

UTILISATION PRÉVUE

Le système ZEUS ELISA de dépistage d'IgM à *Mycoplasma pneumoniae* est un test conçu pour la détection qualitative des anticorps IgM anti-*Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain. Quand il est réalisé selon les recommandations, les résultats de ce test peuvent aider au diagnostic d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae* dans la population adulte. Ce test est réservé pour des diagnostics *in vitro*.

SIGNIFICATION ET CONTEXTE

La pneumonie à mycoplasme est la cause la plus fréquente de pneumonie et d'infections fébriles des voies respiratoires supérieures dans l'ensemble de la population (excepté la grippe A) (1-5). D'autres complications non-respiratoires peuvent également se développer avec cette maladie dans pratiquement n'importe quel organisme, pouvant aller de troubles légers jusqu'à menacer la vie de la personne (6-8). *Mycoplasma pneumoniae*, un procaryote, est le plus petit (10x200 nm) et le plus simple micro-organisme d'auto-réplication connu, qui ressemble davantage à une bactérie qu'à un virus. Cependant, parce qu'il lui manque une paroi cellulaire, une résistance aux antibiotiques de la paroi cellulaire est ainsi évidente (par ex. la pénicilline, les céphalosporines (1)). Ce souci de diagnostic, ou au moins de la précision thérapeutique dans la prise en charge précoce des infections acquises dans la collectivité, est particulièrement critique chez les patients très jeunes ou âgés, où très peu de marge d'erreur temporelle existe. Jusqu'à récemment, le diagnostic de routine en laboratoire de cette infection a été limité à des tests manquant de sensibilité et/ou non-spécifiques (par ex. agglutines froides, fixation du complément, l'isolement par culture). Des anticorps spécifiques d'espèces dirigés contre des antigènes de surface sont maintenant connus. Ils sont protecteurs et sont facilement détectés par ELISA, même dans les premiers stades de la maladie. Le diagnostic sérologique est donc le meilleur moyen (9).

PRINCIPE DU TEST

Le système de test ZEUS ELISA IgM à *Mycoplasma pneumoniae* a été conçu pour la détection d'anticorps de classe IgM contre *Mycoplasma pneumoniae* dans un échantillon de sérum sanguin humain. Les puits des barrettes à micro-puits plastiques sont sensibilisés par une absorption passive d'antigène de *Mycoplasma pneumoniae*. La procédure de test comprend trois étapes d'incubation :

1. Le sérum devant être testé est dilué avec le diluant d'échantillon fourni. Le diluant d'échantillon contient de l'IgG anti-humaine qui précipite et élimine l'IgG et le facteur rhumatoïde de l'échantillon, en laissant l'IgM libre de réagir avec l'antigène immobilisé. Lors de l'incubation de l'échantillon, tout anticorps IgM spécifique de l'antigène qui est présent dans l'échantillon se lie à l'antigène immobilisé. La plaque est lavée de façon à enlever les anticorps non fixés et les autres composants sériques.
2. Des anticorps IgM antihumains d'origine caprine conjugués à de la peroxydase sont ajoutés dans les puits et la plaque est incubée. Le conjugué réagira avec les anticorps IgM immobilisés sur la phase solide de l'étape 1. Les puits sont lavés pour enlever le conjugué non fixé.
3. Les micropuits contenant du conjugué de peroxydase immobilisé sont incubés avec une solution de substrat peroxydase. L'hydrolyse du substrat avec de la peroxydase produit un changement de couleur. Après un certain temps, la réaction est arrêtée et l'intensité de la couleur de la solution est mesurée par photométrie. L'intensité de la couleur de la solution dépend de la concentration d'anticorps dans l'échantillon d'origine.

COMPOSANTS DU SYSTÈME DE TEST

Matériel inclus :

Chaque système de test contient les composants suivants en quantité suffisante pour réaliser le nombre de tests indiqué sur l'étiquette du conditionnement.
REMARQUE : Les composants suivants contiennent de l'azoture de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : contrôles, étalon et diluant d'échantillon.

