

Diagnosi di micoplasmi urogenitali

MYCOFAST Screening Revolution

Rilevamento e differenziazione

50 tests (RIF 00063)

COMPLEMENT MYCOFAST Revolution 2

Conteggio, identificazione e test di sensibilità

25 test (RIF 00082)

UMMt AMIES Revolution

50 test (RIF 00083)

CPB 0396-3-IT-2018-03

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

Test monouso.



1 - OBIETTIVO

Cofanetto MYCOFAST Screening *Revolution* (RIF. 00063) consente lo screening e la differenziazione di *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (U.u.) e di *Mycoplasma hominis* (M.h.) a partire da vari campioni clinici effettuati in un ambiente di trasporto AMIES o in un ambiente di trasporto universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma. Deve essere utilizzato in combinazione con i mezzi di coltura del cofanetto UMMt AMIES *Revolution* (RIF. 00083).

In caso di screening positivo, l'analisi potrà essere gallerie del cofanetto completata a con le COMPLEMENT MYCOFAST *Revolution 2* (RIF.00082) per il conteggio e l'identificazione di U.u. e/o M.h. nonché il test di sensibilità agli antibiotici raccomandato dal CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2).

2 - INTRODUZIONE

I micoplasmi, che comprendono diverse specie precedentemente rilevate negli umani, appartengono alla classe del Mollicuto. Si differenziano dagli altri batteri in molti modi, compresa la mancanza di una parete che dia loro una naturale resistenza alle beta-lattamine, nonché una membrana ricca di steroli proveniente dalle membrane cellulari eucariotiche alle quali si attaccano. I micoplasmi sono organismi relativamente sensibili che si moltiplicano nei terreni acellulari solo in presenza di numerosi fattori di crescita e ad una temperatura ottimale di 37 °C (4).

La maggior parte dei micoplasmi umani sono semplici batteri commensali. Le specie isolate dal tratto genito-urinario, *U. urealyticum* e *M. hominis*, sono le più comuni. La specie *U. urealyticum* è divisa in due biovar: *U. urealyticum* e *U. parvum* (U.u.).

U.u. o M.h. può comportarsi come veri agenti patogeni. Sei responsabile di infezioni genitali maschili (uretrite non gonococcica, epididimite, prostatite, sterilità); infezioni ginecologiche (vaginosi batterica, endometrite, salpingite); Disturbi della riproduzione (corioamniotite, endometrite post partum, parto prematuro, aborto spontaneo); Infezioni neonatali (basso peso alla nascita, infezioni respiratorie, infezioni neurologiche, batteriemia, accessi); infezioni extragenitali (artrite settica, artrite reattiva, altre localizzazioni) (1).

La diagnosi di infezioni da micoplasma dipende dalla determinazione di una soglia patologica e quindi da un conteggio. Il verificarsi di resistenze di U.u. e M.h. contro determinate molecole porta ad un test di sensibilità agli antibiotici (5, 6). Gli antibiotici testati e i criteri di interpretazione sono progettati per trattare le infezioni da micoplasma nel tratto genitourinario o in altre aree extragenitali (2).

3 - PRINCIPIO

La tecnica MYCOFAST Screening *Revolution* è un metodo in mezzo di coltura liquido basato sulla capacità di U.u. e M.h. di metabolizzare

urea e arginina rispettivamente. La crescita dei micoplasmi in mezzo di coltura liquido viene visualizzata tramite il viraggio di un indicatore colorato, il rosso di fenolo, dal giallo-arancio al rosso che riflette l'alcalinizzazione del mezzo a causa del rilascio di ammoniaca.

La crescita del micoplasma così visualizzata permette:

- rilevamento e differenziazione; poi in caso di positività:

- la numerazione basata sul tasso di idrolisi dei substrati che è proporzionale alla quantità di germi contenuti nel campione; lo studio della sensibilità di U.u. e M.h. agli antibiotici.

