

VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG/IgM ELISA
(M. pneumoniae IgG/IgM ELISA)

Bestell-Nr.: EC114.00

M. pneumoniae IgA-Set

Bestell-Nr.: EC114.08

Farbcodierung: dunkelblau

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim

Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>



Inhalt

1. Verwendungszweck.....	3
2. Diagnostische Bedeutung.....	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt.....	3
4.1 IgG/IgM Testkit.....	3
4.2 IgA Set.....	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert).....	4
8. Testdurchführung	5
8.1 Untersuchungsmaterial	5
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung.....	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
9. Testauswertung.....	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE).....	6
9.3 Auswertung der Ergebnisse	6
9.4 Interpretationsschema.....	7
9.5 Grenzen des Tests.....	7
10. Leistungsdaten.....	8
10.1 Sensitivität und Spezifität	8
10.2 Diagnostische Sensitivität	8
10.3 Diagnostische Spezifität	8
10.4 Durchseuchung (erwartete Werte)	9
10.5 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	9
10.6 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	9
11. Literatur.....	9
12. Testablaufschemata.....	10

1. Verwendungszweck

Der *Mycoplasma pneumoniae* ELISA dient dem semiquantitativen und qualitativen Nachweis von IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern im Humanserum. Der IgG-Antikörpernachweis ist so eingestellt, dass er vor allem frische Infektionen detektiert.

2. Diagnostische Bedeutung

Das zellwandlose Bakterium *Mycoplasma pneumoniae* ist der Verursacher der atypischen Pneumonie und Luftröhrenbronchitis beim Menschen, die hauptsächlich bei Kindern, jungen Erwachsenen und immundefizienten Personen verbreitet ist (1,2,3,4). Es heftet sich an Epithelzellen mit Hilfe sogenannter Adhäsine (6), gegen die der Wirt Antikörper bildet. Untersuchungen von Foy zeigen, dass in den USA 15-20% aller Pneumonien durch *Mycoplasma pneumoniae* verursacht werden (8). Der ELISA detektiert Mycoplasma-Antikörper mit einer mittels monospezifischer Seren definierten Antigenfraktion des Stammes M129. Sie enthält Membranproteine, Zytoskelettproteine und rekombinante Proteine.

Die Inkubationszeit bei einer Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae* beträgt 10 bis 21 Tage:

- Spezifische IgM-Antikörper treten 6-10 Tage nach der Infektion auf. Grundsätzlich gilt, dass etwa 80% der Patienten jünger als 20 Jahre und 40% der Patienten älter als 20 Jahre IgM-Antikörper bilden, d.h. eine spezifische IgM-Antwort kann vor allem bei älteren Patienten fehlen. IgM-Antikörper können laut Literatur noch mindestens ein Jahr nach Beginn der Symptome nachgewiesen werden.
- Spezifische IgG-Antikörper erscheinen 9-14 Tage nach der Infektion. Sie können bis zu 4 Jahre persistieren.
- Spezifische IgA-Antikörper erscheinen eine Woche nach Infektionsbeginn und sinken etwa 5 Wochen nach Infektionsbeginn wieder ab. Der IgA-Titer übersteigt in der Regel den IgM-Titer.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass IgM-Antikörper bei machen Personen lange persistieren und bei anderen völlig fehlen, ist es wichtig, neben dem IgM- auch den spezifischen IgG- und IgA-Titer zu bestimmen. Re-Infektionen verlaufen häufig ohne Bildung von IgM-Antikörpern, aber der IgG- und IgA-Antikörper-Titer steigt deutlich an. Zwei Seren eines Patienten im Abstand von 5-10 Tagen lassen eine sichere Aussage über den Anstieg der Antikörper zu (5). Wichtig ist zu berücksichtigen, dass eine erste Auseinandersetzung mit *Mycoplasma pneumoniae* keinen ausreichenden Schutz vor einer erneuten Kolonisierung hinterlässt. Bei der Diagnosestellung sollte in jedem Fall zu den serologischen Ergebnissen auch das klinische Bild herangezogen werden.

