

MYCOFAST® Revolution 2

Diagnosi di micoplasmi urogenitali

Rilevamento

Conteggio

Identificazione

Sensibilità agli antibiotici

25 test (RIF. 00080)

CPB 0410_IT-2018-03

Esclusivamente per diagnostica *in vitro*, solo per uso professionale
I test sono monouso.



1 - OBIETTIVO

Il cofanetto MYCOFAST Revolution 2 consente il rilevamento, il conteggio e l'identificazione di *Ureaplasma Urealyticum* / *Ureaplasma parvum* (Uu) e di *Mycoplasma hominis* (Mh) a partire da diversi campioni clinici. Il cofanetto MYCOFAST Revolution 2 consente inoltre lo studio della sensibilità di Uu e Mh agli antibiotici secondo le raccomandazioni del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institutes) (2).

2 – INTRODUZIONE

Diverse specie censite a giorno I micoplasmi, che contano d'oggi negli esseri umani, appartengono alla classe dei mollicutes. Sono si distinguono da altri batteri per numerosi aspetti, tra cui l'assenza di parete che conferisce loro una resistenza naturale alle β -lattamine, unitamente a una membrana ricca di steroli provenienti dalle membrane delle cellule eucariote su cui si fissano. I micoplasmi sono organismi relativamente fragili, che non si moltiplicano in mezzo acellulare se non in presenza di molti fattori di crescita e a una temperatura ottimale di 37 °C (4).

La maggior parte dei micoplasmi umani è costituita da semplici commensali. Le specie isolate dal tratto urogenitale, *U. urealyticum* e *M. hominis* sono quelle riscontrate più spesso. La specie *U. urealyticum* è suddivisa in due biovarianti: *U. urealyticum* e *U. parvum* (Uu).

Uu o Mh possono comportarsi come veri e propri patogeni. Sono responsabili di infezioni genitali maschili (uretriti non gono-cocciche, epididimiti, prostatiti, infertilità); di infezioni ginecologiche (vagini batterica, endometrite, salpingite); di disturbi della riproduzione (corioamniotiti, endometriti post-partum, nascite premature, aborti spontanei); di esiti neonatali (basso peso alla nascita, infezioni respiratorie, neurologiche, batteriemie, ascessi); di infezioni extragenitali (artrite settica, artrite reattiva, altre localizzazioni) (1).

La diagnosi delle infezioni da micoplasmi dipende dalla determinazione di una soglia patologica e quindi da un conteggio. La comparsa di resistenza di Uu e Mh a determinate molecole porta a eseguire un test di sensibilità agli antibiotici (5,6). Gli antibiotici testati e i criteri di interpretazione sono appropriati per il trattamento delle infezioni da micoplasmi nel tratto urogenitale o in altri organi extra-genitali (2).

3 – PRINCIPIO

MYCOFAST Revolution 2 è un metodo liquido basato sulla capacità di Uu e Mh di metabolizzare l'urea e l'arginina. La crescita dei micoplasmi in mezzo liquido è visualizzata mediante il viraggio di un indicatore colorato, il rosso di fenolo, dal giallo-arancione al rosso fucsia che rispecchia l'alcalinizzazione del mezzo a causa della liberazione di ammoniaca.

La crescita del micoplasma così visualizzata permette:

- il conteggio basato sul tasso di idrolisi dei substrati che proporzionale alla quantità di germi contenuti nel campione;
- lo studio della sensibilità di Uu e Mh agli antibiotici.

Nel caso di campioni misti (Uu + Mh), il test consente di interpretare le sensibilità di ciascuna specie agli antibiotici testati.

4 – REAGENTI

Descrizione	Quantità
UMMT: Fiala da 3 ml di brodo di micoplasmi con antibiotici e conservante.	25
MYCOFAST® Revolution 2: Galleria di 24 pozzetti confezionata in bustina di alluminio con essiccante integrato.	25
Sistema di chiusura: Coperchio protettivo della galleria inocolata in plastica traslucida.	25

La galleria MYCOFAST Revolution 2 contiene, in forma disidratata nei 24 pozzetti, il mezzo di coltura dei micoplasmi (siero di cavallo, estratto di lievito, cisteina, arginina, urea, rosso di fenolo, antibiotici, pH:6,1 \pm 0,1) e si compone di 2 parti separate:

- la parte destinata al conteggio e alla valutazione della sensibilità agli antibiotici per la specie Uu (pozzetti marcati in nero sull'etichetta);
- la parte destinata al conteggio e alla valutazione della sensibilità agli antibiotici per la specie Mh (pozzetti marcati in rosso sull'etichetta).

