

# A7 AGAR

## Culture, numération et identification des mycoplasmes urogénitaux 8 tests (REF 00090)

CP 0257-FR-2019-09

Pour diagnostic *in vitro* uniquement, pour usage professionnel seulement  
Tests à usage unique.



### I - BUT

La gélose A7 permet la culture, la numération indicative et l'identification morphologique de *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) et de *Mycoplasma hominis* (M.h.) à partir de prélèvements endocervicaux, uréthraux, urinaires, spermes, liquides gastriques et autres prélèvements susceptibles de mettre en évidence des mycoplasmes urogénitaux.

### 2 - INTERET

Les mycoplasmes urogénitaux, *U. urealyticum* et *M. hominis*, ont un pouvoir pathogène reconnu (3). Ils peuvent être présents à l'état commensal au niveau des voies génitales basses. Une appréciation quantitative est donc utile. *U. urealyticum* est responsable d'infection génitale masculine. *M. hominis* prolifère au cours de vaginose et peut s'étendre au voies génitales hautes. Les mycoplasmes urogénitaux sont également responsables d'infections extra-génitales.

### 3 - PRINCIPE

Les mycoplasmes sont des organismes relativement fragiles, qui ne se multiplient qu'en présence de nombreux facteurs de croissance. Anaérobies facultatifs, ils sont exigeants en stérols. Ils utilisent comme source d'énergie le métabolisme des sucres ou de l'arginine (*Mycoplasma hominis*) ou de l'urée (*Ureaplasma urealyticum*).

La gélose A7 est un milieu de Shepard modifié (4). Il contient du sérum, des peptones, de l'extrait de levure et un mélange vitaminiq. Il est dépourvu de sucre et renferme de l'urée et de l'arginine comme sources d'énergie. Il est rendu sélectif par l'addition d'antibiotiques et d'antifongique afin d'inhiber le développement des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et les levures. La présence de sulfate de manganèse donne aux colonies d' *Ureaplasma urealyticum* une coloration noire en présence d'urée (4). Sur milieux gélosés, les colonies de mycoplasmes sont petites et doivent être recherchées au microscope optique.

Pour la recherche de mycoplasmes il convient d'utiliser des milieux liquides et des milieux solides (3). La gélose A7 peut s'associer aux méthodes liquides MYCOSCREEN ou MYCOFAST.

### 4 - REACTIFS

**Conditionnement** : 8 Géloses

#### Description

**A7 AGAR** : Gélose de 55 mm prête à l'emploi et emballée individuellement dans un sachet en cellophane.

#### Composition de la gélose en g/L d'eau distillée

Bouillon mycoplasmes (25 g/L), extrait de levures (9,4 g/L), sérum de poulain (15%), urée (1,15 g/L), arginine (0,4 g/L), chlorure de calcium (0,3 g/L), sulfate de manganèse (0,1 g/L), supplément vitaminiq., mélange d'antibiotiques et d'antifongique et agar (14 g/L).

### 5 - PRECAUTION D'EMPLOI

- Les géloses de ce coffret sont destinées à un usage *in vitro* uniquement et doivent être manipulées par des personnes habilitées.
- Les prélèvements et les géloses 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 géloses contiennent des matières premières d'origine animale et doivent être manipulées avec les précautions d'usage.
- Ne pas utiliser les géloses de ce coffret au delà de la date de péremption ou les géloses contaminées ou mal conservées.

### 6 - RECUEIL ET TRANSPORT DES ECHANTILLONS

#### 6.1 Recueil des prélèvements

- **Prélèvements endocervicaux/vaginaux**: Utiliser uniquement un écouvillon en Dacron® ou en rayonne ou une cytobrosse (si utilisation d'un UMMt 2 mL ou 3 mL), ou utiliser l'écouvillon fourni avec son milieu de transport Amies ou universel pour virus, chlamydiae, mycoplasme et ureaplasme (si utilisation d'un UMMt AMIES 2.6mL).

Effectuer le prélèvement après une élimination soigneuse des sécrétions de l'exocol à l'aide d'un premier écouvillon. Les mycoplasmes ayant une forte affinité pour les cellules des muqueuses sur lesquelles ils adhèrent, il est essentiel de bien gratter la muqueuse afin d'obtenir un bon rendement (1).

- **Prélèvements urétraux**: Nettoyer le méat et prélever par écouvillonnage ou grattage des cellules.

- **Sperme, urines, autres liquides**: Récolter le sperme ou le premier jet d'urine ou un autre prélèvement liquide dans un flacon stérile.

#### 6.2 Transport des prélèvements

##### UMMt 2 ou 3 mL

Décharger l'écouvillon, ou en cas de prélèvement liquide 200 µL ou 300 µL de liquide dans un milieu UMMt 2 mL ou 3 mL. 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".

##### Milieu Amies ou milieu universel pour virus, chlamydiae, mycoplasme et ureaplasme

Se référer à la notice d'utilisation du fabricant

##### Milieu UMMt AMIES

Décharger 300 µL du milieu de transport Amies ou milieu universel pour virus, chlamydiae, mycoplasme et ureaplasme ensemencé dans un flacon de milieu UMMt AMIES

Une fois ensemencé, le milieu UMMt AMIES (2.6 mL) peut être conservé à température ambiante (18-25 °C) pendant 20 heures, ou à 2-8 °C pendant 56 heures.

Pour une conservation pendant 3 jours à -20 °C, rajouter au préalable 2 gouttes de "MYCOPLASMA Stabilizer".

### 7 - PREPARATION ET CONSERVATION DES REACTIFS

Les géloses sont prêtes à l'emploi; conservées dans leur emballage d'origine elles sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le sachet.

Ne pas faire subir à la gélose de forte variation de température.

### 8 - MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Matériel pour prélèvement (écouvillon Dacron, cytobrosse, milieu de transport Amies ou milieu universel pour virus, chlamydiae, mycoplasme et ureaplasme, flacon stérile pour le recueil des prélèvements liquides), Pipettes
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF. 00064)
- Milieux UMMt (REF 00835 ; 00061 ;00083) pour les prélèvements sur écouvillon ou en milieu de transport Amies ou milieu universel pour virus, chlamydiae, mycoplasme et ureaplasme
- Etuve calibrée à 35-37 °C, dispositif pour anaérobiose, microscope optique (objectif x10), récipient pour déchets contaminés

### 9 - MODE OPERATOIRE

#### 9.1 Inoculation

- **Prélèvement sur écouvillon**: Décharger l'écouvillon dans un milieu UMMt. Déposer au centre de la gélose 3 gouttes d'environ 30 µL (ou un dépôt de 100 µL) de milieu ensemencé et homogénéisé.

- **Prélèvement sur écouvillon associé** à son milieu de transport Amies ou milieu universel pour virus, chlamydiae, mycoplasme et ureaplasme : Homogénéiser le flacon de transport et transférer 300 µL dans un milieu UMMt AMIES. Déposer au centre de la gélose 3 gouttes d'environ 30 µL (ou un dépôt de 100µL) de milieu UMMt AMIES ensemencé et homogénéisé.

- **Prélèvement liquide**: Homogénéiser le prélèvement et déposer directement au centre de la gélose 3 gouttes d'environ 30 µL (ou un dépôt de 100 µL). Si le prélèvement doit être transporté, **inoculer un milieu UMMt 2 mL avec 200 µL de liquide, ou UMMt 3 mL avec 300 µL de liquide** (§6.2)

#### 9.2 Incubation de la gélose

Laisser sécher la gélose environ 30 minutes à température ambiante.

Incuber la gélose à 35-37 °C pendant 48 heures en anaérobiose.

### 10 - LECTURE ET INTERPRETATION

Les colonies doivent être recherchées au microscope (objectif x10), boîte retournée.

#### 10.1 Identification morphologique

**Ureaplasma urealyticum**: Aspect de précipités bruns-noirs ("en oursin" de taille variable). Les colonies sont de petite taille.

**Mycoplasma hominis**: Aspect "en oeuf sur le plat". Les colonies sont plus grosses que les colonies de *U. urealyticum*.

#### 10.2 Numération

Effectuer la numération sur boîte retournée au microscope objectif x10, **en fonction de la moyenne du nombre de colonies sur 10 champs microscopiques** :

Moins de 1 colonie / champ: <10<sup>3</sup> UFC/mL

1 à 5 colonies / Champ: environ 10<sup>4</sup> UFC/mL

5 à 10 colonies / Champ: environ 10<sup>5</sup> UFC/mL

10 à 20 colonies / Champ: environ 10<sup>6</sup> UFC/mL

> 20 colonies / Champ: > 10<sup>6</sup> UFC/mL

UFC : Unité Formant Colonies

### 11 - CONTROLE QUALITE

Le contrôle qualité peut être réalisé à partir d'une souche de collection lyophilisée (*Ureaplasma urealyticum* ATCC 27618) et calibrée à 10<sup>4</sup> UFC/mL. Ensemencer une gélose A7 et procéder comme indiqué dans cette notice (§9 et §10).

Résultat attendu: Présence de 1 à 5 colonies en forme d'oursin (*U. urealyticum*).

### 12 - CAUSES D'ERREURS

- Prélèvement avec des écouvillons ou des milieux de transport non préconisés.
- Ensemencement direct à partir de l'écouvillon.
- Incubation en aérobiose.
- Non respect de la température d'incubation

### 13 - LIMITES DE LA METHODE

- Prélèvement faiblement chargé en mycoplasmes (<10<sup>3</sup> UFC/mL)
- Méthode solide en gélose A7 à associer avec une méthode liquide.
- Comme pour toute méthode de recherche de germes, la qualité du prélèvement conditionne le résultat du test. Un test négatif ne traduit donc pas forcément une absence d'infection.

### 14 - PERFORMANCES

Les performances de la culture en gélose A7 d'IM ont été évaluées par rapport à la méthode liquide MYCOFAST (2). L'étude a été réalisée dans un centre hospitalier sur 544 prélèvements cliniques (266 spermes, 155 prélèvements endocervicaux, 82 placentas, 19 prélèvements urétraux et 22 prélèvements divers). Pour 475 prélèvements (88%) dont 140 positifs et 335 négatifs les résultats étaient concordants. Les discordances concernaient 69 prélèvements dont 8 étaient positifs seulement avec la gélose A7 (1,5%), 48 étaient positifs seulement avec la méthode MYCOFAST (8,8%) et 13 étaient contaminés (2,4%). Certaines souches de mycoplasmes provenant de prélèvements contaminés ont pu être détectées avec la gélose A7.

### 15 - ELIMINATION DES DECHETS

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

### 16 - BIBLIOGRAPHIE

**BOUCAUD-MAITRE Y. et THOINET S.** 1993. Analyse des prélèvements en bactériologie médicale - 2<sup>ème</sup> partie : prélèvements génitaux. Feuil. Biol., 34: 21-24.

**BRES P., J.P. CASALTA, M. DRANCOURT, G. PAPIEROK, D. RAOULT.** 1991. Comparison of mycofast test kit and conventional culture methods for the isolation of Genital Mycoplasma and Ureaplasma species A.S.M. 91th General Meeting - Poster : G-14.

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

**SHEPARD, M.C. and LUNCEFORD C.D.** 1976. Differential agar medium (A7) for identification of Ureaplasma urealyticum (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. J. Clin. Microbiol. 3: 613-625.

Les modifications par rapport à la version précédente sont surlignées en gris.

**ELITech MICROBIO**  
Parc d'activités du Plateau  
allée d'Athènes  
83870 SIGNES  
FRANCE  
☎: 33 (0)4 94 88 55 00  
Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61  
http://www.elitechgroup.com

