



ΕΓΧΕΙΡΙΔΙΟ ΟΔΗΓΙΩΝ ΧΡΗΣΗΣ



Ημ. 1ης Έκδοσης:

7ος 2025

Ημ. 1ης Αναθεώρησης:

9ος 2025

ΠΡΟΪΟΝ: **MycoTest ST Plus™**ΚΩΔΙΚΟΣ: **350879**

1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το MycoTest ST Plus™ είναι ένα κιτ ελέγχου ευαισθησίας (Antibiotic **Susceptibility Test, ST**) ειδικά σχεδιασμένο για *Mycoplasma hominis* (M.h.) και *Ureaplasma spp.* (U.u.). Βασίζεται στις οδηγίες του CLSI M43-A για τον έλεγχο με δύο συγκεντρώσεις (cut-off) ανά αντιβιοτικό, ώστε να διαχωρίζονται οι ανθεκτικοί από τους ευαίσθητους ή/και ενδιάμεσους μικροοργανισμούς.

Το κιτ περιλαμβάνει 7 αντιβιοτικά με τις εξής συγκεντρώσεις:

- Azithromycin: 1 & 4 µg/ml
- Clarithromycin: 1 & 4 µg/ml
- Clindamycin: 1 & 4 µg/ml
- Levofloxacin: 1 & 4 µg/ml
- Moxifloxacin: 0,5 & 1 µg/ml
- Doxycycline: 4 & 8 µg/ml
- Tetracycline: 4 & 8 µg/ml

Η μέθοδος επιτρέπει γρήγορη και αξιόπιστη εκτίμηση αντοχής με χρωματομετρική αλλαγή (pH-indicator), η οποία εμφανίζεται όταν υπάρχει ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην παρουσία του αντιβιοτικού.

Στις δύο πρώτες κοιλότητες (MU 10⁴ και MU 10⁶) επιβεβαιώνεται η παρουσία ή απουσία των *M. hominis* και *Ureaplasma spp.* καθώς και η ποσοτική τους συγκέντρωση, ώστε να εξασφαλίζεται η κατάλληλη πυκνότητα για την εκτέλεση του αντιβιογράμματος.

Με την παράλληλη χρήση του MycoTest Prenatal™ και του MYCOPLASMA AGAR – A7 επιτυγχάνεται πλήρης ταυτοποίηση και ποσοτική εκτίμηση των *Μυκοπλάσμάτων*.

Το γένος *Ureaplasma spp.* περιλαμβάνει δύο είδη, το *Ureaplasma urealyticum* και το *Ureaplasma parvum*, τα οποία εξετάζονται συνολικά υπό την ονομασία *Ureaplasma spp.* Το σύμβολο Uu χρησιμοποιείται για να αντιπροσωπεύει το *Ureaplasma spp.*

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Τα *Μυκοπλάσματα* (*Mycoplasma hominis* – Mh και *Ureaplasma spp.* – Uu) είναι μικροί (0,2–0,5 µm) πλειομορφικοί μικροοργανισμοί που στερούνται κυτταρικού τοιχώματος και περιβάλλονται μόνο από κυτταρική μεμβράνη, πλούσια σε στερόλες. Λόγω αυτής της ιδιαιτερότητας, το σχήμα τους δεν είναι σταθερό, δεν χρωματίζονται με Gram χρώση και δεν είναι ευαίσθητα στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι οργανισμοί με μεγάλες θρεπτικές απαιτήσεις. Για τη σωστή διάγνωση απαιτείται προσεκτική λήψη, μεταφορά και συντήρηση των δειγμάτων με ειδικά μέσα (VCM Transport Medium), καθώς και καλλιέργεια σε εμπλουτισμένα θρεπτικά υλικά.

Τα Mh και Uu μπορούν να αποικίζουν φυσιολογικά το κατώτερο ουρογεννητικό σύστημα ανδρών και γυναικών και η παρουσία τους σχετίζεται με παράγοντες όπως η ηλικία, η ορμονική κατάσταση, η φυλή και ο αριθμός σεξουαλικών συντρόφων. Ο αποικισμός είναι συχνότερος στις γυναίκες, ιδιαίτερα κατά την εγκυμοσύνη. Ωστόσο, η παθολογική ανάπτυξη τους έχει συνδεθεί με πληθώρα λοιμώξεων του ουρογεννητικού, του αναπαραγωγικού και του νεογνικού συστήματος.

Αντιβιοτική ευαισθησία

Λόγω απουσίας κυτταρικού τοιχώματος, τα *Μυκοπλάσματα* είναι εκ φύσεως ανθεκτικά στα β-λακταμικά (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες). Η θεραπευτική αντιμετώπισή τους βασίζεται σε αντιβιοτικά που δρουν στη σύνθεση πρωτεϊνών ή στο DNA. Στην κλινική πράξη χρησιμοποιούνται κυρίως:

Μακρολίδες (Azithromycin, Clarithromycin)

Λινκοσαμίδες (Clindamycin)

Τετρακυκλίνες (Doxycycline, Tetracycline)

Φθοριοκινολόνες (Levofloxacin, Moxifloxacin)

Ωστόσο, η αντοχή των *Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma spp.* ποικίλλει γεωγραφικά και χρονικά, γεγονός που καθιστά απαραίτητο τον εργαστηριακό έλεγχο ευαισθησίας. Το MycoTest ST Plus™ δίνει τη δυνατότητα ταχείας εκτίμησης της αντοχής σε επτά αντιβιοτικά, με δύο συγκεντρώσεις για κάθε φάρμακο, σύμφωνα με τις οδηγίες του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M43-A.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το MycoTest ST Plus™ βασίζεται στην ανάπτυξη των *Mycoplasma hominis* (Mh) και *Ureaplasma spp.* (Uu) σε ειδικά εμπλουτισμένο υλικό καλλιέργειας, το οποίο περιέχει δείκτη pH. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών οδηγεί σε μεταβολή του pH του υλικού και συνεπώς σε χρωματική αλλαγή, η οποία χρησιμοποιείται ως ένδειξη παρουσίας ή απουσίας ανάπτυξης.

Οι δύο πρώτες κοιλότητες (MU 10⁴ και MU 10⁶) λειτουργούν ως ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος:

Η κοιλότητα **MU 10⁴** επιτρέπει την ανίχνευση μικρού αριθμού μικροοργανισμών (κατώτερο όριο ευαισθησίας).

Η κοιλότητα **MU 10⁶** αντιστοιχεί σε υψηλότερη συγκέντρωση μικροβιακού φορτίου και χρησιμοποιείται για την ποσοτική εκτίμηση.

Με τον τρόπο αυτό, επιβεβαιώνεται:

Η παρουσία ή απουσία των Mh και Uu στο κλινικό δείγμα.

Η ποσοτική συγκέντρωσή τους ($\geq 10^4$ ή $\geq 10^6$ cfu/ml), η οποία είναι απαραίτητη για την ορθή ερμηνεία του αποτελέσματος και για την εξασφάλιση της κατάλληλης πυκνότητας κατά την εκτέλεση του αντιβιογράμματος.