4 - REAGENTI

Descrizione	Quantità		
	rif.00083	rif. 00082	rif. 00063
UMMt AMIES: Contenitore contenente 2,6 mL di micoplasma in brodo con antibiotici e conservanti. pH: 6,0 ± 0,1	50		
MYCOFAST SCREENING <i>Revolution</i> : Galleria separabile con 10 pozzetti per 5 prove, confezionata singolarmente in buste di alluminio con essiccante integrato			10
Etichette: foglio con 5 separabili			10
S.Mh.: Attivatore di crescita per M.h. (4,5 ml)			1
MYCOFAST <i>Revolution 2</i> : Galleria di 24 pozzetti per 1 test, confezionati in sacchetti di alluminio, con essiccante		25	
Sistema di chiusura: Rivestimento in plastica trasparente per la galleria <i>Revolution</i> di MYCOFAST		25	

Galleria MYCOFAST Screening *Revolution*

Galleria composta da 5 file di 2 pozzetti: una fontana *Ureaplasma urealyticum* (U.u.) con lincomicina e urea e una fontana *Mycoplasma hominis* (M.h.) con eritromicina e arginina.

MYCOFAST Gallery *Revolution 2*

La galleria contiene nei 24 pozzetti il mezzo di crescita in forma essiccata (siero di puledro, estratto di lievito, cisteina, arginina, urea, rosso fenolo, antibiotici, pH: 6,1 ± 0,1) e si compone di 2 parti differenti: la parte per il conteggio e la valutazione della sensibilità agli antibiotici per U.u. (Fontana con lettere nere sull'etichetta). la parte per il conteggio e la valutazione della suscettibilità agli antibiotici per la specie M.h. (Fontana con lettere rosse sull'etichetta).

Parte destinata alla diagnostica della specie U.u. (in nero):

Pozzetti 1/2/3: Identificazione e conteggio di U.u. per tassi di 10^3 , 10^4 e $\geq 10^5$ CCU/mL (soluzione tamponata e lincomicina che inibisce la crescita di M.h.).

Pozzetti 4/5: Valutazione della sensibilità di U.u. alla levofloxacina (LVX) a 2 / 4 µg/mL

Pozzetti 6/7: Valutazione della sensibilità di U.u. alla moxifloxacina (MXF) a 2 / 4 µg/mL

Pozzetti 8/9: Valutazione della sensibilità di U.u. all'eritromicina (ERY) a 8 / 16 µg/mL

Pozzetti 10/11: Bewertung der Empfindlichkeit von U.u. gegenüber Tetracyclin (TET) 1-2 µg/mL

Brunnen 12/13: Valutazione della sensibilità di Uu alla tetraciclina (DOX) 1-2 µg/mL

Parte destinata alla diagnosi della specie M.h. (in rosso):

Pozzetti 14: Identificazione e numerazione di Mh per tassi $\geq 10^4$ CCU/mL

Pozzetti 15/16: Valutazione della sensibilità di Mh alla doxiciclina (DOX) 4-8 µg/mL

Pozzetti 17/18: Valutazione della sensibilità di Mh alla levofloxacina (LVX) 1-2 µg/mL

Pozzetti 19/20: Valutazione della sensibilità di Mh alla moxifloxacina (MXF) 0,25-0,5 µg/mL

Pozzetti 21/22: Valutazione della sensibilità di Mh alla clindamicina (CL) 0,25-0,5 µg/mL

Pozzetti 23/24: Valutazione della sensibilità Mh alla tetraciclina (CL) 0,25-0,5 µg/mL

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24				
	DOX		LVX		MXF		CLI		TET					
	4	8	1	2	0,25	0,5	0,25	0,5	4	8				
14	Mh	MYCOFAST® <i>Revolution 2</i>										2	DOX	13
	>10 ⁴													
1	Uu											1		12
	10 ³													
	Uu	2	4	2	4	8	16	1	2					
	10 ⁴	Uu	≥10 ⁵	LVX	MXF	ERY	TET							
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			

5 - PRECAUZIONI D'IMPIEGO

I reagenti di questo cofanetto sono destinati esclusivamente all'uso diagnostico *in vitro* e devono essere maneggiati da personale autorizzato.

