

Mycoplasma pneumoniae-IgM-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

Telefon/Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 348

Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 359

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

Telefon/Phone: ++49/ 4103 / 8006 - 111

Fax: ++49/ 4103 / 8006 - 113

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

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

Mycoplasma pneumoniae-IgM-ELISA medac

Enzymimmunoassay zur qualitativen Bestimmung von
Mycoplasma pneumoniae-IgM-Antikörpern in humanem Serum

Katalog-Nr.: 362

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, Po-

lyneuritis 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.

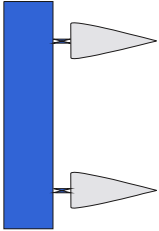
Die Infektion verläuft bei Kindern unter 5 Jahren vorwiegend asymptomatisch. Die Erkrankung nimmt hier einen leichten Verlauf. Dagegen geht die Infektion bei älteren Kindern sowie Jugendlichen und Erwachsenen mit einer deutlichen Symptomatik einher. Die Symptome wie Abgeschlagenheit, Kopfschmerz, Fieber 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.

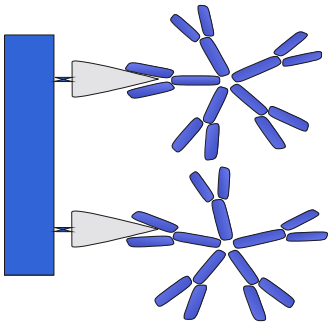
Die Serologie stellt die Methode der Wahl bei chronischen Krankheitsverläufen, Reinfektionen und extrapulmonalen Erkrankungen durch **M. pneumoniae** dar. Als kommerzielle Nachweissysteme stehen Komplementbindungsreaktion (KBR), Hämagglutinationstest (HAT) und Enzymimmunoassay (ELISA) zur Verfügung. 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-IgM-ELISA medac** verwendet für den serologischen Nachweis ein natives, aufgereinigtes Antigen.

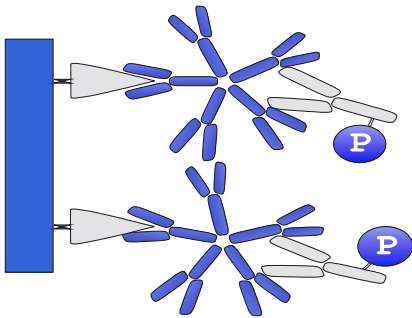
TESTPRINZIP



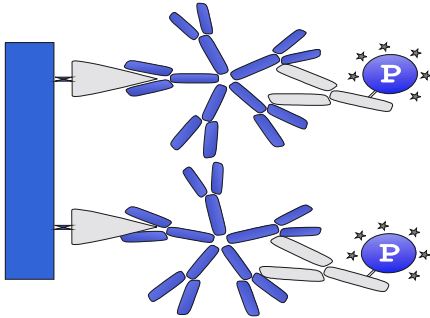
Mit *M. pneumoniae*-spezifischem Antigen beschichtete Mikrotiterplatte.



Die *M. pneumoniae*-spezifischen Antikörper aus dem Patientenserum binden an das Antigen.



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



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

Testvorteile

- ☞ Hohe Sensitivität und Spezifität.
- ☞ Die brechbaren Mikrotiterstreifen gewährleisten eine optimale Testauslastung.

PACKUNGSINHALT

KAT.-NR.: 362

1.

MTP

Mikrotiterplatte: 12 Teststreifen à 8 Vertiefungen, (mit Halterahmen und Trockenmittelpappe im Aluminiumbeutel vakuumverschweißt), brechbar, Rundboden, beschichtet mit *M. pneumoniae*-spezifischem Antigen 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.

WB

Waschpuffer: 1 Flasche à 100 ml, PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, enthält ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche à 110 ml, PBS/Tween/NBCS, pH 7,0 - 7,2, gebrauchsfertig, blau gefärbt, enthält ProClin™ 300.
6.

CON

Konjugat: 3 Fläschchen à 4,5 ml, Ziege-Anti-Human-IgM-Antikörper, HRP-konjugiert, gebrauchsfertig, rot gefärbt, enthält BSA, Phenol, ProClin™ 300 und Gentamycinsulfat.
7.

TMB

TMB-Substrat: 1 Fläschchen à 10 ml, gebrauchsfertig.
8.

STOP

Stopplösung: 2 Fläschchen à 11 ml, 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄), gebrauchsfertig.
9.

