

# Valutazione comparativa dei sistemi Mycoplasma IST 2 e Mycofast Screening Evolution 2 nelle infezioni uro-genitali da *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*

Romano Mattei, Arnaldo Savarino

Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Campo di Marte, Lucca

## Comparison of two commercialised methods “Mycoplasma IST 2” and “Mycofast Screening Evolution 2” for the culture, identification, enumeration and susceptibility testing of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*

### SUMMARY

Numerous transport and growth medium systems have been developed for enhanced growth of genital mycoplasmas. In this investigation a total of 161 patient specimens were cultured on the Urée-Arginine LYO 2 screening broth from the Mycoplasma IST 2 kit, on the U.M.M.lyo regenerated screening broth from the Mycofast Screening Evolution 2 kit and on A7 agar as control of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* culture. Rates of recovery of these organisms with commercial kits were compared with the standard culture on A7 agar. We evaluated the performance of both screening test: a) Urée-Arginine LYO 2 screening broth test sensitivity was 100%, specificity 96.2%, positive predictive value 93.2% and negative predictive value 100%; b) U.M.M.lyo regenerated screening broth test sensitivity was 80%, specificity 100%, positive predictive value 100% and negative predictive value 90.6%.

The results of the identification and enumeration obtained on A7 agar complied a) with Mycoplasma IST 2 strip for 100% of *M. hominis* and 85% of *U. urealyticum* b) with Mycofast Screening Evolution 2 strip for 50% of *M. hominis* and 100% of *U. urealyticum*.

According our study Urée-Arginine LYO 2 screening broth is an optimal medium for the recovery of *M. hominis* and *U. urealyticum*.

Moreover we confirmed the screening positive tests evaluating sensitivity and specificity through the agar test culture. The Mycoplasma IST 2 strip gives an indicative enumeration and for this reason it is necessary a sub-culture on A7 agar for any positive screening.

This study shows that Mycofast Screening Evolution 2 does not allow an optimal recovery of the genital mycoplasmas, particularly *M. hominis* and for this reason we recommend the combination of Mycofast Screening Evolution 2 with A7 agar.

We have also studied susceptibilities of *M. hominis* and *U. urealyticum* to different antibiotics and their association with *G. vaginalis*.

### INTRODUZIONE

I micoplasmi sono i più piccoli batteri a vita libera, sia come dimensione cellulare sia per l'estrema piccolezza del loro genoma (13). Essi sono privi di parete cellulare e questo li rende resistenti ai  $\beta$ -lattamici. I micoplasmi sono inclusi nella classe dei *Mollicutes* che comprende la famiglia *Mycoplasmataceae* a cui appartengono due generi responsabili di infezioni umane *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Nell'uomo *Mycoplasma* e *Ureaplasma* si localizzano prevalentemente sulle mucose dell'apparato respiratorio e genitourinario e comprendono diverse specie, alcune delle quali vivono come commensali mentre altre sono associate a malattia (21, 22, 25).

*Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* sono le specie patogene più frequentemente isola-

te dall'apparato genitourinario; la trasmissione dell'infezione può avvenire per contatto sessuale o in modo verticale dalla madre al figlio (4, 21, 22, 25).

Il frequente isolamento di *M. hominis* e *U. urealyticum* nell'apparato urogenitale di donne e uomini sani fa pensare a un loro ruolo commensale anche se diversi lavori sembrano dimostrare la loro patogenicità. In particolare *U. urealyticum* si ritiene responsabile di uretriti non-gonococciche (18, 25) ed alcuni autori suggeriscono un suo ruolo eziologico nella sindrome uretrale acuta delle donne (16).

*M. hominis* è stato isolato dall'endometrio e dalle tube di Falloppio in circa il 10% di donne con malattia infiammatoria pelvica, diagnosticata tramite laparoscopia, e la sua presenza è tipicamen-

te accompagnata da una specifica risposta anticorpale (23). *M. hominis* è implicato come agente eziologico anche di infezioni intramniotiche (3, 6), febbre post-partum (11), endometrite post-partum (26) e di pielonefrite (24).

I micoplasmi non causano vaginiti, ma essi sono fra i vari microrganismi che proliferano in pazienti con vaginosi batterica e possono contribuire alle manifestazioni cliniche (8, 9, 23, 25).

