

# Saggio microbiologico

**REF**

M0205

20 test

## ***Mycoplasma IES***

Saggio basato su un terreno di coltura disidratato per la rilevazione qualitativa, la conta indicativa, l'identificazione e i test di sensibilità agli antibiotici di *Ureaplasma urealyticum* (UU) e di *Mycoplasma hominis* (MH) isolati dal tratto urogenitale umano. La selezione degli antibiotici si basa parzialmente sulle raccomandazioni CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Tutti i marchi commerciali appartengono ai rispettivi proprietari.

### Legenda dei simboli grafici impiegati

**LOT**

codice lotto



data di scadenza



fabbricante



contenuto sufficiente per &lt;n&gt; test

**IVD**dispositivo  
medico-diagnostico *in vitro*

intervallo di temperatura

**REF**

numero catalogo



consultare le istruzioni per l'uso

EC

REP

rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

EC REP

OBELIS S.A  
Bd. Général Wahis, 53  
1030 Bruxelles  
BelgioAUTOBIO DIAGNOSTICS CO., LTD  
No.87 Jingbei Yi Road  
National Eco & Tech Development Area  
Zhengzhou  
Cina  
450016

Per assistenza tecnica scrivere in lingua inglese all'indirizzo  
e-mail: [customerservice@autobio.com.cn](mailto:customerservice@autobio.com.cn)

Consultare i rivenditori locali per ottenere informazioni su tutti i prodotti nella propria lingua madre

## Introduzione

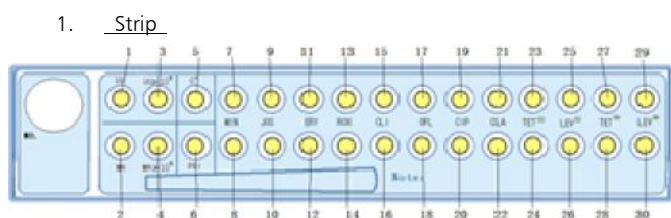
I micoplasmi rappresentano uno dei principali agenti patogeni responsabili di uretriti non gonococciche (NGU), cervicite, malattia infiammatoria pelvica, orchite, epididimite, ecc., e possono, inoltre, causare sterilità negli uomini e nelle donne<sup>1</sup>. Questi agenti patogeni sono in grado di attaccare e distruggere le cellule epiteliali del tratto urogenitale e possono rappresentare dei cofattori nella patogenesi dell'AIDS e di altre malattie sessualmente trasmesse. I micoplasmi (soprattutto UU e MH) possono causare malattie sessualmente trasmesse. La loro incidenza è sempre più in aumento. La resistenza agli antibiotici sta diventando sempre più preoccupante a causa dell'uso scorretto degli antibiotici, con grave pericolo per la salute umana.<sup>2</sup> La chiave per il trattamento e la prevenzione della diffusione dei micoplasmi è una tempestiva e accurata diagnosi. La coltura è tuttora un metodo affidabile nel diagnosticare l'infezione da micoplasmi.

## Principio del test

Il kit per la ricerca dei micoplasmi si basa sulla loro coltura e su reazioni biochimiche. Il terreno di coltura si ricostituisce miscelando il diluente con il terreno in polvere liofilizzato. Durante la coltura dei micoplasmi, l'urea viene idrolizzata dall'ureasi prodotta da UU con rilascio di  $\text{NH}_3$ <sup>3</sup>, e l'arginina viene degradata da MH con rilascio di  $\text{NH}_3$ . Poiché l' $\text{NH}_3$  fa innalzare il pH del terreno liquido, il risultato si valuta in base al cambiamento di colore dell'indicatore. La strip contiene 11 antibiotici. Se i micoplasmi rilevati sono sensibili all'antibiotico, l'attività dell'enzima è inibita, quindi non si rileva alcun cambiamento di colore.

## Componenti

|                                 |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| Strip                           | 20                     |
| Terreno in polvere liofilizzato | 20 flaconcini × 1,2 ml |
| Diluente                        | 20 flaconcini × 4 ml   |
| Olio minerale                   | 1 flacone × 28 ml      |



La strip contiene 30 pozetti ed è suddivisa in 3 sezioni.

### 1.1 Coltura e identificazione (pozzetti n. 1, 2, 5)

Pozzetto n. 5 (C+): controllo positivo.