RF-ABS

IgG/Rf-Absorbens: 1 Fläschchen à 4 ml, Ziege-Anti-Human-IgG-Antiserum, gebrauchsfertig, enthält Natriumazid < 0,1%.

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	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen
Waschpuffer	verdünnt	2 - 8 °C	12 Wochen
Probenverdünnungs- puffer	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
IgG/Rf-Absorbens	geöffnet	2 - 8 °C	12 Wochen

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 nm - 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 von Mikrotitervertiefungen zusammen mit der Trockenmittelpappe wieder fest verschlossen werden. Lagerung und Haltbarkeit der nicht verwendeten Mikrotitervertiefungen siehe 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, Konjugat) sind nicht mit denen anderer Chargen zu mischen. Im Gegensatz dazu sind Probenverdünnungspuffer, Waschpuffer, TMB-Substrat, IgG-Rf-Absorbens 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. Um Interferenzen mit hohen IgG-Titern und Rheumafaktoren zu vermeiden, soll eine IgG-/Rheumafaktor-Absorption für alle Seren durchgeführt werden.

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

5. ARBEITSVORSCHRIFT

5.A. IgG/RF-ABSORPTION

Wichtig:

- * Die Kontrollen sind gebrauchsfertig und werden nicht absorbiert.
- * Die im folgenden angegebenen Volumina gelten pro Einzelbestimmung.

5.A.1. Serum: 10 µl Serum werden mit 490 µl Verdünnungspuffer verdünnt (Verdünnung 1:50).

5.A.2. Absorption: 30 µl IgG/Rf-Absorbens und 30 µl verdünntes Serum werden gemischt (Verdünnung 1:100) und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Alternative: Die Absorption kann auch über Nacht bei 2 - 8 °C durchgeführt werden.

5.A.3. Die Testverdünnung ist nun 1:100.

5.B. TESTDURCHFÜHRUNG

5.B.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.B.2. Für die Ermittlung des Leerwertes in die Vertiefung A1 50 µl Probenverdünnungspuffer pipettieren (s. 6.A.). Anschließend in Doppelbestimmung jeweils 50 µl negative Kontrolle, dann in Einfachbestimmung die positive Kontrolle (50 µl) sowie fortlaufend, auch in Einfachbestimmung, die verdünnten Patientenproben (50 µl) pipettieren.

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

5.B.3. Die Mikrotitervertiefungen 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).

5.B.4. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen dreimal mit jeweils 200 µl 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.B.5. Konjugat (rot gefärbt) in alle Vertiefungen pipettieren.

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

Bitte beachten:

Beim Arbeiten mit automatisierten Gerätesystemen ist auf Grund der höheren Verdunstung in den Inkubationskammern die Zugabe von 60 µl 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.

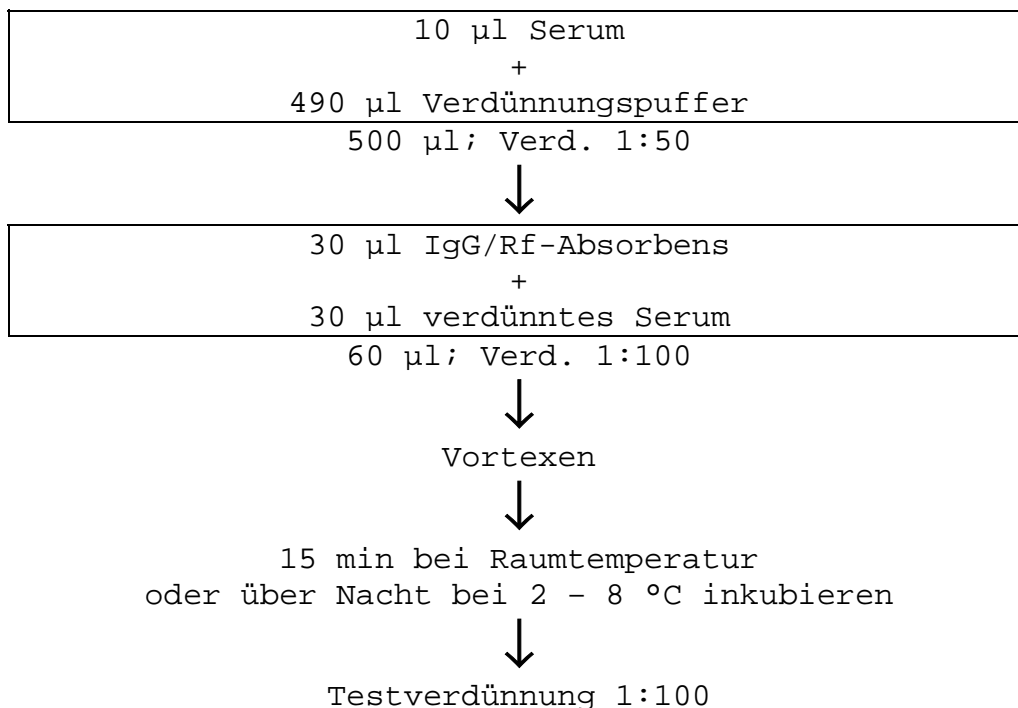
- 5.B.6. Erneut 60 min (\pm 5 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt).
- 5.B.7. Nach Inkubation die Mikrotitervertiefungen erneut waschen (s. 5.B.4.).
- 5.B.8. 50 μ l TMB-Substrat in jede Vertiefung pipettieren und 30 min (\pm 2 min) bei 37 °C (\pm 1 °C) im Dunkeln inkubieren (feuchte Kammer oder mit Folie abgeklebt). Positive Proben erscheinen blau gefärbt.
- 5.B.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.C. TABELLE ZUR IgG/RF-ABSORPTION