La trasmissione verticale dalla madre, colonizzata da micoplasmi urogenitali, al feto al momento del parto o durante la gravidanza può avvenire nel 18-55% dei casi (4, 25). In genere la colonizzazione dei neonati è transitoria e senza sequele anche se in una percentuale molto bassa di casi, in neonati con basso peso alla nascita, può essere causa di polmonite congenita, batteriemia e meningite (4, 25).

Si ignora se i micoplasmi siano causa di infertilità nella donna (17, 25).

Numerosi terreni differenziali e selettivi e kit commerciali sono stati formulati per favorire la crescita dei micoplasmi genitali (2, 5, 15). È raccomandazione corrente di coltivare il campione sia su agar solido sia su brodo liquido (5).

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la sensibilità e la specificità di due sistemi, il Mycoplasma IST 2 ed il Mycofast Screening *EvolutioN* 2, specificatamente formulati per lo screening, l'identificazione, la numerazione e l'antibiogramma di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis*.

Abbiamo utilizzato come sistema di riferimento, per l'identificazione e la numerazione, la coltura su agar A7 (5, 15) della ditta bioMérieux.

Secondariamente abbiamo valutato l'associazione con *Gardnerella vaginalis* e la sensibilità di *Mycoplasma hominis* e/o *Ureaplasma urealyticum* verso alcuni antibiotici.

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 161 campioni (134 tamponi endocervicali, 4 tamponi uretrali, 7 campioni di sperma e 16 campioni d'urina) ottenuti da pazienti afferenti al Laboratorio Analisi dell'Ospedale Campo di Marte di Lucca.

Per lo screening, l'identificazione, la numerazione e l'antibiogramma di *Ureaplasma urealyticum* e di *Mycoplasma hominis* sono stati utilizzati i kit Mycoplasma IST 2 della ditta bioMérieux ed il Mycofast Screening *EvolutioN* 2 della ditta International Microbio (distribuito in Italia dalla ditta D.I.D.). Abbiamo utilizzato, per l'identificazione e la conta batterica, il terreno selettivo Mycoplasma A7 agar della ditta bioMérieux.

Il kit Mycoplasma IST 2 associa un brodo di coltura selettivo (brodo Urée-Arginine LYO 2) uti-

lizzato per lo screening ad una galleria con 22 test.

Il brodo Urée-Arginine LYO 2, venduto anche come prodotto separato, è composto dal reattivo liquido (R1) e dal reattivo liofilizzato (R2). Il reattivo R1 è utilizzato per la preparazione del campione e la ricostituzione del reattivo R2. Il brodo (R1+R2) contiene peptone di carne e di caseina, estratto di lievito, cloridrato d'arginina e cisteina, urea, rosso fenolo, miscela di PolyVitex, siero di cavallo e una miscela d'antibiotici.

La galleria comprende 22 test divisi in 3 sezioni:

1. Sezione d'identificazione (dalla cupola 1 alla 3)
2. Sezione di conta indicativa (cupole 4 e 5)
3. Sezione test di sensibilità (dalla cupola 6 alla 22)

Le tre sezioni con le relative cupole e significato corrispondente sono riportate in tabella 1.

**Tabella 1.** Pozzetti e loro finalità d'uso (coltura, identificazione, conta batterica e suscettibilità agli antibiotici) della Galleria Mycoplasma IST 2

POZZETTI	FINALITÀ
1	Controllo di crescita
2	Identificazione <i>U. urealyticum</i>
3	Identificazione <i>M. hominis</i>
4	Valori di <i>U. urealyticum</i> $\geq 10^4$ UFC (Unità Formanti Colonia)
5	Valori di <i>M. hominis</i> $\geq 10^4$ UFC (Unità Formanti Colonia)
6 e 7	Valutazione resistenza a Doxiciclina 4 e 8 mg/l
8 e 9	Valutazione resistenza a Josamicina 2 e 8 mg/l
10 e 11	Valutazione resistenza a Ofloxacina 1 e 4 mg/l
12 e 13	Valutazione resistenza a Eritromicina 1 e 4 mg/l
14 e 15	Valutazione resistenza a Tetraciclina 4 e 8 mg/l
16 e 17	Valutazione resistenza a Ciprofloxacina 1 e 2 mg/l
18 e 19	Valutazione resistenza a Azitromicina 0.12 e 4 mg/l
20 e 21	Valutazione resistenza a Claritromicina 1 e 4
22	Valutazione resistenza a Pristinamicina 2 mg/l

Il kit Mycofast Screening *EvolutioN* 2 è composto di un terreno di trasporto (U.M.M.t) da un brodo di coltura liofilizzato (U.M.M.lyo) costituito da siero di puledro, estratto di lievito, miscela d'antibiotici, urea, arginina e rosso fenolo, dalla galleria screening costituita da pozzetti vuoti, dall'attivatore di crescita di *M. hominis* (Supplemento *M.h*) e dalla Galleria Mycofast *EvolutioN* 2.