PLATE	1. Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits, enduits d'une préparation d'antigène inactivé réactif à <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (souche FH). Les bandes sont emballées dans un porte-bandes et placées avec du desséchant dans une enveloppe hermétiquement fermée.
CONJ	2. Conjugué : Solution d'IgM antihumains d'origine caprine conjuguée à de la peroxydase du raifort (spécifique à la chaîne μ). Un flacon de 15 ml avec bouchon blanc. Prêt à l'emploi.
CONTROL +	3. Contrôle positif (sérum humain) : Une ampoule de 0,35 ml avec bouchon rouge.
CAL	4. Étalon (sérum humain) : Une ampoule de 0,5 ml avec bouchon bleu.
CONTROL -	5. Contrôle négatif (sérum humain) : Une ampoule de 0,35 ml avec bouchon vert.
DIL SPE	6. Diluant d'échantillon : Un flacon de 30 ml à bouchon vert contenant du Tween-20, de l'albumine de sérum bovin et tampon phosphate salin, avec de l'IgG anti-humain d'origine caprine (spécifique à la chaîne γ). Solution pourpre. Prêt à l'emploi.
SOLN TMB	7. TMB : Un flacon de 15 ml à bouchon ambre contenant du tétraméthyl-3, 3', 5, 5'-benzidine (TMB). Prêt à l'emploi.
SOLN STOP	8. Solution d'arrêt : Un flacon de 15 ml à bouchon rouge contenant du 1M H ₂ SO ₄ , 0.7M HCl. Prêt à l'emploi.
WASHBUF 10X	9. Tampon de lavage concentré (10 x) : Dilution d'un volume de concentré dans neuf volumes d'eau distillée ou déionisée. Un flacon de 100 ml à bouchon transparent contenant une solution de Tween 20 et un tampon phosphate salin concentré 10 x (solution bleue). REMARQUE : La solution 1 x présente un pH de 7,2 ± 0,2.

REMARQUES :

1. Les composants suivants ne doivent pas nécessairement être utilisés avec des systèmes de test ayant un numéro de lot correspondant et peuvent donc être librement utilisés avec des systèmes de test ZEUS ELISA : TMB, solution d'arrêt et tampon de lavage.
2. Le système de test contient également une étiquette de composant contenant des informations spécifiques de lot à l'intérieur de la boîte du système de test.

PRÉCAUTIONS

1. Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Observer les précautions normalement applicables lors de toute manipulation de réactif de laboratoire. En cas de contact oculaire, rincer immédiatement les yeux avec beaucoup d'eau et consulter un médecin. Porter des vêtements protecteurs appropriés, ainsi que des gants et une protection des yeux/du visage. Ne pas respirer les vapeurs de ce produit. Jeter conformément à toutes les lois applicables.
3. Les puits de la plaque ELISA ne contiennent pas d'organismes viables. Cependant, les bandes doivent être considérées comme des **matériaux biologiques dangereux** et être manipulées en conséquence.
4. Les solutions de contrôle sont des **matériaux biologiques dangereux**. Les matériaux d'origine de ces produits ont fait l'objet de tests approuvés n'ayant révélé aucune présence d'antigène du VIH-1, de HBsAg et d'anticorps contre le VHC et le VIH. Cependant, puisqu'aucune méthode de test n'offre une garantie absolue

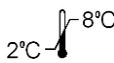
d'absence de tout agent infectieux, ces produits doivent être manipulés selon les consignes du niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (12).

- Pour obtenir des résultats exacts, il est essentiel de respecter les délais et les températures d'incubation. Vérifier que tous les réactifs sont équilibrés à température ambiante (20–25 °C) avant de commencer le test. Les réactifs non utilisés doivent être retournés à une température de réfrigération immédiatement après utilisation.
- Un mauvais lavage peut causer de faux résultats positifs ou négatifs. S'assurer de minimiser la quantité de solution de lavage résiduelle (p. ex. par absorption ou aspiration) avant d'ajouter le conjugué ou le substrat. Ne pas laisser les puits sécher entre les incubations.
- Le diluant d'échantillon, les solutions de contrôle et la solution étalon contiennent de l'azote de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azote de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azote de cuivre dans la tuyauterie de laboratoire, lesquelles peuvent causer des explosions ou des détonations. Pour éviter ce risque, rincer abondamment les éviers avec beaucoup d'eau après y avoir jeté une solution contenant de l'azote de sodium.
- L'inhalation, l'ingestion et le simple contact cutané de la solution d'arrêt peuvent avoir des effets TOXIQUES, notamment des brûlures. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.
- La solution TMB est nocive. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
- Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
- Essuyer le fond de la plaque de façon à enlever les empreintes digitales et les résidus de liquide pouvant fausser les mesures de densité optique.
- La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
- Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
- La solution TMB doit être incolore, jaune très pâle, vert très pâle ou bleu très pâle lors de son utilisation. Une contamination de la solution TMB avec du conjugué ou d'autres oxydants peut causer un changement de couleur prématuré. Ne pas utiliser la solution TMB si elle est nettement bleue.
- Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
- Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
- Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
- Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
- Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
- Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
- Laisser les bandes de micropuits et le support arriver à température ambiante avant d'ouvrir l'enveloppe protectrice, afin de protéger les puits de toute condensation.
- Récupérer la solution de lavage dans un bassin à résidus. Traiter la solution résiduelle avec un désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium). Éviter d'exposer les réactifs aux vapeurs de javel.
- Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
- Ne jamais utiliser une plaque ELISA dont la bande indicatrice du sachet de déshydratant est passée du bleu au rose.
- Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azote de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azote de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
- Ne pas exposer les réactifs à des solutions contenant de la javel ni même aux odeurs fortes s'échappant d'une solution contenant de la javel. De très petites quantités de javel (hypochlorite de sodium) peuvent détruire l'activité biologique de plusieurs réactifs de ce système de test.