Angaben pro Bestimmung



5.D. TABELLE ZUR ARBEITSVORSCHRIFT

	Leerwert (A1)	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle	Absorbierte Probe
Probenverdünnungspuffer	50 µl	-	-	-
Negative Kontrolle	-	50 µl	-	-
Positive Kontrolle	-	-	50 µl	-
Absorbierte 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 *)
60 min bei 37 °C inkubieren, 3 x mit 200 µl Waschpuffer waschen				
TMB-Substrat	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
Photometrische Auswertung bei 450 nm (Ref. 620 - 650 nm)				

*) manuelle/automatisierte Abarbeitung (s. 5.B.5.)

6.A. TESTBEURTEILUNG (VALIDITÄT)

- * 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.
- * Der OD-Wert des Leerwertes muß < 0,100 betragen.
- * Der OD-Mittelwert der **negativen Kontrolle** muß < 0,100 betragen.
- * Der OD-Wert der **positiven Kontrolle** muß > 0,800 betragen.
- * **Cut-off = OD-Mittelwert der negativen Kontrolle + 0,380**
- * **Grenzbereich = Cut-off ± 10%**

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

6.B. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

6.B.1. QUALITATIV

Ergebnis	Bewertung
OD < Grenzbereich	negativ
OD des Cut-off +/- 10%	grenzwertig
OD > Grenzbereich	positiv

6.B.2. SEMIQUANTITATIV

Cut-off-Index: $\frac{\text{OD der Probe}}{\text{OD des Cut-off}}$	Bewertung
< 0,9	negativ
0,9 - 1,1	grenzwertig
> 1,1	positiv

- * Werte im Grenzbereich sollten kontrolliert werden, indem nach 14 Tagen eine zusätzliche Patientenprobe entnommen wird, die zusammen mit der ersten Probe auf eine Titerbewegung untersucht wird.
- * Die Testergebnisse sollten stets in Verbindung mit IgG und IgA und 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 bei negativen Proben zu erhöhten OD-Werten führen.
- * Kreuzreaktionen mit heterophilen Antikörpern sind in Einzelfällen nicht auszuschließen.
- * Bei frischen EBV-Infektionen kann es unter Umständen zu falsch positiven IgM-Ergebnissen kommen.

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. SPEZIFITÄT UND SENSITIVITÄT

Probandengruppe	Spezifität IgM
<i>M. pneumoniae</i> IgM negative Seren (Referenz-ELISA/Aggl. Test)	100% (n=40)
Probandengruppe	Sensitivität IgM
Seren mit IgM-Antikörpern gegen <i>M. pneumoniae</i> (Referenz ELISA/Aggl. Test) Patienten mit Atemwegs-erkrankungen	71% (n=44)

7.B. PRÄZISION

Probe	Intraassay-Varianz				Probe	Interassay-Varianz (n = 13)		
	Ø OD	S	VK (%)	n		Ø OD	S	VK (%)
NK	0,028	0,008	29	22	NK	0,017	0,004	24
GW	0,838	0,019	2	22	GW	0,792	0,050	6
PK	1,141	0,020	2	22	PK	0,990	0,035	4
Nr. 1	0,033	0,004	12	22	Nr. 4	0,021	0,004	19
Nr. 2	0,651	0,015	2	22	Nr. 5	0,542	0,017	3
Nr. 3	1,611	0,033	2	22	Nr. 6	1,480	0,062	4
					Nr. 7	1,409	0,093	7

NK = negative Kontrolle; GW = schwach positive Kontrolle (im Kit nicht enthalten); 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 Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

Ausgabedatum: 01.10.2007

Mycoplasma pneumoniae-IgM-ELISA medac

Enzyme immunoassay for qualitative determination of
Mycoplasma pneumoniae IgM antibodies in human serum

Cat.no.: 362

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 la-

te 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.

