

FR

1. INTRODUCTION

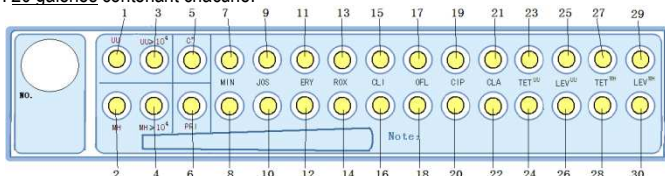
Mycoplasma est l'un des principaux genres bactériens provoquant les pathologies suivantes : urétrite non gonococcique, pathologies inflammatoires du col et du bassin, orchite, épithélium, etc., et qui peut entraîner une infertilité chez l'homme et chez la femme¹. Ces germes pathogènes peuvent attaquer et détruire les cellules épithéliales du tractus génito-urinaire, provoquer des infections au cours du SIDA et d'autres maladies sexuellement transmissibles. Les maladies sexuellement transmissibles cliniques peuvent être provoquées par *Mycoplasma* (principalement *Urea urealyticum* UU et *Mycoplasma hominis* MH). Leur fréquence est en augmentation. L'antibiorésistance est devenue de plus en plus alarmante suite à l'utilisation excessive d'antibiotiques, pouvant entraîner des risques graves pour la santé humaine². Le point le plus important pour le traitement et la prévention de la propagation de *Mycoplasma* est un diagnostic précoce et exact. La culture de *Mycoplasma* est toujours considérée comme une méthode fiable pour le diagnostic d'une infection par *Mycoplasma*.

2. PRINCIPE DU TEST

Le kit MYCOPLASMATEST est basé sur la culture des germes et différentes réactions biochimiques. Le milieu reconstitué est préparé en mélangeant la poudre lyophilisée et le diluant. Après la mise en culture de *Mycoplasma*, l'urée peut être décomposée par l'uréase de UU ce qui entraîne la libération d'ammoniac (NH₃)³; par ailleurs, l'arginine peut être décomposée par l'arginase de MH et entraîner la libération de NH₃. NH₃ augmente le pH du milieu liquide, et le résultat est estimé en fonction du changement de couleur de l'indicateur. La galerie contient 11 antibiotiques, chacun d'entre eux à deux concentrations. Si *Mycoplasma* est sensible à un antibiotique, l'activité de l'enzyme est inhibée, et aucun changement de couleur n'est visible.

3. MATERIEL FOURNI

1. 20 galeries contenant chacune:



► 1 puits C+: Contrôle Positif (n°5) revêtu d'arginine, d'urée et de facteurs de croissance pour *Mycoplasma*.

► 29 puits, parmi lesquels : un puits UU revêtu de lincomycine (n°1), un puits MH revêtu d'érythromycine (n°2), un puits UU≥10⁴ de lincomycine et d'un agent inhibiteur (n°3), un puits MH≥10⁴ d'érythromycine et d'un agent inhibiteur (n°4), puis 25 puits coâtés de 11 antibiotiques à 2 concentrations d'antibiotiques chacun, sauf le pristinamycine (voir tableau ci-dessous) :

Numéro puits	Abbréviation	Signification	Faible concentration (puits du haut) (mg/L)	Concentration élevée (puits du bas) (mg/L)
6	PRI	pristinamycine	2	/
7, 8	MIN	minocycline	2	8
9, 10	JOS	josamycine	2	8
11, 12	ERY (AZI)*	érythromycine (azithromycine)*	8	16
13, 14	ROX	roxithromycine	1	4
15, 16	CLI	clindamycine	0,25	0,5
17, 18	OFL	ofloxacin	1	4
19, 20	CIP	ciprofloxacine	1	2
21, 22	CLA	clarithromycine	1	4
23, 24	TET ^{UU} (DOX)*	tétracycline (doxycycline)*	1	2
25, 26	LEV ^{UU}	levofloxacine	2	4
27, 28	TET ^{MH} (DOX)*	tétracycline (doxycycline)*	4	8
29,30	LEV ^{MH}	levofloxacine	1	2

Note*: Les organismes sensibles à la tétracycline sont également sensibles à la doxycycline (DOX), et les organismes sensibles à l'érythromycine sont également sensibles à l'azithromycine (AZI). Ces informations sont basées sur le document M43-A du CLSI: Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing For Human Mycoplasmas (Méthodes pour tester la sensibilité des mycoplasmes humains aux antimicrobiens).

► 1 embout de pipette.

2. Poudre lyophilisée

Vingt flacons contenant chacun 1,2 ml de peptone d'origine bovine et un bouillon de cœur de bœuf. Contient un agent d'inhibition qui peut inhiber la croissance des organismes interférant et favoriser la croissance du *Mycoplasma*.

3. Diluant

Vingt flacons contenant chacun 4 ml de solution utilisée pour dissoudre la poudre lyophilisée. Le milieu de culture, après le mélange du diluant et de la poudre lyophilisée, est conforme à la formule suivante : pour 1 000 ml d'eau purifiée, 7,3 g de peptone d'origine bovine, 2,5 g d'extrait de levure, 6,6 g de bouillon de cœur de bœuf, 3,6 g d'urée, 3,6 g de hydrochlorure d'arginine, 797 ml de mélange de sels, 181 ml de sérum de cheval, 6 ml de rouge phénol, 7 ml de mélange de facteurs de croissance et 9 ml de mélange d'antibiotiques. Le pH est de 6,3 ± 0,3.

4. Huile de paraffine

Un flacon contenant 28 ml de paraffine liquide.

