussen die Testergebnisse nicht. Dagegen können hohe Lipidkonzentrationen das Testergebnis verfälschen.

* Kreuzreaktionen mit heterophilen Antikörpern sind in Einzelfällen nicht auszuschließen.

6.C. SPEZIFISCHE IgM-/IgA-/IgG-INTERPRETATION

Mögliche Ergebnisse			Interpretation
IgM	IgA	IgG	
+	-	-	1. Hinweis auf ein frühes Infektionsstadium oder solitär persistierendes IgM. Überprüfung des IgM, IgA und IgG nach 14 Tagen. ^{1,2}
-	+	-	2. Hinweis auf ein frühes Infektionsstadium oder solitär persistierendes IgA. Überprüfung des IgA und IgG nach 14 Tagen.
+	+	-	3. Hinweis auf eine akute Infektion. ^{1,2} Überprüfung des IgG nach 14 Tagen.
+	-	+	4. Hinweis auf eine akute Infektion.
+	+	+	5. Hinweis auf eine akute Infektion.
-	+	+	6. Hinweis auf eine bestehende Erst- oder Reinfektion. ³
-	-	+	7. Hinweis auf eine zurückliegende Infektion. Bei klinischem Verdacht nach 14 Tagen auf IgA- und IgG-Antikörperbewegungen überprüfen.
-	-	-	8. Kein serologischer Hinweis auf bestehende oder abgelaufene Infektion. Bei klinischem Verdacht nach 14 Tagen auf IgM, IgA und IgG überprüfen.

Hinweise:

- Grenzwertige Ergebnisse können auf beginnende oder abklingende Infektionsstadien hinweisen. Eine Überprüfung nach 14 Tagen wird empfohlen.
- ¹ Bestehende, akute Infektionen sind am besten durch parallele Bestimmung von IgM- und IgA-Antikörpern nachzuweisen.
- ² Gleichzeitig positiver IgM- und IgA-Nachweis wird besonders häufig bei Kindern festgestellt.
- ³ IgA ist bei Erwachsenen ein zuverlässigerer Marker für bestehende Infektionen als IgM.

7. LEISTUNGSMERKMALE

Die nachfolgenden Leistungsmerkmale wurden von uns im Rahmen der diagnostischen Evaluierung ermittelt.

7.A. SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Probandengruppe	Spezifität IgG
<i>M. pneumoniae</i> IgG negative Seren (Referenz-ELISA/Aggl. Test)	80% (n=40)
Probandengruppe	Sensitivität IgG
Seren mit IgG-Antikörpern gegen <i>M. pneumoniae</i> (Referenz ELISA/Aggl. Test) Patienten mit Atemwegserkrankungen	84% (n=45)

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz			
	MW AU	S	VK (%)	n		MW AU	S	VK (%)	n
PK	22,1	2,1	10	22	PK	23,2	1,4	6	13
Nr. 1	15,9	0,6	4	22	Nr. 4	33,7	1,6	5	13
Nr. 2	35	1	3	22	Nr. 5	68,7	3,7	5	13
Nr. 3	88,3	4,3	5	22	Nr. 6	99	6,3	6	13

PK = Positive Kontrolle

ALLGEMEINE HANDHABUNGSHINWEISE

- * Reagenzienflaschen und deren Verschlüsse nicht vertauschen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- * Sofort nach Gebrauch die Reagenzflaschen wieder fest verschliessen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- * Nach Gebrauch sind die Reagenzien sofort wieder, entsprechend den vorgeschriebenen Lagerungsbedingungen, zu lagern, um die angegebene Haltbarkeit zu gewährleisten.
- * Um Verwechslungen mit Reagenzien anderer Testsysteme oder Chargen zu vermeiden, sollten alle Kitkomponenten einer Testpackung nach dem Gebrauch zusammen in der Originalpackung gelagert werden (siehe auch 3.).

SICHERHEITSHINWEISE

- * Die national verbindlichen Arbeitsschutzvorschriften sind zu beachten.
- * Die Reagenzien humanen Ursprungs wurden auf HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV untersucht und für nicht reaktiv befunden. Dennoch sollten diese Reagenzien wie auch jene, die Bestandteile tierischer Herkunft enthalten (siehe Packungsinhalt), als potentiell infektiös behandelt werden, um das Risiko einer Ansteckung zu vermeiden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Die in diesem Produkt enthaltenen Chemikalien und Zubereitungen sowie die bei der Anwendung dieses Produktes anfallenden Reste sind in der Regel Abfälle, die einer ordnungsgemäßen Entsorgung zugeführt werden müssen.

Die Entsorgung solcher Abfälle unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde oder Abfallentsorgungsunternehmen informieren über die Entsorgungsmöglichkeiten.

Ausgabedatum: 01.10.2007

Mycoplasma pneumoniae-IgG-ELISA medac

Enzyme immunoassay for quantitative determination of
Mycoplasma pneumoniae IgG antibodies in human serum

Cat.no.: 360

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

INTRODUCTION

Mycoplasmas are bacteria without cell walls (Class Mollicutes = soft-skinned, Order Mycoplasmatales) having a particularly small genome. They are characterised by their small size (300 - 800 nm) and their capacity to assume widely differing shapes (pleomorphism). At the present time over 100 species of the Order Mycoplasmatales are known. Most of them occur exclusively in animals. Fourteen species have so far been isolated from human beings. They colonise the mucous membranes of the respiratory and urogenital tracts. Only a few of them are pathogenic. ***Mycoplasma pneumoniae*** is among the species pathogenic to human beings. Two variants of ***M. pneumoniae*** are known.