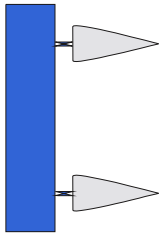
In children under five years of age the infection is predominantly asymptomatic. In such cases the disease runs a mild course. In older children and in young people and adults, however, the infection is accompanied by prostration, headache, fever and a dry, unproductive cough. But these clinical features 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.

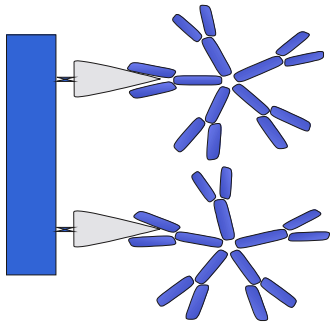
Serology constitutes the method of choice for patients with chronic infections, reinfections or extrapulmonary diseases due to *M. pneumoniae*. Commercial test systems include the complement fixation test (CFT), the haemagglutination test (HAT) and enzyme immunoassay (ELISA). Unlike the CFT and the HAT, 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*-IgM-ELISA medac employs a native, purified antigen for the serological detection.

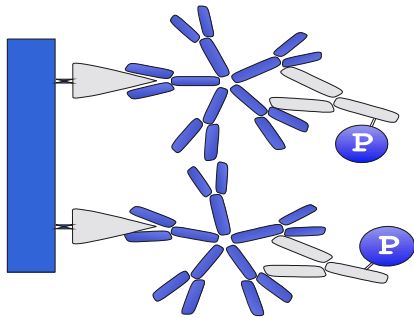
TEST PRINCIPLE



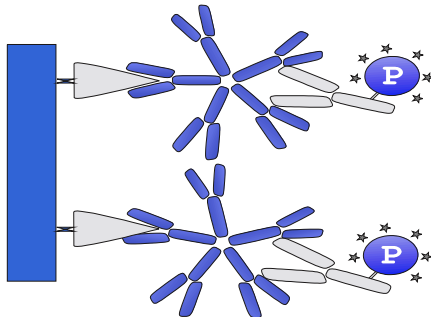
The plate is coated with a highly purified *M. pneumoniae*-specific antigen preparation.



The *M. pneumoniae*-specific antibodies from the specimen bind to the antigen.



Peroxidase-conjugated anti-human IgM antibodies bind to the IgM 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

- ☞ High sensitivity and specificity.
- ☞ The breakable microwell strips permit efficient use of the test.

KIT CONTENTS

Cat. no.: 362

1.

MTP

Microplate: 12 x 8 wells, (with frame and desiccant vacuum sealed in aluminium bag), breakable, U-form, coated with *M. pneumoniae*-specific antigen 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.

WB

Wash buffer: 1 bottle with 100 ml PBS/Tween (10x), pH 7.2 - 7.4, contains ProClin™ 300.
5.

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.
6.

CON

Conjugate: 3 vials with 4.5 ml each, goat anti-human IgM, HRP-conjugated, ready to use, stained red, contains BSA, phenol, ProClin™ 300 and gentamycin sulfate.
7.

TMB

TMB-substrate: 1 vial with 10 ml, ready to use.
8.

STOP

Stop solution: 2 vials with 11 ml each, 0.5 M sulfuric acid (H₂SO₄), ready to use.
9.

RF-ABS

IgG/Rf-absorbent: 1 vial with 4 ml, goat anti-human IgG antibody, ready to use, contains < 0.1% sodium azide.

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	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
IgG/Rf-absorbent	opened	2 - 8 °C	12 weeks

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 (RT).

Calculate the number of wells required.

3.1. Microplate

After each removal of wells the aluminium bag has to be tightly resealed together with the desiccant. 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, conjugate) from different kit lots. In contrast to that, sample diluent, wash buffer, TMB-substrate, IgG/Rf-absorbent 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 samples.
- 4.2. In order to avoid interferences with high IgG titers and rheumatoid factors (RF) an absorption of IgG/RF shall be performed.
- 4.3. An additional pretreatment of sera, e.g. inactivation, is not necessary. However, they should neither be contaminated with microorganisms nor contain red blood cells.