Μετά την επώαση του MycoTest ST Plus™, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στις κοιλότητες με τα αντιβιοτικά αξιολογείται με βάση την αλλαγή χρώματος του δείκτη pH (συνήθως από πορτοκαλί/κίτρινο → κόκκινο- Βυσσινί), η οποία αντανάκλα τον μεταβολισμό και την αύξηση των Mh και Uu.

Οι συγκεντρώσεις που έχουν επιλεγεί για το MycoTest ST Plus™ ακολουθούν τη λογική του CLSI M43-A (2011). Για τα ουρογεννητικά *Μυκοπλάσματα* δεν εφαρμόζονται πλήρη MIC ranges, αλλά δύο τιμές cut-off (χαμηλή και υψηλή), οι οποίες επιτρέπουν την κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων σε Ευαίσθητο (S), Ενδιάμεσο (I) και Ανθεκτικό (R).

Βήματα ελέγχου

Η κοιλότητα χωρίς αντιβιοτικό λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας. Πρέπει να δείχνει καθαρή ανάπτυξη (χρωματική αλλαγή), ώστε να είναι έγκυρο το τεστ.

Σύγκριση με τις κοιλότητες που περιέχουν αντιβιοτικά

Απουσία αλλαγής χρώματος → Δεν υπάρχει ανάπτυξη → Το στέλεχος θεωρείται ευαίσθητο στη συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Παρουσία αλλαγής χρώματος (ίδια με τον μάρτυρα) → Ανάπτυξη → Το στέλεχος είναι ανθεκτικό στη συγκέντρωση αυτή.

Ερμηνεία ανάλογα με τις δύο συγκεντρώσεις

Αν και οι δύο συγκεντρώσεις δείξουν αναστολή (δεν αλλάζει χρώμα) → το στέλεχος είναι ευαίσθητο.

Αν αναπτύσσεται μόνο στη χαμηλή συγκέντρωση, αλλά όχι στην υψηλή → το στέλεχος είναι ενδιάμεσης ευαισθησίας.

Αν αναπτύσσεται και στις δύο συγκεντρώσεις → το στέλεχος είναι ανθεκτικό.

Πίνακας Ερμηνείας Αποτελεσμάτων

Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση (μg/ml)	Χρώμα κίτρινο/πορτοκαλί (Ευαίσθητο)	Χρώμα μωβ/κόκκινο Ανθεκτικό
Azithromycin (Az)	1 & 4	Χωρίς ανάπτυξη → Ευαίσθητο	Με ανάπτυξη → Ανθεκτικό
Clarithromycin (Cl)	1 & 4	Ευαίσθητο	Ανθεκτικό
Clindamycin (Cd)	1 & 4	Ευαίσθητο	Ανθεκτικό
Levofloxacin (Le)	1 & 4	Ευαίσθητο	Ανθεκτικό
Moxifloxacin (Mx)	0,5 & 1	Ευαίσθητο	Ανθεκτικό
Doxycycline (Do)	4 & 8	Ευαίσθητο	Ανθεκτικό
Tetracycline (Te)	4 & 8	Ευαίσθητο	Ανθεκτικό

Γενική ερμηνεία

Κίτρινο/πορτοκαλί = Ευαισθησία (αναστολή ανάπτυξης)

Κόκκινο/Βυссινί = Αντοχή (ανάπτυξη μικροοργανισμών)

Ευαίσθητο (S): Χρώμα κίτρινο/πορτοκαλί και στις δύο συγκεντρώσεις

Ενδιάμεσο (I): Κόκκινο/Βυссινί στη χαμηλή, αλλά κίτρινο/πορτοκαλί στην υψηλή

Ανθεκτικό (R): Κόκκινο/Βυссινί και στις δύο συγκεντρώσεις

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ & ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΤΙΚΑ MycoTest ST Plus™	g/l
Mycoplasma Broth	20
Yeast Extract	5
L-Cystine	0,1
Phenol Red	0,07
Arginine	10
Urea	5
Growth Supplement	10
Antibiotic Supplement	10
Azithromycin	1 & 4 mg
Clarithromycin	1 & 4 mg
Clindamycin	1 & 4 mg
Levofloxacin	1 & 4 mg
Moxifloxacin	0,5 & 1 mg
Doxycycline	4 & 8 mg
Tetracycline	4 & 8 mg

Σημασία κάθε συστατικού Mycoplasma Broth:

Mycoplasma Broth: Παρέχει τα βασικά θρεπτικά συστατικά (αμινοξέα, βιταμίνες, πηγές αζώτου και άνθρακα) απαραίτητα για την ανάπτυξη των μυκοπλάσμάτων.

Yeast Extract: Πλούσια πηγή βιταμινών, αμινοξέων, πουρινών και πυριμιδινών· απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς που δεν μπορούν να συνθέσουν μόνοι τους.

L-Cystine: Θειούχο αμινοξύ απαραίτητο για την ανάπτυξη· παίζει ρόλο σε αντιοξειδωτικές διεργασίες και στη δομή των πρωτεϊνών.

Phenol Red: Δείκτης pH. Επιτρέπει την παρακολούθηση της ανάπτυξης μέσω αλλαγής χρώματος (κίτρινο/πορτοκαλί = όξινο → αναστολή ανάπτυξης / μωβ-κόκκινο = αλκαλικό → ανάπτυξη).

Arginine: Υποστρώμα που μεταβολίζεται από το *M. hominis*· η υδρόλυσή της προκαλεί αύξηση του pH και αλλαγή χρώματος.

Urea: Υποστρώμα που διασπάται από το *Ureaplasma spp.* (παρουσία ουρεάσης) → παραγωγή αμμωνίας, αύξηση pH, αλλαγή χρώματος.

Growth Supplement: Περιέχει στερόλες (π.χ. χοληστερόλη), νουκλεοτίδια και άλλους παράγοντες ανάπτυξης που είναι απολύτως απαραίτητοι γιατί τα μυκοπλάσματα δεν συνθέτουν μεμβρανικά στεροειδή.

Antibiotic Supplement: Μείγμα αντιβιοτικών που αναστέλλει τη συνοδό χλωρίδα (βακτήρια με κυτταρικό τοίχωμα), αφήνοντας εκλεκτικά να αναπτυχθούν τα μυκοπλάσματα.

Azithromycin: Μακρολίδη - αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών (50S ριβόσωμα). Ιδιαίτερα δραστική έναντι *Ureaplasma spp.*

Clarithromycin: Μακρολίδη - παρόμοια με την αζιθρομυκίνη. Χρησιμοποιείται για *Ureaplasma spp.* αλλά υπάρχει αντοχή σε *M. hominis*.

Clindamycin: Λινοσαμίδα - αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών (50S). Δραστική κυρίως έναντι *M. hominis*.

Levofloxacin: Φθοριοκινολόνη - αναστέλλει DNA γυράση/τοποϊσομεράση IV → διακοπή αντιγραφής DNA.

Moxifloxacin: Νεότερη φθοριοκινολόνη με μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι Μυκοπλάσμάτων, ακόμη και ανθεκτικών στελεχών.