Il terreno U.M.M.lyo è stato ricostituito con il terreno U.M.M.t e distribuito in provette, conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  per un massimo di due mesi e utilizzate per la preparazione del campione.

La galleria Mycofast *EvolutioN* 2 comprende 10 pozzetti il cui contenuto è riportato nella tabella 2. Le piastre di agar A7 della ditta bioMérieux sono state seminate utilizzando il brodo urea-arginina inoculato con il campione da esaminare. La lettura delle piastre è stata eseguita dopo 24-72 ore di incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  in microaerofilia osservando

**Tabella 2.** Pozzetti e loro finalità d'uso (coltura, identificazione, conta batterica e suscettibilità agli antibiotici) della galleria Mycofast Evolution N 2

POZZETTI	FINALITÀ
1	Valori di <i>U. urealyticum</i> = 10 <sup>3</sup> UFC (Unità Formanti Colonia)
2	Valori di <i>U. urealyticum</i> = 10 <sup>4</sup> UFC (Unità Formanti Colonia)
3	Valori di <i>U. urealyticum</i> >= 10 <sup>5</sup> UFC (Unità Formanti Colonia)
4	Valutazione resistenza a Doxiciclina (8 mg/l)
5	Valutazione resistenza a Roxitromicina (4 mg/l)
6	Valutazione resistenza a Ofloxacina (4 mg/l)
da 7 a 9	Identificazione di <i>U. urealyticum</i> e/o <i>M. hominis</i>
10	Valori di <i>M. hominis</i> >= 10 <sup>4</sup> UFC (Unità Formante Colonia)

al microscopio (obiettivo 10x) la superficie della piastra. Le colonie di *M. hominis* si presentano all'esame microscopico con il caratteristico aspetto a uovo fritto e quelle di *U. urealyticum* a riccio di mare. La carica è espressa in Unità Formanti Colonia (UFC) secondo lo schema riportato in tabella 3.

**Tabella 3.** Determinazione della carica batterica in base al numero di colonie di *U. urealyticum* e/o di *M. hominis* per campo su piastre di agar A7 osservate al microscopio ottico con obiettivo 10x

COLONIE PER CAMPO (OBIETTIVO 10X)	CARICA BATTERICA
< 1 colonia	10 <sup>3</sup> UFC
Da 1 a 5 colonie	10 <sup>4</sup> UFC
Da 5 a 15 colonie	10 <sup>5</sup> UFC
> 15 colonie	10 <sup>6</sup> UFC

Come criterio di patogenicità per i tamponi endocervicali e uretrali è stata adottata la soglia, correntemente utilizzata, di 10<sup>4</sup> UFC (Unità Formanti Colonia), mentre per i campioni di urina e sperma abbiamo considerato significativa la presenza anche di cariche inferiori a 10<sup>4</sup> UFC per una migliore valutazione della sensibilità del metodo.

**Procedura:** Mycoplasma IST 2

Campione: 1 tampone di dacron prelevato dall'endocervice o dall'uretra; 200 µl di urina; 200 µl di liquido seminale diluito 1:10 con soluzione fisiologica sterile.

Il campione era inoculato nel flacone R1 a sua volta travasato nel flacone R2. Dopo accurata agitazione al vortex, 3 gocce della brodocoltura erano dispensate in punti distinti sulla superficie di una piastra di agar A7 e 0.5 ml trasferiti dal flacone R2 al flacone R1. Il flacone R1 era incubato in termostato a 37°C per lo screening e il flacone R2 conservato a -4°C per un periodo massimo di 48 ore.

Dopo 24-48 ore si procedeva alla lettura del flacone R1 osservando il viraggio di colore dal giallo (test negativo) al rosso (test positivo). In assenza di viraggio entro 48 ore il test era considerato negativo. In caso di positività si procedeva all'identificazione, numerazione e antibiogramma con

la galleria a 22 test. A tal fine 55 µl del flacone R2, conservato in frigorifero, erano trasferiti in ognuna delle cupole test della galleria IST 2, ricoperte poi con 2 gocce di olio di paraffina ciascuno.

