

**Diagnostic des mycoplasmes urogénitaux**  
**MYCOFAST® Screening RevolutioN**  
**Détection et différenciation**  
 50 tests (REF 00063)

**COMPLEMENT MYCOFAST® RevolutioN**  
**Numération, identification et test de sensibilité**  
 25 tests (REF 00062)

**UMMt RevolutioN**  
 50 tests (REF 00061)

CPB 0396 FR-2013-08

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



### 1 - BUT

Le coffret MYCOFAST Screening RevolutioN (REF 00063) permet le dépistage et la différenciation de *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) et de *Mycoplasma hominis* (M.h.) à partir de différents prélevements cliniques. Il doit être utilisé en association avec les milieux du coffret UMMt Revolution (REF 00061). En cas de dépistage positif, l'analyse pourra être complétée avec les galeries du coffret COMPLEMENT MYCOFAST RevolutioN (REF 00062) permettant la numération et l'identification de U.u et/ou M.h ainsi que le test de sensibilité aux antibiotiques suivant les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

### 2 - INTRODUCTION

Les mycoplasmes, qui comptent plusieurs espèces recensées à ce jour chez l'homme, appartiennent à la classe des molécules. Ils se diffèrentient 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 acellulaire 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* (U.u.).

U.u. ou M.h. 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 U.u. et M.h. 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-génital (2).

### 3 - PRINCIPE

La technique MYCOFAST Screening RevolutioN est une méthode en milieu liquide basée sur l'aptitude de U.u. et de M.h. 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-orange au rouge qui traduit l'alcalinisation du milieu due à la libération d'ammoniaque.

La croissance des mycoplasmes ainsi visualisée permet :

- la détection et la différenciation ; puis en cas de positivité :
- la numération basée sur la vitesse d'hydrolyse des substrats qui est proportionnelle à la quantité de germes contenus dans le prélevement.
- l'identification basée sur la sensibilité ou non du germe vis-à-vis de trois antibiotiques.
- l'étude de la sensibilité de U.u. et M.h. aux antibiotiques.

### 4 - REACTIFS

Description	Quantité		
	#00061	#00062	#00063
<b>UMMt</b> : Flacon de 3 ml de bouillon mycoplasmes avec antibiotiques et agent conservateur. pH: 6.0 ± 0.1	<b>50</b>	-	-
<b>MYCOFAST SCREENING RevolutioN</b> : Galerie sécable de 10 puits pour 5 tests, conditionnée individuellement en sachet aluminium avec dessicant intégré	-	-	<b>10</b>
<b>Etiquettes</b> : Planche de 5 étiquettes sécables	-	-	<b>10</b>
<b>S. Mh.</b> : Activateur de croissance de M.h (4.5 mL)	-	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>MYCOFAST RevolutioN</b> : Galerie de 20 puits pour 1 test, conditionnée en sachet aluminium avec dessicant intégré	-	<b>25</b>	-
<b>Closing system</b> : Couvercle en plastique translucide pour galerie MYCOFAST RevolutioN	-	<b>25</b>	-

### Galerie MYCOFAST Screening RevolutioN

Galerie composée de 5 séries de 2 puits : un puit *Ureaplasma urealyticum* (U.u) contenant de la lincomycine et de l'urée et un puit *Mycoplasma hominis* (M.h) contenant de l'érythromycine et de l'arginine.

### Galerie MYCOFAST RevolutioN

La galerie contient dans les 20 puits le milieu de croissance sous forme déshydratée (sérum de poulet, extrait de levures, cystéine, arginine, urée, rouge de phénol, antibiotiques, pH : 6.1 ± 0.1) et comprend 4 parties distinctes:

- puits 1-3 **Numération de U.u. pour des taux de  $10^3$  à  $10^5$  UCC/ mL**  
(solution tamponnée et lincomycine inhibant la croissance des M.h).
- puits 4-6 **Identifiant**: Identification de U.u. et M.h. par leur profil de résistance ou de sensibilité à : Lincomycine (L), Triméthoprime-sulfaméthoxazole (SXT) et Erythromycine (E).
- puits 7 **Numération de Mh pour des taux  $> 10^4$  UCC/ mL** (solution tamponnée et érythromycine inhibant la croissance des U.u.).
- puits 8-20 **Evaluation de la sensibilité de Uu et Mh aux antibiotiques**  
Lévofoxacin (LVX) 1-2-4 µg/mL, Moxifloxacin (MXF) 0.25-2 µg/mL, Erythromycine (E) 8-16 µg/mL, Clindamycine (CM) 0.25-0.5 µg/mL, Tétracycline (TE) 1-2-4-8 µg/mL.

### 5 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs de ce coffret sont destinés uniquement au diagnostic *in vitro* et doivent être manipulés par des personnes habilitées.
- Les prélevements 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 galerie MYCOFAST RevolutioN 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 TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

#### 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'exocoll 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.

**Liquides gastriques**: Prélever le liquide gastrique des nouveau-nés par aspiration à l'aide d'un cathéter, et récolter dans un flacon stérile.

#### 6.2 Transport en milieu UMMt

Prélèvements sur écouvillon: Décharger l'écouvillon dans un flacon de milieu UMMt.

Prélèvements liquides: Ensemencer un flacon de milieu UMMt avec 300 µL 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 - PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

- Les réactifs conservés à 2-8 °C sous leur état d'origine sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes.

● En cas d'utilisation d'une seule série de puits (U.u) (M.h) ou de deux, trois, quatre séries de puits, le reste de la galerie MYCOFAST Screening RevolutioN non utilisé, et refermé hermétiquement dans la pochette d'origine en aluminium, peut être conservé 4 semaines à 2-8 °C.

- Le supplément Mh est stable 3 mois après ouverture.
- Le milieu UMMt peut être temporairement conservé à température ambiante mais présente une meilleure stabilité à 2-8 °C.
- Ne pas congeler les réactifs du coffret.

### 8 - MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Matériel pour prélèvement (écouvillons, cytobrosses, flacons stériles pour le recueil des prélevements liquides)
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- Pipettes et cônes de transfert
- Récipient pour déchets contaminés
- Huile minérale
- Etuve calibrée à 37 ± 1 °C

### 9 - MODE OPERATOIRE

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

#### 9.1 DEPISTAGE - Galerie MYCOFAST Screening RevolutioN

- Préparer autant de séries de puits que d'échantillons à tester.
- Si besoin, séparer une ou des séries de puits (U.u)/(M.h) en se repérant aux marquages sur la galerie.

#### 9.1.1 Ensemencement du milieu UMMt RevolutioN

Ensemencer le milieu UMMt avec l'écouvillon ou 300 µL de prélevements liquides (§ 6.2). Homogénéiser.

#### 9.1.2 Inoculation des puits Uu/Mh

- Distribuer successivement:
  - Puits (U.u) : 100 µL de milieu UMMt ensemencé.
  - Puits (M.h) : 100 µL de milieu UMMt ensemencé.
  - 50 µL de Supplément Mh.
- Rajouter 2 gouttes d'huile minérale dans les deux puits.
- Recouvrir les puits avec l'étiquette sécable et identifier le prélèvement.
- Conserver l'excédent du flacon de milieu UMMt ensemencé à 2-8 °C pour continuer l'analyse dans le cas d'un dépistage positif.

#### 9.1.3 Incubation des puits Uu/Mh

Incuber les puits de la galerie pendant 24 heures à 37 ± 1 °C. L'incubation de la galerie peut être prolongée jusqu'à 48 heures uniquement dans le cas de prélevements liquides négatifs en 24 heures.

#### 9.1.4 Lecture et interprétation des puits Uu/Mh

- Vérifier que les 2 puits (U.u) (M.h) sont limpides. Un puits trouble indique une contamination bactérienne. Dans ce cas recommencer le test.

- Observer le virage de couleur dans les puits U.u et M.h:
  - Puits U.u orangé ou rouge: Présence de *Ureaplasma urealyticum*
  - Puits M.h orangé ou rouge: Présence de *Mycoplasma hominis*
  - Puits U.u / M.h jaune : Absence de mycoplasmes

En cas de dépistage positif poursuivre le diagnostic avec la galerie MYCOFAST RevolutioN

#### 9.2 NUMERATION, IDENTIFICATION ET TEST DE SENSIBILITÉ

##### 9.2.1 Ensemencement de la galerie MYCOFAST RevolutioN

- Retirer le film adhésif en tirant sur les 2 languettes et distribuer successivement dans les puits:

- puits 1-20 100 µL de milieu UMMt ensemencé
- puits 6-7 50 µL de supplément S.Mh
- puits 1-20 2 gouttes d'huile minérale

- Recouvrir la galerie en enclenchant le couvercle "closing system".
- Identifier le prélèvement.

Conserver l'excédent du flacon UMMt à 2-8 °C afin de permettre une vérification éventuelle.

##### 9.2.2 Incubation de la galerie

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

Pour la numération des U.u et des M.h lire les résultats en 24 heures. L'incubation de la galerie peut être prolongée jusqu'à 48 heures uniquement dans le cas de prélevements liquides négatifs en 24 heures.

##### 9.2.3 Lecture et interprétation

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

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).

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

## Identification (puits 4, 5 et 6)

L'identification s'effectue en fonction du virage spécifique des puits 4, 5 et 6:

U. urealyticum	rouge	4 (L)	5 (SXT)	6 (E)
M. hominis	jaune	jaune	rouge	jaune
				rouge

## Numération (puits 1, 2, 3 et 7)

Repérer les puits ayant viré au rouge et interpréter:	
1	taux U.u. de $10^3$ UCC/mL
1 et 2	taux U.u. de $10^4$ UCC/mL
1, 2 et 3	taux U.u. $\geq 10^5$ UCC/mL
7	taux M.h. $\geq 10^4$ UCC/mL

Les taux pathologiques habituellement retenus pour *U. urealyticum* sont:  $\geq 10^4$  UCC/mL pour un prélèvement urétral ou un prélèvement endotrachéal,  $\geq 10^3$  UCC/mL pour un 1er jet d'urines ou un sperme. Pour *M. hominis* sa présence à un taux  $\geq 10^4$  UCC/mL dans un prélèvement cervico-vaginal est anormale (1, 3).

