

FIG. 1. Transmission electron micrograph of *M. genitalium* negatively stained with ammonium molybdate. The characteristic flask shape and the terminal truncated portion with extracellular small projections are shown. The organism size is presented in the text (original magnification,  $\times 120,000$ ). (Reprinted from reference 222.)



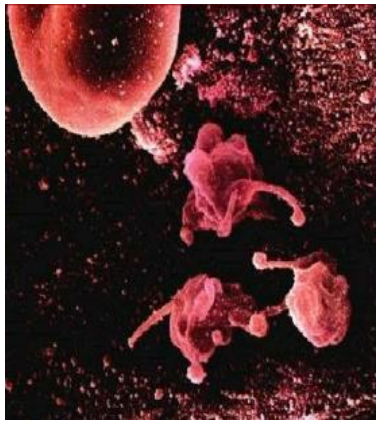
David Taylor - Robinson

## Λοιμώξεις από Μυκοπλάσματα των γεννητικών οργάνων Αληθές παθογόνο ;

Γιώργος Κατσαρός  
Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας  
Εργαστήριο Βιοπαθολογίας

Αρεταίειο Νοσοκομείο

# Genital Mycoplasmas



ΤΑΞΗ Mollicutes (soft skin)

Ιατρική σημασία → οικογένεια Mycoplasmataceae

Γενος: *Mycoplasma*

(114 είδη)



- *M. hominis* + (1937)
- *M. Fermentans* + (1952)
- *M. genitalium* + (1981)
- *M. pirum* ? (1985)
- *M. penetrans* ? (1991)
- *M. spermatophilum* ? (1991)

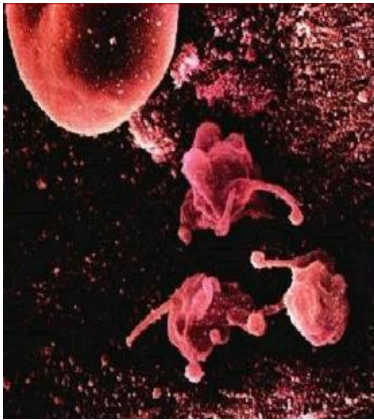
Γενος: *Ureaplasma*

(6 είδη → υδρόλυση ουρίας)



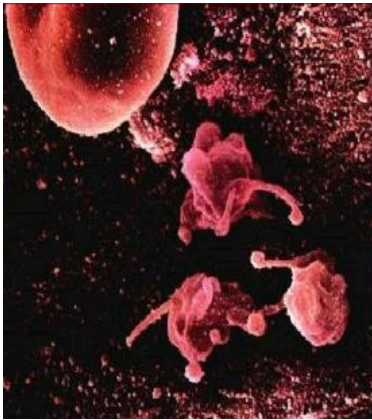
- *U. urealyticum* +
  - *U. parvum* +
- 1954 } Διαχωρισμός  
2002

## Genital Mycoplasmas - Μικροβιολογία



- Οι μικρότεροι προκαρυωτικοί οργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια χωρίς την παρουσία ευκαρυωτικών κυττάρων
- Απαιτούν πλούσια θρεπτικά υλικά (ορός αίματος: ζωϊκές πρωτεΐνες, χοληστερίνη – κορεσμένα, ακόρεστα λιπαρά οξέα )
- Δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα
- Ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά που στοχεύουν το κυτταρικό τοίχωμα (β-lactams)
- Το *M.genitalium* έχει το μικρότερο γένωμα που έχει ως τώρα κωδικοποιηθεί (580kbp) <500 γονίδια
- Ο Craig Venter και συνεργάτες συνέθεσαν in vitro το γένωμα δημιουργώντας το πρώτο βακτηριακό κύτταρο με γενετικό υλικό φτιαγμένο στο εργαστήριο

## Genital Mycoplasma



- *M. genitalium*: επιπολασμός 1% - 4% σε σεξουαλικά ενεργούς ♂
- *M. genitalium*: επιπολασμός 1% - 6,5% σε σεξουαλικά ενεργές ♀
- ***M. genitalium*: επιπολασμός 4% - 38% σε κέντρα STI**

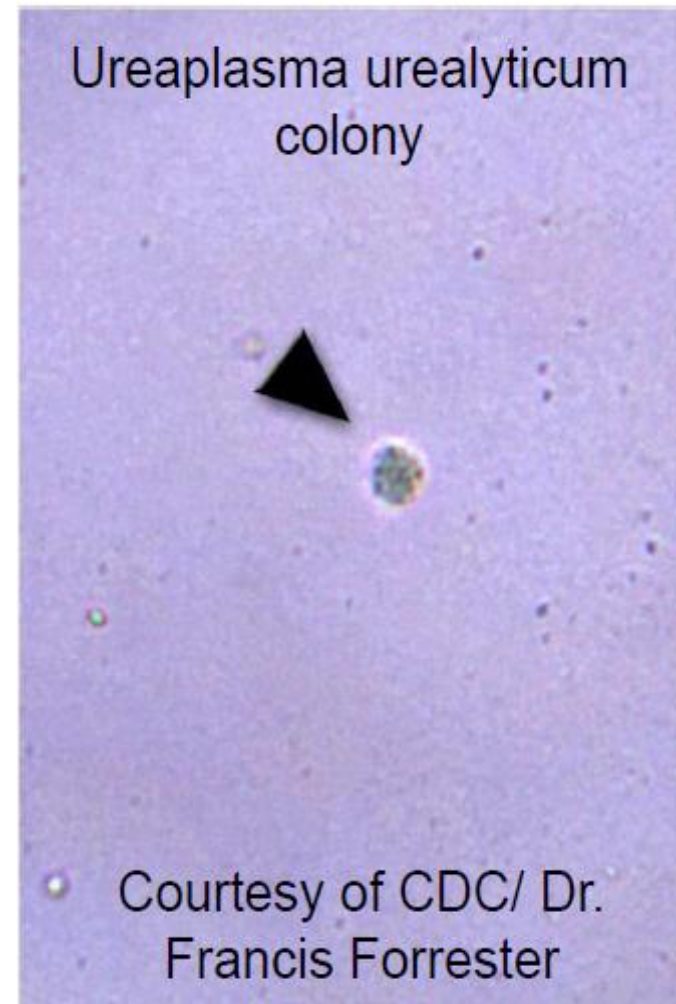
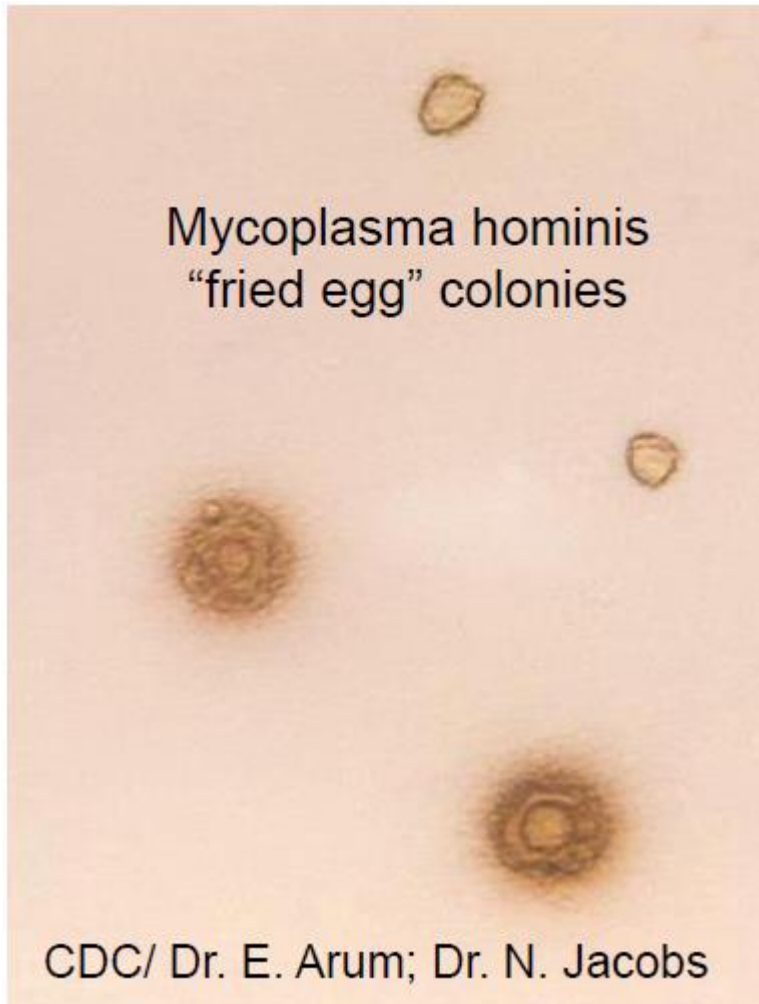
- Ureaplasmas: επιπολασμός 40 – 80 % σε σεξουαλικά ενεργές ασυμπτωματικές γυναίκες
- Ureaplasmas: επιπολασμός 20 – 45 % σε σεξουαλικά ενεργούς άνδρες

ΦΧ ?

- *M. hominis*: επιπολασμός 20-50 % σε σεξουαλικά ενεργές ασυμπτωματικές γυναίκες
- *M. hominis*: επιπολασμός 2-10 % σε σεξουαλικά ενεργούς άνδρες

## Μετάδοση

- Γεννητική επαφή
- Στοματογεννητική επαφή
- Κάθετα από μητέρα στο νεογνό



# Κλινικές εκδηλώσεις

## *M. hominis*

Species	Disease associations <sup>a</sup>						
	Urethritis	Cervicitis	Bacterial vaginosis	Endometritis and/or PID	Preterm birth	Infertility (Women)	HIV transmission
<i>M. hominis</i>	–	–	++++	+/-	+/-	–	ND

ND, not determined; PID, pelvic inflammatory disease.

<sup>a</sup> +++++ strong association, +++ association in most studies, + association only from a few studies, +/- conflicting results.