M. pneumoniae is an extracellular parasite of the mucosa of the respiratory tract. The pathogen is distinguished by its high level of host specificity. A specific adhesin is responsible for the adherence of the pathogen to the surface of the host cell. This adhesin also constitutes the virulence factor against which the crucial humoral response is directed. The transmission of *M. pneumoniae* takes place by droplet infection, but the incubation period of 10 to 20 days is relatively long.

M. pneumoniae is endemic, occurring with seasonal peaks in the spring and autumn. Epidemics at intervals of 3-4 years are not unusual. Infections with ***M. pneumoniae*** are among the most frequent causes of community-acquired tracheobronchitis and atypical pneumonia in children and young people. The highest incidence is found between the ages of five and fifteen years. Of all cases of atypical pneumonia, 5 - 10% are attributable to ***M. pneumoniae***. It also causes conditions such as pharyngitis, laryngitis, otitis media and myringitis. Following a ***M. pneumoniae*** infection which begins with an infection of the respiratory tract, various other clinical manifestations may occur in other organs and systems: these include pericarditis and myocarditis, reactive arthritis, meningitis, meningoencephalitis, and

polyneuritis together with a wide assortment of conditions affecting the skin. This at first seemingly harmless infection can therefore entail serious late consequences. The disease may run a particularly severe course in immunodeficient and immunosuppressed patients.

A previous attack of *M. pneumoniae* infection does not leave behind it any immunity to this pathogen. Frequent reinfections are therefore observed.

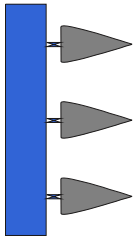
In children under five years of age the infection is predominantly asymptomatic. In such cases the disease runs a mild course. In older children and in young people and adults, however, the infection is accompanied by prostration, headache, fever and a dry, unproductive cough. But these clinical features are totally nonspecific and do not provide any clue to the cause of the infection. An effective diagnostic test is therefore necessary.

In the acute phase of the disease demonstration of the causative pathogen is the method of choice. Tests for the pathogen can be performed on throat swabs, specimens of sputum and bronchoalveolar lavage fluid (BAL). The classical technique for demonstrating *M. pneumoniae* by means of cell culture takes a long time (10-14 days). Nevertheless the isolation of the microorganism is successful in only 40-60% of cases. The antigen-ELISA test requires material rich in cells, because the sensitivity of the test is relatively low. Effective qualitative DNA tests for this pathogen are not yet commercially available.

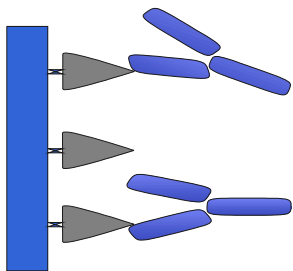
Serology constitutes the method of choice for patients with chronic infections, reinfections or extrapulmonary diseases due to *M. pneumoniae*. Commercial test systems include the complement fixation test (CFT), the haemagglutination test (HAT) and enzyme immunoassay (ELISA). Unlike the CFT and the HAT, the ELISA techniques make it possible to differentiate between immunoglobulin classes IgG, IgA and IgM, so that acute infections can be distinguished from chronic infections and past infections.

The **Mycoplasma pneumoniae-IgG-ELISA medac** test uses a recombinant antigen mixture for serological testing. This ensures that the results will have high specificity and sensitivity. Furthermore, the medac one point quantification (AU/ml) offers the best possible conditions for reproducible results and hence for the measurement of follow-up samples.

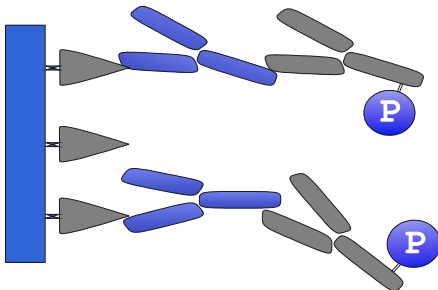
TEST PRINCIPLE



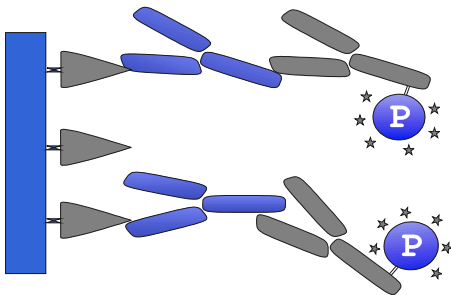
The plate is coated with ***M. pneumoniae*** specific recombinant antigen.



The ***M. pneumoniae*** - specific anti-bodies from the specimen are selectively bound to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgG antibodies bind to the IgG antibodies (P = peroxidase).



Incubation with TMB-substrate (*). The reaction is stopped by the addition of sulfuric acid. The absorption is read photometrically.

Advantages of the test

- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.
- ☞ Suitable for automation on open ELISA devices.
- ☞ One-point quantification, no standard curve needed.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 360

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells, yellow-coded, (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with recombinant antigen from *M. pneumoniae* and FCS, ready to use.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Negative control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains NBCS, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Positive control: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
4.

CAL

Calibrator: 1 vial with 1.5 ml, human serum, ready to use, stained blue, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycine sulfate.
5.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml PBS/Tween (10x), pH 7.2 -7.4, contains ProClin™ 300.
6.

BAC-DIL

Sample diluent: 1 bottle with 110 ml PBS/Tween/NBCS, pH 7.0 - 7.2, ready to use, stained blue, contains ProClin™ 300.
7.

