

MYCOFAST *Revolution* ATB +
Diagnosi di micoplasmi urogenitali
 Identificazione
 Conteggio
 Rilevamenti
 Sensibilità agli antibiotici
 25 test (REF 00070)

C €

Il ruolo patologico dei micoplasmi nelle infezioni urogenitali è soggetto a interpretazione in base a specifiche raccomandazioni (1,3,7). I tassi patologici solitamente utilizzati per *U. urealyticum* sono: $\geq 10^4$ CCU/mL per il

campionamento uretrale, $\geq 10^3$ CCU/mL per un primo getto di urina o sperma (anche se una nuova raccomandazione locale menziona una soglia ≥ 104 CCU/mL per lo sperma [7]). Per *M. hominis*, la sua presenza a un tasso $> 10^4$ CCU/mL in un campione cervico-vaginale è anormale (1,3).

10.2.2 Test di sensibilità (pozzetti da 4 a 24)

La reazione 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 considerati sensibili o resistenti agli antibiotici sulla base dei seguenti criteri di interpretazione definiti dal CLSI (2) per levofloxacin, moxifloxacin, clindamicina, tetraciclina, eritromicina e telitromicina. Per altri antibiotici, non ci sono concentrazioni critiche definite dal CLSI.

Criteri di interpretazione delle MIC in µg/mL (criteri di interpretazione definiti dal CLSI):

Il ceppo è detto sensibile quando la sua crescita è inibita alle due concentrazioni critiche dell'antibiotico.
Il ceppo è considerato resistente se:
1/ la crescita del ceppo per l'antibiotico è stata testata a una singola concentrazione.
2/ la crescita è a bassa concentrazione o in entrambe le concentrazioni dell'antibiotico per l'antibiotico testato in due concentrazioni.

Classe	Antibiotico	U.u.		M.h.		Commenti
		S	R	S	R	
Chinoloni	Levofloxacin*	≤ 2	≥ 4	≤ 1	≥ 2	
	Moxifloxacin*	≤ 2	≥ 4	≤ 0,25	≥ 0,5	
	Ofloxacin	≤ 1	> 1	≤ 1	> 1	
Lincosamidi	Clindamicina*	/	/	≤ 0,25	≥ 0,5	U.u. è naturalmente resistente alla clindamicina
Tetracidine	Tetraciclina*	≤ 1	≥ 2	≤ 4	≥ 8	I ceppi sensibili alla tetraciclina sono anche sensibili alla doxiciclina
	Minociclina	≤ 2	> 2	≤ 2	> 2	
Macrolidi	Eritromicina*	≤ 8	≥ 16	/	/	I ceppi sensibili all'eritromicina sono anche sensibili all'azitromicina. M.h. è naturalmente resistente all'eritromicina
	Roxitromicina	≤ 2	> 2	/	/	M.h. è naturalmente resistente alla roxitromicina
	Josamicina	≤ 2	> 2	≤ 2	> 2	
Ketolidi	telitromicina*	≤ 4	-	≤ 4	/	
Streptogramine	Pristamicina	≤ 2	> 2	≤ 2	> 2	

(* criteri di interpretazione definiti dal CLSI)

M. hominis è naturalmente resistente a 14 e 15 macrolidi di carbonio, comprese l'eritromicina e la roxitromicina, ma sensibile a 16 macrolidi di carbonio come la josamicina.
U. urealyticum è naturalmente resistente alle lincosamidi (clindamicina).
In alcune popolazioni il tasso di resistenza alla tetraciclina può raggiungere il 45% per Uu 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.
Ausilio per l'interpretazione:

Test di sensibilità U.u.

ATB*	LVX				MXF					TET					ERY		
CONC* (µg/mL)	1	2	4	int*	0.25	0.5	2	4	int*	1	2	4	8	int*	8	16	int*
Profili	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	S
	+	-	-	S	+	-	-	-	S	+	-	-	-	R	+	-	R
	+	+	-	R	+	+	-	-	S	+	+	-	-	R	+	+	R
	+	+	+	R	+	+	+	-	R	+	+	+	-	R	/	/	/
	/	/	/	/	+	+	+	+	R	+	+	+	+	R	/	/	/

*ATB = antibiotici, *CONC = concentrazione, *INT = interpretazioni

Test di sensibilità U.u.

ATB*	TEL		ROX		MIN		OFX		JOS		PRI	
CONC* (µg/mL)	4	int*	2	int*	2	int*	1	int*	2	int*	2	int*
Profili	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S	-	S
	+	/	+	R	+	R	+	R	+	R	+	R

Test di sensibilità M.h.

ATB*	LVX				MXF					TET					CLI		
CONC* (µg/mL)	1	2	4	int*	0.25	0.5	2	4	int*	1	2	4	8	int*	0.25	0.5	int*
Profili	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	S
	+	-	-	R	+	-	-	-	R	+	-	-	-	S	+	-	R
	+	+	-	R	+	+	-	-	R	+	+	-	-	S	+	+	R
	+	+	+	R	+	+	+	-	R	+	+	+	-	R	/	/	/
	/	/	/	/	+	+	+	+	R	+	+	+	+	R	/	/	/

Test di sensibilità M.h.