Κλινικές εκδηλώσεις  
*M. hominis*  
Κυρίως λοιμώξεις στις ♀

♀ **Δεν προκαλεί τραχηλίτιδα**

- ♀ Ισχυρή συσχέτιση με βακτηριακή κολπίτιδα επι εδάφους αναεροβίων μικροοργανισμών (*Gardnerella vaginalis* + ...) ή παρασίτων (πολλαπλασιάζεται σε κύτταρα *Trichomonas vaginalis*)
- ♀ Πιθανή συμμετοχή σε ενδομητρίτιδα και φλεγμονώδη νόσο της πυέλου (PID) σαν δευτερεύον αίτιο
- ♀ Πιθανή εμπλοκή σε μηνιγγίτιδα ελλειποβαρών πρόωρων βρεφών λόγω κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα κατά τον τοκετό.
- ♀ Αντικρουόμενες μελέτες για πρόκληση πρόωρου τοκετού
- ♀ Δεν υπάρχει συσχέτιση με γυναικεία στειρότητα
- ♂ Αντικρουόμενες μελέτες για την ανδρική στειρότητα
- ♂ ♀ **Δεν προκαλεί ουρηθρίτιδα**

# Κλινικές εκδηλώσεις

## *Ureaplasma spp*



*U. urealyticum*      *U. parvum*

Species	Disease associations <sup>a</sup>						
	Urethritis	Cervicitis	Bacterial vaginosis	Endometritis and/or PID	Preterm birth	Infertility (Women)	HIV transmission
Ureaplasmas (undifferentiated)	+/-	-	+++	ND	+	+/-	ND
<i>U. urealyticum</i>	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>U. parvum</i>	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, not determined; PID, pelvic inflammatory disease.

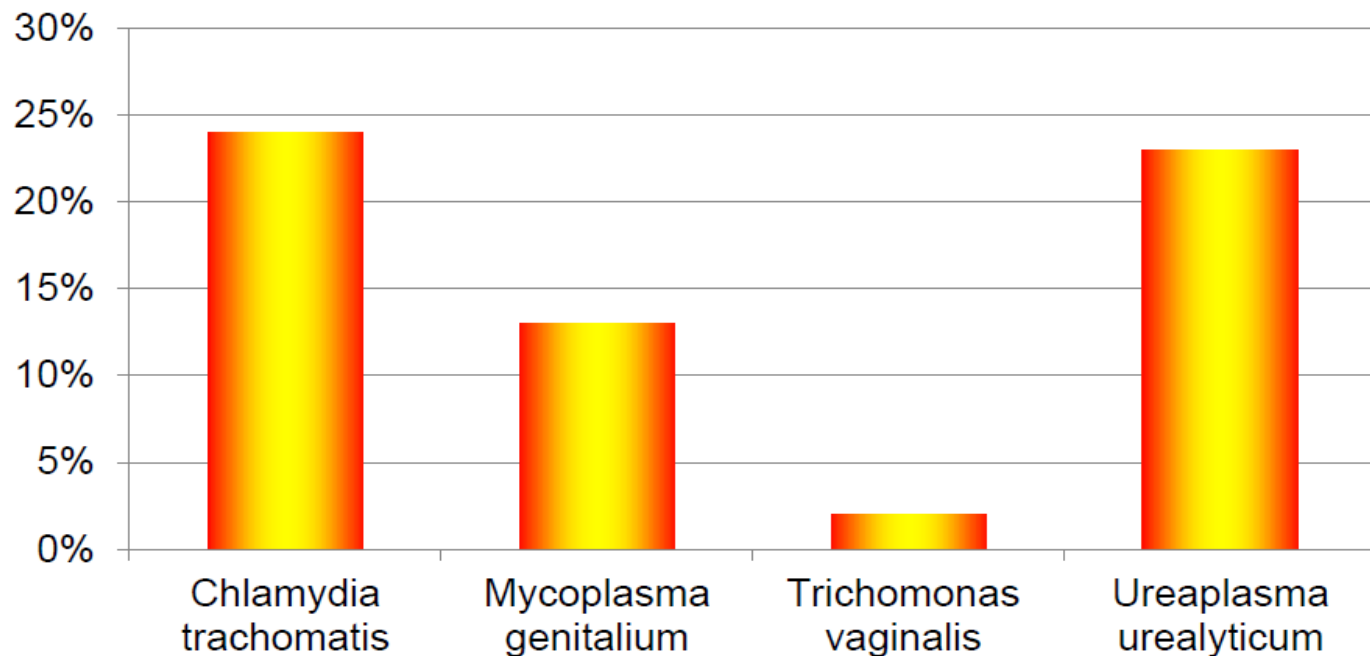
<sup>a</sup> ++++ strong association, +++ association in most studies, + association only from a few studies, +/- conflicting results.

# Κλινικές εκδηλώσεις *Ureaplasma spp.*

- ♂ Πιθανό αίτιο μη γονοκοκκικής ουρηθρίτιδας (NGU), κυρίως το *U. urealyticum*

## NGU Causes

606 males  $\geq 16$  years, attending a sexually transmitted diseases clinic in Seattle



# Κλινικές εκδηλώσεις *Ureaplasma spp.*

- ♂ Αδιευκρίνιστος ρόλος σε προστατίτιδα – επιδιδυμίτιδα
- ♂ Συσχέτιση με ανδρική στειρότητα

**Table 2** The prevalence of *U. urealyticum* infection in male infertility in the world and in China

<i>U. urealyticum</i>	Infertile group	Control group
	China	China
Positive case	82	28
Sample size	418	336
Positive rate <sup>a</sup>	19.6%	8.3%

<sup>a</sup>Infertile group between China and the world:  $\chi^2 = 21.513$ ,  $p < 0.001$ . Control group between China and the world:  $\chi^2 = 8.469$ ,  $p = 0.004$ . Between infertile and control groups in the world:  $\chi^2 = 3.056$ ,  $p = 0.080$ . Between infertile and control groups in China:  $\chi^2 = 19.034$ ,  $p < 0.001$ .

# Κλινικές εκδηλώσεις *Ureaplasma spp.*

- ♀ Ισχυρή συσχέτιση με κολπίτιδες.  
Καμμία συσχέτιση με τραχηλίτιδα – ενδομητρίτιδα – PID  
Μόλυνση εμβρύου ενδομητρίως ή κατά τον τοκετό μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρο τοκετό – πνευμονία – βακτηραιμία – μηνιγγίτιδα
- Αδιευκρίνιστος ρόλος σε ♀ στείρωση
- ♀ ♂ Διερευνάται η συσχέτιση σε περιστατικά ενεργούς αρθρίτιδος

# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

Species	Disease associations <sup>a</sup>						
	Urethritis	Cervicitis	Bacterial vaginosis	Endometritis and/or PID	Preterm birth	Infertility (Women)	HIV transmission
<i>M. genitalium</i>	++++	+++	–	+++	+/-	+	+

ND, not determined; PID, pelvic inflammatory disease.

<sup>a</sup> +++++ strong association, +++ association in most studies, + association only from a few studies, +/- conflicting results.

# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

- Ισχυρή συσχέτιση με acute NGU 15-25%

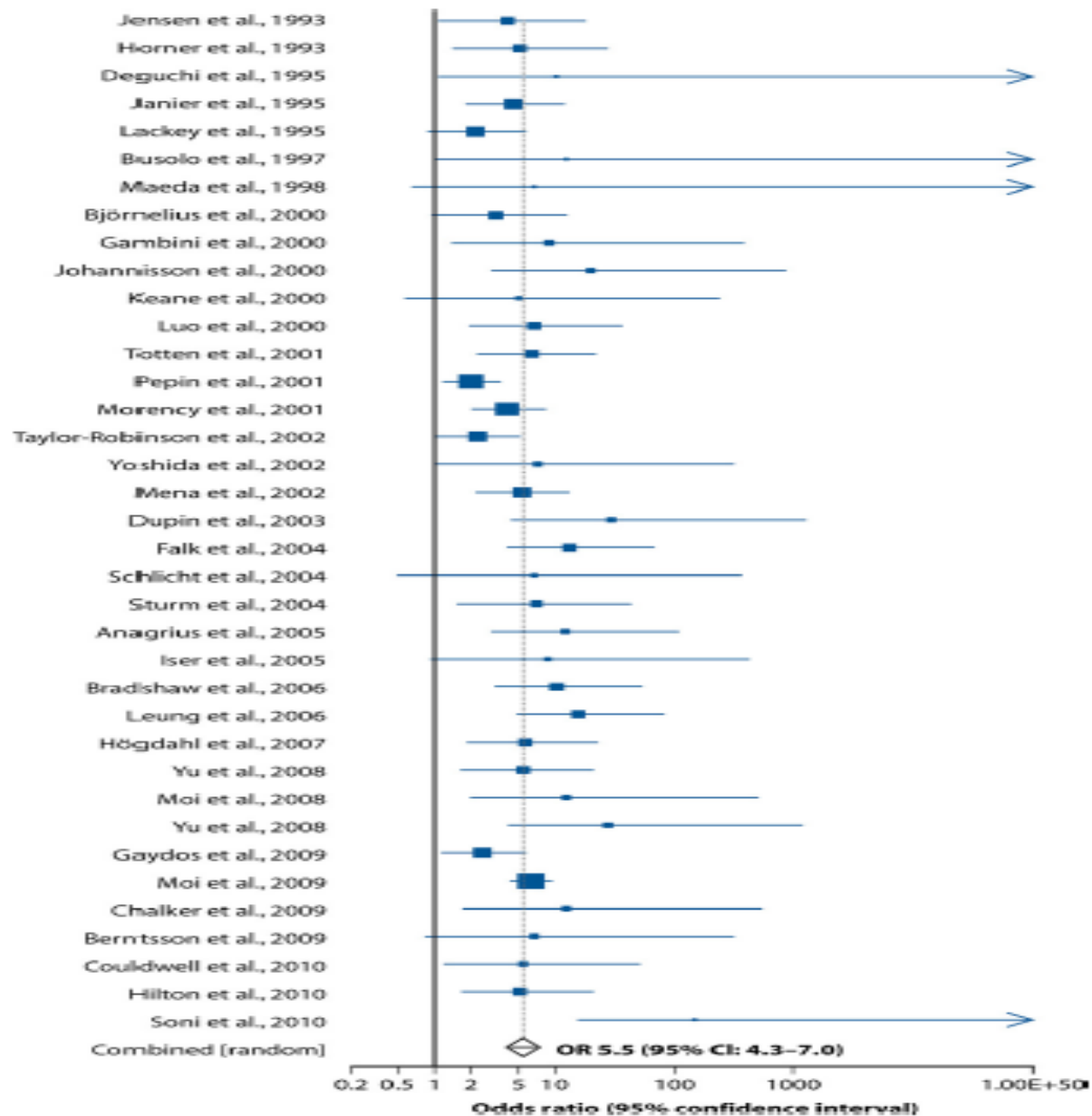


FIG. 2. Association between *M. genitalium* and acute NGU in men. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated from published studies of PCR positivity. References correspond to reference numbers 2, 9, 14, 19, 21, 24, 30, 35, 40, 47, 55, 58, 74, 80, 84, 92, 95, 105, 108, 113, 118, 120, 128, 133, 144, 147, 149, 153, 164, 176, 182, 185, 211, 217, 232, 234, and 235.

# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

- Ισχυρότατη συσχέτιση με acute nonchlamydia NGU 25-35%

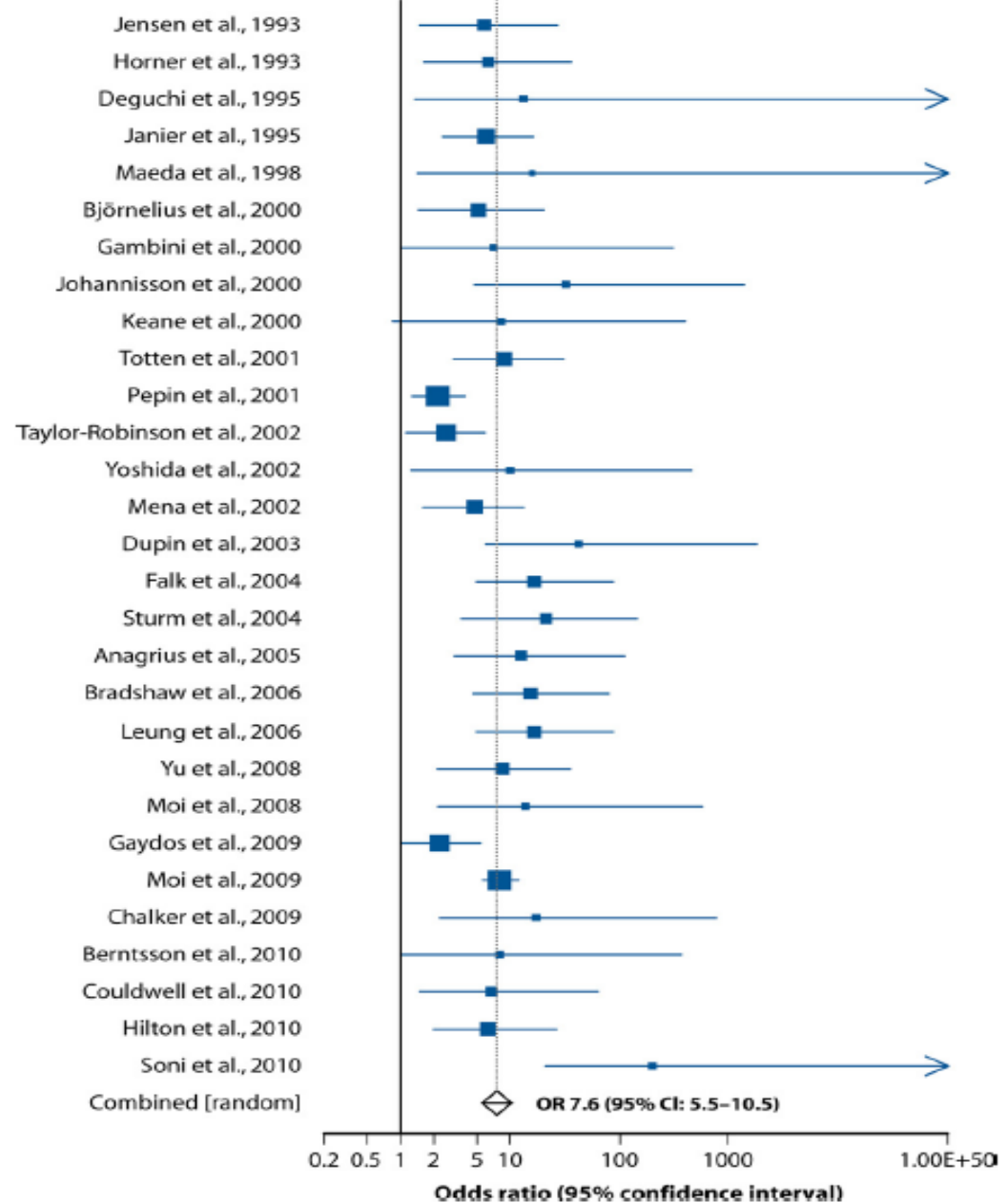


FIG. 3. Association between *M. genitalium* and acute nonchlamydial NGU. Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated from published studies of PCR positivity. References correspond to reference numbers 2, 9, 14, 19, 24, 30, 35, 40, 47, 55, 58, 74, 84, 95, 105, 108, 113, 120, 133, 144, 147, 149, 164, 182, 185, 211, 217, 232, and 235.

# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

TABLE 2. Fulfillment of criteria required to determine whether *M. genitalium* or *C. trachomatis* causes NGU<sup>a</sup>

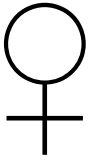
Criterion	Fulfillment of criterion for:	
	<i>M. genitalium</i>	<i>C. trachomatis</i>
Detection significantly more often than in controls for:		
Acute NGU	++++	++++
Chronic NGU	+++	+
Homosexual NGU	+++	+++
Larger no. of organisms than in controls	+++	++
Antibody titers and responses more often than in controls	+	++
Effective microbiological and clinical response to therapy	++++	++++
Reproduction of disease in inoculated subhuman primates	++++	+++
Reproduction of disease in inoculated human volunteers	ND	ND
Wide geographic involvement	++++	++++
Disease prevented by natural or exptl immunity	ND	+

<sup>a</sup> +++++, excellent; +++, good; ++, moderate; +, poor; ND, not determined. The second to eighth criteria relate mainly to acute NGU.



# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

- Ισχυρή συσχέτιση με εμμένουσα ή υποτροπιάζουσα NGU
- Ανευρίσκεται στο 40% των ♂ με χρόνια ουρηθρίτιδα μετά από θεραπεία με doxycycline και τελευταία με azithromycin
- Συσχέτιση με βαλανοποσθίτιδα
- ? Χρόνια αβακτηριακή προστατίτιδα
- ? Οξεία επιδιδυμίτιδα – πρωκτίτιδα
- ? Αίτιο ανδρικής υπογονιμότητας



# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

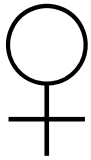
- Ανευρίσκεται: κόλπο – τράχηλο – ενδομήτριο

## Μη γονοκοκκική ουρηθρίτιδα (NGH)

- Συσχέτιση βασισμένη κυρίως στην εμπειρία Σκανδιναβικών κρατών  
Απαιτείται έρευνα για την διερεύνηση πρόκλησης συμπτωματικής –  
ασυμπτωματικής πυουρίας και ουρηθρικού συνδρόμου

## Κολπίτιδα

- Στις περισσότερες μελέτες δεν υπάρχει συσχέτιση
- Μόλυνση in vitro σε επιθηλιακά κολπικά κύτταρα



# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium* --- ΤΡΑΧΗΛΙΤΙΔΑ

Τ<sub>1</sub>

- Δεν υπάρχει σαφής ορισμός για την τραχηλίτιδα (ερύθημα-αιμορραγία κατά τη λήψη δείγματος – αριθμός PMNL(10-30) – βλεννοπυώδες έκκριμα)
- Υπάρχει συσχέτιση *M.genitalium* – τραχηλίτιδος
- Επιπολασμός σε γυναίκες με τραχηλίτιδα 10% - 30%

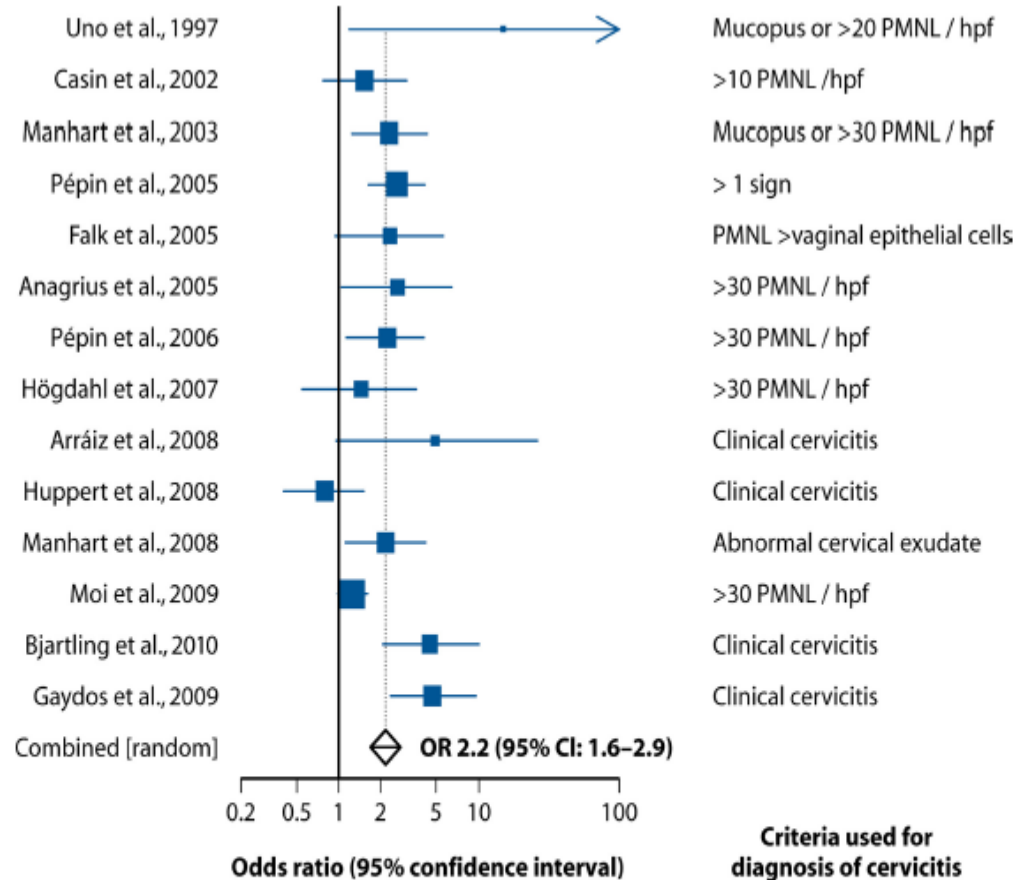
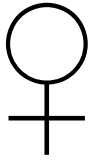


FIG. 5. Association between *M. genitalium* and cervicitis. Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated from published studies of PCR positivity. hpf, high-power field. References correspond to reference numbers 2, 4, 11, 23, 48, 57, 80, 89, 137, 139, 148, 163, 165, and 225.