Dopo incubazione per 24 ore a 37°C si procedeva alla lettura della cupola N. 4 per la conta delle colonie di *U. urealyticum*; la galleria era quindi incubata per ulteriori 24 ore per la lettura delle restanti cupole e il viraggio da giallo a rosso deponeva per la positivizzazione dei test.

*Mycofast Screening Evolution N 2*

Campione: 1 tampone di dacron prelevato dall'endocervice o dall'uretra; 200 µl di urina o di liquido seminale.

Il campione veniva inoculato nella provetta contenente il terreno U.M.M.lyo ricostituito con il terreno U.M.M.t da cui venivano successivamente prelevati 100 µl per distribuirli in un pozzetto vuoto della galleria screening, ricoperto poi con 2 gocce di olio di paraffina. Si conservava la provetta inoculata a -2-4°C per un massimo di 48 ore e s'incubava la galleria screening a 37°C per 24-48 ore, registrando l'eventuale viraggio di colore da giallo a rosso. In caso di positività si procedeva alla identificazione, numerazione e antibiogramma con la galleria Mycofast Evolution N 2 provvedendo a distribuire 100 µl del campione in provetta in ognuno dei 10 pozzetti della galleria.

Ai pozzetti 9 e 10 si aggiungevano 2 gocce di supplemento S.Mh e tutti i pozzetti venivano ricoperti con 2 gocce di olio di paraffina. La galleria era incubata a 37°C per 24 ore per i tamponi cervicali e uretrali, per 48 ore per gli altri campioni.

La crescita dei micoplasmi era evidenziata dalla alcalinizzazione del terreno con viraggio dal giallo al rosa-fucsia. L'identificazione si effettuava in funzione del viraggio specifico dei pozzetti 7, 8, 9 secondo lo schema riportato in tabella 4.

**Tabella 4.** Pozzetti della galleria Mycofast Evolution N 2 per l'identificazione di *U. urealyticum* e/o di *M. hominis*

	POZZETTO 7 (LINCOMICINA)	POZZETTO 8 (SXT)	POZZETTO 9 (ERITROMICINA)
<i>U. urealyticum</i>	rosa-fucsia	rosa-fucsia	giallo
<i>M. hominis</i>	giallo	rosa-fucsia	rosa-fucsia

**RISULTATI**

Dei 161 campioni esaminati 55 sono risultati positivi alla coltura su agar A7 (34.1%) di cui 44 per *U. urealyticum*, 8 per *M. hominis* e 3 per *U. urealyticum* e *M. hominis*. Delle 55 colture positive 48 provenivano da tamponi endocervicali, 1 da tampone uretrale, 2 da urina e 4 da sperma, vedi tabella 5.

Lo screening con il brodo Urée-Arginine LYO 2 del sistema Mycoplasma IST 2 è risultato positivo su 59 campioni di cui 4 falsi positivi per l'assenza di crescita su agar A7.

La sensibilità del test di screening utilizzando il brodo Urée-Arginine LYO 2 comparata alla coltura su agar A7 è stata pertanto del 100%, la specificità del 96.2%, il valore predittivo positivo del 93.2% ed il valore predittivo negativo del 100%, vedi tabella 6.

**Tabella 5.** Sedi di prelievo delle colture positive per *U. urealyticum* e/o di *M. hominis*

	<i>U. urealyticum</i>	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i> e <i>M. hominis</i>
Tampone endocervicale	37	8	3
Liquido seminale	4	0	0
Tampone uretrale	1	0	0
Urina	2	0	0

**Tabella 6.** Prestazioni del brodo screening Urée-Arginine LYO 2 (*Mycoplasma* IST 2) in rapporto agli isolamenti di *U. urealyticum* e/o di *M. hominis* su agar A7

		COLTURA SU AGAR A7	
		POSITIVA	NEGATIVA
Screening brodo Urée-Arginine LYO 2 ( <i>Mycoplasma</i> IST 2)	Positivo	55	4
	Negativo	0	102

Lo screening con il brodo UMMIyo del sistema Mycofast Screening *Evolution*N 2 è risultato positivo su 44 campioni, con 11 falsi negativi e nessun falso positivo.

La sensibilità del test di screening utilizzando il brodo Urée-Arginine LYO 2 comparata alla coltura su agar A7 è stata dell'80% e la specificità del 100%; il valore predittivo positivo del 100% ed il valore predittivo negativo del 90.6% , vedi tabella 7.