MATÉRIAUX NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de micropuits ELISA pouvant lire des mesures avec des longueurs d'ondes de 450 nm. **REMARQUE: il est possible d'utiliser un lecteur à longueur d'onde unique (450 nm) ou à longueur d'onde double (450/620 - 650 nm). L'utilisation d'un lecteur à longueur d'onde double est préférable, puisqu'il a été établi que le filtre de référence supplémentaire réduisait l'interférence potentielle provenant d'anomalies susceptibles d'absorber la lumière.**
- Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 – 200 µl.
- Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 50 – 200 µl.
- Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
- Flacon de lavage ou système de lavage de micropuits.
- Eau distillée ou déionisée.
- Cylindre gradué d'un litre.
- Pipettes sérologiques.
- Embouts de pipettes jetables.
- Serviettes en papier.
- Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
- Bassin de résidus et de désinfectant (p. ex. 10 % de javel domestique à 0,5 % d'hypochlorite de sodium).

CONDITIONS DE STOCKAGE

	Bandes de micropuits avec revêtement : Refermer immédiatement de façon hermétique le sachet de bandes non utilisées en y laissant le déshydratant et replacer le sachet dans un environnement de stockage approprié. Après l'ouverture du sachet, les bandes demeurent stables pendant 60 jours, tant que les bandes indicatrices du sachet de déshydratant demeurent bleues.
	Conjugué – NE PAS CONGELER.
	Système de test non ouvert, étalon, contrôle positif, contrôle négatif, solution TMB, diluant d'échantillon
	Solution d'arrêt : 2 - 25°C
	Tampon de lavage (1 x) : 20 - 25°C pendant un maximum de 7 jours; 2 – 8 °C pendant un maximum de 30 jours. Tampon de lavage (10 x) : 2 - 25°C

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

- ZEUS Scientific recommande que l'utilisateur prélève les échantillons conformément au document M29 du CLI intitulé « *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease* » (dernière édition).
- Aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie totale qu'un échantillon de sang humain ne causera aucune transmission d'infection. Par conséquent, tous les dérivés d'échantillons sanguins doivent être considérés comme possiblement infectieux.
- Utiliser uniquement du sérum sanguin fraîchement prélevé et correctement réfrigéré, obtenu selon la procédure de ponction veineuse aseptique de cette analyse (10, 11). Ne pas utiliser si un anticoagulant ou un agent de conservation a été ajouté. Éviter d'utiliser du sérum sanguin hémolysé, lipémique ou exposé à des bactéries.
- Les échantillons peuvent être conservés à température ambiante pendant un maximum de 8 heures. Si aucun test n'est effectué dans un délai de 8 heures, le sérum sanguin peut être stocké à 2 – 8 °C pendant un maximum de 48 heures. Si l'exécution du test est retardée, le sérum sanguin peut être stocké à -20 °C ou moins. Éviter les cycles multiples de gel/dégel pouvant causer une perte d'activité anticorps et produire des résultats erronés. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour

leur laboratoire. Les laboratoires utilisateurs ont la responsabilité de consulter tous les documents de référence disponibles et/ou leurs propres études afin de déterminer les critères de stabilité appropriés pour leur laboratoire (13).

PROCÉDURE D'ESSAI

- Sortir les composants de leur lieu de stockage et laisser les composants se réchauffer à température ambiante (20 – 25 °C).
- Déterminer le nombre de micropuits nécessaires. Prévoir six déterminations de contrôle/étalon (un blanc réactif, un contrôle négatif, trois étalons et un contrôle positif) par série. Exécuter un blanc réactif pour chaque analyse. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées contrôles/étalon. Replacer les bandes inutilisées dans le sachet en y laissant le déshydratant, puis fermer hermétiquement le sachet et conserver à 2 – 8 °C.