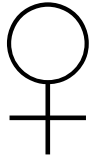
## Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

### Φλεγμονώδης νόσος πυέλου (PID) ενδομητρίτιδα - σαλπιγγίτιδα

- Ισχυρή συσχέτιση με οξεία ενδομητρίτιδα (ιστολογικώς επιβεβαιωμένη)
- 58 γυναίκες Ο.Ε. → 9 (16%) *M.genitalium* (+)
- 57 γυναίκες control → 1 (2%) *M.genitalium* (+)
- Ασθενής συσχέτιση με σαλπιγγίτιδα στις γυναίκες  
ΌΜΩΣ  
Πρόκληση σαλπιγγίτιδας σε πειραματόζωα (πίθηκος)
- Ανεύρεση αντισωμάτων έναντι του *M. genitalium* σε 1/3 ♀ με οξεία PID.

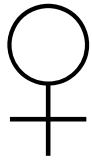
## ΤΕΛΙΚΑ

Το *M. genitalium* θεωρείται αιτίο πρόκλησης PID



# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*

- Δεν υπάρχει συσχέτιση με έκτοπη κύηση
- Διερεύνηση του ρόλου σε πρόωρο τοκετό



# Κλινικές εκδηλώσεις *M. genitalium*



## Στειρότητα

- Ικανότητα προσκόλλησης σε σπερματοζωάρια (κεφαλή – μέσον – ουρά) in vitro
- Σε υψηλούς αριθμούς μειώνουν κινητικότητα
- Μολυσμένα σπερματοζωάρια μεταφέρουν τον μικροοργανισμό στο ♀ αναπαραγωγικό σύστημα
- Γυναίκες με Tubol factor infertility (TFI) έχουν αντισώματα έναντι *M. genitalium* σε ποσοστό 17% - 22% έναντι ποσοστού 4% - 6% control

TABLE 4. Relationship between *M. genitalium* and disease compared with *M. hominis* and *Ureaplasma* spp.<sup>a</sup>

Condition	<i>M. genitalium</i>		<i>M. hominis</i>		<i>Ureaplasma</i> spp.	
	A	C	A	C	A	C
NGU						
Acute	++++	++++	—		+++	+++
Chronic	+++	+++	—		—	
Balanoposthitis	+++	++	—		—	
Chronic prostatitis	+	+	—		—	
Epididymitis	++	++	+	—	++	++
Reiter's disease/ SARA	++	+	—		++	++
BV	++	—	++++	+	+++	±
Cervicitis	+++	+++	—		—	
Infertility	++	++	—		++	—
Ectopic pregnancy	+	?	+	—	+	—
PID	+++	+++	+++	++	+	—
Postpartum fever	NE		+++	+++	++	—
PTB	++	+	++	—	+++	++
Neonatal conjunctivitis	NE		—		—	
Neonatal respiratory disease	NE		+	?	+++	++

<sup>a</sup> Shown are the chances of the indicated mycoplasma being associated with (A) or causing (C) the conditions shown in the left-hand column. +++++, overwhelming; +++, good; ++, moderate; +, small; —, nil; NE, not examined; ?, not certain.

# Παθογένεια (αφορά κυρίως το *M. genitalium*)

- Πρωτεΐνες κυρίως η MgPa παίζουν πρωτεύοντα ρόλο για την προσκόλληση στα ευκαρυωτικά κύτταρα.
- Μελέτες δείχνουν ισχυρή προσκόλληση σε γυάλινες – πλαστικές επιφάνειες – επιθηλιακά κύτταρα – σπερματοζωάρια – ερυθροκύτταρα
- Πιθανόν οι υποδοχείς να είναι long – chain sialo – oligosaccharides.
- Ύπαρξη επαναλαμβανόμενων DNA αλληλουχιών με ομολογία προς το γονίδιο MgPa adhesin δίνει ποικιλία πρωτεϊνών με αντιγονικούς επιτόπους που ξεγλιστρούν από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή
- Στη φάση του πολλαπλασιασμού η διχοτόμηση του κυτταροπλάσματος δεν συγχρονίζεται πάντα με τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού με αποτέλεσμα κάποια κύτταρα να στερούνται επαρκές γενετικό υλικό και να καθίστανται ανίκανα για διπλασιασμό και για προσκόλληση σε ευκαρυωτικά κύτταρα
- Μετά την προσκόλληση ο μικροοργανισμός εισέρχεται στο κύτταρο του ξενιστή
- Πιθανόν η νουκλεάση MG-186 δίνει τη δυνατότητα στο *M. genitalium* να κατακερματίζει το DNA του ξενιστή σε νουκλειικά οξέα προκειμένου να τα χρησιμοποιήσει ως πρόδρομα νουκλεοτίδια για δική του ανάπτυξη.

# *M. hominis* / *U. urealyticum* / *U. parvum*\*

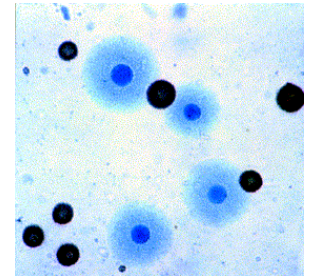
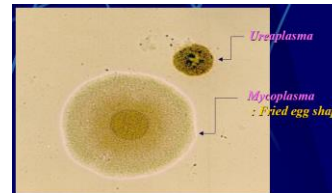
## Εργαστηριακή διάγνωση

- Η λήψη κολπικών, τραχηλικών και ουρηθρικών δειγμάτων: πάντα με **πλαστικό στυλεό** και τοποθέτηση σε υλικό μεταφοράς και συντήρησης (1 ml Hanks) **αφήνοντας το στυλεό μέσα στο σωληνάριο**. Το ίδιο με σπέρμα, προστατικό υγρό και ίζημα ούρων.
- Συντήρηση δειγμάτων: μέχρι 48 h στους 2-8°C.
- καλλιέργεια μόνο για *Uu* και *Mh*
- μοριακές τεχνικές: PCR
- Διαχωρισμός μόνο με NAATs - mass spectrometry

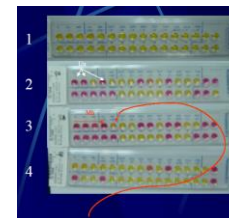
# Μυκοπλάσματα

## Εργαστηριακή διάγνωση

- οι καλλιέργειες γίνονται σε 2 είδη θρεπτικών υλικών:
  - στερεό : DNA-PPL0 άγαρ για την κ/α του Μh ή A7 - Μh και Uu (37°C, 5-10% CO<sub>2</sub>, 48 h)
  - υγρό: στο υλικό Hanks, μετά τον εμβολιασμό του άγαρ, προσθέτουμε ισόποση ποσότητα (800 μl ζωμός ουρίας - ορός ίππου, ουρία, αντιβιοτικά και Phenol Red → αλλαγή του pH\*) και επωάζονται αεροβίως για 24-48 h στους 37°C.
- Για το Uu τα υλικά πρέπει να περιέχουν ουρία και για το Μh, αργινίνη.



- οι αποικίες του Uu είναι μικρές και μαύρες, ενώ του Μh «σαν αυγά μάτια»
- υπάρχουν στο εμπόριο έτοιμα κιτ



Negative culture



Positive culture

\* η μετατροπή του χρώματος από κίτρινο σε κόκκινο γίνεται λόγω αλκαλοποίησης του θρεπτικού υλικού από την αμμωνία που παράγεται κατά τη διάσπαση της ουρίας, αργινίνης

# Mycoplasma HUF

10 test. Cat no 100339. - GR/CA01/GRM5/O/74.



Για την εργαστηριακή διάγνωση των ουρογεννητικών Μυκοπλάσμάτων *M. hominis*, *U. urealyticum* & *M. fermentans*.  
Περιλαμβάνει: 1) Το *M. U-A*, για τον εμβολιασμό του δείγματος. 2) Το MYCOTEST, για την ταυτοποίηση (βιοχημική) και ημιοσοτικό προσδιορισμό. 3) Το MYCOTEST AGAR, για την καλλιέργεια, ταυτοποίηση (μικροσκοπική) και αρίθμηση.



**1. M. U-A** 10 test  
Εμβολιασμός του δείγματος.



**2. MYCOTEST** 10 test  
Ταυτοποίηση (βιοχημική)  
και ημιοσοτικός προσδιορισμός.



**3. MYCOTEST AGAR** 10 test  
Καλλιέργεια, ταυτοποίηση  
(μικροσκοπική) και αρίθμηση.

## ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

### 1. Εμβολιάστε το δείγμα στο M. U-A.

Σε δείγματα από στελεό εμβαπτίστε με περιστροφές του στελεαού.  
Σε υγρά δείγματα ρίξτε 200μl.  
Τα ούρα πρέπει να φυγοκεντρώνται.



### 2. Ρίξτε 100μl σε κάθε σωληνάριο του MYCOTEST και 10μl στο MYCOTEST AGAR.



### 3. Κλείστε τα πώματα και επώαστε στους 36 - 37 °C σε αερόβιες συνθήκες για 24 – 48 ώρες. Το MYCOTEST AGAR πρέπει να τοποθετείται ανάποδα.



### 4. Φυλάξτε το εμβολιασμένο M. U-A στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι να ολοκληρωθεί η εξέταση.



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Comparison of the new Mycofast Revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens

Mathys J Redelinghuys<sup>1\*†</sup>, Marthie M Ehlers<sup>1,2†</sup>, Andries W Dreyer<sup>1,2†</sup>, Hennie A Lombaard<sup>3</sup> and Marleen M Kock<sup>1,2†</sup>

## Abstract

**Background:** Genital mycoplasmas are opportunistic bacteria that are associated with undesirable gynaecologic and reproductive events. Mycoplasmas are fastidious bacteria with increasing resistance to routine antimicrobials and often fail to grow on conventional culture methods. The commercial Mycofast Revolution assay permits the phenotypic detection and identification of genital mycoplasmas. Antimicrobial susceptibility testing against five antimicrobial agents with MICs corresponding to the CLSI guidelines can also be performed. This study aimed to compare the new commercially available Mycofast Revolution assay with a multiplex PCR assay.