ATB*	TEL		ROX		MIN		OFX		JOS		PRI	
CONC* (µg / mL)	4	int*	2	int*	2	int*	1	int*	2	int*	2	int*
Profili	-	S	Resistenza naturale	-	S	-	S	-	S	-	S	
	+	/		+	R	+	R	+	R	+	R	

11 - CASI PARTICOLARI

Per tassi molto elevati in U.u. o M.h., si verifica un viraggio verso il rosso di tutti i pozzetti della galleria. In tal caso, si consiglia di eseguire una diluizione del campione per ottenere un risultato più accurato. In questo caso, procedere come segue:
Inoculare una nuova fiala di UMMt (3 ml.) con 300 µL di mezzo di coltura UMMt originale conservato a 2-8 °C (vedere § 9.1).
Inoculare una nuova galleria con l'ausilio del nuovo mezzo UMMt ottenuto.
Considerare la diluizione (1:10) per interpretare il conteggio. Confermare se necessario su agar A7 la presenza di micoplasmi isolando nuovamente a partire dal mezzo di coltura UMMt originale conservato a 2-8 °C (§ 9.1). Una temperatura di incubazione non costante o <36 °C (frequente apertura ed eterogeneità di

temperatura nel forno) può rallentare la cinetica di crescita dei micoplasmi.

12 - CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo di qualità può essere effettuato dai ceppi *U. urealyticum* o *M. hominis* del cofanetto MYCOPLASMA CONTROL (REF 00900) o da un ceppo di raccolta liofilizzato (*U. urealyticum* ATCC 27815 o *M. hominis* ATCC 23114) precedentemente calibrato per 104-5 CCU/mL. Inoculare la galleria MYCOFAST *RevolutioN* ABT+ e proseguire il test come indicato in questa nota (§ 9 e 10)
Risultati attesi di seguito (ATCC):

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

	CLI	TEL	ROX	MIN	OFX	JOS	PRI
Ceppo U.u. ATCC 27815	R	S	S/R	S	S/R	S	S
Ceppo M.h. ATCC 23114	S	S/R	R	S	S	S	S

13 - LIMITI DEL METODO

Alcuni batteri, presenti in quantità >10⁶⁻⁷ CFU/mL e e in possesso di un'ureasi possono far virare tutti i pozzetti della galleria. La loro presenza può essere verificata isolando nuovamente su agar cioccolato il mezzo di coltura originale UMMt conservato a 2-8 °C (§ 9.1).
Un pH basso del campione (pH ≥ 7) può causare il viraggio del mezzo di coltura. In questo caso diluire il campione (1:10) in un altro mezzo di coltura UMMt e interpretare tenendo conto della diluizione.
Un pH acido del campione (pH ≤ 5,5) può rallentare la comparsa del viraggio di colore.
Un campione contenente sangue può causare un cambiamento di colore dei pozzetti della galleria MYCOFAST *RevolutioN* ATB+, 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 con un carico debole di micoplasmi (<10³ CCU/mL) può causare un viraggio casuale nei diversi pozzetti della galleria. Come con qualsiasi altro metodo di ricerca dei germi, la qualità del campione determina il risultato del test. Pertanto, un test negativo non indica necessariamente un'assenza di infezione.

14 - RISULTATI

14.1 Identificazione - Conteggio

Percentuale di concordanza globale	U.u.	M.h.	U.u./M.h.
Ceppi isolati (tasso ≤10 ³ CCU / mL) (vedere § 14.1.1)	97,7	ND	ND
Ceppi isolati (tasso ≥ 10 ⁴ CCU/mL) (vedere § 14.1.1)	96,5	98,9	97,8
Campioni clinici vaginali	100	95,7	97,8
Campioni clinici liquidi: urina	96,6	97,7	97,1

N.A.: non applicabile

14.1.1 In ceppi isolati

Uno studio comparativo condotto utilizzando 21 ceppi isolati (ceppi ATCC e ceppi di raccolta), testati separatamente (Uu o Mh) con varie diluizioni (85 test in totale).
I risultati ottenuti sono confrontati con quelli ottenuti con altro metodo in mezzo liquido.
Per un'interpretazione con soglia patologica stabilita a 10³ CCU/mL; la

concordanza globale per Uu è del 97,7% (abbiamo registrato 2 falsi positivi per tassi di 10³ CCU/mL utilizzando il metodo di conteggio in micro-diluizione). Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10⁴ CCU/mL; la concordanza globale per U.u. è 96,5 % (abbiamo registrato 3 falsi positivi per tassi di 10³ CCU/mL utilizzando il metodo di conteggio in micro-diluizione). La concordanza globale per M.h. è del 98,9% (abbiamo registrato un falso positivo per un tasso di 10³ CCU/mL utilizzando il metodo di conteggio in micro-diluizione).