EXEMPLE DE CONFIGURATION DE PLAQUE		
	1	2
A	Blanc	Patient 3
B	Contrôle négatif	Patient 4
C	Étalon	etc.
D	Étalon	
E	Étalon	
F	Contrôle positif	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

- Préparer une dilution 1:21 (p. ex. 10 µl de sérum + 200 µl de diluant d'échantillon) de contrôle négatif, d'étalon, de contrôle positif et de sérum de chaque patient.
- Dans les puits individuels, ajouter 100 µl de contrôle, d'étalon et d'échantillon de patient (solutions diluées). S'assurer que les échantillons sont correctement mélangés. Utiliser un embout de pipette différent pour chaque échantillon.
- Ajouter 100 µl de diluant d'échantillon dans les puits A1 comme blanc réactif. Vérifier les exigences de logiciel et de lecteur pour connaître les configurations appropriées de puits de blanc réactif.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
- Laver les bandes de micropuits 5 fois.
 - Procédure de lavage manuel :**
 - Secouer vigoureusement pour faire sortir le liquide des puits.
 - Remplir chaque micropuits de tampon de lavage. S'assurer qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée dans les puits.
 - Répéter les étapes 1 et 2 jusqu'à un total de 5 lavages.
 - Secouer vigoureusement pour faire sortir la solution de lavage de tous les puits. Inverser la plaque sur une serviette en papier et donner des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits. Inspecter visuellement la plaque pour s'assurer qu'il ne reste aucun résidu de solution de lavage. Récupérer la solution de lavage dans un bassin jetable et traiter avec un désinfectant à la fin des procédures de la journée.
 - Procédure de lavage automatisé :**

Si un système automatisé de lavage de micropuits est utilisé, régler le volume distribué à 300 – 350 µl par puits. Programmer un cycle de 5 lavages sans délai entre les lavages. Si nécessaire, la plaque de micropuits peut être retirée de l'appareil de lavage, puis inversée sur une serviette en papier et recevoir des coups fermes pour faire sortir les résidus de solution de lavage dans les puits.
- Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits, y compris dans les puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 25 ± 5 minutes.
- Laver les micropuits conformément à la procédure décrite dans l'étape 7.
- Ajouter 100 µl de TMB dans chaque puits, y compris dans les puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons.
- Incuber la plaque à température ambiante (20 – 25 °C) pendant 10 ± 15 minutes.
- Arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de solution d'arrêt dans chaque puits, y compris dans les puits de blanc réactif, à la même vitesse et dans le même ordre que les échantillons. Les échantillons positifs passeront du bleu au jaune. Après avoir ajouté la solution d'arrêt, taper plusieurs fois sur la plaque pour que les échantillons soient bien mélangés.
- Programmer le lecteur de micropuits pour lire avec une longueur d'onde de 450 nm et mesurer la densité optique de chaque puits par rapport au blanc réactif. Lire les résultats de la plaque moins de 30 minutes après avoir ajouté la solution d'arrêt.

RÉSUMÉ DE LA PROCÉDURE D'ANALYSE

- Diluer le sérum 1:21.
- Ajouter l'échantillon dilué dans les micropuits à raison de 100 µl/puits.
- Incuber 25 ± 5 minutes.
- Laver.
- Ajouter le conjugué – 100 µl/puits.
- Incuber 25 ± 5 minutes.
- Laver.
- Ajouter le TMB – 100 µl/puits.
- Incuber 10 - 15 minutes.
- Ajouter la solution d'arrêt, 50 µl/puits – Mélanger.
- LIRE les résultats dans les 30 minutes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Chaque fois qu'une analyse est exécutée, l'étalon doit être exécuté en trois exemplaires. Un blanc réactif, un contrôle négatif et un contrôle positif doivent également être inclus.
- Calculer la moyenne des trois puits d'étalon. Si une des trois valeurs est à plus de 15 % de la moyenne, éliminer cette valeur et recalculer la moyenne avec les deux puits restants.
- Les valeurs de densité optique (DO) moyenne de l'étalon, du contrôle positif et du contrôle négatif devraient se situer dans les plages suivantes :

	Plage DO
Contrôle négatif	≤0,250
Étalon	≥0,300
Contrôle positif	≥0,500

- La DO du contrôle négatif divisée par la DO moyenne de l'étalon devrait être ≤0,9.
 - La DO du contrôle positif divisée par la DO moyenne de l'étalon devrait être ≥1,25.
 - Si les conditions ci-dessus ne sont pas satisfaites, le test est invalide et doit être répété.
- Le contrôle positif et le contrôle négatif servent à détecter une anomalie de réactif substantielle, mais ne garantissent pas la précision à la fin de l'analyse.
 - Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux réglementations gouvernementales en vigueur et aux normes des organisations d'accréditation compétentes.