Mycoplasmainfektionen lassen sich in der Regel durch Antibiotika wie Tetracycline und Makrolide gut behandeln. Dagegen führt die Gabe ungeeigneter z.B. zellwandspezifischer Antibiotika (Penicillin) zu einem Selektionsvorteil für *Mycoplasma pneumoniae* gegenüber allen Penicillin sensitiven Mikroorganismen.

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt

4.1 IgG/IgM Testkit

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert) 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgM negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgM cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
9. **IgM positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig

11. **IgM-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin - Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

4.2 IgA Set

1. **IgA negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
2. **IgA cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
3. **IgA positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
4. **IgA-Konjugat 2 (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF Sorbo Tech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stopplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopp-Lösung und TMB wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material

8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).
5. Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren mit RF-SorboTech (VIROTECH-Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgM-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen-, cut-off und der positiven IgG-, IgM und IgA- Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG- IgA-und IgM-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$$\begin{aligned} \text{VE (positive Kontrolle)} &= \frac{\text{OD (positive Kontrolle)}}{\text{OD (cut-off Kontrolle)}} \times 10 \\ \text{VE (Patientenserum)} &= \frac{\text{OD (Patientenserum)}}{\text{OD (cut-off Kontrolle)}} \times 10 \end{aligned}$$

9.3 Auswertung der Ergebnisse

a) Im IgM und IgA für alle Patienten, im IgG für Patienten > 14 Jahre

Ergebnis (VE) (IgG > 14 Jahre, IgM und IgA)	Beurteilung
< 9,0	negativ
9,0 - 11,0	grenzwertig
> 11,0	positiv

b) Im IgG für Kinder (0-14 Jahre), wenn IgM und/oder IgA positiv

Bei Kindern zwischen 0 und 14 Jahren kann der grenzwertige Bereich (Cut off) im IgG nach unten verschoben werden, da der VIROTECH ELISA im IgG so eingestellt ist, dass vorwiegend akute Infektionen detektiert werden. Bedingung für die Anwendung dieses Schemas ist jedoch, dass das Serum ein positives IgM- und /oder IgA-Ergebnis liefert.

Ergebnis (VE) (IgG 0-14 Jahre)	Beurteilung
< 7,0	negativ
7,0 - 8,0	grenzwertig
> 8,0	positiv

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
2. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich. Die höchste Sensitivität wird erreicht, wenn alle 3 Antikörperklassen IgG, IgM und IgA getestet werden, denn es muß berücksichtigt werden, dass manche Personen kein IgM bilden.
3. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

9.4 Interpretationsschema

IgG	IgA	IgM	Interpretation
-	-	-	Kein Kontakt mit <i>Mycoplasma pneumoniae</i> oder Antikörperspiegel ist bereits unter das cut-off-Level abgesunken.
-	+	+	Ganz frühe Phase einer akuten Infektion oder Re-Infektion.
-	+	-	Ganz frühe Phase einer akuten Infektion; entweder Erstinfektion oder Re-Infektion ohne IgM oder IgM-Titer kommt noch.
+	+	+	Akute Infektion, i.d.R. Erstinfektion, späte Phase, IgG und IgM bereits gebildet, IgA noch nicht abgesunken.
+	-	+	Akute Infektion, i.d.R. Erstinfektion, späte Phase, IgG und IgM bereits gebildet, IgA bereits abgesunken.
+	+	-	Re-Infektion, sehr späte Phase, IgA noch vorhanden, kein IgM mehr vorhanden, oder Re-Aktivierung oder Infektion ohne Bildung von IgM.
+	-	-	Re-Infektion, sehr späte Phase, IgA bereits abgesunken, bzw. gar nicht gebildet (kommt bei einigen Erwachsenen vor) oder Re-Aktivierung oder Infektion ohne Bildung von IgM oder persistierender IgG-Titer nach durchlaufener Infektion.
-	-	+	Akute frühe Infektion, IgA fehlt noch oder ist bereits abgesunken, IgG noch zu geringer Titer.

