

Sérologie des Mycoplasmes urogénitaux

MYCOKIT SERO

REF : PL10011 : 6 tests



Dosage des anticorps anti-Mycoplasmes urogénitaux par inhibition métabolique

Légende des Symboles utilisés :

-20°C



-Conserver à une température ≤ -20°C

-Date d'expiration

REF -Référence

LOT

-Lot

IVD -Pour diagnostic in vitro



-Attention, voir les instructions d'utilisation, souches infectieuses

I - INTRODUCTION

Les Mycoplasmes sont des bactéries gram-négatif sans parois. Cette caractéristique a permis de les ranger dans la classe particulière des Mollicutes. Les Mycoplasmes sont les plus petits procaryotes capables de se répliquer en dehors d'un système cellulaire. Ils ont un diamètre de l'ordre de 300 nm.

Deux espèces de mycoplasmes sont le plus souvent responsables d'infections génito-urinaires : *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*.

Les infections à mycoplasmes uro-génitaux sont reconnues maintenant comme l'une des principales causes de maladies sexuellement transmissibles. On retrouve les Mycoplasmes uro-génitaux comme agent étiologique dans les pathologies suivantes:

	U. urealyticum	M. hominis
Urétrites non gonococciques	+	-
Prostatites, epididymites	+	-
Troubles de la reproduction	+	-
Vaginites	-	+
Salpingites	-	+
Fièvres post-partum	-	+
Prématurité	+	-

La sérologie des mycoplasmes uro-génitaux est une méthode particulièrement intéressante pour distinguer les atteintes uro-génitales hautes (salpingites, prostatites, pyelonephrites, endométrites, fièvres post-abortive / post-partum) des infections basses (avec présence de mycoplasmes dans les prélèvements et une sérologie négative).

2 - PRINCIPE DE LA METHODE

Les anticorps sériques anti-*Ureaplasma urealyticum* ou anti-*Mycoplasma hominis* bloquent *in vitro* le processus de dégradation de l'urée ou de l'arginine.

Cette technique permet donc la mise en évidence et le dosage semi-quantitatif des anticorps anti-mycoplasme par inhibition métabolique.

3 - DESCRIPTION DU REACTIF

- R1. 1 Microplaque sécable coatée avec les milieux urée et arginine (pour 6 tests)

- R2. 1 support pour barrettes

- R4. 1 flacon de souche lyophilisée d'*U. urealyticum*

- R4. 1 flacon de souche lyophilisée de *M. hominis*

- R5. 1 flacon d'eau (8 ml)

- R6. 1 flacon de milieu à l'urée (6 ml)

- R7. 1 flacon de milieu à l'arginine (6 ml)

- 6 feuilles adhésives

- 1 notice technique



4 - CONSERVATION DES REACTIFS



-20°C

4.1- Pour garder son activité jusqu'à la date d'expiration, le kit doit à réception, être conservé congelé à une température ≤ -20 °C.

4.2- Pour assurer la conservation de la qualité des milieux d'identification R6 et R7, il faut éviter leur congélation-décongélation plus de 2 fois, et les prélever stérilement dans le flacon d'origine.

4.3- Lorsque le kit est rapidement consommé, il peut être conservé pendant 3 mois entre 2°C et 8 °C. Dans le cas contraire, il est conseillé d'aliqoter stérilement les milieux R6 et R7 dans des contenants stériles pour être conservés à une température ≤ -20 °C.

4.4- Prélever les barrettes à utiliser et replacer immédiatement les barrettes restantes dans le sachet avec le dessiccant, fermer le sachet et le ranger pour conservation.

4.5- Les **lyophilisats reconstitués R3 et R4** doivent être stockés congelés à une température ≤ -20°C, pendant six mois maximum, en aliquotes de 100 µl.

5 - MATERIELS NECESSAIRES, NON FOURNIS

5.1- Sérums à tester décomplémentés.