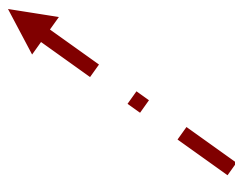
**Methods:** Self-collected swabs were obtained from pregnant women attending the antenatal clinic of a tertiary academic hospital in Pretoria, South Africa from October 2012 to November 2012. These swabs were used to seed UMMt and modified Amies transport media. The seeded UMMt transport medium was used to inoculate the Mycofast Revolution assay for the identification, enumeration and antimicrobial susceptibility testing of genital mycoplasmas. Following DNA extraction from the modified Amies transport medium, specimens were subjected to a multiplex PCR assay for the detection of genital mycoplasmas.

**Results:** The Mycofast Revolution kit had a sensitivity and specificity of 77.3% (95% CI: 62.15% to 88.51%) and 80% (95% CI: 28.81% to 96.70%), respectively, against the PCR assay. The positive and negative predictive values were 97.1% (95% CI: 85.03% to 99.52%) and 28.6% (95% CI: 8.57% to 58.08%). Genital mycoplasmas were detected in 71.4% (35/49) of samples with the Mycofast Revolution assay with 49% (24/49) being *Ureaplasma* spp. and 22.4% (11/49) mixed strains. The multiplex PCR assay had a positivity rate of 89.8% (44/49) for genital mycoplasmas; mixed strains were present in 51% (25/49) of samples, *Ureaplasma* spp. in 16.3% (8/49) and *M. hominis* in 22.4% (11/49) of samples.

**Conclusions:** There was a fair agreement ( $\kappa = 0.319$ ) between the Mycofast Revolution assay and the mPCR assay. With the high prevalence rates of genital mycoplasmas, fast and efficient diagnostic methods are imperative to treat infections and minimise complications. The Mycofast Revolution assay is simple to use, has a short turnaround time and interpretation of results are straightforward. This assay circumvents common problems experienced with conventional culture and molecular methods in diagnostic laboratories where skilled personnel are limited and can be used as an alternative diagnostic assay.

**Keywords:** *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp, Mycofast, Antimicrobial susceptibilities, Multiplex PCR assay

Mycofast Se = 77.3 %  
Sp = 80.0 %  
Against PCR





**Reading and interpretation** at 24 hrs and 48 hrs, except for *Ureaplasma* spp.  $\geq 10^4$ CFU/specimen (reading at 24 hrs only).

**Identification and enumeration : strip**



**Negative control at 24 hrs**  
 (= absence of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis*) :  
 do not read the strip – re-incubate for 24 hrs.



Presence of *M. hominis* <  $10^4$ CFU/specimen

**Detection : R1+R2**



Presence of *M. hominis*  $\geq 10^4$ CFU/spec.



Presence of *Ureaplasma* spp. <  $10^4$ CFU/spec.

**Examples of combinations**



Presence of *Ureaplasma* spp.  $\geq 10^4$ CFU/spec.  
 (reading at 24 hrs only).



Presence of *Ureaplasma* spp. <  $10^4$ CFU/spec.  
 and *M. hominis* <  $10^4$ CFU/spec.



Presence of *Ureaplasma* spp.  $\geq 10^4$ CFU/spec.  
 and *M. hominis* <  $10^4$ CFU/spec.

**Susceptibility tests - 9 antibiotics**

Example :

	DOT 4	JOS 2	OFL 1	ERY 1	TET 4	CIP 1	AZI 0,12	CLA 1	PRI 2
<b>c</b>	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Pink	Yellow	Yellow	Yellow
<b>C</b>	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Pink	Yellow	Yellow	White
<b>c</b>	-	-	+	-	-	+	-	-	-
<b>C</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>

c = low concentration C = high concentration

Growth Control (O)	Yellow	-	Do not read, re-incubate for 24 hrs
	Pink	+	Positive control
<b>IDENTIFICATION</b>	Yellow	-	Absence of <i>Ureaplasma</i> spp. and/or <i>M. hominis</i>
Uu $\pm$ Mh	Pink	+	Presence of <i>Ureaplasma</i> spp. and/or <i>M. hominis</i>
<b>ENUMERATION</b>	Yellow	-	Presence of <i>U. Ureaplasma</i> spp. and/or <i>M. hominis</i> < $10^4$ CFU/spec.
Uu $\geq 10^4$ $\pm$ Mh $\geq 10^4$	Red	+	Presence of <i>U. Ureaplasma</i> spp. and/or <i>M. hominis</i> < $10^4$ CFU/spec.
<b>SUSCEPTIBILITY TESTS</b>	Yellow	-	No growth
DOT 4, 8... through to PRI 2	Red	+	Growth
		<b>c C</b>	
Interpretation for each antibiotic	-	-	Susceptible Strain (S)
	+	-	Intermediate Strain (I)*
	+	+	Resistant Strain (R)

\* No "Intermediate result" for Pristinamycin.

# Diagnostic methods for *M. genitalium*

- Η διάγνωση *M. genitalium* περιορίζεται στη χρήση μεθοδολογιών NAATs
- Η καλλιέργεια απαιτεί αρκετούς μήνες >3
- Δεν υπάρχουν ορολογικές δοκιμασίες, δοκιμασίες ανίχνευσης αντιγόνου – roc tests χρήσιμα για τη διάγνωση

**WHO: NAATs is the only practical method for diagnosis of *M. genitalium***



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)



# Performance of Anyplex<sup>TM</sup> II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods



Hyun-Sop Choe<sup>a</sup>, Dong Sup Lee<sup>a</sup>, Seung-Ju Lee<sup>a</sup>, Sung-Hoo Hong<sup>b</sup>, Dong Choon Park<sup>c,\*</sup>,  
Mi-Kyung Lee<sup>d</sup>, Tae-Hyoung Kim<sup>e</sup>, Yong-Hyun Cho<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Department of Urology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Suwon, Korea

<sup>b</sup> Department of Urology, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

<sup>c</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, 93-6 Ji-dong, Paldal-gu, Suwon, 442-723, Korea

<sup>d</sup> Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

<sup>e</sup> Department of Urology, Chung-Ang University Hospital, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

<sup>f</sup> Department of Urology, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea

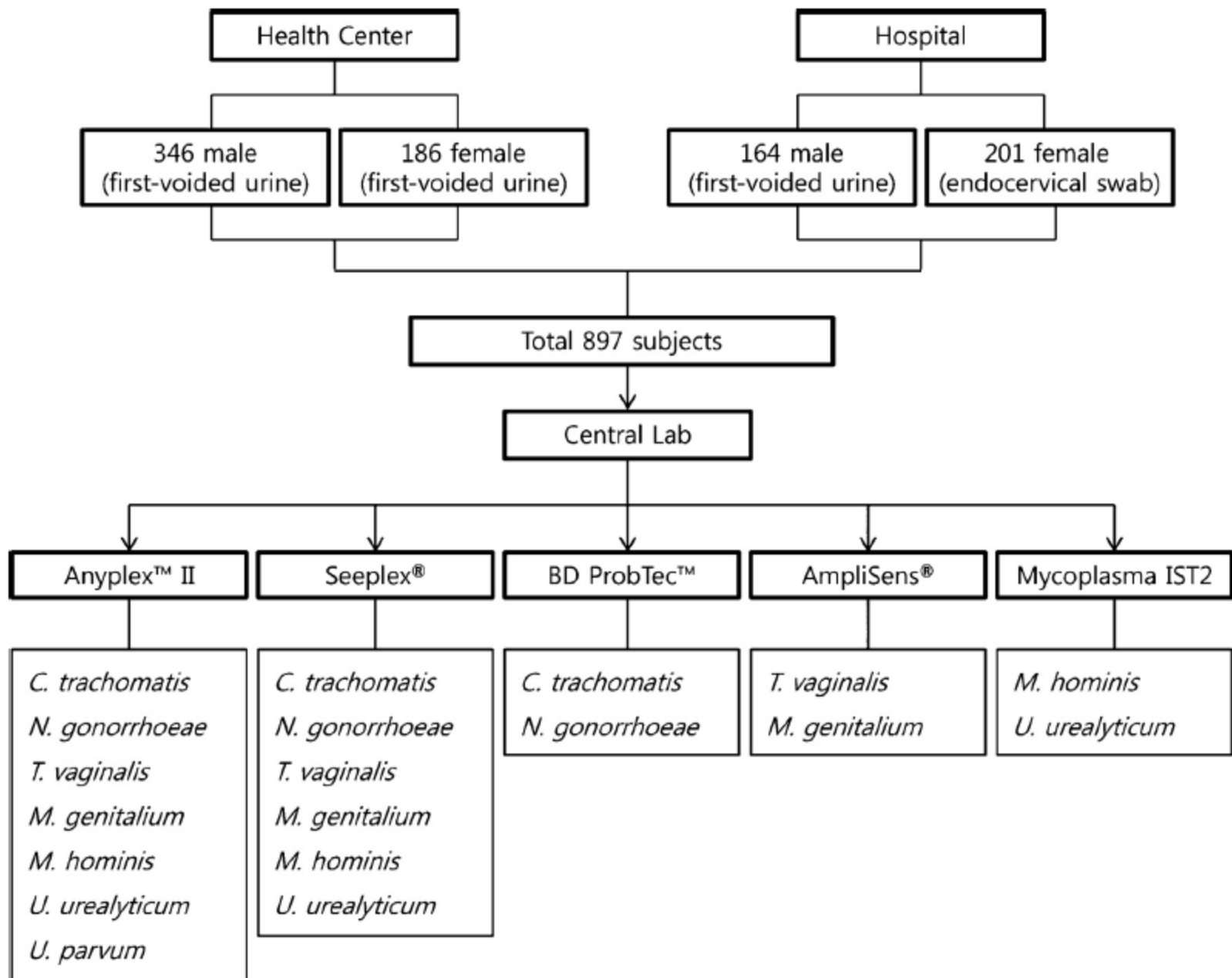


Figure 1. Flow chart showing the population and samples in the study.