Pozzetto n. 1 (UU): identificazione di *U. urealyticum*.

Pozzetto n. 2 (MH): identificazione di *M. hominis*.

| Pozzetto | Test | Substrato principale |
|----------|------|----------------------|
| N. 5     | C+   | N/A                  |
| N. 1     | UU   | Lincomicina          |
| N. 2     | MH   | Eritromicina         |

### 1.2 Conta (pozzetti n. 3 e 4)

Pozzetto n. 3 ( $\text{UU} \geq 10^4$ ): conta di *U. urealyticum*.

Pozzetto n. 4 ( $\text{MH} \geq 10^4$ ): conta di *M. hominis*.

| Pozzetto | Test                  | Substrato principale           |
|----------|-----------------------|--------------------------------|
| N. 3     | $\text{UU} \geq 10^4$ | Lincomicina e agente inibente  |
| N. 4     | $\text{MH} \geq 10^4$ | Eritromicina e agente inibente |

*Mycoplasma* IES

### 1.3 Test di sensibilità (pozzetti n. 6 - 30)

I seguenti pozzetti consentono di effettuare il saggio di sensibilità del ceppo nei confronti di 11 antibiotici.

| Pozzetto   | Antibiotico e abbreviazione |                   | Concentrazione mg/L |     |
|------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|-----|
| N. 6       | Pristinamicina              | PRI               | 2                   |     |
| N. 7 e 8   | Minociclina                 | MIN               | 2                   | 8   |
| N. 9 e 10  | Josamicina                  | JOS               | 2                   | 8   |
| N. 11 e 12 | Eritromicina                | ERY               | 8                   | 16  |
| N. 13 e 14 | Roxitromicina               | ROX               | 1                   | 4   |
| N. 15 e 16 | Clindamicina                | CLI               | 0,25                | 0,5 |
| N. 17 e 18 | Ofloxacina                  | OFL               | 1                   | 4   |
| N. 19 e 20 | Ciprofloxacina              | CIP               | 1                   | 2   |
| N. 21 e 22 | Claritromicina              | CLA               | 1                   | 4   |
| N. 23 e 24 | Tetraciclina                | TET <sup>UU</sup> | 1                   | 2   |
| N. 25 e 26 | Levofloxacina               | LEV <sup>UU</sup> | 2                   | 4   |
| N. 27 e 28 | Tetraciclina                | TET <sup>MH</sup> | 4                   | 8   |
| N. 29 e 30 | Levofloxacina               | LEV <sup>MH</sup> | 1                   | 2   |

Alcuni antibiotici presenti nella strip seguono le interpretazioni indicate in tabella:<sup>4</sup>

| Antibiotici  |               | UU |    | MH   |     | Commenti                                                                             |
|--------------|---------------|----|----|------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Classe       | Farmaco       | S  | R  | S    | R   |                                                                                      |
| Chinoloni    | Levofloxacina | 2  | 4  | 1    | 2   |                                                                                      |
| Macrolidi    | Eritromicina  | 8  | 16 | -    | -   | I microrganismi sensibili all'eritromicina saranno sensibili anche all'azitromicina  |
| Lincosamidi  | Clindamicina  | -  | -  | 0,25 | 0,5 |                                                                                      |
| Tetracicline | Tetraciclina  | 1  | 2  | 4    | 8   | I microrganismi sensibili alla tetraciclina saranno sensibili anche alla doxiciclina |

Nota: S indica sensibile, R indica resistente. Questa tabella si basa sul documento CLSI M43-A, "Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing For Human Mycoplasmas".<sup>4</sup>

### 2. Terreno in polvere liofilizzato

20 flaconcini ciascuno contenente 1,2 ml di peptone di origine bovina e infusione di cuore di bue. Contiene agenti inibenti. La crescita di microrganismi interferenti è inibita, mentre la crescita dei micoplasmi è favorita.

### 3. Olio minerale

1 flacone contenente 28 ml di paraffina liquida.

### 4. Diluente

20 flaconcini ciascuno contenente 4 ml di soluzione da utilizzare per dissolvere la polvere liofilizzata.

Dopo la ricostituzione della polvere liofilizzata con il diluente, la composizione sarà la seguente.

