

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

Référence : EC114.00

M. pneumoniae IgA-Set

Référence : EC114.08

Code couleur : bleu marine

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Principe du test	3
3. Contenu.....	3
3.1 Kit de test IgG/IgM	3
3.2 Kit IgA	3
4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi	3
5. Mesures de précaution et mises en garde	4
6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)	4
7. Réalisation du test	4
7.1 Echantillons d'analyse.....	4
7.2 Préparation des réactifs	5
7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH	5
7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA	5
8. Interprétation du test	6
8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test.....	6
8.2 Calcul des unités VIROTECH (VE)	6
8.3 Interprétation des résultats.....	6
8.4 Schéma d'interprétation	7
8.5 Limites du test.....	7
9. Littérature	7
10. Schéma du déroulement du test	9

1. Usage prévu

Le test ELISA *Mycoplasma pneumoniae* sert à détecter semi-quantitativement et qualitativement les anticorps IgG, IgM et IgA dans le sérum humain. La détection des anticorps IgG est conçue pour déceler notamment les infections récentes.

2. Principe du test

L'anticorps recherché dans le sérum humain forme un immunocomplexe avec l'antigène coâté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées par lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt.

3. Contenu

3.1 Kit de test IgG/IgM

1. **Une microplaque**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi) 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20) 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. **Contrôle négatif des IgG, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle cut-off des IgG, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Contrôle positif des IgG, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
7. **Contrôle négatif des IgM, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
8. **Contrôle cut-off des IgM, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
9. **Contrôle positif des IgM, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
10. **Conjugué IgG (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec stabilisants des protéines et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
11. **Conjugué IgM (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec sérum fœtal de veau (FCS) et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
12. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5'), 11 ml**, prêt à l'emploi
13. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide.

3.2 Kit IgA

1. **Contrôle négatif des IgA, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
2. **Contrôle cut-off des IgA, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
3. **Contrôle positif des IgA, 1300 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
4. **Conjugué IgA 2 (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec sérum fœtal de veau (FCS) et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi

4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Après avoir détaché les puits individuels nécessaires, remettre les puits restants dans un sachet fermé hermétiquement et contenant un dessiccateur, puis stocker ce sachet à une température comprise entre 2 et 8 °C. Stocker à nouveau les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après leur utilisation.
2. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.
3. Prélever uniquement la quantité de conjugué prêt à l'emploi ou de TMB étant nécessaire à la réalisation du test. Si un excédent de conjugué ou de TMB a été prélevé, ne pas le réinjecter dans son récipient, mais l'éliminer.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	max. 6 h
	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
Absorbant facteur rhumatoïde	Non dilué, Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums de contrôle utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les échantillons, les échantillons dilués, les contrôles, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Pipette à plusieurs conduits 50 µl, 100 µl
3. Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Tubes à essai
5. Chiffons en cellulose
6. Couvercles pour les plaques ELISA
7. Poubelle pour les déchets infectieux
8. Dispositif de lavage manuel pour test ELISA, ou dispositif de lavage automatique des plaques de microtitrage
9. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
10. Incubateur

7. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est le préalable à obtenir des résultats corrects.

7.1 Echantillons d'analyse

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

Les échantillons doivent être préparé directement avant commencer le test.

Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés. Il est déconseillé de décongeler les sérums plusieurs fois.

1. N'utiliser que des sérums frais non inactivés.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, ni de sérums à l'aspect trouble (résultats positifs/négatifs faussés).

7.2 Préparation des réactifs

Le système de diagnostic VIROTECH Diagnostics offre une grande flexibilité, grâce à la possibilité d'utiliser le tampon de dilution et de lavage, le TMP, la solution d'arrêt au citrate ainsi que le conjugué pour tous les paramètres et les lots. Les contrôles prêts à l'emploi (contrôle positif, contrôle valeur-seuil, contrôle négatif) sont spécifiques des paramètres et doivent être utilisés exclusivement avec le lot de lames indiqué dans le certificat de contrôle de qualité.

1. Régler l'incubateur à 37 °C et vérifier que cette température règne bien à l'intérieur de celui-ci avant de commencer l'incubation.
2. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les bandelettes de test.
3. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
4. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).
5. Des titrages d'IgG ou des facteurs rhumatismaux élevés peuvent gêner la mise en évidence d'anticorps IgM ou engendrer l'obtention de résultats positifs ou négatifs erronés. **Les sérums doivent être prétraités avec le RF-SorboTech** (agent d'adsorption VIROTECH). Dans le cas de contrôles des IgM, l'adsorption préliminaire n'est pas nécessaire.