CON

Conjugate: 3 vials with 4.5 ml each, goat anti-human IgG, HRP-conjugated, ready to use, stained green, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
8.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
9.

STOP

Stop solution: 2 vials with 11 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.

1. STORAGE AND STABILITY

MATERIAL/REAGENT	STATE	STORAGE	STABILITY
Test kit	unopened	2 - 8 °C	until expiry date
Microplate	opened	2 - 8 °C in bag with desiccant	12 weeks
Controls/Calibrator	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Wash buffer	diluted	2 - 8 °C	12 weeks
Sample diluent	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Conjugate	opened	2 - 8 °C	12 weeks
TMB-substrate	opened	2 - 8 °C	12 weeks
Stop solution	opened	2 - 8 °C	until expiry date

Do not use the reagents after the expiry date.

2. REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 2.1. Water for injection (H₂O redist.). Use of deionised water can disturb the test procedure.
- 2.2. Adjustable micropipettes.
- 2.3. Clean glass or plastic containers for dilution of wash buffer and specimen.
- 2.4. Suitable device for microplate washing (e.g. multistepper or ELISA washer).
- 2.5. Incubator for 37 °C.
- 2.6. Microplate reader with filters for 450 nm and 620 - 650 nm.

3. PREPARATION OF THE REAGENTS

Before starting the test procedure all kit components must be equilibrated to room temperature.

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

The aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant after each removal of wells. Storage and stability of the wells are indicated under point 1.

3.2. Wash buffer

Mix one volume of wash buffer (10x) with nine volumes of water for injection (e.g. 50 ml wash buffer (10x) with 450 ml water). 10 ml of diluted wash buffer are needed for eight wells.

Crystals in the wash buffer (10x) have to be dissolved by warming (max. 37 °C) and/or stirring at RT.

Do not mix test specific reagents (microplate, controls, calibrator, conjugate) from different kit lots. In contrast to that, sample diluent, wash buffer, TMB-substrate and stop solution are generally exchangeable in all Chlamydia-and Mycoplasma-ELISA medac.

Reagents from other manufacturers must not be used in general.

Valid and reproducible results are only obtained if the test procedure is precisely followed.

4. SPECIMEN

4.1. The test is suitable for serum.

4.2. Pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain any red blood cells.

4.3. Sera have to be diluted 1:100 with sample diluent.

5.A. TEST PROCEDURE

5.1. Cut the aluminium bag above the zip fastener and take out the required number of microplate wells (see 3.1.).

Microplate wells are ready to use and do not have to be pre-washed.

5.2. Pipette 50 µl sample diluent into well A1 as blank (see 6.A.). Add 50 µl each of the negative control, the positive control as well as the diluted samples in single determination, and 50 µl of the calibrator in duplicate to the wells.

If necessary the microplate wells can be kept in a humid chamber up to 30 min at RT before proceeding.

5.3. Incubate the microplate wells for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.4. After incubation wash the microplate wells three times with 200 µl wash buffer per well. Pay attention that all wells are filled. After washing tap microplate wells on filter paper.

Do not allow the wells to dry out! Proceed immediately!

5.5. Add conjugate (coloured green) to each well.

50 µl of conjugate have to be pipetted into the wells if the test is done manually.

Please note:

When working with automated devices, 60 µl of conjugate have to be pipetted into each well due to a higher evaporation in the incubation chambers of the devices.

The suitability of the test for automated devices was confirmed during the evaluation of the test. Nevertheless we recommend to verify the compatibility of the test with the devices used in the lab.

5.6. Incubate again for 60 min (\pm 5 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.4.).

5.8. Add 50 µl of TMB-substrate to each well and incubate for 30 min (\pm 2 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.

5.9. Stop the reaction by adding 100 µl of stop solution to each well. Positive samples turn yellow.

Clean microplate wells from underneath before the photometric reading and take care that there are no air bubbles in the wells.

The reading must be done within 15 min after adding the stop solution!

5.B. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Calibrator	Sample
Sample diluent	50 µl	-	-	-	-
Neg. control	-	50 µl	-	-	-
Pos. control	-	-	50 µl	-	-
Calibrator	-	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	-	50 µl
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer					
Conjugate	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
Incubate for 60 min at 37 °C, wash 3 x with 200 µl wash buffer					
TMB-substrate	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark					
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)					

*) manual/automatic procedure (see 5.5.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * The evaluation is performed using arbitrary units (AU).
- * Read OD values at 450 nm (reference wavelength 620 - 650 nm).
- * Subtract the OD value of the blank (well A1) from all other OD values.
- * Lot-specific data

The lot-specific data sheet provided with the kit contains the following information:

- Lot-specific calibration curve
- Curve parameters a and b
- Nominal OD value of the calibrator
- Lower OD limit of the calibrator
- Nominal concentration range (AU/ml) of the positive control

* Validity criteria

- The OD value of the **blank** has to be **< 0.100**.
- The OD value of the **negative control** has to be **< 0.100**.
- The unit value of the **positive control** has to be within the nominal range indicated in the lot-specific data sheet.
- The mean OD value of the calibrator has to be above the lower OD limit indicated in the lot-specific data sheet.

Repeat the run if the results do not meet the specification!

* Correction of the results

The measured OD values of the positive control and the samples have to be corrected as follows:

$$OD_{\text{corrected}} = \frac{\text{Nominal OD value of the calibrator}}{\text{Measured OD value of the calibrator}} \times OD_{\text{measured}}$$

* Quantification of the results

The corresponding concentrations of the corrected OD values in AU/ml can be read from the lot-specific calibration curve (see lot-specific data sheet).

