

Diagnostic des mycoplasmes urogénitaux

MYCOFAST® Screening Revolution

Détection et différenciation

50 tests (REF 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST® Revolution 2

Numération, identification et test de sensibilité

25 tests (REF 00082)

UMMt Revolution

50 tests (REF 00061)

CPB 0396-2_FR-2018-03

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* (Uu) et de *Mycoplasma hominis* (Mh) à partir de différents prélèvements 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 2 (REF 00082) permettant la numération et l'identification de Uu et/ou Mh 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 mollicutes. Ils se différencient des autres bactéries sur de nombreux points, parmi lesquels l'absence de paroi qui leur confère une résistance naturelle aux β -lactamines, ainsi qu'une membrane riche en stéroïdes 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* (Uu).

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

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

3 - PRINCIPE

La technique MYCOFAST Screening Revolution est une méthode en milieu liquide basée sur l'aptitude de Uu et de Mh à métaboliser respec-

tivement l'urée et l'arginine. La croissance des mycoplasmes en milieu liquide est visualisée par le virage d'un indicateur coloré - le rouge de phénol - du jaune-orangé au rouge 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 prélèvement.
- l'identification basée sur la sensibilité ou non du germe vis-à-vis de trois antibiotiques.
- l'étude de la sensibilité de Uu et Mh aux antibiotiques.

4 - REACTIFS

Description	Quantité		
	réf 00061	réf 00082	réf 00063
UMMt : Flacon de 3 mL de bouillon mycoplasmes avec antibiotiques et agent conservateur. pH: 6.0 \pm 0.1	50		
MYCOFAST SCREENING Revolution : Galerie sécable de 10 puits pour 5 tests, conditionnée individuellement en sachet aluminium avec dessiccant intégré			10
Étiquettes : Planche de 5 étiquettes sécables			10
S.Mh : Activateur de croissance de Mh (4.5mL)			1
MYCOFAST Revolution 2 : Galerie de 24 puits pour 1 test, conditionnée en sachet aluminium avec dessiccant intégré		25	
Closing System : Couvercle en plastique translucide pour galerie MYCOFAST Revolution		25	

Galerie MYCOFAST Screening Revolution

Galerie composée de 5 séries de 2 puits : un puits *Ureaplasma urealyticum* (Uu) contenant de la lincomycine et de l'urée et un puits *Mycoplasma hominis* (Mh) contenant de l'érythromycine et de l'arginine.

Galerie MYCOFAST Revolution 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 - PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

Les prélèvements et les réactifs ensemençés 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 ECHANTILLONS

6.1 Recueil des échantillons

Prélèvements cervico-vaginaux

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

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

Sperme, urines: Récolter le sperme ou le premier jet d'urine dans un flacon stérile.

6.2 Transport en milieu UMMt

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

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

6.3 Conservation en milieu UMMt

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

7 - PREPARATION ET CONSERVATION DES REACTIFS

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 (Uu) (Mh) ou de deux, trois, quatre séries de puits, le reste de la galerie MYCOFAST Screening *Revolution* non utilisé, et fermé 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 (3 mois) 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 FOURNIS

Matériel pour prélèvement (écouvillons, cytobrosses, flacons stériles pour le recueil des prélèvements 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 (Uu)/(Mh) 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 prélèvements liquides (§ 6.2). Homogénéiser.

9.1.2 Inoculation des puits Uu/Mh

- Distribuer successivement:
Puits (Uu) : 100 µL de milieu UMMt ensemencé.
Puits (Mh) : 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 prélèvements liquides négatifs en 24 heures.

9.1.4 Lecture et interprétation des puits Uu/Mh

- Vérifier que les 2 puits (Uu) (Mh) sont limpides. Un puits trouble indique une contamination bactérienne. Dans ce cas recommencer le test.
- Observer le virage de couleur dans les puits Uu et Mh:
Puits Uu orangé ou rouge: Présence de *Ureaplasma urealyticum*
Puits Mh orangé ou rouge: Présence de *Mycoplasma hominis*
Puits Uu / Mh jaune : Absence de mycoplasmes

En cas de dépistage positif poursuivre le diagnostic avec la galerie MYCOFAST *Revolution* 2

9.2 NUMERATION, IDENTIFICATION ET TEST DE SENSIBILITE

9.2.1 Ensemencement de la galerie MYCOFAST *Revolution* 2

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

puits 1-24 100 µL de milieu UMMt ensemencé
puits 1-24 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 pendant au moins 48 heures 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 Uu et des Mh lire les résultats en 24 heures. L'incubation de la galerie peut être prolongée jusqu'à 48 heures uniquement dans le cas de prélèvements liquides négatifs en 24 heures.