7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

1. Pour chaque série, pipeter 100 µl de tampon de dilution (valeur à blanc) prêt à l'emploi, de contrôle négatif, de contrôle cut-off et de contrôle positif des IgG, IgM et des IgA, ainsi que des sérums dilués des patients. Nous recommandons d'opter pour une double distribution (blanc, contrôles et sérums patients) : pour le contrôle cut-off, la double distribution est absolument indispensable. Dilution de travail pour les sérums patients : 1+100 ; par ex. 10 µl de sérum + 1 ml de tampon de dilution.
2. Après la distribution, incuber à 37 °C la plaque pendant 30 minutes (avec couvercle).
3. Mettre fin à la période d'incubation par quatre lavages effectués chacun à l'aide de 350 à 400 µl de solution de lavage pour chaque puits. Ne pas laisser de solution de lavage dans les puits, mais en éliminer les derniers restes en tapotant la plaque sur une protection en cellulose étendue à cet effet sur le plan de travail.
4. Déposer 100 µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.
5. Incubation des conjugués : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle).
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant quatre lavages (voir le point 3).
7. Déposer 100 µl de substrat TMB en solution dans chacun des puits.
8. Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
9. Arrêt de la réaction avec le substrat : pipetter 50 µl de solution d'arrêt dans chacun des puits. Agiter la plaque avec précaution, jusqu'à ce que les liquides se soient complètement mélangés et qu'ils présentent une couleur jaune uniforme.
10. Mesurer les extinctions à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm). Régler le photomètre de façon à ce que la valeur à blanc mesurée soit déduite de toutes les autres extinctions. La mesure photométrique doit être réalisée en l'espace d'une heure à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA

Tous les tests ELISA de VIROTECH Diagnostics peuvent être effectués à l'aide de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA. L'utilisateur s'engage à procéder à une validation de l'appareil à intervalles réguliers.

VIROTECH Diagnostics recommande la procédure suivante :

1. Lors de la mise à disposition de l'appareil ou lorsque des réparations importantes ont été effectuées sur le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA, VIROTECH Diagnostics recommande de réaliser la validation du dispositif en se conformant aux directives du fabricant de l'appareil.
2. Il est recommandé de contrôler ensuite le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA à l'aide du kit de validation (EC250.00). Ce contrôle régulier à l'aide du kit de validation doit être effectué au moins une fois par trimestre.
3. Lors de chaque cycle d'essai, les critères de validation du certificat de contrôle-qualité du produit doivent impérativement être remplis.

Cette manière de procéder assure le fonctionnement irréprochable de votre processeur ELISA et sert de plus à la garantie de qualité du laboratoire.

8. Interprétation du test

Les contrôles prêts à l'emploi sont destinés à une détermination semi-quantitative des anticorps IgG et IgM dont la concentration est indiquée en unités VIROTECH (VE). Les fluctuations dues à la réalisation du test sont compensés par la méthode de calcul, ce qui permet d'obtenir une reproductibilité élevée. Pour le calcul des unités VIROTECH (VE), utiliser les moyennes des valeurs de DO.

8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test

a) Valeurs de DO

La valeur de DO de la valeur à blanc doit être <0,15.

Les valeurs de DO des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité, les valeurs de DO des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10 VE. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

8.2 Calcul des unités VIROTECH (VE)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

$$VE_{\text{(contrôle positif)}} = \frac{DO_{\text{(contrôle positif)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$$

$$VE_{\text{(sérum patient)}} = \frac{DO_{\text{(sérum patient)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$$

8.3 Interprétation des résultats

a) Dans l'IgM et l'IgA pour tous les patients, dans l'IgG pour ceux > 14 ans

Résultat (VE) (IgG > 14 ans, IgM et IgA)	Évaluation
< 9,0	négatif
9,0 à 11,0	zone grise
> 11,0	positif

b) Dans l'IgG pour les enfants (0 à 14 ans) si le test est positif à l'IgM et/ou l'IgA

Chez l'enfant de 0 à 14 ans, la plage de valeurs seuil (*cut off*) peut être décalée vers le bas dans l'IgG, car le test ELISA VIROTECH est conçu pour détecter principalement les infections aiguës dans l'IgG. Mais ce schéma est exploitable sous réserve que le sérum donne un résultat positif à l'IgM et/ou à l'IgA.

Résultat (UV) (IgG 0 à 14 ans)	Évaluation
< 7,0	négatif
7,0 - 8,0	plage limite
> 8,0	positif

- Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées pour l'échantillon est supérieur à la limite supérieure de la zone grise, les échantillons seront considérés comme positifs.

2. Pour qu'une infection soit mise en évidence de façon sûre, il est nécessaire de déterminer la teneur en anticorps des deux échantillons sériques. Un échantillon sérique doit être testé directement après le début de l'infection, un deuxième échantillon cinq à dix jours plus tard (sérum de convalescent). La concentration des deux échantillons doit être déterminée de façon parallèle. Il n'est pas possible d'établir de diagnostic correct sur la base de l'évaluation d'un seul échantillon sérique. La sensibilité maximale est obtenue lorsque les trois classes d'anticorps IgG, IgM et IgA sont testées, car il faut prendre en compte le fait que certaines personnes ne produisent pas d'IgM.
3. Si les valeurs mesurées sont inférieures à celles de la zone grise définie, l'échantillon ne contient pas d'anticorps spécifiques aux antigènes en quantité décelable. Les échantillons seront alors considérés comme étant négatifs.

8.4 Schéma d'interprétation

IgG	IgA	IgM	Interprétation
-	-	-	Aucun contact avec le <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ou le taux d'anticorps est déjà retombé au-dessous du niveau cut-off
-	+	+	Toute première phase d'une infection aiguë ou d'une réinfection
-	+	-	Toute première phase d'une infection aiguë ; soit primo-infection, soit réinfection sans IgM ou bien le titrage des IgM n'a pas encore été effectué
+	+	+	Infection aiguë, en règle générale primo-infection, phase tardive, IgG et IgM déjà formées, taux d'IgA encore non retombé
+	-	+	Infection aiguë, en règle générale primo-infection, phase tardive, IgG et IgM déjà formées, taux d'IgA déjà retombé
+	+	-	Réinfection, phase très tardive, IgA encore présents, absence d'IgM ou réactivation ou infection sans formation d'IgM.
+	-	-	Réinfection, phase très tardive, taux d'IgA déjà revenu à la normale ou pas de formation d'IgA (se produit chez certains adultes), ou réactivation ou infection sans formation d'IgM ou titre d'IgG persistant après infection.
-	-	+	Infection précoce aiguë, IgA encore manquantes ou déjà retombées, titrage des IgG encore trop faible.

Remarque importante : On ne peut jamais exclure complètement des résultats faux positifs à l'IgA ou l'IgM isolés. Pour confirmer les résultats, il est recommandé de procéder à un contrôle du titrage de l'IgG dans les 5 à 10 jours ou de réaliser un immunoblot (LINE).

8.5 Limites du test

1. L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les éventuels autres résultats d'analyses existants.
2. Il est difficile de différencier une infection à *Mycoplasma* d'autres infections des voies respiratoires supérieures et inférieures ou de pneumonies atypiques malgré les antécédents et l'examen clinique, y compris les analyses standard de laboratoire et les contrôles radiologiques. Dans les cas imprécis ou en présence de symptômes persistants, si les résultats sont négatifs, nous recommandons, outre les examens sérologiques, d'étayer le diagnostic par méthode d'analyse biologique moléculaire.
3. Les réactions croisées avec les *M. genitalium* et les *M. hominis* ne peuvent être exclues. Des réactions croisées peuvent également survenir dans les sérums ayant réagi positivement à la détection d'anticorps anti-EBV.

9. Littérature

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

Préparation des échantillons patients et de la solution de lavage

▼ **Solution de lavage :** ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.

▼ **Dilution du Échantillons IgG/IgA**
à
1:101

Exemple :

10 µl de sérum/plasma + 1000 µl de tampon de dilution
(le tampon de dilution est prêt à l'emploi)

▼ **Dilution du Échantillons IgM à**
1:101
Adsorption du facteur
rhumatoïde avec RF-SorboTech

Exemple :

Incuber 5 µl de sérum/plasma + 450 µl de tampon de dilution +
1 goutte RF-SorboTech pendant 15 minutes

Réalisation du test

