

A7 AGAR

Cultura, enumerazione e identificazione dei micoplasmi urogenitali 8 test (REF 00090)

CP 0257-IT-2019-09

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

Test monouso.



I - OBIETTIVO

La piastra A7 Agar consente di effettuare la coltura, la conta indicativa e l'identificazione morfologica di *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) / *Ureaplasma parvum* e di *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partire da prelievi endocervicali, uretrali, urinari, spermatici, da liquidi gastrici e da altri prelievi in cui è possibile riscontrare la presenza dei micoplasmi urogenitali.

2 - INTRODUZIONE

I micoplasmi urogenitali, *U. urealyticum* e *M. hominis*, hanno un potere patogeno riconosciuto (3). Essi possono essere presenti allo stato commensale a livello delle vie genitali basse. E' quindi utile una valutazione quantitativa. *U. urealyticum* è responsabile di infezioni genitali maschili. *M. hominis* prolifera durante vaginosi e può estendersi alle vie genitali alte. I micoplasmi urogenitali sono anche responsabili di infezioni extra-genitali.

3 - PRINCIPIO

I micoplasmi sono microrganismi relativamente fragili, che si moltiplicano solo in presenza di numerosi fattori di crescita. Anaerobi facoltativi, esigono molti steroli e utilizzano come fonte di energia il metabolismo degli zuccheri o dell'arginina (*Mycoplasma hominis*) oppure dell'urea (*Ureaplasma urealyticum*).

La piastra A7 Agar è un terreno di Shepard modificato (4). Contiene siero, peptoni, estratto di lievito e una miscela vitaminica. Non contiene zucchero, ma urea e arginina come fonti di energia. E' resa selettiva mediante l'aggiunta di antibiotici e di antimicotici al fine di inibire lo sviluppo dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi e dei lieviti. La presenza di solfato di manganese conferisce alle colonie di *Ureaplasma urealyticum* una colorazione nera in presenza di urea (4). Sulle piastre agarizzate, le colonie di micoplasmi sono piccole e devono essere osservate con il microscopio ottico.

Per ricercare i micoplasmi, è indicato utilizzare sia terreni liquidi che solidi (3). La piastra A7 Agar può essere associata ai metodi liquidi MYCOSCREEN o MYCOFAST.

4 - REAGENTI

Confezionamento: 8 Piastre

Descrizione

A7 AGAR: Piastra da 55 mm pronta per l'uso e imballata individualmente in un sacchetto di cellophane.

Composizione della piastra agar

Brodo per micoplasmi (25 g/L), estratto di lieviti (9.4 g/L), siero di puldredo (15%), urea (1.15 g/L), arginina (1.4 g/L), cloruro di calcio (0.3 g/L), solfato di manganese (0.1 g/L), complemento vitaminico, miscela di antibiotici e antimicotici e agar (14 g/L).

5 - PRECAUZIONI D'IMPIEGO

- Le piastre agar di questo cofanetto vanno utilizzate esclusivamente per uso diagnostico in vitro e devono essere manipolate da persone autorizzate.
- I prelievi e le piastre inoculate sono potenzialmente infettivi, quindi devono essere manipolati con le precauzioni d'uso appropriate rispettando le regole di igiene e la regolamentazione vigente nel paese di utilizzo per questo tipo di prodotto.
- Le piastre agar contengono materie prime di origine animale e devono essere manipolate con le precauzioni d'uso adeguate.
- Non usare le piastre di questo cofanetto oltre la data di scadenza né piastre contaminate o conservate male.

6 - RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI

6.1 Raccolta dei prelievi

- **Tamponi endocervicali / vaginali:** utilizzare solo un tampone Dacron® o rayon o cytobrush (se si utilizza un UMMt da 2 mL o 3 mL), o utilizzare il tampone fornito con il suo mezzo di trasporto amichevole o universale per i virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma (se si utilizza un UMMt AMIES 2.6 mL).

Effettuare il prelievo dopo aver accuratamente eliminato le secrezioni dell'esoccolo con un primo tampone. Poiché i micoplasmi hanno una forte affinità per le cellule delle mucose sulle quali aderiscono, per avere un buon risultato è essenziale grattare bene la mucosa (1).

Prelievi uretrali: pulire il meato ed eseguire il prelievo mediante tampone o raschiando le cellule.

Sperma, urina, altri liquidi: raccogliere lo sperma o il primo getto di urina o altro prelievo liquido in un flacone sterile.

6.2 Trasporto dei prelievi

UMMt 2 o 3 mL

Inoculare una fiala di mezzo UMMt con il campione di tampone o se si utilizza un trasferimento di campione liquido 200 µL o 300 µL del campione liquido in 2 mL o 3 mL UMMt. Una volta inoculato, il brodo di trasporto UMMt può essere conservato a temperatura ambiente (18-25 °C) per 20 ore, o a 2-8 °C per 56 ore. Per una conservazione di 3 giorni a -20°C, aggiungere prima 2 gocce di "MYCOPLASMA stabilizer"

Medium AMIES o medium universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma

Fare riferimento alle istruzioni operative del produttore

UMMt AMIES Medio

Scaricare 300 µL di terreno di trasporto AMIES o terreno universale per virus, clamidie, micoplasmi e ureaplasme seminato in una fiala di terreno AMIES.

Una volta inoculato, l'ambiente UMMt AMIES (2.6 mL) può essere conservato a temperatura ambiente (18-25 °C) per 20 ore o a 2-8 °C per 56 ore.

Per lo stoccaggio per 3 giorni a -20 °C, aggiungere prima 2 gocce di "stabilizzante MYCOPLASMA".