6. Le document C24 du CLSI intitulé « *Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures* » contient des informations supplémentaires sur les procédures appropriées de contrôle de qualité.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. Calculs :

- Facteur de correction :** Le fabricant a déterminé une valeur seuil de densité optique pour les échantillons positifs et l'a corrélée à l'étalon. Le facteur de correction (FC) permet de déterminer la valeur seuil des échantillons positifs. Il permet également de compenser les légères variations de résultats d'un jour à l'autre. Le facteur de correction est déterminé pour chaque lot de composants et est imprimé sur l'étiquette de composants située du la boîte du système de test.
- Valeur seuil de densité optique :** Pour obtenir la valeur seuil de densité optique, multiplier le FC par la DO moyenne de l'étalon, déterminée ci-dessus.
($FC \times DO \text{ moyenne de l'étalon} = \text{Valeur seuil de DO}$)
- Rapports valeur d'indice/DO :** Calculer le rapport valeur d'indice/DO de chaque échantillon en divisant sa valeur de DO par la valeur seuil de DO de l'étape b.

Exemple :	DO moyenne de l'étalon	=	0,793
	Facteur de correction (FC)	=	0,25
	Valeur seuil de DO	=	$0,793 \times 0,25 = 0,198$
	DO inconnue de l'échantillon	=	0,432
	Rapports valeur d'indice/DO de l'échantillon	=	$0,432/0,198 = 2,18$

2. **Interprétations :** Les rapports valeur d'indice/DO sont interprétés de la manière suivante.

	Rapport valeur d'indice/DO
Échantillons négatifs	$\leq 0,90$
Échantillons ambivalents	0,91 à 1,09
Échantillons positifs	$\geq 1,10$

- Un rapport de DO égal ou inférieur à 0,90 signifie qu'il n'a pas été possible de détecter une quantité significative d'anticorps IgM dirigés contre *Mycoplasma pneumoniae*. Un résultat négatif signifie une absence d'infection actuelle ou passée.
- Un rapport DO égal ou supérieur à 1,10 signifie que des anticorps IgM spécifiques à *Mycoplasma pneumoniae* ont été détectés. Un résultat positif signifie une infection récente ou passée.
- Refaire deux fois le test sur les échantillons lorsque les rapports de DO sont dans la zone d'ambivalence (0,91 – 1,09). Le résultat final sera obtenu dès que deux mesures concordantes seront observées. Évaluer répétitivement les échantillons ambivalents avec une autre méthode sérologique et/ou reprendre l'évaluation en prélevant d'autres échantillons une à trois semaines plus tard.

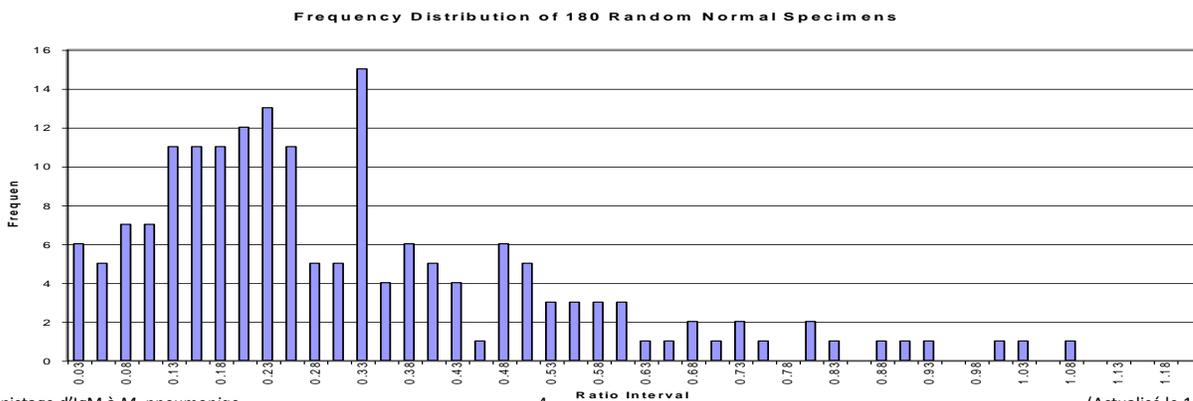
Remarque : L'amplitude des mesures au-dessus de la valeur de seuil n'est pas indicative de la quantité totale d'anticorps présents et ne peut pas être liée aux titres par immunofluorescence indirecte.