I campioni e i reagenti inoculati sono potenzialmente infettivi, devono essere manipolati con le precauzioni per l'uso nel rispetto delle norme di igiene e del regolamento in vigore nel paese di utilizzo per questo tipo di prodotto.

I reagenti contenenti materie prime di origine animale devono essere manipolati con le precauzioni per l'uso.

Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

Non utilizzare reagenti danneggiati o conservati in modo improprio prima dell'uso.

Un risultato positivo con la galleria MYCOFAST *Revolution 2* indica una colonizzazione da micoplasmi urogenitali, ma non è sufficiente da solo per effettuare una diagnosi clinica.

Questa deve essere eseguita dal medico in funzione dei risultati biologici e dei segni clinici.

6 - RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

6.1 Raccolta dei campioni

Tampioni cervico-vaginali

Utilizzare solo i tamponi forniti con il mezzo di trasporto.

Campione dopo un'attenta rimozione della secrezione dell'ectocervice usando un primo tampone. I micoplasmi hanno una forte affinità per le cellule della mucosa a cui aderiscono, quindi è importante raschiare bene la mucosa per ottenere una buona resa.

Campioni uretrali

Utilizzare solo i tamponi forniti con il mezzo di trasporto.

Pulire il meato e rimuovere un campione con un tampone o raschiando le cellule.

6.2 Trasporto dei campioni

Conservazione in terreno medio o universale di AMIES per virus, clamidia, micoplasmi e ureaplasmi. Consultare le istruzioni per l'uso del produttore.

Trasporto in mezzo UMMt AMIES

Scaricare 300 µL di mezzo di trasporto inoculato in una fiala di mezzo UMMt AMIES.

6.3 Conservazione dei campioni

Conservazione in mezzo AMIES o in mezzo universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma

Fare riferimento alle istruzioni per l'uso del roduttore Conservazione in mezzo UMMt AMIES.

Una volta inoculato, il mezzo UMMt AMIES può essere conservato a temperatura ambiente (18-25 °C) per 20 ore, o a 2-8 °C per 56 ore. Per la conservazione a -20 °C per 3 giorni, aggiungere 2 gocce di "MYCOPLASMA Stabilizer" prima di procedere.

7 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti conservati a 2-8 °C nello stato originale sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette.

Se si utilizza una sola serie di pozzetti (U.u.) (M.h.) o due, tre, quattro serie di pozzetti, il resto della galleria di MYCOFAST Screening *Revolution* non

utilizzato e richiuso ermeticamente nella busta originale in alluminio, può essere conservato per 4 settimane a 2-8 °C.
 Il supplemento di M.h. è stabile per 3 mesi dopo l'apertura.
 Il mezzo UMMt può essere conservato temporaneamente (3 mesi) a temperatura ambiente, ma ha una migliore stabilità a 2-8 °C.
 Non congelare i reagenti del cofanetto.

8 - MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Materiale per campionamento (tamponi associati al mezzo di trasporto Amies o mezzo universale per virus clamidia, micoplasma e ureaplasma) MYCOPLASMA Stabilizer (RIF. 00064)
 Pipette e coni di trasferimento
 Contenitore per rifiuti contaminati Olio minerale
 Forno calibrato a 37± 1 °C

9 - MODALITÀ OPERATIVA

Portare i reagenti a temperatura ambiente per 20-30 minuti.

9.1 SCREENING - Galleria MYCOFAST Screening *Revolution* -

Preparare tanti set di pozzetti quanti i campioni da analizzare.
 - Se necessario, separare una o più serie di pozzetti (U.u.)/(M.h.) facendo riferimento alle marcature sulla galleria.

