



SeroMP™ Recombinant IgM

Trousse pour la détection semi-quantitative par dosage immuno-enzymatique (ELISA) des anticorps IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain

Notice d'emploi

Trousse pour 96 déterminations
(Référence 1262-01)

Pour Diagnostic *In Vitro*
Pour usage professionnel uniquement
Conserver à 2-8°C. **Ne pas congeler**



Savyon® Diagnostics Ltd.

3 Habosem St. Ashdod 77610
ISRAEL

Tel.: +972.8.8562920

Fax: +972.8.8523176

E-mail: support@savyondiagnosics.com

Indications d'utilisation

Le kit SeroMP™ Recombinant IgM est un dosage immuno-enzymatique (ELISA) pour la détection des anticorps IgM spécifiques à *Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain.

La trousse Savyon® SeroMP™ Recombinant IgM permet le diagnostic précoce d'une infection en cours dans un seul échantillon sérique, par détermination des anticorps IgM. Pour Diagnostic *In Vitro*.

Introduction

Mycoplasma pneumoniae est une cause fréquente de pneumonie, qui se caractérise souvent par une apparition progressive de maux de tête, fièvre, malaise, et plus typiquement une toux sèche. *M. pneumoniae* est commun à tous les groupes d'âge, cependant il est plus fréquent dans les vingt premières années de vie et il est rare chez des enfants de moins de quatre ans. Il est reconnu comme étant responsable de plus de 30% des cas de pneumonie (2). On peut retrouver *M. pneumoniae* à l'origine de maladies non respiratoires telles que des manifestations neuroméningées, pancréatiques, ORL et du syndrome neurologique aigu au niveau du tronc cérébral (5). Etant donné sa grande fréquence, on peut incriminer *M. pneumoniae* en cas de pneumonie, mais les symptômes étant les mêmes pour divers agents pathogènes, d'autres tests sérologiques sont nécessaires au diagnostic (3).

La technique ELISA est sensible, spécifique et permet une différenciation des anticorps spécifiques IgG, IgA et IgM (6). Du point de vue du diagnostic et du traitement, la caractéristique structurelle saillante de MP est l'absence de paroi cellulaire. Il a été établi que les polypeptides exposés en

surface déclenchent une réponse immunogène, en particulier ceux qui sont impliqués dans l'organite d'attachement de MP. Cet organite d'attachement se compose d'un complexe de polypeptides dans lequel la protéine cytoadhésine P1 joue un rôle majeur. (1; 4; 10) Compte tenu de sa forte immunogénicité, la protéine P1 est un modèle pour l'utilisation d'un antigène définitif dans des systèmes de diagnostic basés sur la sérologie, en essayant d'améliorer divers paramètres de performances de l'essai. Une manière courante d'améliorer les performances d'essais utilisant des polypeptides hautement immunogènes tels que la protéine P1 consiste à les incorporer dans les tests sous la forme d'antigènes recombinants. En effet, plusieurs polypeptides ont été identifiés dans la littérature comme étant de bons candidats pour cela. (9)

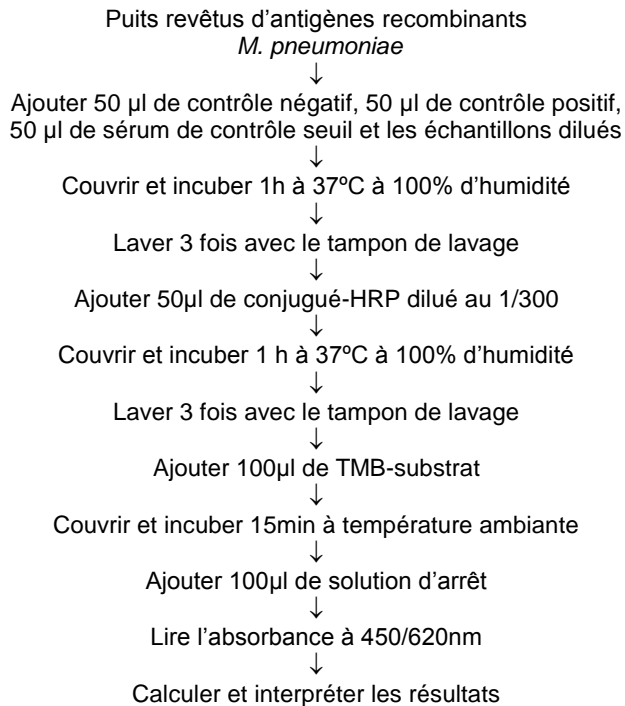
Les anticorps IgM spécifiques à *M. pneumoniae* apparaissent rapidement après le déclenchement de la maladie, atteignant des pics en une à quatre semaines puis retombant à des niveaux non significatifs du point de vue du diagnostic en l'espace de quelques mois (7). Compte tenu de l'apparition précoce et de la durée de vie relativement courte des anticorps IgM, leur détection permet de diagnostiquer une infection aiguë en utilisant un seul échantillon de sérum. Les patients jeunes ont tendance à présenter des taux d'IgM supérieurs à ceux des adultes (8). Les taux d'IgG augmentent plus lentement que les taux d'IgM mais ils restent élevés plus longtemps, de sorte qu'une augmentation significative entre deux échantillons consécutifs prélevés au moins à 2 semaines d'intervalle peut indiquer une infection ou réinfection en cours même en l'absence d'IgM. Les anticorps IgA se trouvent à des taux plus élevés chez les patients âgés (7) et ils peuvent être plus utiles que les IgM pour diagnostiquer une infection en cours chez l'adulte (8).