LIMITES DE L'ESSAI

- Aucun diagnostic ne doit être rendu sur la base des seuls résultats du test ZEUS ELISA IgM à *M. pneumoniae*. Interpréter les résultats de test conjointement avec l'évaluation clinique et avec les résultats d'autres procédures de diagnostic.
- Si le test d'un échantillon intervient tôt dans la primo-infection, il est possible qu'aucun anticorps IgM ne soit détecté. Si une infection à *Mycoplasma* est suspectée, un second échantillon doit être prélevé au moins quatorze jours plus tard.
- Un résultat négatif n'exclut pas une infection courante due au *M. pneumoniae* car l'échantillon peut avoir été recueilli avant que des anticorps démontrables soit présent ou après que l'anticorps ait diminué au-dessous des niveaux détectables. Par conséquent, l'obtention de titres d'IgG élevées, en liaison avec l'IgM donné, augmente la spécificité du diagnostic sérologique.
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés, lipémiques, thermo-désactivés ou contenant des bactéries afin de ne pas risquer de fausser les résultats. Des résultats erronés pourraient survenir.
- Les caractéristiques de performance du test n'ont pas été définies par ZEUS Scientific pour d'autres matrices que du sérum.
- ZEUS Scientific n'a pas réalisé d'étude de réactivité croisée ni étudié les performances de cet essai avec certains types d'échantillons, notamment ceux connus pour être positifs aux anticorps d'organismes eux-mêmes connus pour être associés à la maladie des voies respiratoires inférieures (par ex. la grippe A et B, CMV, *C. pneumoniae*, parainfluenza), et étroitement liés aux sérotypes *Mycoplasma* connus pour provoquer une réaction croisée avec *M. pneumoniae*, tels que *M. genitalium* et *M. hominis*, ainsi que diverses espèces d'*Ureplasma*.
- Les résultats de culture de *Mycoplasma* ou la présence ou l'absence d'anticorps ne peuvent pas être utilisés pour déterminer le succès ou l'échec d'un traitement.
- Les résultats de tests pratiqués sur des échantillons provenant de patients immunodéprimés doivent être interprétés avec prudence.
- Ce test ne doit pas être utilisé comme procédure de dépistage dans une grande population. Le test doit uniquement être utilisé en cas de présence de symptômes cliniques ou si l'on soupçonne une exposition.
- Le système d'élimination des IgG inclus dans ce système de test a démontré pouvoir supprimer fonctionnellement des échantillons IgG dans les échantillons contenant des taux d'IgG total allant de 300 à 600 mg/ml. L'efficacité de ce système d'élimination des IgG à des niveaux supérieurs à 600 mg/ml n'a pas été établie.
- La présence d'anticorps IgM *Mycoplasma* est relativement faible. Les faibles taux de prévalence au niveau des analyses influenceront sur la valeur prédictive du test.

RÉSULTATS ATTENDUS

L'étude clinique de ce produit inclut 220 échantillons aléatoires qui ont été envoyés à un centre de référence dans le nord-est des États-Unis pour une analyse sérologique de *Mycoplasma* de routine. En ce qui concerne cette population, 201/220 (91,4 %) étaient négatifs, 3/220 (1,4 %) étaient ambivalents et 16/220 (7,3 %) ont été réactifs. En outre, une étude interne a été effectuée pour évaluer 180 sérums aléatoires de donneurs normaux. Une distribution de fréquence des résultats de cette étude est présentée ci-dessous.



CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Études comparatives

Une étude comparative a été réalisée pour démontrer l'équivalence du système de test ZEUS ELISA IgM Mycoplasma avec le système de test ZEUS IFA IgM Crowntitre®. La performance du test ZEUS ELISA IgM à *M. pneumoniae* a été évaluée dans le cadre d'une étude de 299 échantillons sur trois sites cliniques. Tous les sites cliniques ont comparé les performances du test ZEUS ELISA au test IFA. Le tableau 1 présente un résumé des analyses réalisées sur chaque site clinique. Le tableau 2 résume les résultats de cette étude comparative.

