

UTILISATION PRÉVUE

Le système ZEUS ELISA de dépistage d'IgG à *Mycoplasma pneumoniae* est un test conçu pour la détection qualitative des anticorps IgG anti-*Mycoplasma pneumoniae* dans le sérum humain. Le test permet la détermination du statut sérologique du patient, ou le diagnostic des maladies associées au *Mycoplasma pneumoniae*. Le potentiel de réactivité croisée avec *M. genitalium* n'a pas été évalué, pas plus que des études réalisées sur de très jeunes et/ou des patients âgés.

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 IgG à *Mycoplasma pneumoniae* a été conçu pour la détection d'anticorps de classe IgG 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. Les échantillons de sérum sanguin du test (correctement dilués) sont incubés dans des micropuits enduits d'antigène. Tout anticorps spécifique de l'antigène se trouvant dans le sang s'accrochera à l'antigène immobilisé. La plaque est lavée de façon à enlever les anticorps non fixés et les autres composants sériques.
2. Des anticorps IgG 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 IgG immobilisés sur la phase solide de l'étape 1. Les puits sont lavés pour enlever le conjugué n'ayant pas réagi.
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'azote de sodium comme agent de conservation sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau) : contrôles, étalon et SAVE Diluent®.**

PLATE		1.	Plaque : 96 puits configurés en douze bandes de 8 puits, enduits 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'immunoglobulines de chèvre anti-IgG humaines conjuguée à de la peroxydase du raifort (spécifique à la chaîne FC). 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.	SAVE Diluent® : Un flacon de 30 ml à bouchon vert contenant du Tween-20, de l'albumine de sérum bovin et tampon phosphate salin. Prêt à l'emploi. REMARQUE : La solution SAVE Diluent® change de couleur lorsqu'elle est combinée à du sérum.
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. La solution SAVE Diluent® peut être interchangeée dans n'importe quel système de test ZEUS ELISA avec le produit n° 005CC.
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

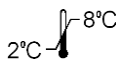
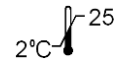
applicables aux échantillons de sang et aux sérums humains potentiellement infectieux dans le manuel des centres américains de contrôle des maladies intitulé « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (dernière édition) et conformément aux normes de l'OSHA concernant les agents pathogènes sanguins (14).

5. 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.
6. 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.
7. La solution SAvE Diluent®, les solutions de contrôle et la solution étalon contiennent de l'azoture de sodium sous une concentration inférieure à 0,1 % (volume d'eau). Il a été signalé que l'azoture de sodium pouvait former des accumulations de plomb ou d'azoture 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'azoture de sodium.
8. 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.
9. La solution TMB est nocive. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
10. Le tampon de lavage concentré est IRRITANT. Ce produit peut irriter les yeux, le système respiratoire et la peau.
11. 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.
12. La dilution et l'adultération de ces réactifs peuvent produire des résultats erronés.
13. Ne pas utiliser les réactifs d'autres vendeurs ou fabricants.
14. 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.
15. Ne jamais pipeter à la bouche. Éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec des réactifs ou des échantillons humains.
16. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Des résultats incorrects pourraient survenir.
17. Toute contamination des réactifs ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
18. Les récipients en verre réutilisables doivent être lavés et abondamment rincés de façon à enlever tout résidu de détergent.
19. Éviter les éclaboussures et la génération d'aérosols.
20. Ne pas exposer les réactifs à une lumière puissante durant leur stockage ou durant une incubation.
21. 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.
22. 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.
23. Mise en garde : Avant d'ajouter une solution de javel, neutraliser les résidus liquides jusqu'à l'obtention d'un pH acide.
24. Ne jamais utiliser une plaque ELISA dont la bande indicatrice du sachet de déshydratant est passée du bleu au rose.
25. Ne pas laisser le conjugué entrer en contact avec des récipients ou des instruments pouvant avoir précédemment contenu une solution utilisant de l'azoture de sodium comme agent de conservation. Des quantités résiduelles d'azoture de sodium peuvent détruire l'activité enzymatique du conjugué.
26. 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

1. 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.**
2. Pipettes pouvant mesurer avec précision des quantités de 10 – 200 µl.
3. Pipette à canaux multiples pouvant mesurer avec précision des quantités de 50 – 200 µl.
4. Réservoirs de réactif pour pipettes à canaux multiples.
5. Flacon de lavage ou système de lavage de micropuits.
6. Eau distillée ou déionisée.
7. Cylindre gradué d'un litre.
8. Pipettes sérologiques.
9. Embouts de pipettes jetables.
10. Serviettes en papier.
11. Minuterie de laboratoire pour mesurer les étapes d'incubation.
12. 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, solution SAvE Diluent®
	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

1. 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).
2. 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.
3. 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.
4. 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 (15).