5.2- Tubes propres de 1,5 ou 5 ml. Pour l'aliqutage des lyophilisats, préférer des tubes en polypropylène à fermeture hermétique.

5.3- Tubes stériles pour aliqoter les milieux d'identification R6 et R7.

5.4- Pipettes stériles pour prélever les milieux d'identification.

5.5- Micropipettes pouvant distribuer 5 à 1000 µl.

5.6- Embouts pour micropipettes, des propres et des stériles pour prélever les milieux d'identification.

5.7- Huile de paraffine.

5.8- Incubateur pouvant maintenir une température de 36 +/- 1°C

5.9- Agitateur de type « vortex ».

5.10- Hypochlorite de sodium pour la décontamination.

L'huile de paraffine doit être validée avant utilisation

6 - PRECAUTIONS ET RESTRICTION D'USAGE

Il est recommandé de manipuler les réactifs et les échantillons analysés conformément aux bonnes pratiques de travail en laboratoire. Le matériel à usage unique utilisé et les réactifs périmés doivent être détruits selon la réglementation en vigueur.

Pour assurer leur conservation, **les milieux d'identification** doivent être **prélevés stérilement** dans le flacon d'origine.



- Le réactif est destiné uniquement au diagnostic *in vitro*. Il est réservé exclusivement à un usage professionnel.



- Ne pas utiliser le réactif au-delà de la date d'expiration.



- **ATTENTION** : ce kit contient des souches bactériennes vivantes lyophilisées.

CONSIGNES DE SECURITE

- Les éclaboussures de réactifs contenant des Mycoplasmes doivent être éliminées immédiatement à l'aide d'un papier absorbant et la surface contaminée doit être nettoyée avec par exemple de l'hypochlorite de sodium à 1% avant de continuer. L'hypochlorite de sodium ne doit pas être utilisé pour nettoyer des éclaboussures contenant de l'acide. Le matériel utilisé pour le nettoyage des éclaboussures doit être éliminé comme s'il s'agissait de déchets biologiques infectieux.

- Les acides neutralisés et autres déchets liquides doivent être décontaminés en ajoutant un volume suffisant d'hypochlorite de sodium pour obtenir une concentration finale d'au moins 1 %. Une exposition de 30 minutes à l'hypochlorite de sodium à 1 % peut être nécessaire afin d'assurer une décontamination efficace.

- Ne pas stériliser à l'autoclave le matériel contenant de l'hypochlorite de sodium.

7 - PRELEVEMENTS, TRANSPORT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

7.1- Prélèvements

Utiliser des échantillons de sérums, pour cela laisser le sang prélevé par ponction veineuse coaguler naturellement. Lorsque les échantillons de sérums sont complètement coagulés, éliminer toute particule en suspension par centrifugation. Transférer le sérum dans un tube propre.

7.2- Conservation des prélèvements

Si le test ne peut avoir lieu immédiatement, conserver les sérums entre 2 et 8 °C. Ainsi, ils sont stables 7 jours. Pour une conservation plus longue, il est conseillé de placer les prélèvements à une température ≤ -20°C, éviter les cycles de congélation-décongélation répétés.

Pour l'optimisation des résultats, les échantillons de sérum à tester doivent être décomplémentés avant toute prise d'essai (Chauffage 56°C pendant 30 minutes).

8 - PROTOCOLE D'UTILISATION

Lire attentivement les précautions et restrictions d'usage avant d'effectuer l'analyse

Amener l'ensemble des réactifs à température ambiante (18°C à 30°C) avant utilisation.

Attention : le lyophilisat reconstitué ne sera décongelé que lorsque les autres réactifs seront équilibrés en température.

8.1- Placer le nombre de barrettes nécessaires sur le cadre R2 (1 barrette pour 1 test).