Savyon® Diagnostics Ltd. a développé des kits semi-quantitatifs utilisant des antigènes recombinants dans des dosages ELISA d'IgG et IgA et un kit qualitatif utilisant un mélange d'antigènes recombinant et natif dans le dosage ELISA des IgM qui permettent de suivre la variation des taux d'anticorps dans les sérums humains.

Principe du dosage

- Les plaques de microtitration SeroMP™ Recombinant sont fournies revêtues de fractions purifiées de protéine membranaire du *Mycoplasma pneumoniae* et de antigènes recombinants.
- Le sérum à doser est dilué et mis à incuber dans les puits de la microplaque. Lors de cette étape les anticorps de *M. pneumoniae* vont se fixer aux antigènes des puits.
- Les anticorps non fixés sont éliminés par lavage.
- Des immunoglobulines anti-IgM humaines conjuguées à la peroxydase du raifort (HRP) sont ajoutées. Lors de cette étape le conjugué se lie au complexe antigène-anticorps fixé au puits.
- Le conjugué non lié est éliminé par lavage.
- Après ajout du TMB-substrat, celui-ci est hydrolysé par la peroxydase, formant ainsi, par réduction du substrat, une réaction colorée bleue.
- Après ajout de la solution d'arrêt, la coloration bleue vire au jaune et peut ensuite être lue au spectrophotomètre à 450/620 nm.
- L'absorbance est proportionnelle à la concentration en anticorps spécifiques ayant réagi avec les antigènes fixés sur les parois des puits.

Procédure de dosage



Contenu de la trousse

Trousse pour 96 déterminations

- Microplaque revêtue d'antigène *M. pneumoniae*:** 96 puits sécables (8x12) revêtus d'antigènes recombinants de *M. pneumoniae*, contenus dans un sachet d'aluminium contenant un déshydratant.
1 Plaque
- Tampon de lavage concentré (20 X):** Un tampon PBS - Tween.
1 flacon, 100 ml
- UniDiluent (jaune) :** Solution tampon prête à l'emploi. Contient moins de 0,05% de ProClin comme conservateur.
1 flacon, 60 ml
- Diluant du sérum IgM (orange) :** Une solution tampon anti-IgG humaine, prête à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin comme conservateur.
2 flacons, 60 ml
- Contrôle Positif:** Sérum humain positif pour IgM anti-*M. pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin et moins de 0,1% d'azide de sodium comme conservateur.
1 flacon, 2,0 ml
- Contrôle Négatif :** Sérum humain négatif pour IgM anti-*M. pneumoniae* prêt à l'emploi. Contient moins de 0,05% de Proclin et moins de 0,1% d'azide de sodium comme conservateur.
1 flacon, 2,0 ml
- Contrôle seuil :** Sérum IgM de *M. pneumoniae* prêt à l'emploi, utilisé pour la détermination de limites. Contient moins de 0,1% d'azide de sodium et moins de 0,05% de ProClin comme conservateurs.
1 flacon, 2,5 ml
- Conjugué-HRP concentré (X 300):** Conjugué d'anti-IgM humaines (spécifiques de la chaîne µ) conjugué à la

peroxydase du raifort. Contient moins de 0,05% de Proclin comme conservateur.