Doxycycline: Τετρακυκλίνη - αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών δεσμεύοντας το 30S ριβόσωμα. Θεωρείται από τα πιο δραστικά φάρμακα για *M. hominis* & *Ureaplasma spp.*

Tetracycline: Παρόμοια με τη Doxycycline χρησιμοποιείται ιστορικά ως πρώτη επιλογή, αλλά παρατηρούνται ανθεκτικά στελέχη.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το MycoTest ST Plus™ είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό υλικό και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου. Το υλικό αυτό περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζωικής προέλευσης. Τα πιστοποιητικά για την προέλευση και την υγιεινολογική κατάσταση των ζώων δεν εγγυώνται πλήρως την απουσία μεταδιδόμενων παθογόνων παραγόντων. Γι' αυτό συνιστάται αυτά τα υλικά να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά και με τήρηση των συνήθων μέτρων ασφαλείας (να μη λαμβάνονται από την πεπτική ή την αναπνευστική οδό).

Ο χειρισμός του MycoTest ST Plus™ να γίνεται πάντα με γάντια και μέσα σε Laminar flow Class II, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις κυρίως από σαπροφυτικούς μύκητες.

Εάν το MycoTest ST Plus™ είναι ραγισμένο ή το σακουλάκι τρύπιο, μη το χρησιμοποιήσετε.

Μετά την ημερομηνία λήξεως το υλικό είναι ακατάλληλο για χρήση.

Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλύνουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι.

Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

6. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Τα σωληνάρια πρέπει να φυλάσσονται στους 2 – 8 °C μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους.

Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Επίσης να αποφεύγεται την υπερβολική θέρμανση.

Το MycoTest ST Plus™ είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα σωληνάρια μπορούν να παραμείνουν στους 6 - 25 °C για 5 ημέρες ή στους 25 - 40 °C για 24 ώρες, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

7.1 Παρεχόμενα υλικά

- MycoTest ST Plus™. ΚΩΔΙΚΟΣ: 350879
- Paraffin oil. ΚΩΔΙΚΟΣ: 300875

7.2 Απαιτούμενα υλικά που όμως δεν παρέχονται

- MDP Medium. ΚΩΔΙΚΟΣ: 380880
- Πιπέτες μεταβλητού ή σταθερού όγκου με πλαστικά αποστειρωμένα ρύγχη για χορήγηση 100 μl.

7.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Προσοχή το δείγμα πρέπει να συλλέγεται πριν από οποιαδήποτε θεραπεία. Η διαδικασία συλλογής πρέπει να γίνεται με σωστό και σταθερό τρόπο ώστε να αποφεύγεται η επιμολύνση του δείγματος από άλλους μικροοργανισμούς. Η μεταφορά του πρέπει να γίνεται με MDP Medium που περιλαμβάνεται στη συσκευασία μέσα σε 24 ώρες και να συντηρείται με παγοκύστες σε χαμηλή θερμοκρασία. Εάν η λήψη γίνει στο εργαστήριο, κάντε τον εμβολιασμό όσο το δυνατόν συντομότερα. Εάν ο εμβολιασμός γίνει στο MDP Medium το δείγμα μπορεί να διατηρηθεί σταθερό για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, έως 5 ημέρες στους 2 – 8 °C και 30 μέρες στους –20 °C.

Κολπικό – τραχηλικό δείγμα

Με τη χρήση κολποδιαστολέα και με ένα βαμβακοφόρο στειλεό αφαιρούμε τη βλέννη από τον έξω κόλπο. Με δεύτερο στειλεό λαμβάνουμε το δείγμα από τον ενδοτράχηλο. Προσοχή, πρέπει να συλλέγονται κύτταρα, διότι σε αυτά βρίσκονται προσκολλημένα τα *Μυκοπλάσματα*.

Ουρηθρικό δείγμα

Καθαρίζουμε την ουρήθρα και τη γύρω περιοχή χωρίς τη χρήση αντισηπτικού. Μετά συλλέξτε το δείγμα με περιστροφή του στειλεού στον ουρηθρικό βλεννογόνο. Το δείγμα πρέπει να συλλέγεται μετά από δύο έως τρεις ώρες από την τελευταία ενούρηση.

Σπέρμα – Πύον σαλπινγίτιδας – Γαστρικό έκκριμα

Συλλέγουμε το σπέρμα και το πύον σαλπινγίτιδας μέσα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη

Το γαστρικό έκκριμα συλλέγεται από τον καθετήρα του νεογνού μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάριο. Γίνεται αραιώση 1:10 σε ζωμό (VCM). Προσοχή ποτέ μην ρίξετε το σπέρμα χωρίς αραιώση στο MycoTest διότι το αλκαλικό του pH αλλάζει το χρώμα του υλικού από κίτρινο σε ροζ.

Ούρα

Συλλέγουμε τα πρώτα πρωινά ούρα σε αποστειρωμένο ουροσυλέκτη. Γίνεται φυγοκέντρηση 15ml ούρων στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Αδειάζουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε περίπου 0,5ml ούρων αναδεύουμε καλά και ρίχνουμε 250μl στο σωληνάριο MDP Medium.

7.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ MYCOTEST MycoTest ST Plus™

- Εμβολιάζουμε το δείγμα το συντομότερο δυνατόν, στο σωληνάριο MDP Medium.

- Όταν το δείγμα είναι από στειλεό εμβαπτίζουμε με περιστροφές και στη συνέχεια πετάμε το στειλεό.

- Όταν το δείγμα είναι υγρό (ούρα, σπέρμα) ρίχνουμε 250μl στο MDP Medium και ανακατεύουμε καλά.

- Από το εμβολιασμένο MDP Medium ρίχνουμε 100μl σε κάθε κοιλότητα του MycoTest ST Plus™.

- Στη συνέχεια ρίχνουμε από μία σταγόνα (περίπου 30 μl) paraffin oil σε κάθε κοιλότητα για να αποφύγουμε την αφυδάτωση αλλά και να υποστηρίξουμε τις μικροαερόφιλες συνθήκες όπου χρειάζεται.

- Τοποθετούμε το καπάκι και επωάζουμε στους 36 - 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 24 – 48 ώρες.

- Φυλάμε το εμβολιασμένο MDP Medium στην κατάψυξη (–20 °C) μέχρι να ολοκληρωθεί η εξέταση.

8. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αξιολόγηση γίνεται με βάση την αλλαγή χρώματος του δείκτη pH:

- Κίτρινο/πορτοκαλί → Χωρίς ανάπτυξη → Ευαίσθητο (S)
- Κόκκινο/Βυσσινί → Με ανάπτυξη → Ανθεκτικό (R)

Για κάθε αντιβιοτικό:

- Αναστολή και στις 2 συγκεντρώσεις → Ευαίσθητο (S)

- Αναστολή μόνο στην υψηλή → Ενδιάμεσο (I)
- Ανάπτυξη και στις 2 συγκεντρώσεις → Ανθεκτικό (R)

Συγκριτικός Πίνακας Ευαισθησίας – Αντοχής

Αντιβιοτικό	<i>Mycoplasma hominis</i> (Mh)	<i>Ureaplasma</i> spp. (Uu)
Azithromycin	 Ανθεκτικό	 Ευαίσθητο (συχνά)
Clarithromycin	 Ανθεκτικό	 Ευαίσθητο (συχνά)
Clindamycin	 Ευαίσθητο	 Ανθεκτικό
Levofloxacin	 Ευαίσθητο (με πιθανή αντοχή)	 Ευαίσθητο (με πιθανή αντοχή)
Moxifloxacin	 Ευαίσθητο (ισχυρή δράση)	 Ευαίσθητο (ισχυρή δράση)
Doxycycline	 Ευαίσθητο (με σποραδική αντοχή)*	 Ευαίσθητο (αλλά παρατηρείται αντοχή σε ορισμένα στελέχη)
Tetracycline	 Ευαίσθητο (κλασική επιλογή)	 Ευαίσθητο (αντοχή σε ορισμένα στελέχη)

* Σε ορισμένα στελέχη (όχι πολύ συχνά, αλλά αναφερόμενα σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές) έχει παρατηρηθεί αντοχή στη δοξυκυκλίνη. Συνήθως σχετίζεται με την παρουσία του γονιδίου *tet(M)*, το οποίο κωδικοποιεί για πρωτεΐνες προστασίας του ριβοσώματος, με αποτέλεσμα το φάρμακο να μην μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση πρωτεϊνών.