8.2- Reconstitution des lyophilisats R3 et R4 :

Ajouter 0.6 ml d'eau (R5) dans chacun des flacons R3 et R4. Laisser le lyophilisat se dissoudre (au moins 5 minutes, par exemple pendant l'étape 8.3). Homogénéiser les lyophilisats à la micropipette en aspirant-refoulant environ 7 fois et en laissant le liquide s'écouler sur le bord du flacon. 100 µl de chaque suspension de mycoplasmes reconstituée (R3 et R4) sont utilisés par test. Si la totalité de la plaque n'est pas utilisée en une fois, congeler à une température ≤ -20°C les suspensions reconstituées en aliquotes de 100 µl dans des tubes en polypropylène à fermeture hermétique. Après leur décongélation, les volumes des suspensions non utilisés sont jetés.

8.3- Distribuer dans chaque cupule de la plaque 50 µl d'eau (R5).

8.4- Préparer la dilution des suspensions de mycoplasmes selon le nombre de tests à réaliser (voir suggestion dans la table de dilution)

a- Préparer les volumes de R6 et R7 nécessaires.

b- Pour les suspensions reconstituées, congelées : homogénéiser la suspension en aspirant-refoulant environ 7 fois à la micropipette réglée entre 20 et 100 µl.

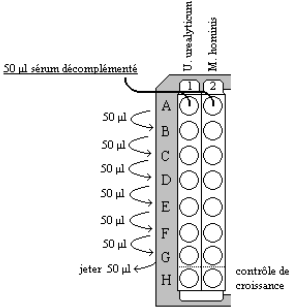
c- Diluer au 1/100ème la suspension R3 (dans le milieu à l'urée R6), et R4 (dans le milieu à l'arginine R7), puis homogénéiser les suspensions obtenues avec un agitateur de type « vortex » ou en aspirant-refoulant (7 fois) à la pipette.

Table de dilution

Nombre de tests	Volume de suspension 1/100ème nécessaire	Volume de Lyophilisat reconstitué	Volume Milieu R6 ou R7
1	0,5 ml	5 µl	0,495 ml
2	1,0 ml	10 µl	0,990 ml
3	1,5 ml	15 µl	1,485 ml
4	2,0 ml	20 µl	1,980 ml
5	2,5 ml	25 µl	2,475 ml
6	3,0 ml	30 µl	2,970 ml

8.5- Distribuer 50 µl de sérum décomplémenté à tester dans la première cupule de chaque rangée (dilution 1/2) puis diluer de 2 en

2 dans les cupules suivantes ; aspirer/refouler 5 à 7 fois par puits (voir figure ci-après).



Version 20/05/2011

Les cupules H sont utilisées comme témoin de culture.

8.6- Répartir 50 µl de suspension d'*U. urealyticum* 1/100^{ème} dans toutes les cupules de la première rangée, puis 50 µl de suspension de *M. hominis* 1/100^{ème} dans toutes les cupules de la seconde rangée.

8.7-Ajouter une goutte d'huile de paraffine dans chaque puits.

8.8- Recouvrir les barrettes avec une feuille adhésive.

8.9- Incuber les barrettes 48 à 72 heures à 36°C +/- 1 °C.

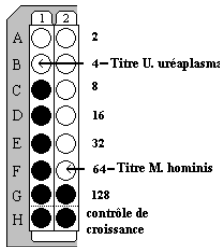
9 – RESULTATS

La présence d'anticorps anti-mycoplasme dans le sérum se traduit par une inhibition de la dégradation métabolique du substrat correspondant. Dans ces conditions, le milieu ne change pas de couleur, il reste jaune. L'absence d'anticorps se traduit par une croissance des mycoplasmes; le milieu vire au vert-bleu.

Le titre du sérum est exprimé en inverse de dilution. Il correspond à la dernière dilution pour laquelle le milieu n'a pas changé de couleur.

Un titre supérieur 8 doit être considéré comme POSITIF

Exemple de lecture.



Dans cet exemple :

- le titre en anticorps anti-*Ureaplasma urealyticum* est 4, il est négatif,
- le titre en anticorps anti-*Mycoplasma hominis* est 64, il est positif.