5. 1 notice d'utilisation

6. 20 feuilles de résultats

4. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Pour le prélèvement des échantillons, un écouvillon stérile en coton, en polyester, STUART, Copan's Eswab, ou UTM swab peuvent être utilisés.
- Incubateur bactériologique (36 °C, 37 °C, 38 °C)
- Milieu UTM (Universal Transport Medium), peut également être utilisé comme milieu de transport.

5. CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS

- Conserver tous les composants entre 2 et 8°C.
- Cependant, le coffret peut être transporté et conservé à une température comprise entre -10 et 37°C durant 7 jours, sans que la durée de vie et les qualités du produit ne soient altérées. Un diluant non ouvert peut être stocké à température ambiante pendant un mois.
- Après avoir sorti la galerie de son sachet aluminium, l'utiliser dans un délai de 8 heures.
- L'huile de paraffine peut être utilisée jusqu'à la date de péremption indiquée, même une fois le flacon ouvert.
- Utiliser le milieu reconstitué (mélange du diluant avec la poudre) dans un délai de 72 heures.
- Utiliser le milieu inoculé dans un délai de 8 heures entre 18 et 28 °C ou dans un délai de 48 heures entre 2 et 8°C.

6. PRECAUTIONS

- Ce test est réservé à une utilisation professionnelle. Ne peut pas être réutilisé.
- Suivre les instructions avec soin. La fiabilité des résultats du dosage ne peut pas être garantie si les instructions de cette notice ne sont pas respectées.
- Se référer aux fiches de données de sécurité et à l'étiquetage du produit, pour ce qui concerne les risques chimiques susceptibles d'être présentés par ce dosage.
- Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et des réactifs. Se laver les mains après les manipulations.
- Effectuer le dosage dans des conditions environnementales favorables, c'est-à-dire à l'écart d'un air ambiant contenant des acides forts, des alcalins forts ou des gaz volatiles, etc.
- La croissance de *Mycoplasma* dans le bouillon de culture ne doit pas générer de trouble. Ce dosage repose sur une méthode originale qui inhibe de manière efficace la croissance des bactéries contaminantes (comportant une inhibition des *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteritidis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes* et *Pneumonia Kleber*, etc). Si le milieu reconstitué présente occasionnellement un trouble et devient rouge, cela n'indique pas un résultat positif.
- Après avoir ajouté le milieu reconstitué avec les échantillons dans chaque puits d'antibiogramme, si la couleur du milieu reconstitué dans tous les puits de la galerie devient plus sombre ou prend une teinte rouge clair, cela peut être dû à l'alcalinité des échantillons provenant des patients atteints de différentes pathologies. Dans ce cas, il est recommandé de renouveler le test des échantillons de sécrétions prélevés chez les patients.
- Pour réaliser l'antibiogramme à partir d'une culture positive obtenue sur un milieu classique, ajouter 50 µl de la culture positive au milieu de culture reconstitué du coffret et suivre la procédure décrite ci-après. La réinoculation doit être faite avant que le fond du flacon ne vire au rouge. Dans le cas contraire, le pH augmentera entraînant la mort rapide des mycoplasmes et diminuant ainsi les perspectives de réinoculation.

- Considérer les échantillons, les flacons de réactifs et les galeries comme potentiellement infectieux et les traiter conformément aux pratiques du laboratoire concernant la sécurité biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ne pas mélanger ou utiliser des composants de kit portant des numéros de lots différents.
- Ne pas utiliser les flacons avec une apparence trouble.
- Ne pas utiliser les galeries qui ont été endommagées : cupules déformées, sachet déshydratant ouvert, ou pochette aluminium ouverte.
- Les performances présentées ont été obtenues en utilisant la procédure indiquée dans cette notice. Tout changement ou modification dans la procédure peut affecter le résultat.
- Le *Mycoplasma* a une forte affinité pour les membranes des cellules du mucus, il est donc important de bien gratter la muqueuse, afin de recueillir le maximum de cellules.
- Recueillir l'échantillon avant d'administrer un traitement antibiotique.
- Une technique normalisée doit être utilisée pour prévenir la contamination par d'autres microorganismes.
- Un échantillon ne peut pas être considéré comme négatif avant 24 heures d'incubation.
- Si le titre de l'échantillon est faible, les puits de la galerie peuvent ne pas changer de couleur ou le changement de couleur peut être incompatible.
- Le dénombrement effectué sur la galerie donne seulement une indication du titre. Le titre exact peut être déterminé sur gélose.
- Le résultat de la sensibilité aux antibiotiques des échantillons ne tient pas compte du titre en *Mycoplasma* de l'échantillon. Si les titres sont faibles, la sensibilité réelle de la souche peut être différente du résultat obtenu avec la galerie.
- Un résultat qui est négatif à des concentrations faibles d'antibiotique, et positif à des concentrations maximales, est dénué de sens. Dans ce cas, il faut refaire le test.
- Si l'emballage extérieur est endommagé, la trousse peut toujours être utilisée. Cependant, si l'emballage intérieur est endommagé ou si les performances analytiques changent, ne pas utiliser la trousse.