# DNA Microarray Characterization of Pathogens Associated with Sexually Transmitted Diseases

Boyang Cao<sup>1,2,3,4</sup>, Suwei Wang<sup>1,2,3,4</sup>, Zhenyang Tian<sup>1,2,3,4</sup>, Pinliang Hu<sup>3,4</sup>, Lu Feng<sup>1,2,3,4</sup>, Lei Wang<sup>1,2,3,4</sup>\*

**1** Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology of the Ministry of Education, TEDA College, Nankai University, Tianjin, P. R. China, **2** TEDA Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Nankai University, Tianjin, P. R. China, **3** Tianjin Research Center for Functional Genomics and Biochips, TEDA College, Nankai University, Tianjin, P. R. China, **4** Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, TEDA College, Nankai University, Tianjin, P. R. China

\* [leiwang@nankai.edu.cn](mailto:leiwang@nankai.edu.cn)



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** Cao B, Wang S, Tian Z, Hu P, Feng L, Wang L (2015) DNA Microarray Characterization of Pathogens Associated with Sexually Transmitted Diseases. PLoS ONE 10(7): e0133927. doi:10.1371/journal.pone.0133927

**Editor:** Ralph Tripp, University of Georgia, UNITED STATES

**Received:** March 27, 2015

**Accepted:** July 2, 2015

**Published:** July 24, 2015

**Copyright:** © 2015 Cao et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

## Abstract

This study established a multiplex PCR-based microarray to detect simultaneously a diverse panel of 17 sexually transmitted diseases (STDs)-associated pathogens including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma*, Herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2, and Human papillomavirus (HPV) types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 54 and 58. The target genes are 16S rRNA gene for *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, and *Ureaplasma*, the major outer membrane protein gene (*ompA*) for *C. trachomatis*, the glycoprotein B gene (*gB*) for HSV; and the *L1* gene for HPV. A total of 34 probes were selected for the microarray including 31 specific probes, one as positive control, one as negative control, and one as positional control probe for printing reference. The microarray is specific as the commensal and pathogenic microbes (and closely related organisms) in the genitourinary tract did not cross-react with the microarray probes. The microarray is 10 times more sensitive than that of the multiplex PCR. Among the 158 suspected HPV specimens examined, the microarray showed that 49 samples contained HPV, 21 samples contained *Ureaplasma*, 15 contained *M. hominis*, four contained *C. trachomatis*, and one contained *N. gonorrhoeae*. This work reports the development of the first high through-put detection system that identifies common pathogens associated with STDs from clinical samples, and paves the way for establishing a time-saving, accurate and high-throughput diagnostic tool for STDs.

The background of the slide features two wireframe human faces in profile, facing each other. The faces are rendered in a light blue/teal color with a grid pattern. A large red rectangle is overlaid on the left side of the image, containing the main title text.

# **Sexually Transmitted Infections kits**

# Clinical background

Sexually Transmitted Infections (STIs) have a major impact on sexual and reproductive health worldwide. More than 1 million STIs are acquired each day. The personal symptoms can range from sores, blisters and itchiness in the genital area, unusual discharge from the penis, vagina or anus, and pain during sex or urination to even persistent diarrhea and fever or flu-like symptoms. In addition, STIs can lead to an increased risk of HIV infection, miscarriage or infertility. Transmission mostly occurs through sexual contact, but can also happen through blood or from mother to child during pregnancy and birth <sup>(1)</sup>.

More than 30 different bacteria, viruses and parasites are known to be transmitted through sexual contact. To the group of pathogens that are linked to the greatest incidence of STIs belong:

- » ***Chlamydia trachomatis***, one of the most commonly reported STIs causing serious reproductive morbidity <sup>(2)</sup>,
- » ***Neisseria gonorrhoeae***, cause of the serious bacterial infection called **Gonorrhea** or “the clap” <sup>(3)</sup>,
- » ***Treponema pallidum***, a bacterium causing **Syphilis** that might lead to brain damage, hearing loss, and blindness without treatment <sup>(4)</sup>,
- » ***Mycoplasma genitalium***, one of the major agents in urogenital tract diseases <sup>(5)</sup>,
- » ***Trichomonas vaginalis***, a single-celled protozoan parasite causing genital inflammation <sup>(6)</sup>,
- » **herpes simplex virus 1 and 2**, triggering the outbreak of genital herpes with cold sores <sup>(7)</sup>.

**Bacterial and parasitic STIs can mostly be cured. Viral STIs, such as herpes, can't be cured, but they can be treated effectively.**

# Sexually Transmitted Infections portfolio

FTD offers 8 different Sexually Transmitted Infections kits available in two sizes: 32 or 64 reactions. All Sexually Transmitted Infections kits are **CE labeled**, detecting more than **29** different pathogens.

Kit name	Description	Samples	Cat. No.
<b>FTD Urethritis basic</b>	One tube multiplex for detection of <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> and internal control	» urine » genital / rectal swabs	FTD-33.1-32 FTD-33.1-64
<b>FTD Urethritis plus</b>	Two tube multiplex for detection of <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> and internal control	» urine » genital / rectal swabs	FTD-42.1-32 FTD-42.1-64
<b>FTD STD9</b>	Two tube multiplex for detection of <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum/parvum</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , herpes simplex virus 1/2 and internal control	» urine » genital / rectal swabs	FTD-52.1-32 FTD-52.1-64
<b>FTD Vaginal swab</b>	Two tube multiplex for detection of <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , herpes simplex virus 1, 2, <i>Treponema pallidum</i> and internal control	» urine » genital / rectal swabs » vaginal / male urethral swabs	FTD-12-32 FTD-12-64
<b>FTD Gonorrhoea confirmation</b>	One tube multiplex - two separate targets - for detection and confirmation of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> and internal control	» urine » endocervical / rectal swabs	FTD-17-32 FTD-17-64
<b>FTD Genital ulcer</b>	One tube multiplex for detection of herpes simplex virus 1 and 2, <i>Treponema pallidum</i> and internal control	» urine » genital and rectal swabs » vaginal / male urethral swabs	FTD-19-32 FTD-19-64
<b>FTD Herpes simplex virus</b>	One tube multiplex for detection of herpes simplex virus 1 and 2 and internal control	» urine » plasma » vaginal / throat / eye / skin swabs	FTD-75-32 FTD-75-64
<b>FTD HPV High Risk</b>	One tube multiplex for detection of human papillomavirus 16, human papillomavirus 18, a pool of 12 other High Risk human papillomavirus and endogenous control	» cervical swabs	FTD-90-32 FTD-90-64

# Overall % agreement for quality panels and clinical samples compared to competitors

FTD kits are regularly controlled by Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) panels and other external quality assessment programs. In addition FTD kits undergo pre- and post- market clinical performance evaluation studies.

## » FTD Urethritis basic

EQA samples		Clinical samples	
Number of tests performed on samples	446	Number of tests performed on samples	641
Accuracy	99.8%*	Overall agreement	99.8%*

## » FTD Genital ulcer

EQA samples		Clinical samples	
Number of tests performed on samples	432	Number of tests performed on samples	462
Accuracy	100.0%	Overall agreement	99.6%*

## » FTD Gonorrhoea confirmation

EQA samples		Clinical samples	
Number of tests performed on samples	156	Number of tests performed on samples	166
Accuracy	98.7%*	Overall agreement	100.0%

*\* The majority of the discrepant results were obtained from low positives or educational samples.*

# SaMag - 12 /24™



Automatic Nucleic Acids Extraction System  
from Sacace Biotechnologies

## SaMag - 12™

### SAMAG12 SYSTEM

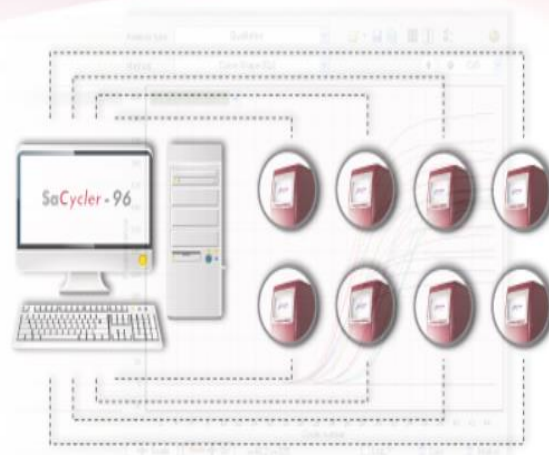
The SaMag-12™ is a compact bench-top extractor for automated nucleic acid purification.

It is able to process 1-12 samples in parallel, recommended for labs with small sample throughputs



## SaMag - 12™ System

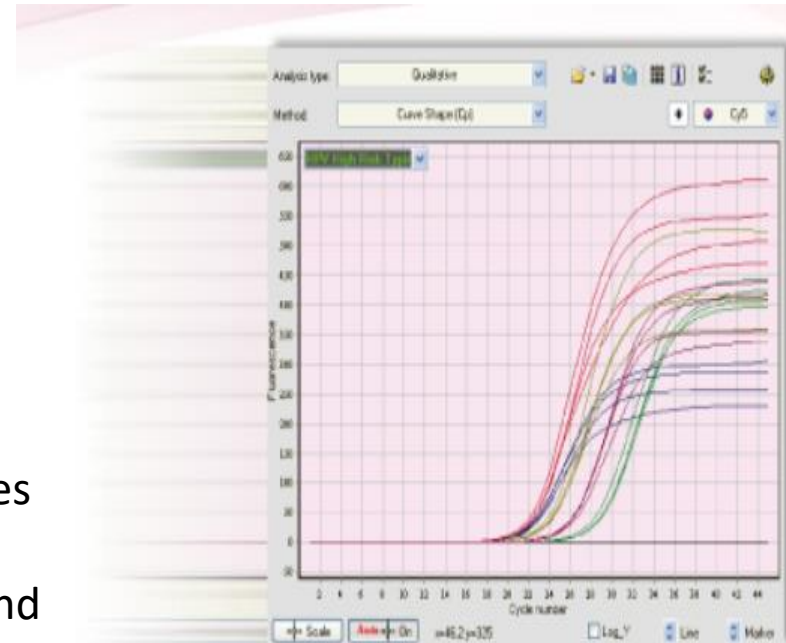
The SaMag-12™ is a compact bench-top extractor for automated nucleic acid purification. It is able to process 1-12 samples in parallel, recommended for labs with small-medium sample throughputs.