		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 $\geq 10^4$	MYCOFAST® Revolution 2										2	DOX
	Uu 10^3											1	
1	Uu 10^4	2	4	2	4	8	16	1	2				
	Uu $\geq 10^5$	LVX		MXF		ERY		TET					
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

Parte destinata alla diagnostica della specie Uu (in nero):

Pozzetti 1/2/3: Identificazione e conteggio di Uu per tassi di 10^3 , 10^4 e $\geq 10^5$ UCC/mL (soluzione tamponata e lincomicina che inibisce la crescita di Mh).

Pozzetti 4/5: Valutazione della sensibilità di Uu alla levofloxacina (LVX) a 2/4 μ g/mL

Pozzetti 6/7: Valutazione della sensibilità di Uu alla moxifloxacina (MXF) a 2 / 4 μ g/mL

Pozzetti 8/9: Valutazione della sensibilità di Uu all'eritromicina (ERY) a 8 / 16 μ g/mL

Pozzetti 10/11: Valutazione della sensibilità di Uu alla tetraciclina (TET) a 1-2 μ g/mL

Pozzetti 12/13: Valutazione della sensibilità di Uu alla doxiciclina (DOX) 1-2 μ g/mL

Parte destinata alla diagnosi della specie Mh (in rosso):

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

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

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

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

Pozzetti 21/22: Valutazione della sensibilità di Mh alla clindamicina (CLI) a 0,25-0,5 μ g/mL

Pozzetti 23/24: Valutazione della sensibilità di Mh alla tetraciclina (TET) a 4-8 μ g/mL

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 fessivi, 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 il metodo MYCOFAST indica colonizzazione da micoplasmi urogenitali, ma non può essere utilizzato da solo per eseguire 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 di campioni

Tamponi cervico-vaginali:

Utilizzare esclusivamente un tampone dacron o rayon, o un cito spazzolino. Eseguire il prelievo dopo un'accurata eliminazione delle secrezioni dell'esocollo con un primo tampone.

I micoplasmi presentano una forte affinità per le cellule cose cui aderiscono, è essenziale raschiare bene la mucosa per ottenere una buona resa.

Campioni uretrali:

Pulire il meato e prelevare mediante tampone o raschiamento delle cellule.

Sperma, urina:

Raccogliere lo sperma o il primo getto di urina in una fiala sterile.

6.2 Trasporto in mezzo UMMT

Prelievo su tampone asciutto:

Scaricare il tampone in una fiala di mezzo UMMT da 3 mL

Campioni liquidi:

Inoculare una fiala di mezzo UMMT da 3 ml con 300 μ l di liquido omogeneizzato

6.3 Conservazione in mezzo UMMT

Una volta inoculato, il mezzo UMMT può essere conservato a temperatura ambiente (18-25°C) per 20 ore, oppure a 2-8°C per 56 ore.

Per la conservazione per 3 giorni a -20°C, aggiungere preventivamente 2 gocce di "MYCOPLASMA Stabilizer".

7 - PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti sono pronti per l'uso. I reagenti conservati a 2-8 °C nello stato originale sono stabili fino alla data di scadenza indicata sul cofanetto.

Il mezzo UMMT può essere conservato temporaneamente (3 mesi) a temperatura ambiente ma presenta una stabilità migliore a 2-8°C.

Non congelare i reagenti del cofanetto.

8 - MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Materiale di campionamento (tamponi, cito spazzolini, fiale sterili per la raccolta di campioni liquidi), pipette e coni di trasferimento MYCOPLASMA Stabilizer (RIF. 00064); forno calibrato a 37 \pm 1°C. Contenitore per rifiuti contaminati e oli minerali

9 - MODALITÀ OPERATIVA

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

9.1 Inoculazione della galleria

Rimuovere la pellicola adesiva tirando la linguetta e dispensare successivamente nei pozzetti:

pozzetti 1-24 100 μ l di mezzo UMMT inoculato
pozzetti 1-24 2 gocce di olio minerale

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

Identificare il campione.

Conservare l'eccesso della fiala UMMT a 2-8 °C per almeno 48 ore per consentire un'eventuale verifica.