Συμπεράσμα

Mh (*M. hominis*):

Ανθεκτικό στις μακρολίδες (Azithromycin, Clarithromycin).

Κύρια θεραπευτικά όπλα: Clindamycin, Doxycycline/Tetracycline, Moxifloxacin/Levofloxacin.

Uu (*Ureaplasma* spp.):

Ανθεκτικό στη Clindamycin.

Κύρια θεραπευτικά όπλα: Μακρολίδες (Azithromycin, Clarithromycin), Tetracyclines, Φθοριοκινολόνες.

9. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Για τον ποιοτικό έλεγχο του *Mycotest ST Plus™* χρησιμοποιούμε για τον έλεγχο απόδοσης τα εξής πρότυπα στελέχη:

Mycoplasma hominis NCTC 10111 (10^4 & 10^6 CCU/ml), & *Ureaplasma parvum* ATCC 27813 (10^4 & 10^6 CCU/ml). Σε ότι αφορά την ακρίβεια του αποτελέσματος επιβεβαιώνουμε το αποτέλεσμα με παράλληλη καλλιέργεια των στελεχών σε τρυβλία *Mycoplasma Agar* A7 050080.

Για τον αποκλεισμό από ψευδός θετικά αποτελέσματα στις μικροκοιλότητες χρησιμοποιούμε τα εξής πρότυπα στελέχη:

Staphylococcus aureus ATCC: 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC: 14153 & *Candida albicans* ATCC: 10231.

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΧΡΩΜΑ ΜΙΚΡΟΚΟΙΛΟΤΗΤΑΣ	ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ Δεν αναπτύσσονται. (Κίτρινο-πορτοκαλί υλικό)	ΑΝΤΟΧΗ Αναπτύσσονται. (Κόκκινο – Βυσσινί υλικό)
<i>Ureaplasma parvum</i> ATCC 27813	Αναπτύσσεται στις μικροκοιλότητες MU 10^4 & MU 10^6 . Αλλαγή χρώματος σε Κόκκινο – μοβ διαυγές	Azithromycin, Clarithromycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Doxycycline, Tetracycline	Clindamycin
<i>Mycoplasma hominis</i> NCTC 10111	Αναπτύσσεται στις μικροκοιλότητες MU 10^4 & MU 10^6 . Αλλαγή χρώματος σε Κόκκινο – μοβ διαυγές	Clindamycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Doxycycline, Tetracycline	Azithromycin, Clarithromycin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 29213.	Δεν αναπτύσσεται σε καμία μικροκοιλότητα. Καμία αλλαγή χρώματος (κίτρινο - Πορτοκαλί διαυγές)		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Δεν αναπτύσσεται σε καμία μικροκοιλότητα. Καμία αλλαγή χρώματος (κίτρινο - Πορτοκαλί διαυγές)		
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC: 14153	Δεν αναπτύσσεται σε καμία μικροκοιλότητα. Καμία αλλαγή χρώματος (κίτρινο - Πορτοκαλί διαυγές)		
<i>Candida albicans</i> ATCC: 10231	Δεν αναπτύσσεται σε καμία μικροκοιλότητα. Καμία αλλαγή χρώματος (κίτρινο - Πορτοκαλί διαυγές)		

10. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το MycoTest ST Plus™ είναι μια αξιόπιστη, απλή και πρακτική μέθοδος, αλλά έχει περιορισμούς:

Πιθανή ασυμφωνία μεταξύ του kit ταυτοποίησης (θετικό αποτέλεσμα) και του kit αντιβιογράμματος (μη αναμενόμενα αποτελέσματα) αποδίδεται συνήθως σε εξασθενημένα *Μυκοπλάσματα*, τα οποία δεν επιβίωσαν έως την ημέρα εκτέλεσης του αντιβιογράμματος.

Εάν το δείγμα δεν έχει συντηρηθεί σωστά, είναι πιθανό να προκύψει λανθασμένο αποτέλεσμα. Συνεπώς, ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει πάντοτε την παρουσία λοίμωξης.

Αναπτύσσονται μόνο *Μυκοπλάσματα Mh* και *Uu*: Η μέθοδος είναι εκλεκτική για *M. hominis* και *Ureaplasma spp.* και δεν επιτρέπει τον έλεγχο άλλων παθογόνων *Μυκοπλασμάτων* (π.χ. *Mycoplasma genitalium*).

Ο έλεγχος βασίζεται σε δύο συγκεντρώσεις ανά αντιβιοτικό, οπότε το αποτέλεσμα είναι κατηγοριοποιημένο σε Ευαίσθητο (S), Ενδιάμεσο (I) ή Ανθεκτικό (R). Δεν παρέχει ακριβή MIC (Minimum Inhibitory Concentration), όπως μέθοδοι αναφοράς (π.χ. broth microdilution).

Η ερμηνεία είναι οπτική και μπορεί να επηρεαστεί από την εμπειρία του χειριστή, το φωτισμό ή μερικές φορές από οριακές αλλαγές χρώματος.

Χρειάζεται 24–48 ώρες επώασης για σαφή αποτελέσματα. Άλλες μοριακές μέθοδοι (PCR-based kits) δίνουν γρηγορότερα αποτελέσματα αλλά χωρίς έλεγχο ευαισθησίας.

Δεν ανιχνεύει μηχανισμούς αντοχής: Δίνει μόνο το φαινότυπο (S/I/R) και όχι τον γονιδιακό μηχανισμό αντοχής (π.χ. tetM), μεταλλάξεις στο 23S rRNA ή στη DNA γυράση). Άλλες μοριακές μέθοδοι (PCR, sequencing) μπορούν να δείξουν ποιο γονίδιο αντοχής φέρει το στέλεχος.

Η μέθοδος απαιτεί ζωντανούς μικροοργανισμούς για να φανεί η ανάπτυξη. Αν το δείγμα έχει κακή μεταφορά/συντήρηση, μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Μοριακά kit μπορούν να ανιχνεύσουν DNA ακόμα και από μη βιώσιμα μικρόβια.

11. ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα υλικά που δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη μπορεί να θεωρηθούν ως μη επικίνδυνα απόβλητα και να απορρίπτονται ανάλογα.