**Tabella 7.** Prestazioni del brodo screening UMMIyo (*Mycoplast* Screening *Evolution*N 2) in rapporto agli isolamenti di *U. urealyticum* e/o di *M. hominis* su agar A7

		COLTURA SU AGAR A7	
		POSITIVA	NEGATIVA
Screening brodo UMMIyo ( <i>Mycoplast</i> Screening <i>Evolution</i> N 2)	Positivo	44	0
	Negativo	11	106

I risultati della galleria *Mycoplasma* IST 2, eseguita sui campioni positivi allo Screening in rapporto alla coltura su agar A7 per *U. urealyticum* sono riassunti nella tabella 8.

I risultati della galleria *Mycoplasma* IST 2, eseguita sui campioni positivi allo screening in rapporto alla coltura su agar A7 per *M. hominis* sono riassunti nella tabella 9.

I risultati della galleria MYCOFAST *Evolution*N 2, eseguita sui campioni positivi allo screening su brodo UMMIyo, in rapporto alla coltura su agar A7 per *U. urealyticum* sono riassunti nella tabella 10. I risultati della galleria MYCOFAST *Evolution*N 2, eseguita sui campioni positivi allo Screening su brodo UMMIyo, in rapporto alla coltura su agar A7 per *M. hominis* sono riassunti nella tabella 11. In 3 campioni la coltura su agar A7 è risultata positiva per la presenza contemporanea di *M. hominis* e *U. urealyticum*. Di questi, 2 presenta-

**Tabella 8.** Prestazioni della galleria *Mycoplasma* IST 2 in rapporto alla coltura su agar A7 per *U. urealyticum*

		Coltura di <i>U. urealyticum</i> su agar A7		
		NEGATIVO	<10 <sup>4</sup> UFC	>=10 <sup>4</sup> UFC
		Negativo	0	1
Galleria <i>Mycoplasma</i> IST 2	<10 <sup>4</sup> UFC	3	8	5
	>=10 <sup>4</sup> UFC	0	1	29

**Tabella 9.** Prestazioni della galleria *Mycoplasma* IST 2 in rapporto alla coltura su agar A7 per *M. hominis*

		Coltura per <i>M. hominis</i> su agar A7	
		<10 <sup>4</sup> UFC	>=10 <sup>4</sup> UFC
		<10 <sup>4</sup> UFC	3
Galleria <i>Mycoplasma</i> IST 2	>=10 <sup>4</sup> UFC	0	5

**Tabella 10.** Prestazioni della galleria MYCOFAST *Evolution*N 2 in rapporto alla coltura su agar A7 per *U. urealyticum*

		Coltura di <i>U. urealyticum</i> su agar A7		
		Negativo	<10 <sup>4</sup> UFC	>=10 <sup>4</sup> UFC
		Negativo	0	1
Galleria MYCOFAST <i>Evolution</i> N 2	<10 <sup>4</sup> UFC	0	3	0
	>=10 <sup>4</sup> UFC	0	1	31

**Tabella 11.** Prestazioni della galleria MYCOFAST *Evolution*N 2 in rapporto alla coltura su agar A7 per *M. hominis*

		Coltura di <i>M. hominis</i> su agar A7		
		Negativo	<10 <sup>4</sup> UFC	>=10 <sup>4</sup> UFC
		Negativo	0	2
Galleria MYCOFAST <i>Evolution</i> N 2	<10 <sup>4</sup> UFC	0	0	0
	>=10 <sup>4</sup> UFC	0	0	3

**Tabella 12.** Sensibilità di *Ureaplasma urealyticum* ai vari antibiotici utilizzando la galleria *Mycoplasma* IST 2

ANTIBIOTICO E RELATIVE					
CONCENTRAZIONI IN MG/L		SENSIBILE	INTERMEDIO	RESISTENTE	
Doxiciclina	4	8 (42%)	1 (2%)	1 (2%)	
Josamicina	2	8 (43%)	1 (2%)	0 (0%)	
Ofloxacina	1	4 (15%)	22 (50%)	7 (16%)	
Eritromicina	1	4 (29%)	13 (29%)	2 (5%)	
Tetraciclina	4	8 (41%)	2 (5%)	1 (2%)	
Ciprofloxacina	1	2 (7%)	21 (48%)	16 (36%)	
Azitromicina	0.12	4 (38%)	5 (11%)	1 (2%)	
Claritromicina	1	4 (40%)	3 (7%)	1 (2%)	
Pristinamicina	2	44 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

**Tabella 13.** Sensibilità di *Ureaplasma urealyticum* ai vari antibiotici utilizzando la galleria *Mycoplast* Screening *Evolution*N 2

ANTIBIOTICO/CONCENTRAZIONE IN MG/L	SENSIBILE	RESISTENTE
Doxiciclina	8 (100%)	0 (0%)
Ofloxacina	4 (91%)	3 (9%)
Roxitromicina	4 (94%)	2 (6%)

vano una carica per *M. hominis* >= 10.000 UFC/ml e per *U. urealyticum* < 10.000 UFC/ml ed 1 ambedue i microrganismi con una carica batterica >= 10.000 UFC/ml. I risultati concordavano con la Galleria *Mycoplasma* IST 2, mentre con la galleria MYCOFAST *Evolution*N 2 i due campioni con *M. hominis* >=10.000 UFC/ml e *U. urealyticum* <10.000 UFC/ml erano positivi solo per la presenza di *U.urealyticum* con carica batterica >= 10.000 UFC/ml.

Sui 55 pazienti positivi per *Ureaplasma urealyticum* e/o *Mycoplasma hominis* abbiamo osservato la presenza contemporanea di *Gardnerella vaginalis* in 27 casi pari al 49.1%.

La sensibilità ai vari antibiotici di *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* e di *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* in coltura mista, utilizzando Mycoplasma IST 2 e Mycofast Screening *EvolutioN* 2 è riportata nelle tabelle 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

**Tabella 14.** Sensibilità di *Mycoplasma hominis* ai vari antibiotici utilizzando la galleria Mycoplasma IST 2

ANTIBIOTICO E RELATIVE CONCENTRAZIONI IN MG/L	SENSIBILE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Doxiciclina 4 8	8 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Josamicina 2 8	7 (87%)	1 (13%)	0 (0%)
Ofloxacina 1 4	1 (13%)	4 (50%)	3 (38%)
Eritromicina 1 4	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)
Tetraciclina 4 8	7 (87%)	1 (13%)	0 (0%)
Ciprofloxacina 1 2	3 (38%)	0 (0%)	5 (62%)
Azitromicina 0.12 4	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)
Claritromicina 1 4	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)
Pristinamicina 2		0 (0%)	0 (0%)

**Tabella 15.** Sensibilità di *Mycoplasma hominis* ai vari antibiotici utilizzando la galleria Mycofast Screening *EvolutioN* 2

ANTIBIOTICO/CONCENTRAZIONE IN MG/L	SENSIBILE	RESISTENTE
Doxiciclina 8	3 (100%)	0 (0%)
Ofloxacina 4	2 (67%)	1 (33%)
Roxitromicina 4	2 (67%)	1 (33%)

**Tabella 16.** Sensibilità di *Mycoplasma* e *Ureaplasma* in coltura mista ai vari antibiotici utilizzando la galleria Mycoplasma IST 2

ANTIBIOTICO E RELATIVE CONCENTRAZIONI IN MG/L	SENSIBILE	INTERMEDIO	RESISTENTE
Doxiciclina 4 8	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Josamicina 2 8	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Ofloxacina 1 4	0 (0%)	1 (33%)	2 (67%)
Eritromicina 1 4	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Tetraciclina 4 8	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Ciprofloxacina 1 2	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Azitromicina 0.12 4	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Claritromicina 1 4	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Pristinamicina 2	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

**Tabella 17.** Sensibilità di *Mycoplasma* e *Ureaplasma* in coltura mista ai vari antibiotici utilizzando la galleria Mycofast Screening *EvolutioN* 2

ANTIBIOTICO/CONCENTRAZIONE IN MG/L	SENSIBILE	RESISTENTE
Doxiciclina 8	3 (100%)	0 (0%)
Ofloxacina 4	2 (67%)	1 (33%)
Roxitromicina 4	2 (67%)	1 (33%)

**DISCUSSIONE**

Poiché il ruolo di *M. hominis* e *U. urealyticum* è oggi meglio definito, l'importanza dell'isolamento e dello studio della sensibilità agli antibiotici per una terapia appropriata è aumentata. Dai dati ottenuti il kit Mycoplasma IST2 dimostra

elevata sensibilità (100%) e specificità (96.2%) del test di screening. La galleria Mycoplasma IST2 evidenzia in rapporto al test di riferimento, in 8 campioni positivi per *M. hominis* un'ottima concordanza (100%) e in 34 campioni positivi per *U. urealyticum*, con carica significativa  $\geq 10.000$  UFC/ml, una buona concordanza (85%).