5. TEST PROCEDURE

5.A. IgG/RF-ABSORPTION

Attention:

- * **The controls are ready to use (no absorption necessary).**
 - * **The following volumes indicated apply for single determinations only.**
- 5.A.1. Serum: 10 µl serum are diluted with 490 µl sample diluent (dilution 1:50).
 - 5.A.2. Absorption: 30 µl IgG/Rf-Absorbent and 30 µl diluted serum are mixed (dilution 1:100) and incubated for 15 min at room temperature.

Alternative: The absorption can be performed overnight at 2 - 8 °C.

5.A.3. Now the test dilution is 1:100.

5.B. TEST RUN

5.B.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.B.2. Pipette 50 µl of the sample diluent into the well A1 as blank (see 6.A.), and 50 µl of the negative control (in duplicate), positive control, and the diluted patient samples.

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

5.B.3. Incubate the microplate wells for 60 min (± 5 min) at 37 °C (± 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

5.B.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.B.5. Add conjugate (coloured red) 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.B.6. Incubate again for 60 min (± 5 min) at 37 °C (± 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil.

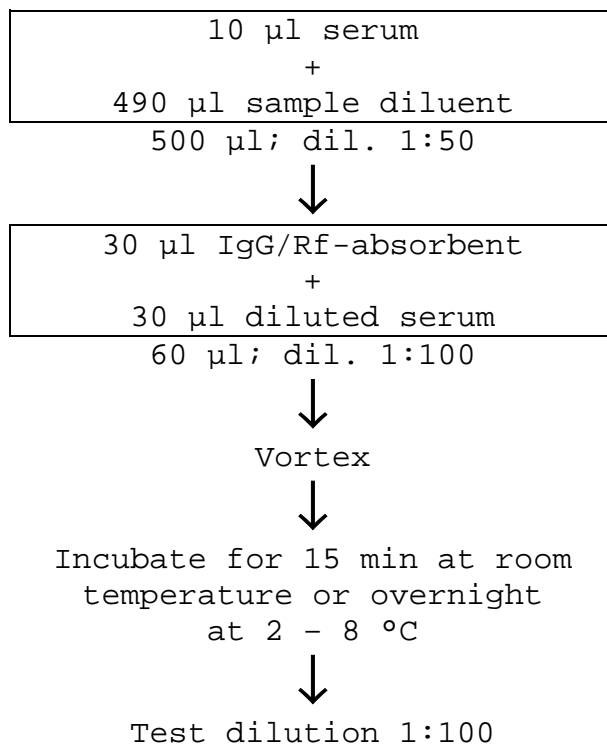
- 5.B.7. After incubation wash microplate wells again (see 5.B.4.).
- 5.B.8. Add 50 µl of TMB-substrate to each well and incubate for 30 min (\pm 2 min) at 37 °C (\pm 1 °C) in a humid chamber or sealed with incubation cover foil in the dark. Positive samples turn blue.
- 5.B.9. Stop the reaction by adding 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.C. TABLE FOR THE IgG/RF-ABSORPTION

Indication per determination



5.D. TABLE FOR THE TEST PROCEDURE

	Blank (A1)	Negative control	Positive control	Absorbed Sample
Sample diluent	50 µl	-	-	-
Negative control	-	50 µl	-	-
Positive control	-	-	50 µl	-
Absorbed 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 *)
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
Incubate for 30 min at 37 °C in the dark.				
Stop solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Photometric reading at 450 nm (ref. 620 - 650 nm)				

*) manual/automatic procedure (see 5.B.5.)

6.A. CALCULATION OF RESULTS (VALIDITY)

- * 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.
- * The OD value of the blank has to be < **0.100**.
- * The mean OD value of the **negative control** has to be < **0.100**.
- * The OD value of the **positive control** has to be > **0.800**.
- * **Cut-off = mean OD value of the negative control + 0.380**
- * **Grey zone = Cut-off ± 10%**

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

6.B. EVALUATION OF RESULTS:

6.B.1. QUALITATIVE

Result	Valuation
OD < Grey zone	negative
OD of Cut-off +/- 10%	equivocal
OD > Grey zone	positive

6.B.2. SEMIQUANTITATIVE

Cut-off-Index: $\frac{\text{OD Sample}}{\text{OD Cut-off}}$	Valuation
< 0.9	negative
0.9 - 1.1	equivocal
> 1.1	positive

- * Samples with OD values within the grey zone should be retested together with a fresh specimen taken 14 days later in order to determine a titer change.
- * The results should always be interpreted in connection with IgG and IgA, and with the 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 might increase the OD values of negative samples.
- * Cross-reactivities with heterophilic antibodies cannot be excluded in individual cases.
- * In recent EBV-infections false positive IgM results may occur in certain circumstances.

