

SEROLOGY

Détection quantitative des anticorps anti-*Ureaplasma urealyticum* et anti-*Mycoplasma hominis*

14 tests (REF 00014)
120 tests (REF 00097)

FR-2010-09



1 - BUT

Le coffret SEROLOGY permet la détection quantitative des anticorps dirigés contre les principaux mycoplasmes urogénitaux, *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) et de *Mycoplasma hominis* (M.h.), à partir du sérum. Un coffret permet de réaliser 14 tests ou 120 tests.

2 - INTRODUCTION

Les mycoplasmes sont des germes fragiles dépourvus de paroi, exigeants en facteurs de croissance, doués d'un fort pouvoir d'adhérence et très fréquemment présents à l'état commensal. Des espèces isolées à partir du tractus uro-génital, *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* sont les plus souvent retrouvées. U.u. ou M.h. sont transmis par voie sexuelle et peuvent se comporter comme de véritables pathogènes.

Etant donné le caractère peu immunogène des mycoplasmes, la sérologie ne remplace pas le diagnostic direct à partir du prélèvement. La sérologie des mycoplasmes urogénitaux est surtout utilisée pour diagnostiquer une infection génitale profonde, telle que salpingite ou prostatite. La technique de l'inhibition du métabolisme utilisant des réactifs lyophilisés et des souches de référence est la technique la plus appropriée (1) pour les laboratoires non spécialisés.

3 - PRINCIPE

La détection quantitative des anticorps anti-U.u. et/ou anti M.h. est réalisée par la technique d'inhibition métabolique (2). La réaction se fait dans les puits d'une galerie contenant du côté *U. urealyticum* de la lincomycine et du côté *M. hominis* de l'érythromycine. Les huit premiers puits, de chaque côté de la galerie, sont inoculés par un milieu de culture UMM contenant un indicateur de pH et préalablement ensemencé par une quantité déterminée de souches U.u. et M.h.

Le sérum à tester est ajouté par des dilutions en cascade. Les anticorps éventuellement présents inhibent la multiplication des mycoplasmes, la couleur du milieu est alors jaune. Par contre en l'absence d'anticorps les mycoplasmes se multiplient, dégradent l'urée et/ou l'arginine présentes dans le milieu, ce qui provoque un changement de couleur du milieu au rouge-orangé à fuschia.

Pour chaque série de tests U.u. et M.h. un contrôle de croissance (puits 1, noté T) est réalisé afin de vérifier la viabilité des souches U.u. et de leur bon fonctionnement du test.

4 - REACTIFS

Description	Quantité #00014	#00097
UMMt: Flacon de 2 mL de milieu de base des mycoplasmes sous forme liquide	14	120
UMMMyo: Flacon de milieu de croissance des mycoplasmes sous forme lyophilisée (+ 2 mL UMMt)	14	120
U.u./M.h.: Flacon contenant des souches lyophilisées <i>U. urealyticum</i> et <i>M. hominis</i>	14	120
Galerie SEROLOGY: Galerie 20 puits conditionnée individuellement en sachet aluminium	14	120
Contrôle positif : Flacon contenant une solution lyophilisée de titre connu pour contrôle des réactifs	1	5

Milieu reconstitué (UMMt+UMMMyo) - Composition

Bouillon Mycoplasmes 20 g/L, Sérum de poulain 200 mL, Extrait de levures 5,8 g/L, Cystéine 0,3 g/L, Arginine 9 g/L, Urée 3,6 g/L, Rouge de phénol 0,04 g/L, Antibiotiques 10 mL. pH : 6.1 ± 0.1

Souches U.u / M.h

Souches de référence lyophilisées : *U. urealyticum* sérotype 8 et *M. hominis* souche PG 21.

SEROLOGY (§9.1)

- Côté *U. u.* : Série de 8 premiers puits contenant de la lincomycine inhibiteur spécifique de *M.h.*

- Côté *M. h.* : Série de 8 premiers puits contenant de l'érythromycine inhibiteur spécifique de *U.u.*

Contrôle positif

Milieu pour mycoplasmes avec un mélange d'antibiotiques spécifiques.

5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI

● Les réactifs de ce coffret sont destinés uniquement à un diagnostic *in vitro* et doivent être manipulés par des personnes habilitées.

SEROLOGY

Quantitative detection of antibodies against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*

14 tests (REF 00014)
120 tests (REF 00097)

EN-2010-09



1 - INTENDED USE

The SEROLOGY kit enables the quantitative detection in serum of the antibodies against the principal urogenital mycoplasma species, *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) and *Mycoplasma hominis* (M.h.). Each kit contains 14 or 120 tests.

2 - INTRODUCTION

Mycoplasmas are fragile germs lacking a cell wall. They are demanding in their requirements for growth promoters, endowed with a strong capacity of adherence and most often present as commensal organisms. The species isolated from the urogenital tract, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* are the most frequently encountered. U.u. and M.h. are sexually transmitted and can be pathogenic in nature.

Given their lack of immunogenicity, serological testing of mycoplasmas does not replace direct diagnosis from patient specimens. The serologic test for urogenital mycoplasmas is especially used to diagnose a deep genital infection, like salpingitis or prostatitis. The technique of metabolic inhibition using lyophilized reagents and reference strains is the most appropriate technique for use by non-specialized laboratories (1).

3 - PRINCIPLE

The quantitative detection of anti-U.u. and/or anti-M.h. antibodies is achieved by a metabolic inhibition technique (2). The reaction is carried out in the wells of a tray containing in the *U. urealyticum* rows, lincomycin and in the *M. hominis* rows, erythromycin. The first 8 wells, of each side of the tray, are inoculated with UMM culture medium containing a pH indicator and seeded beforehand with a known quantity of U.u. and M.h. strains.

The serum to be tested is serially diluted in the tray. The presence of antibodies in the serum causes an inhibition of mycoplasma multiplication and is visualised by a yellow coloration of the medium. However, in the absence of antibodies the mycoplasmas multiply, degrading urea and/or arginine present in the medium, which results in an orangey, red or fuschia coloration of the medium.

For each row of U.u. and M.h. tests there is a growth control (well 1, labelled T). These are carried out in order to verify the viability of the U.u. and M.h. strains, as well as the correct operation of the test.