7. RECUEIL ET CONSERVATION DE L'ÉCHANTILLON

7.1. RECUEIL

1. Pour collecter les échantillons endocervicaux et urétraux, n'utiliser que des écouvillons en Dacron ou en coton ou alors une cytobrosse. Prendre l'échantillon après que l'exocol ou le méat ait été soigneusement nettoyé avec un premier écouvillon.
Note: les mycoplasmes adhèrent fortement aux cellules muqueuses. La paroi muqueuse doit être bien grattée afin d'obtenir une quantité abondante d'échantillon. Inoculer dans le diluant ou dans le milieu de culture reconstitué et puis jeter l'écouvillon.
2. Recueillir les échantillons d'urines (pour les hommes) à mi-jet dans un récipient stérile. Inoculer à l'aide d'une pipette 500 µl d'urines homogénéisées dans le diluant ou dans le milieu de culture reconstitué.
3. Collecter dans un récipient stérile les autres types d'échantillons, par exemple le sperme et d'autres liquides moins fréquents. Inoculer 25 µl de sperme dans le diluant ou le milieu de culture reconstitué.

7.2. CONSERVATION

1. Si l'échantillon est inoculé dans le milieu reconstitué, il faut réaliser l'ensemencement de l'échantillon dans les 4 heures à température ambiante ou dans les 24 heures à 2-8 °C.
2. Si l'échantillon est inoculé dans le diluant (le diluant inoculé peut être utilisé comme milieu de transport), conserver 24 heures à température ambiante (18 à 25 °C) ou, pour une plus longue conservation, jusqu'à 48 heures entre 2 et 8 °C.
3. Si l'inoculation des échantillons est faite avec un milieu UTM, conserver 24 heures à température ambiante (18 à 25 °C), ou pour une plus longue conservation, conserver le milieu UTM jusqu'à 48 heures entre 2 et 8 °C.

8. PROCEDURE

Amener tous les réactifs à température ambiante (18 à 25 °C) avant utilisation.
Ajuster l'incubateur à 37 °C.

Si le prélèvement et l'ensemencement sont effectués sur place

1. Ajouter la totalité du diluant à la poudre lyophilisée et agiter pour mélanger complètement.
2. Inoculer l'écouvillon de prélèvement ou 500 µl d'urine à mi-jet ou 25 µl de sperme dans le milieu reconstitué. Placer le bouchon sur le flacon et agiter pour mélanger complètement.

3. Ajouter 100 µl de milieu inoculé à tous les puits de la galerie. Mélanger doucement pour dissoudre les substances adsorbées.
4. Ajouter 1 goutte d'huile de paraffine à chacun des puits.
5. Couvrir la galerie. Incuber entre 36 et 38 °C pendant 24 heures.

Si le prélèvement et l'ensemencement sont effectués sur des sites différents et que l'échantillon est transporté dans le diluant du coffret

1. Sur le lieu de prélèvement de l'échantillon, mettre l'écouvillon de prélèvement ou 500 µl d'urine à mi-jet ou 25 µl de sperme dans le diluant du coffret. Puis envoyer le diluant inoculé à l'endroit où le test doit être effectué.
2. Ajouter le diluant inoculé à la poudre lyophilisée. Placer le bouchon sur le flacon et agiter pour mélanger complètement.
3. Ajouter 100 µl de milieu inoculé à tous les puits de la galerie. Mélanger doucement pour dissoudre les substances adsorbées.
4. Ajouter 1 goutte d'huile de paraffine à chacun des puits.
5. Couvrir la galerie. Incuber entre 36 et 38 °C pendant 24 heures.

Si le prélèvement et l'ensemencement sont effectués à des endroits différents et que l'échantillon est transporté dans le système UTM

1. Ajouter la totalité du diluant du coffret à la poudre lyophilisée.
2. Inoculer le milieu reconstitué avec 400 µl du milieu de transport UTM. Placer le bouchon sur le flacon et agiter pour mélanger complètement.
3. Ajouter 100 µl de milieu inoculé à tous les puits de la galerie. Mélanger doucement pour dissoudre les substances adsorbées.
4. Ajouter 1 goutte d'huile de paraffine à chacun des puits.
5. Couvrir la galerie. Incuber entre 36 et 38 °C pendant 24 heures.

9. RESULTATS ET INTERPRETATION

Utiliser une feuille de résultat par test.

Examiner les changements de couleur sur la galerie.

Le puits C+ : Si la couleur devient rouge, cela indique la croissance de *Mycoplasma*, l'échantillon est considéré comme positif.

Si la couleur ne change pas et reste jaune, l'échantillon est considéré comme négatif.

Les puits tests : Si la couleur devient orange à rouge ou fuchsia, cela indique une croissance, soit une résistance à *Mycoplasma* ; si la couleur ne change pas et reste jaune, l'échantillon peut être considéré comme négatif ou sensible aux antibiotiques ; rarement, le milieu de culture devient rouge clair (c'est-à-dire que la couleur ne change pas de manière évidente) après avoir été mis en culture pendant 24 heures. Dans ce cas, il est recommandé de prolonger la culture de 12 à 24 heures supplémentaires. (Dans la mesure où le patient peut avoir été infecté récemment par *Mycoplasma*, au cours de la période de récupération ou sous traitement antibiotique, la quantité de *Mycoplasma* dans l'échantillon peut être très faible ou les germes *Mycoplasma* peuvent être inhibés par les antibiotiques. Par conséquent, le changement de couleur n'est pas évident). La souche est sensible si elle est inhibée par les deux concentrations d'antibiotiques. Elle est intermédiaire si elle est inhibée par la concentration la plus élevée et n'est pas inhibée par la concentration la plus faible. Elle est résistante si elle n'est inhibée ni par la concentration plus faible ni par la concentration plus élevée.