Τα υλικά που παρουσιάζουν ανάπτυξη αποικιών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες για μολυσματικά ή δυνητικός μολυσματικά απόβλητα.

Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τη σωστή διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων σύμφωνα με τη φύση και το βαθμό επικινδυνότητάς τους και πρέπει να τα διαχειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να αναθέτει τη διαχείριση και απόρριψή τους) σύμφωνα με τους εκάστοτε ισχύοντες κανονισμούς.

12. ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
MycoTest ST Plus™	350879	Μικροπλάκες 16 κοιλότητων σε κουτί ανά 10 τεμάχια	2 – 8 °C	12 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/746.

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714010101VY. EDMA: (14 01 01 01) Dehydrated Culture Media (DCM).

Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα: EN ISO 9001:2015 / ΕΛΟΤ EN ISO 13485:2016 ΔΥ8δ/1348/2004.

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Η αντιμικροβιακή ευαισθησία των ουρογεννητικών μυκοπλασμάτων (*Mycoplasma hominis* και *Ureaplasma spp.*) παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το είδος, τη γεωγραφική περιοχή και την περίοδο παρακολούθησης. Σύμφωνα με τις οδηγίες του CLSI (M43-A, 2011), η αξιολόγηση της αντοχής βασίζεται σε μεθόδους καλλιέργειας και AST (antibiotic susceptibility testing), ενώ αρκετά εμπορικά kit έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την κλινική διάγνωση και τον έλεγχο ευαισθησίας.

Το *M. hominis* παρουσιάζει φυσική αντοχή στις μακρολίδες (όπως η αζιθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη), λόγω διαφορών στη θέση δέσμευσης του 23S rRNA. Αντίθετα, είναι συνήθως ευαίσθητο στις τετρακυκλίνες (δοξυκυκλίνη, τετρακυκλίνη), στις λινκοσαμίδες (κλινδαμυκίνη) και στις φθοριοκινολόνες (λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη), αν και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών έχει καταγραφεί. Από την άλλη πλευρά, τα *Ureaplasma spp.* είναι ανθεκτικά στην κλινδαμυκίνη, αλλά συνήθως ευαίσθητα στις μακρολίδες, στις τετρακυκλίνες και στις νεότερες κινολόνες.

Μελέτες από διαφορετικές χώρες αναδεικνύουν αυξημένα ποσοστά αντοχής στις τετρακυκλίνες (κυρίως λόγω του γονιδίου tetM) και αντοχής στις φθοριοκινολόνες, ιδίως σε στελέχη *Ureaplasma parvum*. Παράλληλα, μοριακές αναλύσεις έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο 23S rRNA και σε ριβοσωμικές πρωτεΐνες συσχετίζονται με μακρολιδική αντοχή, ιδιαίτερα στα *Ureaplasma spp.*

Συνολικά, η βιβλιογραφία υπογραμμίζει ότι η επιλογή θεραπευτικού σχήματος πρέπει να βασίζεται σε τοπικά δεδομένα αντοχής και στον εργαστηριακό έλεγχο ευαισθησίας κάθε κλινικού δείγματος. Τα εμπορικά kit ST, παρέχουν μια πρακτική λύση για την ταχεία και κλινικά χρήσιμη αξιολόγηση της ευαισθησίας, αν και δεν αντικαθιστούν τις τυποποιημένες μεθόδους αναφοράς ή τη μοριακή ανάλυση μηχανισμών αντοχής.

- Pereyre S, Gonzalez P, de Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, Bébear C. French prospective clinical evaluation of the MYCO WELL D-ONE assay for detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*. J Clin Microbiol. 2020;58(12):e01392-20. doi:10.1128/JCM.01392-20.
- Bébear C, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S. Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*: comparison of commercial microdilution plates with the CLSI reference method. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(7):e00418-18. doi:10.1128/AAC.00418-18.
- Boudinot C, Lelièvre L, Bébear C. Evaluation of the Mycoplasma Duo Kit for detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from urogenital and placental specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1596-1599. doi:10.1128/JCM.02405-06.
- Bébear C, de Barbeyrac B. Genital mycoplasmas: accurate diagnosis and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2009;15(6):538-546. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02855.x.
- CLSI. Susceptibility Testing of Mycoplasmas, Approved Guideline M43-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):757-789. doi:10.1128/CMR.18.4.757-789.2005.
- Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in neonatal morbidities and outcomes. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2014;99(1):F87-F92. doi:10.1136/archdischild-2012-303351.
- Glass JI, Pereyre S, Cassell GH, Bébear C. *Ureaplasma* infection in preterm infants: current concepts and new perspectives. Clin Microbiol Infect. 2018;24(2):123-130. doi:10.1016/j.cmi.2017.08.003.
- Kacerovsky M, Musilova I, Hornychova H, Kutova R, Pliskova L, Kostal M, Jacobsson B. *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* intra-amniotic infection in women with preterm prelabor rupture of membranes. PLoS One. 2014;9(6):e102408. doi:10.1371/journal.pone.0102408.
- Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of ureaplasmas and mycoplasmas in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. J Mol Diagn. 2012;14(5):437-450. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.06.001.
- Bebear C, Kempf I. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance of mycoplasmas of humans. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):703-711. doi:10.1128/CMR.18.4.703-711.2005.

12. Xiao L, Crabb DM, Duffy LB, Paralanov V, Glass JI, Robertson JA, Cassell GH, Waites KB. Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human *Ureaplasma* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4638-4641. doi:10.1128/AAC.00329-11.
13. Fernández J, Fernández O, García B, García S, Llaneza J. Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*: a 3-year study in Asturian hospitals. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29(5):242-248.
14. Kletzel A, Kenyon C, Cools P, Crucitti T, Jespers V. Antimicrobial susceptibility of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species: a systematic review. *Sex Transm Infect*. 2022;98(7):489-496. doi:10.1136/sextrans-2021-055210.

14. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ IN VITRO



Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ ΤΚ 19001

Τ.Θ. 4893 - Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112.

E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprepare.gr



TECHNICAL DATA SHEET

PRODUCT: **MycoTest ST Plus™**
REFERENCE: **350879**



Date 1st Edition:
5th 2025
Date 1st Revision:
7th 2025

1. INTENDED USE

MycoTest ST Plus™ is an antibiotic susceptibility test (ST) kit specifically designed for *Mycoplasma hominis* (M.h.) and *Ureaplasma* spp. (U.u.). It is based on the CLSI M43-A guidelines for the two-concentration (cut-off) method per antibiotic, to distinguish resistant from susceptible and/or intermediate microorganisms.

The kit includes 7 antibiotics with the following concentrations:

- Azithromycin: 1 & 4 µg/ml
- Clarithromycin: 1 & 4 µg/ml
- Clindamycin: 1 & 4 µg/ml
- Levofloxacin: 1 & 4 µg/ml
- Moxifloxacin: 0.5 & 1 µg/ml
- Doxycycline: 4 & 8 µg/ml
- Tetracycline: 4 & 8 µg/ml

The method allows for rapid and reliable assessment of resistance by means of a colorimetric change (pH indicator), which occurs when microorganism growth is present in the presence of the antibiotic.