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. SPECIFICITY AND SENSITIVITY

Patient Group	Specificity IgM
<i>M. pneumoniae</i> IgM negative sera (reference ELISA/ Aggl. Assay)	100% (n=40)
Patient Group	Sensitivity IgM
Sera with IgM antibodies to <i>M. pneumoniae</i> (reference ELISA/Aggl. Assay) Patients with respiratory infections	71% (n=44)

7.B. PRECISION

Sample	Intra-assay variation				Sample	Inter-assay variation (n = 13)		
	mean OD	SD	CV (%)	n		mean OD	SD	CV (%)
NC	0.028	0.008	29	22	NC	0.017	0.004	24
BC	0.838	0.019	2	22	BC	0.792	0.050	6
PC	1.141	0.020	2	22	PC	0.990	0.035	4
N° 1	0.033	0.004	12	22	N° 4	0.021	0.004	19
N° 2	0.651	0.015	2	22	N° 5	0.542	0.017	3
N° 3	1.611	0.033	2	22	N° 6	1.480	0.062	4
					N° 7	1.409	0.093	7

NC = negative control; BC = weak positive control (not included in the kit);
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-IgM-ELISA medac

Immunoessai enzymatique pour la détection qualitative des anticorps IgM anti-*Mycoplasme pneumoniae* dans le sérum humain.

Cat.no.: 362

DESTINEE 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. Le *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 *Mycoplasme 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 pendant le printemps et l'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, la laryngite, l'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 méningoencéphalite 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.

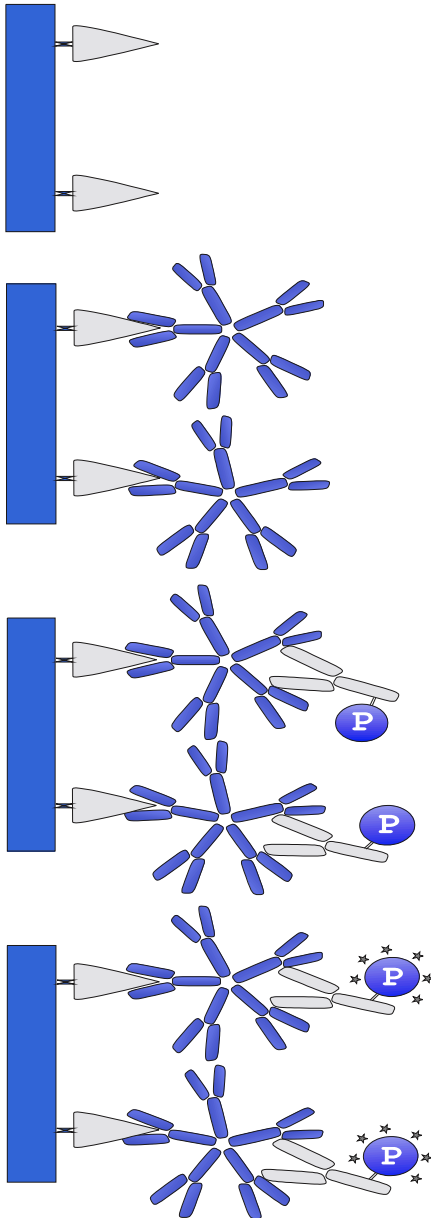
Dans la phase aiguë de la maladie, la mise en évidence du pathogène responsable est la méthode de choix. Des tests pour la détection du pathogène peuvent être réalisés sur des frottis de gorge, des spécimens de crachat et du liquide de lavage bronchoalvéolaire (BAL). La technique classique pour démontrer 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 pour ce pathogène ne sont pas encore disponibles commercialement.

La sérologie constitue la méthode de choix pour les patients avec 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 aiguës peuvent être distinguées des infections chroniques et des infections anciennes.

Le test ***Mycoplasma pneumoniae*-IgM-ELISA medac** utilise un antigène natif, purifié pour la détection sérologique.

PRINCIPE DU DOSAGE



La plaque est revêtue d'une préparation antigénique spécifique hautement purifiée de *M. pneumoniae*.