Remarques : les seuils pathologiques généralement établis pour *U.urealyticum* sont : $\geq 10^4$ UCC/ml pour les prélèvements urétraux, et UU positive pour les prélèvements d'urine ou de sperme, que la quantité soit $\geq 10^4$ CCU/ml ou non. Le seuil de *M.hominis* dans un prélèvement endocervical est $\geq 10^4$ CCU/ml. La pristinamycine n'est tapissée qu'à une seule concentration. La souche est résistante si le puits vire au rouge et est sensible si le puits reste jaune. Selon la directive CLSI, la sensibilité à l'érythromycine vaut également pour l'azithromycine alors que la sensibilité aux tétracyclines est également valable pour la doxycycline.

Exemple de résultats :

UU	UU $\geq 10^4$	C+		UU	UU $\geq 10^4$	C+	
●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●
MH	MH $\geq 10^4$	PRI	MIN	MH	MH $\geq 10^4$	PRI	MIN
Pas d'infection à <i>Mycoplasma</i>				Infection due à <i>Urea urealyticum</i>			
				Sensible (S) à PRI Intermédiaire (I) à MIN			

<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>	<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>
<p>Infection due à <i>Urea urealyticum</i> supérieure à 10⁴</p> <p>Sensible (S) à PRI Résistant (R) à MIN</p>	<p>Infection due à <i>Mycoplasma hominis</i> supérieure à 10⁴</p> <p>Résistant (R) à PRI Sensible (S) à MIN</p>
<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>	<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>
<p>Infection due à <i>Urea urealyticum</i> et <i>Mycoplasma hominis</i> Sensible (S) à PRI Sensible (S) à MIN</p>	<p>Infection due à <i>Urea urealyticum</i> et <i>Mycoplasma hominis</i> supérieures à 10⁴ Résistant (R) à PRI Sensible (S) à MIN</p>
<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>	<p>Note : Sensible (S): La probabilité de succès thérapeutique est acceptable. On doit s'attendre à un effet thérapeutique dans le cas d'un traitement à dose habituelle par voie générale.</p> <p>Intermédiaire (I): Le succès thérapeutique est imprévisible.</p> <p>Résistant (R): Forte probabilité d'échec thérapeutique. On ne peut s'attendre à un effet thérapeutique quel que soit le traitement.</p>
<p>Invalid</p>	

10. CONTROLE DE QUALITE

Le contrôle recommandé pour ce dosage est l'utilisation de souches de référence (UU [ATCC® 27813] et MH [ATCC® 15488]) séparément. Mettre en culture la souche ATCC® 27813 dans le milieu reconstitué. Mettre en incubation jusqu'à ce que le milieu de culture devienne rouge clair, puis réaliser une sous-culture dans un autre flacon de milieu reconstitué et mettre en incubation jusqu'à ce que le milieu de culture prenne une couleur rouge clair. Effectuer une dilution au millièmes de ce milieu de culture avec une solution saline stérile, puis ajouter 100 µl dans un nouveau flacon de milieu reconstitué. Inoculer la galerie avec cette culture finale. Le résultat est valide si la couleur des puits C+, UU, UU ≥ 10⁴, CLI (concentration faible et élevée), OFL (faible concentration) et CIP (concentration faible et élevée) passe de l'orange au rouge ou au fuchsia. Tester la souche ATCC® 15488 selon la même procédure que précédemment. Le résultat est valide si la couleur des puits C+, MH, MH ≥ 10⁴, ERY (concentrations faible et élevée), CLA (concentrations faible et élevée) et ROX (concentrations faible et élevée) passe de l'orange au rouge ou au fuchsia.

Les contrôles externes ne sont pas fournis avec ce kit. Il est recommandé selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire de tester des contrôles positifs et négatifs pour confirmer la procédure de test et de vérifier les performances de celui-ci. Chaque laboratoire se doit ensuite de mettre en place son propre planning de contrôles.

11. LIMITES DU TEST

- Ce dosage est destiné à constituer une aide pour le diagnostic clinique. Ce dosage doit être réalisé parallèlement à un examen clinique, au recueil des antécédents médicaux et à la réalisation d'autres tests.

- Un très petit nombre d'échantillons alcalins peut entraîner un changement de couleur du milieu de culture directement au rouge, car ce test est basé sur une mise en culture et des réactions biochimiques, et l'augmentation résultante du pH peut entraîner le changement de couleur du milieu reconstitué.
- Dans la mesure où l'utilisation abusive d'antibiotiques peut entraîner l'émergence d'un faible nombre de souches résistantes, quelques rares résultats faux positifs peuvent être obtenus malgré l'ajout de différents antibiotiques dans le bouillon de culture pour inhiber les bactéries non pertinentes. Par conséquent, nous recommandons de confirmer les échantillons positifs avec une étude sur boîte de Pétri lorsque cela est réalisable.

12. PERFORMANCES

12.1 Performances avec les souches

Pour le milieu reconstitué, 16 souches pures de Mycoplasmes inoculées à deux dilutions, et trois mélanges de UU et de MH à deux dilutions ont été détectés comme positifs, quelle que soit la dilution. En outre, à partir de 19 souches interférentes présentes dans des échantillons urogénitaux à une densité de 0,5 McFarland, 100 µl ont été prélevés et inoculés. Les résultats ont été négatifs.