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.

Numération (puits 1, 2, 3 et 14)

Repérer les puits ayant viré au rouge et interpréter:

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

Le rôle pathologique des mycoplasmes dans les infections urogénitales est sujet à interprétation selon des recommandations spécifiques (1,3,7). Les taux pathologiques habituellement retenus pour *U. urealyticum* sont: ≥10⁴ UCC/mL pour un prélèvement urétral, ≥10³ UCC/mL pour un 1er jet d'urines ou un sperme (même si une nouvelle recommandation locale mentionne un seuil à ≥10⁴ UCC/mL pour le sperme (7)). Pour *M. hominis* sa présence à un taux ≥10⁴ UCC/mL dans un prélèvement cervico-vaginal est anormale (1, 3).

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

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

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

Classe	Antibiotique	Uu		Mh		Commentaires
		S	R	S	R	
Quinolones	Lévofloxacine	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moxifloxacine	≤2	≥4	≤0,25	≥0,5	
Lincosamides	Clindamycine			≤0,25	≥0,5	
Tétracyclines	Tétracycline	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doxycycline	≤1	≥2	≤4	≥8	
Macrolides	Erythromycine	≤8	≥16			Les souches sensibles à l'Erythromycine le seront aussi à l'Azithromycine

Aide à l'interprétation :

Tests de sensibilité aux antibiotiques pour Uu

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

int* = interprétation

Tests de sensibilité aux antibiotiques pour Mh

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

int* = interprétation

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

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

10 - CAS PARTICULIERS

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

Dans ce cas, procéder comme suit :

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

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

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

11 - CONTROLE DE 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 27815 ou *M. hominis* ATCC 23114) préalablement calibrée à 10⁴⁻⁵ UCC/mL.

Ensemencer la galerie MYCOFAST *Revolution* 2 et poursuivre le test comme indiqué dans cette notice (§9 et 10)

Résultats attendus ci-dessous (ATCC):

MYCOFAST *Revolution* 2

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

NI* (Non interprétable) : Résistance Naturelle

12 - LIMITES DE LA METHODE

12.1 - Dépistage:

La galerie MYCOFAST Screening *Revolution* possède un seuil de sensibilité ≤ 10³UCC/mL et ne permet pas la numération. La numération obtenue avec la galerie MYCOFAST *Revolution* 2 peut se révéler négative après un dépistage positif.

12.2 - Numération, identification et test de sensibilité

- Quelques bactéries présentes en quantité >10⁶⁻⁷ UFC/mL et possédant une uréase peuvent faire virer tous les puits de la galerie. Leur présence peut être vérifiée en ré-isolant sur gélose chocolat à partir du milieu UMMt d'origine conservé à 2-8°C (§ 9.1).
- Un pH de prélèvement basique (pH > 8) peut faire virer le milieu. Dans ce cas diluer l'échantillon (1:10) dans un autre milieu UMMt et interpréter en tenant compte de la dilution.
- Un pH de prélèvement acide (pH ≤ 5) peut ralentir l'apparition du virage de couleur.
- Un échantillon contenant du sang peut entraîner un changement de couleur des puits de la galerie MYCOFAST *Revolution* 2, interprété comme des résultats positifs. Dans ce cas diluer l'échantillon (1:10) dans un autre milieu UMMt et interpréter en tenant compte de la dilution.
- Un prélèvement faiblement chargé en mycoplasmes (<10³ UCC/mL) peut donner un virage aléatoire dans les différents puits de la galerie.
- Comme pour toute méthode de recherche de germes, la qualité du prélèvement conditionne le résultat du test. Un test négatif ne traduit donc pas forcément une absence d'infection.

13 - PERFORMANCES

13.1 Dépistage et différenciation

Galerie MYCOFAST Screening *Revolution*

Une étude comparative a été réalisée à partir de prélèvements cliniques vaginaux (n=40 p ; 2 espèces Uu et Mh) et d'écouillons secs. Les résultats obtenus avec MYCOFAST Screening *Revolution* sont comparés avec la méthode de numération en micro dilution liquide. Pour le dépistage des 2 espèces Uu et Mh, la concordance est de 97,5%.

Nous avons répertorié 1 faux négatif Uu pour un taux à 10³ UCC/mL en méthode de routine du laboratoire sachant que ce taux est considéré comme infra pathologique pour des prélèvements vaginaux. Pour Uu et Mh, la concordance globale est de 100% sur les taux supra-pathologiques.

