

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgG LINE Immunoblot  
(M. pneumoniae IgG LINE-16)**

**Bestell-Nr.: WE214G16**

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgM LINE Immunoblot  
(M. pneumoniae IgM LINE-16)**

**Bestell-Nr.: WE214M16**

**VIROTECH Mycoplasma pneumoniae IgA LINE Immunoblot  
(M. pneumoniae IgA LINE-16)**

**Bestell-Nr.: WE214A16**

**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

<b>1. Verwendungszweck</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Diagnostische Bedeutung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Testprinzip</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Packungsinhalt</b> .....	<b>4</b>
4.1 Kit für 16 Bestimmungen .....	4
<b>5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien</b> .....	<b>4</b>
<b>6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise</b> .....	<b>4</b>
<b>7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)</b> .....	<b>5</b>
<b>8. Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>5</b>
<b>9. Testdurchführung</b> .....	<b>5</b>
9.1 Vorbereitung der Proben .....	5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien .....	5
9.3 Immunoblot Testdurchführung .....	6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren .....	7
<b>10. Testauswertung</b> .....	<b>7</b>
10.1 Auswertung der Patientenproben .....	7
10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle .....	7
10.3 Bedeutung der Antigene .....	7
10.4 Auswertungskriterien .....	8
10.5 Interpretationsschema IgG, IgA bzw. IgM .....	9
10.6 Gesamt-Befundkonstellationen (IgG, IgA und IgM) .....	9
10.7 Beurteilung P1-EP1 .....	9
10.8 Grenzen des Tests .....	9
<b>11. Leistungsdaten</b> .....	<b>9</b>
11.1 Sensitivität und Spezifität .....	9
11.2 Durchseuchung (Erwartete Werte) .....	10
11.3 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit) .....	10
11.4 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit) .....	10
<b>12. Literatur</b> .....	<b>10</b>
<b>13. Symbole</b> .....	<b>11</b>
<b>14. Testablaufschema</b> .....	<b>12</b>

## 1. Verwendungszweck

---

Line Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis von spezifischen IgG-, IgA- und IgM-Antikörpern im Humanserum. Der Line Immunoblot dient der serologischen Diagnostik einer frischen oder kürzlich durchgemachten *Mycoplasma pneumoniae*-Infektion. Der Kit kann zur serologischen Diagnostik allein oder, wenn das Ergebnis eines anderen Assays fraglich oder positiv ist, als Bestätigungstest eingesetzt werden. Für spezielle Fragestellungen wie z.B. für die differenzierte Erregersuche bei postinfektiösen Arthritiden oder beim Guillain-Barree-Syndrom ist der LINE momentan noch nicht evaluiert.

## 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 (7). Die Infektion ist endemisch mit kleinen epidemischen Peaks alle 4 bis 5 Jahre (7,10). *Mycoplasma pneumoniae* ist schwach infektiös und wird nur bei engem Kontakt übertragen (10). Untersuchungen zeigen, dass Mycoplasma-Infektionen bei AIDS-Patienten nicht selten sind (8). Eine überstandene Infektion schützt nicht vor einer Reinfektion (11).

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.
- 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. Daher ist eine schnelle, spezifische Labordiagnostik dieser Infektion für den Beginn einer geeigneten Therapie wichtig.

In einer vergleichenden Betrachtung der Mycoplasma-Diagnostik in 2003 wurde der damalige VIROTECH Mycoplasma pneumoniae Western Blot als die Methode mit der höchsten Spezifität auf dem Markt beschrieben (9). Bei dem Mycoplasma pneumoniae LINE handelt es sich um das verbesserte Nachfolgeprodukt dieses Western Blots.

## 3. Testprinzip

---

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Humanserum/ plasma-Proben erlaubt den Nachweis evtl. im Serum vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit den auf dem Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschriffe, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG-, IgA- bzw. IgM- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschriff entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blau-violette Banden ("Antigen-Banden") erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der

Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG-, IgA- bzw. IgM-Antikörpern schließen.