Pour la galerie, trois souches pures de mycoplasmes inoculées à deux dilutions ainsi que six mélanges de UU et de MH à deux dilutions ont été correctement identifiés par la galerie. Douze souches pures de mycoplasmes ont été mises en culture dans le milieu reconstitué jusqu'à ce que la couleur devienne rouge clair, puis ont été diluées à la concentration de 10⁴ unités changeant la couleur (UCC)/ml puis ont été testées. Les puits UU≥10⁴ ou MH≥10⁴ correspondants ont viré au rouge. Trois souches pures de UU à deux dilutions ont été testées à six reprises. La couleur du puits CLI (concentrations faible et élevée) a viré au rouge pour 6 tests. La couleur du puits CIP (faible concentration) a viré au rouge pour 3 tests. La couleur du puits TET^{UU} (concentration faible et élevée) a viré au rouge pour 4 tests. La couleur du puits OFL (faible concentration) a viré au rouge pour 3 tests, la couleur du puits OFL a viré au rouge (concentration faible et élevée) pour 1 test. La couleur du puits MIN (faible concentration) a viré au rouge pour 1 test, la couleur du puits MIN a viré au rouge (concentration faible et élevée) pour 3 tests. Les couleurs des puits PRI, ERY, ROX, JOS, CLA et LEV^{UU} (concentration faible et élevée) sont restées jaunes pour 6 tests. Trois souches pures de MH ont été testées 6 fois à 2 dilutions. Les couleurs des puits ERY, CLA et ROX (concentration faible et élevée) ont virées au rouge. La couleur du puits OFL (concentration faible et élevée) a viré au rouge pour 4 tests. La couleur du puits LEV^{MH} (concentration faible et élevée) a viré au rouge pour 4 tests. La couleur du puits CIP (faible concentration) a viré au rouge pour 1 test, la couleur du puits CIP (concentration faible et élevée) a viré au rouge pour 3 tests. La couleur des puits MIN, PRI, JOS, CLI et TET^{MH} (concentration faible et élevée) est restée jaune pour 6 tests.

12.2 Mesure de l'exactitude par corrélation

Une étude a été effectuée en testant les échantillons avec le présent dosage et deux autres produits CE. Quand deux essais sur trois montrent un résultat positif, l'échantillon est considéré comme vrai positif. Autrement, le résultat est négatif.

Les données ont été analysées et récapitulées dans le tableau suivant.

		Standard or amplifié		total
		positif	négatif	
Ce test	positif	48	2	50
	négatif	0	89	89
	total	48	91	139

Avec le test du x², une valeur de p > 0,05 a été obtenue, ce qui indique l'absence de différence manifeste entre les deux méthodes.

13. LITTÉRATURE

1. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, et al. *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998;13(10):2756-2761.
2. Rylander M, Hallander HO. In vitro comparison of the activity of doxycycline, tetracycline, erythromycin and a new macrolide, CP 62993, against *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1988;53:12-17.
3. Murray P. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011 Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing For Human Mycoplasmas; *Approved Guideline.CLSI Document M43-A.Vol. 31-N°19*.

EN

1. INTRODUCTION

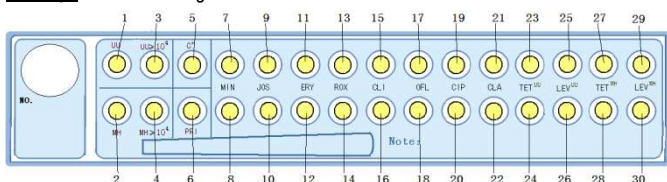
Mycoplasma is one of the main pathogens which lead to NGU (nongonococcal urethritis), cervical, pelvic inflammatory disease, orchitis, epididymitis etc., and can cause infertility to men and women¹. These pathogens can attack and destroy genitourinary epithelial cells, cause infection of the AIDS and other sexually transmitted diseases. Clinical sexually transmitted diseases can be caused by *Mycoplasma* (mainly by *Urea urealyticum* UU and *Mycoplasma hominis*). Its occurrence has been presenting an up-trend. Antibiotic resistance is becoming more and more severe due to the misuse of antibiotics, which seriously endanger mankind's health². The key to the treatment and prevention of the spread of *Mycoplasma* is timely and accurate diagnosis. *Mycoplasma* cultivation is currently still being recognized as a reliable method to diagnose the *Mycoplasma* infection.

2. PRINCIPLE

MYCOPLASMATEST kit is based on cultivation and biochemical reactions. The mixed medium is prepared by mixing the freeze-dried powder and the diluent. After *Mycoplasma* has been cultivated, urea can be decomposed by urease in UU and release NH₃; and arginine can be decomposed by arginase in MH and release NH₃. NH₃ increases the pH of the liquid medium, the result is judged according to the color change of the indicator. Strip contains 11 antibiotics and each one has two concentrations, If *Mycoplasma* is sensitive to antibiotic, the activity of enzyme is inhibited, so there is no change in color.

3. MATERIAL REQUIRED

1. 20 strips each containing:



► 1 well C+: Positive Control (n°5) coated with arginin, urea and some *Mycoplasma* growth activator.

► 29 wells, among which the UU well (n°1) is coated with lincomycin, MH well (n°2) is coated with erythromycin, UU≥10⁴ well (n°3) is coated with lincomycin and inhibition agent, MH≥10⁴ well (n°4) is coated with erythromycin and inhibition agent, then 25 wells are coated with 11 antibiotics at 2 concentrations, except PRI (see table below) :

Well number	Abreviation	Signification	Low concentration (up well) (mg/L)	High concentration (down well) (mg/L)
6	PRI	pristinamycin	2	1
7, 8	MIN	minocycline	2	8
9, 10	JOS	josamycin	2	8
11, 12	ERY (AZI)	erythromycin (azithromycin)*	8	16
13, 14	ROX	roxithromycin	1	4
15, 16	CLI	clindamycin	0,25	0,5
17, 18	OFL	ofloxacin	1	4
19, 20	CIP	ciprofloxacin	1	2
21, 22	CLA	clarithromycin	1	4
23, 24	TET ^{UU} (DOX)	tetracycline (doxycycline)*	1	2
25, 26	LEV ^{UU}	levofloxacin	2	4
27, 28	TET ^{MH} (DOX)	tetracycline (doxycycline)*	4	8
29, 30	LEV ^{MH}	levofloxacin	1	2

Note*: Organisms sensitive to tetracycline are sensitive to doxycycline (DOX) too. Organisms sensitive to erythromycin are sensitive to azithromycin (AZI) too. This information are based upon CLSI Document M43-A, Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas.