- Pour la différenciation, tous les prélèvements testés ont permis une identification correcte du Uu ou Mh dans les puits de la galerie MYCOFAST Screening *Revolution*.

13.2 Identification et numération

Méthode directe galerie MYCOFAST *Revolution* 2

% de concordance globale	Uu	Mh	Uu/Mh
Souches isolées taux ≤ 10 ³ UCC/mL (voir § 14.1.1)	97.4	NA*	NA*
Souches isolées taux ≥ 10 ⁴ UCC/mL (voir § 14.1.1)	93.4	93.4	93.4
Prélèvements cliniques vaginaux (voir § 14.1.2)	100	100	100
Prélèvements cliniques liquides - urines (voir § 14.1.2)	93.2	96.6	94.9

NA* (Non Applicable)

13.2.1 - Sur souches isolées

Une étude comparative a été réalisée à partir de 21 souches isolées (souches ATCC et souches de collection) testées séparément (Uu ou Mh) à plusieurs concentrations (76 tests au total). Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus avec une méthode de numération en micro dilution.

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

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

13.2.2 - Sur prélèvements cliniques

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

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

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

Les résultats obtenus avec MYCOFAST *Revolution* 2 sont comparés à ceux obtenus avec la méthode de numération en micro dilution liquide.

La concordance globale pour Uu est de 93.2% (nous avons répertorié 1 faux négatif pour un taux à 10⁴ UCC/mL avec la méthode de numération en micro dilution liquide) et 5 faux positifs pour des taux de 10² UCC/mL avec la méthode de numération en micro dilution liquide).

La concordance globale pour Mh est de 96.6% (nous avons répertorié 3 faux positifs pour des taux à 10² - 10³ UCC/mL avec la méthode de numération en micro dilution liquide).

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

13.3 Tests de sensibilité

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

Les souches testées (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* et 16 *M. hominis*) sont des souches de référence, des souches cliniques sauvages ou des souches ayant acquis des résistances. Chaque souche est testée aux dilutions de 10³ - 10⁴ et 10⁵ UCC/mL dans l'UMMt 3 mL.

Pour les taux 10⁴ et 10⁵ UCC/mL, les résultats ont été lus et interprétés après 24h d'incubation.

Pour les taux 10³ UCC/mL, les résultats ont été lus et interprétés après

48h d'incubation si le test était négatif en 24h.

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

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

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

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

DM: Discordance Majeur; DTM: Discordance Très Majeur

^a : 1 discordance obtenue à 10³ UCC/mL (CMI de référence 0.5 µg/mL), 4 discordances obtenues à 10⁵ UCC/mL (CMI de référence 0.5 - 1 et 8 µg/mL).

^b : 1 discordance obtenue à 10⁵ UCC/mL (CMI de référence 8 µg/mL).

^c : 1 discordance obtenue à 10³ UCC/mL (CMI de référence 8 µg/mL); 1 discordance obtenue à 10⁵ UCC/mL (CMI de référence 2 µg/mL)

^d : 1 discordance obtenue à 10⁵ UCC/mL (CMI de référence 4 µg/mL).

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

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

2 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline. CLSI Document M43-A. Vol.31 - N°19.

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

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MAN-DELLG. 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., BREDAKATZ AND ROBERT L. SCHELONKA. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 18 -N°4 -757-789.

6 - WAITES KEN B, DONNAM. 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 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® est une marque déposée d'ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau 19, allée d'Athènes

83870 SIGNES - FRANCE

Tél. : 33 (0)4 94 88 55 00

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

http://www.elitechgroup.com

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

Urogenital mycoplasma diagnosis
MYCOFAST® Screening Revolution
 Screening and differentiation
 50 tests (REF 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST® Revolution 2
 Enumeration, identification and susceptibility testing
 25 tests (REF 00082)

UMMt Revolution
 50 tests (REF 00061)

CPB 0396-2_EN-2018-03

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* (Uu) and *Mycoplasma hominis* (Mh) 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 2* kit (REF 00082) allowing the enumeration and identification of Uu and/or Mh 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 β -lactams, as well as by the presence of a membrane rich in sterol obtained through their adhesion to eukaryotic cells. Since mycoplasmas are relatively fragile, they will only grow in acellular culture in the presence of various growth factors and at an optimal temperature of 37°C (4). Most human mycoplasmas are commensal. *U. urealyticum* and *M. hominis* are the most commonly encountered species that have been isolated from the urogenital tract. *U. urealyticum* species are divided into two biovars: *U. urealyticum* and *U. parvum* (Uu).