Wichtiger Hinweis: Isolierte falsch positive IgA- oder IgM- Ergebnisse sind nie 100-prozentig auszuschließen. Zur Bestätigung ist eine Überprüfung des IgG-Titers in 5-10 Tagen oder die Überprüfung mittels Immunoblot (LINE) zu empfehlen.

9.5 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Eine *Mycoplasma*-Infektion ist trotz Anamnese-Erhebung, klinischer Untersuchung, inklusive Standardlabor und Röntgenkontrolle schwierig von anderen Infektionen der oberen und unteren Atemwege oder atypischen Pneumonien zu unterscheiden. Bei unklaren Fällen oder weiter bestehenden Symptomen bei einem negativen Befund empfehlen wir neben der Serologie die Diagnose durch molekularbiologische Nachweisverfahren zu stützen.
3. Kreuzreaktionen mit *M. genitalium* oder *M. hominis* sind nicht auszuschließen. Auch EBV-positive Seren können kreuzreagieren.

10. Leistungsdaten

10.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden 99 Seren im IgG, IgA und IgM im Vergleich zum VIROTECH *Mycoplasma pneumoniae* LINE getestet. Das Serenpanel setzte sich wie folgt zusammen: 49 klinisch charakterisierte Seren von Patienten mit gesicherter *Mycoplasma pneumoniae* –induzierter atypischer Pneumonie (*M. pneumoniae* PCR positiv; bereitgestellt von der CAPNETZ Stiftung), 34 Kinderseren im Alter von 1-14 Jahren von Patienten mit Verdacht auf eine *Mycoplasma pneumoniae* Infektion und 16 Erwachsenenserum von Patienten mit Verdacht auf eine *Mycoplasma pneumoniae* Infektion.

Zur Bestimmung der Spezifität wurden 161 Seren im IgG, IgA und IgM im Vergleich zum VIROTECH *Mycoplasma pneumoniae* LINE getestet. Das Serenpanel setzt sich wie folgt zusammen: 71 Blutspenderseren, 26 Seren von Patienten mit einer klinisch bestätigten, nicht durch *Mycoplasma pneumoniae* –induzierten, ambulant erworbenen Pneumonie (CAP: Community-acquired Pneumonia) mit positivem PCR-Ergebnis für den jeweiligen Erreger und negativem PCR-Ergebnis für *Mycoplasma pneumoniae*, 26 Neugeborenenserum im Alter von 0-3 Monaten, und 38 Seren von Patienten mit anderen respiratorischen Erkrankungen (21 *B. pertussis* positive Seren und 17 *Legionella pneumophila* positive Seren).

	Sensitivität - Referenz: <i>Mycoplasma pneumoniae</i> LINE -	Spezifität - Referenz: <i>Mycoplasma pneumoniae</i> LINE -
IgG	97 %	98 %
IgA	95 %	97 %
IgM	94 %	98 %

10.2 Diagnostische Sensitivität

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität wurden 49 klinisch charakterisierte Seren von Patienten mit gesicherter atypischer Pneumonie getestet. Diese Seren stammten aus dem Bestand der CAPNETZ Stiftung. Die Proben dieser Patienten zeigten im Vorbefund ein positives PCR-Ergebnis für *Mycoplasma pneumoniae*. Der serologische Vorbefund mittels ELISA zeigte im IgM bei 34 Seren ein positives und bei 15 Seren ein negatives Ergebnis (7, 9). Obwohl sich bei diesen Proben *Mycoplasma pneumoniae*-DNA nachweisen lässt, müssen durch die Verzögerung der Immunantwort noch keine Antikörper nachweisbar sein. Dies erklärt die geringe Sensitivität der Vorbefundung.