► 1 pipettes tips

2. Freeze-dried Powder

20 vials each containing 1.2 ml of peptone of bovine origin and beef heart infusion. Contains inhibition agent. The growth of interfering organisms could be inhibited while the growth of *Mycoplasma* could be promoted.

3. Diluent

20 vials each containing 4 ml of solution which is used to dissolve the freeze-dried powder. The culture medium, after the diluent and freeze-dried powder are mixed

together, conforms to the formula which is, of each 1000 ml of purified water, there are 7.3 g of peptone of bovine origin, 2.5 g of yeast extract, 6.6 g of beef heart infusion, 3.6 g of urea, 3.6 g of arginine hydrochloride, 797 ml of salt-mixture, 181 ml of horse serum, 6 ml of phenol red, 7 ml of growth factors mixture and 9 ml of antibiotic mixture. The pH is 6.3±0.3.

4. Mineral Oil

1 vial containing 28 ml of liquid paraffin.

5. 1 copy of instruction for use

6. 20 sheets of result paper

4. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Cotton, polyester sterile, STUART swab, Eswab or UTM swab, for the sample collection.
- Bacteriology incubator (36 °C, 37 °C, 38 °C)
- UTM medium (Universal Transport Medium), can be used for transport medium.

5. CONSERVATION AND STABILITY OF THE COMPONENTS

- Store all components at 2-8 °C.
- However the kit can be transported and stored at a temperature between -10 and 37°C during 7 days without the life and qualities of the product are altered. An unopened diluent can be stored at room temperature within one month.
- Use the strip within 8 hours once unwrapped.
- The Mineral Oil may be used until the labelled expiry date once opened.
- Use the culture medium, after the diluent and freeze-dried powder are mixed together within 72 hours.
- Use the inoculated medium within 8 hours at 18-28 °C, or within 48 hours at 2-8 °C.

6. PRECAUTIONS

- For professional use only. Can not be reused.
- Follow the instruction for use carefully. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package insert.
- Refer to the material safety data sheet and product labeling for any chemical hazards that may be present in this assay.
- Wear disposable gloves when dealing with samples and reagents. Wash hands after operations.
- Conduct the assay away from bad ambient conditions. e.g. ambient air containing strong acid, strong alkali or volatile gas and so on.
- The growth of *Mycoplasma* in the culture broth would not generate turbidity. This assay has adopted a unique method to effectively inhibit the growth of irrelevant bacteria (including the inhibition of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteritidis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes* and *Pneumonia Kleber*, etc). If the mixed medium occasionally displays turbidity and turns red, this does not indicate a positive result.
- After adding the mixed medium with added samples to each susceptibility well, if it is observed that the color of the mixed medium in all the other strip wells evidently becomes darker or turns to light red, this may be due to the biased alkalinity of samples from patients under pathological conditions. In this case, it is recommended to retest secretion samples from the patients.
- When testing the antibiotic susceptibility of positive samples validated by normal growth medium, add 50 µl of the cultured positive sample to the mixed medium from this kit and follow the assay procedures mentioned below. The re-inoculation should be conducted before the bottom of the vial turns red, otherwise the pH will increase, leading to the rapid death of the *Mycoplasma* and the lowered reinoculation possibility.
- Consider the samples, reagent vials and strips for testing as potentially infectious material and deal them in accordance with biosafety laboratory practices.
- Do not use reagents after expiry date.
- Do not mix or use components from kits with different batch codes.
- Do not use vials with turbid appearance.
- Do not use strips which have been damage: cupules deformed, dessicant sachet open, and aluminium failed pouch broken.
- The performance data presented were obtained using the procedure indicated in this package insert. Any change or modification in the procedure may affect the result.
- Since *Mycoplasma* have a high affinity for mucus cell membranes, it is important to thoroughly scrape the mucosa so as to collect as many cells as possible.
- Collect the sample before administering any antibiotic treatment.

- A standardized technique must be used to prevent contamination by other microorganisms.
- A sample cannot be considered as negative before 24 hours of incubation.
- If the sample titre is low, the strip cupules may not change color or the color change may be inconsistent.
- Enumeration in the tests carried out on the strip can only give an indication of titer. The exact titre can be determinate on agar.
- The antibiotics susceptibility results of the samples do not take into account the Mycoplasma titer of the sample. In the case of low titers, the real susceptibility of the strain may be different from the result obtained with the strip.
- A result which is negative at the lowest concentration of an antibiotic, and positive at the highest concentration is meaningless. In this case, perform the test again.
- If the outer packaging is damaged, it is still appropriate to use the kit. However, if the interior packaging is damaged or the analytical performance is changed, do not use the kit.

7. SAMPLE AND CONSERVATION

7.1 SAMPLE

- For Endocervical and urethral samples, use only a Dacron or rayon or cotton swab, or a cytobrush to collect samples; collect after the exocervix, or the meatus have been carefully cleaned with a first swab.
Note: Mycoplasmas adhere strongly to mucous cells. The mucous lining should be well scraped to obtain an abundant amount sample. Inoculate to the diluent or mixed culture medium and dispose the swab.
- For urine samples, collect midstream of urine (for males) in a sterile bottle. Inoculate 500 µl of the homogenized urine to the diluent or mixed culture medium with a pipette.
- For other types of samples, e.g. semen or other less frequent liquid samples are collected in a sterile bottle. Inoculate 25 µl of the semen to the diluents or mixed culture medium.