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

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

3 - PRINCIPE

MYCOFAST Screening *Revolution* is a liquid method based on the ability of Uu and Mh 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 Uu and Mh susceptibility testing to antimicrobial agents.

4 - REAGENTS

Description	Amount		
	ref 00061	ref 00082	ref 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
Etiquettes : Sheet of 5 divisible labels			10
S.Mh. : Mycoplasma hominis growth activator (4.5 mL)			1
MYCOFAST Revolution 2 : Tray of 24 wells for 1 test, packed in an aluminium sachet with an integrated desiccant		25	
Closing System : Protective translucent plastic lid for MYCOFAST <i>Revolution</i> tray		25	

MYCOFAST Screening *Revolution* tray

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

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

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

Diagnosis of Uu species (black part of tray):

- Wells 1/2/3** : Identification and enumeration of Uu at 10³, 10⁴ and $\geq 10^5$ CCU/mL (buffered solution and lincomycin inhibiting Mh growth).
Wells 4/5 : Evaluation of Uu susceptibility to Levofloxacin (LVX) at 2 / 4 μ g/mL
Wells 6/7 : Evaluation of Uu susceptibility to Moxifloxacin (MXF) at 2 / 4 μ g/mL
Wells 8/9 : Evaluation of Uu susceptibility to Erythromycin (ERY) at 8 / 16 μ g/mL
Wells 10/11 : Evaluation of Uu susceptibility to Tetracycline (TET) at 1 / 2 μ g/mL
Wells 12/13 : Evaluation of Uu susceptibility to Doxycycline (DOX) at 1 / 2 μ g/mL

Diagnosis of Mh species (red part of tray):

- Wells 14** : Identification and enumeration of Mh at $\geq 10^4$ CCU/mL
Wells 15/16 : Evaluation of Mh susceptibility to Doxycycline (DOX) at 4 / 8 μ g/mL
Wells 17/18 : Evaluation of Mh susceptibility to Levofloxacin (LVX) at 1 / 2 μ g/mL
Wells 19/20 : Evaluation of Mh susceptibility to Moxifloxacin (MXF) at 0.25 / 0.5 μ g/mL
Wells 21/22 : Evaluation of Mh susceptibility to Clindamycin (CLI) at 0.25 / 0.5 μ g/mL
Wells 23/24 : Evaluation of Mh susceptibility to Tetracycline (TET) at 4 / 8 μ g/mL

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

5 - PRECAUTIONS

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

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

Do not use reagents after the expiry date.

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

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

6 - SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

6.1 Sample collection

Cervicovaginal sample collection

Use only a Dacron or rayon swab or a cytobrush to collect samples.

The cervix should be carefully cleaned with a swab, to remove secretions, before collecting the sample with a new swab. As mycoplasmas adhere strongly to mucous cells, the mucous lining should be vigorously scrubbed to obtain a rich specimen.

Urethral sample collection :

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

Sperm, Urine

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

6.2 Transport in UMMt medium

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

Liquid samples: Inoculate a vial of UMMt medium with 300 μ L of homogenized fluid.

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 (Uu) (Mh) 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 (3 months) 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; Incubator at 37°C ± 1°C
 Waste container for contaminated waste and mineral oil

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 (Uu)/(Mh) wells with the aid of the marks found on the tray.

9.1.1 Seeding of the UMMt *Revolution* medium

Seed the UMMt medium with a swab or 300 µL of liquid sample (§6.2). Mix well.

9.1.2 Inoculation of Uu/Mh wells

- Distribute successively:
 (Uu) well: 100 µL of seeded UMMt medium.
 (Mh) well: 100 µL of seeded UMMt medium.
 50 µL 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 tray at 37°C ± 1°C for 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.

9.1.4 Reading and interpretation of Uu/Mh wells

- Check that the 2 (Uu) (Mh) 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 Uu and Mh wells:
 Uu wells are orangey or red: presence of *Ureaplasma urealyticum*
 Mh wells are orangey or red: presence of *Mycoplasma hominis* Uu / Mh wells are yellow: absence of mycoplasma
In the case of positive screening continue diagnosis with the MYCOFAST *Revolution* 2 tray.