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 SAVE Diluent®) de contrôle négatif, d'étalon, de contrôle positif et de sérum de chaque patient.
REMARQUE : La solution SAVE Diluent® changera de couleur pour confirmer que l'échantillon a été combiné avec le diluant.
- 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 solution SAVE Diluent® dans le 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 x.
 - 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 le 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 le 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 le 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.

5. 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 :**
- a. *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.
 - b. *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 x DO moyenne de l’étalon = Valeur seuil de DO)
 - c. *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 x 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	≤0.90
Échantillons ambivalents	0,91 à 1,09
Échantillons positifs	≥1.10

- a. 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 IgG dirigés contre *Mycoplasma pneumoniae*. Un résultat négatif signifie une absence d’infection actuelle ou passée.
- b. Un rapport DO égal ou supérieur à 1,10 signifie que des anticorps IgG spécifiques à *Mycoplasma pneumoniae* ont été détectés. Un résultat positif signifie une infection récente ou passée.
- c. 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.

LIMITES DE L’ESSAI

- 1. Un diagnostic ne devrait pas être fait sur la base des résultats anti-Mycoplasma seulement. Les résultats des tests anti-Mycoplasma doivent être interprétés en conjonction avec l’évaluation clinique et les résultats des autres procédures de diagnostic.
- 2. Si le test d’un échantillon intervient tôt dans la primo-infection, il est possible qu’aucun anticorps IgG ne soit détecté. Si une infection à Mycoplasma est suspectée, un second échantillon doit être prélevé au moins quatorze jours plus tard.
- 3. 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.
- 4. Les caractéristiques de performance du test n’ont pas été définies pour d’autres matrices que du sérum.
- 5. Un résultat positif unique indique seulement une exposition immunologique passée. Le niveau ou le type de réponse immunitaire peuvent aussi bien être nécessaire pour déterminer si une infection est active ou au stade de la maladie.
- 6. Des résultats négatifs n’excluent pas le diagnostic de la maladie associée à *M. pneumoniae*. L’échantillon peut avoir été prélevé avant l’apparition d’anticorps détectables. Un résultat négatif pour un patient avec une suspicion d’infection doit être représenté 4 à 6 semaines après.
- 7. La présence ou l’absence continue d’anticorps ne peut pas être utilisée pour déterminer la réussite ou l’échec d’un traitement.
- 8. Ce test ne doit pas être utilisé comme procédure de dépistage dans une grande population. La valeur prédictive d’un résultat sérologique positif ou négatif dépend de la probabilité de la présence de *M. pneumoniae*. L’essai doit être effectué seulement lorsque les caractéristiques cliniques d’une maladie associée à *M. pneumoniae* son présentes.
- 9. Les performances de ce test n’ont pas été établies sur les nouveau-nés et les patients immunodéprimés.

RÉSULTATS ATTENDUS

Les infections symptomatiques attribuables à cet pathogène surviennent le plus souvent chez les enfants et les jeunes adultes (âgés de 2-19 ans) (12). Un rapport a démontré que 97-98 % des sérums d’une population adulte en bonne santé ont été non réactifs pour les anticorps *M. pneumoniae* par techniques CF et IFA (13). Chaque laboratoire doit établir ses propres résultats attendus en fonction du type de population généralement évaluée. L’étude clinique de ce produit inclut 205 échantillons aléatoires qui ont été envoyés à un centre de référence dans le nord-est des États-Unis pour une analyse sérologique de Microplasma de routine. En ce qui concerne cette population, 92/205 (45 %) étaient négatifs, 21/205 (10 %) étaient ambivalents et 92/205 (45 %) ont été réactifs.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. **Études comparatives**
- Une étude comparative a été réalisée pour démontrer l’équivalence du système de test ZEUS ELISA IgG Mycoplasma avec le système de test ZEUS IFA IgG Crowntitre®. La performance du test ZEUS ELISA IgG Mycoplasma a été évaluée dans le cadre d’une étude sur deux sites cliniques. Un total de 194 échantillons ont été testés, 109 sur le site 1 et 85 sur le site 2. La plupart des échantillons (192/194) ont été obtenus d’un laboratoire de référence dans le nord-est des États-Unis. Ces échantillons ont été envoyés au laboratoire pour une analyse de routine du Mycoplasma sérologique. Les deux autres spécimens étaient des échantillons de référence, précédemment testé pour l’anticorps IgG à Mycoplasma et ont été jugés positifs. Tous les échantillons ont été congelés et conservés comme indiqués dans le paragraphe « Prélèvement des échantillons » de cette notice. Les échantillons ont été analysés avec le test ZEUS ELISA IgG Mycoplasma sur les sites cliniques, puis en interne par immunofluorescence. Le tableau 1 résume les résultats de cette étude comparative. Ces résultats représentent ceux d’échantillons uniques de patients et ne proviennent pas de prélèvements multiples d’un même patient.