- TMB-Substrat :** Solution prête à l'emploi. Contient 3, 3', 5, 5' - tétraméthylbenzidine comme chromogène et du peroxyde comme substrat.
1 flacon, 0,2 ml
- Solution d'arrêt :** Solution prête à l'emploi. Contient 1M H₂SO₄.
1 flacon, 14 ml
- Couvercle pour plaque :**
1 unité
- Manuel d'utilisation :**
1

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Tubes de dosage propres pour la dilution des sérums des patients.
2. Flacon plastique jetable pour la dilution du conjugué HRP concentré.
3. Micropipettes graduées, pipettes multicanaux (5-50, 50-200 et 200-1000 µl) et embouts jetables.
4. Flacon d'un litre.
5. Eprouvette de 50 ml.
6. Bouteille de lavage.
7. Papier absorbant.
8. Agitateur Vortex.
9. Bain marie à 37°C avec couvercle.
10. Lecteur de plaque ELISA avec filtres à 450 et 620 nm.
11. Eau distillée ou bidistillée.

Avertissements et Précautions

Pour Diagnostic In Vitro

1. La trousse contient du sérum humain qui a été testé par des techniques approuvées par la FDA et a été trouvé négatif vis à vis des antigènes HBV et des anticorps anti-HCV et anti-HIV 1 et 2. Puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution, selon les conseils publiés dans le manuel "Biosafety in Micro Biological and Biomedical Laboratories, 1988" de CDC/NIH.
2. La solution de TMB-Substrat est irritante pour la peau et les muqueuses. Éviter le contact direct.
3. Tous les composants de cette trousse ont été étalonnés et testés par lot. Ne pas mélanger des composants provenant de lots différents.
4. L'acide sulfurique dilué (H₂SO₄ 1M) est irritant pour les yeux et la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer à grande eau immédiatement et consulter un médecin.

Conservation et durée de vie des réactifs

1. Tous les réactifs fournis doivent être conservés à 2-8°C. Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur la trousse. L'exposition des composants bouchés ou scellés à température ambiante pendant quelques heures n'affectera pas les réactifs.
NE PAS CONGELER !
2. Une fois ouverte, la durée de vie de la trousse est de 90 jours.
3. Les barrettes non utilisées doivent être rescellées dans le sachet en aluminium avec les déshydratants, en enroulant le côté ouvert et en fermant fortement avec la bande sur toute la longueur.

4. Il est courant que des cristaux se forment dans le tampon de lavage (concentré x 20) pendant sa conservation au froid. Redissoudre ces cristaux en chauffant le tampon à 37°C avant de le diluer. Une fois dilué, le tampon peut être conservé à 2-8°C pendant 3 semaines.

Prélèvement du sérum

Préparer le sérum à partir d'échantillons prélevés aseptiquement selon les méthodes classiques. Ne pas utiliser du sérum inactivé par la chaleur. L'utilisation de sérum contaminé, trouble ou lipidique est fortement déconseillée. Des particules et des précipités dans le sérum peuvent entraîner des résultats erronés. Clarifier ces échantillons par centrifugation ou filtration avant le dosage.

Conservation

Les échantillons doivent être conservés à 2-8°C et dosés dans les 7 jours (l'addition d'azide de sodium à 0,1% est fortement recommandée). Pour une conservation plus longue, aliquoter les échantillons et les conserver à -20°C. Éviter les décongélations et congélations répétées.

Procédure de dosage - Manuelle

Procédure sur automate disponible sur demande

A. Préparation des réactifs

1. Porter tous les composants et les échantillons cliniques à température ambiante. Bien mélanger le contrôle de seuil, le contrôle négatif, le contrôle positif et les échantillons cliniques avant emploi.
2. Déterminer le nombre total d'échantillons à tester. En plus de ces échantillons, prévoir pour chaque dosage : deux puits pour le contrôle de seuil, un puits pour le contrôle négatif, et un puits pour le contrôle positif.
3. Retirer la microplaque de son sachet d'aluminium en coupant l'extrémité de l'emballage. Placer le nombre de puits nécessaires pour le dosage sur le support (selon le nombre d'échantillons à tester).
4. Diluer le tampon concentré au 1/20 avec de l'eau distillée : par exemple pour 1 litre de tampon de lavage, ajouter 50 ml de tampon de lavage concentré à 950 ml d'eau distillée ou bidistillée.

B. Incubation des sérums et des contrôles

5. Diluer chaque sérum de patient au 1/105 comme suit : Ajouter 10 µl de sérum de patient à 1040 µl de diluant du sérum.

Remarque : Le Diluant Sérum IgM contient un anticorps anti-IgG humaine et il est utilisé pour enlever les anticorps IgG et le facteur RF du sérum humain.