Alternatively, the concentrations can be calculated using the following formula:

$$\text{Concentration [AU/ml]} = b \left(\frac{a}{OD_{\text{corrected}}} - 1 \right)$$

Most of the new ELISA readers allow to program the formula, thus enabling an automated data processing.

The measuring range spans from 9 to 125 AU/ml. Samples below this range have to be interpreted as < 9 AU/ml, those above as > 125 AU/ml. These values must not be extrapolated.

The cut-off is 10 AU/ml.

Grey zone = 9 - 11 AU/ml.

6.B. INTERPRETATION OF RESULTS/LIMITATIONS OF THE METHOD

* Samples with Unit values below the lower limit of the grey zone are reported as **NEGATIVE**.

* Samples with Unit values within the grey zone are reported as **EQUIVOCAL**.

These samples should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.

* Samples with Unit values exceeding the upper limit of the grey zone are reported as **POSITIVE**.

* The results should always be interpreted in connection with clinical data and additional diagnostic parameters.

* High concentrations of hemoglobin in serum do not have an influence on the results. However, high concentrations of lipids may influence the test results.

* Cross-reactivities with heterophilic antibodies cannot be excluded in individual cases.

6.C. SPECIFIC IgM-/IgA-/IgG-INTERPRETATION

Possible results			Interpretation
IgM	IgA	IgG	
+	-	-	1. Indication of early stage of infection or solitary, persisting IgM. Retest IgM, IgA and IgG after 14 days. ^{1,2}
-	+	-	2. Indication of early stage of infection or solitary, persisting IgA. Retest IgA and IgG after 14 days.
+	+	-	3. Indication of acute infection. ^{1,2} Retest IgG after 14 days.
+	-	+	4. Indication of acute infection.
+	+	+	5. Indication of acute infection.
-	+	+	6. Indication of primary current or reinfection. ³
-	-	+	7. Indication of past infection. In case of clinical suspicion retest after 14 days for IgA and IgG antibodies.
-	-	-	8. No serological indication of current or past infection. In case of clinical suspicion retest after 14 days for IgM, IgA and IgG antibodies.

Comment:

- Borderline results may indicate commencing or abating infections. Retesting after 14 days is recommended.

¹ Current, acute infections are best detectable by parallel determination of IgM and IgA antibodies.

² Simultaneous detection of IgM and IgA antibodies is particularly frequent in children.

³ In adults, IgA antibodies are more reliable markers for current infections than IgM antibodies.

7. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

We determined the following performance characteristics during the diagnostic evaluation.

7.A. SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Patient Group	Specificity IgG
<i>M. pneumoniae</i> IgG negative sera (reference-ELISA/Aggl. Assay)	80% (n=40)
Patient Group	Sensitivity IgG
Sera with IgG antibodies to <i>M. pneumoniae</i> (reference ELISA/Aggl. Assay) Patients with respiratory infections	84% (n=45)

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation			
	mean AU	SD	CV (%)	n		mean AU	SD	CV (%)	n
PC	22.1	2.1	10	22	PC	23.2	1.4	6	13
N° 1	15.9	0.6	4	22	N° 4	33.7	1.6	5	13
N° 2	35	1	3	22	N° 5	68.7	3.7	5	13
N° 3	88.3	4.3	5	22	N° 6	99	6.3	6	13

PC = positive control

GENERAL HANDLING ADVICES

- * To avoid cross contamination do not exchange the vials and their screw caps.
- * The reagents have to be sealed immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- * After use, the reagents have to be stored as indicated to guarantee the shelf life.
- * After use, all components of the testkit should be stored in the original package, in order to avoid mixing up the reagents of other test systems or lots (see also 3.).

HEALTH AND SAFETY INFORMATION

- * The local occupational safety and health regulations have to be regarded.
- * Reagents of human origin have been tested and found to be negative for HBsAg, for antibodies to HIV-1/2 and to HCV. Nevertheless, it is strongly recommended that these materials as well as those of animal origin (see kit contents), should be handled as potentially infectious and used with all necessary precautions.

DISPOSAL CONSIDERATIONS

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

Date of issue: 01.10.2007

Mycoplasme pneumoniae-IgG-ELISA medac

Immunoessai enzymatique pour la détection quantitative des anticorps IgG anti-**Mycoplasme pneumoniae** dans le sérum humain

Cat.no.: 360

DESTINE UNIQUEMENT AU DIAGNOSTIC IN VITRO

INTRODUCTION

Les Mycoplasmes sont des bactéries sans paroi cellulaire (classe des Mollicutes = peau molle, ordre des Mycoplasmatales) ayant un génome particulièrement petit. Elles sont caractérisées par leur petite taille (300-800 nm) et leur capacité à adopter différentes formes (pléomorphisme). Actuellement, plus de 100 espèces de l'ordre des Mycoplasmatales sont connues. La plupart d'entre elles sont présentes exclusivement chez les animaux. Quatorze espèces ont été jusqu'à présent isolées chez l'être humain. Elles colonisent les membranes muqueuses des tractus respiratoires et urogénitaux. Seulement quelques unes d'entre elles sont pathogènes. **Mycoplasme pneumoniae** est parmi les espèces pathogènes de l'être humain. Deux variantes de **M. pneumoniae** sont connues.

Le **M. pneumoniae** est un parasite extracellulaire de la muqueuse du tractus respiratoire. Le pathogène se distingue par son haut degré de spécificité de l'hôte. Une adhésine spécifique est responsable de l'adhérence du pathogène sur la surface de la cellule hôte. Cette adhésine constitue aussi le facteur virulent principal contre lequel la réponse humorale est dirigée. La transmission de **M. pneumoniae** se fait par aérosol, mais la période d'incubation de 10 à 20 jours est relativement longue.