#### formula in g/L di acqua purificata

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Peptone di origine bovina      | 7,3 g  |
| Estratto di lievito            | 2,5 g  |
| Infusione di cuore di bue      | 6,6 g  |
| Urea                           | 3,6 g  |
| Arginina cloridrato            | 3,6 g  |
| Miscela di sali                | 797 ml |
| Siero di cavallo               | 181 ml |
| Rosso fenolo                   | 6 ml   |
| Miscela di fattori di crescita | 7 ml   |
| Miscela di antibiotici         | 9 ml   |
| pH = 6,3 ± 0,3                 |        |

#### 5. Istruzioni per l'uso

#### 6. 20 schede cartacee per la registrazione dei risultati

#### 7. 20 puntali per pipette

### Materiale richiesto ma non fornito

1. Tamponi per il prelievo dei campioni
2. Incubatore batteriologico (36°C, 37°C, 38°C)

### Precauzioni e avvertenze

1. Solo per uso professionale. Prodotto monouso.
2. Seguire attentamente le istruzioni. L'affidabilità dei risultati del test non potrà essere garantita in caso di deviazioni dalle istruzioni fornite nel presente documento.
3. Far riferimento alle schede di sicurezza e all'etichetta dei prodotti per eventuali informazioni riguardanti la pericolosità dei reagenti.
4. Quando si maneggiano i campioni e reagenti, indossare guanti monouso. Lavare le mani alla fine dell'operazione.
5. Condurre i test in condizioni idonee, per esempio non operare in ambienti contenenti acidi forti, basi forti o gas volatili, ecc.
6. La crescita dei micoplasmi nel terreno non deve generare torbidità. Questo kit ha adottato un metodo esclusivo per inibire efficacemente la crescita di batteri irrilevanti (inclusa l'inibizione di *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella enteritidis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pyogenes* e *Klebsiella pneumoniae*, ecc.). Se la miscela del terreno occasionalmente dovesse mostrare torbidità e diventare rossa, ciò non sta a indicare un risultato positivo.
7. Se dopo aver inoculato i pozzetti per il saggio di sensibilità dovesse osservarsi in tutti i pozzetti una colorazione più intensa o rosso-chiara, significa che si è in presenza di un'eccessiva alcalinità del campione prelevato da pazienti in condizioni patologiche. In questi casi si raccomanda di analizzare nuovamente i campioni di secreto dei pazienti.
8. Per eseguire il saggio di sensibilità agli antibiotici di campioni risultati positivi su normali terreni di coltura per micoplasmi, dispensare nel terreno ricostituito 50 µl di campione positivo e procedere con le analisi indicate di seguito. Il re-inoculo deve essere eseguito prima che il fondo del flaconcino diventi rosso, altrimenti il pH del terreno aumenterà causando la morte rapida dei micoplasmi e limitando pertanto la possibilità di un re-inoculo.
9. I campioni, i flaconi dei reagenti e le strip per il test devono essere considerati come materiali potenzialmente infettivi e devono

essere manipolati in conformità con le pratiche dei laboratori di biosicurezza.

10. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.
11. Non miscelare o utilizzare componenti di kit provenienti da lotti diversi.
12. Non usare flaconi il cui contenuto risulti torbido.
13. Non usare strip danneggiate: pozzetti deformati, sacchetti essiccanti aperti o buste laminate rotte.
14. I dati delle prestazioni presentati in questo documento sono stati ottenuti con la procedura indicata in queste istruzioni. Qualsiasi variazione o modifica della procedura può compromettere i risultati dei test.
15. Poiché i micoplasmi hanno alta affinità per le membrane composte da cellule mucose, è importante raschiare molto bene la mucosa in modo da raccogliere il maggior numero possibile di cellule.
16. I campioni vanno raccolti prima di somministrare qualsiasi terapia a base di antibiotico.
17. Utilizzare una tecnica standardizzata per prevenire la contaminazione da parte di altri microrganismi.
18. Un campione non può essere considerato negativo prima che siano trascorse 24 ore di incubazione.
19. Se il titolo del campione è basso, i pozzetti delle strip potrebbero non produrre un viraggio di colore, oppure dar luogo a un viraggio aleatorio.
20. La quantizzazione nei test eseguiti sulle strip può dare solo un'indicazione del titolo. Il titolo esatto può essere determinato su agar.
21. I risultati dei test di sensibilità agli antibiotici dei campioni non tengono conto del titolo dei micoplasmi presenti nel prelievo. In caso di bassi titoli, la reale sensibilità del ceppo può essere diversa dal risultato ottenuto con la strip.
22. Un risultato negativo alla più bassa concentrazione di un antibiotico, e positivo alla più alta concentrazione, non ha alcun significato. In questo caso è necessario ripetere il test.
23. Se la confezione esterna risulta danneggiata, è ancora possibile utilizzare il kit. Se invece risulta danneggiato l'involucro interno a diretto contatto con la strip o se sono cambiate le prestazioni analitiche, non utilizzare il kit.

### Conservazione

1. Conservare il kit a 2-8°C.
2. Dopo l'apertura, la strip deve essere utilizzata entro 8 ore.
3. Non utilizzare i terreni di coltura ricostituiti da oltre 72 ore dalla miscelazione del terreno in polvere con il diluente.
4. Utilizzare il brodo inoculato entro 8 ore se conservato a 18-28°C o 48 ore se conservato a 2-8°C.
5. Dopo l'apertura, l'olio minerale deve essere utilizzato secondo le condizioni ed entro la data di scadenza riportate in etichetta.
6. Durante il trasporto, conservare il kit a basse temperature e al riparo dalla luce. Il kit va spedito mantenendo la catena del freddo.

### Campione

1. In caso di inoculo del campione nel terreno ricostituito, procedere con l'inoculo entro 4 ore. In casi particolari, conservare i campioni a 2-8°C e inoculare entro 24 ore.
2. Se il campione viene prelevato e trasportato con tampone floccato e sistema UTM™, conservare il tampone floccato in UTM™ a temperatura ambiente (18-25°C) per un massimo di 24 ore. Per intervalli più lunghi, il campione in UTM™ va conservato a 2-8°C per un massimo di 48 ore.

3. In caso di inoculo del campione direttamente nel diluente (il diluente inoculato può essere utilizzato come terreno di trasporto), procedere con la coltura entro 24 ore se il campione è stato conservato a temperatura ambiente (18-25°C) o entro 48 ore se conservato a 2-8°C.
4. Per il prelievo dei campioni endocervicali e uretrali impiegare esclusivamente tamponi in Dacron, rayon o cotone, o una citospazzola; prima della raccolta, pulire scrupolosamente il collo dell'esocervice o il meato con un primo tampone.  
Nota: i micoplasmi aderiscono strettamente alle cellule mucose. Il rivestimento mucoso va raschiato bene per ottenere un'abbondante quantità di campione. Inoculare il campione nel diluente o nel terreno di coltura ricostituito ed eliminare il tampone.
5. Per i campioni di urina, raccogliere il primo mitto di urina in un contenitore sterile. Utilizzare una pipetta per inoculare 500 µl di urina omogeneizzata nel diluente o nel terreno di coltura ricostituito.
6. Per gli altri tipi di campione, per esempio liquido seminale o campioni liquidi meno frequenti, raccogliere i campioni in contenitori sterili. Inoculare 25 µl di liquido seminale nel diluente o nel terreno di coltura ricostituito.

## Preparazione dei reagenti

1. Prima dell'uso, equilibrare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-25°C).
2. Tarare il termostato a 37°C.

## Procedura di analisi

1. Campione prelevato e analizzato nella stessa sede
  - i. Rigenerare il terreno di coltura liofilizzato con l'intero contenuto del diluente. Chiudere il flaconcino e agitare per miscelare bene il contenuto.
  - ii. Stemperare il tampone contenente il prelievo nel terreno di coltura ricostituito, oppure dispensare 500 µl di urine del primo mitto o 25 µl di liquido seminale. Chiudere il flaconcino e agitare per miscelare bene il contenuto.
  - iii. Dispensare 100 µl di terreno di coltura inoculato in ciascun pozzetto della strip. Agitare delicatamente la strip per dissolvere i materiali adesivi.
  - iv. Aggiungere una goccia di olio minerale. (L'olio minerale dispensato deve coprire l'intera superficie del liquido presente nel pozzetto per evitare l'evaporazione del terreno di coltura e quindi causare risultati inaccurati).
  - v. Coprire la strip con un coperchio. Incubare a 36-38°C per 24 ore. Leggere quindi i risultati.
2. Campione prelevato e trasportato nel diluente e trasferito in altra sede
  - i. Nella sede di raccolta del campione, stemperare nel diluente il tampone contenente il prelievo del paziente o dispensare nel diluente 500 µl di urine del primo mitto o 25 µl di liquido seminale. Quindi inviare il diluente inoculato al laboratorio che effettuerà l'analisi.
  - ii. Rigenerare il terreno di coltura liofilizzato con l'intero contenuto del diluente inoculato. Chiudere il flaconcino e agitare per miscelare bene il contenuto.
  - iii. Dispensare 100 µl di terreno di coltura inoculato in ciascun pozzetto della strip. Agitare delicatamente la strip per dissolvere i materiali adesivi.
  - iv. Aggiungere una goccia di olio minerale. (L'olio minerale dispensato deve coprire l'intera superficie del liquido presente nel

pozzetto per evitare l'evaporazione del terreno di coltura e quindi causare risultati inaccurati).

- v. Coprire la strip con un coperchio. Incubare a 36-38°C per 24 ore. Leggere quindi i risultati.
3. Campione prelevato e trasportato in UTM™ (Universal Transport Medium) e trasferito in altra sede
    - i. Rigenerare il terreno di coltura liofilizzato con l'intero contenuto del diluente.
    - ii. Dispensare nel terreno ricostituito 400 µl di UTM™ inoculato. Chiudere il flaconcino e agitare per miscelare completamente il contenuto.
    - iii. Dispensare 100 µl di terreno di coltura inoculato in ciascun pozzetto della strip. Agitare delicatamente la strip per dissolvere i materiali adesivi.
    - iv. Aggiungere una goccia di olio minerale. (L'olio minerale dispensato deve coprire l'intera superficie del liquido presente nel pozzetto per evitare l'evaporazione del terreno di coltura e quindi causare risultati inaccurati).
    - v. Coprire la strip con un coperchio. Incubare a 36-38°C per 24 ore. Leggere quindi i risultati.

## Interpretazione dei risultati

Leggere il cambiamento di colore avvenuto nella strip. Se il colore vira all'arancione, rosso o rosa-carico, vi è crescita dei micoplasmi; se non si verifica alcun cambiamento di colore, il test potrebbe essere considerato negativo o essere presenti micoplasmi sensibili agli antibiotici; in alcuni rari casi, dopo un'incubazione di 24 ore, il terreno di coltura potrebbe assumere una colorazione rosso-pallida (per es. non vira in maniera evidente). In questo caso si raccomanda di prolungare il tempo di incubazione di ulteriori 12-24 ore. (Il paziente potrebbe presentare un'infezione recente da micoplasmi, o essere in via di guarigione o sotto trattamento antibiotico, avendo perciò un debole titolo di micoplasmi nel campione o un'inibizione operata dagli antibiotici. Conseguentemente, il viraggio di colore potrebbe non essere evidente). Il ceppo risulta sensibile quando è inibito da entrambe le concentrazioni di antibiotici, presenta sensibilità intermedia quando è inibito dalla concentrazione maggiore e non inibito dalla concentrazione minore, risulta resistente quando non è inibito né dalla concentrazione maggiore né da quella minore.

La tabella seguente illustra come procedere alla lettura dei risultati in base al colore dei pozzetti della strip.

|          | Coltura e identificazione |                      |    | Conta                |                      | Test di sensibilità (mg/L)                                                                                                   |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      |     |          |     |     |     |                   |                   |                   |                   |
|----------|---------------------------|----------------------|----|----------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----|----------|-----|-----|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Pozz.    | C+                        | UU                   | MH | UU ≥ 10 <sup>4</sup> | MH ≥ 10 <sup>4</sup> | PRI                                                                                                                          | MIN | JOS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | ERY  | ROX | CLI      | OFL | CIP | CLA | TET <sup>UU</sup> | LEV <sup>UU</sup> | TET <sup>MH</sup> | LEV <sup>MH</sup> |
|          |                           |                      |    |                      |                      | 2                                                                                                                            | 2/8 | 2/8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 8/16 | 1/4 | 0.25/0.5 | 1/4 | 1/2 | 1/4 | 1/2               | 2/4               | 4/8               | 1/2               |
| Negativo | Giallo                    |                      |    | Giallo               |                      | Giallo                                                                                                                       |     | Giallo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |      |     |          |     |     |     |                   |                   |                   |                   |
| Positivo | Da arancione a rosso      | Da arancione a rosso |    | Da arancione a rosso |                      | Da arancione a rosso                                                                                                         |     | Da arancione a rosso                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |     |          |     |     |     |                   |                   |                   |                   |
| Note     | UU e/o MH positivo        | UU                   | MH | UU ≥ 10 <sup>4</sup> | MH ≥ 10 <sup>4</sup> | Un cambiamento di colore indica resistenza all'antibiotico; nessun cambiamento di colore indica sensibilità all'antibiotico. |     | Nessun cambiamento di colore in entrambi i pozzetti indica sensibilità all'antibiotico; un cambiamento di colore nel pozzetto superiore e nessun cambiamento di colore nel pozzetto inferiore indica sensibilità intermedia all'antibiotico; un cambiamento di colore in entrambi i pozzetti indica resistenza all'antibiotico. |      |     |          |     |     |     |                   |                   |                   |                   |

In caso di bassi titoli (per esempio 10<sup>3</sup> UCC/ml), il viraggio si produrrà unicamente nei pozzetti 1 (UU) e 2 (MH) e nel pozzetto C+, mentre i pozzetti 3 e 4 risulteranno negativi.

Si noti che le soglie patologiche generalmente citate per *U. urealyticum* sono: ≥10<sup>4</sup> UCC/ml per campioni uretrali, > 10<sup>3</sup> UCC/ml per il 1° mitto di urine e liquido seminale. La soglia patologica per *M. hominis* in campioni endocervicali è ≥10<sup>4</sup> UCC/ml.

Poiché la concentrazione dell'antibiotico pristinamicina è unica, il ceppo è resistente quando il pozzetto diventa rosso, mentre è sensibile quando il pozzetto rimane di colore giallo. Secondo le linee guida CLSI, la sensibilità all'eritromicina è applicabile anche all'azitromicina, mentre la sensibilità alla tetraciclina è applicabile anche alla doxiciclina.

### Procedura di controllo

Per il controllo di questa analisi si raccomanda di acquistare i ceppi di riferimento (UU (ATCC® 27813) e MH (ATCC® 15488)). Coltivare il ceppo ATCC® 27813 nel terreno ricostituito. Incubare fino a quando il terreno sarà virato al rosso chiaro, poi eseguire una sottocoltura in un altro flaconcino di terreno ricostituito e incubare fino a quando il terreno di coltura non sarà virato al rosso chiaro. Preparare una diluizione 1:1000 di questo terreno di coltura con soluzione salina sterile e aggiungere 100 µl a un nuovo terreno di coltura ricostituito. Inoculare la strip con questa coltura finale. Il risultato è valido se il colore dei pozzetti C+, UU, UU ≥ 10<sup>4</sup>, CLI (alta e bassa concentrazione), OFL (bassa concentrazione) e CIP (alta e bassa concentrazione) vira all'arancione, rosso o al pesca. Analizzare il ceppo ATCC® 15488 con la modalità indicata precedentemente. Il risultato è valido se il colore dei pozzetti C+, MH, MH ≥ 10<sup>4</sup>, ERY (alta e bassa concentrazione), CLA (alta e bassa concentrazione) e ROX (alta e bassa concentrazione) si trasforma da giallo all'arancione, al rosso o al pesca.

### Limitazioni della procedura

- Il presente saggio deve intendersi solamente come ausilio alla diagnosi clinica. Effettuare il presente test unitamente ad altre valutazioni: esame clinico, anamnesi del paziente o risultati di altri test.
- Un numero molto limitato di campioni alcalini potrebbe causare il viraggio al rosso del terreno, in quanto il presente test si basa sulla coltura e su reazioni biochimiche, e il conseguente aumento del pH porta al cambiamento di colore del terreno ricostituito.
- Poiché l'abuso clinico di antibiotici porta all'emergere di un piccolo numero di ceppi resistenti ai farmaci, potrebbe prodursi un numero veramente esiguo di risultati falsamente positivi, nonostante l'adozione di diversi antibiotici nel terreno di coltura per inibire i batteri di scarso rilievo clinico per questo tipo di campione. Pertanto si consiglia, laddove possibile, di confermare i campioni positivi piastrando i micoplasmi su agar.

### Valutazione delle prestazioni

#### 1. Prestazioni con i vari ceppi

Con il terreno ricostituito sono stati rilevati positivi, indipendentemente dalle diluizioni, 12 ceppi puri di micoplasmi inoculati a 2 diluizioni, nonché 3 miscele di UU e MH a 2 diluizioni. Inoltre, sono stati valutati un totale di 19 ceppi potenzialmente interferenti in campioni urogenitali. Gli isolati batterici sono stati valutati a una concentrazione di 0,5 McFarland ed è stato effettuato un inoculo di 100 µl prelevati da ciascuna soluzione batterica. I risultati sono stati tutti negativi. Per quanto riguarda la strip, 3 ceppi puri di micoplasma inoculati a 2 diluizioni, nonché 6 miscele di UU e MH a 2 diluizioni sono stati correttamente identificati dalla strip. 12 ceppi puri di micoplasmi sono stati coltivati nel terreno ricostituito fino a quando non si è ottenuto un viraggio di colore rosso chiaro e quindi sono stati diluiti alla concentrazione di 10<sup>4</sup> UCC/ml e analizzati. I corrispondenti pozzetti UU ≥ 10<sup>4</sup> o MH ≥ 10<sup>4</sup> sono diventati rossi. Sono stati analizzati 3 ceppi puri di UU a 2 diluizioni per un 6 volte. Il colore del pozzetto CLI (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 6 prove, il colore del pozzetto CIP (bassa concentrazione) è diventato rosso in 3 prove, il colore del pozzetto CIP (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 3 prove, il colore del pozzetto TET<sup>UU</sup> (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 4 prove, il colore del pozzetto OFL (bassa concentrazione) è diventato rosso in 3 prove, il colore del pozzetto OFL (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 1 prova, il colore del pozzetto MIN (bassa concentrazione) è diventato rosso in 1 prova, il colore del pozzetto MIN (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 3 prove, il colore dei pozzetti PRI, ERY, ROX, JOS, CLA, LEV<sup>UU</sup> (alta e bassa concentrazione) è rimasto arancione in 6 prove. Sono stati analizzati 3 ceppi puri MH a 2 diluizioni per 6 volte. Il colore dei pozzetti ERY, CLA e ROX (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 6 prove, il colore dei pozzetti OFL (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 4 prove, il colore dei pozzetti LEV<sup>MH</sup> (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 4 prove, il colore del pozzetto CIP (bassa concentrazione) è diventato rosso in 1 prova, il colore del pozzetto CIP (alta e bassa concentrazione) è diventato rosso in 3 prove, il colore dei pozzetti MIN, PRI, JOS, CLI, TET<sup>MH</sup> (alta e bassa concentrazione) è rimasto arancione in 6 prove.

#### 2. Accuratezza della misurazione per correlazione

È stato condotto uno studio in cui i campioni sono stati analizzati utilizzando il presente test e altri due test in commercio nella UE. Il campione veniva considerato positivo quando almeno due dei tre saggi producevano un risultato positivo. Al contrario, il campione veniva considerato negativo quando non vi era concordanza sulla positività di almeno 2 test. La presente tecnica di valutazione è definita Gold Standard Amplificato. Il confronto tra il presente test e il Gold Standard Amplificato è riportato di seguito.

Confronto tra il presente saggio e il Gold Standard Amplificato

|  | Gold standard amplificato | totale |
|--|---------------------------|--------|
|--|---------------------------|--------|

|               |          | positivo | negativo |     |
|---------------|----------|----------|----------|-----|
| questo saggio | positivo | 48       | 2        | 50  |
|               | negativo | 0        | 89       | 89  |
|               | totale   | 48       | 91       | 139 |

Secondo il metodo del  $\chi^2$ ,  $P > 0,05$ , non vi sono evidenti differenze tra i due metodi.

## Bibliografia

1. Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, et al. *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998;13(10):2756-2761.
2. Rylander M, Hallander HO. In vitro comparison of the activity of doxycycline, tetracycline, erythromycin and a new macrolide, CP 62993, against *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1988;53:12-17.
3. Murray P. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . 2011 Methods For Antimicrobial Susceptibility Testing For Human Mycoplasmas; Linee guida approvate. Documento CLSI M43-A.Vol. 31-N°19.