9.1.1 Inoculazione del mezzo UMMt AMIES *Revolution*

Se il trasporto è stato effettuato in mezzo UMMt AMIES inoculato con 300 µL di mezzo AMIES o in un mezzo universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma, passare direttamente al punto 9.1.2.

Se il campione è stato trasportato nel suo mezzo AMIES o universale per virus, clamidia, micoplasma e ureaplasma, trasferire 300 µL di questo mezzo di trasporto in un flacone di UMMt AMIES.

9.1.2 Inoculazione dei pozzetti U.u./M.h.

- Distribuire successivamente:
 Pozzetto (U.u.): 100 µL di mezzo UMMt AMIES inoculato.
 Pozzetto (M.h.): 100 µL di mezzo UMMt AMIES inoculato.
 50 µL di supplemento Mh.

- Aggiungere 2 gocce di olio minerale nei due pozzetti.
 - Coprire i pozzetti con l'etichetta staccabile e identificare il campione. -
Conservare l'eccesso della fiala di mezzo UMMt AMIES inoculato a 2-8 °C per continuare l'analisi in caso di screening positivo.

9.1.3 Incubazione dei pozzetti Uu/Mh

Incubare i pozzetti della galleria per 24 ore a 37 ± 1 °C. L'incubazione della galleria può essere prolungata fino a 48 ore solo nel caso di test negativi entro 24 ore.

9.1.4 Lettura e interpretazione dei pozzetti U.u./M.h.

- Verificare che i 2 pozzetti (U.u.) (M.h.) siano limpidi. Un pozzetto torbido indica una contaminazione batterica. In questo caso, ricominciare il test.
 - Osservare il cambiamento di colore nei pozzetti U.u. e M.h.
 Pozzetto U.u. arancione o rosso: presenza di *Ureaplasma urealyticum*
 Pozzetto M.h. arancione o rosso: presenza di *Mycoplasma hominis*
 Pozzetto U.u./M.h. giallo: assenza di micoplasmi

In caso di screening positivo continuare la diagnosi con la galleria MYCOFAST *Revolution* 2

9.2 NUMERAZIONE, IDENTIFICAZIONE E TEST DI SENSIBILITÀ

9.2.1 Inoculazione della galleria MYCOFAST *Revolution* 2

Rimuovere la pellicola adesiva tirando la linguetta e distribuire successivamente nei pozzetti.

Pozzetti 1-24 100 µL di mezzo UMMt AMIES inoculato
 Pozzetti 1-24 2 gocce di olio minerale

Coprire la galleria agganciando il coperchio "sistema di chiusura".
 Identificare il campione.

Conservare l'eccedenza della fiala di UMMt AMIES a 2-8 °C per almeno 48 ore per eventuali verifiche.

9.2.2 Incubazione della galleria

Incubare la galleria a 37 ± 1 °C per 24 ore.

Per i conteggi U.u. e M.h. leggere i risultati in 24 ore. L'incubazione della galleria può essere prolungata fino a 48 ore solo nel caso di campioni liquidi negativi entro 24 ore.

9.2.3 Lettura e interpretazione

Verificare che tutti i pozzetti della galleria siano limpidi. Un pozzetto torbido indica una contaminazione batterica. In questo caso, ripetere l'analisi. La crescita di micoplasmi urogenitali nei pozzetti provoca un'alcalinizzazione del mezzo di coltura, che vira verso il rosso. In assenza di crescita di micoplasmi urogenitali, il mezzo di coltura rimane di colore giallo. Una colorazione arancione deve essere considerata un test positivo (livello limite). Per l'interpretazione dei test, consultare la scheda dei risultati.