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

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

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

Avantages du dosage

- ☞ Haute sensibilité et spécificité.
- ☞ Micropuits sécables permettant l'utilisation rationnelle du test.

CONTENU DE LA TROUSSE

Réf.: 362

1.

MTP

Microplaque: 12 x 8 puits (avec support et dessiccant, dans un sachet d'aluminium sous vide), sécables, en forme de U, revêtus d'antigènes spécifiques *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, contenant 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.

WB

Tampon de lavage: 1 flacon de 100 ml, tampon PBS/Tween (10x), pH 7,2 - 7,4, contenant du ProClin™ 300.
5.

BAC-DIL

Diluant pour échantillons: 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.
6.

CON

Conjugué: 3 flacons de 4,5 ml chacun, solution d'immunoglobulines de chèvre anti-IgM humaines conjuguées à la peroxydase de raifort, prête à l'emploi, de couleur rouge, contenant de la BSA, du phénol, du ProClin™ 300 et du sulfate de gentamycine.
7.

TMB

TMB-substrat: 1 flacon de 10 ml, prêt à l'emploi.
8.

STOP

Solution d'arrêt: 2 flacons de 11 ml chacun, acide sulfurique 0,5 M (H₂SO₄), prêt à l'emploi.
9.

RF-ABS

Absorbant IgG/RF: 1 flacon de 4 ml, anticorps de chèvre anti IgG humaines, prêt à l'emploi, contenant < 0,1% d'azide de sodium.

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
Contrôle	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
Absorbant IgG/FR	ouvert	2 - 8 °C	12 semaines

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, conjugué) de différents lots. Par contre, le diluant pour échantillon, le tampon de lavage, le substrat-TMB, l'absorbant IgG/RF et la solution d'arrêt sont interchangeable 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. De manière à éviter des interférences avec des hauts titres d'IgG et de facteur rhumatoïde (FR), une absorption des IgG/RF devra être réalisée.

4.3. Un prétraitement complémentaire des séra, par ex. inactivation, n'est pas nécessaire. Cependant, ils ne doivent être contaminés ni par des microorganismes ni contenir des globules rouges.

5. PROCEDURE DE DOSAGE

5.A. ABSORPTION DES IgG/FR

Attention:

- * **Les contrôles sont prêts à l'emploi.**
- * **Les volumes suivants indiqués s'appliquent uniquement à des déterminations en simple.**

5.A.1. Sérum: 10 µl de sérum sont dilués avec 490 µl de diluant pour échantillon (dilution 1:50).

5.A.2. Absorption: 30 µl absorbant-IgG/FR et 30 µl de sérum dilué sont mélangés (dilution 1:100) et incubés pendant 15 min. à température ambiante.

Alternative: L'absorption peut être réalisée pendant toute la nuit à 2 - 8 °C.

5.A.3. La dilution finale est de 1:100.

5.B. PROCEDURE DE DOSAGE

- 5.B.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 prélevés.

- 5.B.2. Distribuer 50 µl de diluant pour échantillons dans le puit blanc A1 (voir 6.A.) et 50 µl de contrôle négatif (en double), contrôle positif, et échantillons dilués.

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

- 5.B.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.B.4. Après incubation, laver les puits trois fois avec 200 µl 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.B.5. Ajouter le conjugué (de couleur rouge) à chaque puit.

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

Attention:

Si la procédure est réalisée sur automate, il faut distribuer 60 µl 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.B.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.B.7. Après incubation, laver les puits à nouveau (voir 5.B.4.).

- 5.B.8. Ajouter 50 µl de TMB-substrat dans chaque puit et incuber pendant 30 min. (\pm 2 min.) à 37 °C (\pm 1 °C) dans une chambre hu-

mide ou recouvert d'un film pour incubation dans l'obscurité. Les échantillons positifs deviennent bleus.