La concordanza totale U.u. e M.h. è del 97,8%.

14.1.2 Su campioni clinici

È stato condotto un primo studio comparativo su campioni clinici vaginali (n=23) prelevati in tamponi asciutti. I risultati ottenuti con MYCOFAST *RevolutioN* ATB+ vengono confrontati con il metodo di conteggio in micro-diluizione liquida.

La concordanza globale per U.u. è del 100% e per M.h. la concordanza globale è del 95,7% (abbiamo registrato un falso positivo per un tasso di 10² CCU/mL utilizzando il metodo della micro-diluizione liquida).

Un secondo studio comparativo è stato condotto utilizzando campioni clinici di urina (n=88).

I risultati sono stati letti e interpretati dopo 48 ore di incubazione se il test è risultato negativo entro 24 ore. La presenza di micoplasma è stata analizzata senza conteggio, come si consiglia di procedere in caso di prelievo di liquidi.

I risultati ottenuti con MYCOFAST *RevolutioN* ATB+ vengono confrontati con quelli ottenuti con un altro metodo in mezzo liquido.

La concordanza globale per l'U.u. è del 96,6% (abbiamo registrato 1 falso negativo per un tasso di 10⁴ CCU/mL con il metodo di conteggio della micro-diluizione e 2 falsi positivi per i tassi di 10² CCU/mL utilizzando il metodo di conteggio in micro-diluizione).

La concordanza globale per M.h. è del 97,7% (abbiamo registrato 2 falsi positivi per un tasso di 10² CCU/mL utilizzando il metodo di conteggio in micro-diluizione).

La concordanza totale U.u. e M.h. è del 97,1 %.

14.2 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* ATB+.

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. Ciascun ceppo viene testato a diluizioni di 10⁻³-10⁻⁴e 10⁻⁵ CCU/mL.

Per i tassi 10⁴ e 10⁵ CCU/mL, i risultati sono stati letti e interpretati dopo 24 ore di incubazione.

Per tassi di 10³ 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 *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum* è: 93,8% (394/420).

La concordanza globale per *Mycoplasma hominis* per i tassi a 10⁴e 10⁵ CCU/mL è: 93,4% (227/243).

Concor danza	Ureaplasma urealyticum / parvum (n=42)									
	TET	MIN	MXF	LVX	OFX	ERY	JOS	PRI	TEL	ROX
	39	38	37	40	34	41	42	42	42	39
DM	3	4	4	2	4	1	0	0	0	0
DTM	0	0	1 ^a	0	4 ^b	0	0	0	0	3 ^c

DM: Discordanza importante, DTM: Discordanza molto importante

a : Discordanza ottenuta a 10⁴ CCU/mL (MIC di riferimento a 4 µg/mL)

b : 1 discordanza ottenuta a 10³ CCU/mL (MIC di riferimento a 2 µg/mL), 1 discordanza a 10⁴ CCU/mL (MIC di riferimento a 1 µg/mL), 1 discordanza a 10⁵ CCU/mL (MIC di riferimento a 1 µg/mL), 1 mancata corrispondenza a 10⁴ CCU/mL (MIC di riferimento a 2 µg/mL)

c : 1 discordanza ottenuta a 10³ CCU/mL (MIC di riferimento a 2 µg/mL), 1 discordanza a 10⁴ CCU/mL (MIC di riferimento a 2 µg/mL), 1 discordanza a 10⁵ CCU/mL (MIC di riferimento a 4 µg/mL)

Concor danza	Mycoplasma hominis (n=27)								
	TET	MIN	MXF	LVX	OFX	JOS	PRI	TEL	CLI
	26	26	27	27	26	27	27	14	27
DM	0	0	0	0	0	0	0	13	0
DTM	1 ^a	1 ^b	0	0	1 ^c	0	0	0	0

a: Discordanza ottenuta a 104 CCU/mL (MIC di riferimento > 32 µg/mL)

b: Discordanza ottenuta a 10 5 CCU/mL (MIC di riferimento a 4 µg/mL)

c: Discordanza ottenuta a 10 5 CCU/mL (MIC di riferimento a 2 µg/mL)

15 - 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.

16 - 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. Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. Supplément au N°329, 34-36.

4 - TAYLOR-ROBINSON D. 1995. Ureaplasma urealyticum (T-strain Mycoplasma) and Mycoplasma hominis, p. 1713-1718. Dans Mandell G. L., Bennet J. E. and Dolin R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4. Ausg., Bd. 2, Churchill Livingstone, New York.

5 - WAITES Ken B. , Brenda Katz and Robert L. Schelonka. 2005. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. Clin. Microbiol. Rev. Vol.18 -N°4 -757-789.

6 - Waites KEN B, Donna M. Crabb, and Lynn B. DuGy. 2008. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC- 159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol. 52, No. 10, 3776–3778,5

7 - Rémic 2015 - Référentiel en Microbiologie Médicale (Société Française de Microbiologie) - (5. Ausgabe)

Le modifiche dalla revisione precedente sono evidenziate 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