La galleria ha inoltre evidenziato la presenza contemporanea di *M.hominis* e *U. urealyticum* nei 3 casi di infezione mista osservati.

A fronte di un'elevata specificità (100%), Mycofast Screening *EvolutioN* 2 ha dimostrato invece una bassa sensibilità (80%) del test di screening. La galleria ha evidenziato un ottimo grado di concordanza (100%) nei confronti di *U. urealyticum* con carica significativa  $\geq 10.000$  UFC/ml; non altrettanto per *M. hominis*, dove la galleria è risultata negativa in 4 campioni su 8 esaminati considerando anche le infezioni miste.

I risultati ottenuti indicano un'elevata sensibilità del test di screening del kit Mycoplasma IST2 mentre la galleria da un numerazione indicativa della carica batterica, che può essere confermata facendo delle subculture su terreno solido.

Si ritiene invece necessaria l'associazione di un terreno di coltura solido al kit Mycofast Screening *EvolutioN* 2 per la bassa sensibilità del test di screening, in particolare nei confronti di *M. hominis*.

Per quanto riguarda le scelte terapeutiche i micoplasmi sono naturalmente resistenti a penicilline, cefalosporine e rifampicina. *M. hominis* è naturalmente resistente all'eritromicina mentre la resistenza ai fluorochinoloni, come per altre specie, è associata ad una mutazione della *gyrA* (1). La resistenza di *M. hominis* e *U. urealyticum* alle tetracicline, legata apparentemente all'acquisizione di un gene streptococcico *tetM* (12), sta assumendo maggior importanza a causa dell'aumentato utilizzo di questi farmaci nelle infezioni del tratto genitale ed in altri distretti cosicché in alcune zone geografiche si è osservato un incremento almeno fino al 10% (10, 19, 20).

È importante, così, considerare i vantaggi della galleria Mycoplasma IST 2 perché permette il dosaggio di 9 molecole a 2 concentrazioni ad eccezione della pristinamicina e la possibilità di saggiare l'azitromicina, antibiotico sempre più utilizzato per il trattamento delle uretriti non-gonococciche e di altre infezioni in cui potrebbe essere implicata *C. trachomatis* (7, 19). L'ampio pannello di antibiotici disponibili per il saggio di sensibilità può indirizzare inoltre verso le più opportune opzioni terapeutiche in particolare in quelle situazioni, es. gravidanza, dove non è possibile utilizzare fluorochinoloni e tetracicline, o in presenza di ceppi resistenti alle tetracicline.

Il test di sensibilità con la galleria Mycoplasma IST 2 eseguito su 34 ceppi di *U. urealyticum* ha evidenziato: nessun ceppo resistente a josamicina e pristinamicina, solo il 2% di ceppi resistenti a tetraciclina, doxiciclina, azitromicina e claritromicina, 5% a eritromicina, 16% a ofloxacina e 36% a ciprofloxacina.

Con la galleria Mycofast Screening *Evolution 2*, tutti i 35 ceppi di *U. urealyticum* testati sono risultati sensibili a doxiciclina, il 9% resistenti a ofloxacina ed il 6% a roxitromicina.

Per *M. hominis* gli 8 stipiti saggiati con Mycoplasma IST 2 sono risultati tutti resistenti ad eritromicina, claritromicina ed azitromicina, 3 (38%) ceppi resistenti a ofloxacina, 5 (62%) a ofloxacina, mentre nessuna resistenza si è osservata nei confronti di doxiciclina, tetraciclina josamicina e pristinamicina.

Il nostro studio conferma un elevato grado di associazione di campioni positivi per *M. hominis* e *U. urealyticum* con *G. vaginalis* ad indicare un possibile effetto sinergico reciproco.