4 - REAGENTS

Description	Quantity #00014	#00097
UMMt: Vial of 2 mL of liquid mycoplasma base medium	14	120
UMMMyo: Vial of lyophilized mycoplasma growth medium (+ 2 mL UMMt)	14	120
U.u./M.h.: Vial containing lyophilized <i>U. urealyticum</i> and <i>M. hominis</i> strains	14	120
SEROLOGY: 20-well tray wrapped individually in an aluminium sachet	14	120
Positive control: Vial containing a lyophilized solution of known titre for verification of the reagents	1	5

Reconstituted medium (UMMt + UMMMyo) - Composition

Mycoplasma broth 20 g/L, Foal serum 200 mL, Yeast extract 5,8 g/L, Cystine 0,3 g/L, Arginine 9 g/L, Urea 3,6 g/L, Phenol red 0,04 g/L, Antibiotics 10 mL. pH : 6.1 ± 0.1

U.u. / M.h. strains

Lyophilized reference strains: *U. urealyticum* serotype 8 and *M. hominis* PG 21 strain.

SEROLOGY tray (§9.1)

- *U. urealyticum* row: Series of first 8 wells containing a *M. hominis* specific lincomycin inhibitor.

- *M. hominis* row: Series of first 8 wells containing an *U. urealyticum* specific erythromycin inhibitor.

Positive control

Mycoplasma medium with a mixture of specific antibiotics.

5 - PRECAUTIONS

● The reagents in this kit are intended solely for *in vitro* use and must be handled by authorised personnel.

- Les prélèvements et les réactifs ensemencés sont potentiellement infectieux, ils doivent être manipulés avec les précautions d'usage en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation pour ce type de produit.
- Les milieux UMMt et UMMMyo et le contrôle positif contiennent des matières premières d'origine animale et doivent être manipulés avec les précautions d'usage.
- Les flacons U.u / M.h. contiennent des bactéries de groupe 2 (*M. hominis*) et doivent être manipulés avec les précautions d'usage. Risque de contamination par un agent biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser les réactifs endommagés ou mal conservés avant utilisation.
- Après la première ouverture du coffret, sortir du réfrigérateur uniquement les réactifs nécessaires. Les souches U.u./M.h. sont sensibles à la chaleur et aux variations de température.
- Un résultat positif avec la méthode SEROLOGY ne peut servir seul à effectuer un diagnostic clinique. Celui-ci doit être réalisé par le médecin en fonction des résultats biologiques et des signes cliniques.

6 - RECUEIL ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

- Prélèver le sang à tester sur tube sec.
- Centrifuger 10 minutes à x2500g.
- Recueillir le sérum.

Le sérum peut être conservé 3 heures à 2-8 °C ou congelé à -20 °C. Les échantillons d'un même malade prélevés à 15 jours d'intervalle doivent être traités simultanément.

7 - PREPARATION ET CONSERVATION DES REACTIFS

- Les réactifs conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.
- Les milieux UMMMyo (+ 2 mL UMMt) sont à régénérer par les milieux UMMt (2 mL).
- Le flacon de souches U.u. et M.h. est à reconstituer avec 1 mL d'eau distillée stérile. Bien homogénéiser doucement par retournement. Ne pas conserver après utilisation.
- Le flacon du contrôle positif est à reconstituer avec 1 mL d'eau distillée stérile. Homogénéiser. Ne pas conserver le flacon.

8 - MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

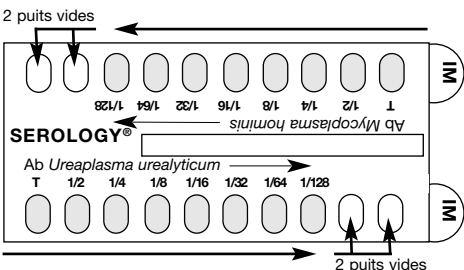
- Pipettes stériles
- Eau distillée stérile
- Huile de paraffine
- Etuve calibrée à 37 °C
- Récipients pour déchets contaminés

9 - MODE OPERATOIRE

Equilibrer les réactifs à température ambiante (18-25 °C).

9.1. Préparation et distribution de la suspension

- Inoculer le milieu UMMMyo régénéré avec 400 µL de la suspension de germes (Souches U.u / M.h.).
- Identifier chaque galerie, soulever l'adhésif puis distribuer 100 µL du réactif ainsi préparé dans chacun des 8 premiers puits de la série U.u. et des 8 premiers puits de la série M.h. Il est inutile de remplir les deux derniers puits vides de chaque côté.



9.2. Distribution du sérum à tester (ou du contrôle positif)

- Introduire 100 µL de sérum dans le deuxième puits d'une des deux séries de puits. Reprendre 100 µL de liquide dans le puits 2, les ajouter au puits 3 et continuer les dilutions en cascade jusqu'au puits 8 (1/128). Rejeter les derniers 100 µL.
- Répéter la même opération avec la deuxième série de puits.
- Lors de la toute première utilisation du coffret ensemencer une galerie SEROLOGY en remplaçant dans les deux séries de puits le sérum à tester par le contrôle positif.
- Distribuer 2 gouttes d'huile de paraffine dans chaque puits de la galerie.
- Recouvrir la galerie à l'aide de l'adhésif.

9.3. Incubation de la galerie

- Incuber la galerie SEROLOGY à 37 °C pendant 24 heures (48 heures si nécessaire) (§10.1).
- Pour le contrôle positif des réactifs, incuber la galerie seulement 24 heures.

10 - LECTURE ET INTERPRETATION

10.1. Validation

Vérifier que le contenu des puits est limpide.

Ne lire les séries de puits que lorsque les témoins (puits T) de contrôle de croissance sont positifs:

U.u.: Virage du jaune au rouge à fuschia,

M.h.: Virage du jaune au rouge-orangé à fuschia.

- Samples and inoculated reagents are potentially infectious and must be handled with caution, in observance of hygiene rules and the current regulations for this type of product in the country of use.
- The UMMt and UMMMyo media, as well as the positive control contain raw materials of animal origin and must be handled with caution.
- The U.u./M.h. vials contain group 2 bacteria (*M. hominis*) and must be handled with caution. Risk of contamination by a biological agent.
- Do not use reagents after the expiry date.
- Do not use reagents that have been damaged or that have been poorly preserved before use.
- After opening the kit, only remove from the refrigerator the reagents required. The U.u./M.h. strains are sensitive to heat and to variations in temperature.
- A positive result with the SEROLOGY method should not be used in isolation to reach a clinical diagnosis. A doctor, taking into account the biological results and the clinical symptoms should carry this out.