Le **M. pneumoniae** est endémique, apparaissant par pics saisonniers au printemps et en automne. Des épidémies à intervalle de 3-4 ans ne sont pas inhabituelles. Les infections à **M. pneumoniae** sont parmi les causes les plus fréquentes de trachéobronchites communautaires et de pneumonie atypiques chez l'enfant et les jeunes gens. La plus haute incidence est trouvée entre les âges de cinq et quinze ans. De toutes les causes de pneumonie atypique, 5-10% sont attribuables à **M. pneumoniae**. Il cause également des maladies comme la pharyngite, laryngite, otite media et la myringite. Après une infection à **M. pneumoniae** qui commence par une infection du tractus respiratoire, différentes autres manifestations cliniques peuvent apparaître dans d'autres

organes ou systèmes: celles - ci incluent la péricardite et la myocardite, l'arthrite réactive, la méningite, la méningo-encéphalite et la polynévrite simultanément à un large tableau de pathologies affectant la peau. Ces infections semblant d'abord sans gravité peuvent avoir des conséquences sérieuses tardives.

La maladie peut avoir une évolution sévère chez les patients immunodéficients et immunodéprimés. Une atteinte antérieure à ***M. pneumoniae*** ne laisse pas d'immunité contre ce pathogène. Des réinfections fréquentes sont dès lors observées.

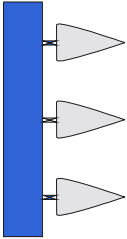
Chez l'enfant en-deça de cinq ans les infections sont principalement asymptomatiques. Dans de tel cas la maladie a une évolution non sévère. Chez les enfants plus âgés, les jeunes gens et les adultes, cependant, l'infection est accompagnée d'abattement, de mal de tête, de fièvre et d'une toux sèche, improductive. Ces indications cliniques sont totalement non spécifiques et ne fournit aucun indice en ce qui concerne la cause de l'infection. Un diagnostic efficace est dès lors nécessaire.

Dans la phase aigüe de la maladie, la mise en évidence du pathogène responsable est la méthode de choix. Des tests pour la détection du pathogène peuvent être réalisés sur des frottis de gorge, des spécimens de crachat et du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BAL). La technique classique pour démontrer la présence de ***M. pneumoniae*** au moyen de la culture cellulaire prend un temps important (10-14 jours). Cependant, l'isolation du microorganisme est réussie dans seulement 40-60% des cas. Les test ELISA-antigène demandent du matériel riche en cellules, parce que la sensibilité du test est relativement basse. Des tests qualitatifs efficaces de DNA ne sont pas encore disponibles commercialement.

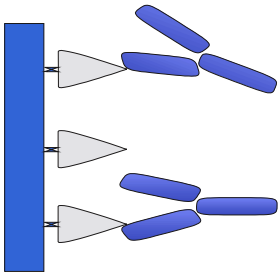
La sérologie constitue la méthode de choix pour les patients avec des infections chroniques, des réinfections ou des maladies extrapulmonaires causées par ***M. pneumoniae***. Les systèmes de tests commerciaux incluent la fixation du complément (CFT), le test d'hémagglutination (HAT) et les immunoessais enzymatiques (ELISA). Contrairement au CFT et HAT, les techniques ELISA rendent possibles la différenciation des classes d'immunoglobulines IgG, IgA et IgM, de telle manière que les infections aigües peuvent être distinguées des infections chroniques et des infections anciennes.

Le test ***Mycoplasma pneumoniae-IgG-ELISA*** medac utilise un mélange d'antigènes recombinants pour la détection sérologique. Ceci assure que les résultats auront une spécificité et une sensibilité élevées. De plus, la quantification en un point (AU/ml) offre les meilleures conditions possibles pour des résultats reproductibles et en conséquence pour les changements sériels de titre d'anticorps".

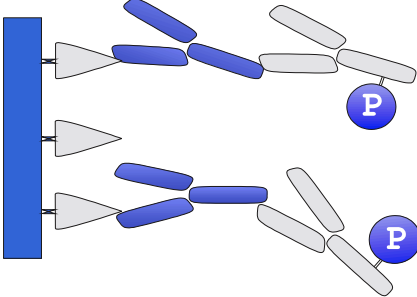
PRINCIPE DU DOSAGE



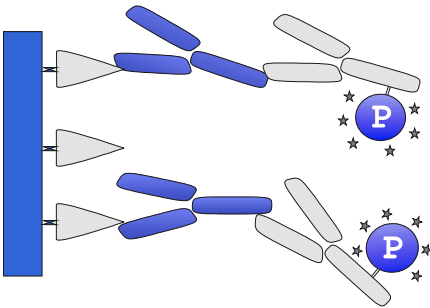
La plaque est revêtue d'antigènes recombinants spécifiques *M. pneumoniae*.



Les anticorps spécifiques anti-*M. pneumoniae* présents dans l'échantillon, vont se lier aux antigènes



Les anticorps anti-IgG humaines conjugués à la peroxydase vont se lier aux anticorps IgG (P = peroxydase).



Incubation avec le TMB-substrat (*). La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique. L'absorption est lue sur un spectrophotomètre.

Avantages du dosage

- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation rationnelle du test.
- ☞ Convient pour l'automatisation sur des appareils ELISA ouverts.
- ☞ Quantification en un point, pas de courbe standard nécessaire.