7 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Le piastre agar sono pronte per l'uso; conservate nella confezione originale sono stabili fino alla data di scadenza riportata sul sacchetto.

Non far subire alla piastra agar forti variazioni di temperatura.

8 - MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Attrezzature per campionamento (tampone Dacron, cytobrush, terreno di trasporto di AMIES o terreno universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasme, flacone sterile per la raccolta di campioni liquidi), pipette
- MYCOPLASMA Stabilizer (REF 00064)
- UMMt media (REF 00835; 00061; 00083) per campioni di tamponi o di trasporto AMIES o terreno universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma
- Autoclave calibrata a 35-37 °C, dispositivo per anaerobiosi, I Microscopio ottico (obiettivo 10X), Recipiente per rifiuti contaminati.

9 - MODALITA' DI FUNZIONAMENTO

9.1 Inoculazione

- **Prelievo su tampone:** stemperare il tampone in un mezzo UMMt. Depositare al centro della piastra agar 3 gocce da circa 30 µL (o un deposito da 100 µL) di terreno inoculato e omogeneizzato.

- **Campione di tampone associato al terreno di trasporto AMIES o terreno universale per virus, clamidie, micoplasma e ureaplasme:** Omogeneizzare la fiala di trasporto e trasferire 300 µL in un terreno UMMt AMIES Al centro dell'agar, collocare 3 gocce di circa 30 µL (o un deposito da 100 µL) di UMMT AMIES media inoculato e omogeneizzato.

- **Prelievo liquido:** omogeneizzare il prelievo e depositare direttamente al centro della piastra agar 3 gocce da circa 30 µL (o un deposito da 100 µL). Se il prelievo deve essere trasportato, inoculare un UMMt medio 2 ml con 200 µL di liquido, oppure UMMt 3 ml con 300 µL di liquido (§6.2).

9.2 Incubazione della piastra agar

Lasciare asciugare la piastra agar per circa 30 minuti a temperatura ambiente.

Incubare la piastra a 35-37 °C per 48 ore in anaerobiosi.

10 - LETTURA E INTERPRETAZIONE

Le colonie devono essere osservate con il microscopio (obiettivo 10X), la piastra capovolta.

10.1 Identificazione morfologica

Ureaplasma urealyticum: aspetto di precipitati bruno-neri (a forma di "riccio di mare" di dimensioni variabili). Le colonie sono piccole.

Mycoplasma hominis: aspetto a "uovo al tegame". Le colonie sono più grandi delle colonie di *U. urealyticum*.

10.2 Numerazione

Effettuare la numerazione sulla piastra capovolta al microscopio con un obiettivo 10X, secondo la media del numero di colonie in 10 campi microscopici:

meno di 1 colonia / campo: <10³ UFC/mL

da 1 a 5 colonie / campo: circa 10⁴ UFC/mL

da 5 a 10 colonie / campo: circa 10⁵ UFC/mL

da 10 a 20 colonie / campo: circa 10⁶ UFC/mL

> 20 colonie / campo: > 10⁶ UFC/mL

UFC: Unità formanti colonie

11 - CONTROLLO QUALITA'

Il controllo qualità può essere realizzato a partire da un ceppo di collezione liofilizzato (*Ureaplasma urealyticum* ATCC 27618) e calibrato a 10⁴ UFC/mL. Inoculare la piastra A7 Agar e procedere come indicato nelle presenti istruzioni (§9 e §10).

Risultato atteso: presenza di 1-5 colonie a forma di riccio di mare (*U. urealyticum*).

12 - CAUSE DI ERRORI

- Campionatura con tamponi o supporti di trasporto inadatti.
- Inoculo diretto a partire dal tampone.
- Incubazione in aerobiosi.
- Mancato rispetto della temperatura di incubazione.

13 - LIMITI DEL METODO

- Prelievo con scarsa presenza di micoplasmi (<10³ UFC/mL).
- Metodo solido in A7 da associare a un metodo liquido.
- Come per qualsiasi metodo di ricerca di germi, la qualità del prelievo condiziona il risultato del test. Un test negativo non è indicativo di assenza di infezione.

14 - PERFORMANCE

Le performance della coltura in piastre A7 Agar di IM sono state valutate rispetto al metodo liquido MYCOFAST (2). Lo studio è stato realizzato in un centro ospedaliero su 544 prelievi clinici (266 spermi, 155 prelievi endocervicali, 82 placente, 19 prelievi uretrali e 22 prelievi vari). Su 475 prelievi (88%), di cui 140 positivi e 335 negativi, i risultati sono stati concordanti. Le discordanze riguardavano 69 prelievi, di cui 8 erano positivi solo con la piastra A7 Agar (1,5%), 48 erano positivi solo con il metodo MYCOFAST (8,8%) e 13 erano contaminati (2,4%). E' stato possibile rilevare alcuni ceppi di micoplasmi provenienti da prelievi contaminati con la piastra A7 Agar.

15 - SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere eliminati rispettando le regole di igiene e la regolamentazione vigente per questo tipo di reagenti nel paese in cui vengono utilizzati.

16 - BIBLIOGRAFIA

BOUCAUD-MAITRE Y. et THOINET S. 1993. Analyse des prélèvements en bactériologie médicale - 2^{ème} partie : prélèvements génitaux. Feuil. Biol., 34: 21-24.

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

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

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

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziati in grigio.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE

☎ 33 (0)4 94 88 55 00
Fax.: 33 (0)4 94 32 82 61
http://www.elitechgroup.com