9.2 ENUMERATION, IDENTIFICATION AND SUSCEPTIBILITY TESTING

9.2.1 Inoculation of the MYCOFAST *Revolution* 2 tray

Remove the adhesive film by pulling on the tab and add the following to the wells of each row:
 Wells 1-24 100 µL of inoculated UMMt medium
 Wells 1-24 2 drops of mineral oil
 Cover the seeded tray with the "closing system".
 Label the sample.
Store excess UMMt medium at 2-8°C for at least 48 hours for possible verification.

9.2.2 Incubation of the tray

Incubate the tray at 37°C ± 1°C for 24 hours.
 For Uu and Mh 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.

Enumeration (wells 1, 2, 3 and 14)

Mark the wells that have turned red and interpret:
 1 Uu value 10³ CCU/mL
 1 and 2 Uu value 10⁴ CCU/mL
 1, 2 and 3 Uu value ≥10⁵ CCU/mL
 14 Mh value ≥ 10⁴ CCU/mL

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

Susceptibility testing (wells 4 to 13 and 15 to 24)

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

Table of MIC (µg/mL) interpretative criteria

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

Help with interpretation:

Susceptibility testing of Uu

Antibiotic	LVX			MFX			ERY			TET			DOX		
	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Profile	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

Susceptibility testing of Mh

Antibiotic	DOX			TET			ERY			MFX			LVX		
	1	2	int*	1	2	int*	8	16	int*	2	4	int*	2	4	int*
Concentration (µg/mL)	1	2	int*	1	2	int*	8	16	int*	2	4	int*	2	4	int*

Profile	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*: interpretation

The strain is said to be susceptible when its growth is inhibited by the higher and lower critical concentrations of the antibiotic.

The strain is said to be resistant when its growth is inhibited by the higher critical concentration of the antibiotic, but not the lower critical concentration or when its growth is not inhibited by either the higher or the lower critical concentrations of the antibiotic.

For moxifloxacin only one concentration is tested for Uu and Mh. *M. hominis* strains are innately resistant to macrolides (14 -15 carbon atoms), including erythromycin.

In some patient populations, tetracycline resistance is as high as 45% for Uu and 39.6% for Mh (2). Uu/Mh quinolone (5, 6) and clindamycin resistance have been described but the prevalence is not known.

10 - PARTICULAR CASES

For high Uu and Mh levels, the content of all the wells on the tray has turned red. It is recommended that the sample be diluted in order to obtain more specific results. In this case, proceed as follows:

Inoculate a new UMMt 3mL vial with 300 µL of the original UMMt medium stored at 2-8°C (see § 9.1).

Inoculate a new tray with the new inoculated UMMt medium.

Take the dilution (1:10) into account in the interpretation of the enumeration results.

If necessary, confirm the presence of mycoplasmas on an A7 agar plate by re-isolating from the original UMMt medium stored at 2-8°C (§ 9.1). A non-constant incubation temperature or <36°C (frequent opening and poor temperature heterogeneity of the incubator) can slow down the mycoplasma growth kinetics.

11 - QUALITY CONTROL

Quality control can be carried out from the lyophilized *U. urealyticum* strain of the MYCOPLASMA CONTROL kit (REF 00900)) or from a lyophilized reference strain (*U. urealyticum* ATCC 27815 or *M. hominis* ATCC 23114) previously calibrated at 104-5 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: for strain Uu : Uu (+) et Mh (-) ; for strain Mh: Uu (-) et Mh (+).

Enumeration, identification and susceptibility testing:

Inoculate the MYCOFAST *Revolution* 2 tray and perform the test as indicated in these instructions (§ 9.2).

Expected results (ATCC):

	MYCOFAST <i>Revolution</i> 2									
	Uu 10 ³	Uu 10 ⁴	Uu ≥10 ⁵	Mh ≥10 ⁴	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
Strain Uu ATCC 27815	+	+	+/-	NA	S	S	S	S/R	S	NI*
Strain Mh ATCC 23114.	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI* (Non Interpretable) : natural resistance

12 - LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

12.1 - Screening:

The MYCOFAST Screening *RevolutioN* tray allows detection at a threshold of $\leq 10^3$ UCC/mL and does not enable numeration. 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 § 9.1).

An alkaline sample pH (pH > 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 an acidic pH (pH ≤ 5) can slow down the appearance of the colour change.

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

A sample with a low mycoplasma load ($<10^3$ 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 - PERFORMANCES

13.1 Screening and differentiation

MYCOFAST Screening *RevolutioN* tray

A comparative study was carried out using dry swabs on clinical vaginal samples (n= 40 for both Uu and Mh species).