CONTENU DE LA TROUSSE

Cat. no.: 360

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits, de couleur jaune, (avec support et dessiccant, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, en forme de U, revêtus d'antigènes recombinants de *M. pneumoniae* et de sérum fœtal de veau, prêts à l'emploi.
2.

CONTROL	-
----------------	----------

Contrôle négatif : 1 flacon de 1,5 ml, sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contient du sérum de veau nouveau-né, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
3.

CONTROL	+
----------------	----------

Contrôle positif: 1 flacon de 1,5 ml, sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contenant de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine .
4.

CAL

Calibrateur: 1 flacon de 1,5 ml, sérum humain, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contenant de la BSA, du phénol, du Proclin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
5.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, tampon PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, contenant du ProClin™ 300.
6.

BAC-DIL

Diluant pour échantillon: 1 flacon de 110 ml , PBS/Tween/sérum de veau, pH 7,0 - 7,2, prêt à l'emploi, de couleur bleue, contenant du ProClin™ 300.
7.

CON

Conjugué: 3 flacons de 4,5 ml chacun, solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguées à la peroxydase de raifort, prête à l'emploi, de couleur verte, contenant de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
8.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
9.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 11 ml chacun, acide sulfurique 0,5 M (H₂SO₄), prêt à l'emploi.

1. CONSERVATION ET STABILITE

MATERIEL/REACTIFS	ETAT	CONSERVATION	STABILITE
Trousse	non ouvert	2 - 8 °C	Jusqu'à la date de péremption
Microplaque	ouvert	2 - 8 °C dans le sachet avec dessicant	12 semaines
Contrôles/ Calibrateur	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Tampon de lavage	dilué	2 - 8 °C	12 semaines
Diluant pour échantillons	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Conjugué	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
TMB-substrat	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines
Solution d'arrêt	ouvert	2 - 8 °C	Jusqu'à la date de péremption

Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.

2. REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- 2.1. Eau pour injection (H₂O redist.). L'utilisation d'eau désionisée peut perturber la procédure du test.
- 2.2. Micropipettes ajustables.
- 2.3. Récipients propres en plastique ou en verre pour la dilution du tampon de lavage et des sérums de patients.
- 2.4. Dispositif de lavage des microplaques (par exemple multistepper ou laveur ELISA).
- 2.5. Incubateur à 37 °C.
- 2.6. Lecteur de microplaque avec filtres à 450 nm et 620 - 650 nm.

3. PREPARATION DES REACTIFS

Avant de démarrer la procédure de dosage, tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante.

Calculer le nombre nécessaire de puits.

3.1. Microplaque

Le sachet aluminium avec le dessicant doit être soigneusement refermé après avoir retiré les puits. La conservation et la stabilité des puits sont indiqués au point 1.

3.2. Tampon de lavage

Mélanger un volume de tampon de lavage (10x) avec neuf volumes d'eau pour injection (ex. 50 ml de tampon de lavage avec 450 ml d'eau). 10 ml de tampon dilué sont nécessaires pour 8 puits.

Des cristaux dans le tampon de lavage (10x) doivent être dissous en chauffant (max. 37 °C) et/ou en agitant à t° ambiante.

Ne pas mélanger les réactifs spécifiques du test (microplaque, contrôles, calibrateur, conjugué) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillon, le tampon de lavage, le substrat-TMB, et la solution d'arrêt sont interchangeables dans tous les Chlamydiae- et Mycoplasmes-ELISA medac.

Des réactifs d'autres fabricants ne peuvent pas être utilisés.

Des résultats valides et reproductibles sont obtenus uniquement en suivant strictement la notice d'emploi.

4. ECHANTILLONS

4.1. Le test est à utiliser avec du sérum.

4.2. Le pré-traitement, par ex. inactivation, n'est pas nécessaire. Toutefois, il ne doit pas être contaminé par des microorganismes ni contenir des érythrocytes.

4.3. Les échantillons sériques doivent être dilués au 1:100 avec le diluant pour échantillons.

5.A. PROCEDURE DE DOSAGE

5.1. Couper le sachet aluminium au-dessus du zip et extraire le nombre de puits nécessaire (voir 3.1.).

Les puits sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être prélavés.

5.2. Distribuer 50 µl de diluant pour échantillons dans le puit blanc A1 (voir 6.A.). Ajouter 50 µl de chaque du contrôle négatif, contrôle positif de même que les échantillons dilués en simple, et 50 µl du calibrateur en double dans les puits.

Remarque: La plaque peut, à ce stade de la technique, être conservée dans une chambre humide 30 min à température ambiante.

- 5.3. Incuber la microplaque pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) dans une chambre humide ou recouverte d'un film pour incubation.
- 5.4. Après incubation, laver les puits trois fois avec 200 μ l de tampon de lavage par puit. Vérifier que tous les puits soient bien remplis. Après lavage, tapoter délicatement les puits sur du papier filtre.

Ne pas laisser sécher les puits! Poursuivre immédiatement la procédure!

- 5.5. Ajouter le conjugué (de couleur verte) à chaque puit.

Distribuer 50 μ l de conjugué dans les puits si la procédure est réalisée manuellement.

Attention:

Si la procédure est réalisée sur automate, il faut distribuer 60 μ l de conjugué dans chaque puit, en raison de l'évaporation importante dans les chambres d'incubation des automates.

L'utilisation sur des appareils automatiques a été validée pendant l'évaluation du test. Néanmoins nous recommandons de vérifier la compatibilité du dosage avec les appareils utilisés dans le laboratoire.

