

**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
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.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 Grenzen des Tests.....	7
10. Leistungsdaten.....	8
10.1 Informationen zur Analyseleistung	8
10.2 Informationen zur klinischen Leistung	9
11. Literatur.....	11
12. Testablaufschemata.....	12

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 Luftröhren-bronchitis 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-Stoppplösung, 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
Stoppplösung	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.

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

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

- Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
 - 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.
 - Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.
- 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.

9.4 Grenzen des Tests

- Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
- 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.
- Kreuzreaktionen mit *M. genitalium* oder *M. hominis* sind nicht auszuschließen. Auch EBV-positive Seren können kreuzreagieren.

10. Leistungsdaten

10.1 Informationen zur Analyseleistung

10.1.1 Probentypen

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (EDTA, Heparin, CPD, Citrat) eingesetzt werden. Informationen zu Probentypen, deren Stabilität und Lagerbedingungen befinden sich in den Kapiteln 5 und 8.

10.1.2 Genauigkeit

a) Richtigkeit

Für den VIROTECH M. pneumoniae IgG/IgM/IgA ELISA gibt es keinen WHO-Standard oder vergleichbaren Referenzwert, anhand dessen die Richtigkeit bestimmt werden könnte.

b) Präzision

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).

Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit): In 10 unabhängigen Testansätzen wurden an 3 verschiedenen Testtagen 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten betragen < 15%.

10.1.3 Analytische Spezifität

a) Interferenzen

Der VIROTECH M. pneumoniae IgG/IgM/IgA ELISA wurde gemäß der Richtlinie EP07-A3 ("Interference Testing in Clinical Chemistry" vom Clinical and Laboratory Standards Institute) auf Interferenzen untersucht. Drei Proben, eine negative, eine schwach positive und eine mäßig positive, wurden mit hohen Konzentrationen von interferenten Substanzen versetzt und zusammen mit Serum ohne interferente Substanzen getestet. Die folgende Tabelle zeigt die getesteten Substanzen, die den Patientenproben in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt wurden. Diese entsprechen den Empfehlungen in der CLSI-Richtlinie zur Darstellung pathologisch erhöhter Konzentrationen in Patientenproben.

Interferente Substanz	Testkonzentration
Albumin	60 mg/ml
Bilirubin	0,4 mg/ml
Cholesterol	4 mg/ml
Hämoglobin	10 mg/ml
Triglyceride	15 mg/ml

Für alle getesteten Substanzen wurde im VIROTECH M. pneumoniae IgG/IgM/IgA ELISA kein klinisch signifikanter Störeffekt gefunden.

b) Kreuzreaktivität

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des VIROTECH M. pneumoniae IgG/IgM/IgA ELISA wurden 64 vorcharakterisierte Patientenserum getestet, die für einen der in der Tabelle gelisteten Erreger positiv waren. Seren, welche im VIROTECH M. pneumoniae IgG ELISA ein positives Testergebnis ergaben, wurden anschließend zusätzlich mit dem VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgA/IgG/IgM LINE Immunoblot getestet.

Erreger	Anzahl getestet
Bordetella pertussis	21
Legionella	17
CAP-pos/Myco neg Seren	26

Im IgG liegt die Spezifität bei 98%, im IgA bei 95% und im IgM bei ebenfalls 95%.

10.1.4 Metrologische Rückführbarkeit

Für den VIROTECH M. pneumoniae IgG/IgM/IgA ELISA gibt es keinen WHO-Standard oder vergleichbaren Referenzwert.

10.1.5 Definition der Testgrenzwerte (Cutoff)

Bei der Auswertung der Testproben wurde der Cutoff so gewählt, dass die Diagnostische Sensitivität und Diagnostische Spezifität möglichst maximal waren, wobei ein Mindestwert von 85% für die diagnostische Sensitivität, sowie $\geq 95\%$ für die diagnostische Spezifität angestrebt wurde. Hierfür wurde eine ROC-Analyse durchgeführt.

10.2 Informationen zur klinischen Leistung

10.2.1 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 (CAP: Community-acquired Pneumonia). Die Proben dieser Patienten zeigten im Vorbefund ein positives PCR-Ergebnis für *Mycoplasma pneumoniae*.

Von den 49 PCR-positiv getesteten Proben zeigten 44 im VIROTECH M. pneumoniae IgG ELISA eine positive Diagnostik, 2 wurden grenzwertig getestet und 3 zeigten eine negative Diagnostik. Unter Nicht-Berücksichtigung der grenzwertigen Proben errechnet sich hieraus eine diagnostische Sensitivität von 94%. Im VIROTECH M. pneumoniae IgA ELISA liegt die Diagnostische Sensitivität bei 91%, im IgM ELISA sind es 79%.

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	94 %
IgA	91 %
IgM	79 %

10.2.2 Diagnostische Spezifität

Zur Bestimmung der diagnostischen Spezifität wurden Seren aus dem Bestand der CAPNETZ Stiftung getestet, die eine klinisch bestätigte, nicht durch *Mycoplasma pneumoniae* –induzierte, ambulant erworbene Pneumonie (CAP: Community-acquired Pneumonia) mit positivem PCR-Ergebnis für den jeweiligen Erreger und negativem PCR-Ergebnis für *Mycoplasma pneumoniae* aufweisen.