7.2. SAMPLE CONSERVATION

- If the sample is inoculated in the mixed medium, the inoculated medium may be kept for 4 hours at room temperature (18-25°C), or 24 hours at 2-8°C at the most.
- If the sample is to be inoculate to the diluent (the inoculated diluents can be used as transported medium), store the inoculated diluents at room temperature (18-25 °C) within 24 hours, for longer storage, the inoculated diluent should be stored at 2-8 °C up to 48 hours.
- If the sample is to be collected and transported with a UTM Swab (Universal Transport Medium), store the UTM swab at room temperature (18-25°C) within 24 hours, for longer storage, the UTM swab sample should be store at 2-8 °C up to 48 hours.

4. PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use
Adjust the incubator at 37 °C.

If the Sample is Collected and Inoculated at the Same Place

- Add the diluent completely to the freeze-dried powder, and shake to mix completely.
- Inoculate the swab sample or 500 µl of the midstream urine sample or 25 µl of the semen sample to the mixed medium. Place the lid on the vial, and shake to mix completely.
- Add 100 µl of the inoculated medium to all the wells on the strip. Shake gently to dissolve the coated materials.
- Add 1 drop of mineral oil to each well.
- Cover the strip. Incubate at 36 – 38°C for 24 hours.

If the Sample is Collected and Inoculated at Different Places and Transported in the Diluent

- At the place of sample collection, add the swab sample or 500 µl of the midstream urine sample or 25 µl of the semen sample to the diluent. Then send the inoculated diluent to the place where the test is to be conducted.
- Add the inoculated diluent to the freeze-dried powder. Place the lid on the vial, and shake to mix completely.
- Add 100 µl of the inoculated medium to all the wells on the strip. Shake gently to dissolve the coated materials.
- Add 1 drop of mineral oil to each well.
- Cover the strip. Incubate at 36-38 °C for 24 hours.

If the Sample is Collected and Inoculated at Different Places and Transported in the UTM

- Add the diluent completely to the freeze-dried powder.
- Inoculate 400 µl of the UTM sample to the mixed medium. Place the lid on the vial, and shake to mix completely.
- Add 100 µl of the inoculated medium to all the wells on the strip. Shake gently to dissolve the coated materials.
- Add 1 drop of mineral oil to each well.
- Cover the strip. Incubate at 36-38 °C for 24 hours.

9. RESULTS AND INTERPRETATION

Use one sheet of result paper per test.

Read the color change on the strip.

The well C+ : If the color turns red, it implicates the growth of *Mycoplasma* ; the sample is positive. If the color doesn't change, and stays yellow, it is negative.

The others well : If the color turns from orange to red or peach blow, it implicates the growth of *Mycoplasma*, it is resistant. If the color doesn't change, and stays yellow, it could be deemed to be negative or sensitive to antibiotics; Seldom, the culturing medium turns light red (i.e. the color does not change evidently) after being cultivated for 24 hours. In this case, it is recommended to extend the culture time by another 12-24 hours. (Because the patient may be infected by *Mycoplasma* recently, in the recovery period or under antibiotic treatment such that there is only very little amount of *Mycoplasma* in the sample or the *Mycoplasma* is inhibited by antibiotics. Consequently, the color change is not evident.) The strain is susceptible when it is inhibited by both the two concentrations of the antibiotics, is intermediate when it is inhibited by the higher concentration while not inhibited by the lower concentration, is resistant when it is neither inhibited by the lower concentration nor the higher concentration.

The table below is an illustration of how to read the results according to the color of each well on the strip.

Note: the pathological thresholds usually quoted for *U. urealyticum* are: $\geq 10^4$ CCU/ml for an urethral sample, and UU positive in a urine stream or sperm sample, no matter the quantity is $\geq 10^4$ CCU/ml or not. The threshold for *M. hominis* is $\geq 10^4$ CCU/ml in an endocervical sample. Because pristinamycin is coated at only one concentration, the strain is resistant when the well turns red while it is susceptible when the well stays at yellow. According to CLSI guideline, the susceptibility to erythromycin is also applicable to azithromycin while the susceptibility to tetracycline is also applicable to doxycycline.

Example of results:

No <i>Mycoplasma</i> infection	<i>Ureaplasma urealyticum</i> infection PRI is sensible (S) MIN is intermediate (I)
<i>Ureaplasma urealyticum</i> infection is more than 10^4 CCU/mL PRI is sensible (S) MIN is resistant (R)	<i>Mycoplasma hominis</i> infection is more than 10^4 CCU/mL PRI is resistant (R) MIN is sensitive (S)



BIOSYNEX

12, rue Ettore Bugatti – CS 28006
67038 STRASBOURG Cedex – France

Tél. : +33 (0)3 88 77 57 00
Fax : +33 (0)3 59 81 21 74

info@biosynex.com
www.biosynex.com

BIOSYNEX

<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>	<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>
<p><i>Mycoplasma hominis</i> and ureaplasma urealyticum infection</p> <p>PRI is sensible (S) MIN is sensitive (S)</p>	<p><i>Mycoplasma hominis</i> and ureaplasma urealyticum infection are more than 10⁴ CCU/mL. PRI is resistant (R) MIN is sensitive (S)</p>
<p>UU UU≥10⁴ C+ MIN</p> <p>MH MH≥10⁴ PRI</p>	<p><u>Sensitive (S):</u> The probability of therapeutic success is acceptable. We have to expect a therapeutic effect in the case of a treatment with usual dose.</p> <p><u>Intermediate (I):</u> The therapeutic success is unpredictable.</p> <p><u>Resistant (R):</u> Strong probability of therapeutic failure. We cannot expect a therapeutic effect whatever is the treatment.</p>
Invalid	