6. Distribuer 50µl de contrôle négatif, de contrôle positif, de contrôle seuil « Cut off » en DOUBLE, et d'échantillons de sérum dilués au 1/105 dans des puits séparés de la bandelette de test.
7. Couvrir les barrettes avec un couvercle et incuber 1 heure à 37°C en chambre humide.
8. Éliminer le liquide présent dans les puits.
9. **Étape de lavage:** Remplir chaque puits avec le tampon de lavage jusqu'en haut du puits et éliminer ensuite le tampon de lavage; recommencer cette étape 3 fois.
10. Sécher les puits en les tapotant délicatement sur du papier absorbant.

C. Incubation avec le conjugué

11. Afin d'obtenir la solution de travail, le conjugué (anti-IgM humaine) concentré-HRP doit être dilué. Diluer le conjugué-HRP au 1/300 avec le UniDiluent. Par exemple pour 2 barrettes, préparer un minimum de 3 ml de conjugué de la manière suivante : 10 µl de conjugué HRP anti-IgM concentré mélangé à 3 ml de UniDiluent.
12. Distribuer 50 µl de conjugué dilué dans chaque puits.
13. Recouvrir les barrettes avec un couvercle et incuber 1 h à 37°C en chambre humide.
14. Éliminer le liquide et laver comme dans les étapes 9 et 10.

D. Incubation avec le TMB - Substrat

15. Distribuer 100 µl de TMB-substrat dans chaque puits, couvrir les barrettes avec un couvercle et incuber **15 minutes** à température ambiante.
16. Arrêter la réaction par ajout de 100 µl de solution d'arrêt (H₂SO₄ 1 M) dans chaque puits.

E. Détermination des résultats

17. Déterminer l'absorbance à 450/620nm et enregistrer les résultats. La lecture doit se faire dans les 30 minutes maximum après l'arrêt de la réaction colorée.
 - **Note:** Toute bulle d'air doit être éliminée avant la lecture. Le fond de la plaque ELISA doit être soigneusement essuyé.

Validation du dosage

Afin de valider le dosage, les critères suivants doivent être vérifiés et validés. Si ces critères ne sont pas remplis, le dosage est invalidé et doit être refait.

1. D.O_{CP} ≥ 1.0
2. Rapport : D.O._{CP} / D.O_{Contrôle de seuil} > 2
3. D.O_{CN} < 0.3

Calcul des résultats

1. L'absorbance moyenne du sérum seuil passé en double doit être calculée.
2. Pour normaliser les résultats obtenus dans des tests différents, l'indice de seuil (COI, *cutoff index*) est calculé au moyen de la formule suivante :

$$\text{COI} = \frac{\text{DO de l'échantillon de sérum}}{\text{DO moyenne du contrôle seuil}} \times 10$$

Interprétation des résultats

IgM COI	Résultat	Interprétation diagnostique
<10	Négatif Pas d'anticorps IgM détectés	Pas d'infection à <i>M. pneumoniae</i>
10-11	Douteux	Doser un deuxième échantillon, prélevé 2 à 3 semaines après, en parallèle avec le premier. Si le second échantillon est douteux, le résultat doit être considéré négatif
>11	Positif Concentration d'anticorps IgM significative	Infection à <i>M. pneumoniae</i> en cours

Afin d'obtenir un profil d'anticorps complet, les IgA et les IgG devraient également être dosés

Interprétation des résultats à partir de la détection combinée des anticorps IgG, IgM et IgA.

Niveau d'anticorps <i>M. pneumoniae</i>			
IgG	IgM	IgA	
Négatif	Négatif	Négatif	Pas d'infection à <i>M. pneumoniae</i>
Négatif ou Positif	Positif	Négatif ou Positif	Infection à <i>M. pneumoniae</i> en cours
Positif	Négatif	Négatif	Infection à <i>M. pneumoniae</i> ancienne
Négatif ou Positif	Négatif	Positif	Infection à <i>M. pneumoniae</i> en cours ou réinfections

Performance du test

Comparaison des résultats obtenus avec les tests Savyon® SeroMP™ Recombinant IgG, IgA et IgM et des tests recombinants concurrents*

	Groupe (N)	SeroMP Recombinant % POSITIF.	Tests Concurrents % POSITIF.
IgG	Population saine (30)	20	40
	Patients atteints de <i>M. pneumoniae</i> (61)	32,8	36,1
IgA	Population saine (30)	6,6	3,3 6,6 (BL)
	Patients atteints de <i>M. pneumoniae</i> (61)	55,7	42,6
IgM	Population saine (30)	6,6	3,3
	Patients atteints de <i>M. pneumoniae</i> (56)	64,2	44,6 18 (BL)

- Les résultats obtenus pour les IgM et IgA avec les coffrets **Savyon® SeroMP™ Recombinant IgM et IgA** montrent une sensibilité des résultats plus élevée chez les patients atteints de *M. pneumoniae* aiguës ou chroniques.
 - De plus, leur taux de détection dans la population saine est plus faible avec les coffrets **Savyon® SeroMP™ Recombinant** que ceux des concurrents.
 - Lors d'infections à *M. Pneumoniae* aiguës ou en cours, les coffrets **Savyon® SeroMP™ Recombinant IgM et IgA** se révèlent plus performants pour distinguer les patients malades de la population saine.