#### 4. Packungsinhalt

##### 4.1 Kit für 16 Bestimmungen

- |                                                                                                                                              |           |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|
| 1. <b>IgG, IgA bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen</b> mit aufgesprützten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig | <b>1x</b> | 16 Streifen |
| 2. <b>IgG, IgA bzw. IgM Cut off Kontrolle</b> , Humanserum, vorverdünnt                                                                      | <b>1x</b> | 1,0 ml      |
| 3. <b>Verdünnungs-/Waschpuffer</b> , pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel                                                   | <b>1x</b> | 50 ml       |
| 4. <b>IgG, IgA bzw. IgM - Konjugat</b> (100x konz.)<br>Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel                  | <b>1x</b> | 0,7 ml      |
| 5. <b>Substrat</b> (BCIP/NBT), gebrauchsfertig                                                                                               | <b>1x</b> | 57 ml       |
| 6. <b>Auswertungsprotokollblatt</b> zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse                                                        | <b>1x</b> | 1 Stk.      |

##### Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

IgG bzw. IgA oder IgM -Positive Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.

(Best.-Nr.: IgG: WE214P60 bzw. IgA: WE214P40 oder IgM: WE214P80)

IgG/IgM/IgA -Negative Kontrolle, Humanserum, vorverdünnt, 0,5 ml.

Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.

(Best.-Nr.: IgG/IgM/IgA: WE214N50)

#### 5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

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

- Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
- Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
- Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
- Nitrozellulose Teststreifen:** Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblässen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	oder Raumtemperatur	2 Wochen

#### 6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

- 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 Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die

Nitrozellulose Teststreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.

2. Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
4. Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

## **7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)**

---

1. Inkubationswanne (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
2. Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
3. Eine Spritzflasche zum Abstoppen
4. Pipette oder Handwaschgerät
5. Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
6. Pipettenspitzen
7. Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
8. Plastikpinzette
9. Aqua dest. oder deionisiert
10. Filterpapier

## **8. 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.

## **9. Testdurchführung**

---

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

### **9.1 Vorbereitung der Proben**

1. Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt.
2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma).
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübe Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

### **9.2 Vorbereitung der Reagenzien**

1. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
2. Vor Verdünnung alle Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
3. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
4. **Verdünnungs-/Waschpuffer**  
Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen. Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.

5. **IgG-, IgA- bzw. -IgM-Konjugat**

Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: „Testablaufschema“).

6. **Substratlösung**

Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

### 9.3 Immunoblot Testdurchführung

**Achtung:** Die Nitrozellulose Teststreifen dürfen nur in der freigegebenen Ig-Klasse getestet werden (siehe Etikett auf dem Blotheftchen und Bezeichnung auf jedem einzelnen Teststreifen).

**Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des Mycoplasma pneumoniae LINE, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.**

**Für eine sichere *Mycoplasma pneumoniae* Diagnostik sollte der LINE im IgG, IgA und IgM durchgeführt werden.**

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.
5. Je **15µl Patientenserum/-plasma** bzw. **100µl der cut off / positiven / negativen Kontrolle** zu pipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. Streifen **Waschen:** mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrilles die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. Streifen **Waschen:** mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Streifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtern Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

#### 9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

### 10. Testauswertung

---

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control):

Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.

2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control):

Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.

Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

#### 10.1 Auswertung der Patientenproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie bitte dem Protokollblatt.

IgG-Banden: P1, P90, P400, NMP, RP3M, RP3F und P1-EPI

IgA-Banden: P1, P90, P400, RP14, P200

IgM-Banden: P1, P90, P400, Pdh-B, GL, I-Prot.

#### 10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle

Banden, deren Intensität schwächer als die Cut off Bande (P1) der Cut off Kontrolle sind, werden nicht in die Bewertung einbezogen. Die P1- Bande muss eine schwache Intensität zeigen.

