

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	
Tetracicline	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 10^3 UCC/ml (MIC di riferimento 0,5 µg/mL),
 4 discordanze ottenute a 10^5 UCC/ml (MIC di riferimento 0,5 - 1 e 8 µg/mL).
 b : 1 discordanza ottenuta a 10^6 UCC/ml (MIC di riferimento 8 µg/mL).
 c : 1 discordanza ottenuta a 10^3 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 10^6 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° 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° 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