Conteggio (pozzetti 1, 2, 3 e 14)

Individuare i pozzetti che hanno virato verso il rosso e interpretare:

1 tasso U.u. di 10³ CCU/mL
 1 e 2 tasso U.u. di 10⁴ CCU/mL
 1, 2 e 3 tasso U.u. di 10⁵ CCU/mL
 14 tasso M.h. ≥ 10⁴ CCU/mL

Il ruolo patologico dei micoplasmi nelle infezioni urogenitali è soggetto a interpretazione secondo raccomandazioni specifiche (1,3,7). I tassi normalmente considerati patologici per *U. urealyticum* sono: ≥10⁴ CCU/mL per prelievo uretrale, ≥10³ CCU/mL per un primo getto di urina o sperma (anche se una nuova raccomandazione locale menziona una soglia a ≥10⁴ CCU/mL per lo sperma (7)). Per *M. hominis* la presenza a un tasso ≥10⁴ CCU/mL in un prelievo cervico-vaginale è anomala (1, 3).

Test di sensibilità agli antibiotici (pozzetti da 4 a 13 e da 15 a 24)

Il viraggio del mezzo di coltura nei pozzetti contenenti un antibiotico riflette la capacità del ceppo di svilupparsi in presenza della concentrazione testata dell'antibiotico. Il colore giallo del mezzo riflette l'incapacità del ceppo di svilupparsi in presenza della concentrazione testata dell'antibiotico. I ceppi sono classificati come sensibili o resistenti agli antibiotici secondo i seguenti criteri di interpretazione definiti dalla CLSI (2):

Tabella dei criteri di interpretazione delle MIC (µg/mL):

Classe	Antibiotico	U.u.			M.h.			Commenti
		S	R	MI	S	R	MI	
Chinoloni	Levofloxacina	≤2	≥2	MI	≤1	≥1	MI	
	Moxifloxacina	≤2	≥0,5	MI	≤0,25	≥0,5	MI	
Lincosamidi	Clindamicina			MI	≤0,25	≥0,5		
Tetracidine	Tetraciclina	≤1	≥8	MI	≤4	≥8		
	Doxiciclina	≤1	≥8	MI	≤4	≥8		
Macrolidi	Eritromicina	≤8	≥16	MI			I ceppi sensibili all'eritromicina lo sono anche all'azitromicina	

Ausilio per l'interpretazione:

Test di sensibilità U.u.

Antibiotico	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Concentrazione (µg/mL)															
Profili	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interpretazione

Test di sensibilità M.h.

Antibiotico	LVX			MXF			CLI			TET			DOX		
	1	2	int*	0,25	0,5	int*	0,25	0,5	int*	4	8	int*	4	8	int*
Profili	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

int*= interpretazione

Il ceppo è detto sensibile quando la sua crescita è inibita alle due concentrazioni critiche dell'antibiotico. Il ceppo è considerato resistente quando la sua crescita è inibita alla concentrazione critica alta dell'antibiotico e non è inibita alla concentrazione critica bassa, o quando la sua crescita non è inibita alle due concentrazioni critiche dell'antibiotico.

M. hominis è naturalmente resistente ai macrolidi con 14-15 atomi di carbonio, compresa l'eritromicina.

In alcune popolazioni il tasso di resistenza alla tetraciclina può raggiungere il 45% per U.u. e il 39,6% per M.h. (2). Sono state descritte resistenze ai chinoloni (U.u. e M.h.) (5, 6) e alla clindamicina (M.h.), ma la prevalenza non è nota.

10 - CASI PARTICOLARI

Per tassi molto elevati in U.u. o M.h., si verifica un viraggio verso il rosso di tutti i pozzetti interessati dal germe. Si raccomanda quindi di diluire il campione per ottenere un risultato più accurato. In tal caso procedere come segue.

Inoculare una nuova fiala di UMMt AMIES da 2,6 mL con 300 µL di mezzo originale UMMt AMIES conservato a 2-8 °C (§ 9.1). Inoculare una nuova galleria con il nuovo mezzo UMMt AMIES inoculato.