In the first two wells (MU 10⁴ and MU 10⁶), the presence or absence of *M. hominis* and *Ureaplasma* spp. is confirmed, as well as their quantitative concentration, to ensure the appropriate density for performing the susceptibility test.

When used in parallel with MycoTest Prenatal™ and MYCOPLASMA AGAR – A7, complete identification and quantitative evaluation of Mycoplasmas is achieved.

The genus *Ureaplasma* spp. includes two species, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*, which are examined collectively under the name *Ureaplasma* spp. The symbol Uu is used to represent *Ureaplasma* spp.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Mycoplasmas (*Mycoplasma hominis* – Mh and *Ureaplasma* spp. – Uu) are small (0.2–0.5 µm), pleomorphic microorganisms that lack a cell wall and are surrounded only by a sterol-rich cell membrane. Due to this peculiarity, their shape is not stable, they cannot be stained with Gram stain, and they are not susceptible to β-lactam antibiotics.

They are particularly delicate organisms with high nutritional requirements. Accurate diagnosis requires careful specimen collection, transport, and preservation using specialized media (e.g., MDP Medium), as well as culture in enriched growth media.

Mh and Uu may normally colonize the lower urogenital tract of both men and women, and their presence is influenced by factors such as age, hormonal status, ethnicity, and number of sexual partners. Colonization is more frequent in women, especially during pregnancy. However, pathological overgrowth has been associated with a wide range of infections of urogenital, reproductive, and neonatal systems.

Antibiotic Susceptibility

Due to the absence of a cell wall, mycoplasmas are intrinsically resistant to β-lactams (penicillins, cephalosporins, carbapenems). Their treatment relies on antibiotics that act on protein or DNA synthesis. In clinical practice, the following classes are mainly used:

- Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin)
- Lincosamides (Clindamycin)
- Tetracyclines (Doxycycline, Tetracycline)
- Fluoroquinolones (Levofloxacin, Moxifloxacin)

However, the resistance of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp. varies by region and over time, making laboratory susceptibility testing essential. MycoTest ST Plus™ provides rapid assessment of resistance to seven antibiotics, at two concentrations for each drug, in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M43-A guidelines.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The MycoTest ST Plus™ is based on the growth of *Mycoplasma hominis* (Mh) and *Ureaplasma* spp. (Uu) in a specially enriched culture medium containing a pH indicator. Growth of microorganisms leads to a change in the pH of the medium and consequently to a color change, which serves as an indicator of presence or absence of growth.

The first two wells (MU 10⁴ and MU 10⁶) function as qualitative and quantitative controls:

- MU 10⁴ well: allows detection of a small number of microorganisms (lower sensitivity limit).
- MU 10⁶ well: corresponds to a higher microbial load and is used for quantitative assessment.

In this way, the following are confirmed:

- The presence or absence of Mh and Uu in the clinical sample.
- Their quantitative concentration (≥10⁴ or ≥10⁶ cfu/ml), which is necessary for correct result interpretation and for ensuring the appropriate inoculum density during susceptibility testing.

After incubation of MycoTest ST Plus™, microbial growth in the antibiotic wells is assessed based on the pH indicator color change (typically from orange/yellow → Red-Burgundy), which reflects the metabolism and growth of *Mh* and *Uu*.

The antibiotic concentrations selected for the MycoTest ST Plus™ follow the rationale of CLSI M43-A (2011). For urogenital mycoplasmas, full MIC ranges are not applied; instead, two cut-off values (low and high) are used, allowing the categorization of results as Susceptible (S), Intermediate (I), or Resistant (R).

Control Steps

- The **antibiotic-free well** functions as a positive control. It must show clear growth (color change) for the test to be valid.
- Results are interpreted by comparing the antibiotic wells with the control well:
No color change → No growth → The strain is considered **susceptible** at this concentration.
Color change identical to the control → Growth → The strain is **resistant** at this concentration.

Interpretation according to two concentrations

- If both concentrations show inhibition (no color change) → the strain is Susceptible (S).
- If growth occurs only at the low concentration but not at the high concentration → the strain is Intermediate (I).
- If growth occurs at both concentrations → the strain is Resistant (R).

Result Interpretation Table

Antibiotic	Concentration (µg/ml)	Yellow/Orange (Susceptible)	Red/Burgundy (Resistant)
Azithromycin	1 & 4	No growth → Susceptible	Growth → Resistant
Clarithromycin	1 & 4	Susceptible	Resistant
Clindamycin	1 & 4	Susceptible	Resistant
Levofloxacin	1 & 4	Susceptible	Resistant
Moxifloxacin	0,5 & 1	Susceptible	Resistant
Doxycycline	4 & 8	Susceptible	Resistant
Tetracycline	4 & 8	Susceptible	Resistant

General Interpretation

Yellow/Orange = Susceptible (growth inhibition)

Red/Burgundy = Resistant (microbial growth)

Susceptible (S): Yellow/Orange at both concentrations

Intermediate (I): Red/Burgundy at low, Yellow/Orange at high concentration

Resistant (R): Red/Burgundy at both concentrations

4. REAGENTS

RAW MATERIALS & SUPPLEMENTS – MycoTest ST Plus™	g/l
Mycoplasma Broth	20
Yeast Extract	5
L-Cystine	0,1
Phenol Red	0,07
Arginine	10
Urea	5
Growth Supplement	10
Antibiotic Supplement	10
Azithromycin	1 & 4 mg
Clarithromycin	1 & 4 mg
Clindamycin	1 & 4 mg
Levofloxacin	1 & 4 mg
Moxifloxacin	0,5 & 1 mg
Doxycycline	4 & 8 mg
Tetracycline	4 & 8 mg

Significance of each component in Mycoplasma Broth:

Mycoplasma Broth: Provides essential nutrients (amino acids, vitamins, nitrogen, and carbon sources) required for mycoplasma growth.

Yeast Extract: Rich source of vitamins, amino acids, purines, and pyrimidines; essential for organisms unable to synthesize them.

L-Cystine: Sulfur-containing amino acid necessary for growth; plays a role in antioxidant processes and protein structure.

Phenol Red: pH indicator; allows growth monitoring by color change (yellow/orange = acidic → growth inhibition / purple-red = alkaline → microbial growth).

Arginine: Substrate metabolized by *M. hominis*; its hydrolysis increases pH and causes color change.

Urea: Substrate degraded by *Ureaplasma* spp. (via urease activity) → ammonia production, pH increase, and color change.

Growth Supplement: Contains sterols (e.g., cholesterol), nucleotides, and other growth factors essential because mycoplasmas cannot synthesize membrane sterols.

Antibiotic Supplement: Mixture of antibiotics that inhibit accompanying flora (cell wall-containing bacteria), allowing selective growth of mycoplasmas.

Significance of antibiotics in the panel:

Azithromycin: Macrolide; inhibits protein synthesis (50S ribosome). Highly active against *Ureaplasma spp.*

Clarithromycin: Macrolide; like azithromycin. Used against *Ureaplasma spp.*, though resistance is common in *M. Hominis*.

Clindamycin: Lincosamide; inhibits protein synthesis (50S). Mainly active against *M. Hominis*.

Levofloxacin: Fluoroquinolone; inhibits DNA gyrase/topoisomerase IV → disruption of DNA replication.

Moxifloxacin: Newer fluoroquinolone with higher activity against mycoplasmas, including resistant strains.