Tableau 1 : Résumé des analyses cliniques

Site	Lieu	Caractérisation des échantillons	n
Un	Hors site	Échantillons de routine ayant été envoyés à un laboratoire de référence dans le nord-est des États-Unis pour une analyse sérologique de Mycoplasma.	111
Un	Hors site	Échantillons envoyés à un hôpital du centre-ouest pour une analyse sérologique de Mycoplasma.	9
Deux	Hors site	Échantillons de routine ayant été envoyés à un laboratoire de référence dans le nord-est des États-Unis pour une analyse sérologique de Mycoplasma.	100
Deux	Hors site	Échantillons de réserve ayant déjà été testés pour IgM à Mycoplasma et s'étant avérés réactifs.	2
Trois	En interne	Sérum jumelés avec divers stades de maladie provenant de patients diagnostiqués d'une infection de Mycoplasma.	62
Trois	En interne	Échantillons avec divers stades de maladie provenant de patients ayant une infection de Mycoplasma confirmée.	15

Tableau 2 : Site 1 – Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de concordance

		Système de test ZEUS ELISA IgM à <i>M. pneumoniae</i>			
		Négatif	Ambivalent	Positif	Total
Test ZEUS IFA	<1:16	102	1	0	103
	1:16	8	0	0	8
	≥1:32	2	2	5	9
	Total	112	3	5	120

Sensibilité relative = 5/7 = 71,4 %

Spécificité relative = 102/102 = 100 %

Concordance relative = 107/109 = 98,2 %

* Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte.

Intervalle de confiance à 95 % = 29,0 % à 96,3 %

Intervalle de confiance à 95 % = 96,4 % à 100 %

Intervalle de confiance à 95 % = 93,5 % à 99,8 %

Tableau 3 : Site 2 – Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de concordance

		Système de test ZEUS ELISA IgM à <i>M. pneumoniae</i>			
		Négatif	Ambivalent	Positif	Total
Test ZEUS IFA	<1:16	89	0	7	96
	1:16	0	0	0	0
	≥1:32	0	0	6	6
	Total	89	0	13	102

Sensibilité relative = 6/6 = 100%

Spécificité relative = 89/96 = 92,7 %

Concordance relative = 95/102 = 93,1 %

* Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte.

Intervalle de confiance à 95 % = 54,1 % à 100 %

Intervalle de confiance à 95 % = 85,6 % à 97,0 %

Intervalle de confiance à 95 % = 86,4 % à 97,2 %

Tableau 4 : Site 3 – Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de concordance

		Système de test ZEUS ELISA IgM à <i>M. pneumoniae</i>			
		Négatif	Ambivalent	Positif	Total
Test ZEUS IFA	<1:16	27	1	10	38
	1:16	0	0	5	5
	≥1:32	3	1	30	34
	Total	30	2	45	77

Sensibilité relative = 30/33 = 90,9 %

Spécificité relative = 27/37 = 73,0 %

Concordance relative = 57/70 = 81,4 %

* Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés par la méthode exacte.

Intervalle de confiance à 95 % = 75,7 % à 98,1 %

Intervalle de confiance à 95 % = 55,9 % à 86,2 %

Intervalle de confiance à 95 % = 70,3 % à 89,7 %

Tableau 5 : Tous les sites combinés – Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de concordance

		Système de test ZEUS ELISA IgM à <i>M. pneumoniae</i>			
		Négatif	Ambivalent	Positif	Total
Test ZEUS IFA	<1:16	218	2	17	237
	1:16	8	0	5	13
	≥1:32	5	3	41	49
	Total	231	5	63	299

Sensibilité relative = 41/46 = 89,1 % Intervalle de confiance à 95 %* = 76,4 % à 96,4 %

Spécificité relative = 218/235 = 92,8 % Intervalle de confiance à 95 %* = 88,7 % à 95,7 % *Intervalles de confiance à 95,7% calculés selon la méthode exacte.

Concordance relative = 259/281 = 92,2 % Intervalle de confiance à 95 %* = 88,4 % à 95,0 %

REMARQUE : Le terme « relatif » désigne la comparaison des résultats de ce test à ceux d'un test similaire. Aucune tentative de corrélation des résultats du test à la présence ou l'absence de la maladie n'a eu lieu. Aucun jugement ne peut être fondé sur la précision comparative du test pour prédire la maladie.

2. Précision et reproductibilité :

Des études de reproductibilité ont été menées dans les deux centres cliniques à partir des huit mêmes échantillons : deux relativement fortement positifs, deux près de la valeur seuil et deux nettement négatifs. En outre, le contrôle négatif et le contrôle positif haut du système ont été inclus. Lors de chaque jour de test, les huit échantillons ont été testés en trois exemplaires. Les sites cliniques ont mené l'étude de reproductibilité pour une période de trois jours. La

reproductibilité à été évaluée conformément aux directives du document de la FDA intitulé Review Criteria for In Vitro Diagnostic Devices for Detection of IgM Antibodies to Viral Antigens. Un résumé de cette étude apparaît dans les tableaux 6 et 7 ci-dessous.