6 - SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

- Collect the blood sample in a plain, non-additive, tube.
- Centrifuge for 10 minutes at x2500g.
- Collect the serum.

The serum can be stored for 3 hours at 2 to 8 °C or frozen at -20 °C. Specimens from the same patient taken at an interval of 15 days must be tested simultaneously.

7 - PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- The reagents, stored at 2 to 8 °C in their original packaging, are stable until the expiry date shown on the kit.
- The UMMMyo (+ 2 mL UMMt) should be regenerated with the UMMt medium (2 mL).
- The vial of U.u. and M.h. strains should be reconstituted with 1 ml of sterile distilled water. Mix well by gently inverting the vial. Do not conserve after use.
- The positive control vial should be reconstituted with 1 mL of sterile distilled water. Mix well. Do not conserve the vial after use.

8 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Sterile pipettes
- Sterile distilled water
- Paraffin oil
- Incubator calibrated to 37 °C
- Waste container for contaminated waste

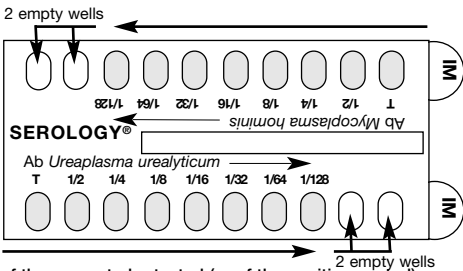
9 - METHOD

Allow the reagents to reach room temperature (18 to 25 °C) before use.

9.1. Preparation and distribution of the suspension

- Inoculate the regenerated UMMMyo medium with 400 µL of the germ suspension (U.u./M.h. strains).

- Label each tray, lift up the adhesive film, then add 100 µL of prepared reagent to each of the 8 wells of the U.u. row and of the M.h. row. The last 2 wells of each row (empty wells) don't need to be filled.



9.2. Distribution of the serum to be tested (or of the positive control)

- Add 100 µL of serum to the second well of one of the two rows of wells. Serial dilute 100 µL of liquid from well 2 into well 3 and continue in this way for each well through to well 8 (1/128). Discard the extra 100 µL from well 8.
- Repeat the same operation for the second row of wells.
- Before using the kit to test patient serum, the wells of the two rows of the SEROLOGY tray should be inoculated with the positive control.
- Add 2 drops of paraffin oil to each well of the tray
- Cover the tray with the adhesive film.

9.3. Incubation of the tray

- Incubate the SEROLOGY tray for 24 hours (48 hours if necessary) (§10.1) at 37 °C.
- The reagent positive control tray should only be incubated for 24 hours.

Le temps d'incubation des deux souches est indépendant, il dépend du virage du milieu dans le puits T de chaque série.

10.2. Lecture

La présence d'anticorps se traduit par une absence de virage du milieu. En l'absence d'anticorps le milieu devient rouge-orangé ou fuschia. Le taux d'anticorps correspond à la plus forte dilution inhibée (dernier puits jaune).

10.3. Interprétation

L'interprétation doit être effectuée à partir de deux échantillons prélevés à 15 jours d'intervalle et testés simultanément. Seule une variation du taux des anticorps entre ces deux échantillons supérieure ou égale à 2 dilutions est significative d'une infection évolutive.

11 - CONTROLE QUALITE

11.1. Contrôle positif des réactifs

Le contrôle de bon fonctionnement des réactifs doit être fait à réception du coffret en utilisant le flacon de contrôle positif à la place d'un sérum. La lecture se fait après une incubation de 24 heures. Le titre attendu pour les deux séries de la galerie est spécifié sur l'étiquette.

Note: Le titre du contrôle positif du coffret, noté sur l'étiquette, peut varier d'une dilution.

11.2. Témoin positif du test

La croissance de la souche dans le premier puits (T) de chaque série U.u. et M.h. valide le test (§10.1).

12 - LIMITES DE LA METHODE

- Les malades prélevés ne doivent pas être sous traitement antibiotique. La présence d'antibiotiques dans le sérum peut inhiber la multiplication des mycoplasmes et entraîner des taux faussement élevés.
- L'interprétation doit être effectuée à partir de deux échantillons prélevés à 15 jours d'intervalle et testés simultanément.
- La sérologie des mycoplasmes ne doit en aucun cas se substituer à la culture pour faire preuve d'une infection ou d'un déséquilibre de la flore.

13 - CAUSES D'ERREURS

- Mauvaise conservation du sérum.
- Mauvaise conservation des réactifs du coffret, en particulier des souches U.u./M.h.
- Température d'incubation inférieure à 35 °C ou supérieure à 37 °C.
- Lecture des résultats avant le virage du puits T de témoin de croissance du côté U.u. et/ou M.h.

14 - PERFORMANCES

Une étude comparative a été réalisée avec le réactif SEROLOGY et le réactif MYCOKIT SERO de PBS ORGENICS à partir de 100 sérums humains testés en routine (64 sérums négatifs en anticorps anti-U.u. et anti-M.h., 28 sérums positifs en anticorps anti-U.u. et anti-M.h., 6 sérums positifs en anticorps anti-U.u. et négatifs en anticorps anti-M.h. et 2 sérums négatifs en anticorps anti-U.u. et positifs en anticorps anti-M.h. Les deux méthodes utilisent le même principe d'inhibition du métabolisme. La lecture de la galerie SEROLOGY a été réalisée après 48 heures d'incubation :

- Pour la détection des anticorps anti-U.u. la sensibilité est de 88,2% et la spécificité de 100%. Les 4 faux négatifs correspondaient à des sérums positifs à des dilutions de 1/2 et 1/4.

- Pour la détection des anticorps anti-M.h. la sensibilité est de 96,6% et la spécificité de 98,5%.

- Pour la détermination du titre les résultats de l'étude ont montré 92,5% de concordance quelque soit l'écart dans le titre et 97,5% de concordance pour un titre à une dilution près

15 - ELIMINATION DES DECHETS

Les déchets doivent être éliminés en respectant les règles d'hygiène et la réglementation en vigueur pour ce type de réactifs dans le pays d'utilisation.