- 5.6. Incuber à nouveau pendant 60 min (\pm 5 min) à 37 °C (\pm 1 °C) en chambre humide ou recouvert d'un film pour incubation.
- 5.7. Après incubation, laver les puits à nouveau (voir 5.4.).
- 5.8. Ajouter 50 μ l de TMB-substrat dans chaque puit et incuber pendant 30 min (\pm 2 min) à 37 °C (\pm 1 °C) dans une chambre humide ou recouvert d'un film pour incubation dans l'obscurité. Les échantillons positifs deviennent bleus.
- 5.9. Arrêter la réaction en ajoutant 100 μ l de solution d'arrêt dans chaque puit. Les échantillons positifs deviennent jaunes.

Bien nettoyer le dessous des puits avant la lecture photométrique et vérifier l'absence de bulles d'air.

La lecture doit être effectuée dans les 15 min. après l'ajout de la solution d'arrêt!

5.B. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Calibrateur	Echantillons
Diluant pour échantillons	50 µl	-	-	-	-
Contrôle nég.	-	50 µl	-	-	-
Contrôle pos.	-	-	50 µl	-	-
Calibrateur	-	-	-	50 µl	-
Echantillons	-	-	-	-	50 µl
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 x avec 200 µl de tampon de lavage					
Conjugué	50/60 µl*)	50/60 µl *)	50/60 µl*)	50/60 µl*)	50/60 µl*)
Incuber pendant 60 min à 37 °C, laver 3 x avec 200 µl de tampon de lavage					
TMB-Substrat	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Incuber pendant 30 min à 37 °C dans l'obscurité					
Solution d'arrêt	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Lecture photométrique à 450 nm (réf. 620 - 650 nm)					

*) procédure manuelle/ automatique(voir 5.5.)

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * L'évaluation est réalisée en utilisant des unités arbitraires (AU).
- * Lire les DO à 450nm (réf. 620 - 650 nm).
- * Soustraire la valeur DO du blanc (puit A1) de toutes les autres valeurs DO.
- * Données spécifique du lot

La feuille de données spécifiques du lot fournie avec le kit contient les informations suivantes:

- La courbe de calibration spécifique du lot.
- Les paramètres de courbe a et b.
- La valeur nominale DO du calibrateur.
- La DO limite inférieure du calibrateur.
- L'étendue nominale de concentration (AU/ml) du contrôle positif.

* Critères de validité

- La valeur DO du **blanc** doit être **< 0,100**.
- La valeur de DO du **contrôle négatif** doit être **< 0,100**.
- La valeur en unités du **contrôle positif** doit être dans l'écart nominal indiqué dans la feuille de données spécifiques du lot .
- La valeur moyenne de DO du calibrateur doit être au-dessus de la valeur minimale indiquée dans la feuille de données spécifique du lot.

Refaire la série si les résultats ne rencontrent pas les spécifications!

* Correction des résultats

Les DO mesurées du contrôle positif et des échantillons doivent être corrigés comme ci-après:

$$DO_{\text{corrigée}} = \frac{\text{Valeur DO nominale du calibrateur}}{\text{Valeur DO mesurée du calibrateur}} \times DO_{\text{mesurée}}$$

* Quantification des résultats

Les concentrations correspondantes aux valeurs DO corrigées en AU/ml peuvent être lues à partir de la courbe de calibration spécifique du lot (voir feuille de données spécifiques du lot).

Alternativement, les concentrations peuvent être calculées en utilisant la formule suivante:

$$\text{Concentration [AU/ml]} = b \left(\frac{a}{DO_{\text{corrigée}}} - 1 \right)$$

La plupart des nouveaux lecteurs ELISA permettent de programmer la formule, donc de calculer les résultats automatiquement

L'étendue de mesure s'étend de 9 à 125 AU/ml. Les échantillons en-dessous de cet écart doivent être interprétés comme < 9 AU/ml, ceux au-dessus comme > 125 AU/ml. Ces valeurs ne peuvent pas être extrapolées.

Le cut-off est 10 AU/ml.

Zone grise = 9 - 11 AU/ml.

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS/LIMITES DE LA METHODE

* Les échantillons ayant des valeurs en unités inférieures à la limite inférieure de la zone grise sont rapportés comme **NEGATIFS**.

* Les échantillons ayant des valeurs en unités dans la zone grise sont rapportés comme **EQUIVOQUES**.

Ces échantillons devront être retestés en même temps qu'un nouvel échantillon prélevé 14 jours plus tard de manière à déterminer un changement de titre.

* Les échantillons ayant des valeurs en unités dépassant la limite supérieure de la zone grise sont rapportés comme **POSITIFS**.

* Les résultats devront toujours être interprétés en relation avec les données cliniques et les paramètres complémentaires de diagnostic.

* De hautes concentrations d'hémoglobine dans le sérum n'ont pas d'influence sur les résultats. Cependant, de hautes concentrations de lipides peuvent les influencer.

* Des réactions croisées avec des anticorps hétérophiles ne peuvent être exclues dans des cas individuels.

6.C. INTERPRÉTATION SPECIFIQUE IgM-/IgA-/IgG

Résultats possibles			Interprétation
IgM	IgA	IgG	
+	-	-	1. Indication d'un stade précoce d'une infection ou d'IgM solitaires persistants. Retester IgM, IgA et IgG après 14 jours. ^{1,2}
-	+	-	2. Indication d'un stade précoce d'une infection ou présence d'IgA persistants et solitaires. Retester IgA et IgG après 14 jours.
+	+	-	3. Indication d'une infection aiguë. Retester les IgG après 14 jours.
+	-	+	4. Indication d'une infection aiguë.
+	+	+	5. Indication d'une infection aiguë.
-	+	+	6. Indication d'une infection primaire en cours ou d'une réinfection. ³
-	-	+	7. Indication d'une infection passée. En cas de suspicion clinique retester les anticorps IgA et IgG après 14 jours.
-	-	-	8. Pas d'indication sérologique d'une infection en cours ou passée. En cas de suspicion clinique retester les anticorps IgM, IgA et IgG après 14 jours.

