

## MycoView ID

Kit per l'identificazione di *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma hominis*

### 1- INDICAZIONI D'USO

Il kit MycoView ID consente l'identificazione e la differenziazione dei micoplasmi urogenitali: *Ureaplasma* spp. (*Ureaplasma urealyticum/Ureaplasma parvum*) e *Mycoplasma hominis*, a partire da diversi tipi di campioni urogenitali.

### 2- INTRODUZIONE

I micoplasmi appartengono al gruppo *Mollicutes*; sono organismi pleomorfi e il loro diametro varia tra 0,2 e 0,3 µm. Sono gli unici procarioti ad essere privi di parete cellulare e questa peculiarità conferisce loro una resistenza intrinseca a molti comuni agenti antimicrobici (beta-lattamici, rifampicina, polimixina).

Dei sette tipi di micoplasmi riscontrati nel tratto uro-genitale, *Mycoplasma hominis* (M.h) e *Ureaplasma* spp (U.u) sono quelli isolati con maggior frequenza. Queste due specie possono essere presenti come flora commensale in una percentuale fino al 40% delle persone asintomatiche.

In certe circostanze essi si moltiplicano eccessivamente, dando luogo ad una serie di patologie:

- Infezioni da micoplasma del tratto urogenitale femminile

Vaginosi: Anche se il contributo del M.h alla patogenesi delle vaginosi batteriche (VB) non è chiaro, le donne con VB hanno più probabilità di colture positive per M.h.

Inflammazioni pelviche (IP): M.h e U.u, come organismi presenti nella flora commensale dell'area genitale, possono avere un ruolo nelle IP.

Febbre post-parto: M.h è la specie che contribuisce alla febbre post-parto in alcune pazienti, essendo presumibilmente responsabile di endometriti nel tratto genitale.

Infezioni neonatali: Nelle donne in gravidanza, U.u può comportare corio-amnioniti e rottura prematura delle membrane con conseguente rischio di infezioni neonatali.

Entrambe le specie sono state descritte come causa di meningiti neonatali, infezioni del tratto respiratorio e setticemia.

Aborto e nascita di feti morti: L'associazione tra mortalità fetale e colonizzazione da micoplasmi genitali rimane controversa, sebbene U.u sia stato ritenuto responsabile di problemi riproduttivi.

- Infezioni da micoplasma del tratto urogenitale maschile

Uretriti non gonococciche (UNG): U.u è la causa più frequente di UNG (15-20%) dopo *Chlamydia trachomatis*; M.h non causa UNG.

Prostatiti ed epididimiti: U.u può esserne la concausa nel 10-15% dei casi e può avere un ruolo eziologico nelle epididimiti.

Questi organismi possono essere isolati con successo da differenti siti: vagina, cervice, curettaggi endometriali, fluido amniotico, uretra, urina, sperma e altri (per esempio tessuto fetale o placentare, fluido peritoneale, fluido sinoviale).

Qualsiasi metodo utilizzato per raccogliere i campioni richiede che siano raccolte le cellule a cui i micoplasmi sono adesi.

Poiché i micoplasmi sono molto sensibili all'essiccamento, dovrà essere utilizzato un mezzo di trasporto liquido dopo la raccolta del campione.

La coltura dovrà essere iniziata il prima possibile: U.u cresce nel terreno di Shepard convenzionale contenente urea, ad un valore di pH prossimo a 6; M.h cresce nelle stesse condizioni di coltura di U.u ed in terreni contenenti arginina, ad un pH di 7,2. In terreni di coltura liquidi, la crescita è segnalata dal cambiamento di colore da parte di un indicatore; U.u e M.h rendono il mezzo di coltura alcalino in un intervallo di tempo che va dalle 18 alle 48 ore.

L'isolamento dei micoplasmi, quando presenti nella flora commensale del tratto genitale, rende l'interpretazione difficile. Potrebbe essere necessario un test quantitativo: esso si esprime in termini di unità di cambiamento di colore (CCU). I livelli di intervento proposti sono  $\geq 10^4$  CCU/ml per campioni uretrali ed endocervicali e  $10^3$  CCU/ml per campioni di urina o sperma.

farmaci potenzialmente più efficaci che vengono utilizzati per il trattamento dei micoplasmi sono Tetracicline, Fluoroquinolonici, Macrolidi e antibiotici correlati.