* Evaluation interne

Réactions croisées

Des patients hospitalisés, infectés par des agents pathogènes du tractus respiratoire : *Chlamydia pneumoniae* et *EBV* diagnostiqués par des tests sérologiques commercialisés, ont été aussi étudiés avec la trousse SeroMP Recombinant. La plupart des sérums ont été trouvés négatifs, il n'a pas été détecté de réactions croisées significatives.

Précision

Répétabilité (précision Intra-essai)

Echantillon	N	Valeur moyenne	CV%
Positif	10	2.164	4.7%
Négatif	10	0.159	13%

Reproductibilité (précision inter-essais):

Echantillon	N	Valeur moyenne	CV%
Positif	10	1.196	4.9%
Négatif	10	0.252	7.3%

Limites du dosage

- Le diagnostic final ne doit pas reposer sur le seul résultat sérologique. Toutes les données cliniques et de laboratoire doivent être prises en considération.
- Les échantillons dosés trop tôt pendant la primo-infection ne contiennent pas toujours d'anticorps décelables. Si une infection à *M. pneumoniae* est suspectée, un second échantillon doit être prélevé 2 à 4 semaines plus tard et dosé en parallèle avec l'échantillon d'origine.
- Substances interférentes: Il n'est pas conseillé d'utiliser du sérum lipémique, trouble ou contaminé. Du sérum contenant du précipité ou des particules en suspension peut conduire à des résultats erronés. Ces échantillons devraient être clarifiés par centrifugation ou par filtration avant le dosage.

Bibliographie

- Jacobs, E., A. Bennewitz, and W. Bredt, Reaction pattern of human anti-Mycoplasma pneumoniae antibodies in enzyme-linked immunosorbent assays and immunoblotting, *J Clin Microbiol*, 23 (3), 517-22., 1986
- Lieberman D., Schlaffer F., Boldur I., Lieberman D., Horowitz S., Friedman, M.G., Leioninen M., Horowitz O., Manor E. and Porath A. (1996) Multiple pathogens in adult patients admitted with Community - acquired pneumonia, a one year prospective study of 346 consecutive patients Thorax 1996 51: 179-184.
- Lieberman, D., Shvartzman, P., Lieberman, D., Ben-Yaakov, M., Lazarovich, Z., Hoffman, S., Mosckovitz, R., Ohana, B., Leinonen, M., Luffy, D. and Boldur I. (1998) Etiology of Respiratory Tract Infection in Adults in a General Practice Setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 685-689.
- Macadam, S., and N. Cimolai, Anti-Mycoplasma pneumoniae secretory antibody in human breast milk, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43 (3), 247-250, 2002.
- Okada T., Kato I., Miho I., Minami S., Kinoshita H., Akao I., Kemmochi M., Miyabe S. and Takeyama I (1996) Acute Sensorineural Hearing Loss Cause by M. Pneumoniae Acute Otolaryngol (Stockh) 1996 522: 22-25
- Raisanen S.M. Suni J.I. and Leinikki P.O.: (1980) "Serological diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections by enzyme immunoassay" : *J.Clin. Pathol.* 33, 836-840.
- Seggav J.S., Sedmark G.V. and Krup V., (1996) Isotype-specific antibody responses to acute M. pneumoniae infection *Ann Allergy Asthma Immuno.* 77: 67-73.
- Samra Z., and Gadba R.,(1993) "Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection by specific IgM antibodies using a new capture-enzyme-immunoassay; *Eur. J. Epidermol.* 9: 97-99.
- Tuuminen, T., and R. Vainionpaa, Development of enzyme immunoassays to detect salivary sIgA to Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae, *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 61 (5), 357-362, 2001.
- Tuuminen, T., S. Varjo, H. Ingman, T. Weber, J. Oksi, and M. Viljanen, Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae immunoglobulin G and A antibodies in a healthy Finnish population as analyzed by quantitative enzyme immunoassays, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7 (5), 734-738, 2000.



European Authorized Representative:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53, B-1030 Brussels, Belgium

Tel: +32.2.732.59.54

Fax: +32.2.732.60.03

E-mail: mail@obelis.net

	Limitation de température
	Consulter la notice
	Dispositif médical pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Fabricant
	Représentant autorisé en Europe