Commentaire:

- Des résultats limite peuvent indiquer des infections débutantes ou finissantes. Un retest après 14 jours est recommandé.

¹ Les infections en cours ou aiguës sont mieux détectables par la détermination en parallèle des anticorps IgM et IgA.

² La détection simultanée des anticorps IgM et IgA est fréquente chez les enfants.

³ Chez les adultes, les anticorps IgA sont des marqueurs plus fiables pour les infections en cours que les anticorps IgM.

7. PERFORMANCES DU DOSAGE

Les performances suivantes ont été déterminées pendant l'évaluation diagnostique.

7.A. SENSIBILITE ET SPECIFICITE

Groupe de patients	Spécificité IgG
Séras <i>M. pneumoniae</i> IgG négatifs (référence-ELISA/test d'agglutination)	80% (n=40)
Group de patients	Sensibilité IgG
Séras avec anticorps IgG anti <i>M. pneumoniae</i> (référence ELISA/test d'agglutination) Patients avec infections respiratoires	84% (n=45)

7.B. PRECISION

Echantillon	Variation intra-essai				Echantillon	Variation inter-essai			
	AU moyenne	SD	CV (%)	n		AU moyenne	SD	CV (%)	n
CP	22,1	2,1	10	22	CP	23,2	1,4	6	13
N° 1	15,9	0,6	4	22	N° 4	33,7	1,6	5	13
N° 2	35	1	3	22	N° 5	68,7	3,7	5	13
N° 3	88,3	4,3	5	22	N° 6	99	6,3	6	13

CP = Contrôle positif

INDICATION GENERALES

- * Ne pas échanger les flacons et leurs bouchons pour éviter les contaminations croisées.
- * Les flacons des réactifs doivent être refermés immédiatement après leur utilisation pour éviter l'évaporation et les contaminations microbiennes.
- * Après emploi, les réactifs doivent être conservés comme indiqué pour garantir leur durée de vie.
- * Après utilisation, conserver tous les composants de la trousse dans leur emballage d'origine, afin d'éviter le mélange des réactifs concernant d'autres techniques de dosage ou d'autres lots (voir aussi 3.).

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- * Il faut appliquer la réglementation en vigueur en matière de sécurité et de santé.
- * Les réactifs d'origine humaine ont été dosés et trouvés négatifs en AgHBs, en anticorps anti-HIV-1/2 et anti-VHC. Néanmoins, il est formellement conseillé de manipuler ces produits, ainsi que ceux d'origine animale (voir contenu de la trousse), comme étant potentiellement infectieux et de les utiliser avec les précautions nécessaires.

CONSEIL D'ELIMINATION

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets doit se faire selon la réglementation en vigueur. Il faut consulter les organismes agréés pour connaître le moyen de se débarrasser des déchets.

Date de mise à jour: 01.10.2007

LITERATUR/REFERENCES/LITTERATURE

Clyde, WA: Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. Clin Infect Dis 17 (Suppl 1), S32-6 (1993).

Dionisio D, Valassina M, Uberti M, Fabbri C, Parri F, Saffi EG: *Mycoplasma pneumoniae* non-pulmonary infection presenting with pharyngitis, polyarthritits and localized exanthem. Scand J Infect Dis 33, 782-783 (2001).

Döller G, Döller PC, Jacobs E, Schuy W: Zur Differentialdiagnostik von Infektionen des Respirationstrakts. Diagnose & Labor 43, 21-33 (1993).

Drasbek M, Nielsen PK, Persson K, Birkelund S, Christiansen G: Immune response to *Mycoplasma pneumoniae* P1 and P116 in patients with atypical pneumonia analyzed by ELISA. BMC Microbiol. 4, 7ff. (2004).

Ferwerda A, Moll HA, de Groot R: Respiratory tract infections by *Mycoplasma pneumoniae* in children: a review of diagnostic and therapeutic measures. Eur J Pediatr 160, 483-491 (2001).

Granstrom M, Holme T, Sjogren AM, Ortqvist A, Kalin M: The role of IgA determination by ELISA in the early serodiagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection, in relation to IgG and mu-capture IgM methods. Med Microbiol. 40, 288-92 (1994).

Hammerschlag MR: *Mycoplasma pneumoniae* infections. Curr Opin Infect Dis 14, 181-186 (2001).

Jacobs E: Das Adhäsion von *Mycoplasma pneumoniae*: Seine Bedeutung als Virulenzfaktor in der Pathogenese und in der Diagnostik. Klin Lab 40, 228-229 (1994).

Kleemola M, Käyhty H: Increase in titers of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in patients with purulent meningitis. J Infect Dis 146, 284-288 (1982).

Krause D: *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. Trends Microbiol 6, 15-18 (1998).

Seggev JS, Semak GV, Kurup VP: Isotype-specific antibody responses to acute *Mycoplasma pneumoniae* infection. Ann Allergy Asthma Immunol. 77, 66-73 (1996).

Sillis M: The limitations of IgM assays in the serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. Med Microbiol. 33, 253-8 (1990).

Sotgiu S, Pugliatti M, Rosati G, Deiana GA, Sechi GP: Neurological disorders associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. Eur J Neurol 10, 165-168 (2003).