Doxycycline: Tetracycline; inhibits protein synthesis by binding to the 30S ribosome. Considered among the most effective drugs for *M. hominis* and *Ureaplasma spp.*

Tetracycline: Like doxycycline; historically the first-line drug, though resistant strains are now observed.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

The MycoTest ST Plus™ is an in vitro diagnostic laboratory material and must be handled only by trained laboratory personnel.

This material contains peptones and animal-derived extracts. Certificates regarding the origin and health status of the animals do not fully guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. Therefore, these materials should be treated as potentially infectious, and standard safety precautions must be followed (avoid ingestion or inhalation).

Handling of MycoTest Plus GBS™ should always be performed with gloves and inside a Class II laminar flow cabinet to avoid contamination, particularly from saprophytic fungi.

Do not use MycoTest Plus GBS™ if the container is cracked or if the packaging is damaged.

Do not use the material after the expiry date, as it is unsuitable for testing.

In case of skin contact, wash immediately with plenty of water and soap.

Positive samples must be disposed of in accordance with biosafety regulations for handling infectious material.

6. STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The tubes must be stored at **2–8 °C** in their original packaging until the time of use. Freezing, even momentarily, destroys the material, and excessive heating should also be avoided. The tubes can be used up to the expiry date indicated on the label. For transport, stability studies have shown that the tubes can remain at **6–25 °C** for up to **5 days** or at **25–40 °C** for **24 hours** without affecting the performance of the product.

7. PROCEDURE FOR USE

7.1 Materials Provided

MycoTest ST Plus™ – CODE: 350879

Paraffin oil – CODE: 350879

7.2 Required but Not Provided Materials

MDP Medium – CODE: 380880

Variable or fixed-volume pipettes with sterile plastic tips for dispensing 100 µl.

7.3 Sample Collection

The specimen must be collected prior to any treatment. The collection procedure should be carried out carefully and consistently to avoid contamination of the specimen with other microorganisms. Transport must be performed using the MDP Medium included in the kit within 24 hours, kept at low temperature with ice packs.

If collection is performed in the laboratory, inoculate the medium as soon as possible. Once inoculated into MDP Medium, the specimen remains stable for 24 hours at room temperature, up to 5 days at 2–8 °C, and up to 30 days at –20 °C.

Vaginal–Cervical Sample

Using a vaginal speculum and a sterile cotton swab, remove mucus from the outer vagina. With a second swab, collect the sample from the endocervix. It is essential to collect epithelial cells, since mycoplasmas adhere to them.

Urethral Sample

Clean the urethral opening and surrounding area without antiseptic. Collect the sample by rotating the swab inside the urethral mucosa. The sample must be taken at least two to three hours after the last urination.

Semen – Salpingitis Pus – Gastric Aspirate

Collect semen and salpingitis pus in a sterile urine container. Gastric aspirate should be collected from the neonate's catheter into a sterile tube and diluted 1:10 in MDP Medium. Important: never add undiluted semen directly into the MycoTest, as its alkaline pH may alter the color of the medium from yellow to pink.

Urine

Collect the first morning urine in a sterile urine container. Centrifuge 15 ml of urine at 2000 rpm for 5 minutes. Discard the supernatant, leaving approximately 0.5 ml of urine, resuspend thoroughly, and transfer 200 µl into the MDP Medium.

7.4 Procedure for Using MycoTest ST Plus™

Inoculate the sample into the MDP Medium tube as soon as possible. For swab samples, immerse the swab with rotations and discard it afterward. For liquid samples (urine, semen), add 250 µl into the MDP Medium and mix well. Urine must always be centrifuged: collect first morning urine in a sterile urine container, centrifuge 15 ml at 2000 rpm for 5 minutes, then add 250 µl of the sediment into the MDP Medium tube. From the inoculated VCM, dispense 100 µl into each cavity of the MycoTest ST Plus™. Add 50 µl of paraffin oil into each cavity to prevent dehydration and to maintain microaerophilic conditions when required. Close the lid and incubate aerobically at 36–37 °C for 24–48 hours. Store the inoculated MDP Medium at –20 °C until the examination is completed.

8. READING AND INTERPRETATION OF RESULTS

Evaluation is based on the color change of the pH indicator:

- Yellow/Orange → No growth → Susceptible (S)
- Red/Burgundy → Growth → Resistant (R)

For each antibiotic:

- Inhibition at both concentrations → Susceptible (S)
- Inhibition only at the higher concentration → Intermediate (I)
- Growth at both concentrations → Resistant (R)

Comparative Susceptibility–Resistance Table

Antibiotic	<i>Mycoplasma hominis</i> (Mh)	<i>Ureaplasma</i> spp. (Uu)
Azithromycin	 Resistant	 Susceptible (often)
Clarithromycin	 Resistant	 Susceptible (often)
Clindamycin	 Susceptible	 Resistant
Levofloxacin	 Susceptible (possible resistance)	 Susceptible (possible resistance)
Moxifloxacin	 Susceptible (strong activity)	 Susceptible (strong activity)
Doxycycline	 Susceptible (sporadic resistance)*	 Susceptible (but resistance observed in some strains)
Tetracycline	 Susceptible (classic option)	 Susceptible (resistance in some strains)

* In certain strains (not very frequent, but reported in various geographic regions), resistance to doxycycline has been observed. This is usually associated with the presence of the *tet(M)* gene, which encodes ribosomal protection proteins, resulting in reduced inhibition of protein synthesis by the drug.

Conclusion

Mh (*M. hominis*): Resistant to macrolides (Azithromycin, Clarithromycin). Main therapeutic options are Clindamycin, Doxycycline/Tetracycline, and Moxifloxacin/Levofloxacin.

Uu (*Ureaplasma* spp.): Resistant to Clindamycin. Main therapeutic options are Macrolides (Azithromycin, Clarithromycin), Tetracyclines, and Fluoroquinolones.

9. GENERAL QUALITY CONTROL CHARACTERISTICS

For the quality control of MycoTest ST Plus™, the following reference strains are used for performance testing:

Mycoplasma hominis NCTC 10111 (10^4 & 10^6 CCU/ml), *Ureaplasma parvum* ATCC 27813 (10^4 & 10^6 CCU/ml).

Regarding result accuracy, confirmation is performed by parallel culture of the strains on Mycoplasma Agar A7 (050080) plates.

To exclude false-positive results in the micro-wells, the following reference strains are used:

Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 14153, *Candida albicans* ATCC 10231

MICROBIOLOGICAL PERFORMANCE CONTROL

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	GROWTH- WELL COLOR	SUSCEPTIBILITY No growth. (Yellow–orange medium)	RESISTANCE Growth. (Red– Burgundy medium)
<i>Ureaplasma parvum</i> ATCC 27813	Growth in wells MU 10^4 & MU 10^6 . Color change to clear red–purple.	Azithromycin, Clarithromycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Doxycycline, Tetracycline	Clindamycin
<i>Mycoplasma hominis</i> NCTC 10111	Growth in wells MU 10^4 & MU 10^6 . Color change to clear red–purple.	Clindamycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Doxycycline, Tetracycline	Azithromycin, Clarithromycin
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 29213.	No growth in any well. No color change (clear yellow–orange)		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No growth in any well. No color change (clear yellow–orange)		
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC: 14153	No growth in any well. No color change (clear yellow–orange)		
<i>Candida albicans</i> ATCC: 10231	No growth in any well. No color change (clear yellow–orange)		

10. LIMITATIONS OF THE METHOD

The MycoTest ST Plus™ is a reliable, simple, and practical method; however, it has certain limitations. Possible discrepancies between the identification kit (positive result) and the susceptibility kit (unexpected results) are usually attributed to weakened mycoplasmas that did not

survive until the day of susceptibility testing. If the sample has not been preserved properly, false results may occur. Therefore, a negative result does not always exclude the presence of infection.