Considerare la diluizione (1:10) per l'interpretazione del conteggio. Confermare se necessario su agar A7 la presenza di micoplasmi isolando nuovamente a partire dal mezzo UMMt AMIES originale conservato a 2-8 °C (§ 9.1). Una temperatura di incubazione non costante o < 36 °C (frequente apertura del forno, eterogeneità di temperatura nel forno ...) può rallentare la cinetica di crescita dei micoplasmi.

11 - CONTROLLO DI QUALITÀ

Non riesco a controllare la qualità del gioco a causa dei souk *U. urealyticum* et da *Mycoplasma hominis* da coffret MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) o da una zuppa di raccolta liofilizzata (*U. urealyticum* ATCC 27815 o *M. hominis* ATCC 23114), precedentemente calibrata a 10⁴⁻⁵ CCU/mL.

Screening: Inoculare i due pozzetti di una galleria MYCOFAST Screening *Revolution* e continuare il test come indicato nella nota (§ 9.1).

Risultati attesi per il ceppo: U.u. (+) e M.h. (-);

Conteggio, identificazione e test di sensibilità Inoculare la galleria MYCOFAST *Revolution* 2 e proseguire il test come indicato in questa nota (§ 9.2)

Ecco i risultati attesi (ATCC).

MYCOFAST *Revolution* 2

	U.u.		M.h.		LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
	10 ³	10 ⁴	≥10 ⁵	≥10 ⁴						
Ceppo U.u. ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	NI*
Ceppo M.h. ATCC 23114.	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI: Non interpretabile

12 - LIMITI DELLA METODOLOGIA

12.1 Screening:

La galleria MYCOFAST Screening *Revolution* ha una soglia di sensibilità ≤ 10³ CCU/mL e non consente la numerazione. Il conteggio ottenuto con la galleria MYCOFAST *Revolution* 2 può rivelarsi negativo dopo uno screening positivo.

12.2 Conteggio, identificazione e test di sensibilità

- Alcuni batteri presenti in quantità $>10^{5-7}$ CFU/mL e in possesso di un'ureasi possono far virare tutti i pozzetti della galleria. La loro presenza può essere verificata risolvendo su agar cioccolato il mezzo di coltura originale UMMt AMIES conservato a 2-8 °C (§ 9.2). Un pH di prelievo basico (pH ≥ 8) può causare il viraggio del mezzo di coltura. In questo caso diluire il campione (1:10) in un altro mezzo di coltura UMMt AMIES e interpretare tenendo conto della diluizione.

Un pH di prelievo acido (pH ≤ 5) può rallentare la comparsa del viraggio di colore.

Un campione contenente sangue può causare un cambiamento di colore dei pozzetti della galleria MYCOFAST *RevolutioN* 2, interpretato come risultato positivo. In questo caso diluire il campione (1:10) in un altro mezzo di coltura UMMt e interpretare tenendo conto della diluizione. Un campione leggermente caricato di micoplasmi ($<10^3$ CCU/mL) può causare un viraggio casuale nei diversi pozzetti della galleria. Come per qualsiasi metodo di ricerca dei germi, il risultato del test dipende dalla qualità del campione. Un test negativo non indica quindi necessariamente l'assenza di infezione.

13 - PRESTAZIONI

13.1 Selezione e differenziazione - Identificazione e conteggio

Galleria MYCOFAST Screening *RevolutioN*

È stato effettuato uno studio comparativo utilizzando campioni vaginali clinici (n=87; per le 2 specie U.u. e M.h.) prelevati in tamponi secchi associati al mezzo di trasporto (Transwab e CVM - Medical Wire e Eswab - Copan).

I risultati ottenuti con MYCOFAST Screening *RevolutioN* vengono confrontati con il metodo di conteggio della microdiluizione liquida. Galleria MYCOFAST Screening *RevolutioN*

- Per lo screening delle 2 specie U.u. e M.h. la concordanza è del 97,7%.

Abbiamo elencato 2 falsi negativi U per tassi di 10^3 CCU/mL nel metodo di routine di laboratorio sapendo che questo tasso è considerato infra patologico per i campioni vaginali. Per U.u. e M.h. la concordanza globale è del 100% ai tassi superiori alla soglia patologica.