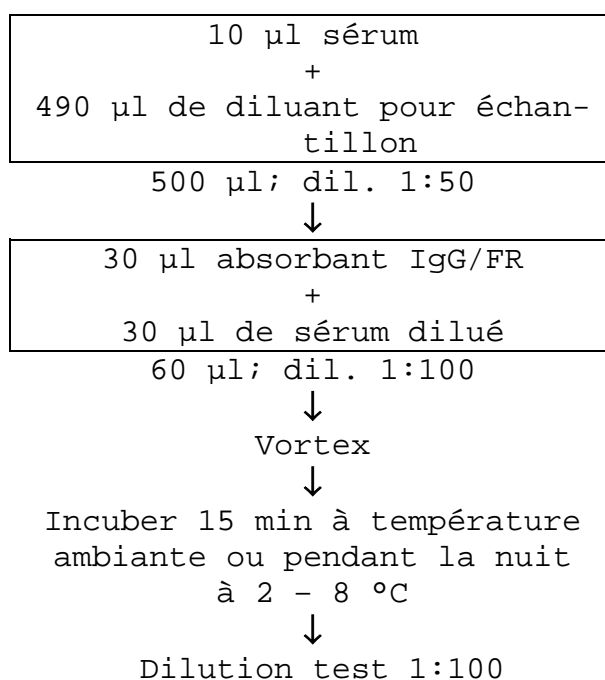
5.B.9. Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puit. Les échantillons positifs deviennent jaunes.

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

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

5.C. TABLEAU POUR L'ABSORPTION IgG/FR

Indication par détermination



5.D. TABLEAU DE DISTRIBUTION DES REACTIFS

	Blanc (A1)	Contrôle négatif	Contrôle positif	Echantillon absorbé
Diluant échantillons	50 µl	-	-	-
Contrôle négatif	-	50 µl	-	-
Contrôle positif	-	-	50 µl	-
Echantillon absorbé	-	-	-	50 µl
Incuber pendant 60 min. à 37 ° C, laver 3 x avec 200 µl de tampon de lavage dilué.				
Conjugué	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 dilué.				
Substrat- TMB	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
Lecture photométrique à 450 nm (réf. 620 - 650 nm)				

*) procédure manuelle/automatique (voir 5.B.5.)

6.A. CALCUL DES RESULTATS (VALIDITE)

- * Lire les valeurs de DO à 450nm (longueur d'onde de réf. 620 - 650 nm).
- * Soustraire la valeur de DO du blanc (puit A1) de toutes les autres valeurs de DO.
- * La valeur de DO du blanc doit être **< 0,100**.
- * La valeur de DO du **contrôle négatif** doit être **< 0,100**.
- * La valeurs de DO du **contrôle positif** doit être **> 0,800**.
- * **Cut-off = valeur moyenne de DO du contrôle négatif + 0,380**
- * **Zone grise = Cut-off ± 10%**

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

6.B. INTERPRETATION DES RESULTATS:

6.B.1. QUALITATIVE

Résultat	Interprétation
DO < zone grise	négatif
DO cut-off +/- 10%	équivoque
DO > zone grise	positif

6.B.2. SEMI-QUANTITATIVE

Index seuil: $\frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO Cut-off}}$	Interprétation
< 0,9	négatif
0,9 - 1,1	équivoque
> 1,1	positif

- * Des échantillons qui ont des valeurs de DO dans la zone grise doivent être dosés à nouveau avec un nouveau sérum prélevé 14 jours après, afin de pouvoir déterminer un changement dans le titre d'anticorps.
- * Les résultats devraient être toujours interprétés conjointement avec les IgG et les IgA, les données cliniques et autres paramètres diagnostiques.
- * 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.
- * Dans les infections récentes à EBV des résultats IgM faussement positifs peuvent apparaître dans certaines circonstances.

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. SPECIFITE ET SENSIBILITE

Groupe de patients	Specificité IgM
Sera <i>M. pneumoniae</i> IgM négatifs (référence ELISA/test d'agglutination).	100% (n=40)
Groupe de patients	Sensibilité IgM
Sera avec anticorps IgM anti <i>M. pneumoniae</i> (référence ELISA/test d'agglutination) Patients avec infections respiratoires.	71% (n=44)

7.B. PRECISION

Echantillon	Variations intra-essai				Echantillon	Variations inter-essais (n = 13)		
	DO moyenne	SD	CV (%)	n		DO moyenne	SD	CV (%)
CN	0,028	0,008	29	22	CN	0,017	0,004	24
BC	0,838	0,019	2	22	BC	0,792	0,050	6
CP	1,141	0,020	2	22	CP	0,990	0,035	4
N° 1	0,033	0,004	12	22	N° 4	0,021	0,004	19
N° 2	0,651	0,015	2	22	N° 5	0,542	0,017	3
N° 3	1,611	0,033	2	22	N° 6	1,480	0,062	4
					N° 7	1,409	0,093	7

CN = contrôle négatif; BC = contrôle faiblement positif (pas inclus dans le kit); 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 péremption.
- * 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

- 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).