Tableau 6 : Résumé des analyses de précision intra-essai sur les sites cliniques 1 et 2

Échant.	Résultats du site 1						Résultats du site 2					
	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 1		Jour 2		Jour 3	
	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV
1	2.53	9.7	2.70	8.2	2.95	8.0	2.05	38.0	2.73	15.7	2.46	11.2
2	1.14	13.8	1.09	9.1	1.35	18.5	1.13	7.1	1.25	6.3	1.29	12.9
3	2.42	11.9	2.37	1.3	2.29	6.0	2.49	7.5	3.07	19.5	2.52	4.1
4	1.10	10.6	1.09	5.9	1.04	6.1	0.97	7.5	1.36	21.0	1.13	9.2
5	0.18	23.6	0.18	9.3	0.12	15.7	0.17	15.6	0.13	50.0	0.19	8.2
6	0.20	23.1	0.24	5.2	0.17	8.5	0.16	16.1	0.18	14.7	0.23	13.5
CN	0.07	28.5	0.09	15.4	0.09	55.9	0.11	32.8	0.09	22.3	0.11	18.2
CP	3.25	3.9	3.05	4.4	3.23	5.9	2.98	3.5	3.49	6.2	3.68	7.3

Tableau 7 : Résumé des analyses de précision inter-essai sur les sites cliniques 1 et 2

Échant.	Résultats sur 3 jours du site 1		Résultats sur 3 jours du site 2	
	Rapport moyen	% CV	Rapport moyen	% CV
1	2.73	10.0	2.41	22.9
2	1.19	16.6	1.22	10.3
3	2.36	7.2	2.69	15.8
4	1.08	7.3	1.15	20.0
5	0.16	25.2	0.16	27.7
6	0.20	18.9	0.19	20.8
CN	0.09	36.2	0.10	23.5
CP	3.18	5.1	3.38	10.6

REMARQUE : Les résultats de reproductibilité décrits ci-dessus représentent seulement un exemple des résultats obtenus lors de l'étude clinique, dans des conditions ambiantes, techniques et matérielles idéales. La reproductibilité doit être évaluée pour chaque laboratoire et peut varier en fonction des conditions présentes.

RÉFÉRENCES

1. Tazoua CU, and Murray HW: "Atypical pneumonias". In: Respiratory Infections: diagnosis and Management. Pennington JE, ed. Raven Press, New York, NY, pp. 251, 1983.
2. Chanock RM, Fox HH, James WD, Gutekunst RR, White RT, Seterfit LB: Epidemiology of M.P. infection in military recruits. Ann. NY Acad. Sci. 143:484-496, 1967.
3. Lind K, Bentzon MW: Epidemics of *M. pneumoniae* infection in Denmark from 1958 - 1974. Tnt. J. Epidemiol. 5:267-277, 1976.
4. Noah ND: *M. pneumoniae* infection in the United Kingdom. British Med. J. 2:544-546, 1974.
5. Foy HM, Kenny GE, Cooney MK, Allan ID: Long-term epidemiology of infections with *M. pneumoniae*. J. Infect. Dis. 139:681-687, 1979.
6. Murray HW, Masur H, Seterfit LB, and Roberts LB: The protean manifestation of *M. pneumoniae* infections in adults. Am. J. Med. 58:229-242, 1975.
7. Cassell GH, and Cole BC: Mycoplasmas as agents of human disease. N. Engl. J. Med. 304:80, 1981.
8. Noriega ER, Simberkoff MS, Gilroy SJ, et al: Life threatening *M. pneumoniae*. JAMA 29:1471-1472, 1974.
9. Carter JB, and Carter SC: Acute-phase, Indirect Fluorescent antibody Procedure for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Ann. Clin. Lab. Sci. 13, No. 2, 150-155, 1983.
10. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
11. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
12. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
13. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA et SAve Diluent[®] sont des marques de commerce de ZEUS Scientific, Inc.

Si vous désirez une assistance clientèle aux États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local.
 Si vous avez besoin d'assistance technique aux États-Unis, veuillez contacter ZEUS Scientific au numéro de téléphone gratuit indiqué ou par courriel à support@zeusscientific.com.
 Les clients ayant besoin d'assistance commerciale ou technique hors des États-Unis doivent contacter leur distributeur régional.
 © 2017 ZEUS Scientific, Inc. Tous droits réservés.