## Test de sensibilité aux antibiotiques (puits 8 à 20)

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:

## Critères d'interprétations des CMI en µg/mL

Classe	Antibiotique	U.u		M.h		Commentaires
		S	R	S	R	
Quinolones	Lévofoxacine	$\leq 2$	$\geq 4$	$\leq 1$	$\geq 2$	
	Moxifloxacine	$\leq 2$		$\leq 0.25$		
Macrolides	Erythromycine	$\leq 8$	$\geq 16$			Les souches sensibles à l'érythromycine sont sensibles à l'aztreomycine
	Lincosamides	Clindamycine		$\leq 0.25$	$\geq 0.5$	
Tétracyclines	Tétracycline	$\leq 1$	$\geq 2$	$\leq 4$	$\geq 8$	Les souches sensibles à la tétracycline sont sensibles à la doxycycline

- 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.
- Pour la Moxifloxacine seule la concentration critique basse est testée pour U.u. et pour M.h.
- M. hominis* est naturellement résistant aux macrolides à 14 et 15 carbones, incluant l'érythromycine et l'aztreomycine.
- Dans certaines populations le taux de résistance à la tétracycline peut atteindre 45 % pour les U.u et 39.6% pour les M.h (2). Des résistances aux quinolones (U.u et M.h) (5, 6) et à la clindamycine (M.h.) ont été décrites mais la prévalence n'est pas connue.

## 10 - CAS PARTICULIERS

Pour des taux très élevés de U.u ou de M.h il y a virage au rouge de tous les puits de la galerie. 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 avec 300  $\mu$ L du milieu UMMt d'origine conservé à 2-8 °C (voir § 9.2.1).
- 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 (voir§ 9.2.1).

## 11 - CONTROLE QUALITE

Le contrôle qualité peut être réalisé à partir de la souche *U. urealyticum* du coffret MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) ou à partir d'une souche de collection lyophilisée (*U. urealyticum* ATCC 33175) préalablement calibrée à  $10^{4-5}$  UCC/mL.

**Dépistage :** Ensemencer les deux puits d'une galerie MYCOFAST Screening RevolutioN et poursuivre le test comme indiqué dans la notice (§ 9.1).

Résultats attendus : U.u (+) et M.h (-).

**Numération, identification et test de sensibilité:** Ensemencer la galerie MYCOFAST RevolutioN et poursuivre le test comme indiqué dans cette notice (§ 9.2).

Résultats attendus (ATCC 33175):

Uu	Uu	Uu	L	SXT	E	Mh	LVX	LVX	LVX
+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-
MXF	MXF	E	E	CM	CM	TE	TE	TE	TE
+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-

## 12 - LIMITES DE LA METHODE

**12.1 - Dépistage:** La galerie MYCOFAST Screening RevolutioN possède un seuil de sensibilité  $< 10^3$  UCC/mL et ne permet pas la numération. La numération obtenue avec la galerie MYCOFAST RevolutioN peut se révéler négative après un dépistage positif.

## 12.2 - Numération, identification et test de sensibilité

- Quelques bactéries présentes en quantité  $\geq 10^{6-7}$  UFC/mL et possédant une uréase peuvent faire virer tous les puits de la galerie. Leur présence peut être vérifiée en réisolant sur gélose chocolat à partir du milieu UMMt d'origine conservé à 2-8 °C (voir § 9.2).
- Un pH de prélèvement basique (pH  $\geq 8$ ) 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 prélèvement faiblement chargé en mycoplasmes ( $< 10^3$  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.

## 13 - PERFORMANCES

### 13.1 Souches isolées

#### 13.1.1 Dépistage et différenciation - Identification et numération

Une étude comparative a été réalisée à partir de 9 souches isolées (souches ATCC et souches de collection) testées séparément (U.u ou M.h) à deux concentrations ou en mixte (U.u/M.h). Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec une autre méthode en milieu liquide.

#### Galerie MYCOFAST Screening RevolutioN

- Pour le dépistage (n=19) la concordance est de 100%.
- Pour la différenciation (n=21), toutes les souches testées U.u ou M.h ont été correctement identifiées dans les puits de la galerie MYCOFAST Screening RevolutioN.
- Pour l'identification (n=21) la concordance est de 100%.
- Pour la numération des U.u (n = 11) 10 tests sont concordants et 1 test donne une numération à  $10^3$  UCC/mL avec MYCOFAST RevolutioN et  $\geq 10^4$  UCC/mL avec la méthode comparative ( $\leq 10^3$  UCC/mL avec A7 AGAR).
- Pour la numération des M.h (n = 10) 6 tests sont concordants et 4 tests donnent une numération  $\geq 10^4$  UCC/mL avec MYCOFAST RevolutioN et  $< 10^4$  UCC/mL avec la méthode comparative ( $10^4$  UCC/mL avec A7 AGAR).

#### 13.1.2 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. Les souches testées (5 *U. urealyticum*, 10 *U. parvum* et 10 *M. hominis*) sont des souches de référence, des souches cliniques sauvages ou des souches ayant acquis des résistances. Chaque souche est testée aux dilutions de  $10^3$ ,  $10^4$  et  $10^5$  UCC/mL. Les résultats des deux méthodes sont interprétés en Sensible (S) ou Résistant (R) selon les recommandations du CLSI M43-A.

La concordance globale pour *U. urealyticum* est de 96.7 % (174/180).

La concordance globale pour *M. hominis* est de 99.2% (119/120).

Prélèvements positifs pour U.u et M.h: Les prélèvements positifs pour U.u et M.h avec la méthode comparative se sont révélés positifs pour U.u et M.h avec MYCOFAST RevolutioN, sauf pour 5 prélèvements. 11 prélèvements positifs pour U.u et 2 prélèvements négatifs avec la méthode comparative se sont révélés positifs pour U.u et M.h avec MYCOFAST RevolutioN.

	n = 179	MYCOFAST RevolutioN	METHODE COMPARATIVE
U.u (n = 118)	111	U.u	U.u
	5	U.u	Absence
M.h (n = 4)	2	Absence	U.u
	4	M.h	M.h
U.u/M.h (n = 57)	39	U.u/M.h	U.u/M.h
	11	U.u/M.h	U.u
	2	U.u/M.h	Absence
	4	U.u	U.u/M.h
	1	M.h	U.u/M.h

## 13.2.2 Numération

Les résultats de la numération des souches U.u (n = 175) et des souches M.h (n = 61) obtenus avec la méthode comparative et/ou avec MYCOFAST RevolutioN sont donnés dans les deux tableaux suivants :

U.u (n=175)	MYCOFAST RevolutioN	METHODE COMPARATIVE
147	$\geq 10^5$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
2	$\geq 10^5$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
5	$\geq 10^5$ UCC/mL	Absence
9	$10^4$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	$10^4$ UCC/mL	Absence
5	$10^3$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	$10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
1	$10^3$ UCC/mL	Absence
2	Absence	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	Absence	$< 10^4$ UCC/mL
1	$< 10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL

Parmi les 165 prélèvements positifs pour U.u avec les deux méthodes, 158 prélèvements présentent une numération identique. Parmi les 44 prélèvements positifs pour M.h avec les deux méthodes, 10 prélèvements présentent une numération identique et 34 prélèvements présentent une numération avec un taux pathologique pour la méthode MYCOFAST RevolutioN et un taux infopathologique pour la méthode comparative.

## 14 - 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.

## 15 - BIBLIOGRAPHIE

- BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.
- 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.
- PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.
- TAYLOR-Robinson D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MANDELL G. L., BENNET J. E. et DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.
- WAITES KEN B. , BREND A KATZ AND ROBERT L. SCHELONKA. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 N°4 - 757-789.
- 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.
- MYCOFAST® est une marque déposée d'ELITech MICROBIO
- ELITech MICROBIO Parc d'activités du plateau 19, allée d'Athènes 83870 SIGNESES (FRANCE) Tel : 33 (0)4 94 88 55 00 Fax : 33 (0)4 94 88 55 22 http://www.elitechgroup.com



## Urogenital mycoplasma diagnosis

### MYCOFAST® Screening RevolutioN

#### Screening and differentiation

50 tests (REF 00063)

### COMPLEMENT MYCOFAST® RevolutioN

#### Enumeration, identification and susceptibility testing

25 tests (REF 00062)

### UMMt RevolutioN

50 tests (REF 00061)

CPB 0396 EN-2013-08

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



#### 1 - INTENDED USE

MYCOFAST Screening RevolutioN (REF 00063) has been designed for the screening and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) and *Mycoplasma hominis* (M.h.) in various clinical specimens. This kit should be used in association with the media contained in the UMMt RevolutioN kit (REF 00061).

In the case of positive screening, analysis can be completed with trays contained in the COMPLEMENT MYCOFAST RevolutioN kit (REF 00062) allowing the enumeration and identification of U.u and/or M.h as well as the antimicrobial susceptibility testing 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  $\beta$ -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* (U.u.).

U.u. and M.h. 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 U.u./M.h. 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 Screening RevolutioN is a liquid method based on the ability of U.u. and M.h. to metabolize urea and arginine respectively. The 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:

- detection and differentiation; then, if a positive result is obtained:
- 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 identification based on the sensitivity or otherwise of the germ to three antimicrobial agents.
- the U.u and M.h susceptibility testing to antimicrobial agents.

#### 4 - REAGENTS

Description	Amount		
	#00061	#00062	#00063
UMMt : Vial of 3 mL mycoplasma broth with antimicrobial agents and preservative solution. pH : 6.0 ± 0.1	50	-	-
MYCOFAST SCREENING RevolutioN: Divisible tray, of 10 wells for 5 tests, individually packed in an aluminium sachet with an integrated desiccant	-	-	10
Labels: Sheet of 5 divisible labels	-	-	10
S. Mh.: Mycoplasma hominis growth activator (4.5 mL)	-	2	1
MYCOFAST RevolutioN: Tray of 20 wells for 1 test, packed in an aluminium sachet with an integrated desiccant	-	25	-
Closing system: Protective translucent plastic lid for MYCOFAST RevolutioN tray	-	25	-

#### MYCOFAST Screening RevolutioN tray

Tray consisting of 5 rows of 2 wells: a *Ureaplasma urealyticum* (U.u) well containing lincomycin and urea and a *Mycoplasma hominis* (M.h) well containing erythromycin and arginine.

#### MYCOFAST RevolutioN tray

The MYCOFAST RevolutioN tray contains in each of the 20 wells the dehydrated culture medium (foal serum, yeast extract, cysteine, arginine, urea, phenol red, antibiotics, pH: 6.1 ± 0.1) and comprises 4 parts:

Wells 1-3 Enumeration for U.u between  $10^3$  and  $\geq 10^5$  CCU/mL (buffered solution and lincomycin included to inhibit the growth of M.h).

Wells 4-6 U.u. and M.h. Identification via resistance profiles to Lincomycin (L), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT) and Erythromycin (E).

Well 7 Enumeration of M.h.:  $\geq 10^4$  CCU/mL (buffered solution and erythromycin included to inhibit the growth of U.u).

Wells 8-20 Antimicrobial susceptibility testing for U.u. and M.h. against:

Levofloxacin (LVX) 1-2-4  $\mu$ g/mL, Moxifloxacin (MXF) 0.25-2  $\mu$ g/mL, Erythromycin (E) 8-16  $\mu$ g/mL, Clindamycin (CM) 0.25-0.5  $\mu$ g/mL, Tetracycline (TE) 1-2-4-8  $\mu$ 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 and is a function of the 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 scraped 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.

Gastric secretions : Collect gastric secretions from the neonate by aspiration with a catheter and transferral to a sterile bottle.

##### 6.2 Transport in UMMt medium

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

Liquid samples: Inoculate a vial of UMMt medium with 300  $\mu$ L 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.

● Should only one or two, three, or four rows of (U.u) (M.h) wells be used, the remaining MYCOFAST Screening RevolutioN tray may be stored for 4 weeks at 2-8 °C in its original packaging and hermetically resealed.

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

● The S.Mh supplement is stable for 3 months after opening  
● Do not freeze the reagents contained in the kit.

#### 8 - MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Sample collection (Swabs, cytobrushes, sterile containers for liquid samples)
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- Pipettes and tips, ● Waste container for contaminated waste
- Mineral oil
- Incubator at 37°C ± 1°C

#### 9 - METHOD

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

##### 9.1 SCREENING - MYCOFAST Screening RevolutioN tray

- Prepare as many rows of wells as samples to be tested.
- If required separate one or several rows of (U.u)/(M.h) wells with the aid of the marks found on the tray.

##### 9.1.1 Inoculation of UMMt RevolutioN medium

Seed the UMMt medium with a swab or 300  $\mu$ L of liquid sample (\$6.2). Mix well.

##### 9.1.2 Inoculation of Uu/Mh wells

- Distribute successively:  
(U.u) well: 100  $\mu$ L of seeded UMMt medium.  
(M.h) well: 100  $\mu$ L of seeded UMMt medium.  
50  $\mu$ L of Mh supplement.

- Add 2 drops of mineral oil to the two wells.

- Cover the wells with the divisible labels and label the sample in order to identify it.

- Store excess seeded UMMt medium at 2-8°C in order to continue the analysis in case of positive screening.

##### 9.1.3 Incubation of Uu/Mh wells

Incubate the wells of the tray for 24 hours at 37°C ± 1°C.  
Tray incubation can be extended for up to 48 hours only in the case of liquid samples that are negative after 24 hours.

##### 9.1.4 Reading and interpretation of Uu/Mh wells

- Check that the 2 (U.u) (M.h) wells are limpid. A cloudy appearance in a well indicates bacterial contamination. In this case repeat the analysis. Observe the colour change of the medium in the U.u and M.h wells:  
U.u wells are orangey or red: Presence of *Ureaplasma urealyticum*  
M.h wells are orangey or red: Presence of *Mycoplasma hominis*  
U.u / M.h wells are yellow: Absence of mycoplasma

In the case of positive screening continue diagnosis with the MYCOFAST RevolutioN tray.

##### 9.2 ENUMERATION, IDENTIFICATION AND SUSCEPTIBILITY TESTING

##### 9.2.1 Inoculation of the MYCOFAST RevolutioN tray

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

Wells 1-20 100  $\mu$ L of inoculated UMMt  
Wells 6-7 50  $\mu$ L of S.Mh supplement  
Wells 1-20 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.

##### 9.2.2 Incubation of the tray

Incubate the tray at 37°C ± 1°C for 24 hours.

For U.u. and M.h. enumeration, read the results in 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.

##### 9.2.3 – Reading and interpretation

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. 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).

For the interpretation of the results refer to the results sheet.

## Identification (wells 4, 5 and 6)

Identification is made according to the colour change in wells 4, 5 and 6:

	4 (L)	5 (SXT)	6 (E)
<i>U. urealyticum</i>	red	red	yellow
<i>M. hominis</i>	yellow	red	red

## Enumeration (wells 1, 2, 3 and 7)

Mark the wells that have turned red and interpret:

1	U.u. value $10^3$ CCU/mL
1 and 2	U.u. value $10^4$ CCU/mL
1, 2 and 3	U.u. value $>10^5$ CCU/mL
7	M.h. value $\geq 10^4$ CCU/mL

The pathological thresholds usually quoted for *U. urealyticum* are:  $>10^4$  CCU/mL for a urethral specimen or endotracheal specimen,  $>10^5$  CCU/mL in a first urine stream or sperm. The presence of *M. hominis* at a threshold  $\geq 10^4$  CCU/mL in a cervicovaginal specimen is abnormal (1, 3).

## Antimicrobial susceptibility testing (wells 8 to 20)

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: MIC ( $\mu$ g/mL) Interpretative Criteria

Antimicrobial		U.u		M.h		Comments
Class	Drug	S	R	S	R	
Quinolones	Levofloxacin	$\leq 2$	$\geq 4$	$\leq 1$	$\geq 2$	
	Moxifloxacin	$\leq 2$		$\leq 0.25$		
Macrolides	Erythromycin	$\leq 8$	$\geq 16$			Organisms susceptible to erythromycin will also be susceptible to azithromycin
	Clindamycin			$\leq 0.25$	$\geq 0.5$	
Tetracyclines	Tetracycline	$\leq 1$	$\geq 2$	$\leq 4$	$\geq 8$	Organisms susceptible to tetracycline will also be susceptible to doxycycline

- The strain is said to be **Sensitive** 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.
- For Moxifloxacin only one concentration is tested for U.u. and M.h.
- 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 U.u and 39.6% for M.h (2). U.u/M.h quinolone (5, 6) and clindamycin resistance have been described but the prevalence is not known.

## 10 - PARTICULAR CASES

For high U.u and M.h 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 vial with 300  $\mu$ L of the original UMMt medium stored at 2-8°C (see § 9.2.1).
- 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 (§ 9.2.1).

## 11 - QUALITY CONTROL

Quality control can be carried out from a MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) strain or from a lyophilised reference strain (*Ureaplasma urealyticum* ATCC 33175) previously calibrated at  $10^{4-5}$  CCU/mL.

Screening: Inoculate the two wells of the MYCOFAST Screening Revolution tray and perform the test as indicated in these instructions (§ 9.1).

Expected results: U.u (+) and M.h (-).

Identification, enumeration and susceptibility testing: Inoculate the MYCOFAST Revolution tray and perform the test as indicated in these instructions (§ 9.2).

Expected results (ATCC 33175):

Uu	Uu	Uu	L	SXT	E	Mh	LVX	LVX	LVX
+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-
MXF	MXF	E	E	CM	CM	TE	TE	TE	TE
+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-

## 12 - LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

### 12.1 - Screening

The MYCOFAST Screening Revolution tray allows detection at a threshold of  $<10^3$  UCC/mL and does not enable enumeration. The numeration obtained with the MYCOFAST Revolution tray can appear negative following positive screening.

### 12.2 - Identification, enumeration and susceptibility testing

- Some bacteria that are present in quantities of  $>10^{6-7}$  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 (see § 9.2).
- An alkaline sample pH (pH  $\geq 8$ ) may lead the UMM medium to change colour. Should this occur, dilute the sample (1:10) in fresh UMM medium and interpret the results taking the dilution into account.
- A sample with a low mycoplasma load ( $<10^3$  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.

## 13 - PERFORMANCE

### 13.1 Isolated strains

A comparative study was carried out with 9 isolated strains (ATCC strains and collection strains) tested separately (U.u or M.h) with two concentrations or mixed together (U.u/M.h). The results obtained were compared with those obtained with another method in liquid medium.

### MYCOFAST Screening Revolution tray

- For the screening (n=19) there was 100% concordance.
- For the differentiation (n=21), all of the strains U.u or M.h tested were correctly identified in the wells of the MYCOFAST Screening Revolution tray.

### MYCOFAST Revolution tray

- For the identification (n=21) there was 100% concordance.
- For the numeration of U.u (N = 11) 10 tests were concordant and 1 test gave a numeration with  $10^3$  UCC/mL with MYCOFAST Revolution and  $>10^4$  UCC/mL with the comparative method ( $\leq 10^3$  UCC/mL with A7 AGAR).
- For the numeration of M.h (N = 10) 6 tests were concordant and 4 tests gave a numeration  $\geq 10^4$  UCC/mL with MYCOFAST Revolution and  $<10^4$  UCC/mL with the comparative method ( $10^4$  UCC/mL with A7 AGAR).

### 13.1.2. Antimicrobial susceptibility testing

A comparative study was carried out in a national reference laboratory between the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) in liquid medium and the MYCOFAST Revolution method. The strains tested (5 *U. urealyticum*, 10 *U. parvum* et 10 *M. hominis*) were reference collection strains, clinical wild-type strains or strains having acquired resistance. Each strain was tested at dilutions  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  CCU/mL. The results of the two methods were interpreted as being Susceptible (S) or Resistant (R) according to the CLSI M43-A standard recommendations.

	<i>U. urealyticum/parvum</i> (n = 45)				<i>M. hominis</i> (n = 30)			
	LVX	MXF	E	TE	LVX	MXF	CM	TE
Concordance	43	42	45	44	30	30	29	30
ME	2	3	0	0	0	0	0	0
VME	0	0	0	1*	0	0	1**	0

For *U. urealyticum* the overall agreement is 96.7 % (174/180).

For *M. hominis* the overall agreement is 99.2% (119/120).

Concordance : (S/S ou R/R), ME : Major Error (R/S), VME : Very Major Error (S/R)

\*: Discrepancy obtained at  $10^4$  UCC/mL within one dilution (MIC at 2  $\mu$ g/mL)

\*\*: Discrepancy obtained at  $10^5$  UCC/mL within one dilution (MIC at 0.5  $\mu$ g/mL)

### 13.2 Clinical strains

A comparative study was carried out with clinical samples collected in double, of which 179 positive samples (U.u and/or M.h) detected by at least one of the two methods. The results obtained with MYCOFAST Revolution were compared with those obtained with the routine method used in test laboratories.

### 13.2.1 Identification

Positive samples for U.u: The U.u strains detected with the comparative method were correctly identified with MYCOFAST Revolution except for 2 samples. 5 samples that were negative with the comparative method appeared positive for U.u with MYCOFAST Revolution.

Positive samples for M.h: The 4 M.h strains detected with the comparative method were correctly identified with MYCOFAST Revolution.

Positive samples for U.u and M.h: The samples that were positive for U.u and

M.h with the comparative method appeared positive for U.u and M.h with MYCOFAST Revolution, except for 5 samples. 11 positive samples for U.u and 2 negative samples with the comparative method appeared positive for U.u and M.h with MYCOFAST Revolution.

	n = 179	MYCOFAST Revolution	COMPARATIVE METHOD
U.u (n = 118)	111	U.u	U.u
	5	U.u	Absence
M.h (n = 4)	2	Absence	U.u
	4	M.h	M.h
U.u/M.h (n = 57)	39	U.u/M.h	U.u/M.h
	11	U.u/M.h	U.u
	2	U.u/M.h	Absence
	4	U.u	U.u/M.h
	1	M.h	U.u/M.h

### 13.2.2. Enumeration

The enumeration results of the U.u (n = 175) and M.h strains (n = 61) obtained with the comparative method and/or MYCOFAST Revolution are described in the following two tables.

U.u (n=175)	MYCOFAST Revolution	COMPARATIVE METHOD
147	$\geq 10^5$ CCU/mL	$\geq 10^4$ CCU/mL
2	$\geq 10^5$ CCU/mL	$<10^4$ CCU/mL
5	$\geq 10^5$ CCU/mL	Absence
9	$10^4$ CCU/mL	$\geq 10^4$ CCU/mL
1	$10^4$ CCU/mL	Absence
5	$10^3$ CCU/mL	$\geq 10^4$ CCU/mL
1	$10^3$ CCU/mL	$<10^4$ CCU/mL
1	$10^3$ CCU/mL	Absence
2	Absence	$\geq 10^4$ CCU/mL
1	Absence	$<10^4$ CCU/mL
1	$<10^3$ CCU/mL	$<10^4$ CCU/mL

  

M.h (n=61)	MYCOFAST Revolution	COMPARATIVE METHOD
10	$\geq 10^4$ CCU/mL	$\geq 10^4$ CCU/mL
34	$\geq 10^4$ CCU/mL	$<10^4$ CCU/mL
13	$\geq 10^4$ CCU/mL	Absence
4	Absence	$<10^4$ CCU/mL

Among the 165 positive samples for U.u with the two methods, 158 samples show an identical enumeration. Among the 44 positive samples for M.h with the two methods, 10 samples show an identical enumeration and 34 samples show an enumeration with a pathological threshold with MYCOFAST Revolution method and an infra-pathological threshold with the comparative method.

## 14 - 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.

## 15 - BIBLIOGRAPHY

- BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.
  - 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.
  - PERERE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.
  - 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.
  - 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.
  - 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.
- MYCOFAST® is a trademark of ELITech MICROBIO
- The changes from the previous version are underlined in grey.
- ELITech MICROBIO**  
Parc d'activités du plateau  
19, allée d'Athènes  
83870 SIGNES (FRANCE)  
Tel : 33 (0)4 94 88 55 00  
Fax : 33 (0)4 94 88 55 22  
<http://www.elitechgroup.com>

**Diagnóstico de Micoplasmas urogenitales**  
**MYCOFAST® Screening RevolutioN**  
**Detección y diferenciación**  
 50 tests (REF 00063)

**COMPLEMENT MYCOFAST® RevolutioN**  
**Recuento, identificación y prueba de sensibilidad**

25 tests (REF 00062)

**UMMt RevolutioN**

50 tests (REF 00061)

CPB 0396\_ES-2013-08

Para uso en diagnóstico *in vitro*, sólo para uso profesional



## 1 - FINALIDAD

El estuche MYCOFAST Screening RevolutioN (REF 00063) permite la detección y la diferenciación de *Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum* (U.u.) y de *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partir de distintas muestras clínicas. Se debe utilizar en combinación con los medios del estuche UMMt RevolutioN (REF 00061). En caso de resultado positivo, el análisis se podrá completar con las galerías del estuche COMPLEMENT MYCOFAST RevolutioN (REF 00062) que permite la numeración e identificación de U.u. y/o M.h., así como la prueba de sensibilidad a los antibióticos siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

## 2 - INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas, de los que hay más de 15 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 esteroles 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 bioriedades: *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 postparto, 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 micoplasmas 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 extra genitales.

## 3 - PRINCIPIO

MYCOFAST RevolutioN es un método en medio líquido basado en la aptitud de U.u. y de M.h. para 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:

- la detección y la diferenciación; además, en caso de resultado positivo:
- el recuento basado en la velocidad de la hidrólisis de los sustratos, proporcional a la cantidad de gérmenes contenidos en la muestra;
- la identificación basada en la sensibilidad o no del germen frente a tres antibióticos;
- el estudio de la sensibilidad de U.u. y M.h. a los antibióticos.

## 4 - REACTIVOS

Descripción	Cantidad	#00061	#00062	#00063
UMMt : Frasco de 3 mL de medio de micoplasmas con antibióticos y agente conservador. pH: 6,0 ± 0,1.	50	-	-	
MYCOFAST SCREENING RevolutioN : Galería divisible de 10 pocillos para 5 pruebas, envasada en un sobre de aluminio con desecante integrado.	-	-	10	
Etiquetas: Tabla de 5 etiquetas divisibles.	-	-	10	
S. Mh: Frasco de 4,5 mL de activador de crecimiento de <i>M. hominis</i> .	-	2	1	
MYCOFAST RevolutioN: Galería de 20 pocillos envasada en un sobre de aluminio con desecante integrado.	-	25	-	
Closing system: Tapa de protección de la galería con el cultivo, en plástico transparente.	-	25	-	

### Galería MYCOFAST Screening RevolutioN

Galería compuesta por 5 series de 2 pocillos: un pocillo de *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) que contiene lincomicina y urea y otro pocillo de *Mycoplasma hominis* (M.h.) que contiene eritromicina y arginina.

### Galería MYCOFAST RevolutioN

La galería MYCOFAST RevolutioN contiene en los 20 pocillos el medio de crecimiento de los micoplasmas en forma deshidratada (suero de caballo, extracto de levaduras, cisteína, arginina, urea, rojo de fenol, antibióticos, pH: 6,1 ± 0,1) e incluye 4 partes diferenciadas:

pocillos 1-3 Recuento de U.u. para proporciones de  $10^3$  a  $>10^5$  UCC/mL (solución tamponada y lincomicina inhibidora del crecimiento de M.h.).

pocillos 4-6 Identificación de U.u. y M.h. por su perfil de resistencia o de sensibilidad a: lincomicina (L), trimetropim-sulfametoaxazol (SXT) y eritromicina (E).

pocillos 7 Recuento de Mh para proporciones  $\geq 10^4$  UCC/ mL (solución tamponada y eritromicina inhibidora del crecimiento de U.u.).

pocillos 8-20 Evaluación de la sensibilidad de U.u y Mh a los antibióticos:

levofloxacino (LVX) 1-2-4 µg/mL , moxifloxacina (MXF) 0,25-2 µg/mL, eritromicina (E) 8-16 µg/mL, clindamicina (CM) 0,25-0,5 µg/mL, tetraciclina (TE) 1-2-4-8 µg/mL.

## 5 - PRECAUCIONES DE EMPLEO

- Los reactivos de este estuche deben utilizarse únicamente para el diagnóstico *in vitro* y deben ser manipulados por personas autorizadas para ello.
- 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 cervico-vaginales: Utilizar únicamente un hisopo de Dacron o de rayón, o un citocepillo. Realizar la toma de la muestra tras eliminar bien las secreciones del exocervix mediante un primer hisopo. Los micoplasmas tienen una gran afinidad por las células de las 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.

Líquidos gástricos :Recoger el líquido gástrico de los recién nacidos por aspiración, con un catéter, y depositarlo en un frasco estéril.

### 6.2 Transporte en medio UMMt

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

Muestras líquidas: Sembrar un frasco con medio UMMt 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

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

● En caso de uso de una sola serie de pocillos (U.u.) (M.h.) o de dos, tres o cuatro series de pocillos, el resto de la galería MYCOFAST Screening RevolutioN, no utilizada y cerrada herméticamente en la bolsita original de aluminio, se puede conservar durante 4 semanas a 2-8 °C.

● El suplemento S.Mh se mantiene estable durante 3 meses después de abrirlo.

● El medio UMMt puede conservarse temporalmente 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, citocepillos, frascos estériles para recoger muestras líquidas)

● MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)

● Pipetas y conos, recipiente para residuos contaminados.

● Vaselina líquida estéril, estufa calibrada a 37 °C ± 1°C.

## 9 - PROCEDIMIENTO

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

#### 9.1 DETECCIÓN - Galería MYCOFAST Screening RevolutioN

- Prepare tanto la serie de pocillos como las muestras que se van a testar.
- En caso de que sea necesario, separa una de las series de pocillos (U.u.)/(M.h.) consultando la marca de la galería.

##### 9.1.1 Sementación del medio UMMt RevolutioN

Sementación del medio UMMt con el hisopo o 300 µL de extracciones líquidas (§ 6.2). Homogenice.

##### 9.1.2 Inoculación de los pocillos U.u/M.h.

- Distribuya sucesivamente:

Pocillo (U.u.): 100 µL de medio UMMt sementado.

Pocillo (M.h.): 100 µL de medio UMMt sementado.

50 µL de suplemento M.h.

- Añada 2 gotas de aceite mineral en los dos pocillos.

- Recubra los pocillos con la etiqueta divisible e identifique la extracción.

- **Conserve el excedente del frasco de medio UMMt sementado a 2-8 °C para continuar el análisis en caso de resultado positivo.**

##### 9.1.3 Incubación de los pocillos Uu/Mh

Incube los pocillos de la galería durante 24 horas a 37 ± 1 °C. La incubación en la galería puede alargarse hasta 48 horas sólo en el caso de muestras líquidas que resultan negativas después de 24 horas.

##### 9.1.4 Lectura e interpretación de los pocillos Uu/Mh

- Compruebe que ambos pocillos (U.u.) (M.h.) estén nítidos. Un pocillo turbio indica contaminación bacteriana. En este caso, vuelva a comenzar la prueba.

- Observe el cambio de color de los pocillos U.u. y M.h.:

Pocillo U.u. anaranjado o rojo: Presencia de *Ureaplasma urealyticum*

Pocillo M.h. anaranjado o rojo: Presencia de *Mycoplasma hominis*

Pocillo U.u./M.h. amarillo: Ausencia de micoplasmas

**En caso de resultado positivo, prosiga el diagnóstico con la galería MYCOFAST RevolutioN**

#### 9.2 NUMERACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SENSIBILIDAD

##### 9.2.1 Siembra de la galería MYCOFAST RevolutioN

- Retirar la película adhesiva tirando de las 2 lengüetas y distribuir sucesivamente en los pocillos:

pocillos 1-20 100 µL de medio UMMt regenerado

pocillos 6-7 50 µL de suplemento S.Mh

pocillos 1-20 2 gotas de la 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 48 horas como mínimo para permitir una eventual verificación.

##### 9.2.2 Incubación de la galería

Incubar la galería a 37 °C ± 1 °C durante 24 horas. Para el recuento de los U.u y M.h, leer los resultados en 24 horas. La incubación en la galería puede alargarse hasta 48 horas sólo en el caso de muestras líquidas que resultan negativas después de 24 horas.

##### 9.2.3 Lectura e Interpretación

Verificar que todos los pocillos están limpios. Un pocillo turbio indica contaminación bacteriana. En este caso empezar otra vez la prueba.

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

## Identificación (pocillos 4, 5 y 6)

La identificación se realiza en función de la reacción específica de los pocillos 4, 5 y 6:

	4 (L)	5 (SXT)	6 (E)
<i>U. urealyticum</i>	rojo	rojo	amarillo
<i>M. hominis</i>	amarillo	rojo	rojo

## Recuento (pocillos 1, 2, 3 y 7)

Marcar los pocillos que hayan cambiado a rojo e interpretar:

1	tasa U.u. $10^3$ UCC/mL
1 y 2	tasa U.u. $10^4$ UCC/mL
1, 2 y 3	tasa U.u. $\geq 10^5$ UCC/mL
7	tasa M.h. $\geq 10^4$ UCC/mL

Las proporciones patológicas indicadas habitualmente para *U. urealyticum* son:  $\geq 10^4$  UCC/mL para una muestra uretral o una muestra endotraqueal,  $\geq 10^3$  UCC/mL para un primer chorro de orina o el esperma. Para *M. hominis*, su presencia en una proporción  $\geq 10^4$  UCC/mL en una muestra cérvico-vaginal es anómala (1, 3).

## Test de sensibilidad a los antibióticos (pocillos 8 a 20)

La reacción del medio en los pocillos que contienen antibiótico indica 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 consideran sensibles o resistentes frente a los antibióticos según los criterios de interpretación siguientes, definidos por el CLSI (2):

### Criterios de interpretación de los CMI en µg/ml

Clase	Antibiótico	U.u		M.h		Observaciones
		S	R	S	R	
Quinolonas	Levofloxacina	$\leq 2$	$\geq 4$	$\leq 1$	$\geq 2$	
	Moxifloxacina	$\leq 2$		$\leq 0.25$		
Macrolídos	Eritromicina	$\leq 8$	$\geq 16$			Las cepas sensibles a la eritromicina son sensibles a la azitromicina
	Lincosamidas			$\leq 0.25$	$\geq 0.5$	
Tetraciclínas	Tetraciclina	$\leq 1$	$\geq 2$	$\leq 4$	$\geq 8$	Las cepas sensibles a la tetraciclina son sensibles a la doxiciclina

- La cepa se considera **Sensible** cuando su crecimiento es inhibido con dos 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.
- Para la moxifloxacina solo se hace la prueba de U.u. y M.h. con la concentración crítica baja.
- En determinadas poblaciones, el nivel de resistencia a la tetraciclina puede llegar al 45% para los U.u. y al 39,6% para los M.h. (2). Se han descrito resistencias a las quinolonas (U.u. y M.h.) (5, 6) y a la clindamicina (M.h.), pero se desconoce la prevalencia.

## 10 - CASOS PARTICULARES

Para niveles muy elevados en U.u o M.h, hay una reacción al rojo en todos los pocillos de la galería. En ese caso, se recomienda realizar una dilución de la muestra para obtener un resultado más preciso. En este caso, proceder de la siguiente manera:

- Inocule un nuevo vial de UMMt con 300µL de medio UMMt original almacenado a 2-8°C (ver § 9.1). Inocule una nueva placa con el nuevo medio UMMt inoculado.
- Sembrar una nueva galería con el medio 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 aislarse, a partir del medio UMMt de origen conservado a 2-8 °C (apartado 9.2.1).

## 12 - CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad puede realizarse a partir de la cepa *U. urealyticum* del estuche MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) o a partir de una cepa de recogida liofilizada (*U. urealyticum* ATCC 33175) calibrada previamente a  $10^{4-5}$  UCC/mL.

Detección: Semente los dos pocillos de una galería MYCOFAST Screening RevolutioN y continúe según se indica en las instrucciones (§ 9.1).

Resultados esperados: U.u. (+) y M.h. (-).

Numeración, identificación y prueba de sensibilidad: Sembrar la galería MYCOFAST RevolutioN y continuar la prueba como se indica en este prospecto (apartados 9.2). Los resultados esperados se indican a continuación (ATCC 33175):

Uu	Uu	Uu	L	SXT	E	Mh	LVX	LVX	LVX
+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-
MXF	MXF	E	E	CM	CM	TE	TE	TE	TE
+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-

## 12 - LÍMITES DEL MÉTODO

### 12.1 - Detección

La placa MYCOFAST Screening RevolutioN no permite la numeración, sino la detección en un umbral de  $<103$  UCC/mL. La numeración obtenida con la galería MYCOFAST RevolutioN puede resultar negativa tras una detección positiva.

### 12.2 - Recuento, identificación y test de sensibilidad

● Algunas bacterias, presentes en cantidad  $\geq 10^{6-7}$  UFC/mL y que poseen una ureasa, pueden hacer virar todos los pocillos de la galería. Su presencia puede comprobarse volviendo a aislar en agar chocolate a partir del medio UMMt de origen conservado a 2-8 °C (apartado 9.2).

● Un pH de muestra básica (pH  $\geq 8$ ) puede hacer reaccionar el medio. En ese caso, diluir la muestra (1:10) en otro medio UMMt y realizar la interpretación teniendo en cuenta la disolución.

● Una muestra con una carga débil de micoplasmas ( $<10^3$  UCC/mL) puede provocar una reacción aleatoria en distintos pocillos de la galería.

● Al igual que con cualquier otro método de búsqueda de gérmenes, la calidad de la muestra condiciona el resultado de la prueba. Por lo tanto, una prueba negativa no indica forzosamente una ausencia de infección.

## 13 - RESULTADOS

### 13.2 Cepas aisladas

#### 13.1.1 Detección y diferenciación - Identificación y recuento

Un estudio comparativo realizado con 9 cepas aisladas (cepas ATCC y cepas de referencia), analizadas por separado (U.u o M.h) con dos concentraciones o de forma mixta (U.u/M.h). Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos con otro método en medio líquido.

#### Galería MYCOFAST Screening RevolutioN

- Para la detección (n=19) la concordancia es del 100%

- Para la diferenciación (n=21), todas las matrices testadas U.u o M.h. se han identificado correctamente en los pocillos de la galería MYCOFAST Screening RevolutioN.

#### Galería MYCOFAST RevolutioN

- Para la identificación (n=21) la concordancia es del 100%.

- Para el recuento de U.u (n = 11) 10 pruebas son concordantes y 1 prueba indica un recuento de  $10^3$  UCC/ml con MYCOFAST RevolutioN y  $\geq 10^4$  UCC/mL con el método comparativo ( $\leq 10^3$  UCC/mL con A7 AGAR).

- En lo que respecta al recuento de M.h (n = 10), 6 pruebas son concordantes y 4 pruebas indican un recuento  $\geq 10^4$  UCC/mL con MYCOFAST RevolutioN y  $<10^4$  UCC/mL con el método comparativo ( $10^4$  UCC/mL con A7 AGAR).

#### 13.1.2 Test de sensibilidad a los antibióticos

El estudio comparativo se ha realizado en un laboratorio nacional de referencia entre el método de determinación de concentraciones mínimas inhibidoras (CMI) en medio líquido y el método MYCOFAST RevolutioN. Las cepas analizadas (5 *U. urealyticum*, 10 *U. parvum* y 10 *M. hominis*) son cepas de referencia, cepas clínicas salvajes o cepas que han adquirido resistencia. Cada cepa se prueba con diluciones de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  UCC/mL. Los resultados de los dos métodos se interpretan como Sensible (S) o Resistente (R) de acuerdo con las recomendaciones del CLSI M43-A.

La concordancia global para *U. urealyticum* es del 96,7 % (173/180).

La concordancia global para *M. hominis* es del 99,2% (119/120).

	U.urealyticum/parvum (n = 45)				M. hominis (n = 30)			
	LVX	MXF	E	TE	LVX	MXF	CM	TE
Concordancia	43	42	45	44	30	30	29	30
DM	2	3	0	0	0	0	0	0
DMM	0	0	0	1*	0	0	1**	0

Concordancia: S/S o R/R, DM: Discordancia Mayor (R/S), DMM: Discordancia Muy Mayor (S/R)  
\* Discordanza obtenida con  $10^4$  UCC/ml, con una dilución aproximada (CMI de referencia a 2 µg/ml)

\*\* Discordanza obtenida con  $10^5$  UCC/ml con una dilución aproximada (CMI de referencia con 0,5 µg/ml)

### 13.2 Cepas clínicas

Se realizó un estudio comparativo con muestras clínicas dobles, de las cuales 179 eran muestras positivas (U.u y/o M.h) detectadas como mínimo por uno de los dos métodos. Los resultados obtenidos con MYCOFAST RevolutioN se comparan con los obtenidos con el método utilizado habitualmente en el laboratorio de evaluación.

#### 13.2.1 Identificación

Muestras positivas para U.u: Las cepas U.u detectadas con el método comparativo han sido identificadas con MYCOFAST RevolutioN, excepto en 2 muestras. 5 muestras negativas con el método comparativo han resultado positivas con MYCOFAST RevolutioN.

Muestras positivas para M.h: Las 4 cepas M.h detectadas con el método comparativo han sido identificadas con MYCOFAST RevolutioN.

Muestras positivas para U.u y M.h: Las muestras positivas para U.u y M.h con el método comparativo han resultado positivas para U.u y M.h con MYCOFAST RevolutioN, excepto 5 muestras. 11 muestras positivas para U.u y 2 muestras negativas con el método comparativo han resultado positivas para U.u y M.h con MYCOFAST RevolutioN.

	n = 179	MYCOFAST RevolutioN	MÉTODO COMPARATIVO
U.u (n = 118)	111	U.u	U.u
	5	U.u	Ausencia
M.h (n = 4)	2	Ausencia	U.u
	4	M.h	M.h
U.u/M.h (n = 57)	39	U.u/M.h	U.u/M.h
	11	U.u/M.h	U.u
	2	U.u/M.h	Ausencia
	4	U.u	U.u/M.h
	1	M.h	U.u/M.h

#### 13.2.2 Recuento

Los resultados del recuento de las cepas U.u (n = 175) y de las cepas M.h (n = 61) obtenidos con el método comparativo y/o con MYCOFAST RevolutioN se indican en las dos tablas siguientes:

U.u (n=175)	MYCOFAST RevolutioN	MÉTODO COMPARATIVO
147	$\geq 10^5$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
2	$\geq 10^5$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
5	$\geq 10^5$ UCC/mL	Ausencia
9	$10^4$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	$10^4$ UCC/mL	Ausencia
5	$10^3$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	$10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
1	$10^3$ UCC/mL	Ausencia
2	Ausencia	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	Ausencia	$< 10^4$ UCC/mL
1	$< 10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL

Entre las 165 muestras positivas para U.u con los dos métodos, 158 muestras presentan un recuento idéntico. Entre las 44 muestras positivas para M.h con los dos métodos, 10 muestras presentan un

recuento idéntico y 34 muestras presentan un recuento con un nivel patológico con el método MYCOFAST RevolutioN y un nivel infrapatológico con el método comparativo.

## 14 - ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

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

## 15 - BIBLIOGRAFIA

- 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 - PERREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Francophone des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.
- 4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (1-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans Mandel G. L., Bennett 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.
- 7 - MYCOFAST® es una marca registrada de ELITech MICROBIO
- ELITech MICROBIO Parc d'activités du plateau 19, allée d'Athènes 83870 SIGNE (FRANCE)
- Tel : 33 (0)4 94 88 55 00
- Fax : 33 (0)4 94 88 55 22
- <http://www.elitechgroup.com>

Los cambios desde la revisión anterior, están resaltados en gris



**Diagnostica Dei Micoplasmi Urogenitali**  
**MYCOFAST® Screening RevolutioN**  
**Ricerca differenziazione**  
 50 tests (REF 00063)

**COMPLEMENT MYCOFAST® RevolutioN**  
**Conta, identificazione e test di Sensibilità**  
 25 tests (REF 00062)  
**UMMt RevolutioN**  
 50 tests (REF 00061)

CPB 0396\_IT-2013-08

Per uso diagnostico *in vitro*, solo per uso professionale



**1 – USO PREVISTO**

MYCOFAST Screening RevolutioN (REF 00063) è indicato per la ricerca e differenziazione di *Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum* (Uu) e *Mycoplasma hominis* (Mh) in vari campioni clinici. Questo kit è da utilizzare in associazione con il brodo contenuto fornito con l'UMMt RevolutioN kit (REF 00061).

In caso di screening positivo, l'analisi può essere completata con le gallerie fornite con il COMPLEMENT MYCOFAST RevolutioN kit (REF 00062) che consente la conta e l'identificazione di U.u e/o M.h così come la determinazione del saggio di sensibilità agli antibiotici in accordo con le raccomandazioni CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

**2 – SOMAMRIO**

I Micoplasmi, che comprendono varie specie isolate dagli esseri umani, appartengono alla classe dei *Mollicutes*. Si differenziano dagli altri batteri per numerosi aspetti, tra i quali l'assenza di una parete cellulare che conferisce loro una naturale resistenza ai β-lattamici, e una membrana ricca in steroli ottenuti dalle cellule eucariote sulle quali essi aderiscono. Poiché i micoplasmi sono microrganismi piuttosto delicati, sono in grado di crescere solo in colture acellulari in presenza di fattori di crescita e a una temperatura ottimale di 37°C (4).

La maggior parte dei micoplasmi umani è commensale. *U. urealyticum* e *M. hominis* sono le specie isolate con più frequenza dal tratto urogenitale. La specie *U. urealyticum* è suddivisa in due biovar: *U. urealyticum* e *U. parvum* (Uu). U.u e M.h. possono essere patogeni. Sono responsabili di infezioni genitali maschili (uretre non gonococcica, epididimite, prostatite, infertilità), infezioni genitali femminili (vaginosi batterica, endometrite, salpingite), problemi di fertilità (corioamnioniti, endometrite post-partum, parto pretermine, aborto spontaneo), problemi neonatali (basso peso alla nascita, infezioni respiratorie e neurologiche, batteriemie, ascessi), infezioni extragenitali (artrite settica, artrite reattiva, e infezioni in altri siti) (1).

La diagnosi di infezione da *Mycoplasma* dipende dalla determinazione della soglia patologica eseguita mediante la conta dei microrganismi. La resistenza di U.u / M.h. a determinati antibiotici deve essere eseguita tramite il saggio di sensibilità agli antibiotici (5, 6). Gli antibiotici testati e i criteri di interpretazione sono indicati per il trattamento di infezioni causate da micoplasmi isolati dal tratto urogenitale o in siti extragenitali (2).

**3 – PRINCIPIO DEL TEST**

MYCOFAST RevolutioN è un metodo liquido basato sull'attitudine di U.u e di M.h. a metabolizzare rispettivamente l'urea e l'arginina. Grazie all'indicatore rosso fenolo contenuto nel terreno liquido, la crescita dei micoplasmi è messa in evidenza mediante il viraggio di colore del terreno da giallo-arancio a rosso. Il viraggio di colore è dovuto alla liberazione di ammoniaca che produce un innalzamento del pH del terreno, rendendolo pertanto alcalino.

La crescita dei micoplasmi così evidenziata permette di valutare:

- la ricerca e differenziazione; poi, in caso di positività:
- la conta dei micoplasmi basata sulla velocità d'idrolisi dell'urea e l'arginina: la velocità è proporzionale alla carica dei microrganismi presente nel campione
- l'identificazione basata sulla sensibilità o la resistenza di profilo
- la determinazione del saggio di sensibilità agli antibiotici di U.u e M.h.

**4 - REAGENTI**

Descrizione	Quantità	#00061	#00062	#00063
UMMt: Flaoncini da 3 mL contenenti brodo per micoplasmi con agenti antibiotici e soluzione conservante, pH: 6.0 ± 0.1	50	-	-	
MYCOFAST SCREENING RevolutioN: Micoplastra divisibile da 10 pozzetti per 5 test, confezionata individualmente in busta d'alluminio con essiccatore integrato	-	-	10	
Etichette: fogli con 5 etichette separabili	-	-	10	
S. Mh.: Flaoncino da 4,5 mL contenente l'attivatore di crescita per <i>Mycoplasma hominis</i> .	-	2	1	
MYCOFAST RevolutioN : Gallerie da 20 pozzetti confezionate in un sacchetto d'alluminio con essiccatore integrato.	-	25	-	
Closing system: Coperchio d'incubazione protettivo in plastica translucida	-	25	-	

**Galleria MYCOFAST Screening RevolutioN**

La galleria consiste in 5 file di 2 pozzetti: un pozzetto per *Ureaplasma urealyticum* (U.u) contenente lincomicina e urea e un pozzetto per *Mycoplasma hominis* (M.h) contenente eritromicina e arginina.

**Galleria MYCOFAST RevolutioN**

La galleria MYCOFAST RevolutioN contiene in ciascuno dei 20 pozzetti il terreno di coltura disidratato (siero di puledro, estratto di lievito, cisteina, arginina, urea, rosso fenolo, antibiotici, pH: 6.1 ± 0.1) e comprende 4 settori:

Pozzetti da 1 a 3 Conta di U.u tra  $10^3$  e  $\geq 10^5$  CCU/mL (include soluzione tampon e lincomicina per inhibire la crescita di M.h).

Pozzetti da 4 a 6 Identificazione di U.u e M.h. tramite il profilo di resistenza nei confronti di Lincomicina (L), Trimetoprim/Sulfametossazolo (SXT) e Eritromicina (E).

Pozzetto 7 Conta di M.h.:  $> 10^4$  CCU/mL (include soluzione tampon ed eritromicina per inhibire la crescita di U.u).

Pozzetti da 8 a 20 Saggiaggio di sensibilità agli antibiotici per U.u e M.h. nei confronti di: Levofloxacin (LVX) 1-2-4  $\mu$ g/mL, Moxifloxacin (MXF) 0,25-2  $\mu$ g/mL, Eritromicina (E) 8-16  $\mu$ g/mL, Clindamicina (CM) 0,25-0,5  $\mu$ g/mL, Tetraciclina (TE) 1-2-4-8  $\mu$ g/mL.

**5 - PRECAUZIONI**

- I reagenti presenti in questo kit sono destinati esclusivamente ad un uso *in vitro* e devono essere maneggiati solo da personale autorizzato.
- I prelievi e i reagenti inoculati sono potenzialmente infettivi e devono pertanto essere maneggiati conformemente alle precauzioni d'uso, nel rispetto delle norme igieniche e delle normative in vigore nel paese di utilizzo di questo tipo di prodotto.
- I reagenti contenenti materie prime di origine animale devono essere maneggiati nel rispetto delle precauzioni d'uso.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare i reagenti danneggiati o conservati in modo inadeguato prima dell'uso.
- L'esito positivo ottenuto con il metodo MYCOFAST indica la presenza di una colonizzazione da micoplasmi urogenitali, ma da solo non è sufficiente per effettuare una diagnosi clinica. Quest'ultima deve essere realizzata dal medico in funzione dei risultati biologici e dei sintomi clinici.

**6 – PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

**6.1 Prelievo campioni**

Tamponi cervicali e vaginali: Per il prelievo dei campioni utilizzare solo un tampone in Dacron® o rayon o una citospazzola. Prima di procedere con il prelievo, effettuare un'accurata pulizia della cervice utilizzando un primo tampone per rimuovere le secrezioni, quindi effettuare il prelievo per il test con un secondo tampone. Poiché i micoplasmi hanno una forte affinità per le cellule delle mucose, è essenziale raschiare bene la mucosa per ottenere un campione ricco.

Prelievi uretrali: Pulire il meato e prelevare, tamponando o raschiando, delle cellule. Liquido seminale. Urine: Prelevare il liquido seminale o il primo mitto di urina in una provetta o flacone sterili.

**6.2 Trasporto in brodo UMMt**

Prelievi con tampone: Stemperare il tampone in un flaoncino di brodo di trasporto UMMt. Prelievi liquidi: Inoculare un flaoncino di brodo di trasporto UMMt con 300  $\mu$ L di liquido omogeneizzato.

**6.3 Conservazione nel terreno di trasporto UMMt**

Una volta inoculato, il brodo di trasporto UMMt può essere conservato per 20 ore a temperatura ambiente (18-25°C), o per 56 ore a 2-8°C. Per una conservazione di 3 giorni a -20 °C, prima di congelare il terreno dispensare 2 gocce di "MYCOPLASMA Stabilizer" nel flaoncino UMMt.

**7 – PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI**

- Tutti i reagenti sono pronti per l'uso. I reagenti conservati a 2-8°C nel loro stato originale sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.
- Nel caso in cui la galleria MYCOFAST Screening RevolutioN non venga utilizzata in un'unica seduta, dopo l'apertura si mantiene stabile per 4 settimane se conservata a 2-8 °C nell'imballo originale accuratamente risigillato.
- Il brodo di trasporto UMMt può essere temporaneamente conservato a temperatura ambiente, ma presenta una migliore stabilità a 2-8°C.
- Dopo l'apertura, il supplemento S.Mh è stabile per 3 mesi.
- Non congelare i reagenti contenuti in questo kit.

**8 - MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO**

- Materiale per prelievi (tamponi, citospazzole, flacone sterile per la raccolta dei prelievi liquidi)
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064), pipette e puntali di trasferimento, contenitore per rifiuti contaminati, olio minerale, termostato a 37°C ± 1°C

**9 - PROCEDIMENTO**

**Equilibrare i reattivi a temperatura ambiente (per 20-30 minuti).**

**9.1 SCREENING – Galleria MYCOFAST Screening RevolutioN**

- Allestire tante righe di pozzetti quante il numero di campioni da saggiare.- Se necessario separare una o più righe di pozzetti per U.u/(M.h) con l'ausilio dei marks trovati nella galleria

**9.1.1 Inoculo del brodo di trasporto UMMt RevolutioN**

Inoculare il brodo di trasporto UMMt con un tampone o 300  $\mu$ L di campione (\$6.2). Agitare bene.

**9.1.2 Inoculo dei pozzetti per Uu/Mh**

- Distribuire successivamente:  
pozzetto (U.u): 100  $\mu$ L di UMMt inoculato.  
pozzetto (M.h): 100  $\mu$ L di UMMt inoculato + 50  $\mu$ L del supplemento Mh.  
- Aggiungere 2 gocce di olio minerale in entrambi i pozzetti.  
- Coprire i pozzetti con le etichette e specificare il campione per agevolarne l'identificazione.

**- Conservare l'eccedenza di terreno UMMt a 2-8°C**

per procedere con l'analisi in caso di esito positivo.

**9.1.3 Incubazione dei pozzetti Uu/Mh**

Incubare i pozzetti della galleria a 37°C ± 1°C per 24 ore. L'incubazione della piastra può essere estesa sino a 48 ore solo nel caso in cui i campioni liquidi siano negativi dopo 24 ore.

**9.1.4 Lettura e interpretazione dei pozzetti Uu/Mh**

- Verificare che i 2 pozzetti (U.u) (M.h) siano limpidi. Una torbidità presente in un pozzetto è indice di una contaminazione batterica. Qualora dovesse verificarsi tale ipotesi, ripetere il test.
- I risultati sono letti osservando il viraggio di colore ottenuto nei differenti pozzetti: pozzetti U.u con viraggio ad arancione o rosso: presenza di *Ureaplasma urealyticum* I pozzetti M.h con viraggio ad arancione o rosso: presenza di *Mycoplasma hominis* I pozzetti U.u / M.h con viraggio al giallo: assenza di mycoplasma In caso di screening positivo proseguire la diagnosi utilizzando il MYCOFAST RevolutioN tray

**9.2 CONTA, IDENTIFICAZIONE E TEST DI SENSIBILITÀ**

**9.2.1 Inoculo della galleria MYCOFAST RevolutioN**

- Rimuovere la pellicola adesiva tirando la linguetta e dispensare quanto segue in ciascun pozzetto delle due file della galleria:

Pozzetti da 1 a 20 100  $\mu$ L di UMMt inoculato

Pozzetti 6 e 7 50  $\mu$ L di supplemento S.Mh

Pozzetti da 1 a 20 2 gocce di olio minerale

- Mettere il coperchio sulla galleria ("Sistema di copertura").

**● Identificare la galleria (ID paziente).**

Conservare l'eccedenza di terreno UMMt a 2-8°C per almeno 48 ore per eventuali verifiche.

**9.2.2 Incubazione della galleria**

Incubare la galleria a 37°C ± 1°C per 24 ore. Per la conta di U.u. e M.h, leggere i risultati a 24 ore. L'incubazione della piastra può essere estesa sino a 48 ore solo nel caso in cui i campioni liquidi siano negativi dopo 24 ore.

**9.2.3 Lettura e interpretazione**

Verificare che tutti i pozzetti della fila siano limpidi. Una torbidità presente in un pozzetto è indice di una contaminazione batterica. Qualora dovesse verificarsi tale ipotesi, ripetere il test. I risultati sono letti osservando il viraggio di colore ottenuto nei differenti pozzetti. La crescita dei micoplasmi urogenitali è messa in evidenza quando è visibile un viraggio al rosso del terreno (alcalinizzazione). In assenza di crescita di micoplasmi urogenitali, il terreno rimarrà giallo. Una reazione di colore arancio deve essere considerata come test positivo (soglia minima). Per l'interpretazione dei risultati consultare il foglio dei risultati.

## Identificazione (pozzetti 4, 5 e 6)

L'identificazione è effettuata in accordo con il viraggio di colore dei pozzetti 4, 5 e 6:

U. urealyticum	rosso	rosso	giallo
M. hominis	giallo	rosso	rosso
<b>Conta (pozzetti 1, 2, 3 e 7)</b>			

Annotare i pozzetti virati al rosso e interpretare:

1	U.u. valore $10^3$ CCU/mL
1 e 2	U.u. valore $10^4$ CCU/mL
1, 2 e 3	U.u. valore $\geq 10^5$ CCU/mL
	M.h. valore $\geq 10^4$ CCU/mL

La soglia patologica generalmente attribuita a *U. urealyticum* è  $\geq 10^4$  UCC/mL per un prelievo uretrale o endotracheale,  $\geq 10^3$  CCU/mL per il primo mitto di urina o per il liquido seminale. La presenza di *M. hominis* con una carica  $\geq 10^4$  CCU/mL in un prelievo cervicale e vaginale è di riscontro anomalo (5).

## Saggio di sensibilità agli antibiotici (pozzetti da 8 a 20)

Il cambiamento di colore al rosso del terreno nei pozzetti contenenti un antibiotico indica la presenza di crescita batterica e quindi la resistenza alla concentrazione testata. Il colore giallo del terreno indica l'assenza di crescita batterica e quindi la sensibilità del ceppo alla concentrazione di antibiotico testata. I ceppi sono caratterizzati come sensibili o resistenti agli antibiotici secondo i seguenti criteri definiti dal CLSI:

### MIC (ug/mL) Criteri interpretativi

Antibiotici		U.u		M.h		Commenti
Classe	Antibiotico	S	R	S	R	
Chinoloni	Levofloxacin	$\leq 2$	$\geq 4$	$\leq 1$	$\geq 2$	
	Moxifloxacin	$\leq 2$		$\leq 0.25$		
Macrolidi	Eritromicina	$\leq 8$	$\geq 16$			Microrganismi sensibili all'eritromicina saranno sensibili anche all'azitromicina
	Lincosamidi			$\leq 0.25$	$\geq 0.5$	
Tetracicline	Tetraciclina	$\leq 1$	$\geq 2$	$\leq 4$	$\geq 8$	Microrganismi sensibili alla tetraciclina saranno sensibili anche alla dossicidina

- Un ceppo è definito **Sensibile** quando la sua crescita è inibita alla concentrazione critica di antibiotico più bassa e più alta.
- Un ceppo è definito **Resistente** quando la sua crescita è inibita alla concentrazione critica più alta, ma non alla concentrazione critica più bassa o quando la crescita non è inibita né alla concentrazione più bassa, né alla concentrazione più alta.
- Per la moxifloxacin viene testata 1 sola concentrazione sia per U.u. che per M.h.
- I ceppi di *M. hominis* presentano resistenza intrinseca ai macrolidi (14 -15 atomi di carbonio), inclusa l'eritromicina.
- In alcune popolazioni di pazienti, la resistenza alla tetraciclina è del 45% per U.u. e del 39,6% per M.h (2). Le resistenze di U.u/M.h ai chinoloni (5, 6) e alla clindamicina sono state descritte, ma la prevalenza non è nota.

## 10 – CASI PARTICOLARI

Per elevate cariche di U.u e M.h, tutti i pozzetti della galleria sono virati al rosso. Si raccomanda di diluire il campione al fine di ottenere risultati più specifici. In questo caso procedere come di seguito:

- Inoculare un nuovo flaconcino UMMt con 300  $\mu$ L di terreno UMMt originale conservato a 2-8°C (vedi § 9.1).
- Procedere inoculando una nuova piastra con il nuovo brodo di trasporto UMMt inoculato.
- Tener conto della diluizione (1:10) nell'interpretazione della carica batterica.
- Se necessario, confermare la presenza dei micoplasmi su una piastra A7 isolando dal terreno originale UMMt conservato a 2-8°C (§ 9.1).

## 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo qualità può essere effettuato con ceppi liofilizzati di *U. urealyticum* del kit MYCOPLASMA CONTROL (N. cat. 00900) o da ceppi di riferimento liofilizzati (*U. urealyticum* ATCC 33175) precedentemente calibrati a  $10^{4-5}$  UCC/mL.

Ricerca: Inoculare i due pozzetti della galleria MYCOFAST Screening Revolution ed eseguire il test come indicato al paragrafo (§9.1).

Risultati attesi: U.u (+) e M.h (-).

Conta, identificazione e test di Sensibilità: Inoculare una galleria MYCOFAST Revolution ed effettuare il test come indicato nelle istruzioni (§9.2). Risultati attesi (ceppo ATCC 33175):

Uu	Uu	Uu	L	SXT	E	Mh	LVX	LVX	LVX
+	+	+/-	+	+	-	-	+/-	-	-
MXF	MXF	E	E	CM	CM	TE	TE	TE	TE
+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+/-

## 12 – LIMITI DELLA PROCEDURA

### 12.1 - Ricerca

La soglia di determinazione del MYCOFAST Screening Revolution tray è  $< 103$  UCC/mL e non consente conta. La conta con la galleria MYCOFAST Revolution, che segue uno screening con esito positivo, può essere negativa.

### 12.2 - Conta, identificazione e test di Sensibilità

Alcuni batteri presenti in quantità  $\geq 10^6$  UFC/ml, che presentano ureasi, potrebbero determinare un viraggio dei pozzetti della galleria. La loro presenza può essere verificata mediante sottocoltura su agar cioccolato a partire dal terreno UMMt originale conservato a 2-8°C (vedi § 9.2).

Un campione con un pH alcalino (pH > 8) potrebbe far virare il brodo UMMt. In questo caso diluire il campione (1:10) in un altro brodo UMMt e interpretare tenendo conto della diluizione.

Un campione con una bassa carica di micoplasma ( $< 10^3$  CCU/mL) potrebbe determinare un viraggio aleatorio in vari pozzetti della galleria.

Se necessario, prolungare l'incubazione fino a 48 ore per permettere a ceppi con debole attività enzimatica di poter essere ben visibili.

Come per tutti i metodi di ricerca su batteri, la qualità del prelievo condiziona il risultato del test. Un test negativo, pertanto, non indica necessariamente l'assenza di infezione.

## 13 - PERFORMANCE

### 13.1 Ceppi isolati

#### 13.1.1 Ricerca e differenziazione - Identificazione e differenziazione

È stato condotto uno studio comparativo a partire da 9 ceppi (ceppi ATCC e ceppi da collezione) testati separatamente (U.u o M.h) a due concentrazioni o testati insieme in miscela (U.u/M.h). I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti con altri metodi in un terreno liquido.

#### Galleria MYCOFAST Screening Revolution

- Per lo screening (n=19) si è osservata una concordanza del 100%.

- Per la differenziazione (n=21), tutti i ceppi U.u o M.h saggianti sono stati identificati correttamente nei pozzetti della galleria MYCOFAST Screening Revolution.

#### Galleria MYCOFAST Revolution

- Per l'identificazione (n=21) c'è stata concordanza al 100%.

- Per la conta di U.u (N = 11), 10 test sono risultati essere concordanti, 1 test ha dato una conta di  $10^3$  UCC/mL con il MYCOFAST Revolution e  $> 10^4$  UCC/mL con il metodo di confronto ( $< 10^3$  UCC/mL con le piastre A7 AGAR).

- Per la conta di M.h (N = 10) 6 test sono risultati concordanti, 4 test hanno dato una conta di  $> 10^4$  UCC/mL con MYCOFAST Revolution e  $< 10^4$  UCC/mL con il metodo di confronto ( $10^4$  UCC/mL con A7 AGAR).

### 13.1.2 Saggio di sensibilità agli antibiotici

È stato condotto uno studio comparativo in un laboratorio di riferimento nazionale per confrontare la concentrazione minima inibente (MIC) in mezzo liquido di riferimento e il metodo MYCOFAST Revolution. I ceppi testati (5 *U. urealyticum*, 10 *U. parvum* e 10 *M. hominis*) provenivano da collezioni di riferimento, da isolati clinici wild-type, 9 erano ceppi con resistenza acquisita. Ogni ceppo è stato testato in diluizioni  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  CCU/mL. I risultati dei due metodi sono stati interpretati come sensibile (S) o resistente (R) secondo le raccomandazioni del documento CLSI M43-A.

Per *U. urealyticum* è stata riscontrata una concordanza generale tra i due metodi del 96,7% (174/180)

Per *M. hominis* la concordanza generale dei due metodi è stata del 99,2% (119/120).

U.urealyticum/parvum (n = 45)				M. hominis (n = 30)			
LVX	MXF	E	TE	LVX	MXF	CM	TE
Concordanza	43	42	45	44	30	30	29
ME	2	3	0	0	0	0	0
VME	0	0	0	1*	0	0	1**

Concordanza : (S/S o R/R); ME : Major Error (R/S); VME : Very Major Error (S/R)

\*: Discrepanza ottenuta a  $10^4$  UCC/mL entro 1 diluizione (MIC a 2  $\mu$ g/mL)

\*\*: Discrepanza ottenuta a  $10^5$  UCC/mL entro 1 diluizione (MIC a 0,5  $\mu$ g/mL)

### 13.2 Ceppi Clinici

È stato condotto uno studio con campioni clinici raccolti in doppio, di cui 179 campioni positivi (U.u e / o M.h) rilevati da almeno uno dei due metodi. I risultati ottenuti con MYCOFAST Revolution sono stati confrontati con quelli ottenuti con il metodo di routine utilizzato nei laboratori di prova.

#### 13.2.1 Identificazione

Campioni positivi per U.u: I ceppi U.u rilevati con il metodo di riferimento sono stati correttamente identificati con il kit MYCOFAST Revolution ad eccezione di 2 campioni. 5 campioni che erano negativi con il metodo comparativo sono stati identificati come positivi per U.u con il MYCOFAST Revolution.

I campioni positivi per M.h: I 4 ceppi di M.h rilevati con il metodo di riferimento sono stati

identificati correttamente con il kit MYCOFAST Revolution.

I campioni positivi per U.u e M.h: I campioni rilevati positivi per U.u e M.h con il metodo di riferimento sono stati identificati come positivi per U.u e M.h con il kit MYCOFAST Revolution, fatta eccezione per 5 campioni. 11 campioni positivi per U.u e 2 campioni negativi con il metodo di riferimento sono stati identificati positivi per U.u e M.h con il kit MYCOFAST Revolution.

	n = 179	MYCOFAST Revolution	METODO DI RIFERIMENTO
U.u (n = 118)	111	U.u	U.u
	5	U.u	Assenza
M.h (n = 4)	2	Assenza	U.u
	4	M.h	M.h
U.u/M.h (n = 57)	39	U.u/M.h	U.u/M.h
	11	U.u/M.h	U.u
	2	U.u/M.h	Assenza
	4	U.u	U.u/M.h
	1	M.h	U.u/M.h

### 13.2.2 Conta

I risultati della conta dei ceppi di U.u (n = 175) e M.h (n = 61) ottenuti con il metodo di riferimento e/o MYCOFAST Revolution sono descritti nelle due tabelle seguenti:

U.u (n=175)	MYCOFAST Revolution	METODO DI RIFERIMENTO
147	$\geq 10^5$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
	$\geq 10^4$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
5	$\geq 10^5$ UCC/mL	Assenza
	$10^4$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
9	$10^4$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
	$10^3$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
1	$10^4$ UCC/mL	Assenza
	$10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
5	$10^3$ UCC/mL	$\geq 10^4$ UCC/mL
	$< 10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
1	$10^3$ UCC/mL	Assenza
	$\geq 10^4$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
1	Assenza	$< 10^4$ UCC/mL
	$< 10^4$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL
1	$< 10^3$ UCC/mL	$< 10^4$ UCC/mL

Tra i 165 campioni positivi per U.u con i due metodi, 158 campioni presentavano identica numerazione. Tra i 44 campioni positivi per M.h con i due metodi, 10 campioni mostravano identica numerazione e 34 campioni mostrano una numerazione con una soglia patologica con il metodo MYCOFAST Revolution e una soglia infra-patologica con il metodo di riferimento.

## 15 - SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti rispettando le regole di igiene e la regolamentazione vigente per questo tipo di prodotto nel paese in cui viene utilizzato.

## 16 - BIBLIOGRAFIA

- BEBEAR C., BEBEAR C.M., 2007. Infections humaines à mycoplasmes. Revue Francophone des Laboratoires. N°391, 63-69.
  - 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.
  - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.
  - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (Strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans Mandell G. L., Bennett J. E. and Dolin R. (ed.), principles and practices of infectious diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.
  - WAITES KEN B, BRENDAN KATZ and ROBERT L. SCHELONKA. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.
  - 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.
- MYCOFAST® è un prodotto con marchio registrato ELTech MICROBIO
- ELTech MICROBIO  
Parc d'activités du plateau  
19, allée d'Athènes  
83870 SIGNES (FRANCE)  
Tel : 33 (0)4 94 88 55 00  
Fax : 33 (0)4 94 88 55 22  
<http://www.eltechgroup.com>

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziati in grigio