Tableau 1 : Calculs de sensibilité relative, de spécificité et de concordance

		Résultats du système de test ZEUS IFA			
		≥1:64 Positif	<1:32 Négatif	1:32 Ambivalent	Total
Résultats du test ZEUS ELISA IgG à <i>M. pneumoniae</i>	Positif	69	12	17	98
	Négatif	4	84	0	88
	Ambivalent	2	6	0	8
	Total	75	102	17	194

Sensitivité relative = 69/73 = 94,5 % (intervalle de confiance à 95 %* = 89,3 % à 99,7 %)

Spécificité relative = 84/96 = 87,5 % (intervalle de confiance à 95 %* = 80,9 % à 94,1 %)

Concordance relative = 153/169 = 90,5 % (intervalle de confiance à 95 %* = 86,1 % à 94,9 %)

*Intervalles de confiance à 95% calculés selon la méthode exacte.

En plus de l'étude des deux sites cliniques décrite ci-dessus, le test ZEUS ELISA IgG Mycoplasma a été utilisé pour évaluer 35 paires d'échantillons provenant de patients en phase aiguë d'infection et en convalescence ayant été précédemment caractérisés par la fixation du complément (FC). Sur les 35 paires, 29 ont démontré une augmentation de quatre fois ou plus du titre final pour la FC. Sur les 29 paires, 16 paires ont été négatifs en ELISA pour la phase aiguë et positive pour la phase de convalescence ; 8 paires se sont révélées positives à la fois pour la phase aiguë et de convalescence, et 5 paires étaient négatives à la fois en phase aiguë et de convalescence. **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 :

La reproductibilité est mesurée suivant le protocole EP5-T2 : Evaluation of precision Performance of Clinical Chemistry Devices - Second Edition (Évaluation de la précision du rendement des appareils de chimie clinique - dernière édition), tel que publié par le National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Vilanova, PA. Des études de reproductibilité ont été menées sur les deux sites cliniques avec les mêmes échantillons. En résumé, six échantillons ont été testés, deux échantillons fortement positifs, deux échantillons près de la valeur seuil de densité optique et deux échantillons clairement négatifs. En outre, le contrôle positif et le contrôle négatif du système de test se trouvaient inclus à titre de précision, pour un total de huit échantillons. Lors de chaque jour de test, les huit échantillons ont été testés en deux exemplaires. De plus, lors de chaque jour de test, l'analyse a été exécutée deux fois, une fois le matin et une fois l'après-midi, pour un total de quatre exemplaires quotidiens de chaque échantillon. Les sites cliniques ont réalisé cette étude de reproductibilité pendant vingt jours, pour un total de 80 observations pour chacun des huit membres du panel. Un résumé de cette étude apparaît dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Résumé des analyses de précision sur les sites cliniques 1 et 2

Échantillon	Site	Rapport moyen	Résultat	SWR*	ET**	Jours	Observations totales	% CV global
M-1	1	6,056	Positif	0,682	1,016	20	80	16,75
	2	6,124		0,349	0,683	20	80	11,15
M-2	1	3,084	Positif	0,220	0,449	20	80	14,55
	2	3,295		0,185	0,397	20	80	12,04
M-3	1	1,089	Près de valeur seuil	0,117	0,127	20	80	11,68
	2	0,896		0,087	0,124	20	80	13,83
M-4	1	0,881	Près de valeur seuil	0,056	0,073	20	80	8,32
	2	0,611		0,056	0,094	20	80	15,30
M-5	1	0,475	Négatif	0,024	0,076	20	80	16,03
	2	0,093		0,045	0,077	20	80	83,35
M-6	1	0,443	Négatif	0,026	0,072	20	80	16,24
	2	0,049		0,051	0,067	20	80	137,6
Contrôle positif	1	3,611	Positif	0,210	0,275	20	80	7,61
	2	3,680		0,257	0,311	20	80	8,44
Contrôle négatif	1	0,415	Négatif	0,013	0,068	20	80	16,42
	2	0,111		0,062	0,119	20	80	107,6

*Estimation ponctuelle de l'écart-type de précision intra-essai.

**Estimation ponctuelle de l'écart-type de précision totale.

REMARQUE : Les résultats de reproductibilité décrits dans le tableau 2 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. Tuazon 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: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
11. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18, Approved Guideline.
12. Smith T: *Mycoplasma pneumoniae* Infections: Diagnosis based on Immunofluorescence titer of IgG and IgM antibodies. Mayo Clin Proc 61:831, 1986.
13. Lee SH, et al: Comparative studies of three serologic methods for the measurement of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. Am J Clin Pathol, Vol. 92, No. 3, 1989.
14. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
15. 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
 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

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 Tous droits réservés.



EMERGO EUROPE
 Westervoortsedijk 60
 6827 AT Arnhem
 The Netherlands