16 - BIBLIOGRAPHIE

1. ESCARGUEL C. et G. PAPIEROK. 1988. La sérologie des mycoplasmes uro-génitaux, Spectra Biologie, 88, 39-42.
2. LIN J.S. and KASS E.H. 1974. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: difference among mycoplasmae metabolic inhibition and growth agglutination tests, Infect. Immunity, 10, 535-540.
3. TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MANDELL G. L., BENNET J. E. and DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

MYCOFAST® est une marque déposée de ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19, allée d'Athènes

83870 SIGNES

FRANCE

Tél. : 04 94 88 55 00

Fax : 04 94 88 55 22

10 - READING AND INTERPRETATION

10.1. Validation

Verify that the contents of the wells are limp.

Do not read the tray unless the growth controls (T wells) are positive:

U.u.: Colour change from yellow to red or fuschia.

M.h.: Colour change from yellow to orangey-red or fuschia.

The incubation times of the two strains are independent and depend upon the colour change of the medium in the T wells of each row.

10.2. Reading of the tray

The presence of antibodies is determined by the absence of a colour change of the medium. In the absence of antibodies the medium becomes orangey-red or fuschia coloured. The strongest inhibited dilution (the last yellow well) represents the titre of antibodies.

10.3. Interpretation

Interpretation must be based upon the testing of two specimens taken at an interval of 15 days and tested simultaneously. Only a variation in antibody titre of these specimens, greater or equal to 2 dilution's, is any indication of a progressive infection.

11 - QUALITY CONTROL

11.1. Reagent positive control

Verification of the reagents must be carried out upon reception of the kit using the positive control vial in the place of serum. Reading of the results is carried out after incubation for 24 hours. The expected titre for the two rows of the tray is specified on the label.

Note: The titre of the kit's positive control, as specified on the label, can vary by one dilution.

11.2. Test positive control

The growth of the strain in the first well (T) of each U.u. and M.h. row validates the test (§10.1).

12 - LIMITS OF THE METHOD

● The patients whose samples are to be tested should not be under antibiotic treatment. The presence of antibiotics in the serum can inhibit the multiplication of the mycoplasmas and lead to misleadingly elevated levels.

● Interpretation must be based upon the testing of two specimens taken at an interval of 15 days and tested simultaneously.

● The serological testing of mycoplasma must not under any circumstances be

SEROLOGY

Quantitativa Detektion der Antikörper Anti-*Ureaplasma urealyticum* und Anti-*Mycoplasma hominis*

14 Tests (REF 00014)
120 Tests (REF 00097)

DE-2010-09

1 - ZIEL
Das SEROLOGY Kit, ermöglicht die quantitative Detektion von Antikörpern aus dem Serum, welche gegen die häufigsten urogenitalen Mykoplasmen gerichtet sind, *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) und *Mycoplasma hominis* (M.h.). Kits zu 14 - oder 120 Tests erhältlich.

2 - EINLEITUNG
Mykoplasmen sind empfindliche, zellwandlose Keime, welche hohe Ansprüche an die Wachstumsbedingungen stellen. Sie besitzen ein starkes Haftvermögen und sind oft Bestandteil der Normalflora. Die häufigsten Arten sind *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma hominis*. U.u. oder M.h..Oft werden sie sexuell übertragen und können Krankheitserreger werden. In Anbetracht des schwach immunogenen Charakters der Mykoplasmen, ersetzt die Serologie die Diagnose von der Probeentnahme nicht. Die Serologie der urogenitalen Mykoplasmen wird besonders dann durchgeführt, wenn eine tiefe Infektion des Urogenitaltraktes diagnostiziert werden soll, wie z. Bsp. Eileiterezündungen oder Prostataentzündungen. Die Technik der Stoffwechsellagerung, die gefriergetrocknete Reagenzien und Referenzstämmen benutzt, ist für spezialisierte Laboratorien nicht angemessenen (1).

3 - PRINZIP
Die quantitative Aufspürung der Antikörper Anti-U.u und/oder Anti-M.h werden mittels Stoffwechsellagerung durchgeführt (2). Die Reaktion erfolgt in den Vertiefungen eines Trays mit Lincomycin auf der *U. urealyticum*-Seite und mit Erythromycin auf der *M. hominis*-Seite. Die ersten acht Vertiefungen auf jeder Trayseite werden mit einer UMM-Nährlösung inokuliert, die einen pH-Indikator enthält und im Voraus durch eine bestimmte U.u und M-h Stammmenge, beimpft wurde. Das zu testende Serum wird in den verschiedenen Vertiefungen der Galerie durch eine regelmäßige Verdünnung, hinzugefügt. Die eventuell vorhandenen Antikörper, hemmen die Vermehrung der Mykoplasmen, die Farbe des Mediums bleibt in diesem Fall gelb. Bei fehlenden Antikörpern wachsen die Mykoplasmen und bauen den Harnstoff und/oder das Arginin, welches im Medium vorhanden ist ab, was in einem Farbumschlag von gelb nach rot-orange bis fuchsia führt. Für jede Testreihe wird eine Wachstumskontrolle mit U.u und M.h (Vertiefung 1, mit T markiert) durchgeführt.

Beschreibung	Menge	
	#00014	#00097
UMMt : Fläschchen von 2 mL Mykoplasmen Nährmedium in flüssiger Form	14	120
UMM.Iyo : Fläschchen von Wachstums-Nährmedium der Mykoplasmen in lyophilisierter Form (+ 2 mL UMMt)	14	120
U.u./M.h : Fläschchen, die lyophilisierte U.u. und M.h. Stämme enthalten.	14	120
SEROLOGY : Tray mit 20 Vertiefungen, in Aluminiumtütschen einzelverpackt.	14	120
Positive Kontrolle: Fläschchen, die eine bekannte Titerlösung , für die Reagenzienkontrolle enthält	1	5

Wiederhergestelltes Medium (UMMt+UMM.Iyo) - Zusammensetzung
Mykoplasmen Bouillon 20 g/L, Fohlenserum 200 mL, Hefeextrakt 5,8 g/L, Cystein 0,3 g/L, Arginin 9 g/L, Harnstoff 3,6 g/L, Phenolrot 0,04 g/L, Antibiotika 10 mL. pH: 6.1 ± 0.1
Stämme U.u/ M.h
Gefriergetrocknete Referenzstämmen: *U. urealyticum* Serumtyp 8 und *M. hominis* Stamm PG 21.
SEROLOGY Tray (§9.1)
Seitens des U.u.: Serie der 8 ersten Vertiefungen, die Lincomycin enthalten, ein spezifischen Hemmer für M.h.
Seitens des M.h.: Serie der 8 ersten Vertiefungen, die Erythromycin enthalten, ein spezifischen Hemmer für U.u.
Positive Kontrolle
Nährmedien für Mykoplasmen mit einer spezifischen Antibiotikamischung.

5 – VORSICHTSMASSNAHMEN
● Die Reagenzien dieses Kits sind, nur zur *in-vitro* Diagnostik bestimmt und müssen von geschultem Personal gehandhabt werden.
● Die Probeentnahmen und die beimpften Reagenzien sind möglicherweise infektiös, sie müssen mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden, unter Berücksichtigung der Hygieneregeln und der Bestimmungen des Benutzungslandes für diese Produktarten.
● Die Nährmedien UMMt und UMM.Iyo und die positive Kontrolle enthalten Rohstoffe tierischen Ursprungs und müssen mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden.
● Die Fläschchen U.u/ M.h enthalten Bakterien der Gruppe 2 (*M. hominis*) und müssen mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Ansteckungsrisiko durch einen biologischen

SEROLOGY

Rilevamento quantitativo degli anticorpi anti-*Ureaplasma urealyticum* e anti-*Mycoplasma hominis*

14 Test (REF 00014)
120 Test (REF 00097)

IT-2010-09

1 - SCOPO
Il kit SEROLOGY permette il rilevamento quantitativo degli anticorpi diretti contro i principali micoplasmi urogenitali, *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) e *Mycoplasma hominis* (M.h.), partendo dal siero. Un kit permette di effettuare 14 test o 120 test.

2 - INTRODUZIONE
I micoplasmi sono germi fragili sprovvisti di parete, esigenti nei fattori di crescita, dotati di forte potere di aderenza e molto frequenti allo stato commensale. Le specie riscontrate con maggiore frequenza sono specie isolate a partire dal tratto uro-genitale, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. U.u. o M.h. vengono trasmessi per via sessuale e si possono comportare come veri e propri patogeni. Dato il carattere scarsamente immunogeno dei micoplasmi, la sierologia non sostituisce la diagnosi diretta effettuata partendo dal prelievo. La sierologia dei micoplasmi urogenitali viene usata soprattutto per diagnosticare un'infezione genitale profonda, come la salpingite o la prostatite. La tecnica più indicata (1) per i laboratori non specializzati è la tecnica dell'inibizione del metabolismo usando reagenti liofilizzati e ceppi di riferimento.

3 - PRINCIPIO
Il rilevamento quantitativo degli anticorpi anti-U.u e/o anti-M.h avviene mediante la tecnica di inibizione metabolica (2). La reazione avviene nei pozzetti di una galleria contenente dal lato *U. urealyticum* della lincomicina e dal lato *M. hominis* dell'eritromicina. I primi otto pozzetti, da ogni lato della galleria, sono inoculati da un mezzo di cultura UMM contenente un indicatore di pH e precedentemente inseminato con una quantità determinata di ceppi U.u e M.h.
Il siero da esaminare viene aggiunto nei vari pozzetti della galleria mediante diluizioni a cascata. Gli anticorpi eventualmente presenti inibiscono la moltiplicazione dei micoplasmi, e il mezzo risulta di colore giallo. In assenza di anticorpi, i micoplasmi invece si moltiplicano, degradano l'urea e/o l'arginina presenti nel mezzo provocando un cambiamento del colore del mezzo, dal rosso aranciato al fucsia. Per ogni serie di test U.u e M.h viene effettuato un controllo della crescita (pozzetto 1, sigla T) al fine di verificare la vitalità dei ceppi di U.u e M.h. e il corretto svolgimento del test.

Descrizione	Quantità	
	#00014	#00097
UMMt : Flacone da 2 mL di terreno di base dei micoplasmi sotto forma liquida	14	120
UMM.Iyo : Flacone di terreno di crescita dei micoplasmi sotto forma liofilizzata (+ 2 mL UMMt)	14	120
U.u./M.h : Flacone contenente ceppi liofilizzati <i>U. urealyticum</i> e <i>M. hominis</i>	14	120
SEROLOGY : Galleria da 20 pozzetti confezionata individualmente in busta di alluminio	14	120
Controllo positivo : Flacone contenente una soluzione liofilizzata di titolo conosciuto per il controllo dei reagenti	1	5

Terreno ricostituito (UMMt+UMM.Iyo) – Composizione
Brodio Micoplasmi 20 g/L, Siero di puldetro 200 mL, Estratto di lieviti 5,8 g/L, Cisteina 0,3 g/L, Arginina 9 g/L,Urea 3,6 g/L, Rosso di fenolo 0,04 g/L, Antibiotici 10 mL. pH : 6.1 ± 0.1
Ceppi U.u / M.h
Ceppi di riferimento liofilizzati: *U. urealyticum* sierotipo 8 e *M. hominis* ceppo PG 21.
Galleria SEROLOGY (§9.1)
Lato U.u. Serie dei primi 8 pozzetti contenenti lincomicina come inibitore specifico di *M. hominis*.
Lato M.h.: Serie dei primi 8 pozzetti contenenti eritromicina come inibitore specifico di *U. urealyticum*.
Controllo positivo
Terreno per micoplasmi con una miscela di antibiotici specifici.

5 - PRECAUZIONI D'IMPIEGO
● I reagenti del kit sono destinati unicamente alla diagnosi *in vitro* e vanno manipolati da personale abilitato.

Erreger.
● Die Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus benutzen.
● Vor der Benutzung beschädigte oder schlecht aufbewahrte Reagenzien nicht verwenden.
● Nach dem ersten Öffnen des Kits, nur die notwendigen Reagenzien aus dem Kühlschrank herausnehmen. Die U.u./M.h Stämme sind hitze- und temperaturempfindlich.
● Ein positives Ergebnis mit der SEROLOGY Methode kann nicht allein, zu einer klinischen Diagnose führen. Diese muss vom Arzt gemäss den Ergebnissen und der Klinik zusammen gedeutet werden.

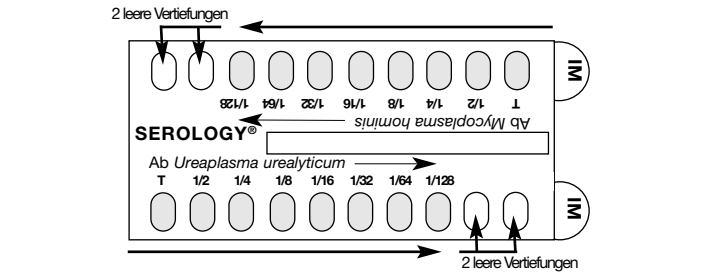
6 - SAMMLUNG UND PROBEN-BEHANDLUNG
- Das zu testende Blut mit trockenen Röhrchen entnehmen.
- 10 Minuten bei x2500g zentrifugieren.
- Das Serum sammeln. Das Serum kann 3 Stunden bei 2-8 °C aufbewahrt oder bei -20 °C tiefgekühlt werden. Die Stichproben ein und desselben Patienten, die in15 Tagen Intervall entnommen wurden, müssen gleichzeitig behandelt werden.

7 - VORBEREITUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN
● Die bei 2-8 °C aufbewahrten Reagenzien in ihrer Originalverpackung sind bis zum Verfallsdatum, das auf dem Kit angegeben ist, stabil.
● Die UMM.Iyo-Nährmedien (+ 2 mL UMMt), sind mit den UMMt-Nährmedien (2 mL) wiederherzustellen.
● Das Fläschchen der U.u und M.h Stämme ist, mit 1mL sterilern destillierten Wassers wiederherzustellen. Sachte, durch umkippen, gut mischen. Nach Benutzung nicht aufbewahren.
● Das Fläschchen der positiven Kontrolle ist mit 1 mL sterilen destillierten Wassers wiederherzustellen. Gut mischen. Das Fläschchen nicht aufbewahren.

8 - ERFORDERLICHES, ABER NICHT DELIEFERTES MATERIAL
● sterile Pipetten
● steriles destilliertes Wasser
● Paraffinöl
● Brutschrank auf 37 °C geeicht
● Gefässe für infektiöse Abfälle

9 - DURCHFÜHRUNG
Reagenzien auf Zimmertemperatur (18-25 °C) bringen.

9.1. Vorbereitung und Verteilung der Suspension
- Das wiederhergestellte UMM.Iyo-Medium mit 400µl der Keimsuspension beimpfen (U.u/ M.h Stämme).
- Jede Galerie identifizieren, den Klebestreifen ablösen, 100 µL des vorbereiteten Reagenz in jeder der Vertiefung der Serie U.u und der Serie M.h verteilen.
100 µL der zubereiteten Lösung in jede der 8 ersten Vertiefungen der U.u.-Serie verteilen und in jeden der 8 ersten Vertiefungen der M.h.-Serie. Eine Beimpfung der beiden letzten leeren Vertiefungen ist nicht nötig.



9.2. Verteilung des zu testenden Serums (oder der positiven Kontrolle)
- 100 µL Serum in die zweite Vertiefung von einer der zwei Vertiefungsreihen einfügen. 100 µL Flüssigkeit aus der 2. Vertiefung herauspipettieren und in die 3 Vertiefung füllen. Mit der stufenweisen Verdünnung bis zur 8. Vertiefung fortfahren (1/128). Die letzten 100 µL verwerfen.
- Dasselbe mit der zweiten Reihe der Vertiefungen wiederholen.
- Bei allererster Verwendung des Kits eine SEROLOGY Reihe beimpfen, indem man in den zwei Vertiefungsreihen das zu testende Serum durch die positive Kontrolle ersetzt.
- 2 Tropfen Paraffinöl in jede Vertiefung der Galerie verteilen.
- Die Galerie mit der Klebefolie wieder zudecken.

9.3. Inkubation der Galerie
- Die SEROLOGY Galerie bei 37°C während 24 Stunden (48 Stunden wenn nötig (§10.1)) inkubieren.
- Für die positive Kontrolle des Reagenzes, die Galerie nur 24 Stunden inkubieren.

10 – ABLESUNG UND INTERPRETATION
10.1. Bestätigung
Prüfen, dass der Inhalt der Vertiefungen klar und durchsichtig ist. Die Vertiefungsreihen nur ablesen, wenn die Wachstumskontrolle (T Vertiefung) positiv ist: U.u.: Umfärbung von Gelb zu Rot bis Fuchsia, M.h.: Umfärbung von Gelb zu Rot-Orange bis Fuchsia. Die Inkubationszeit der zwei Stämme ist voneinander unabhängig. Sie hängt von der Umfärbung des Mediums in der jeweiligen T-Vertiefung ab.

10.2. Ablesung
Die Anwesenheit von Antikörpern äussert sich in einer Farbänderung des Mediums. Bei Abwesenheit des Antikörpers verfärbt sich das Medium Rot-Orange bis Fuchsia. Der Antikörperprozentatz entspricht der stärksten hemmenden Verdünnung (letzte gelb gebliebene Vertiefung).

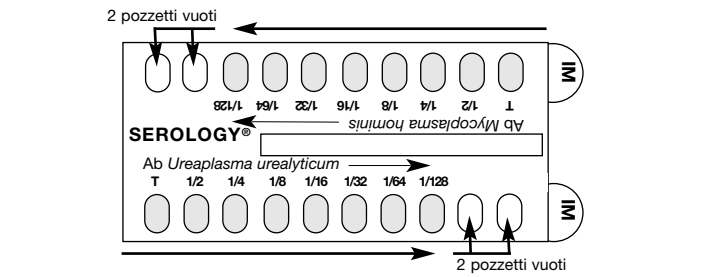
● I prelievi e i reagenti inseminati sono potenzialmente infetti e devono essere manipolati adottando precauzioni d'impiego adeguate e osservando la regolamentazione e le norme di igiene vigenti nei paesi in cui viene impiegato questo tipo di prodotto.
● I terreni UMMt e UMM.Iyo e il controllo positivo contengono materie prime di origine animale e devono essere manipolati adottando adeguate precauzioni d'impiego.
● I flaconi U.u / M.h contengono batteri del gruppo 2 (*M. hominis*) e devono essere manipolati adottando adeguate precauzioni d'impiego. Rischio di contaminazione da agente biologico.
● Non usare i reagenti oltre la data di scadenza.
● Non usare i reagenti danneggiati o mal conservati prima dell'uso.
● Dopo la prima apertura del kit, togliere dal frigorifero solo i reagenti necessari. I ceppi U.u./M.h sono sensibili al calore e alle variazioni di temperatura.
● Un risultato positivo ottenuto con il metodo SEROLOGY, da solo, non può servire per una diagnosi clinica. La diagnosi clinica deve essere fatta dal medico in funzione dei risultati biologici e dei segni clinici.

6 - RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI
- Prelevare il sangue da esaminare in una provetta asciutta.
- Centrifugare per 10 minuti a x2500g.
- Raccogliere il siero.
Il siero può essere conservato per 3 ore a 2-8 °C o congelato a -20 °C. I campioni di uno stesso paziente prelevati a 15 giorni di intervallo devono essere trattati contemporaneamente.

7 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI
● I reagenti conservati a 2-8 °C nel loro stato di origine sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.
● I terreni UMM.Iyo (+2 mL UMMt) vanno rigenerati con i terreni UMMt (2 mL).
● Il flacone di ceppi U.u e M.h va ricostituito con 1mL di acqua distillata sterile. Omogeneizzare delicatamente girando il recipiente. Non conservare dopo l'uso.
● Il flacone del controllo positivo va ricostituito con 1 mL di acqua distillata sterile. Omogeneizzare. Non conservare il flacone.

8 - MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO
● Pipette sterili
● Acqua distillata sterile
● Olio di paraffina
● Stufa calibrata a 37 °C
● Recipienti per rifiuti contaminati

9 - PROCEDIMENTO
Equilibrare i reagenti a temperatura ambiente (18-25 °C).
9.1. Preparazione e distribuzione della sospensione
- Inoculare il terreno UMM.Iyo rigenerato con 400 µL della sospensione di germi (Ceppi U.u / M.h).
- Identificare ogni galleria, sollevare l'adesivo, quindi distribuire 100 µL del reagente preparato in ognuno dei primi 8 pozzetti della serie U.u e dei primi 8 pozzetti della serie M.h. È inutile riempire gli ultimi due pozzetti vuoti da ogni lato.



9.2. Distribuzione del siero da esaminare (o del controllo positivo)
- Introducere 100 µL di siero nel secondo pozzetto di una delle due serie di pozzetti. Prendere 100 µL di liquido nel pozzetto 2, aggiungerli al pozzetto 3 e continuare le diluizioni a cascata fino al pozzetto 8 (1/128). Gettare gli ultimi 100 µL.
- Ripetere la stessa operazione con la seconda serie di pozzetti.
- La prima volta che si usa il kit, inseminare una galleria SEROLOGY sostituendo nelle due serie di pozzetti il siero da esaminare con il controllo positivo.
- Distribuire 2 gocce di olio di paraffina in ogni pozzetto della galleria.
- Ricoprire la galleria con un adesivo.

9.3. Incubazione della galleria
- Incubare la galleria SEROLOGY a 37 °C per 24 ore (48 ore se necessario (§10.1)).
- Per il controllo positivo dei reagenti, incubare la galleria per sole 24 ore.

10.3. Interpretation
Die Interpretation muss von zwei Probeentnahmen durchgeführt werden, welche im Intervall von 15 Tagen entnommen wurden und gleichzeitig getestet wurden. Einzig eine Abweichung des Antikörperprozentatzes zwischen diesen zwei Probeentnahmen (höher oder gleich wie 2 Verdünnungen) ist bedeutend für eine sich entwickelnde Infektion.

11 - QUALITÄTSKONTROLLE
11.1. Positive Kontrolle der Reagenzien
Die Kontrolle der guten Funktion der Reagenzien muss beim Empfang des Kits gemacht werden, indem man das positive Kontrollfläschchen an der Stelle eines Serums benutzt. Die Ablesung erfolgt nach einer Inkubation von 24 Stunden. Der Titer, der für die zwei Serien der Galerie erwartet wird, ist auf dem Etikette angegeben.
Notiz: Den Titer der positiven Kontrolle welcher auf der Etikette angegeben ist, kann um eine Verdünnung abweichen.

11.2. Wachstumskontrolle
Das Wachstum des Stammes in der ersten Vertiefung (T) von jeder Reihe U.u und/oder M.h bestätigt den Test (§10.1).

12 – GRENZEN DER METHODE
● Die Patienten sollten nicht mit Antibiotika behandelt werden. Das Vorhandensein von Antibiotika im Serum kann die Vermehrung der Mykoplasmen hemmen und falsch hohe Prozentsätze zur Folge haben.
● Die Interpretation muss von zwei Probeentnahmen durchgeführt werden, die im Intervall von 15 Tagen entnommen und gleichzeitig getestet worden sind.
● Die Serologie der Mykoplasmen, um den Nachweis einer Infektion oder einer Gleichgewichtsstörung der Normalflora zu erbringen soll in keinem Falle die Kultur ersetzen.,

13 – FEHLER-URSACHEN
● Falsche Lagerung des Serums.
● Falsche Lagerung der Reagenzien des Kits, insbesondere der Stämme U.u/M.h.
● Temperatur der Inkubation lag unter 35 °C oder über 37 °C.
● Ablesung der Ergebnisse vor der Farbveränderung der T-Vertiefung, des Wachstumszeugs von der U.u und/oder M.h Seite.

14 - LEISTUNGEN
Eine Vergleichsstudie wurde mit dem SEROLOGY Reagenz und das Reagenz MYCOKIT SERO von PBS Organics, mit 100 menschlichen Seren durchgeführt, die Routinemässig getestet wurden (64 negative Seren ohne Antikörper Anti-U.u. und Anti-M.h., 28 positive Seren mit Antikörpern Anti-U.u. und Anti-M.h., 6 positive Seren mit Antikörpern Anti-U.u. und negativ mit Anti-M.h Antikörpern und 2 negative Seren mit Antikörpern Anti-U.u. und positiv in Anti-M.h Antikörpern). Die beiden Methoden benutzen dasselbe Prinzip der Stoffwechsellagerung. Die Ablesung der SEROLOGY Reihe wurde nach 48 Stunden Inkubation durchgeführt:
- Für die Aufspürung der Antikörper Anti-U.u. beträgt die Sensitivität 88,2% und die Spezifität von 100%.
Die vier falsch-negativen Resultate entsprachen positivem Serum mit Verdünnungen von 1/2 und 1/4.
- Für die Aufspürung der Antikörper Anti-M.h. beträgt die Sensitivität 96,6% und die Spezifität 98,5%.
- Für die Bestimmung des Titers haben die Ergebnisse der Studie 92,5% Übereinstimmung gezeigt ungeachtet der Titerabweichung und 97,5% einer Übereinstimmung für einen Titer einer Verdünnung.

15 – ABFALLBESEITIGUNG
Die Abfälle müssen nach den gesetzlichen Regeln, welche für diese Produkte im Benutzungsland gelten, beseitigt werden.

16 - BIBLIOGRAPHIE
1. ESCARGUEL C. et G. PAPIEROK. 1988. La sérologie des mycoplasmes uro-génitiaux, Spectra Biologie, 88, 39-42.
2. LIN J.S. and KASS E.H. 1974. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: difference among mycoplasmic acid metabolic inhibition and growth agglutination tests, Infect. Immunity, 10, 535-540.
3. TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MANDELL G. L. , BENNET J. E. and DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

MYCOFAST® ist ein Warenzeichen von ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
Tél. : 33 (0)4 94 88 55 00
Fax : 33 (0)4 94 88 55 22



10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE

10.1. Convalida
Verificare che il contenuto dei pozzetti sia limpido.
Leggere le serie di pozzetti solo quando i campioni (pozzetti T) di controllo della crescita risultano positivi:
U.u.: passaggio dal giallo al rosso al fucsia.
M.h.: passaggio dal giallo al rosso-aranciato al fucsia.
Il tempo di incubazione per i due ceppi è indipendente, e dipende dal cambiamento di colore del terreno nel pozzetto T di ogni serie.
10.2. Lettura
La presenza di anticorpi porta all'assenza di cambiamenti nel colore del terreno. In assenza di anticorpi, il terreno diventa rosso-aranciato o fucsia. Il tasso di anticorpi corrisponde alla diluizione più forte inibita (ultimo pozzetto giallo).
10.3. Interpretazione
L'interpretazione va effettuata partendo da due campioni prelevati a 15 giorni di intervallo ed esaminati contemporaneamente. Solo una variazione nel tasso di anticorpi tra i due campioni superiore o pari a 2 diluizioni indica un'infezione evolutiva.

11 - CONTROLLO QUALITA'
11.1. Controllo positivo dei reagenti
Il controllo del corretto funzionamento dei reagenti va fatto al ricevimento del kit usando il flacone di controllo positivo al posto di un siero. La lettura va fatta dopo un'incubazione di 24 ore. Il titolo previsto per le due serie della galleria è specificato sull'etichetta.
Nota: Il titolo del controllo positivo del kit, indicato sull'etichetta, può variare di una diluizione.
11.2. Campione positivo del test
La crescita del ceppo nel primo pozzetto (T) di ogni serie U.u e M.h convalida il test (§10.1).

12 - LIMITI DEL METODO
● I pazienti esaminati non devono essere sottoposti a trattamento antibiotico. La presenza di antibiotici nel siero può inibire la moltiplicazione dei micoplasmi e causare tassi falsamente elevati.
● L'interpretazione va effettuata partendo da due campioni prelevati a 15 giorni di distanza ed esaminati contemporaneamente.
● La sierologia dei micoplasmi non deve in alcun caso sostituirsi alla coltura per dimostrare un'infezione o uno squilibrio della flora.

13 - CAUSE DI ERRORI
● Cattiva conservazione del siero.
● Cattiva conservazione dei reagenti del kit, in particolare dei ceppi U.u./M.h.
● Temperatura di incubazione inferiore a 35 °C o superiore a 37 °C.
● Lettura dei risultati prima del cambiamento di colore del pozzetto T campione della crescita sul lato U.u e/o M.h.

14 - PRESTAZIONI
Uno studio comparativo è stato effettuato con il reagente SEROLOGY e il reagente MYCOKIT SERO di PBS ORGANICS partendo da 100 campioni di siero umano esaminati in routine (64 sier negativi in anticorpi anti-U.u. e anti-M.h., 28 sier positivi in anticorpi anti-U.u. e anti-M.h., 6 sier positivi in anticorpi anti-U.u. e negativi in anticorpi anti-M.h. e 2 sier negativi in anticorpi anti-U.u. e positivi in anticorpi anti-M.h. I due metodi applicano lo stesso principio di inibizione del metabolismo. La lettura della galleria SEROLOGY è stata effettuata dopo 48 ore di incubazione:
- Per il rilevamento di anticorpi anti-U.u., la sensibilità è pari all'88,2% e la specificità è del 100%.
I 4 falsi negativi corrispondevano a sier positivi a diluizioni di 1/2 e 1/4.
- Per il rilevamento degli anticorpi anti-M.h., la sensibilità è del 96,6% mentre la specificità è del 98,5%.
- Per la determinazione del titolo i risultati dello studio hanno mostrato un 92,5% di concordanza indipendentemente dallo scarto nel titolo e un 97,5% di concordanza per un titolo ad una diluizione.

15 – SMALTIMENTO DEI RIFIUTI
I rifiuti devono essere smaltiti rispettando le regole di igiene e la regolamentazione in vigore per questo tipo di reagenti nel paese in cui vengono utilizzati.

16 - BIBLIOGRAFIA
1. ESCARGUEL C. et G. PAPIEROK. 1988. La sérologie des mycoplasmes uro-génitiaux, Spectra Biologie, 88, 39-42.
2. LIN J.S. and KASS E.H. 1974. Serological reactions of *Mycoplasma hominis*: difference among mycoplasmic acid metabolic inhibition and growth agglutination tests, Infect. Immunity, 10, 535-540.
3. TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MANDELL G. L. , BENNET J. E. and DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

MYCOFAST® è un marchio registrato da ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
Tél. : 33 (0)4 94 88 55 00
Fax : 33 (0)4 94 88 55 22