	Diagnostische Sensitivität Vorbefund der CAPNETZ-Seren: PCR positiv und 69% serologisch positiv
IgG	85 %
IgA	91 %
IgM	79 %
Gesamt: IgG, IgA und IgM	96 %

Durch eine Gesamtbewertung von IgG, IgA und IgM wird für dieses kritische Serenpanel eine deutlich höhere Sensitivität von 96 % erreicht.

10.3 Diagnostische Spezifität

Zur Bestimmung der diagnostischen Spezifität wurden folgende Seren aus dem Bestand der CAPNETZ Stiftung getestet: 26 Seren von Patienten mit einer klinisch bestätigten, nicht durch *Mycoplasma pneumoniae* –induzierten, ambulant erworbenen Pneumonie (CAP: Community-acquired Pneumonia) mit positivem PCR-Ergebnis für den jeweiligen Erreger und negativem PCR-Ergebnis für *Mycoplasma pneumoniae*.

	Diagnostische Spezifität Vorbefund der CAPNETZ-Seren: <i>M. pneumoniae</i> PCR negativ
--	---

IgG	100 %
IgA	92 %
IgM	100 %

10.4 Durchseuchung (erwartete Werte)

Es wurden 71 Blutspenderseren im IgG, IgA und IgM getestet.

	IgG		IgA		IgM	
negativ	65	92 %	68	96 %	70	99 %
grenzwertig	5	7 %	1	1 %	1	1%
positiv	1	1 %	2	3 %	0	0%

10.5 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit zwei Seren schachbrettartig getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten liegen unter 9% (n=2x48).

10.6 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden an 3 verschiedenen Testtagen 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten betragen < 15%.

11. Literatur

1. Clyde WA.J.: Clinical overview of typical Mycoplasma pneumoniae infections. J. Clin Infect. Dis. 1993, 17 (suppl. 1) 32-37
2. Hu, P.-C., Collier, A.M. and Baseman, J.B. (1977): Surface parasitism by Mycoplasma pneumoniae of respiratory epithelium. J. of Experimental med. 145, 1328-13343.
3. Razin, S. (1992): Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. 100, 423-432.
4. Taylor-Robinson, D. (1996): Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update. Clin. Infect. Dis. 23, 671-684.
5. Jacobs, E.: Mycoplasmen-Infektionen. mta. 1997, 12: 236-239
6. Jacobs, E.: Das Adhäsion von Mycoplasma pneumoniae: Seine Bedeutung als Virulenzfaktor in der Pathogenese und in der Diagnostik. Klin. Lab. 1994: 40: 228-229
7. Dumke, R., A. Strubel, C. Cyncynatus, H. Nuytens, R. Herrmann, C. Lück, and E. Jacobs. 2012. Optimized serodiagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections. Diagnostic microbiology and infectious disease. Elsevier Inc. 73:200-203.
8. Foy, HM: Infections caused by Mycoplasma pneumoniae and possible carrier state in different populations of patients. J Clin Infect Dis 1993, 17(suppl. 1) 37-47.
9. Baum, H. v. et.al.: Mycoplasma pneumoniae pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ), BMC Infectious Diseases 2009, 9:62

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **IgG-/IgA-Proben – Verdünnung**
1:101

z.B.:

10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

▼ **IgM-Proben - Verdünnung**
1:101

Rheumafaktoradsorption mit RF-SorboTech

z.B.:

5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +
1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

Testdurchführung

Probeninkubation 30 Minuten bei 37°C



4 x Waschen



Konjugatinkubation 30 Minuten bei 37°C



4 x Waschen



Substratinkubation 30 Minuten bei 37°C



Abstoppen



Extinktion messen

100 µl Patientenproben

Leerwert (Verdünnungspuffer) und Kontrollen

400 µl Waschlösung

gut ausklopfen

100 µl Konjugat

IgG, IgM, IgA

400 µl Waschlösung

gut ausklopfen

100 µl Substrat

50 µl Stopplösung

vorsichtig schütteln

Photometer bei 450/620nm
(Referenzwellenlänge 620-690nm)