9.2 Incubazione della galleria

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

Per i conteggi Uu e Mh 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.

10 - LETTURA E INTERPRETAZIONE

10.1 Convalida

Verificare che tutti i pozzetti della galleria siano limpidi. Un pozzetto torbido indica una contaminazione batterica. In questo caso, ripetere l'analisi.

10.2 Lettura e interpretazione

La lettura dei risultati consiste nell'identificazione delle colorazioni ottenute nei vari pozzetti della galleria. 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 rimane giallo.

Una colorazione arancione deve essere considerata un test positivo (tasso limite). Nel caso di una lettura del risultato in 48 ore di campione liquido con un test negativo in 24 ore, registrare solo la presenza di micoplasma rilevato senza conteggio. Per l'interpretazione del test, consultare la scheda dei risultati.

10.2.1 Conteggio (pozzetti 1, 2, 3 e 14)

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

1	tasso Uu di 10 ³	UCC/mL
1 e 2	tasso Uu di 10 ⁴	UCC/mL
1, 2 e 3	tasso Uu ≥ 10 ⁵	UCC/mL
14	tasso Mh ≥ 10 ⁴	UCC/mL

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:

≥10⁴ UCC/mL per un campione uretrale, ≥10³ UCC/mL per un primo getto di urina o sperma (anche se una nuova raccomandazione locale menziona una soglia di ≥10⁴ UCC/mL per lo sperma (7)). Per *M. hominis* la sua presenza a un tasso ≥10⁴ UCC/mL in un tampone cervico-vaginale è anormale (1, 3).

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

Il viraggio del mezzo 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	Uu		Mh		Commenti
		S	R	S	R	
Chinoloni	Levofloxacina	≤2	≥4	≤1	≥2	
	Moxifloxacina	≤2	≥4	≤0,25	≥0,5	
Lincosamidi	Clindamicina			≤0,25	≥0,5	
Tetracidine	Tetraciclina	≤1	≥2	≤4	≥8	
	Doxiciclina	≤1	≥2	≤4	≥8	
Macrolidi	Eritromicina cina	≤8	≥16			I ceppi sensibili all'eritromicina lo sono anche all'azitromicina

Ausilio per l'interpretazione:

Test di sensibilità agli antibiotici per Uu

Antibiotico	LVX			MXF			ERY			TET			DOX		
	2	4	int*	2	4	int*	8	16	int*	1	2	int*	1	2	int*
Profili	-	-	S	-	-	S	-	-	S	-		S	-	-	S
	+	-	R	+	-	R	+	-	R	+		R	+	-	R
	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R	+	+	R

Test di sensibilità agli antibiotici per Mh

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 Uu e il 39,6% per Mh (2). Sono state descritte resistenze ai chinoloni (Uu e Mh) (5, 6) e alla clindamicina (Mh), ma la prevalenza non è nota.

11 - CASI PARTICOLARI

Per tassi molto elevati in Uu o Mh, 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 UMMt da 3 ml con 300 µl di mezzo di coltura originale conservato a 2-8 °C (§ 9.1).

Inoculare una nuova galleria con il nuovo mezzo UMMt 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 di coltura UMMt 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.

12 - CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo qualità può essere eseguito da ceppi *U. urealyticum* o *M. hominis* del cofanetto MYCOPLASMA CONTROL (RIF. 00900) o da un ceppo di raccolta liofilizzato (*U. urealyticum* ATCC 27815 o *M. hominis* ATCC 23114) precedentemente calibrato a 10⁴⁻⁵ UCC/mL. Inoculare la galleria MYCOFAST *Revolution* 2 e proseguire il test come indicato in questa nota (§ 9 e 10).

Ecco i risultati attesi (ATCC).

MYCOFAST *Revolution* 2

	Uu 10 ⁵	Uu 10 ⁴	Uu ≥10 ³	Mh ≥10 ⁴	LVX	MXF	ERY	TET	DOX	CLI
Ceppo Uu ATCC 27815	+	+	+/-	-	S	S	S	S/R	S	NI*
Ceppo Mh ATCC 23114	-	-	-	+	S/R	S	NI*	S	S	S

NI*(non interpretabile)

13 - LIMITI DELLA METODOLOGIA

Alcuni batteri presenti in quantità >10⁶⁻⁷ UFC/mL e in possesso di un'ureasi possono far virare tutti i pozzetti della galleria. La loro presenza può essere verificata reisolando su agar cioccolato il mezzo di coltura originale UMMt conservato a 2-8°C (§ 9.1).