# SaCycler - 96

Real Time PCR System

- 96 well plate format
- 4-5 fluorescence channels
- LED as light source with 100,000 hours lifetime
- Separate light sources for each channel
- Highest sensitivity and speed

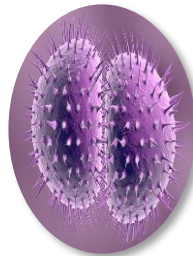
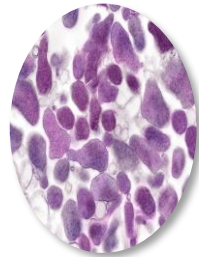


# STI, and MG burden



**3.45%** people infected with CT  
Treatment:  
**azithromycin/macrolide 1g** – 1 dose

**2.15%** people infected with MG  
1<sup>st</sup> day: **azithromycin/macrolide 500mg**  
then **250mg** during 4 days



**1.4%** people infected with NG  
**Ceftriaxone 500mg**

- **C. trachomatis (CT), N. gonorrhoeae (NG), M. genitalium (MG)** are the **3 main bacteria** responsible for **sexually transmitted diseases (STD)** with immediate and long-term consequences on human health

- **1 million STD** are acquired **every day**

- **M. genitalium** is more

**prevalent** than **N. gonorrhoeae**

- **Different antibiotic dosages** are needed to **correctly cure MG**

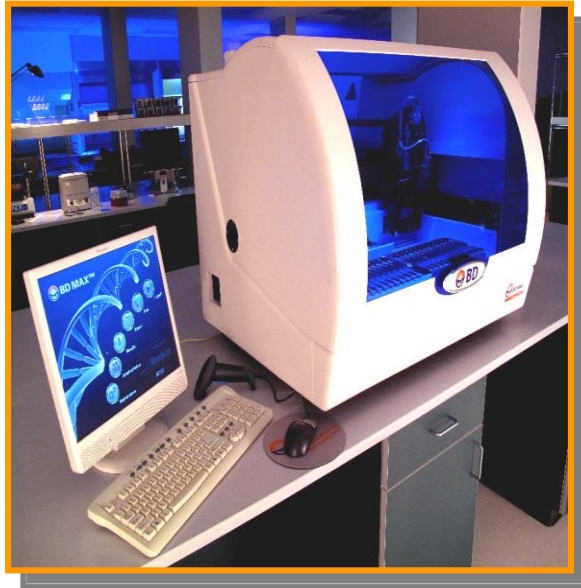
*Mycoplasma genitalium* is now recognized as a sexually transmitted pathogen as CT or NG

# BD MAX™ System

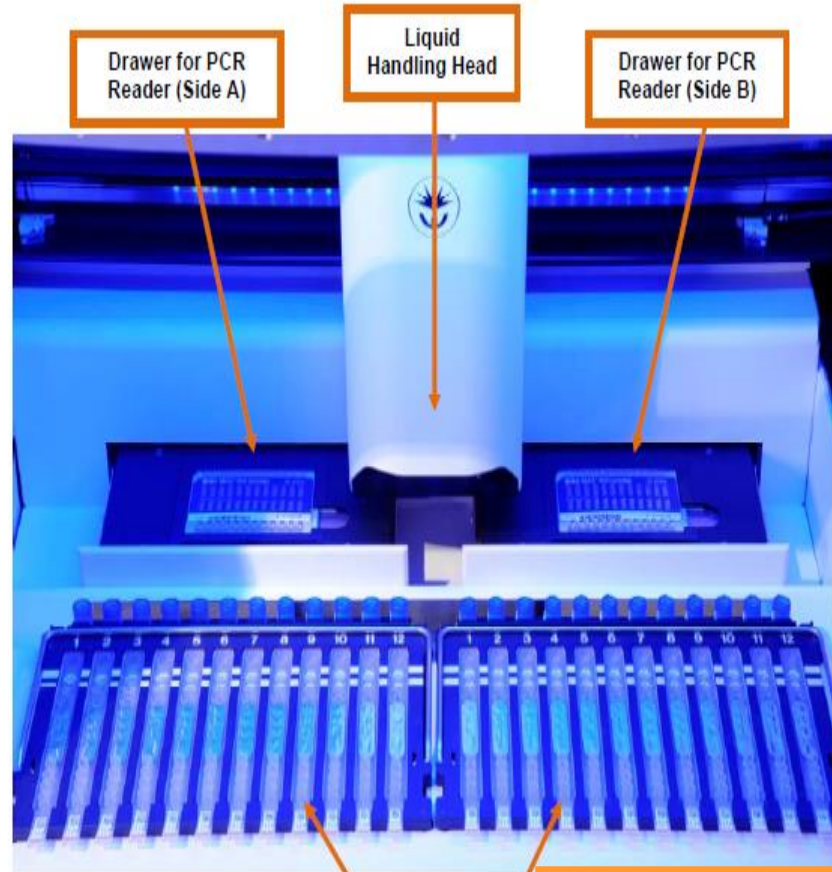


Το BD MAX™ είναι μια μοριακή πλατφόρμα που επιτρέπει πλήρη αυτοματοποίηση εμπορικά διαθέσιμων διαγνωστικών κιτ και προτυποποίηση πρωτοκόλλων χρηστών από την απομόνωση του γενετικού υλικού έως το τελικό αποτέλεσμα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου

# BD MAX™ System

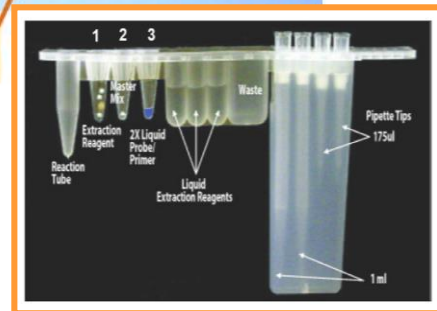
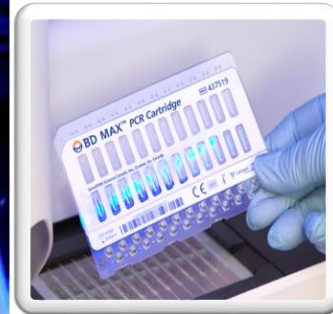


All-in-One Computer with touch-screen



Sample Racks

2 extraction sides:  
Holds sample rack: Rack holds 12 samples each



# BD MAX™ System

## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Απλοποιημένος μοριακός έλεγχος με  
walk-away αυτοματοποίηση



Λιγότερο από  
1 λεπτό  
προετοιμασία  
δείγματος

15 λεπτά  
προετοιμασία και  
προγραμματισμός  
εξετάσεων στο BD  
MAX

Αποτελέσματα σε  
λιγότερο από 3  
ώρες

\*Based on processing 24 samples

## ΜΟΡΦΗ ΜΟΝΟΤΕΣΤ

έως  
24  
δείγματα  
το τρέξιμο



BD CE/IVD kit  
CE/IVD kit συνεργ.  
κατασκευαστών  
*in-house*

**Διαφορετικές  
ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ  
στο ίδιο  
τρέξιμο**

# BD MAX™ System



Women's Health and STIs		
BD MAX CT/GC	Ούρα, κολπικά και ενδοτραχηλικά επιχρίσματα	<i>Chlamidia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
BD MAX CT/GC/TV	Ούρα, κολπικά και ενδοτραχηλικά επιχρίσματα	<i>Chlamidia trachomatis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Trichomonas vaginalis</i>
BioGX Mycoplasma and Ureaplasma	Κολπικά και ενδοτραχηλικά επιχρίσματα	<i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Ureaplasma parvum</i>
Biolegio HSV/VZV	κολπικά, ενδοτραχηλικά επιχρίσματα και ENY	<i>HSV-1</i> , <i>HSV-2</i> , <i>VZV</i>

# Diagnostic methods for *M. genitalium*

- Το μικροβιακό φορτίο σε λοίμωξη από *M. genitalium* είναι 100-fold lower than that of *C. trachomatis*.
- Καλύτερο δείγμα : ♂ first – void urine      ♀ vaginal swab
- Καμία μεθοδολογία δεν είναι FDA cleared
- Οι μεθοδολογίες δεν έχουν ακόμη επαρκώς αξιολογηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία
- Η Real – time PCR είναι η μεθοδολογία εκλογής για την ανίχνευση του *M. genitalium* εως σήμερα
- Μεθοδολογία transcription – mediated amplification (TMA) που στοχεύει το 16S rRNA εξελίχθηκε από την Gen-Probe και είναι πολλά υποσχόμενη (↑Sp + ↑Se) λόγω των multiple copies rRNA (molecules / cell)
- Μεθοδολογίες PCR που στοχεύουν το MgPa gene πρέπει να σχεδιάζονται προσεκτικά διότι πολλές περιοχές του γονιδίου παρουσιάζουν υψηλή μεταβλητότητα (↑ψευδώς αρνητικά )
- **Μεθοδολογίες με multiplex PCR υποφέρουν από χαμηλή ευαισθησία λόγω του μικρού αριθμού του στόχου στο δείγμα**

# Θεραπευτική αντιμετώπιση

TABLE 3. Susceptibilities of *M. genitalium* to various antibiotics compared with those of *M. hominis* and *Ureaplasma* spp.<sup>a</sup>

Antibiotic	Susceptibility of:		
	<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma</i> spp.
<b>Tetracyclines</b>			
Tetracycline	±	+	+
Doxycycline	±	+	+
Minocycline	±	+	+
<b>Macrolides</b>			
Erythromycin	++	-	+ ±
Clarithromycin	++ ±	-	+++
Azithromycin	+++	-	+
<b>Lincosamides</b>			
Clindamycin	±	+++	±
<b>Quinolones</b>			
Ciprofloxacin	+	+	±
Ofloxacin	±	+	+
Moxifloxacin	++	++	++
Penicillins	-	-	-
Rifamycins	-	-	-