**Beurteilung der Bandenintensitäten (Ausnahmen: Pdh-B, GL, I-Protein, RP3M, RP3F und P1-EPI beachten):**

P1-Bande: Die Intensität der P1-Bande der Cut off Kontrolle legt die Bewertung aller Proteinbanden  
Im IgG, IgA und IgM wie folgt fest:

- **Geringere Intensität als die P1-Bande der Cut off Kontrolle** = 0
- **Gleiche Intensität wie die P1-Bande der Cut off Kontrolle** = 1
- **Stärkere Intensität als P1-Bande der Cut off Kontrolle** = 2

**Die Summe der Bandenintensitäten ergibt die Gesamtbeurteilung.**

**Wichtige Ausnahmen:**

- Im IgM werden die Banden: **Pdh-B, GL und I-Protein** nur beurteilt, sobald mindestens eine der Banden: P1, P90 oder P400  $\geq$  Cut off Bande ist, d.h. mit 1 oder 2 beurteilt wird.
- Im IgG wird nur eine der Banden **RP3M und RP3F** gewertet. Es wird die stärker reaktive Bande zur Beurteilung herangezogen.
- Im IgG wird die **Durchseuchungsbande P1-EPI** nicht in die Summe einberechnet. Sie wird als positiv bewertet wenn ihre Intensität  $\geq$  P1-Bande der Cut off Kontrolle ist und gibt - bei einer zusätzlich negativen Gesamtbewertung in allen Ig-Klassen - einen Hinweis auf einen länger zurückliegenden früheren Kontakt mit Mycoplasma pneumoniae.

#### 10.3 Bedeutung der Antigene

Auflistung der verwendeten rekombinanten (P1, P90, P400, RP3M, RP3F, RP14, P200) und gereinigten nativen (NMP, Pdh-B, GL, I-Protein) Antigene.

Antigen / Bezeichnung	Bedeutung der Antigene	Spezifität der Antikörper im LINE
<b>P1</b>	Das Protein P1 ist das Hauptadhäsins (Hauptantigen) von <i>M. pneumoniae</i> (Mw 176 kDa). Es ist oberflächen-exprimiert, in der Tip-Region lokalisiert und für die Cytadhärenz verantwortlich.	Hochspezifisch
<b>P90</b>	P90 ist oberflächen-exprimiert und verantwortlich für die korrekte und spezifische Integration des P1 Proteins in die bakterielle Membran.	Hochspezifisch
<b>P400</b>	Die Funktion von P400 ist weitgehend unbekannt.	Spezifisch
<b>NMP</b>	Niedermolekulare Proteine: Membranbestandteile und oberflächen-exprimierte Proteine.	Spezifisch
<b>RP3M &amp; RP3F</b>	Durch Sequenzunterschiede im Gen P1 werden Isolate von <i>M. pneumoniae</i> dem Serotyp 1 - M129 (RP3M) - oder dem Serotyp 2 - FH (RP3F) - zugeordnet.	Hochspezifisch
<b>RP14</b>	RP14 ist der rek. C-terminale Abschnitt des P1-Adhäsins. Antikörper gegen RP14 können die Cytadhärenz von <i>M. pneumoniae</i> an HBEC (human bronchial epithelial cells) inhibieren.	Hochspezifisch
<b>P200</b>	P200 ist an der Bildung des Zytoskeletts von <i>M. pneumoniae</i> als Strukturprotein beteiligt und erlaubt dem Bakterium das Gleiten auf Oberflächen und damit die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes.	Hochspezifisch
<b>Pdh-B</b>	Pdh-B ist eine Komponente der Pyruvatdehydrogenase. Pdh-B ist oberflächen exprimiert und gehört zu den fünf Proteinen, die mengenmäßig in höchster Konzentration in <i>M. pneumoniae</i> vorkommen.	Möglicher Akutmarker in Kombination mit hochspezifischen M. pn.-Antigenen
<b>GL</b>	<i>M. pneumoniae</i> wird lediglich von einer doppelschichtigen Membran umgeben auf der eine Lipoglycanschicht aufgelagert ist. Aufgrund dessen ist es naheliegend, dass Phospho- und Glykolipide als essentielle Bestandteile von Membranen teilweise an der Zelloberfläche des Bakteriums präsentiert und vom menschlichen Immunsystem erkannt werden.	Möglicher Akutmarker in Kombination mit hochspezifischen M. pn.-Antigenen
<b>I-Protein</b>	I-Proteine sind Erythrozyten-Antigene, die von Kälteagglutininen (CA) erkannt werden. Die CA, die durch <i>M. pneumoniae</i> induziert werden, sind vom IgM-Typ und in über 90% gegen das I-Protein gerichtet.	Möglicher Akutmarker in Kombination mit hochspezifischen M. pn.-Antigenen
<b>P1-EPI</b>	Ein Gemisch der P1-Antigene der Stämme FH und M129, und zeigt die Durchseuchung im IgG an.	Hochspezifisch