14 - PRESTAZIONI

14.1 Identificazione - Conteggio

% di concordanza globale	Uu	Mh	Uu/Mh
Ceppi isolati tasso ≤ 10 ³ UCC/mL (vedere § 14.1.1)	97,4	NA*	NA*
Ceppi isolati tasso ≥ 10 ⁴ UCC/mL (vedere § 14.1.1)	93,4	93,4	93,4
Campioni vaginali clinici (vedere § 14.1.2)	100	100	100
Campioni clinici liquidi - urina (vedere § 14.1.2)	93,2	96,6	94,9

NA* (non applicabile)

14.1.1 Su ceppi isolati

È stato condotto uno studio comparativo utilizzando 21 ceppi isolati (ceppi ATCC e ceppi di raccolta) testati separatamente (Uu o Mh) a diverse concentrazioni (76 test in totale).

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

Per un'interpretazione con soglia patologica impostata a 10³ UCC/mL; la concordanza globale per Uu è del 97,4% (abbiamo elencato 2 falsi positivi per tassi a 10² UCC/mL con il metodo del conteggio in microdiluzione).

Per un'interpretazione con soglia patologica fissata a 104 UCC/ml; la concordanza globale per Uu è del 93,4% (abbiamo elencato 5 falsi positivi per tassi a 10³ UCC/mL con il metodo del conteggio in microdiluzione). La concordanza globale per Mh è del 93,4% (abbiamo elencato 5 falsi positivi, 4 per tassi di 10³ UCC/mL e uno per un tasso di 10² UCC/mL con il metodo del conteggio in microdiluzione). La concordanza globale Uu e Mh è del 93,4%.

14.1.2 Su campioni clinici

Un primo studio comparativo è stato condotto su campioni vaginali clinici (n=23) prelevati in tamponi asciutti. I risultati ottenuti con MYCOFAST *Revolution* 2 sono confrontati con un metodo di conteggio in microdiluzione.

La concordanza globale per Uu e Mh è del 100%.

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

I risultati ottenuti con MYCOFAST *Revolution* 2 sono confrontati con quelli ottenuti con il metodo utilizzato abitualmente in laboratorio.

La concordanza globale per Uu è del 93,2% (abbiamo registrato 1 falso negativo per un tasso di 10³ UCC/mL con il metodo di conteggio in micro diluizione et 5 falsi positivi per tassi di 10² UCC/mL, conteggio in micro diluizione)

La concordanza globale per Mh è del 96,6% (abbiamo registrato 3 falsi positivi per tassi di 10² - 10³ UCC/mL, conteggio in micro diluizione).

La concordanza globale per Uu e Mh è del 94,9%.

14.2 Test di sensibilità agli antibiotici

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 10³ - 10⁴ et 10⁵ UCC/mL dans l'UMMt 3 mL.

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

Per tassi di 10³ UCC/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%.

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

DM: Discrepanza importante, DTM: Discordanza molto importante

- a : 1 discordanza ottenuta a 10³ UCC/ml (MIC di riferimento 0,5 µg/mL),
 4 discordanze ottenute a 10⁵ UCC/ml (MIC di riferimento 0,5 - 1 e 8 µg/mL).
 b : 1 discordanza ottenuta a 10⁶ UCC/ml (MIC di riferimento 8 µg/mL).
 c : 1 discordanza ottenuta a 10³ UCC/ml (MIC di riferimento 8 µg/mL);
 1 discordanza ottenuta a 10⁵ UCC/ml (MIC di riferimento 2 µg/mL).
 d : 1 discordanza ottenuta a 10⁶ UCC/ml (MIC di riferimento 4 µg/mL).

15 - ELIMINAZIONE 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. I micoplasmi en 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 Mandell G. L., Bennet J. E. e Dolin R. (ed.). Principles and Practices of Infectious Diseases, 4^o ed., vol. 2, Churchill Livingstone, New York.

5 - WAITES Ken B., Brenda Katz e 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 e 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, 3776-3778.5

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

MYCOFAST® è un marchio registrato di ELITech MICROBIO



ELITech MICROBIO
 Parc d'activités du Plateau
 19, allée d'Athènes
 83870 SIGNES
 FRANCE
 Tél. : 04 94 88 55 00