10. QUALITY CONTROL

The recommended control requirement for this assay is to purchase reference strains (UU (ATCC® 27813) and MH (ATCC® 15488)) separately. Culture ATCC® 27813 in the mixed medium. Incubate until the culture medium turns to light red then perform a subculture to another vial of mixed medium and incubate until culture medium turns to light red. Carry out a 1000 folds dilution of this culture medium with sterile saline solution and add 100 µl to a new vial of mixed medium. Inoculate the strip with this final culture. The result is valid if the color of C+, UU, UU ≥ 10⁴, CLI (both low and high concentrations), OFL (low concentration) and CIP (both low and high concentrations) wells turns from orange to red or peachblow. Test ATCC® 15488 in the same operation as above. The result is valid if the color of C+, MH, MH ≥ 10⁴, ERY (both low and high concentrations), CLA (both low and high concentrations) and ROX (both low and high concentrations) wells turns from orange to red or peachblow.

Control standards are not supplied with this kit; however, it is recommended that positive and negative controls are tested as a good laboratory practice to confirm the test procedure and to verify proper test performance. Each laboratory has to set up its own planning of controls.

11. LIMITS

- This assay is intended as an aid for the clinical diagnosis. Conduct this assay in conjunction with clinical examination, patient's medical history and other test results.
- A very small number of alkaline samples may cause the culture medium turn red directly because this test is based on culture and biochemical reactions and the resulting increase in pH leads to the change in the color of the mixed medium.
- Since the clinical abuse of antibiotics leads to the emergence of a small number of drug-resistant strains, a very small number of false positive results might be obtained despite the adoption of various antibiotics in the culture broth to inhibit irrelevant bacteria. Hence we recommend confirming the positive samples with a *Mycoplasma* agar plate whenever practicable.

12. PERFORMANCES

12.1. Performance with strains

For the mixed medium, 12 pure mycoplasma strains inoculated at 2 dilutions as well as 3 mixtures of UU and MH at 2 dilutions were detected positive, whatever the dilution. In addition, of the 19 interfering strains in urogenital samples at 0.5 McFarland, 100 µl from each were taken and inoculated. The results were all negative.

For the strip, 3 pure mycoplasma strains inoculated at 2 dilutions as well as 6 mixtures of UU and MH at 2 dilutions were correctly identified by the strip. 12 pure mycoplasma strains were cultured in the mixed medium until the color turns to light red and then were diluted at the concentration of 10⁴ CCU/ml and were tested. The corresponding UU≥10⁴ or

MH≥10⁴ wells turned to red. 3 pure UU strains at 2 dilutions were tested for a total of 6 times. The color of CLI well (both low and high concentrations) turned to red for 6 tests, the color of CIP well (low concentration) turned to red for 3 tests, the color of CIP well (both low and high concentrations) turned to red for 3 tests, the color of TET^{UU} wells (both low and high concentrations) turned to red for 4 tests, the color of OFL well (low concentration) turned to red for 3 tests, the color of OFL well (both low and high concentrations) turned to red for 1 test, the color of MIN well (low concentration) turned to red for 1 test, the color of MIN well (both low and high concentration) turned to red for 3 tests, the color of PRI, ERY, ROX, JOS, CLA, LEV^{UU} wells (both low and high concentrations) remained orange for 6 tests. 3 pure MH strains at 2 dilutions were tested for a total of 6 times. The color of ERY, CLA and ROX wells (both low and high concentrations) turned to red, the color of OFL wells (both low and high concentrations) turned to red for 4 tests, the color of LEV^{MH} wells (both low and high concentrations) turned to red for 4 tests, the color of CIP well (low concentration) turned to red for 1 test, the color of CIP well (both low and high concentrations) turned to red for 3 tests, the color of MIN, PRI, JOS, CLI, TETMH wells (both low and high concentrations) remained orange for 6 tests.

12.2. Measurement Trueness by Correlation

A study was performed where samples were tested using this assay and two other CE marked assay. When two of the three assays generated a positive result, the sample is true positive. Otherwise, the sample is negative. This is called amplified gold standard. The comparison between this assay and the amplified gold standard is presented below.

	Amplified gold standard		total
	positive	negative	
this assay	positive 48	2	50
	negative 0	89	89
	total 48	91	139

In χ^2 method, $P>0.05$, there is no obvious difference between the two methods.

13. LITERATURE

1. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, et al. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998;13(10):2756-2761.
2. Rylander M, Hallander HO. In vitro comparison of the activity of doxycycline, tetracycline, erythromycin and a new macrolide, CP 62993, against *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1988;53:12-17.
3. Murray P. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011 Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing For Human Mycoplasmas; *Approved Guideline.CLSI Document M43-A.Vol. 31-N°19*.

SYMBOLS / SYMBOLS

	Attention, Lire la notice d'utilisation. Attention, see instructions for use		Numéro du lot Lot number
	Pour diagnostic in vitro. For in vitro diagnostic use only		Fabriqueur Manufacturer
	A conserver entre 2-8°C Store between 2-8°C		Ne pas réutiliser Do not reuse
	Nombre de test par kit Tests per kit		Référence catalogue Catalog number
	Date de péremption Expiry		

VERSION 01 – 28/12/2015