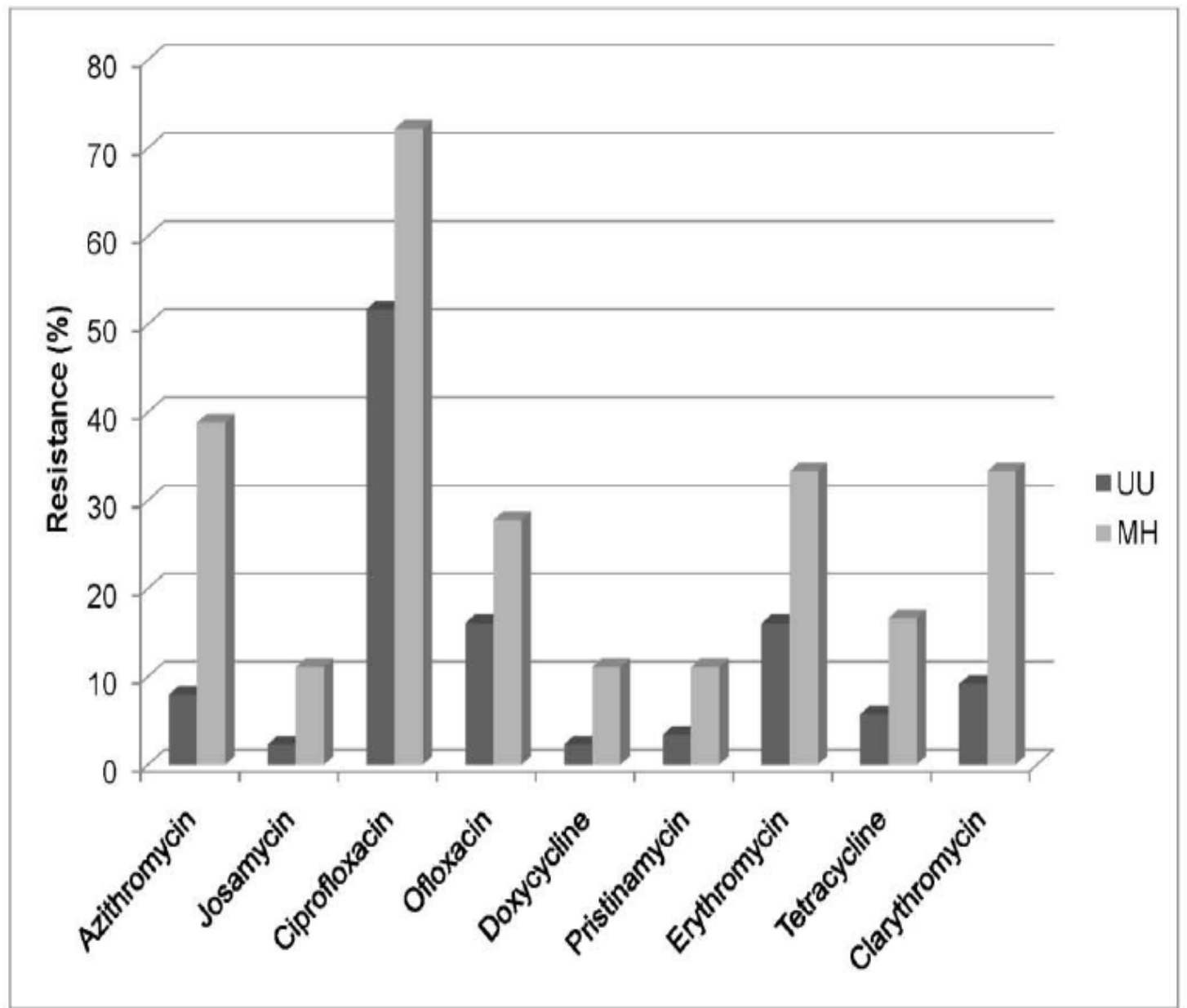
<sup>a</sup> +++, extremely sensitive (MIC ≤ 0.005 µg/ml); ++, highly sensitive (MIC ≤ 0.05 µg/ml); +, moderately sensitive (MIC ≤ 0.1 µg/ml); ±, weakly sensitive (MIC, 0.5 to 2 µg/ml); -, insensitive. Note that some strains of *M. genitalium* are resistant to macrolides and that some strains of *M. hominis* and *Ureaplasma* spp. are resistant to the tetracyclines (MICs of 2 to >64 µg/ml).

Table 2. MIC Ranges ( $\mu\text{g/ml}$ ) for various antimicrobials against genital mycoplasmas\*

Antibiotics	<b>M. genitalium</b>	<b>M. hominis</b>	<b>Ureaplasma spp.</b>
<b><i>Tetracyclines</i>**</b>			
Doxycycline	$\leq 0.01-0.3$	0.1-2	0.02-1
Minocycline	$\leq 0.01-0.2$	0.03-1	0.06-1
<b><i>MLS group</i></b>			
Erythromycin	$\leq 0.01$	<b>32-&gt;1 000</b>	0.02-16
Roxithromycin	$< 0.01$	<b>&gt;16</b>	0.1-2
Clarithromycin	$\leq 0.01-0.06$	<b>16-&gt;256</b>	$\leq 0.004-2$
Azithromycin	$\leq 0.01-0.03$	<b>4-&gt;64</b>	0.06-4
Josamycin	0.01-0.02	0.05-2	0.03-4
Clindamycin	0.2-1	$\leq 0.008-2$	0.2-64
Pristinamycin	$\leq 0.01-0.02$	0.1-0.5	0.1-1
Quinupristin/ Dalfopristin	0.05	0.03-2	0.05-0.5
<b><i>Fluoroquinolones</i>**</b>			
Ciprofloxacin	2	0.1-4	0.1-16
Ofloxacin	1-2	0.1-4	
Levofloxacin	0.5-1	0.1-2	0.2-2
Moxifloxacin	0.03-0.06	0.06-0.125	0.125-1

\*Data were compiled from published studies in which different methods were used (57).

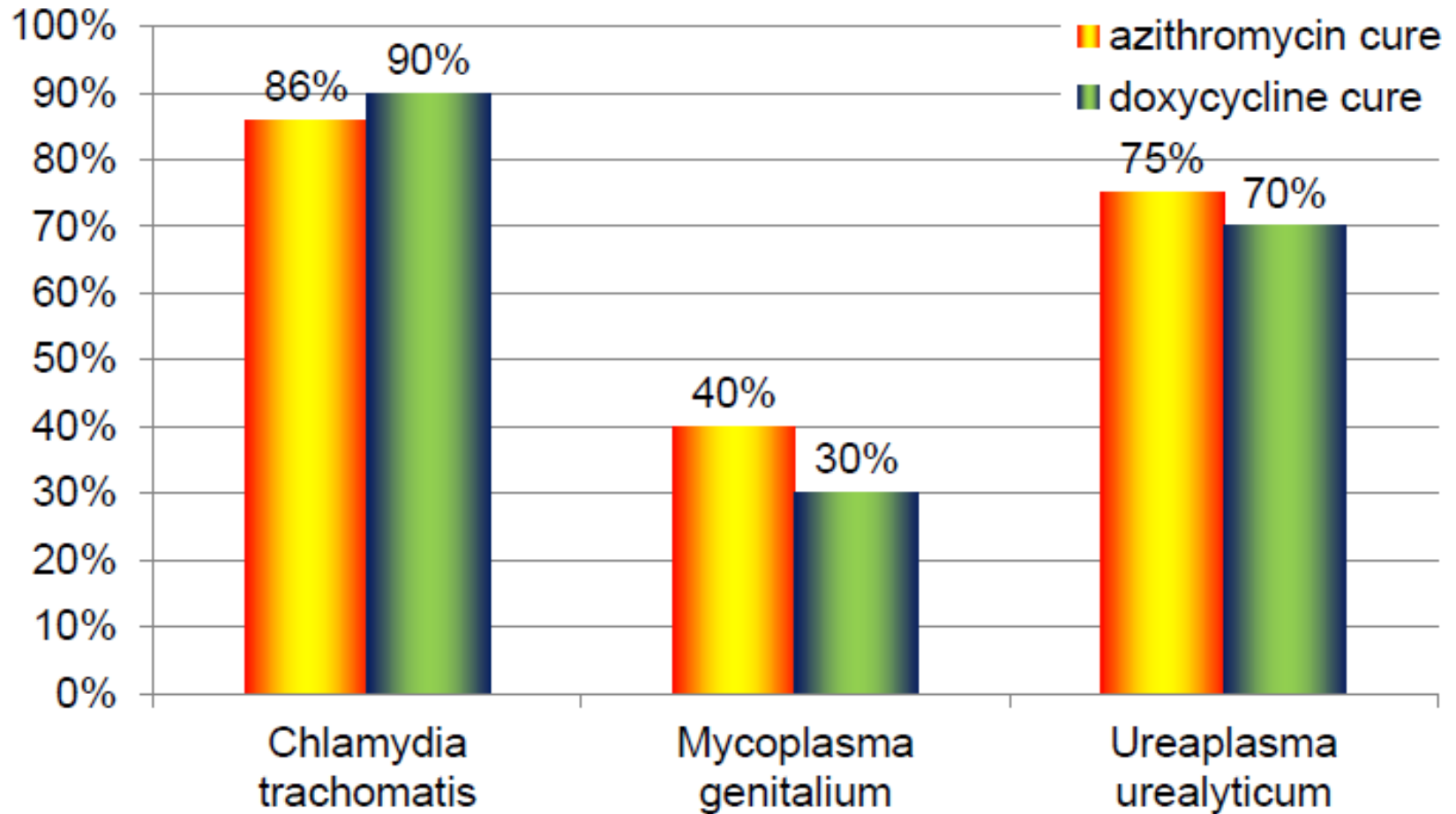
\*\*Susceptible strains. ND, not determined.



**Figure 1.** Resistance of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* strains to the antibacterial agents

# NGU Treatment

**C. trachomatis**  
**M.genitalium**  
**Ur.urealyticum**



Οδηγεί στην επιλογή  
ανθεκτικών στελεχών  
Θεραπεία Ct ?

# M. genitalium Treatment

## Urethritis + Cervicitis

Antibiotic	Classic Tx Efficacy
Tetracycline/Doxycycline	20-40%
Azithromycin 1g x 1	65-90%
<b>100x δραστικότερη in vitro από κινολόνες τετρακυκλινες</b>	
Azithromycin 500mg day 1 + 250mg day 2-5	70-100%
Ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin	30-55%
Moxifloxacin	>99%



Κόντρα στον άνεμο

Άλλοι ορθώνουν ανεμοφράκτες

Και άλλοι χτίζουν ανεμόμυλους

Harvard Medical School