#### 10.4 Auswertungskriterien

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

IgG- bzw. IgA-Auswertung	
Summe der Bandenintensitäten	Beurteilung
< 4	Negativ
= 4	Auffällig
> 4	Positiv

IgM- Auswertung	
Summe der Bandenintensitäten	Beurteilung
< 3	Negativ
= 3	Auffällig
> 3	Positiv

## 10.5 Interpretationsschema IgG, IgA bzw. IgM

Beurteilung	Interpretation	
Negativ	Kein serologischer Hinweis auf eine <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -Infektion oder Zustand nach einer länger zurückliegenden Infektion.	Eine positive Durchseuchungsbande P1-EPI im IgG ( $\geq$ Cut-off-Bande) gibt Hinweis auf einen früheren Kontakt mit <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .
Auffällig	Antikörper gegen <i>Mycoplasma pneumoniae</i> sind nachweisbar. Abgeschwächte Reaktion bei Rekonvaleszenz, persistierenden Antikörpern oder bei gerade beginnender Infektion. Die Anforderung einer Verlaufskontrolle ist empfehlenswert.	
Positiv	Antikörper gegen <i>Mycoplasma pneumoniae</i> sind nachweisbar. Verdacht auf eine frische oder kürzlich durchgemachte <i>Mycoplasma pneumoniae</i> -Infektion.	

## 10.6 Gesamt-Befundkonstellationen (IgG, IgA und IgM)

IgG	IgA	IgM	Interpretation
-	-	-	Kein serologischer Hinweis auf eine <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Infektion.
-	+	+	frühe Phase einer akuten Infektion oder Re-Infektion.
-	+	-	frühe Phase einer akuten Infektion oder Re-Infektion
+	+	+	Akute Infektion
+	-	+	Akute Infektion (späte Phase)
+	+	-	Re-Infektion oder Infektion ohne Bildung von IgM.
+	-	-	Abgelaufene Infektion oder Reinfektion
-	-	+	Früher Phase einer akuten Infektion

## 10.7 Beurteilung P1-EP1

IgG	IgA	IgM	P1-EP1	Interpretation
-	-	-	+	Hinweis auf eine länger zurückliegende Infektion mit <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .

## 10.8 Grenzen des Tests

- Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae* nicht vollständig aus. Die Probe kann vor Auftreten der Antikörper entnommen worden sein oder die Antikörperkonzentration liegt unter der Nachweisgrenze des Tests.
- In seltenen Fällen können Patientenseren "inverse"-Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

## 11. Leistungsdaten

### 11.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität wurden Serenkollektive im IgG, IgA und IgM getestet, die mit einem ELISA und einem Western Blot als Referenzmethode (Befund) vorbestimmt wurden.

Folgende Serenkollektive wurden getestet: Blutspender (n=52), Kreuzreaktive (n=69), Kinderseren (n=27), Mykoplasmaseren (n=52).

## IgG

Serenkollektiv (n=200)		Mycoplasma pneumoniae LINE IgG		
		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Befund	Negativ	125	12	2
	Grenzwertig	10	1	3
	Positiv	3	4	40

Daraus ergibt sich im IgG eine Sensitivität von 93,0% und eine Spezifität von 98,4%. Grenzwertige Ergebnisse sind bei der Berechnung nicht berücksichtigt worden.