## BIBLIOGRAFIA

- Bébear CM, Bové JM, Bébear C, Renaudin J. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 269-73.
- Bébear C, De Barbeyrac B, Bernet C, Renaudin H. Méthodes d'exploration des infections à mycoplasmes- *Ann Bio Clin* 1989; 47: 415-20.
- Blanco JD, Gibbs RS, Malherbe H, Strickland-Cholmeley M, St. Clair PJ, Castaneda YS. A controlled study of genital mycoplasmas in amniotic fluid from patients with intra-amniotic infection. *J Infect Dis* 1983; 147: 650-3.
- Cassel GH, Waites KB, Crouse DT. Mycoplasmal infections. In: Remington JS and Klein JO (ed). *Infectious disease of the fetus and Newborn Infant*, 4th ed. The WB Saunders Co., Philadelphia, Pa 1994: 619-56.
- Fiacco V, Miller MJ, Carney E, Martin WJ. Comparison of media for isolation of *Ureaplasma urealyticum* and genital Mycoplasma species. *J Clin Microb* 1984; 20: 862-5.
- Gibbs RS, Blanco PI, St. Clair PJ, Castaneda YS. *Mycoplasma hominis* and intrauterine infection in late pregnancy. *Sex Transm Dis* 1983; 10 (Suppl. 4): 303-6.
- Gilbert NG, Moellering Jr RC, Sande MA. Guida Sanford alla Terapia Antimicrobica. Momento Medico 2002; 32° Edizione pag 61.
- Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 450-4.
- Holst E, Goffeng AR, Andersch B. Bacterial vaginosis and vaginal microorganism in Idiopathic Premature Labor and Association with Pregnancy Outcome. *J Clin Microb* 1994; 32: 176-86.
- Koutsky LA, Stamm WE, Brunham RC, et al. Persistence of *Mycoplasma hominis* after therapy: importance of tetracycline resistance and of coexisting vaginal flora. *Sex Transm Dis* 1983; 10 (Suppl. 4): 366-70.
- McCormack WM, Lee YH, Lin JS, Rankin JS. Genital mycoplasmas in postpartum fever. *J Infect Dis* 1973; 127: 193-6.
- Roberts MC, Kenny GE. Dissemination of the *tetM* tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1986; 29: 350-2.
- Robertson JA, Alfa M, Boatman ES. The morphology of the cells and colonies of *Mycoplasma hominis*: *Sex Transm Dis* 1983; 10 (suppl.): 232-9.
- Shepard MC, Lunnceford. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinical material. *J Clin Microbiol* 1976; 3: 613-25.
- Shepard MC. In: Razin S and Tully JG (ed.), vol. 1. Academic Press, Inc, New York, NY *Methods in Mycoplasmaology* 1983; 137-46.
- Stamm We, Running K, Hale J, Holmes KK. Etiologic role of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in women with the acute urethral syndrome. *Sex Transm Dis* 1983; 10 (Suppl.4): 318-22.
- Taylor-Robinson D. Genital mycoplasma infections. *Clin Lab Med* 1989; 9: 501-23.
- Taylor-Robinson D. Mycoplasmal and mixed infections of the human male urogenital tract and their possible complications. In: Razin S and Barile MF (ed.). *The Mycoplasmas*, vol. 4 Academic Press, Inc, New York, NY 1985; 27-63.
- Taylor-Robinson D, Bébear C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40: 622-30.
- Taylor-Robinson D, Furr PM. Clinical antibiotic resistance of ureaplasma urealyticum. *Pediatric Infectious Disease* 1986; 335-7.
- Taylor-Robinson D, McCormack WM. The genital mycoplasmas (first of two parts). *N Engl J Med* 1980; 302: 1003-10.
- Taylor-Robinson D, McCormack WM. The genital mycoplasmas (first of two parts). *N Engl J Med* 1980; 302: 1063-7.
- Taylor-Robinson D, Munday PE. Mycoplasmal infection of the female genital tract and its complications. In: Hare MJ (ed.), *Genital Tract Infection in Women*. Churchill Livingstone, Ltd. Edinburgh, United Kingdom 1988; 228-47.
- Thomsen AC. Mycoplasmas in human pyelonephritis: demonstration of antibodies in serum and urine. *J Clin Microbiol* 1978; 8: 197-202.
- Waites KB, Taylor-Robinson D. Mycoplasma and Ureaplasma. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC 1999; 782-94.
- Wallace RJ Jr, Alpert S, Browne K, Lin J-S, McCormack WM. Isolation of *Mycoplasma hominis* from blood cultures in patients with postpartum fever. *Obstet Gynecol* 1978; 51: 181-5.

### Romano Mattei

Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Ospedale Campo di Marte  
Via dell'Ospedale, 55032 Lucca  
Tel.: 0583 970313; Fax 0583 970402;  
E-mail: [rmncrmn@tin.it](mailto:rmncrmn@tin.it)