Für den VIROTECH M. pneumoniae IgG ELISA wurden 21 dieser PCR-negativen Seren getestet. 16 Proben zeigten eine negative Diagnostik, 2 Proben zeigten eine positive Diagnostik und 3 Proben wurden als grenzwertig beurteilt. Aufgrund der hohen Seroprävalenz für diesen Parameter wurden die beiden als positiv diagnostizierten Seren auch auf dem ELISA eines Mitbewerbers getestet. Hier zeigten beide Proben eine negative Diagnostik. Da die Diagnostik der beiden Tests voneinander abweichend war, wurden die gleichen Seren auf einem dritten ELISA getestet. Auf diesem Test zeigten die Seren, wie auf dem VIROTECH ELISA, ein positives Ergebnis. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Proben nicht falsch-positiv diagnostiziert wurden, sondern dass hier eine durchstandene Infektion vorliegt. Die beiden Proben wurden daher aus der

Bewertung der Diagnostischen Spezifität ausgeklammert. Die ermittelte Diagnostische Spezifität beträgt demnach $\geq 99\%$ für den IgG ELISA.

Für den VIROTECH M. pneumoniae IgA und IgM ELISA wurden jeweils 26 der oben genannten *M. pneumoniae* PCR-negativen Seren getestet. Die Diagnostische Spezifität für den IgA ELISA beträgt 92%, im IgM ELISA sind es $\geq 99\%$.

	Diagnostische Spezifität Vorbefund der CAPNETZ-Seren: <i>M. pneumoniae</i> PCR negativ
IgG	$\geq 99\%$
IgA	92 %
IgM	$\geq 99\%$

10.2.3 Methodenvergleich

1. VIROTECH M. pneumoniae IgG ELISA

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden 88 Seren im VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG ELISA und auf dem ELISA Assay eines Mitbewerbers getestet. Hierbei handelt es sich um 48 Proben deutscher Blutspender und 40 Proben, welche PCR-positiv auf *M. pneumoniae* getestet wurden. Als grenzwertig diagnostizierte Proben wurden aus der Bewertung ausgeklammert. Von den 88 getesteten Seren wurden 30 auf beiden Assays als positiv diagnostiziert, 32 Seren wurden auf beiden Assays als negativ diagnostiziert. 1 Serum wurde im Vergleich zum Mitbewerber auf dem VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG ELISA falsch-negativ diagnostiziert, 9 Proben waren falsch-positiv. Dies entspricht einem PPA von 97% und einem NPA von 78%. Von den 9 mutmaßlich falsch-positiven Proben wurden jedoch 6 als PCR-positiv für *M. pneumoniae* bestätigt, der ELISA des Mitbewerbers zeigt für diese Proben demnach eine falsch-negative Diagnostik.

n = 72 Seren		M. pneumoniae IgG ELISA eines Mitbewerbers	
		POS	NEG
VIROTECH M. pneumoniae IgG ELISA	POS	30	9
	NEG	1	32

2. VIROTECH M. pneumoniae IgM und IgA ELISA

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden 99 Seren im 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 Erwachsenenseren von Patienten mit Verdacht auf eine *Mycoplasma pneumoniae* Infektion.

Zur Bestimmung der Spezifität wurden 161 Seren im 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 Neugeborenenseren 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: Mycoplasma pneumoniae LINE	Spezifität - Referenz: Mycoplasma pneumoniae LINE
IgA	95 %	97 %
IgM	94 %	98 %

10.2.4 Prävalenz

Es wurden Seren von deutschen Blutspendern im VIROTECH M. pneumoniae IgG, IgA und IgM ELISA getestet. Als grenzwertig diagnostizierte Seren wurden aus der Bewertung ausgeklammert. Auf dem VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG ELISA wurden 80 Seren getestet, 58 Seren zeigten eine negative Diagnostik, 9 wurden als grenzwertig beurteilt und 13 zeigten eine positive Diagnostik. Bei Nicht-Berücksichtigung der grenzwertigen Ergebnisse ergibt sich daraus eine Prävalenz von 18%. Der Literaturwert von 17% (10) für die Prävalenz von *M. pneumoniae* in Europa liegt somit innerhalb des ermittelten 95%-Konfidenzintervalls von 9,3 bis 27,3%.

Für den IgA ELISA zeigten 2 der getesteten 71 Seren eine positive Diagnostik, eines wurde als grenzwertig beurteilt. Im IgM ELISA wurden 70 der 71 getesteten Seren als negativ diagnostiziert, eines war grenzwertig. Dies entspricht einer Durchseuchung von 3% für IgA und 0% für IgM. In der Literatur findet man bei Blutspendern für den Zeitraum 1992-2002 eine jährliche Serokonversionsrate von 0,55%.

	IgG	IgA	IgM
negativ	58	68	70
positiv	13	2	0
Durchseuchung	18%	3%	0%

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
10. Beeton et al. (2019) Mycoplasma pneumoniae infections, 11 countries in Europe and Israel, 2011-2016. Euro Surveill. 2020;25(2): pii=1900112.

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