- Per la differenziazione, tutti i campioni analizzati hanno permesso di ottenere una corretta identificazione di U.u. o M.h. nei pozzetti della galleria MYCOFAST Screening *RevolutioN*.

13.2 Identificazione e conteggio

Metodo diretto galleria MYCOFAST *RevolutioN* 2

% di concordanza globale		U.u.	M.h.	U.u./M.h
Ceppi isolati (tasso $\leq 10^3$ CCU/mL) (vedere § 14.1.1 e nota 1)	lettura a 24h	88.9	NA*	NA*
	lettura secondo § 9.3	86.7	NA*	NA*
Ceppi isolati (tasso $\geq 10^4$ CCU/mL) (vedere § 14.1.1)	lettura a 24h	91	96.4	93.7
	lettura secondo § 9.3	82.1	92.5	87.3
Vaginale klinische Proben (vedere § 14.1.2)	lettura secondo § 9.3	88.2	100	94

NA *: non applicabile

13.2.1 - Su ceppi isolati

È stato condotto uno studio comparativo utilizzando 26 ceppi isolati (ceppi ATCC e ceppi di raccolta) testati separatamente (U.u. o M.h.) su 3 riferimenti del mezzo di trasporto (Sigma Transwab e Sigma VCM da Medical Wire e il kit di raccolta ESwab da BD) a diverse concentrazioni (per un totale di 279 test).

I risultati ottenuti sono confrontati con quelli ottenuti con il metodo del conteggio in microdiluizione liquida.

Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10^3 CCU/mL e lettura del risultato a 24h; la concordanza globale, per U.u. è dell'88,9% (abbiamo elencato 14 falsi positivi: 13 per tassi di 10^2 CCU/mL e uno per un tasso inferiore a 10^2 CCU/mL e 17 falsi negativi: 11 per tassi di 10^3 CCU/mL - 5 per tassi di 10^4 CCU/mL e uno per un tasso di 10^5 CCU/mL con il metodo di conteggio in micro-diluizione). Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10^4 CCU/mL e una lettura del risultato a 24 h; la concordanza globale per U.u. è del 91% (abbiamo elencato 18 falsi positivi:

per un tasso di $10^2 - 10^3$ CCU/mL e 7 falsi negativi: per tassi di $10^4 - 10^5$ CCU/mL con il metodo di conteggio in micro-diluizione).

La concordanza globale per M.h. è del 96,4% per una lettura del risultato a 24 h (abbiamo elencato un falso positivo a un tasso di 10^3 CCU/mL e 9 falsi negativi a tassi di 10^4 CCU/mL con il metodo di conteggio in micro diluizione).

La concordanza globale U.u. + M.h. con una lettura del risultato a 24 h è del 93,7%.

Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10^3 CCU/mL e una lettura del risultato secondo il protocollo descritto nella nota (§ 9.2); la concordanza globale per U.u. è dell'86,7% (abbiamo elencato 35 falsi positivi: 34 per tassi di 10^2 CCU/mL e uno per un tasso inferiore a 10^2 CCU/mL e 2 falsi negativi: per tassi di 10^3 CCU/mL con il metodo di conteggio in microdiluizione).

Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10^4 CCU/mL e una lettura del risultato secondo il protocollo descritto nella comunicazione (§ 9.2); la concordanza globale per U.u. è dell'82,1% (abbiamo elencato 49 falsi positivi: per un tasso di $10^2 - 10^3$ CCU/mL e 1 falso negativo: per tassi di 10^4 CCU/mL con il metodo di conteggio in microdiluizione).

La concordanza globale per M.h. è del 92,5% per una lettura del risultato secondo il protocollo descritto nella nota (§ 9.2) (abbiamo elencato 21 falsi positivi per un tasso di $10^2 - 10^3$ CCU/mL con il metodo di conteggio in microdiluizione).