### 3- PRINCIPIO DEL TEST

Il principio di funzionamento del kit MycoView ID si basa sulle proprietà metaboliche specifiche e sulla resistenza naturale di ogni specie di micoplasma:

- **U.u:** Idrolisi dell'urea e resistenza alla lincomicina;
- **M.h:** Idrolisi dell'arginina e resistenza all'eritromicina;
- La crescita delle due specie viene visualizzata mediante un cambiamento di colore dell'indicatore di pH da giallo-arancio a rosso-rosa.

La composizione della strip nel kit MycoView ID può essere così schematizzata:

N° pozzetto	Denominazione	Descrizione del test
1	<b>C</b>	Controllo della crescita
2	<b>U.u</b>	Identificazione di specie U.u da campione $\geq 10^4$ CCU/ml
3	<b>M.h</b>	Identificazione di specie M.h da campione $\geq 10^4$ CCU/ml
4	<b>L</b>	Test di resistenza alla Lincomicina (8 $\mu$ g/ml); il test rileva anche U.u a bassi livelli ( $10^3$ CCU/ml)
5	<b>E</b>	Test di resistenza all' Eritromicina (4 $\mu$ g/ml); il test rileva anche M.h a bassi livelli ( $10^3$ CCU/ml)

### 4- CONTENUTO DEL KIT

Componenti	Quantità	Conservazione
Brodo di trasporto: 2 ml di reagente liquido per il trasporto per micoplasmi urogenitali	20 flaconcini	+2/+8°C
Terreno di coltura: terreno liofilizzato contenente brodo pplo e substrati di estratto di lievito e cisteina (urea e arginina), arricchimento, siero di cavallo, miscela di antibiotici selettivi e rosso fenolo	20 flaconcini	+2/+8°C
Strip MycoView ID: 2 strip di 5 pozzetti sigillati in una bustina di alluminio con essiccante	10 set	+2/+8°C
Rack per incubazione di 4 strip con coperchio	1	N/A
Supporto per terreni di coltura (10 flaconcini)	1	N/A
Olio di paraffina (6,5 ml)	2	Temp. ambiente
Puntali	20	Temp. ambiente
Tamponi	20	Temp. ambiente

### 5- PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Tutti i reagenti sono pronti all'uso. I reagenti vanno conservati a +2/+8°C nelle loro singole confezioni fino alla data di scadenza indicata nel kit.

Non congelare i reagenti.

Se si utilizza una sola strip del kit MycoView ID , la seconda strip può essere conservata a +2/+8°C per circa un mese, ben richiusa nella sua bustina originale con all'interno l'essiccante.

### 6- MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

Provette sterili o bottiglie per i campioni, pipette (100  $\mu$ l), contenitore per rifiuti biologici, incubatore a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 7- PRECAUZIONI

- Il test è destinato al solo uso in vitro;
- Leggere le istruzioni attentamente prima dell'utilizzo del prodotto;
- Non utilizzare il materiale oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione;
- Non utilizzare mai contemporaneamente reagenti appartenenti a kit diversi;

- Fare attenzione a riporre il coperchio corretto sopra ad ogni flaconcino onde evitare contaminazioni fra i campioni;
- Utilizzare un nuovo puntale per ogni campione e per ogni test;
- Come materiale di prelievo, utilizzare solo dispositivi con punta in Dacron o rayon, evitare l'uso di tamponi con asta in legno;
- Provvedere all'eliminazione di tutti i campioni e i materiali utilizzati nel test come rifiuti a rischio biologico.

## 8- RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

### CAMPIONI ENDOCERVICALI E URETRALI

- Usare solo tamponi con punta in Dacron o rayon o una spazzola di prelievo per raccogliere i campioni;
- Raccogliere il campione dopo che il meato è stato accuratamente pulito con un primo tampone;

**NOTA:** i micoplasmi aderiscono fortemente alle cellule mucose. Il rivestimento mucoso deve essere ben raschiato per ottenere un campione abbondante.

Inoculare un flaconcino di brodo di trasporto (T Broth) ed eliminare il tampone.

### URINA

- Raccogliere il primo getto di urina in una bottiglia sterile;
- Inoculare un flaconcino di brodo di trasporto (T Broth) con 200 µl di urina.