The results obtained with MYCOFAST Screening *RevolutioN* were compared with those obtained with the liquid micro-dilution method.

- For the screening of both Uu and Mh species, there was 97.5% concordance.

For Uu. at 10^3 CCU/mL, 1 sample that was positive with the liquid micro-dilution method appeared negative with the MYCOFAST Screening *RevolutioN*. However, it is important to underline that the 10^3 CCU/mL concentration corresponds to an infra-pathological threshold usually quoted for Uu. For Uu and Mh, the global agreement for the supra-pathological threshold is 100%.

- Differentiation of the mycoplasma species from all tested samples were correctly identified in the corresponding Uu and Mh wells of the MYCOFAST Screening *RevolutioN* tray.

13.2 Identification and enumeration

Direct method MYCOFAST *RevolutioN* 2 tray

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

NA* (Not Applicable)

13.2.1 Isolated strains

A comparative study was carried out with 21 isolated strains (ATCC strains and collection strains) tested separately (Uu or Mh) with several concentrations (76 tests in total).

The results obtained were compared with those obtained with the micro-dilution enumeration method.

For interpretation with a pathological threshold set at 10^3 CCU/mL, the overall agreement for Uu is 97.4% (we listed 2 false positives at 10^2 CCU/mL with the micro-dilution enumeration method).

For interpretation with a pathological threshold of 10^4 CCU/mL; the overall agreement for Uu is 93.4% (we recorded 5 false positives at 10^3 CCU/mL with the micro dilution enumeration method). The overall agreement for Mh is 93.4% (we listed 5 false positives, 4 at 10^3 CCU/mL and one at 10^2 CCU/mL with the micro dilution enumeration method).

The overall Uu + Mh agreement is 93.4%.

13.2.2 Clinical samples

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

A second comparative study was performed on urinary clinical specimens (n=88).

The results obtained with MYCOFAST *RevolutioN* 2 were compared with those obtained with with the liquid micro-dilution enumeration method.

The overall agreement for Uu is 93.2% (we listed 1 false negative at 10^4 CCU/mL with with the liquid micro-dilution enumeration method and 5 false positives at 10^2 CCU/mL with with the liquid micro-dilution enumeration method).

The overall agreement for Mh is 96.6% (we identified 3 false positives at $10^2 - 10^3$ CCU/mL with the liquid micro-dilution enumeration method).

The overall agreement for Uu and Mh is 94.9%.

13.3 Susceptibility testing

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

The tested strains (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* and 16 *M. hominis*) were reference strains, wild-type clinical strains or strains with acquired resistance. Each strain was tested at 10^3 , 10^4 and 10^5 CCU/mL dilutions in UMMt 3 mL.

For 10^4 and 10^5 CCU/mL rates, results were read and interpreted after 24 hours of incubation.

For 10^3 CCU/mL rate, results were read and interpreted after 48 hours incubation in case of negative test in 24 hours.

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

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

The overall agreement for *Mycoplasma hominis* for rates at 10^4-10^5 CCU/mL is: 100%.

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

ME: Major Error, VME : Very Major Error

- ^a : 1 discrepancy at 10^3 CCU/mL (MIC of reference 0.5 μ g/mL), 4 discrepancies at 10^5 CCU/mL (MIC of reference 0.5 - 1 and 8 μ g/mL).
^b : 1 discrepancy at 10^5 CCU/mL (MIC of reference 8 μ g/mL).
^c : 1 discrepancy at 10^3 CCU/mL (MIC of reference 8 μ g/mL); .1 discrepancy at 10^5 CCU/mL (MIC of reference 2 μ g/mL)
^d : 1 discrepancy at 10^5 CCU/mL (MIC of reference 4 μ g/mL).

14 - ELIMINATION DES DECHETS

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

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

2 - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011 Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas; Approved Guideline. CLSI Document M43-A. Vol.31 - N°19.

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

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. *Ureaplasma urealyticum* (T-strain Mycoplasma) and *Mycoplasma hominis*, p. 1713-1718. Dans MAN-DELLG. L. , BENNETJ.E. and DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4th ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

5 - WAITES KEN B. , BREDAKATZ AND ROBERT L. SCHELONKA. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - WAITES KEN B, DONNAM. 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 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5ème édition)

MYCOFAST® is a trademark of ELITech MICROBIO

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

19, allée d'Athènes

83870 SIGNES - FRANCE

Tél. : 33 (0)4 94 88 55 00

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

<http://www.elitechgroup.com>

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