La concordanza globale U.u. + M.h. con una lettura del risultato secondo il protocollo descritto nella nota (§ 9.3) è dell'87,3%.

13.2.2 - Su campioni clinici

È stato condotto uno studio comparativo su campioni vaginali clinici (n=59) prelevati in tamponi asciutti associati al mezzo di trasporto (Sigma Transwab e Sigma VCM da Medical Wire e il kit di raccolta ESwab da BD).

I risultati ottenuti con MYCOFAST *RevolutioN* 2 AMIES sono confrontati con il metodo di conteggio in microdiluizione liquida.

La concordanza globale per U.u. è dell'88,2% (abbiamo elencato 3 falsi negativi per tassi di $10^4 - 10^5 - 10^6$ CCU/mL e 4 falsi positivi per tassi $<10^2 - 10^2$ e 10^3 CCU/mL con il metodo di conteggio in microdiluizione).

Per Mh la concordanza globale è del 100%.

La concordanza globale U.u. + M.h. è del 94%

13.3 Test di sensibilità

Lo studio comparativo è stato condotto in un laboratorio nazionale di riferimento tra il metodo per determinare le concentrazioni inibitorie minime (MIC) in mezzi liquidi e il metodo MYCOFAST *RevolutioN* 2. I ceppi testati (7 *U. urealyticum*, 11 *U. parvum* e 16 *M. hominis*) sono ceppi di riferimento, ceppi clinici selvatici o ceppi che hanno sviluppato resistenze. Chaque souche est testée aux dilutions de $10^3 - 10^4$ et 10^5 CCU/mL dans l'UMMt 3 mL.

Per i tassi 10^4 e 10^5 CCU/mL, i risultati sono stati letti e interpretati dopo 24 ore di incubazione.

Per tassi di 10^3 CCU/mL, i risultati sono stati letti e interpretati dopo 48 ore di incubazione se il test è risultato negativo in 24 ore.

I risultati dei due metodi sono interpretati come sensibili (S) o resistenti (R) secondo le raccomandazioni del CLSI.

La concordanza globale per *U. urealyticum/U. parvum* è del 95,5%. La

concordanza globale per *M. hominis* è del 100%.

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

DM:Discordanza importante, DTM:Discordanza molto importante

a: Discordanza ottenuta a 10^3 CCU/mL (MIC di riferimento a 0,5 μ g/mL), 4 discordanza ottenuta a 10^5 CCU/mL (MIC di riferimento a 0,5 - 1 e 8 μ g/mL)- 1 e 8 μ g/mL).

b: 1 discordanza ottenuta a 10^5 CCU/mL (MIC di riferimento a 8 μ g/mL).

c: 1 discordanza ottenuta a 10^3 UCC/mL (MIC di riferimento a 8 μ g/mL);

1 discordanza ottenuta a 10^5 CCU/mL (MIC di riferimento a 2 μ g/mL)

d: 1 discordanza ottenuta a 10^5 CCU/mL (MIC di riferimento a 4 μ g/mL).

14 - SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

I rifiuti devono essere smaltiti in conformità con le norme e i regolamenti igienici in vigore per questo tipo di reagenti nel Paese di utilizzo.

15 - BIBLIOGRAFIA

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

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

3 - PEREYRE S., BEBEAR C.M., BEBEAR C. 2001. micoplasme pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplemento al numero 329, 34-36.

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. Ureaplasma urealyticum (T-strain Mycoplasma) and Mycoplasma hominis, p. 1713-1718. In MAN- DELL G.L., BENNETT J.E. e DOLIN R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4° ed., vol.2, Churchill Livingstone, New York.

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

6 - WAITES KEN B, DONNAM. CRABB, and LYNN B. DUFFY. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC-159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol.52, N. 10, 3776-3778.

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5° edizione)

I cambiamenti rispetto alla versione precedente sono evidenziate in grigio.

ELITech MICROBIO

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

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