### ALTRI CAMPIONI

- Sperma o altri campioni liquidi meno comuni sono raccolti in una bottiglia sterile;
- Inoculare un flaconcino di brodo di trasporto (T Broth) con 200 µl dei campioni.

### NOTA/TRASPORTO E CONSERVAZIONE

Il test colturale dovrebbe essere iniziato il prima possibile; tuttavia il brodo di trasporto inoculato può essere conservato al massimo per 8 ore a temperatura ambiente (18-25 °C) o per 48 ore a 2-8 °C.

## 9- METODO

### PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Preparare tanti flaconcini di terreno di coltura e strip MycoView ID quanti sono i flaconcini di brodo di trasporto inoculati;
- Portare i reagenti a temperatura ambiente (per circa 20 minuti) prima di iniziare il test.

### INOCULO DEL TERRENO DI COLTURA

- Ricostituire un flaconcino di terreno di coltura con un flaconcino di brodo di trasporto inoculato;
- Il colore del terreno di coltura completamente ricostituito dovrebbe essere giallo-arancio (pH  $6,6 \pm 0,1$ );
- Miscelare delicatamente con una pipetta il terreno inoculato 4-5 volte prima di inoculare la strip MycoView ID.

### INOCULO E INCUBAZIONE DELLA STRIP MYCOVIEW ID

- Identificare la strip;
- Usando l'invito, rimuovere la pellicola adesiva dalla strip e buttarla;
- Aggiungere 100 µl di terreno di coltura ricostituito ai 5 pozzetti della strip;
- Aggiungere due gocce di olio di paraffina a ciascun pozzetto;
- Posizionare la strip sul rack di incubazione, chiudere con il coperchio e incubare a  $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$
- Il terreno di coltura in eccesso può essere conservato a 2-8 °C per 48 ore in caso di test di conferma (vedi punto 11);
- In caso di campioni endocervicali e uretrali, incubare la strip a  $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  per 24 ore e leggere i risultati;
- L'incubazione può essere prolungata sino a 48-72 ore con campioni di urina, sperma o altri campioni meno comuni.

## 10- RISULTATI E INTERPRETAZIONE

Verificare che tutti i 5 pozzetti della strip siano limpidi; l'aspetto torbido di un pozzetto indica una contaminazione batterica o fungina. In queste condizioni, il test deve essere ripetuto;

I risultati sono determinati dal cambio di colore ottenuto nei diversi pozzetti;

La crescita dei micoplasmi urogenitali è evidente quando il colore del terreno vira al rosso o rosa intenso (più alcalino);

Il terreno rimane di colore giallo-arancio o vira al giallo se non si è verificata crescita di micoplasmi urogenitali.

**IDENTIFICAZIONE E TITOLAZIONE DIFFERENZIALE DELLE SPECIE DI MICOPLASMI UROGENITALI**

Verificare il controllo della crescita (pozzetto 1) prima di leggere gli altri test/pozzetti.

**IDENTIFICAZIONE DI U.U DOPO 24 ORE DI INCUBAZIONE**

I pozzetti N° 2 e N° 4 sono positivi; identificazione di U.u con un valore significativo superiore o uguale a  $10^4$  CCU/ml; se soltanto il pozzetto N° 4 è positivo, U.u è presente nel campione con una bassa concentrazione (inferiore a  $10^4$  CCU/ml);

**IDENTIFICAZIONE DI M.H DOPO 24-48 ORE DI INCUBAZIONE**

I pozzetti N° 3 e N° 5 sono positivi; identificazione di M.h con un valore significativo superiore o uguale a  $10^4$  CCU/ml; se soltanto il pozzetto N° 5 è positivo, M.h è presente nel campione con una concentrazione inferiore a  $10^4$  CCU/ml;

**NOTA:**

I livelli di concentrazione compresi nell'intervallo di  $10^3$ - $10^4$  CCU/ml sono considerati valori soglia di patogenicità:

- In caso di uretrite,  $10^3$  CCU/ml U.u nell'urina maschile;
- $10^4$  CCU/ml per U.u in campioni uretrali maschili e per U.u e M.h in campioni endocervicali o vaginali;
- L'incubazione della strip può essere prolungata fino a 48 ore in caso di identificazione di M.h; il cambiamento di colore è per lo più al rosso e più raramente al rosa intenso.

**NOTA:**

- In caso di risultato positivo per M.h, le letture dei pozzetti devono essere eseguite dopo 48 ore di incubazione;
- Dal momento che l'inoculo non è standardizzato, il test di resistenza deve essere interpretato con cautela (per esempio, un debole cambio di colore può essere osservato con fluorochinolone nei test in vitro su alti livelli di micoplasmi, con nessun difetto nel trattamento del paziente).

**11- CASI PARTICOLARI**

Campioni contenenti elevate concentrazioni sia di U.u che di M.h determinano il viraggio di tutti i pozzetti al rosso o al rosa. Il campione deve quindi essere diluito per ottenere un risultato definito.

Procedere come segue:

- Verificare l'assenza di contaminazione batterica o fungina (i pozzetti devono essere limpidi);
- Inoculare un nuovo flaconcino di brodo di trasporto (T Broth) con 200 µl del terreno di coltura originariamente inoculato e conservato a 2-8 °C;
- Ricostituire un nuovo flaconcino di terreno di coltura con il reagente di trasporto così inoculato fresco, e inoculare una nuova strip;
- Interpretare i risultati tenendo conto della diluizione.

**12- CONTROLLO DI QUALITÀ**

- Scongela i ceppi di collezione (per esempio U.u ATCC 27618 o ATCC 27815) a temperatura ambiente;
- Inoculare un terreno completo 1:10 con il ceppo e incubare a  $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  per 20-24 ore;
- Inoculare un terreno da poco ricostituito con 200 µl della pre-coltura omogeneizzata;
- Eseguire il test come descritto nel metodo (Punto 9);
- Dopo 24 ore il risultato atteso è l'identificazione di U.u con crescite nei pozzetti N° 1, N° 2 e N° 4.

**13- LIMITAZIONI D'USO**

Come per tutti i metodi microbiologici, i risultati dipendono in larga misura da come il campione è stato raccolto. Un risultato positivo con il test MycoView ID indica la presenza di micoplasmi urogenitali, ma la loro identificazione nel tratto uro-genitale non è necessariamente equivalente ad un'infezione. I risultati positivi del test devono essere correlati alla situazione clinica del paziente e a una stima di probabilità che i micoplasmi urogenitali possano avere un ruolo nel processo infettivo.

**14- PERFORMANCE**

Uno studio indipendente eseguito in un laboratorio privato francese ha messo a confronto le prestazioni del test MycoView ID ai metodi di coltura tradizionali.

I campioni sono stati raccolti in doppio. 202 campioni sono stati presi in esame in questo studio.

U.u: identificazione, analisi quantitativa su micropiastra usando il terreno liquido U9.



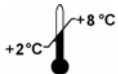


M.h: identificazione, analisi quantitativa sul terreno agarizzato A7.

Il test MycoView ID ha mostrato una sensibilità del 93,3% ed una specificità del 93,6%. Il generale accordo di MycoView ID con i tradizionali metodi colturali è del 93,5%.

### 15- BIBLIOGRAFIA

- **Kenny G.E.** . Mycoplasmas, p. 407-411. *In* A. Balows , W.J. Hausler, Jr, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5<sup>th</sup> ed. ASM, Washington, D.C.
- **Peyreyre S., C.M. Bébéar et C. Bébéar.** 2001. Les mycoplasmes en pathologie humaine. R.F.L. **329 (supp.)** : 34-36.
- **Taylor-Robinson D.** 1996. Infections due to species of mycoplasma and ureaplasma : an update. Clin. Infect. Dis. **23** : 671-684.
- **Taylor-Robinson D., and C. Bébéar.** 1997. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. J. Antimicrob. Chemother. **40** : 622-630.

### 16- SIMBOLOGIA

<b>IVD</b>	In Vitro diagnostic use		Data di scadenza		Consultare le istruzioni per l'uso incluse nel kit
<b>LOT</b>	N° di lotto		Conservare tra +2°C / +8°C		
<b>REF</b>	N° di catalogo		Numero di test (20)		Prodotto da

**Zeakon Diagnostics S.A.R.L.**11 Rue Alfred de Vigny  
25000 Besancon - FRANCE

Distribuito in Italia da Biolife Italiana S.r.l.

### CONFEZIONE

**302030 MycoView ID 20 tests****IVD****CE**