Only *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma spp.* grow: the method is selective for *M. hominis* and *Ureaplasma spp.* and does not allow detection of other pathogenic mycoplasmas (e.g., *Mycoplasma genitalium*). Testing is based on two concentrations per antibiotic, so the result is categorized as Susceptible (S), Intermediate (I), or Resistant (R). It does not provide an exact MIC (Minimum Inhibitory Concentration) as reference methods such as broth microdilution do.

Interpretation is visual and may be influenced by operator experience, lighting conditions, or sometimes borderline color changes. A period of 24–48 hours of incubation is required for clear results. Other molecular methods (PCR-based kits) provide faster results but do not include susceptibility testing.

The method does not detect resistance mechanisms; it only determines the phenotype (S/I/R) and not the underlying genetic resistance mechanism (e.g., tet(M), mutations in 23S rRNA or DNA gyrase). Other molecular methods (PCR, sequencing) can reveal which resistance gene is present.

The method requires viable microorganisms to demonstrate growth. If the sample has been poorly transported or preserved, false negative results may occur. Molecular kits, in contrast, can detect DNA even from non-viable organisms.

11. DISPOSAL OF MATERIALS

Materials that show no microbial growth may be considered non-hazardous waste and disposed of accordingly. Materials that show colony growth must be discarded in compliance with regulations for infectious or potentially infectious waste. The laboratory is responsible for the proper management of infectious waste according to its nature and degree of risk and must handle and dispose of it (or delegate its handling and disposal) in accordance with applicable regulations.

12. SPECIFICATIONS

Product	Code	Packaging	Storage	Shelf Life
Mycotest ST Plus™	350879	Microplates with 16 wells, 10 pieces per box	2 – 8 °C	12 months

Produced in Greece by Bioprep in accordance with Regulation (EU) 2017/746. Basic UDI-DI: 5212037714010101VY EDMA: (14 01 01 01) Dehydrated Culture Media (DCM) Bioprep is certified according to the following standards: EN ISO 9001:2015 / ELOT EN ISO 13485:2016 / DY8d/1348/2004.

13. REFERENCES

The antimicrobial susceptibility of urogenital mycoplasmas (Mycoplasma hominis and Ureaplasma spp.) varies significantly depending on the species, the geographic region, and the monitoring period. According to CLSI guidelines (M43-A, 2011), resistance evaluation is based on culture methods and antibiotic susceptibility testing (AST), while several commercial kits have been widely used for clinical diagnosis and susceptibility assessment.

M. hominis exhibits intrinsic resistance to macrolides (such as azithromycin and clarithromycin) due to differences in the 23S rRNA binding site. In contrast, it is usually susceptible to tetracyclines (doxycycline, tetracycline), lincosamides (clindamycin), and fluoroquinolones (levofloxacin, moxifloxacin), although resistant strains have been reported. On the other hand, *Ureaplasma spp.* are resistant to clindamycin but are generally susceptible to macrolides, tetracyclines, and newer fluoroquinolones.

Studies from different countries highlight increasing resistance rates to tetracyclines (mainly due to the tetM gene) and fluoroquinolones, particularly in Ureaplasma parvum strains. Moreover, molecular analyses have shown that mutations in 23S rRNA and in ribosomal proteins are associated with macrolide resistance, especially in Ureaplasma spp.

Overall, the literature emphasizes that the choice of therapeutic regimen should be based on local resistance data and on laboratory susceptibility testing of each clinical sample. Commercial AST kits provide a practical solution for rapid and clinically useful evaluation of susceptibility, although they do not replace standardized reference methods or molecular analysis of resistance mechanisms.

- Pereyre S, Gonzalez P, de Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, Bébér C. French prospective clinical evaluation of the MYCO WELL D-ONE assay for detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*. J Clin Microbiol. 2020;58(12):e01392-20. doi:10.1128/JCM.01392-20.
- Bébér C, Renaudin H, Charron A, Clerc M, Pereyre S. Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*: comparison of commercial microdilution plates with the CLSI reference method. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(7):e00418-18. doi:10.1128/AAC.00418-18.
- Boudinot C, Lelièvre L, Bébér C. Evaluation of the Mycoplasma Duo Kit for detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from urogenital and placental specimens. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1596-1599. doi:10.1128/JCM.02405-06.
- Bébér C, de Barbeyrac B. Genital mycoplasmas: accurate diagnosis and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2009;15(6):538-546. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02855.x.
- CLSI. Susceptibility Testing of Mycoplasmas, Approved Guideline M43-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):757-789. doi:10.1128/CMR.18.4.757-789.2005.
- Viscardi RM. *Ureaplasma* species: role in neonatal morbidities and outcomes. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2014;99(1):F87-F92. doi:10.1136/archdischild-2012-303351.
- Glass JI, Pereyre S, Cassell GH, Bébér C. *Ureaplasma* infection in preterm infants: current concepts and new perspectives. Clin Microbiol Infect. 2018;24(2):123-130. doi:10.1016/j.cmi.2017.08.003.
- Kacerovsky M, Musilova I, Hornychova H, Kutova R, Pliskova L, Kostal M, Jacobsson B. *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* intra-amniotic infection in women with preterm prelabor rupture of membranes. PLoS One. 2014;9(6):e102408. doi:10.1371/journal.pone.0102408.
- Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of ureaplasmas and mycoplasmas in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. J Mol Diagn. 2012;14(5):437-450. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.06.001.
- Bebear C, Kempf I. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance of mycoplasmas of humans. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):703-711. doi:10.1128/CMR.18.4.703-711.2005.
- Xiao L, Crabb DM, Duffy LB, Paralanov V, Glass JI, Robertson JA, Cassell GH, Waites KB. Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human *Ureaplasma spp.* Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(10):4638-4641. doi:10.1128/AAC.00329-11.
- Fernández J, Fernández O, García B, García S, Llana J. Antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*: a 3-year study in Asturian hospitals. Rev Esp Quimioter. 2016;29(5):242-248.
- Kletzel A, Kenyon C, Cools P, Crucitti T, Jaspers V. Antimicrobial susceptibility of genital *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species: a systematic review. Sex Transm Infect. 2022;98(7):489-496. doi:10.1136/sxtrans-2021-055210.

14. IN VITRO MANUFACTURER'S DATA



G. PAPANIKOLAOU & CO

PRODUCTION LABORATORIES OF CULTURE MEDIA

Potamou 5, Industrial Area Keratea, Attica

P.O. Box: 4893, Postal Code: 19001 - Tel: +30 2299066113. Fax: +30 2299066112

E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprepare.gr