## IgA

Serenkollektiv (n=200)		Mycoplasma pneumoniae LINE IgA		
		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Befund	Negativ	138	10	11
	Grenzwertig	10	5	5
	Positiv	0	2	19

Daraus ergibt sich im IgA eine Sensitivität von >99% und eine Spezifität von 92,6%. Grenzwertige Ergebnisse sind bei der Berechnung nicht berücksichtigt worden.

## IgM

Serenkollektiv (n=200)		Mycoplasma pneumoniae LINE IgM		
		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Befund	Negativ	126	7	8
	Grenzwertig	4	1	8
	Positiv	1	2	43

Daraus ergibt sich im IgM eine Sensitivität von 97,7% und eine Spezifität von 94,0%. Grenzwertige Ergebnisse sind bei der Berechnung nicht berücksichtigt worden.

## 11.2 Durchseuchung (Erwartete Werte)

Die cut off-Einstellung wurde so durchgeführt, dass frische oder kürzlich durchgemachte Mycoplasma pneumoniae-Infektionen detektiert werden. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von 52 Blutspenderseren:

	IgG	IgA	IgM
Negativ	49	46	48
Grenzwertig	3	2	2
Positiv	0	4	2

## Durchseuchungsbande P1-EPI im IgG

Von 148 Seren (Blutspenderseren n=52, Kreuzreaktive Seren n=69 und Kinderseren n=27) zeigen 89 eine P1-EPI Bande > cut off (=60,1%).

## 11.3 Intra-Assay-Präzision (Wiederholbarkeit)

Bei jeder Chargenfreigabe wird in der Qualitätskontrolle von jedem einzelnen Immunoblot ein Streifen mit einem bestimmten Humanserum im IgG, IgA und IgM getestet. Es findet somit eine 100% Kontrolle aller Immunoblots statt.

Die Intensitäten der Banden dürfen bei einer Skala von 1-5 maximal eine Intensitätsstufe vom Mittelwert abweichen.

## 11.4 Inter-Assay-Präzision (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden je 4 Seren im IgG, IgA und IgM getestet. Die Bestimmung erfolgte in 10 Testansätzen an 6 unabhängigen Testtagen.

**In allen Testungen wurden die serologischen Vorgaben getroffen.**

## 12. 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. 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.
8. Sasaki Y, et al., Detection of Mycoplasma fermentans DNA from lymph nodes of acquired immunodeficiency syndrome patients. Microb Pathog (England) Aug. 1994, 17 (2) p131-5
9. Daxboeck F., Krause R. and Wenisch C. ,Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection, Clin. Microbiol. Infect 2003;9: p263-273
10. Bebear C., Biological diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory infections, Diagnostic biologique des infections respiratoires a Mycoplasma pneumoniae, Rev. Mal Respir (FRANCE) 1986, 3 (2) p67-71
11. Jacobs, E. (1991) Mycoplasma pneumoniae virulence factors and immune response. Reviews in Medical Microbiology 2, 83-90

### 13. Symbole

---



Siehe Gebrauchsanweisung!

## 14. Testablaufschemata

### Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	<b>30 Minuten</b>	15 µl Patientenserum/-plasma/100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Waschen	<b>3 x 5 Minuten</b>	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	<b>30 Minuten</b>	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung ( 1 + 100 )
Waschen	<b>3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute</b>	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	<b>10 ± 3 Minuten</b>	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	<b>3 x ohne Zwischeninkubation</b>	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

### Konjugatverdünnungstabelle: (gerundet)

Anzahl Streifen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Verdünnungs/ Waschpuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugat-Konzentrat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Endvolumen	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Anzahl Streifen	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Verdünnungs/ Waschpuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugat-Konzentrat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Endvolumen	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Anzahl Streifen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Verdünnungs/ Waschpuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugat-Konzentrat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Endvolumen	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Anzahl Streifen	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Verdünnungs/ Waschpuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugat-Konzentrat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Endvolumen	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml