

MYCOFAST® Revolution 2

Diagnostic des mycoplasmes urogénitaux

Détection

Numération

Identification

Sensibilité aux antibiotiques

25 tests (REF 00080)

CPB 0410_FR-2018-03

Pour diagnostic *in vitro* uniquement, pour usage professionnel seulement



1 - BUT

Le coffret MYCOFAST *Revolution 2* permet la détection, la numération et l'identification de *Ureaplasma Urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (Uu) et de *Mycoplasma hominis* (Mh) à partir de différents prélèvements cliniques. Le coffret MYCOFAST *Revolution 2* permet en outre l'étude de la sensibilité de Uu et de Mh aux antibiotiques suivant les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institutes) (2)

2 - INTRODUCTION

Les mycoplasmes, qui comptent plusieurs espèces recensées à ce jour chez l'homme, appartiennent à la classe des mollicutes. Ils se différencient des autres bactéries sur de nombreux points, parmi lesquels l'absence de paroi qui leur confère une résistance naturelle aux β -lactamines, ainsi qu'une membrane riche en stérols provenant des membranes des cellules eucaryotes sur lesquelles ils se fixent. Les mycoplasmes sont des organismes relativement fragiles, qui ne se multiplient en milieu cellulaire qu'en présence de nombreux facteurs de croissance et à une température optimale de 37°C (4).

La plupart des mycoplasmes humains sont de simples commensaux. Des espèces isolées à partir du tractus urogénital, *U. urealyticum* et *M. hominis* sont les plus souvent retrouvées. L'espèce *U. urealyticum* est divisée en deux biovars : *U. urealyticum* et *U. parvum* (Uu).

Uu ou Mh peuvent se comporter comme de véritables pathogènes. Ils sont responsables d'infections génitales masculines (urétrites non gonococciques, épididymites, prostatites, infertilité); d'infection gynécologique (vaginose bactérienne, endométrites, salpingites); de troubles de la reproduction (chorioamnionites, endométrites post-partum, prématurité, avortement spontané); d'atteintes néonatales (faible poids de naissance, infections respiratoires, neurologiques, bactériémies, abcès); d'infections extragénitales (arthrites septiques, arthrites réactionnelles, autres localisations) (1).

Le diagnostic des infections à mycoplasmes dépend de la détermination d'un seuil pathologique et donc d'une numération. L'apparition de résistance de Uu et Mh à certaines molécules conduit à réaliser un test de sensibilité aux antibiotiques (5, 6). Les antibiotiques testés et les critères d'interprétation sont adaptés au traitement des infections à mycoplasmes au niveau du tractus urogénital ou d'autres sites extra-génitaux (2).

3 - PRINCIPE

MYCOFAST *Revolution 2* est une méthode en milieu liquide basée sur l'aptitude de Uu et de Mh à métaboliser respectivement l'urée et l'arginine. La croissance des mycoplasmes en milieu liquide est visualisée par le virage d'un indicateur coloré- le rouge de phénol - du jaune-orangé au rouge fuchsia qui traduit l'alcalinisation du milieu due à la libération d'ammoniaque.

La croissance des mycoplasmes ainsi visualisée permet :

- la numération basée sur la vitesse d'hydrolyse des substrats qui est proportionnelle à la quantité de germes contenus dans le prélèvement.
- l'étude de la sensibilité de Uu et Mh aux antibiotiques.

En cas de prélèvements mixtes (Uu + Mh), le test permet l'interpré-

tation des sensibilités de chaque espèce vis-à-vis des antibiotiques testés.

4 - REACTIFS

Description	Quantité
UMMt: Flacon de 3 mL de bouillon mycoplasmes avec antibiotiques et agent conservateur. pH: 6.0 $\pm$ 0.1.	25
MYCOFAST® Revolution 2 : Galerie de 24 puits conditionnée en sachet aluminium avec un dessiccant intégré.	25
Closing system: Couvercle protecteur de la galerie ensemencée, en plastique translucide.	25

La galerie MYCOFAST *Revolution 2* contient, sous forme déshydratée dans les 24 puits, le milieu de croissance des mycoplasmes (sérum de poulain, extrait de levures, cystéine, arginine, urée, rouge de phénol, antibiotiques, pH : 6.1 $\pm$ 0.1) et comprend 2 parties distinctes :

- la partie destinée à la numération et à l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques pour l'espèce Uu (puits inscrits en noir sur l'étiquette).
- la partie destinée à la numération et à l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques pour l'espèce Mh (puits inscrits en rouge sur l'étiquette).

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
DOX	LVX	MXF	CLI	TET					
4	8	1	2	0.25	0.5	0.25	0.5	4	8
MYCOFAST® Revolution 2									
Mh $\geq 10^4$									
Uu 10^3									
Uu 10^4	Uu $\geq 10^5$	2	4	2	4	8	16	1	2
		LVX		MXF		ERY		TET	
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Partie destinée au diagnostic de l'espèce Uu (en noir) :

Puits 1/2/3 : Identification et numération de Uu pour des taux de 10^3 , 10^4 et $\geq 10^5$ UCC/mL (solution tamponnée et lincomycine inhibant la croissance des Mh).

Puits 4/5 : Evaluation de la sensibilité de Uu à la Lévofoxacine (LVX) à 2 / 4 μ g/mL

Puits 6/7 : Evaluation de la sensibilité de Uu à la Moxifloxacine (MXF) à 2 / 4 μ g/mL

Puits 8/9 : Evaluation de la sensibilité de Uu à l'Erythromycine (ERY) à 8 / 16 μ g/mL

Puits 10/11 : Evaluation de la sensibilité de Uu à la Tétracycline (TET) 1-2 μ g/mL

Puits 12/13 : Evaluation de la sensibilité de Uu à la Doxycycline (DOX) 1-2 μ g/mL

Partie destinée au diagnostic de l'espèce Mh (en rouge) :

Puits 14 : Identification et numération de Mh pour des taux $\geq 10^4$ UCC/mL

Puits 15/16 : Evaluation de la sensibilité de Mh à la Doxycycline (DOX) 4-8 μ g/mL

Puits 17/18 : Evaluation de la sensibilité de Mh à la Lévofoxacine (LVX) 1-2 μ g/mL

Puits 19/20 : Evaluation de la sensibilité de Mh à la Moxifloxacine (MXF) 0.25-0.5 μ g/mL

Puits 21/22 : Evaluation de la sensibilité de Mh à la Clindamycine (CLI) 0.25-0.5 μ g/mL

Puits 23/24 : Evaluation de la sensibilité de Mh Tétracycline (TET) 4-8 μ g/mL

5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

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 réactifs contenant des matières premières d'origine animale doivent être manipulés avec les précautions d'usage.

Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.

Ne pas utiliser les réactifs endommagés ou mal conservés avant utilisation.

Un résultat positif avec la méthode MYCOFAST traduit une colonisation par les mycoplasmes urogénitaux, mais 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 TRAITEMENTS DES ECHANTILLONS

6.1 Recueil des échantillons

Prélèvements cervico-vaginaux

Utiliser uniquement un écouvillon Dacron ou rayonne, ou une cytobrosse. Effectuer le prélèvement après une élimination soigneuse des sécrétions de l'exocol à l'aide d'un premier écouvillon.

Les mycoplasmes ayant une forte affinité pour les cellules des muqueuses sur lesquelles ils adhèrent, il est essentiel de bien gratter la muqueuse afin d'obtenir un bon rendement.

Prélèvements urétraux

Nettoyer le méat et prélever par écouvillonnage ou grattage des cellules.

Sperme, urines

Récolter le sperme ou le premier jet d'urine dans un flacon stérile.

6.2 Transport en milieu UMMt

Prélèvements sur écouvillon sec: Décharger l'écouvillon dans un flacon de milieu UMMt 3 mL

Prélèvements liquides: Ensemencer un flacon de milieu UMMt 3 mL avec 300 μ L de liquide homogénéisé.

6.3 Conservation en milieu UMMt

Une fois ensemencé, le milieu UMMt peut être conservé à température ambiante (18-25 °C) pendant 20 heures, ou à 2-8 °C pendant 56 heures. Pour une conservation pendant 3 jours à -20 °C, rajouter au préalable 2 gouttes de "MYCOPLASMA Stabilizer".

7 - PREPARATION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi. Les réactifs conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

Le milieu UMMt peut être temporairement (3 mois) conservé à température ambiante mais présente une meilleure stabilité à 2-8 °C.

Ne pas congeler les réactifs du coffret.

8 - MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

Matériel pour prélèvement (écouvillons, cytobrosses, flacons stériles pour le recueil des prélèvements liquides), pipettes et cônes de transfert MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064); étuve calibrée à 37 $\pm$ 1 °C Récipient pour déchets contaminés et huile minérale

9 - MODE OPÉRATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante pendant 20 à 30 minutes.

9.1 Ensemencement de la galerie

Retirer le film adhésif en tirant sur la languette et distribuer successivement dans les puits:

puits 1-24 100 μ L de milieu UMMt ensemencé

puits 1-24 2 gouttes d'huile minérale

Recouvrir la galerie en enclenchant le couvercle "closing system".

Identifier le prélèvement.

Conserv l'excédent du flacon UMMt à 2-8 °C pendant au moins 48 heures afin de permettre une vérification éventuelle.

9.2 Incubation de la galerie

Incuber la galerie à 37 ± 1 °C pendant 24 heures.

Pour la numération des Uu et des Mh lire les résultats en 24 heures. L'incubation de la galerie peut être prolongée jusqu'à 48 heures uniquement dans le cas de prélèvements liquides négatifs en 24 heures.

10 - LECTURE ET INTERPRETATION

10.1 Validation

Vérifier que tous les puits de la galerie sont limpides. Un puits trouble indique une contamination bactérienne. Dans ce cas refaire une analyse.

10.2 Lecture et interprétation

La lecture des résultats se résume à l'identification des colorations obtenues dans les différents puits de la galerie. La croissance de mycoplasmes urogénitaux dans les puits se traduit par une alcalinisation du milieu qui vire au rouge. En l'absence de croissance des mycoplasmes urogénitaux, le milieu reste jaune.

Une coloration orangée doit être considérée comme un test positif (taux limite).

Dans le cas d'une lecture de résultat en 48h de prélèvement liquide ayant un test négatif en 24 h, rendre uniquement la présence du mycoplasme détecté sans numération.

Se référer à la fiche de résultats pour l'interprétation du test.

10.2.1 Numération (puits 1, 2, 3 et 14)

Repérer les puits ayant viré au rouge et interpréter:

- 1 taux Uu de 10³ UCC/mL
- 1 et 2 taux Uu de 10⁴ UCC/mL
- 1, 2 et 3 taux Uu ≥ 10⁵ UCC/mL
- 14 taux Mh ≥ 10⁴ UCC/mL

Le rôle pathologique des mycoplasmes dans les infections urogénitales est sujet à interprétation selon des recommandations spécifiques (1,3,7). Les taux pathologiques habituellement retenus pour *U. urealyticum* sont:

≥10⁴ UCC/mL pour un prélèvement urétral, ≥10³ UCC/mL pour un 1er jet d'urines ou un sperme (même si une nouvelle recommandation locale mentionne un seuil à ≥10⁴UCC/mL pour le sperme (7)). Pour *M. hominis* sa présence à un taux ≥10⁴ UCC/mL dans un prélèvement cervico-vaginal est anormale (1, 3).

10.2.2 Test de sensibilité aux antibiotiques (puits 4 à 13 puis 15 à 24)

Le virage du milieu dans les puits contenant un antibiotique traduit la capacité de la souche à se développer en présence de la concentration testée de l'antibiotique. La couleur jaune du milieu traduit l'incapacité de la souche à se développer en présence de la concentration testée de l'antibiotique. Les souches sont qualifiées de sensibles ou résistantes vis-à-vis des antibiotiques selon les critères d'interprétations suivants définis par le CLSI (2):

Tableau des critères d'interprétation des CMI (µg/mL):

		Uu		Mh		Commentaires
Classe	Antibiotique	S	R	S	R	
Quinolones	Lévofoxacine	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moxifloxacine	≤2	≥4	≤0.25	≥0.5	
Lincosamides	Clindamycine			≤0.25	≥0.5	
Tétracyclines	Tétracycline	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doxycycline	≤1	≥2	≤4	≥8	
Macrolides	Erythromy-cine	≤8	≥16			Les souches sensibles à l'Erythromycine le seront aussi à l'Azithromycine

Aide à l'interprétation :

Tests de sensibilité aux antibiotiques pour Uu

Antibiotique	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
Concentration (µg/mL)	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Profils	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interprétation

Tests de sensibilité aux antibiotiques pour Mh

Antibiotique	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
Concentration (µg/mL)	1	2	int*	0.25	0.5	int*	0.25	0.5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Profils	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interprétation

La souche est dite Sensible quand sa croissance est inhibée aux deux concentrations critiques de l'antibiotique. La souche est dite Résistante quand sa croissance est inhibée à la concentration critique haute de l'antibiotique et non inhibée à la concentration critique basse, ou quand sa croissance n'est pas inhibée aux deux concentrations critiques de l'antibiotique.

M. hominis est naturellement résistant aux macrolides à 14 et 15 carbones, incluant l'érythromycine. Dans certaines populations le taux de résistance à la tétracycline peut atteindre 45 % pour les Uu et 39.6% pour les Mh (2). Des résistances aux quinolones (Uu et Mh) (5, 6) et à la clindamycine (Mh) ont été décrites mais la prévalence n'est pas connue.

11 - CAS PARTICULIERS

Pour des taux très élevés en Uu ou Mh, il y a virage au rouge de tous les puits concernés par le germe. Il est alors recommandé de procéder à une dilution de l'échantillon afin d'obtenir un résultat plus précis. Dans ce cas, procéder comme suit :

Ensemencer un nouveau flacon UMMt 3 mL avec 300 µL du milieu UMMt d'origine conservé à 2-8 °C (§ 9.1).

Ensemencer une nouvelle galerie à l'aide du nouveau milieu UMMt ensemencé.

Tenir compte de la dilution (1:10) pour l'interprétation de la numération. Confirmer si nécessaire sur gélose A7 la présence de mycoplasmes en réisolant à partir du milieu UMMt d'origine conservé à 2-8 °C (§ 9.1). Une température d'incubation non constante ou < 36 °C (ouverture fréquente de l'étuve, hétérogénéité de la température dans l'étuve,...) peut ralentir la cinétique de pousse des mycoplasmes.

12 - CONTROLE QUALITE

Le contrôle qualité peut être réalisé à partir des souches *U. urealyticum* ou *M. hominis* du coffret MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) ou à partir d'une souche de collection lyophilisée (*U. urealyticum* ATCC 27815 ou *M. hominis* ATCC 23114) préalablement calibrée à 10⁴⁵ UCC/mL. Ensemencer la galerie MYCOFAST *Revolution* 2 et poursuivre le test comme indiqué dans cette notice (§9 et 10) Résultats attendus ci-dessous (ATCC):

MYCOFAST *Revolution* 2

	Uu 10³	Uu 10⁴	Uu ≥10⁵	Mh ≥10⁴	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
Souche Uu ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	NI*
Souche Mh ATCC 23114.	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI* (Non Interprétable)

13 - LIMITES DE LA METHODE

Quelques bactéries présentes en quantité >10 6-7 UFC/mL et possédant une uréase peuvent faire virer tous les puits de la galerie. Leur présence peut être vérifiée en ré-isolant sur gélose chocolat à partir du milieu UMMt d'origine conservé à 2-8°C (§ 9.1).

Un pH de prélèvement basique (pH ≥ 8) peut faire virer le milieu. Dans ce cas diluer l'échantillon (1:10) dans un autre milieu UMMt et interpréter en tenant compte de la dilution.

Un pH de prélèvement acide (pH ≤5) peut ralentir l'apparition du virage de couleur.

Un échantillon contenant du sang peut entraîner un changement de couleur des puits de la galerie MYCOFAST *Revolution* 2, interprété comme des résultats positifs. Dans ce cas diluer l'échantillon (1:10) dans un autre milieu UMMt et interpréter en tenant compte de la dilution. Un prélèvement faiblement chargé en mycoplasmes (<10³ UCC/mL) peut donner un virage aléatoire dans les différents puits de la galerie. Comme pour toute méthode de recherche de germes, la qualité du prélèvement conditionne le résultat du test. Un test négatif ne traduit donc pas forcément une absence d'infection.

14 - PERFORMANCES

14.1 Identification - Numération

% de concordance globale	Uu	Mh	Uu/Mh
Souches isolées taux ≤ 10³ UCC/mL) (voir § 14.1.1)	97.4	NA*	NA*
Souches isolées taux ≥ 10⁴ UCC/mL) (voir § 14.1.1)	93.4	93.4	93.4
Prélèvements cliniques vaginaux (voir § 14.1.2)	100	100	100
Prélèvements cliniques liquides - urines (voir § 14.1.2)	93.2	96.6	94.9

NA* (Non Applicable)

14.1.1 Sur souches isolées

Une étude comparative a été réalisée à partir de 21 souches isolées (souches ATCC et souches de collection) testées séparément (Uu ou Mh) à plusieurs concentrations (76 tests au total).

Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec une méthode de numération en micro dilution.

Pour une interprétation avec un seuil pathologique fixé à 10³ UCC/mL; la concordance globale pour Uu est de 97.4% (nous avons répertorié 2 faux positifs pour des taux à 10² UCC/mL en méthode de numération en micro dilution).

Pour une interprétation avec un seuil pathologique fixé à 10⁴ UCC/mL ; la concordance globale pour Uu est de 93.4% (nous avons répertorié 5 faux positifs pour des taux à 10³ UCC/mL en méthode de numération en micro dilution). La concordance globale pour le Mh est de 93.4% (nous avons répertorié 5 faux positifs, 4 pour des taux 10³ UCC/mL et un pour un taux 10² UCC/mL en méthode de numération en micro dilution).

La concordance globale Uu + Mh est de 93.4%.

14.1.2 Sur prélèvements cliniques

Une première étude comparative a été réalisée à partir de prélèvements cliniques vaginaux (n=23) réalisés en écouvillons secs. Les résultats obtenus avec MYCOFAST *Revolution* 2 sont comparés avec une méthode de numération en micro dilution.

La concordance globale pour Uu et pour Mh est de 100%.

Une seconde étude comparative a été réalisée à partir de prélèvements cliniques urinaires (n= 88).

Les résultats obtenus avec MYCOFAST *Revolution* 2 sont comparés à ceux obtenus avec la méthode utilisée en routine au laboratoire.

La concordance globale pour Uu est de 93.2% (nous avons répertorié 1 faux négatif pour un taux à 10^4 UCC/mL en méthode de numération en micro dilution et 5 faux positifs pour des taux de 10^2 UCC/mL numération en micro dilution)

La concordance globale pour Mh est de 96.6% (nous avons répertorié 3 faux positifs pour des taux à 10^2 – 10^3 UCC/mL numération en micro dilution).

La concordance globale pour Uu et Mh est de 94.9%.

14.2 Test de sensibilité aux antibiotiques

L'étude comparative a été réalisée dans un laboratoire national de référence entre la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide et la méthode MYCOFAST *Revolution* 2.

Les souches testées (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* et 16 *M. hominis*) sont des souches de référence, des souches cliniques sauvage ou des souches ayant acquis des résistances. Chaque souche est testée aux dilutions de 10^3 – 10^4 et 10^5 UCC/mL dans l'UMMt 3 mL.

Pour les taux 10^4 et 10^5 UCC/mL, les résultats ont été lus et interprétés après 24h d'incubation.

Pour les taux 10^3 UCC/mL, les résultats ont été lus et interprétés après 48h d'incubation si le test était négatif en 24h.

Les résultats des deux méthodes sont interprétés en sensible (S) ou résistant (R) selon les recommandations du CLSI.

La concordance globale pour *U. urealyticum*/*U. parvum* est de 95.5%

La concordance globale pour *M. hominis* est de 100%

Concordance	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>parvum</i> (n=40)					<i>Mycoplasma hominis</i> (n=28)				
	TET	DOX	MXF	LVX	ERY	TET	DOX	MXF	LVX	CLI
	34	38	40	39	40	28	28	28	28	28
DM	5 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DTM	1 ^b	2 ^c	0	1 ^d	0	0	0	0	0	0

DM: Discordance Majeure; DTM: Discordance Très Majeure

^a : 1 discordance obtenue à 10^3 UCC/mL (CMI de référence 0.5 µg/mL), 4 discordances obtenues à 10^5 UCC/mL (CMI de référence 0.5 - 1 et 8 µg/mL).

^b : 1 discordance obtenue à 10^5 UCC/mL (CMI de référence 8 µg/mL).

^c : 1 discordance obtenue à 10^3 UCC/mL (CMI de référence 8 µg/mL); 1 discordance obtenue à 10^5 UCC/mL (CMI de référence 2 µg/mL)

^d : 1 discordance obtenue à 10^5 UCC/mL (CMI de référence 4 µg/mL).

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 - BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.

2 - 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.

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.

4 - 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.

5 - WAITES Ken B. , Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. Duffy. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC-159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 52, No. 10, 3776–3778.5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® est une marque déposée d'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 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>



MYCOFAST® Revolution 2

Urogenital Mycoplasma Diagnosis

Detection
Enumeration
Identification

Antimicrobial susceptibility testing
25 tests (REF 00080)

CPB 0410_EN-2018-03

For *in vitro* diagnostic use only, for professional use only



1 - INTENDED USE

MYCOFAST *Revolution* 2 has been designed for the detection, enumeration and the identification of *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (Uu) and *Mycoplasma hominis* (Mh) in various clinical specimens. In addition, MYCOFAST *Revolution* 2 can be used to determine the susceptibility of Uu and Mh to certain antimicrobial agents according to the recommendations of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

2 - INTRODUCTION

Mycoplasmas that include several species that have been identified in humans, all belong to the mollicutes class. They differ from other bacteria in their lack of a cell wall and hence a natural resistance to β -lactams, as well as by the presence of a membrane rich in sterol obtained through their adhesion to eukaryotic cells. Since mycoplasmas are relatively fragile, they will only grow in acellular culture in the presence of various growth factors and at an optimal temperature of 37°C (4).

Most human mycoplasmas are commensal. *U. urealyticum* and *M. hominis* are the most commonly encountered species that have been isolated from the urogenital tract. *U. urealyticum* species are divided into two biovars: *U. urealyticum* and *U. parvum* (Uu).

Uu and Mh can be pathogenic. They are responsible for male genital infections (non-gonococcal urethritis, epididymitis, prostatitis, infertility); female genital infections (bacterial vaginosis, endometritis, salpingitis); fertility problems (chorioamnionitis, post-partum endometritis, preterm birth, spontaneous abortion), neonatal problems (low birth weight, respiratory and neurological infections, bacteremias, abscesses); extragenital infections (septic arthritis, reactive arthritis, other infection loci) (1).

The diagnosis of mycoplasma infections depends upon the determination of the pathological threshold, followed by enumeration. The resistance of Uu/Mh to certain drugs necessitates antimicrobial susceptibility testing (5, 6). The drugs tested and the interpretation criteria are adapted for the treatment of infections caused by mycoplasmas encountered in the urogenital tract or in extragenital sites (2).

3 - PRINCIPLE

MYCOFAST *Revolution* 2 is a liquid method based on the ability of Uu and Mh to metabolize urea and arginine respectively. Mycoplasma growth results in a colour change of the medium, containing phenol red indicator, from yellow-orange to red. This colour change is due to liberation of ammonia resulting in an alkaline pH of the medium. Mycoplasma growth thus viewed enables:

- the enumeration of mycoplasma based on the rate of urea or arginine hydrolysis, which is proportional to the number of germs contained in the sample.

- the Uu and Mh susceptibility testing to antimicrobial agents.

In the case of mixed samples (Uu + Mh), the test allows the interpretation of the sensitivities of each species with regard to the antibiotics tested.

4 - REAGENTS

Description	Amount
UMMt: Vial of 3 mL mycoplasma broth with antimicrobial agents and preservative solution. pH: 6.0 ± 0.1	25
MYCOFAST® Revolution 2: Tray of 24 wells packed in an aluminium sachet with an integrated desiccant.	25
Closing system: Protective translucent plastic tray lid.	25

The MYCOFAST *Revolution* 2 tray, in each of the 24 wells, contains dehydrated mycoplasma culture medium (foal serum, yeast extract, cysteine, arginine, urea, phenol red, antibiotics, pH: 6.1 ± 0.1) and includes 2 separate parts:

- the part intended for enumeration and antibiotic susceptibility testing of the Uu species (wells identified on the label as black).

- the part intended for enumeration and antibiotic susceptibility testing of the Mh species (wells identified on the label as red).

15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
DOX		LVX		MXF		CLI		TET		
4	8	1	2	0.25	0.5	0.25	0.5	4	8	
MYCOFAST® Revolution 2										
14	Mh									2
	$\geq 10^4$									DOX
	1									1
	10^3									12
		Uu	Uu	2	4	2	4	8	16	1
		10^4	$\geq 10^5$	LVX		MXF		ERY		2
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
										11

Diagnosis of Uu species (black part of tray label):

Wells 1/2/3 : Identification and enumeration of Uu at 10^3 , 10^4 and $\geq 10^5$ CCU/mL (buffered solution and lincomycin inhibiting Mh growth).

Wells 4/5 : Evaluation of Uu susceptibility to Levofloxacin (LVX) at 2 / 4 $\mu\text{g/mL}$

Wells 6/7 : Evaluation of Uu susceptibility to Moxifloxacin (MXF) at 2 / 4 $\mu\text{g/mL}$

Wells 8/9 : Evaluation of Uu susceptibility to Erythromycin (ERY) at 8 / 16 $\mu\text{g/mL}$

Wells 10/11 : Evaluation of Uu susceptibility to Tetracycline (TET) at 1 / 2 $\mu\text{g/mL}$

Wells 12/13 : Evaluation of Uu susceptibility to Doxycycline (DOX) at 1 / 2 $\mu\text{g/mL}$

Diagnosis of Mh species (red part of tray label):

Wells 14 : Identification and enumeration of Mh at $\geq 10^4$ CCU/mL

Wells 15/16 : Evaluation of Mh susceptibility to Doxycycline (DOX) at 4 / 8 $\mu\text{g/mL}$

Wells 17/18 : Evaluation of Mh susceptibility to Levofloxacin (LVX) at 1 / 2 $\mu\text{g/mL}$

Wells 19/20 : Evaluation of Mh susceptibility to Moxifloxacin (MXF) at 0.25 / 0.5 $\mu\text{g/mL}$

Wells 21/22 : Evaluation of Mh susceptibility to Clindamycin (CLI) at 0.25 / 0.5 $\mu\text{g/mL}$

Wells 23/24 : Evaluation of Mh susceptibility to Tetracycline (TET) at 4 / 8 $\mu\text{g/mL}$

5 - PRECAUTIONS

The reagents are intended solely for *in vitro* use and must be handled by authorized personnel.

The patient samples and inoculated reagents are potentially infectious; they must be handled with caution, in observance of hygiene rules and the current regulations for this type of product in the country of use.

Reagents containing raw materials of animal origin must be handled with caution.

Do not use reagents after the expiry date.

Do not use reagents that have been damaged or that have been poorly conserved before use.

A positive result with the MYCOFAST method indicates colonization by urogenital mycoplasmas, but cannot alone be used to make a clinical diagnosis. This must be made by a doctor according to biological results and clinical signs.

6 - SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

6.1 Sample collection

Cervicovaginal sample collection

Use only a Dacron or rayon swab or a cytobrush to collect samples. The cervix should be carefully cleaned with a swab, to remove secretions, before collecting the sample with a new swab. As mycoplasmas adhere strongly to mucous cells, the mucous lining should be vigorously swabbed to obtain a rich specimen.

Urethral sample collection

Clean the meatus and swab or scrape the area to obtain cells.

Sperm, Urine

Collect sperm or first micturition in a sterile tube or bottle.

6.2 Transport in UMMt medium

Swab samples: Place the swab in a vial of UMMt 3 mL medium.

Liquid samples: Inoculate a vial of UMMt 3 mL medium with 300 μL of homogenized liquid.

6.3 Conservation in UMMt medium

The inoculated UMMt medium may be kept for 20 hours at room temperature (18-25°C) or 56 hours at 2-8°C. For storage during 3 days at -20 °C, first add 2 drops of "MYCOPLASMA Stabilizer".

7 - PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

All the reagents are ready-to-use. The vials may be stored at 2-8 °C, in their original packaging until the expiry date shown on the kit.

The UMMt medium may be stored temporarily (3 months) at room temperature but is more stable at 2-8°C.

Do not freeze the reagents contained in the kit.

8 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Sample collection (swabs, cytobrushes, sterile containers for liquid samples), pipettes and tips

MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064); Incubator at 37°C $\pm$ 1°C

Waste container for contaminated waste and mineral oil

9 - METHOD

Allow the reagents to reach room temperature (20-30 minutes).

9.1 Inoculation of the tray

Remove the adhesive film by pulling on the tab and add the following to the wells of each row:

Wells 1-24 100 μL of inoculated UMMt medium

Wells 1-24 2 drops of mineral oil

Cover the seeded tray with the "closing system".

Label the sample.

Store excess UMMt medium at 2-8°C for at least 48 hours for possible verification.

9.2 Incubation of the tray

Incubate the tray at 37°C $\pm$ 1°C for 24 hours.

For Uu and Mh enumeration, read the results within 24 hours. Tray incubation can be extended for up to 48 hours only in the case of liquid samples that are negative after 24 hours.

10 - READING AND INTERPRETATION

10.1 Validation

Check that all the wells in the row are limpid. A cloudy appearance in a well indicates bacterial contamination. In this case repeat the analysis.

10.2 Reading and interpretation

The results are read by the colour obtained in the different wells. Urogenital Mycoplasma growth is indicated when the medium turns red (alkaline). The medium remains yellow when no growth of urogenital mycoplasma occurs.

An orangey coloration should be considered as a positive test (rate limit).
In the case of a result read in 48h (for a liquid sample with a negative test result in 24h), only interpret the presence of the detected mycoplasma without enumeration result.
For the interpretation of the results refer to the results sheet.

10.2.1 Enumeration (wells 1, 2, 3 and 14)

The wells that have turned red are identified and interpreted as follows:
1 Uu 10³ CCU/mL
1 and 2 Uu 10⁴ CCU/mL
1, 2 and 3 Uu ≥ 10⁵ CCU/mL
14 Mh ≥ 10⁴ CCU/mL

The pathological role of mycoplasmas in urogenital infections is subject to interpretation according to specific recommendations (1,3,7). The pathological thresholds usually quoted for *U. urealyticum* are:
≥10⁴ CCU/mL for a urethral specimen or endotracheal specimen, >10³ CCU/mL in a first urine stream or sperm (although a new local recommendation mentions a threshold ≥10⁴ CCU/mL for semen (7)). The presence of *M. hominis* at a threshold ≥10⁴ CCU/mL in an cervicovaginal specimen is abnormal (1, 3).

10.2.2 Susceptibility tests (wells 4 to 13 and 15 to 24)

The red colour change of the medium in the wells containing an antibiotic indicates the presence of bacterial growth and hence resistance to the antibiotic concentration being tested. The yellow colour of the medium indicates the absence of bacterial growth and hence susceptibility to the antibiotic concentration being tested. The strains are characterized as being sensitive or resistant to the antibiotics according to the following criteria defined by the CLSI (2):

Table of MIC (µg/mL) interpretative criteria

Antibiotic		Uu		Mh		Comments
Class	Drug	S	R	S	R	
Quinolones	Levofloxacin	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moxifloxacin	≤2	≥4	≤0.25	≥0.5	
Lincosamides	Clindamycin			≤0.25	≥0.5	
Tétracyclines	Tetracycline	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doxycycline	≤1	≥2	≤4	≥8	
Macrolides	Erythromycin	≤8	≥16			Organisms susceptibles to Erythromycin will also be susceptible to Azithromycine

Help with interpretation:

Susceptibility testing for Uu

Antibiotic	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
Concentration (µg/mL)	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Profile	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interpretation

Susceptibility testing for Mh

Antibiotic	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
Concentration (µg/mL)	1	2	int*	0.25	0.5	int*	0.25	0.5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Profile	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interpretation

The strain is said to be susceptible when its growth is inhibited by the higher and lower critical concentrations of the antibiotic.
The strain is said to be resistant when its growth is inhibited by the higher critical concentration of the antibiotic, but not the lower critical concentration or when its growth is not inhibited by either the higher or the lower critical concentrations of the antibiotic.
M. hominis strains are innately resistant to macrolides (14 -15 carbon atoms), including erythromycin.
In some patient populations, tetracycline resistance is as high as 45% for Uu and 39.6% for Mh (2). Uu/Mh quinolone (5, 6) and clindamycin resistance have been described but the prevalence is not known.

11 - PARTICULAR CASES

For high Uu and Mh levels, the content of all the wells on the tray has turned red. It is recommended that the sample be diluted in order to obtain more specific results. In this case, proceed as follows:
Inoculate a new UMMt 3 mL vial with 300 µL of the original UMMt medium stored at 2-8°C (see § 9.1).
Inoculate a new tray with the new inoculated UMMt medium.
Take the dilution (1:10) into account in the interpretation of the enumeration results.
If necessary, confirm the presence of mycoplasmas on an A7 agar plate by re-isolating from the original UMMt medium stored at 2-8°C (§ 9.1). A non-constant incubation temperature or <36°C (frequent opening and poor temperature heterogeneity of the incubator) can slow down the mycoplasma growth kinetics.

12 - QUALITY CONTROL

Quality control can be carried out from the lyophilized *U. urealyticum* or *M. hominis* strains of the MYCOPLASMA CONTROL kit (REF 00900) or from lyophilized reference strains (*U. urealyticum* ATCC 27815 or *M. hominis* ATCC 23114) previously calibrated at 10⁴⁻⁵ UCC/mL.
Inoculate the MYCOFAST *Revolution* 2 tray and perform the test as indicated in these instructions (§ 9 and 10).

Expected results (ATCC): MYCOFAST *Revolution* 2

	Uu 10 ³	Uu 10 ⁴	Uu ≥10 ⁵	Mh ≥10 ⁴	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
Strain Uu ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	NI*
Strain Mh ATCC 23114	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI* (Not Interpretable)

13 - LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Some bacteria that are present in quantities of >10⁶⁻⁷ CFU/mL and contain urease may cause all the wells in the tray to change colour. The presence of these can be verified by re-isolating on chocolate agar from the original UMMt medium stored at 2-8°C (§ 9.1).
A sample with an alkaline pH (pH ≥8) may cause the UMM medium to

change colour. Should this occur, dilute the sample (1:10) in another UMMt medium and interpret the results taking the dilution into account.
A sample with an acidic pH (pH ≤5) can slow down the appearance of the colour change.

A sample containing blood may cause a colour change in the wells of the MYCOFAST *Revolution* 2 tray and could be interpreted as a positive result. In this case dilute the sample (1:10) in another UMMt medium and interpret the results, taking into account the dilution.

A sample with a low mycoplasma load (<10³ CCU/mL) may lead to a random colour change in the different wells of the tray. As for all germ detection methods, the quality of the sample can influence the test result. A negative test does not therefore necessarily indicate the absence of infection.

14 - PERFORMANCE

14.1 Identification - Enumeration

% of overall agreement	Uu	Mh	Uu/Mh
isolated strains (threshold ≤ 10 ³ CCU/mL) (see § 14.1.1)	97.4	NA*	NA*
isolated strains (threshold ≥ 10 ⁴ CCU/mL) (see § 14.1.1)	93.4	93.4	93.4
vaginal samples (see § 14.1.2)	100	100	100
urinary clinical specimens (see § 14.1.2)	93.2	96.6	94.9

NA* (Not Applicable)

14.1.1 Isolated strains

A comparative study was carried out with 21 isolated strains (ATCC strains and collection strains) tested separately (Uu or Mh) with several concentrations (76 tests in total).
The results obtained were compared with those obtained with the micro-dilution enumeration method.
For interpretation with a pathological threshold set at 10³ CCU/mL, the overall agreement for Uu is 97.4% (we listed 2 false positives at 10² CCU/mL with the micro-dilution enumeration method).
For interpretation with a pathological threshold of 10⁴ CCU/mL; the overall agreement for Uu is 93.4% (we recorded 5 false positives at 10³ CCU/mL with the micro dilution enumeration method). The overall agreement for Mh is 93.4% (we listed 5 false positives, 4 at 10³ CCU/mL and one at 10² CCU/mL with the micro dilution enumeration method). The overall Uu + Mh agreement is 93.4%.

14.1.2 Clinical samples

An initial comparative study was performed using vaginal clinical specimens (n =23) on dry swabs. The results obtained with MYCOFAST *Revolution* 2 were compared with the liquid micro-dilution enumeration method. The overall agreement for Uu and Mh is 100%.

A second comparative study was performed on urinary clinical specimens (n=88).
The results obtained with MYCOFAST *Revolution* 2 were compared with those obtained with the liquid micro-dilution enumeration method.

The overall agreement for Uu is 93.2% (we listed 1 false negative at 10⁴ CCU/mL with micro-dilution numeration method and 5 false positives at 10² CCU/mL with micro-dilution numeration method).
The overall agreement for Mh is 96.6% (we identified 3 false positives at 10² – 10³ CCU/mL with micro-dilution numeration method).
The overall agreement for Uu and Mh is 94.9%.

14.2 Susceptibility testing

A comparative study was carried out in a national reference laboratory between the method for determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) in liquid medium and the MYCOFAST *Revolution* N 2.

The tested strains (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* and 16 *M. hominis*) were reference strains, wild-type clinical strains or strains with acquired resistance. Each strain was tested at 10³, 10⁴ and 10⁵ CCU/mL dilutions in UMMt 3 mL.

For 10⁴ and 10⁵ CCU/mL rates, results were read and interpreted after 24 hours of incubation.

For 10³ CCU/mL rate, results were read and interpreted after 48 hours incubation in case of negative test in 24 hours.

The results of both methods were interpreted as susceptible (S) or resistant (R) according to CLSI recommendations.

The overall agreement for *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* is: 95.5%.

The overall agreement for *Mycoplasma hominis* for rates at 10⁴-10⁵ CCU/mL is: 100%.

Agreement	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>parvum</i> (n=40)					<i>Mycoplasma hominis</i> (n=28)				
	TET	DOX	MOX	LVX	ERY	TET	DOX	MOX	LVX	CLI
	34	38	40	39	40	28	28	28	28	28
ME	5 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VME	1 ^b	2 ^c	0	1 ^d	0	0	0	0	0	0

ME: Major Error, VME : Very Major Error

^a : 1 discrepancy at 10³ CCU/mL (MIC of reference 0.5 µg/mL), 4 discrepancies at 10⁵ CCU/mL (MIC of reference 0.5 - 1 and 8 µg/mL).

^b : 1 discrepancy at 10⁵ CCU/mL (MIC of reference 8 µg/mL).

^c : 1 discrepancy at 10³ CCU/mL (MIC of reference 8 µg/mL); 1 discrepancy at 10⁵ CCU/mL (MIC of reference 2 µg/mL)

^d : 1 discrepancy at 10⁵ CCU/mL (MIC of reference 4 µg/mL).

15 - WASTE ELIMINATION

Waste should be disposed of in accordance with the hygiene rules and current regulations for this kind of product in the country of use.

16 - BIBLIOGRAPHY

1 - BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.

2 - 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.

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.

4 - 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.

5 - WAITES Ken B. , Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. Duffy. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC-159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas

and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 52, No. 10, 3776–3778.5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® is a trademark of 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 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>





CPB 0410_ES-2018-03

Únicamente para diagnóstico *in vitro*, solo para uso profesional

Las pruebas son para un solo uso



1 - FINALIDAD

El estuche MYCOFAST *Revolution 2* permite la detección, el recuento y la identificación de *Ureaplasma Urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) y *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partir de diferentes muestras clínicas. El estuche MYCOFAST *Revolution 2* también permite el estudio de la sensibilidad de U.u. y M.h. a los antibióticos de conformidad con las recomendaciones del CLSI (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, por sus siglas en inglés) (2)

2 - INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas, de los que hay varias especies censadas en el hombre en la actualidad, pertenecen a la clase de los *mollicutes*. Se diferencian de otras bacterias en numerosos aspectos, entre ellos la falta de pared, que les confiere una resistencia natural a los betalactámicos, así como una membrana rica en esteroides procedente de membranas de las células eucariotas sobre las que se fijan. Los micoplasmas son organismos relativamente frágiles, que se multiplican en un medio acelular solamente en presencia de muchos factores de crecimiento y a una temperatura óptima de 37 °C (4).

La mayor parte de los micoplasmas humanos son simples comensales. Las especies más comunes son las aisladas a partir del tracto urogenital, *U. urealyticum* y *M. hominis*. La especie *U. urealyticum* se divide en dos biovariedades: *U. urealyticum* y *U. parvum* (U.u.).

U.u. o M.h. pueden comportarse como verdaderos patógenos. Son responsables de infecciones genitales masculinas (uretritis no gonocócicas, epididimitis, prostatitis, infertilidad); infección ginecológica (vaginosis bacteriana, endometritis, salpingitis); trastornos de la reproducción (corioamnionitis, endometritis posparto, nacimientos prematuros, aborto espontáneo); problemas neonatales (poco peso al nacer, infecciones respiratorias, neurológicas, bacteriemias, absceso); infecciones extragenitales (artritis sépticas, artritis de reacción, otras localizaciones) (1).

El diagnóstico de las infecciones por micoplasma depende de la determinación de un umbral patológico y, por lo tanto, de un recuento. La aparición de resistencia de U.u. y M.h. a determinadas moléculas conduce a realizar una prueba de sensibilidad a los antibióticos (5, 6). Los antibióticos probados y los criterios de interpretación se adaptan al tratamiento de las infecciones por micoplasmas a nivel del tracto urogenital y en otros lugares extragenitales (2).

3 - PRINCIPIO

MYCOFAST *Revolution 2* es un método líquido basado en la capacidad de U.u. y de M.h. de metabolizar la urea y la arginina respectivamente. El crecimiento de micoplasmas en medio líquido se visualiza mediante el cambio de un indicador de color —el rojo de fenol— del amarillo anaranjado al rojo, lo que indica la alcalinización del medio debido a la liberación de amoníaco.

El crecimiento de micoplasmas así visualizado permite:

- el recuento basado en la velocidad de hidrólisis de los sustratos, que es proporcional a la cantidad de gérmenes contenidos en la muestra.
- el estudio de la sensibilidad de U.u. y M.h. a los antibióticos.

En el caso de muestras mixtas (U.u. + M.h.), el ensayo permite interpretar las

bilidades de cada especie con respecto a los antibióticos probados.

4 - REACTIVOS

Descripción	Cantidad
UMMt: Frasco de 3 mL de medio de micoplasmas con antibióticos y agente conservador. pH: 6,0 ± 0,1.	25
MYCOFAST® Revolution 2: Galería de 24 pocillos envasada en un sobre de aluminio con un desecante integrado.	25
Sistema de cierre: Tapa de protección de la galería con el cultivo, en plástico transparente.	25

La galería MYCOFAST *Revolution 2* contiene en forma deshidratada en los 24 pocillos, el medio de crecimiento de los micoplasmas (suero de potro, extracto de levadura, cisteína, arginina, urea, rojo de fenol, antibióticos, pH: 6,1 ± 0,1) y comprende 2 partes distintas:

- la parte de recuento y evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos para U.u. (pocillos marcados en negro en la etiqueta).
- la parte de recuento y evaluación de la sensibilidad a los antibióticos para M.h. (pocillos marcados en rojo en la etiqueta).

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	DOX		LVX		MXF		CLI		TET		
	4	8	1	2	0.25	0.5	0.25	0.5	4	8	
14	Mh	MYCOFAST® Revolution 2								2	13
	10 ⁴										
1	Uu									1	12
	10 ³										
	Uu	Uu	2	4	2	4	8	16	1	2	
	10 ⁴	≥10 ⁵	LVX		MXF		ERY		TET		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

Parte para el diagnóstico de la especie U.u. (en negro):

Pocillos 1/2/3: Identificación y recuento de U.u. para tasas de 10³, 10⁴ y ≥ 10⁵ UCC/mL (solución tamponada y lincomicina inhibidora del crecimiento de M.h.).

Pocillos 4/5: Evaluación de la sensibilidad de U.u. a la levofloxacina (LVX) a 2 / 4 µg/mL

Pocillos 6/7: Evaluación de la sensibilidad de U.u. a la moxifloxacina (MXF) a 2 / 4 µg/mL

Pocillos 8/9: Evaluación de la sensibilidad de U.u. a la eritromicina (ERY) a 8 / 16 µg/mL

Pocillos 10/11: Evaluación de la sensibilidad de U.u. a la tetraciclina (TET) 1-2 µg/mL

Pocillos 12/13: Evaluación de la sensibilidad de U.u. a la doxiciclina (DOX) 1-2 µg/mL

Parte para el diagnóstico de la especie M.h. (en rojo):

Pocillos 14: Identificación y recuento de M.h. para tasas ≥ 10⁴ UCC/mL

Pocillos 15/16: Evaluación de la sensibilidad de M.h. a la doxiciclina (DOX) 4-8 µg/mL

Pocillos 17/18: Evaluación de la sensibilidad de M.h. a la evofloxacina (LVX) 1-2 µg/mL

Pocillos 19/20: Evaluación de la sensibilidad de M.h. a la moxifloxacina (MXF) 0,25-0,5 µg/mL

Pocillos 21/22: Evaluación de la sensibilidad de M.h. a la clindamicina (CLI) 0,25-0,5 µg/mL

Pocillos 23/24: Evaluación de la sensibilidad de M.h. a la tetraciclina (TET) 4-8 µg/mL

Los reactivos de este estuche son solo para uso diagnóstico *in vitro* y deben ser manipulados por personal autorizado.

Las muestras y los reactivos sembrados son potencialmente infecciosos; deben manipularse con precaución, respetando las reglas de higiene y la reglamentación en vigor en el país de utilización de este tipo de producto.

Los reactivos que contienen materias primas de origen animal deben manipularse de acuerdo con las precauciones de uso.

No utilice los reactivos después la fecha de caducidad.

No utilice los reactivos deteriorados o mal conservados antes de usar.

Un resultado positivo con el método MYCOFAST indica una colonización de los micoplasmas urogenitales, pero no puede servir por sí mismo para realizar un diagnóstico clínico. El diagnóstico debe ser realizado por un médico en función de los resultados biológicos y de la sintomatología clínica.

6 - RECOGIDA Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

6.1 Recogida de las muestras

Muestras cérvico-vaginales

Utilizar únicamente un hisopo de Dacron o de rayón, o un citocipillo. Realizar la toma de la muestra tras eliminar bien las secreciones del exocérnix mediante un primer hisopo.

Los micoplasmas tienen una gran afinidad por las células mucosas a las que se adhieren, por lo tanto, es esencial raspar bien la mucosa para obtener un buen resultado.

Muestras uretrales

Limpiar el meato y recoger las muestras con el hisopo o por raspado de las células

Esperma, orinas

Recoger el esperma o el primer chorro de orina en un frasco estéril.

6.2 Transporte en medio UMMt

Muestras en hisopo seco: Descargar el hisopo en un frasco con medio UMMt.

Muestras líquidas: Sembrar un frasco con medio UMMt 3 mL con 300 µL de líquido homogeneizado.

6.3 Conservación en medio UMMt

Una vez sembrado, el medio UMMt puede conservarse a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 20 horas, o a 2-8 °C durante 56 horas. Para una conservación durante 3 días a -20 °C, añadir previamente 2 gotas de «MYCOPLASMA Stabilizer».

7 - PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos están listos para usar. Los reactivos conservados a 2-8 °C en su estado original se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el estuche.

El medio UMMt puede conservarse temporalmente (3 meses) a temperatura ambiente, pero presenta mejor estabilidad a 2-8 °C.

Los reactivos del estuche no deben congelarse.

8 - MATERIAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO

Material para muestras (hisopos, citocipillos, frascos estériles para recoger muestras líquidas), pipetas y conos de transferencia MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064); estufa calibrada a 37 °C ± 1 °C Recipiente para residuos contaminados, vaselina líquida estéril

9 - PROCEDIMIENTO

Poner los reactivos a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos.

9.1 Siembra de la galería

Retirar la película adhesiva tirando de la lengüeta y distribuir sucesivamente en los pocillos:

pocillos 1-24	100 µL de medio UMMt sembrado
pocillos 1-24	2 gotas de vaselina estéril

Tapar la galería mediante el «sistema de cierre» de la tapa. Identificar la muestra.

Conservar el excedente del frasco UMMt a 2-8 °C durante al menos 48 horas para permitir una eventual verificación.

9.2 Incubación de la galería

Incubar la galería a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas.

Para el recuento de U.u. y M.h. lea los resultados en 24 horas. La incubación de la galería puede extenderse hasta 48 horas solo en el caso de muestras líquidas negativas en un plazo de 24 horas.

10 - LECTURA E INTERPRETACIÓN

10.1 Validación

Verificar que todos los pocillos están limpios. Un pocillo turbio indica contaminación bacteriana.

En este caso empezar otra vez la prueba.

10.2 Lectura e Interpretación

La lectura de los resultados consiste en identificar las coloraciones obtenidas en los diferentes pocillos de las galerías. El crecimiento de los micoplasmas urogenitales en los pocillos se traduce por una alcalinización del medio que cambia al rojo. En ausencia de crecimiento de micoplasmas urogenitales, el medio permanece amarillo. Una coloración anaranjada debe ser considerada como un test positivo (tasa límite).

En el caso de que una lectura de resultado en 48 horas de muestra líquida tenga una prueba negativa en 24 horas, haga solamente la presencia de micoplasma detectado sin recuento.

Para la interpretación de los resultados vea la hoja de resultados.

10.2.1 Recuento (pocillos 1, 2, 3 y 14)

Marcar los pocillos que hayan cambiado a rojo e interpretar:

- 1 tasa U.u. de 10³UCC/mL
- 1 y 2 tasa U.u. de 10⁴UCC/mL
- 1, 2 y 3 tasa U.u. ≥ 10⁵UCC/mL
- 14 tasa M.h. ≥ 10⁴UCC/mL

El papel patológico de micoplasmas en infecciones urogenitales está sujeto a la interpretación de acuerdo con las recomendaciones específicas (1,3,7). Las tasas patológicas que se utilizan habitualmente para *U. urealyticum* son:

≥ 10⁴ UCC/mL para una muestra uretral, ≥ 10³ UCC/mL para un primer chorro de orina o esperma (aunque una nueva recomendación menciona un umbral ≥ 10⁴ UCC/mL para al esperma [7]). Para *M. hominis* su presencia en una proporción ≥ 10⁴ UCC/mL en una muestra cérvico-vaginal es anómala (1,3).

10.2.2 Prueba de sensibilidad a antibióticos (pozos 4 a 13 y después 15 a 24)

El cambio en el medio en los pozos que contienen un antibiótico refleja la capacidad de la cepa para desarrollarse en presencia de la concentración probada del antibiótico. El color amarillo del medio demuestra la incapacidad de la cepa de desarrollarse en presencia de la concentración testeada del antibiótico. Las cepas se clasifican como sensibles o resistentes a los antibióticos según los siguientes criterios de interpretación definidos por la CLSI (2):

Tabla de criterios de interpretación para los CMI (µg/mL):

Clase	Antibiótico	U.u.		M.h.		Comentarios
		S	R	S	R	
Quinolonas	Levofloxacina	≤2	≤4	≤1	≥2	
	Moxifloxacina	≤2	≤4	≤0,25	≥0,5	
Lincosamidas	Clindamicina			≤0,25	≥0,5	
Tetraciclínas	Tetraciclina	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doxiciclina	≤1	≥2	≤4	≥8	
Macrólidos	Eritromicina	≤8	≥16			Las cepas sensibles a la eritromicina también lo son a la azitromicina.

Ayuda con la interpretación:

Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos para U.u.

Antibiótico	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Concentración (µg/mL)															
Perfiles	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interpretación

Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos para M.h.

Antibiótico	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
	1	2	int*	0,25	0,5	int*	0,25	0,5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Concentración (µg/mL)															
Perfiles	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interpretación

La cepa es sensible cuando su crecimiento es inhibido en ambas concentraciones críticas del antibiótico. La cepa se considera Resistente cuando su crecimiento se inhibe en la concentración crítica alta del antibiótico y no se inhibe en la concentración crítica baja, o cuando su crecimiento no se inhibe en las dos concentraciones críticas del antibiótico.

M. hominis es naturalmente resistente a los macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, incluyendo la eritromicina. En algunas poblaciones la tasa de resistencia a la tetraciclina puede alcanzar el 45 % para U.u. y el 39,6 % para M.h. (2). Se ha descrito resistencia a las quinolonas (U.u. y M.h.) (5, 6) y a la clindamicina (M.h.), pero se desconoce la prevalencia.

11 - CASOS PARTICULARES

Para tasas muy altas en U.u. o M.h., hay un cambio a rojo de todos los pozos afectados por el germen. En este caso, se recomienda diluir la muestra para obtener un resultado más preciso. Proceda como se indica a continuación: Sembrar una nuevo frasco de 3 mL de UMMt con 300 µL del medio original de UMMt almacenado a 2-8 °C (sección 9.1).

Sembrar una nueva galería con la ayudas del nuevo medio UMMt obtenido. Hay que tener en cuenta la dilución (1:10) para interpretar el recuento. Confirmar si es necesario en agar A7 la presencia de micoplasmas volviendo aislar, a partir del medio UMMt de origen conservado a 2-8 °C (apartado 9.1).

Una temperatura de incubación no constante o <36°C (frecuente apertura y heterogeneidad de la temperatura de la incubadora) pueden retrasar la cinética de crecimiento de los micoplasmas.

12 - CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad puede realizarse a partir de las cepas *U. urealyticum* o *M. hominis* del estuche MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) o a partir de una cepa de recogida liofilizada (*U. urealyticum* ATCC 27815 o *M. hominis* ATCC 23114) calibrada previamente a 10⁴⁵ UCC/mL. Sembrar la galería MYCOFAST *Revolution* 2y continuar la prueba como se indica en este prospecto (apartados 9 y 10).

Resultados esperados a continuación (ATCC):

MYCOFAST *Revolution* 2

	U.u. 10³	U.u. 10⁴	U.u. ≥10⁵	M.h. ≥10⁴	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
Cepa U.u. ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	NI*
Cepa M.h. ATCC 23114.	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI* (No interpretable)

13 - LÍMITES DEL MÉTODO

Algunas bacterias, presentes en cantidad >10⁶⁻⁷ UFC/mL y que poseen una ureasa, pueden hacer virar todos los pocillos de la galería. Su presencia puede verificarse volviendo a aislar con agar de chocolate el medio original de UMMt almacenado a 2-8 °C (sección 9.1).

Un pH de muestra básica (pH > 8) puede hacer reaccionar el medio. En este caso, diluya la muestra (1:10) en otro medio UMMt e interprete teniendo en cuenta la dilución. Un pH de muestra ácida (pH ≤ 5) puede ralentizar la aparición del cambio de color.

Una muestra que contenga sangre puede causar que los pocillos de la galería MYCOFAST *Revolution* 2 cambien de color, interpretados como resultados positivos. En ese caso, diluir la muestra (1:10) en otro medio UMMt y realizar la interpretación teniendo en cuenta la dilución. Una muestra con una carga débil de micoplasmas (<10³ UCC/mL) puede provocar una reacción aleatoria en distintos pocillos de la galería. Al igual que con cualquier otro método de búsqueda de gémenes, la calidad de la muestra condiciona el resultado de la prueba. Por lo tanto, una prueba negativa no indica forzosamente una ausencia de infección.

14 - RESULTADOS

14.1 Identificación - Recuento

Porcentaje de la concordancia global	U.u.	M.h.	U.u./M.h
Cepas aisladas (tasa ≤ 10³UCC/mL) (consultar el apartado 14.1.1)	97,4	NA*	NA*
Cepas aisladas (tasa ≥ 10⁴UCC/mL) (consultar el apartado 14.1.1)	93,4	93,4	93,4
Muestras clínicas vaginales (consultar el apartado 14.1.2)	100	100	100
Muestras clínicas líquidas - orina (consultar el apartado 14.1.2)	93,2	96,6	94,9

NA* (No aplicable)

14.1.1 En cepas aisladas

Se realizó un estudio comparativo utilizando 21 cepas aisladas (ATCC y cepas de colección) probadas por separado (U.u. o M.h.) a varias concentraciones (76 pruebas en total). Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos mediante un método de recuento por microdilución.

Para una interpretación con un umbral patológico establecido en 10³ UCC/mL; la concordancia global para U.u. es del 97,4 % (se registraron 2 falsos positivos para tasas de 10² UCC/mL usando el método de recuento por microdilución).

Para una interpretación con un umbral patológico establecido en 10⁴ UCC/mL; la concordancia global para U.u. es 93,4 % (se registraron 5 falsos positivos para tasas de 10³ UCC/mL usando el método de recuento por microdilución). La concordancia global para M.h. es del 93,4 % (encontramos 5 falsos positivos, 4 para 10³ UCC/mL y uno para 10² UCC/mL en el método de recuento por microdilución).

La concordancia global U.u. + M.h. es del 93,4 %.

14.1.2 En muestras clínicas

Se realizó un estudio comparativo inicial en muestras clínicas vaginales (n=23) tomadas en hisposos secos. Los resultados obtenidos con MYCOFAST *Revolución* 2 se comparan con un método de recuento por microdilución. La concordancia global para U.u. y M.h. es del 100 %.

Un segundo estudio comparativo se llevó a cabo utilizando muestras clínicas de orina (n=88).

Los resultados obtenidos con MYCOFAST *Revolución* 2 se comparan con los obtenidos con el método habitual de laboratorio.

La concordancia global para U.u. es del 93,2 % (enumeramos 1 falso negativo para una tasa de 10^4 UCC/mL en el método de recuento por microdilución y 5 falsos positivos para tasas de 10^2 UCC/mL en el recuento por microdilución).

La concordancia global para M.h. es del 96,6 % (enumeramos 3 falsos positivos para tasas de 10^2 – 10^3 UCC/mL en el recuento por microdilución).

La concordancia global para U.u. y M.h. es del 94,9 %.

14.2 Ensayos sobre la sensibilidad a los antibióticos

El estudio comparativo se ha realizado en un laboratorio nacional de referencia entre el método de determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en medio líquido y el método MYCOFAST *Revolución* 2

Las cepas probadas (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* y 16 *M. hominis*) son cepas de referencia, cepas clínicas silvestres o cepas que han desarrollado resistencia. Cada cepa se prueba a diluciones de 10^3 – 10^4 y 10^5 UCC/mL en el UMMt 3 mL.

Para las tasas 10^4 y 10^5 UCC/mL, los resultados se leyeron e interpretaron después de 24 horas de incubación.

Para 10^3 UCC/mL, los resultados se leyeron e interpretaron después de 48 horas de incubación si la prueba era negativa en 24 horas.

Los resultados de ambos métodos se interpretan como sensibles (S) o resistentes (R) según las recomendaciones del CLSI.

La concordancia global para *U. urealyticum*/*U. parvum* es del 95,5 % La concordancia global para *M. hominis* es del 100 %

Concordancia	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>parvum</i> (n=40)					<i>Mycoplasma hominis</i> (n=28)				
	TET	DOX	MXF	LVX	ERY	TET	DOX	MXF	LVX	CLI
	34	38	40	39	40	28	28	28	28	28
DM	5 _a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DMM	1 _b	2 _c	0	1 _d	0	0	0	0	0	0

DM: Discordancia mayor; DTM: Discordancia muy mayor

a: 1 discordancia obtenida a 10^3 UCC/mL (CMI de referencia 0,5 µg/mL), 4 discordancias obtenidas a 10^5 UCC/mL (CMI de referencia 0,5 - 1 y 8 µg/mL).

b: 1 discordancia obtenida a 10^5 UCC/mL (CMI de referencia 8 µg/mL).

c: 1 discordancia obtenida a 10^3 UCC/mL (CMI de referencia 8 µg/mL);

1 discordancia obtenida a 10^5 UCC/mL (CMI de referencia 2 µg/mL).

d: 1 discordancia obtenida a 10^5 UCC/mL (CMI de referencia 4 µg/mL).

15 - ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Los residuos deben eliminarse de conformidad con las normas de higiene y la reglamentación en vigor en materia de este tipo de reactivos en el país de uso.

16 – BIBLIOGRAFÍA

1 - BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N.º 391, 63-69.

2 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011 Methods for

Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline. CLSI Document M43-A. Vol.31 - N.º 19.

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N.º 329, 34-36.

4 - 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.

5 - WAITES Ken B., Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N.º 4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. Duuy. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC- 159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 52, No. 10, 3776–3778.5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® es una marca registrada de 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 32 82 61

http://www.elitechgroup.com



Bewahren Sie übriggebliebenes Medium des UMMt Behälters
mindestens 48 Stunden lang bei 2-8 °C auf, um eine eventuelle
Überprüfung durchführen zu können

9.1 Inkubation der Galerie

Inkubieren Sie die Galerie 24 Stunden lang bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Für die Zählung von Uu und Mh lesen Sie die Ergebnisse nach 24 Stunden ab. Die Inkubation der Galerie kann nur bei negativen flüssigen Proben innerhalb von 24 Stunden auf bis zu 48 Stunden verlängert werden.

10 - ABLESEN UND INTERPRETIEREN

10.1 Validierung

Überprüfen Sie, ob alle Brunnen in der Galerie durchsichtig sind. Ein trüber Brunnen weist auf eine bakterielle Verunreinigung hin.

Wiederholen Sie in diesem Fall die Analyse.

10.2 Ablesen und Interpretieren

Das Ablesen der Ergebnisse beschränkt sich auf die Identifizierung der in den verschiedenen Brunnen der Galerie entstandenen Farben. Das Wachstum von urogenitalem Mykoplasma in den Brunnen führt zu einer Alkalisierung des Mediums, das sich rot verfärbt. Bei fehlendem Wachstum des Urogenitalmykoplasmas bleibt das Medium gelb. Eine orange Färbung sollte als positiver Test (Grenzwert) betrachtet werden.

Im Falle eines Ablesens des Ergebnisses nach 48 Stunden bei flüssigen Proben mit einem negativen Test nach 24 Stunden, wird nur die Anwesenheit von Mykoplasma erkannt, ohne Zählung. Siehe Ergebnisblatt für die Testauswertung.

10.2.1 Zählung (Brunnen 1, 2, 3 und 14)

Suchen Sie die Brunnen, die rot geworden sind und interpretieren Sie sie:

1 Uu-Werte von 10^3 UCC/mL
1 und 2 Uu-Werte von 10^4 UCC/mL
1, 2 und 3 Uu-Werte $\geq 10^5$ UCC/mL
14 Mh-Wert $\geq 10^4$ UCC/mL

Die pathologische Rolle von Mykoplasmen bei urogenitalen Infektionen wird nach spezifischen Empfehlungen interpretiert (1,3,7). Die üblichen festgehaltenen pathologischen Werte für *U. urealyticum* sind: $\geq 10^4$ UCC/mL für die Harnröhrenentnahme, $\geq 10^3$ UCC/mL für den ersten Urinstrahl oder Sperma (obwohl eine neue lokale Empfehlung einen Schwellenwert bei $\geq 10^4$ UCC/mL für Sperme erwähnt (7)). Für *M. hominis* ist eine Anwesenheit mit einem Wert von $\geq 10^4$ UCC/mL in einem Zervikovaginalabstrich abnormal (1, 3).

10.2.2 Empfindlichkeitstest gegenüber (Brunnen 4 bis 13 und dann 15 bis 24)

Die Farbveränderung des Mediums in den Brunnen, die ein Antibiotikum enthalten, spiegelt die Fähigkeit des Stammes wider, sich in Gegenwart der geprüften Konzentration des Antibiotikums zu entwickeln. Die gelbe Farbe des Mediums spiegelt die Unfähigkeit des Stammes wider, sich in Gegenwart der getesteten Konzentration des Antibiotikums zu entwickeln. Stämme werden nach den folgenden, von der CLSI (2) definierten Interpretationskriterien als anfällig oder resistent gegen Antibiotika eingestuft:

Tabelle der Auslegungskriterien der MIC ($\mu\text{g/mL}$):

Klasse	Antibiotikum	Uu		Mh		Anmerkungen
		S	R	S	R	
Quinolone	Levofloxacin	≤ 2	≥ 4	≤ 1	≥ 2	
	Moxifloxacin	≤ 2	≥ 4	$\leq 0,25$	$\geq 0,5$	
Lincosamide	Clindamycin			$\leq 0,25$	$\geq 0,5$	
Tetracyclin	Tetracyclin	≤ 1	≥ 2	≤ 4	≥ 8	
	Doxycyclin	≤ 1	≥ 2	≤ 4	≥ 8	
Makrolide	Erythromycin	≤ 8	≥ 16			Stämme, die empfindlich auf Erythromycin reagieren, sind auch empfindlich gegenüber Azithromycin

Interpretationshilfe:

Antibiotika-Empfindlichkeitstests für Uu

Antibiotikum	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
Konzentration ($\mu\text{g/mL}$)	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Profil	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= Auslegung

Antibiotika-Empfindlichkeitstests für Uu

Antibiotikum	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
Konzentration ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	int*	0,25	0,5	int*	0,25	0,5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Profil	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= Auslegung

Der Stamm wird empfindlich genannt, wenn sein Wachstum bei beiden kritischen Konzentrationen des Antibiotikums gehemmt ist. Der Stamm wird resistent genannt, wenn sein Wachstum bei der hohen kritischen Konzentration des Antibiotikums gehemmt und bei der niedrigen kritischen Konzentration nicht gehemmt wird, oder wenn sein Wachstum bei beiden kritischen Konzentrationen des Antibiotikums nicht gehemmt wird.

M. hominis ist von Natur aus resistent gegen Makrolide mit 14 und 15 Karbonen, einschließlich Erythromycin. In einigen Populationen kann die Resistenz gegenüber Tetracyclin 45 % für Uu und 39,6 % für Mh erreichen (2). Resistenz gegen Chinolone (Uu und Mh) (5, 6) und Clindamycin (Mh) wurde beschrieben, aber die Prävalenz ist nicht bekannt.

11 - SONDERFÄLLE

Bei sehr hohen Raten von Uu oder Mh färben sich alle vom Keim betroffenen Brunnen rot. Es wird dann empfohlen, die Probe zu verdünnen, um ein genaueres Ergebnis zu erhalten. In diesem Fall gehen Sie bitte folgendermaßen vor:

Besäen Sie einen neuen 3 mL UMMt-Behälter mit 300 μL des ursprünglichen UMMt-Mediums, das bei $2-8^\circ\text{C}$ aufbewahrt wurde (§ 9.1).

Besäen Sie eine neue Galerie mit dem neu besäten UMMt-Medium. Bei der Interpretation der Zählung ist die Verdünnung (1:10) zu berücksichtigen. Bestätigen Sie bei Bedarf auf A7-Agar das Vorhandensein von Mykoplasmen durch erneute Isolierung aus dem bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagerten Original UMMt-Medium (§ 9.1).

Eine nicht konstante Inkubationstemperatur oder $< 36^\circ\text{C}$ (häufiges Öffnen der Wärmekammer, Temperaturheterogenität in der Wärmekammer,...) kann die Wachstumskinetik von Mykoplasmen verlangsamen.

12 - QUALITÄTSKONTROLLE

Die Qualitätskontrolle kann aus den *U. urealyticum* oder *M. hominis* Stämmen des MYCOPLASMA CONTROL Kits (Art. 00900) oder aus einem lyophilisierten Sammelstamm (*U. urealyticum* ATCC 27815 oder *M. hominis* ATCC 23114) durchgeführt werden, der zuvor auf 10^{4-5} UCC/mL kalibriert wurde. Besäen Sie die MYCOFAST Revolution 2 Galerie und setzen Sie den Test wie in dieser Anleitung beschrieben (§9 und 10) fort.

Erwartete Ergebnisse unten (ATCC):

MYCOFAST Revolution 2

	Uu 10^3	Uu 10^4	Uu $\leq 10^5$	Mh $\leq 10^4$	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
Uu-Stamm ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	NI*
Mh-Stamm ATCC 23114	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI* (nicht interpretierbar)

13 - GRENZEN DER METHODE

Einige Bakterien, die in der Anzahl $>10^{6-7}$ UFC/mL vorhanden sind und eine Urease besitzen können alle Brunnen der Galerie verfärben. Ihr Vorhandensein kann durch Nachisolieren auf Schokoladenagar aus dem bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagerten Original UMMT-Medium nachgewiesen werden (§ 9.1).

Ein basischer Probenahme-pH-Wert ($\text{pH} \geq 8$) kann zur Verfärbung des Mediums führen. Verdünnen Sie in diesem Fall die Probe (1:10) in einem anderen UMMt-Medium und interpretieren Sie unter Berücksichtigung der Verdünnung erneut. Ein saurer Proben pH-Wert ($\text{pH} \leq 5$) kann das Auftreten der Verfärbung verlangsamen.

Eine Probe, die Blut enthält, kann zu einer Veränderung der Farbe der Brunnen der MYCOFAST Galerie *Revolution 2* führen, die als positive Ergebnisse bewertet werden. Verdünnen Sie in diesem Fall die Probe (1:10) in einem anderen UMMT-Medium und interpretieren Sie unter Berücksichtigung der Verdünnung erneut. Eine leicht mit Mykoplasmen geladene Probe ($<10^3$ UCC/mL) kann eine zufällige Färbung in den verschiedenen Brunnen der Galerie ergeben. Wie bei jeder Keimtestmethode hängt die Qualität der Probe vom Ergebnis des Tests ab. Ein negativer Test bedeutet nicht unbedingt, dass keine Infektion vorhanden ist.

14 - LEISTUNGEN

14.1 Identifikation - Zählung

% der Gesamtkonkordanz	Uu	Mh	Uu/Mh
Isolierte Stämme (Werte $\leq 10^3$ UCC/mL) (s. § 14.1.1)	97,4	NA*	NA*
Isolierte Stämme (Werte $\geq 10^4$ UCC/mL) (siehe § 14.1.1)	93,4	93,4	93,4
Vaginale klinische Proben (siehe § 14.1.2)	100	100	100
Flüssige klinische Proben - Urin (siehe § 14.1.2)	93,2	96,6	94,9

NA* (Nicht zutreffend)

14.1.1 Auf isolierten Stämmen

Eine vergleichende Studie wurde mit 21 isolierten Stämmen (ATCC und Sammelstämme) durchgeführt, die separat (Uu oder Mh) bei mehreren Konzentrationen (insgesamt 76 Tests) getestet wurden. Die erzielten Ergebnisse werden mit denen einer Mikroverdünnungszählung verglichen.

Für eine Interpretation mit einem pathologischen Schwellenwert, der auf 10^3 UCC/mL festgelegt wurde, beträgt die globale Konkordanz für Uu 97,4 % (wir haben 2 falsche Positive für Werte 10^2 UCC/mL im Mikroverdünnungszählverfahren aufgeführt).

Für eine Interpretation mit einem pathologischen Schwellenwert, der auf 10^4 UCC/mL festgelegt wurde, beträgt die Gesamtkonkordanz von Uu 93,4 % (wir haben 5 falsche Positive für Werte 10^3 UCC/mL im Mikroverdünnungszählverfahren aufgeführt). Die Gesamtkonkordanz für Mh beträgt 93,4 % (wir haben 5 falsche Positive identifiziert, 4 für Werte von 10^3 UCC/mL und eines für einen Wert von 10^2 UCC/mL im Mikroverdünnungszählverfahren).

Die Gesamtkonkordanz Uu und Mh beträgt 93,4 %.

14.1.2 Auf klinischen Proben

Eine erste vergleichende Studie wurde an vaginalen klinischen Proben (n=23) durchgeführt, die in trockenen Tupfern entnommen wurden. Die mit MYCOFAST *Revolution* 2 erzielten Ergebnisse werden mit einem Mikroverdünnungszählverfahren verglichen.
Die Gesamtkonkordanz für Uu und Mh beträgt 100 %.

Eine zweite vergleichende Studie wurde mit klinischen Urinproben durchgeführt (n=88).
Die mit MYCOFAST *Revolution* 2 erzielten Ergebnisse werden mit denen der routinemäßig im Labor verwendeten Methode verglichen.
Die Gesamtkonkordanz für Uu beträgt 93,2 % (wir haben 1 falsches Negativ für einen Wert von 10^4 UCC/mL im Mikroverdünnungszählverfahren und 5 falsche Positive für Werte von 10^2 UCC/mL im Mikroverdünnungszählverfahren aufgeführt).
Die Gesamtkonkordanz für Mh beträgt 96,6 % (wir haben 3 falsche Positive für Werte von 10^2 - 10^3 UCC/mL im Mikroverdünnungszählverfahren aufgeführt).
Die Gesamtkonkordanz für Uu und Mh beträgt 94,9 %.

14.2 Empfindlichkeitstest gegenüber Antibiotika

Die Vergleichsstudie wurde in einem nationalen Referenzlabor zwischen der Methode zur Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen (MIC) in flüssigen Medien und der MYCOFAST *Revolution* 2-Methode durchgeführt.

Die getesteten Stämme (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* und 16 *M. hominis*) sind Referenzstämme, wilde klinische Stämme oder Stämme, die Resistenzen entwickelt haben. Jeder Stamm ist getestet in Verdünnungen von 10^3 – 10^4 und 10^5 UCC/mL in UMMt 3 mL.

Für die Werte 10^4 und 10^5 UCC/mL wurden die Ergebnisse nach 24 Stunden Inkubation abgelesen und interpretiert.

Für die Werte 10^3 UCC/mL wurden die Ergebnisse nach 48 Stunden Inkubation abgelesen und interpretiert, wenn der Test innerhalb von 24 Stunden negativ war.

Die Ergebnisse beider Methoden werden nach CLSI-Empfehlungen als sensitiv (S) oder resistent (R) interpretiert.

Die Gesamtkonkordanz für *U. urealyticum*/*U. parvum* beträgt 95,5 %

Die Gesamtkonkordanz für *M. hominis* beträgt 100 %

Konkordanz	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>parvum</i> (n=40)					<i>Mycoplasma hominis</i> (n=28)				
	TET	DOX	MXF	LVX	ERY	TET	DOX	MXF	LVX	CLI
	34	38	40	39	40	28	28	28	28	28
DM	5 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DTM	1 ^b	2 ^c	0	1 ^d	0	0	0	0	0	0

DM: Große Diskordanz, DTM : Sehr große Diskordanz

a: 1 Diskordanz bei 10^3 UCC/mL (Referenz-MIC bei 0,5 µg/mL), 4 Diskordanzen bei 10^5 UCC/mL (Referenz-MIC bei 0,5 - 1 und 8 µg/mL).

b: 1 Diskordanz bei 10^5 UCC/mL (Referenz-MIC bei 8 µg/mL).

c: 1 Diskordanz bei 10^3 UCC/mL (Referenz-MIC bei 8 µg/mL); .1

Diskordanz bei 10^5 UCC/mL (Referenz-MIC bei 2 µg/mL)

d: 1 Diskordanz bei 10^5 UCC/mL (Referenz-MIC 4 µg/mL).

15 - ABFALLENTSORGUNG

Die Entsorgung von Abfällen muss gemäß den für diese Art von Reagenzien im Verwendungsland geltenden Hygienevorschriften erfolgen.

16 - LITERATURVERZEICHNIS

1 - BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.

2 - 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.

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.

4 - 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.

5 - WAITES Ken B. , Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. Duuy. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC-159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 52, No. 10, 3776–3778.5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® ist ein eingetragenes Warenzeichen von ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19, allée d'Athènes 83870

SIGNES – FRANKREICH

Tel.: 33 (0)4 94 88 55 00

Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61

<http://www.elitechgroup.com>



MYCOFAST® Revolution 2

Diagnosi di micoplasmi urogenitali

Rilevamento

Conteggio

Identificazione

Sensibilità agli antibiotici

25 test (RIF. 00080)

CPB 0410_IT-2018-03

Esclusivamente per diagnostica *in vitro*, solo per uso professionale
I test sono monouso.

1 - OBIETTIVO

Il cofanetto MYCOFAST Revolution 2 consente il rilevamento, il conteggio e l'identificazione di *Ureaplasma Urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (Uu) e di *Mycoplasma hominis* (Mh) a partire da diversi campioni clinici. Il cofanetto MYCOFAST Revolution 2 consente inoltre lo studio della sensibilità di Uu e Mh agli antibiotici secondo le raccomandazioni del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institutes) (2).

2 - INTRODUZIONE

Diverse specie censite a giorno I micoplasmi, che contano d'oggi negli esseri umani, appartengono alla classe dei mollicuti. Sono si distinguono da altri batteri per numerosi aspetti, tra cui l'assenza di parete che conferisce loro una resistenza naturale alle β -lattamine, unitamente a una membrana ricca di steroli provenienti dalle membrane delle cellule eucariote su cui si fissano. I micoplasmi sono organismi relativamente fragili, che non si moltiplicano in mezzo acellulare se non in presenza di molti fattori di crescita e a una temperatura ottimale di 37 °C (4).

La maggior parte dei micoplasmi umani è costituita da semplici commensali. Le specie isolate dal tratto urogenitale, *U. urealyticum* e *M. hominis* sono quelle riscontrate più spesso. La specie *U. urealyticum* è suddivisa in due biovarianti: *U. urealyticum* e *U. parvum* (Uu).

Uu o Mh possono comportarsi come veri e propri patogeni. Sono responsabili di infezioni genitali maschili (uretriti non gono-cocciche, epididimiti, prostatiti, infertilità); di infezioni ginecologiche (vagini batterica, endometrite, salpingite); di disturbi della riproduzione (corioamniotiti, endometriti post-partum, nascite premature, aborti spontanei); di esiti neonatali (basso peso alla nascita, infezioni respiratorie, neurologiche, batteriemie, ascessi); di infezioni extragenitali (artrite settica, artrite reattiva, altre localizzazioni) (1).

La diagnosi delle infezioni da micoplasmi dipende dalla determinazione di una soglia patologica e quindi da un conteggio. La comparsa di resistenza di Uu e Mh a determinate molecole porta a eseguire un test di sensibilità agli antibiotici (5,6). Gli antibiotici testati e i criteri di interpretazione sono appropriati per il trattamento delle infezioni da micoplasmi nel tratto urogenitale o in altri organi extra-genitali (2).

3 - PRINCIPIO

MYCOFAST Revolution 2 è un metodo liquido basato sulla capacità di Uu e Mh di metabolizzare l'urea e l'arginina. La crescita dei micoplasmi in mezzo liquido è visualizzata mediante il viraggio di un indicatore colorato, il rosso di fenolo, dal giallo-arancione al rosso fucsia che rispecchia l'alcalinizzazione del mezzo a causa della liberazione di ammoniaca.

La crescita del micoplasma così visualizzata permette:

- il conteggio basato sul tasso di idrolisi dei substrati che proporzionale alla quantità di germi contenuti nel campione;
- lo studio della sensibilità di Uu e Mh agli antibiotici.

Nel caso di campioni misti (Uu + Mh), il test consente di interpretare le sensibilità di ciascuna specie agli antibiotici testati.

4 - REAGENTI

Descrizione	Quantità
UMMT: Fiala da 3 ml di brodo di micoplasmi con antibiotici e conservante.	25
MYCOFAST® Revolution 2: Galleria di 24 pozzetti confezionata in bustina di alluminio con essiccante integrato.	25
Sistema di chiusura: Coperchio protettivo della galleria inoculata in plastica trasparente.	25

La galleria MYCOFAST Revolution 2 contiene, in forma disidratata nei 24 pozzetti, il mezzo di coltura dei micoplasmi (siero di cavallo, estratto di lievito, cisteina, arginina, urea, rosso di fenolo, antibiotici, pH:6,1 $\pm$ 0,1) e si compone di 2 parti separate:

- la parte destinata al conteggio e alla valutazione della sensibilità agli antibiotici per la specie Uu (pozzetti marcati in nero sull'etichetta);
- la parte destinata al conteggio e alla valutazione della sensibilità agli antibiotici per la specie Mh (pozzetti marcati in rosso sull'etichetta).

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
	DOX		LVX		MXF		CLI		TET		
	4	8	1	2	0.25	0.5	0.25	0.5	4	8	
14	Mh	MYCOFAST® Revolution 2								2	DOX
1	Uu									1	12
	Uu	Uu	2	4	2	4	8	16	1	2	
	10 ⁴	$\geq 10^5$	LVX		MXF		ERY		TET		
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

Parte destinata alla diagnostica della specie Uu (in nero):

Pozzetti 1/2/3: Identificazione e conteggio di Uu per tassi di 10³, 10⁴ e $\geq 10^5$ UCC/mL (soluzione tamponata e lincomicina che inibisce la crescita di Mh).

Pozzetti 4/5: Valutazione della sensibilità di Uu alla levofloxacina (LVX) a 2/4 μ g/mL

Pozzetti 6/7: Valutazione della sensibilità di Uu alla moxifloxacina (MXF) a 2 / 4 μ g/mL

Pozzetti 8/9: Valutazione della sensibilità di Uu all'eritromicina (ERY) a 8 / 16 μ g/mL

Pozzetti 10/11: Valutazione della sensibilità di Uu alla tetraciclina (TET) a 1-2 μ g/mL

Pozzetti 12/13: Valutazione della sensibilità di Uu alla doxiciclina (DOX) 1-2 μ g/mL

Parte destinata alla diagnosi della specie Mh (in rosso):

Pozzetto 14: Identificazione e numerazione di Mh per tassi $\geq 10^4$ UCC/mL

Pozzetti 15/16: Valutazione della sensibilità di Mh alla doxiciclina (DOX) a 4-8 μ g/mL

Pozzetti 17/18: Valutazione della sensibilità di Mh alla levofloxacina (LVX) a 1-2 μ g/mL

Pozzetti 19/20: Valutazione della sensibilità di Mh alla moxifloxacina (MXF) a 0,25-0,5 μ g/mL

Pozzetti 21/22: Valutazione della sensibilità di Mh alla clindamicina (CLI) a 0,25-0,5 μ g/mL

Pozzetti 23/24: Valutazione della sensibilità di Mh alla tetraciclina (TET) a 4-8 μ g/mL

5 - PRECAUZIONI D'IMPIEGO

I reagenti di questo cofanetto sono destinati esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* e devono essere maneggiati da personale autorizzato.

I campioni e i reagenti inoculati sono potenzialmente fettivi, devono essere manipolati con le precauzioni per l'uso nel rispetto delle norme di igiene e del regolamento in vigore nel paese di utilizzo per questo tipo di prodotto.

I reagenti contenenti materie prime di origine animale devono essere manipolati con le precauzioni per l'uso.

Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

Non utilizzare reagenti danneggiati o conservati in modo improprio prima dell'uso.

Un risultato positivo con il metodo MYCOFAST indica colonizzazione da micoplasmi urogenitali, ma non può essere utilizzato da solo per eseguire una diagnosi clinica. Questa deve essere eseguita dal medico in funzione dei risultati biologici e dei segni clinici.

6 - RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

6.1 Raccolta di campioni

Tamponi cervico-vaginali:

Utilizzare esclusivamente un tampone dacron o rayon, o un cito spazzolino. Eseguire il prelievo dopo un'accurata eliminazione delle secrezioni dell'esocollo con un primo tampone.

I micoplasmi presentano una forte affinità per le cellule cose cui aderiscono, è essenziale raschiare bene la mucosa per ottenere una buona resa.

Campioni uretrali:

Pulire il meato e prelevare mediante tampone o raschiamento delle cellule.

Sperma, urina:

Raccogliere lo sperma o il primo getto di urina in una fiala sterile.

6.2 Trasporto in mezzo UMMt

Prelievo su tampone asciutto:

Scaricare il tampone in una fiala di mezzo UMMt da 3 mL

Campioni liquidi:

Inoculare una fiala di mezzo UMMt da 3 ml con 300 μ l di liquido omogeneizzato

6.3 Conservazione in mezzo UMMt

Una volta inoculato, il mezzo UMMt può essere conservato a temperatura ambiente (18-25°C) per 20 ore, oppure a 2-8°C per 56 ore.

Per la conservazione per 3 giorni a -20°C, aggiungere preventivamente 2 gocce di "MYCOPLASMA Stabilizer".

7 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso. I reagenti conservati a 2-8 °C nello stato originale sono stabili fino alla data di scadenza indicata sul cofanetto.

Il mezzo UMMt può essere conservato temporaneamente (3 mesi) a temperatura ambiente ma presenta una stabilità migliore a 2-8°C.

Non congelare i reagenti del cofanetto.

8 - MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Materiale di campionamento (tamponi, cito spazzolini, fiale sterili per la raccolta di campioni liquidi), pipette e coni di trasferimento

MYCOPLASMA Stabilizer (RIF. 00064); forno calibrato a 37 $\pm$ 1°C

Contenitore per rifiuti contaminati e oli minerali

9 - MODALITÀ OPERATIVA

Portare i reagenti a temperatura ambiente per 20-30 minuti.

9.1 Inoculazione della galleria

Rimuovere la pellicola adesiva tirando la linguetta e dispensare successivamente nei pozzetti:

pozzetti 1-24 100 μ l di mezzo UMMt inoculato

pozzetti 1-24 2 gocce di olio minerale

Coprire la galleria agganciando il coperchio "sistema di chiusura".

Identificare il campione.

Conservare l'eccesso della fiala UMMt a 2-8 °C per almeno 48 ore per consentire un'eventuale verifica.

9.2 Incubazione della galleria

Incubare la galleria a 37 $\pm$ 1 °C per 24 ore.

Per i conteggi Uu e Mh leggere i risultati in 24 ore. L'incubazione della galleria può essere prolungata fino a 48 ore solo nel caso di campioni liquidi negativi entro 24 ore.

10 - LETTURA E INTERPRETAZIONE
10.1 Convalida

Verificare che tutti i pozzetti della galleria siano limpidi. Un pozzetto torbido indica una contaminazione batterica. In questo caso, ripetere l'analisi.

10.2 Lettura e interpretazione

La lettura dei risultati consiste nell'identificazione delle colorazioni ottenute nei vari pozzetti della galleria. La crescita di micoplasmi urogenitali nei pozzetti provoca un'alcalinizzazione del mezzo di coltura, che vira verso il rosso. In assenza di crescita di micoplasmi urogenitali, il mezzo rimane giallo. Una colorazione arancione deve essere considerata un test positivo (tasso limite). Nel caso di una lettura del risultato in 48 ore di campione liquido con un test negativo in 24 ore, registrare solo la presenza di micoplasma rilevato senza conteggio. Per l'interpretazione del test, consultare la scheda dei risultati.

10.2.1 Conteggio (pozzetti 1, 2, 3 e 14)

Individuare i pozzetti che hanno virato verso il rosso e interpretare:

Table with 3 columns: Count, Uu/Mh ratio, and UCC/mL result.

Il ruolo patologico dei micoplasmi nelle infezioni urogenitali è soggetto a interpretazione in base a specifiche raccomandazioni (1,3,7). I tassi patologici solitamente utilizzati per U. urealyticum sono: ≥10^4 UCC/mL per un campione uretrale, ≥10^3 UCC/mL per un primo getto di urina o sperma (anche se una nuova raccomandazione locale menziona una soglia di ≥10^4 UCC/mL per lo sperma (7)). Per M. hominis la sua presenza a un tasso ≥10^4 UCC/mL in un tampone cervico-vaginale è anormale (1, 3).

10.2.2 Test di sensibilità agli antibiotici (pozzetti da 4 a 13 e poi da 15 a 24)

Il viraggio del mezzo nei pozzetti contenenti un antibiotico riflette la capacità del ceppo di svilupparsi in presenza della concentrazione testata dell'antibiotico. Il colore giallo del mezzo riflette l'incapacità del ceppo di svilupparsi in presenza della concentrazione testata dell'antibiotico. I ceppi sono classificati come sensibili o resistenti agli antibiotici secondo i seguenti criteri di interpretazione definiti dalla CLSI (2):

Tabella dei criteri di interpretazione delle MIC (µg/mL):

Table with 7 columns: Classe, Antibiotico, S, R, S, R, Commenti.

Ausilio per l'interpretazione:

Test di sensibilità agli antibiotici per Uu

Table with 17 columns: Antibiotico, LVX, MXF, ERY, TET, DOX, and Profili.

Test di sensibilità agli antibiotici per Mh

Table with 17 columns: Antibiotico, LVX, MXF, CLI, TET, DOX, and Profili.

int*= interpretazione

Il ceppo è detto Sensibile quando la sua crescita è inibita alle due concentrazioni critiche dell'antibiotico. Il ceppo è considerato Resistente quando la sua crescita è inibita alla concentrazione critica alta dell'antibiotico e non è inibita alla concentrazione critica bassa, o quando la sua crescita non è inibita alle due concentrazioni critiche dell'antibiotico. M. hominis è naturalmente resistente ai macrolidi con 14-15 atomi di carbonio, compresa l'eritromicina. In alcune popolazioni il tasso di resistenza alla tetraciclina può raggiungere il 45% per Uu e il 39,6% per Mh (2). Sono state descritte resistenze ai chinoloni (Uu e Mh) (5, 6) e alla clindamicina (Mh), ma la prevalenza non è nota.

11 - CASI PARTICOLARI

Per tassi molto elevati in Uu o Mh, si verifica un viraggio verso il rosso di tutti i pozzetti interessati dal germe. Si raccomanda quindi di diluire il campione per ottenere un risultato più accurato. In tal caso procedere come segue. Inoculare una nuova fiala UMMt da 3 ml con 300 µl di mezzo di coltura originale conservato a 2-8 °C (§ 9.1). Inoculare una nuova galleria con il nuovo mezzo UMMt inoculato. Considerare la diluizione (1:10) per l'interpretazione del conteggio. Confermare se necessario su agar A7 la presenza di micoplasmi isolando nuovamente a partire dal mezzo di coltura UMMt originale conservato a 2-8°C (§ 9.1). Una temperatura di incubazione non costante o < 36°C (frequente apertura del forno, eterogeneità di temperatura nel forno ...) può rallentare la cinetica di crescita dei micoplasmi.

12 - CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo qualità può essere eseguito da ceppi U. urealyticum o M. hominis del cofanetto MYCOPLASMA CONTROL (RIF. 00900) o da un ceppo di raccolta liofilizzato (U. urealyticum ATCC 27815 o M. hominis ATCC 23114) precedentemente calibrato a 10^4-5 UCC/mL. Inoculare la galleria MYCOFAST Revolution 2 e proseguire il test come indicato in questa nota (§ 9 e 10).

Ecco i risultati attesi (ATCC).

MYCOFAST Revolution 2

Table with 11 columns: Uu 10s, Uu 10s, Uu ≥10s, Mh ≥10s, LVX, MXF, ERY, TET, DOX, CLI.

NI*(non interpretabile)

13 - LIMITI DELLA METODOLOGIA

Alcuni batteri presenti in quantità >10^6-7 UFC/mL e in possesso di un'ureasi possono far virare tutti i pozzetti della galleria. La loro presenza può essere verificata reisolando su agar cioccolato il mezzo di coltura originale UMMt conservato a 2-8°C (§ 9.1).

14 - PRESTAZIONI
14.1 Identificazione - Conteggio

Table with 4 columns: % di concordanza globale, Uu, Mh, Uu/Mh.

NA* (non applicabile)

14.1.1 Su ceppi isolati

È stato condotto uno studio comparativo utilizzando 21 ceppi isolati (ceppi ATCC e ceppi di raccolta) testati separatamente (Uu o Mh) a diverse concentrazioni (76 test in totale). I risultati ottenuti sono confrontati con quelli ottenuti con il metodo del conteggio in microdiluizione. Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10^3 UCC/mL; la concordanza globale per Uu è del 97,4% (abbiamo elencato 2 falsi positivi per tassi a 10^2 UCC/mL con il metodo del conteggio in microdiluizione). Per un'interpretazione con soglia patologica fissata a 104 UCC/ml; la concordanza globale per Uu è del 93,4% (abbiamo elencato 5 falsi positivi per tassi a 10^3 UCC/mL con il metodo del conteggio in microdiluizione). La concordanza globale per Mh è del 93,4% (abbiamo elencato 5 falsi positivi, 4 per tassi di 10^3 UCC/mL e uno per un tasso di 10^2 UCC/mL con il metodo del conteggio in microdiluizione). La concordanza globale Uu e Mh è del 93,4%.

14.1.2 Su campioni clinici

Un primo studio comparativo è stato condotto su campioni vaginali clinici (n=23) prelevati in tamponi asciutti. I risultati ottenuti con MYCOFAST Revolution 2 sono confrontati con un metodo di conteggio in microdiluizione. La concordanza globale per Uu e Mh è del 100%. Un secondo studio comparativo è stato condotto utilizzando campioni clinici di urina (n=88). I risultati ottenuti con MYCOFAST Revolution 2 sono confrontati con quelli ottenuti con il metodo utilizzato abitualmente in laboratorio. La concordanza globale per Uu è del 93,2% (abbiamo registrato 1 falso negativo per un tasso di 10^3 UCC/mL con il metodo di conteggio in micro diluizione et 5 falsi positivi per tassi di 10^2 UCC/mL, conteggio in micro diluizione). La concordanza globale per Mh è del 96,6% (abbiamo registrato 3 falsi positivi per tassi di 10^2 – 10^3 UCC/mL, conteggio in micro diluizione). La concordanza globale per Uu e Mh è del 94,9%.

14.2 Test di sensibilità agli antibiotici

Lo studio comparativo è stato condotto in un laboratorio nazionale di riferimento tra il metodo per determinare le concentrazioni inibitorie minime (MIC) in mezzi liquidi e il metodo MYCOFAST Revolution 2. I ceppi testati (7 U. urealyticum, 11 U. parvum e 16 M. hominis) sono ceppi di riferimento, ceppi clinici selvatici o ceppi che hanno sviluppato resistenze. Chaque souche est testée aux dilutions de 10^3 – 10^4 et 10^5 UCC/mL dans l'UMMT 3 mL. Per i tassi 10^4 e 10^5 UCC/mL, i risultati sono stati letti e interpretati dopo 24 ore di incubazione. Per tassi di 10^3 UCC/mL, i risultati sono stati letti e interpretati dopo 48 ore di incubazione se il test è risultato negativo in 24 ore. I risultati dei due metodi sono interpretati come sensibili (S) o resistenti (R) secondo le raccomandazioni del CLSI. La concordanza globale per U. urealyticum/U. parvum è del 95,5%. La concordanza globale per M. hominis è del 100%.

Concor- Danza	<i>Ureaplasma urealyticum</i> / <i>par- vum</i> (n=40)					<i>Mycoplasma hominis</i> (n=28)				
	TET	DOX	MXF	LVX	ERY	TET	DOX	MXF	LVX	CLI
	34									
	38	40	39	40	28	28	28	28	28	
DM	5a	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DTM	1b	2c	0	1d	0	0	0	0	0	0

DM: Discrepanza importante, DTM: Discordanza molto importante

- a : 1 discordanza ottenuta a 10³ UCC/ml (MIC di riferimento 0,5 µg/mL),
4 discordanze ottenute a 10⁵ UCC/ml (MIC di riferimento 0,5 - 1 e 8 µg/mL).
b : 1 discordanza ottenuta a 10⁵ UCC/ml (MIC di riferimento 8 µg/mL).
c : 1 discordanza ottenuta a 10³ UCC/ml (MIC di riferimento 8 µg/mL);
1 discordanza ottenuta a 10⁵ UCC/ml (MIC di riferimento 2 µg/mL).
d : 1 discordanza ottenuta a 10⁵ UCC/ml (MIC di riferimento 4 µg/mL).

15 - ELIMINAZIONE DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti in conformità con le norme e i regolamenti igienici in vigore per questo tipo di reagenti nel Paese di utilizzo.

16 - BIBLIOGRAFIA

1 - BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007.Infections humaines à my-coplasmes. Revue Francophone des Laboratoires.N. 391, 63-69.

2 - 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.

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. I micoplasmi en pathologie humaine.Revue Française des Laboratoires.Supplemento al numero 329, 34-36.

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995.Ureaplasma urealyticum (T-strain Mycoplasma) and Mycoplasma hominis, p. 1713-1718.In Mandell G. L. , Bennet J. E. e Dolin R. (ed.). principles and practices of infectious diseases, 4° ed., vol.2, Churchill Livingstone, New York.

5 - WAITES Ken B. , Brenda Katz e Robert L. Schelonka.2005.Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens.Clin.Microbiol. Rev. Vol. 18 -N.4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb e Lynn B. Duffy.2008.Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC 159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol.52, N. 10, 3776–3778.5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5° edizione)

MYCOFAST® è un marchio registrato di ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
19, allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
Tél. : 04 94 88 55 00